

Fuerzas en acción

(varias transparencias tomadas de charlas de Carlos Bustamante, UCSF)

Fuerzas dentro de las células

Actualmente existen métodos que permiten manipular moléculas únicas y medir las fuerzas que se ejercen en distintos procesos

Estos métodos son muy usados para estudiar los fenómenos que ocurren dentro de las células, ya que, procesos como:

La replicación y segregación de cromosomas,

La transcripción del ADN, la recombinación y traducción del ARN,

Son llevados a cabo por pocas moléculas.

Los métodos de molécula única han permitido, por primera vez, poder:

medir las fuerzas que mantienen la estructura tri-dimensional de las macromoléculas

medir las **fuerzas** generadas durante reacciones químicas y bioquímicas

caracterizar la dinámica de los así llamados motores motores moleculares.

ejercer fuerzas externas para alterar el estado de moléculas.

Los métodos de molécula única muestran, entre otras cosas, el rol que juegan las fuerzas, siendo éstas prácticamente observables directos del experimento.

Esta área de investigación puede ser llamada

Mecanoquímica

Requisitos técnicos

I) Métodos para localizar las moléculas: microscopio

a) Optico: Marcación fluorescente

b) Microscopios de sonda: STM, SFM (AFM), SNOM

II) Medios para manipular moléculas únicas:

a) Transductores mecánicos: soft cantilevers, micropipetas, etc

b) Campos: eléctrico, magnético

III) Métodos de detección espacial: en general, métodos ópticos

Métodos y Aplicaciones

Table 1 | **Overview of single-molecule manipulation methods**

Methods	$F_{\min-\max}$ (N) [§]	X_{\min} (m) [§]	Stiffness (N m ⁻¹)	Applications	Practical advantages
Cantilevers*	10 ⁻¹¹ -10 ⁻⁷	10 ⁻¹⁰	0.001-100	Protein/polysaccharides ^{6,64} Bond strength ^{65,66}	High spatial resolution Commercially available
Microneedles*	10 ⁻¹² -10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶ -1	Myosin motor force ¹² DNA/titin strength ^{26,28}	Good operator control Soft spring constant
Flow field [†]	10 ⁻¹³ -10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	n.a.	DNA dynamics ³⁸ RNA polymerase ³⁶	Rapid buffer exchange Simplicity of design
Magnetic field [†]	10 ⁻¹⁴ -10 ⁻¹¹	10 ⁻⁸	n.a.	DNA entropic elasticity ⁸ Topoisomerase activity ⁴¹	Specificity to magnets Ability to induce torque
Photon field [†]	10 ⁻¹³ -10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻³	Protein motors ^{13,14} Protein unfolding ⁵²	Specific manipulation High force resolution

*Mechanical transducers: probes are bendable beams; spatial location is by beam deflection. [†]External field manipulators: probes are microscopic beads; spatial location is by bead displacement. [§]These numbers represent only empirical, not absolute limits. ($F_{\min-\max}$, force range; X_{\min} , minimum displacement.)

Bustamante *et al.* Nature Rev. Mol. and Cell Biol., 1, 130 - 136 (2000).

Aplicaciones

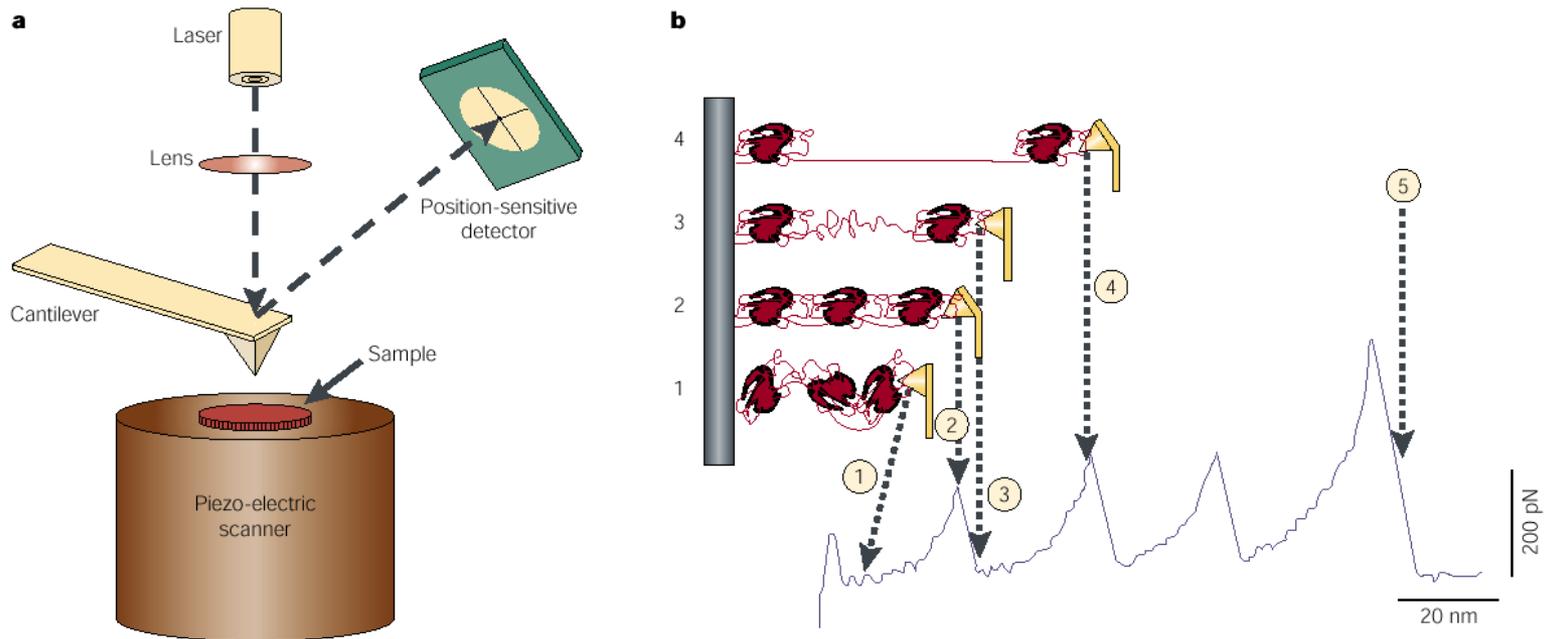


Figure 1 | **Applications of the scanning force microscope (SFM).** **a** | The principal SFM components. Laser light is focused onto the back of a cantilever that ends with a nanometre-scale tip. The reflection and corresponding position of the tip is detected by a position-sensitive photodiode. A piezo-electric scanner moves the sample in all directions, enabling the tip to scan topography or to extend molecules attached to the surface. **b** | Diagrams and force curves showing the mechanical unfolding of repeating immunoglobulin-like domains^{6,64}. As the distance between the surface and tip increases (from state 1 to state 2), the molecule extends and generates a restoring force that bends the cantilever. When a domain unfolds (state 3), the free length of the protein increases, relaxing the force on the cantilever. Further extension again results in a restoring force (state 4). The last peak represents the final extension of the unfolded molecule before detachment from the SFM tip (state 5).

Bustamante *et al.* Nature Rev. Mol. and Cell Biol., 1, 130 - 136 (2000).

Aplicaciones

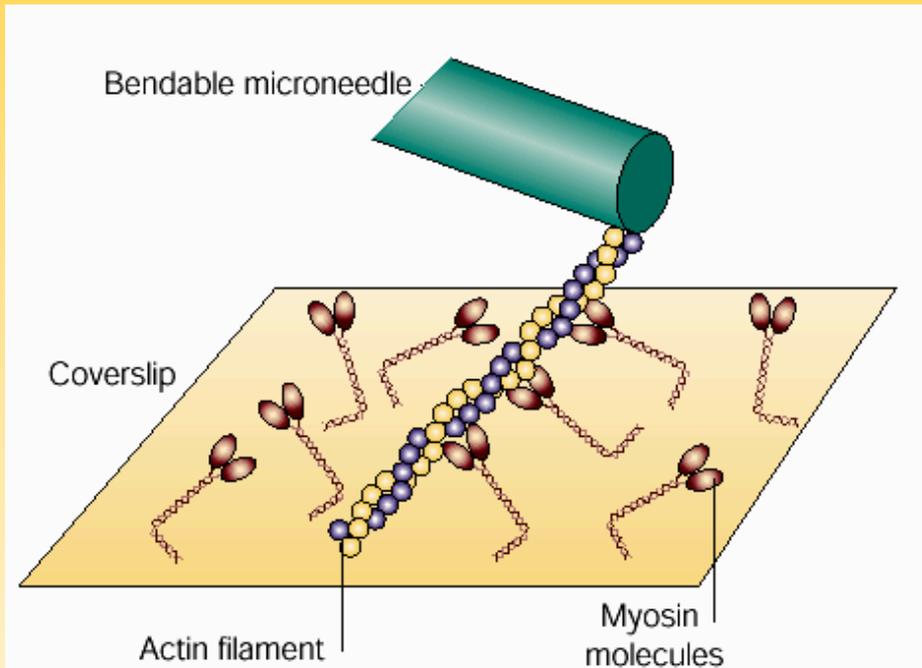


Figure 2 | **Using a microneedle to measure the force of myosin acting on actin.** A bendable microneedle coated in myosin heads (not shown) catches an actin filament. This filament is brought into contact with a glass coverslip coated in myosin molecules. In the presence of ATP, the myosin drags the actin filament across the coverslip and generates a force on the microneedle, which is observable by video-fluorescence microscopy.

Aplicaciones

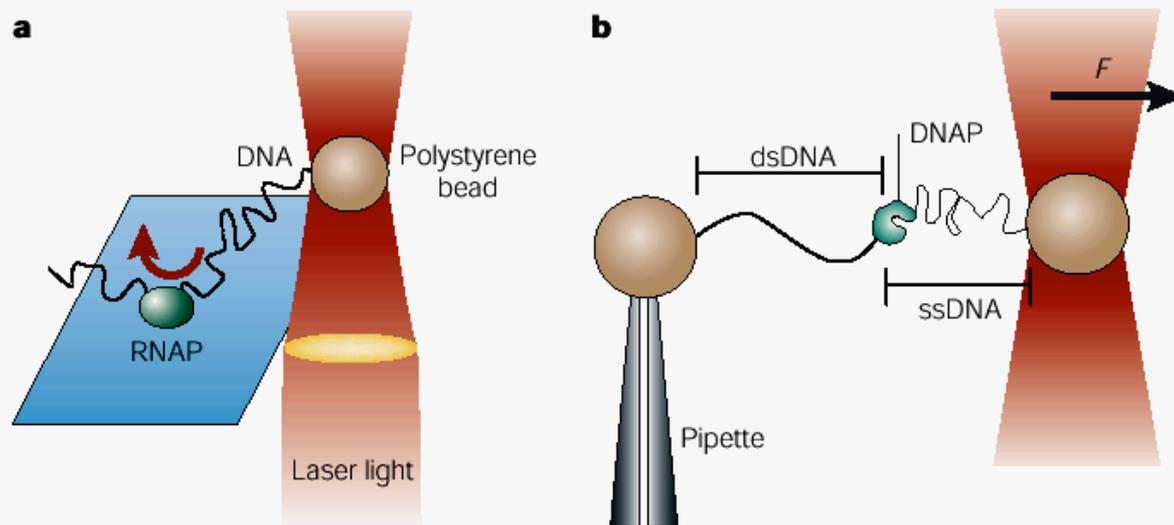


Figure 4 | **Geometries of typical optical-trap single-molecule experiments.** **a** | An optical trap measuring the force generated during transcription by a single RNA polymerase molecule (RNAP)⁵⁴. During transcription, an RNAP bound nonspecifically to a glass slide must thread the template and do work against a load applied by the optical trap through a polystyrene bead attached at the end of the DNA molecule. **b** | A single-stranded DNA molecule, bound with a primer, connects a bead fixed at the end of a micropipette and a bead held in the optical trap. A feedback circuit is used to keep the DNA molecule at a fixed tension, F . As the DNAP converts single-stranded DNA into double-stranded DNA, keeping the tension constant requires the pipette to adjust its position relative to the optical trap by an amount proportional to the movement of the enzyme over the template¹¹.

Escalas de los Experimentos

Types of processes	Time
Elementary Processes	
Electronic Transition	$10^{-14} - 10^{-15}$ sec
Local Vibration	$10^{-12} - 10^{-13}$ sec
Small Conformational Change	$10^{-9} - 10^{-6}$ sec
Intermediate Processes	
Bimolecular Dissociation	$10^{-3} - 10^{-6}$ sec
Bond Breaking or Formation	$10^{-3} - 10^{-6}$ sec
Cyclic Processes	
Kinesin steps at V_{max}^a	~ 13 msec
Myosin steps at V_{max}^b	< 7 msec
Enzyme Turnover Rate:	
Carbonic anhydrase ^c	$1 - 2$ μ sec
Chymotrypsin ^c	10 msec
ATP synthase	5 - 10 mec
Bacteriophage Packing Rate ^d	~ 3 msec- nt ⁻¹
Prokaryotic Replication:	
T4 ^e	$1 - 2$ msec-nt ⁻¹
<i>E. colif</i>	~ 2 msec-nt ⁻¹
Eukaryotic Replication ^g :	
<i>X. Laevis</i> (Frog)	~ 2 msec-nt ⁻¹
<i>D. Melanogaster</i> (fly)	$\sim .35$ msec-nt ⁻¹
Prokaryotic Transcription ^h —	$\sim 20 - 50$ msec- nt ⁻¹
Eukaryotic Transcription ^l	40 - 50 msec- nt ⁻¹
Prokaryotic Translation ^j	50 - 60 msec- aa ⁻¹
Eukaryotic Translation ^k	0.5 - .1 sec-aa ⁻¹
Unit Processes	
Replicat. of ave. prokaryotic gene	2 secs
Transcript. of ave. prokaryotic gene	20 - 50 secs
Nuclear separation in post anaphase ^l	$\sim 1 - 2$ min
Chromosome Segregation ^m	10 - 20 min
Protein Folding	\sim secs - hrs

Rangos de fuerzas

Las fuerzas que se ejercen dentro de las células típicamente están en el rango de los picoNewtons

Process	Force	Length or Velocity
Myosin power stroke ^a	3-5 pN*	5-17 nm
Kinesin step ^b	5-7 pN*	8 nm
RNA polymerase ^c	14 pN*	0.34 nm
Biotin-Streptavidin rupture ^d	300-400 pN	~0.7 nm
DNA entropic elasticity (phage λ) ^e	0.01 - 10 pN	4 - 15 μm^\dagger
DNA intrinsic elasticity (phage λ) ^f	10 - 70 pN	15 - 18 μm^\dagger
Protein compressibility (Lysozyme) ^g	~ 1000 pN	~ 1 nm [†]
Kinesin moving on microtubule ^h	~ 5 pN [†]	~ 600 nm/sec

a (Finer *et al.*, 1994)

b (Svoboda *et al.*, 1993)

c (Yin *et al.*, 1995)

d (Chilkoti *et al.*, 1995)

e (Smith *et al.*, 1992)

f (Smith *et al.*, 1996)

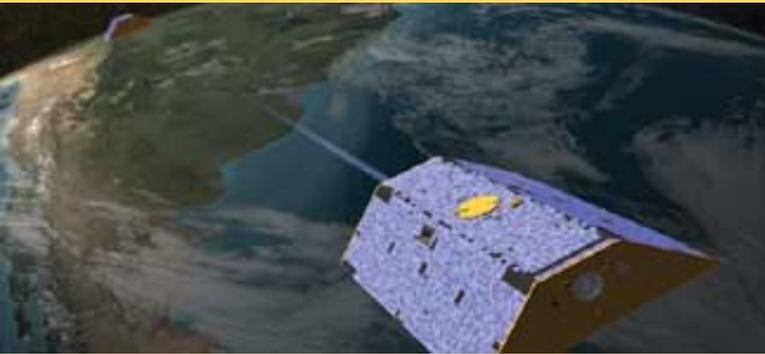
g (Radmacher *et al.*, 1994a)

h (Svoboda and Block, 1994b)

* Force required to stall motion

† distance stretched or compressed to generate the listed force

En geología las fuerzas de interés son de otro orden de magnitud. Sin embargo, también interesa hacer mediciones precisas, por ejemplo, de la gravedad en la Tierra.



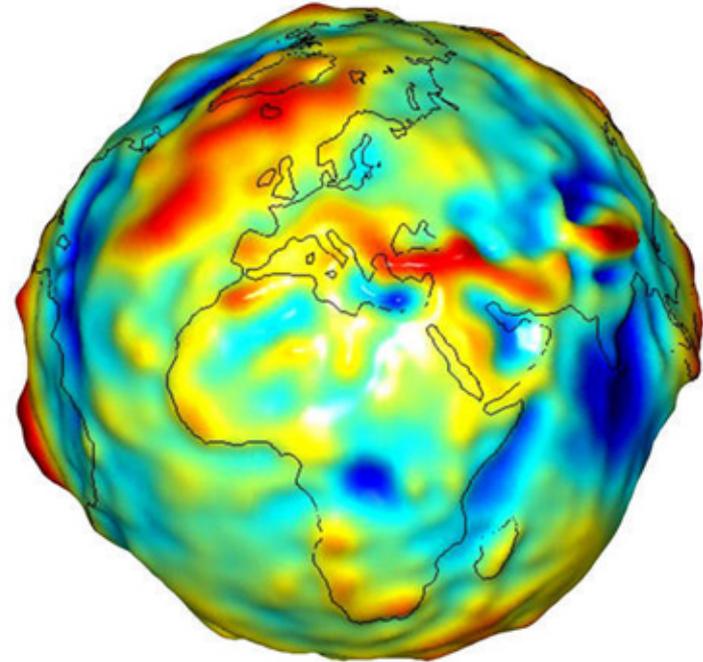
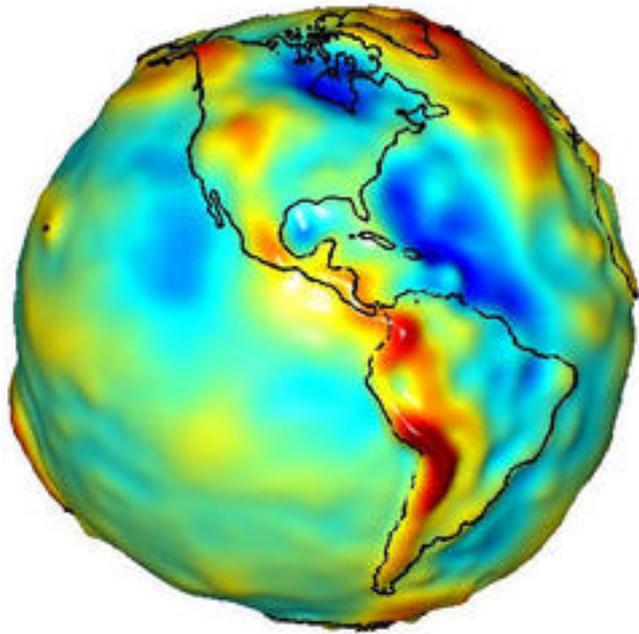
En 2002 se enviaron dos satélites mellizos para medir la gravedad terrestre con gran precisión (Misión Grace: <http://www.csr.utexas.edu/grace/>).

A medida que los satélites se mueven alrededor de la Tierra, las pequeñas variaciones de la gravedad que siente cada uno modifican su movimiento relativo lo que permite inferir dichas variaciones.

Mejorar la precisión con la que se conoce la gravedad permite:
Tener un mejor sistema de referencia para definir coordenadas

Calcular mejor las órbitas de los satélites

Estimar mejor las elevaciones locales de la tierra



Pequeñas inhomogeneidades en la fuerza gravitatoria sobre la superficie de la Tierra medidas por la misión *Grace*. Con esta misión no sólo interesa conocer la gravedad sino inferir cuáles son las inhomogeneidades en la estructura de la Tierra que causan las variaciones observadas. En particular, busca determinar las variaciones en el contenido de agua en distintas zonas.