

CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias



BIOFÍSICA DE CENTROSOMAS Y ADN MEDIANTE MANIPULACIÓN ÓPTICA

Memoria presentada por

Silvia Hormeño Torres

para optar al grado de Doctora en Biología Molecular

Directores:

Dr. D. J. Ricardo Arias González de la Aleja

Dr. D. José María Valpuesta Moralejo

Madrid, 2010

A mi madre

Agradecimientos

Siempre había pensado que escribir esta sección de la tesis era algo sencillo, pero ahora sé que estaba equivocada. Son muchas las caras y las situaciones que vienen a mi memoria al echar la vista atrás y es difícil limitar a un par de páginas todas las frases de agradecimiento que me gustaría incluir aquí. Durante estos enriquecedores años he tenido la suerte de contar con muchas personas que han contribuido al desarrollo de mi trabajo, que me han ayudado o que me han alentado en los momentos difíciles. Os estoy muy agradecida por ello e intentaré demostrarlo lo mejor posible en estas líneas.

En primer lugar, quiero mostrar mi gratitud a mis dos directores de tesis: J. Ricardo Arias González y José María Valpuesta. A Ricardo, por todo el trabajo que hemos realizado juntos, desde que comenzamos la construcción de las pinzas ópticas hasta ahora. Gracias por el tiempo y esfuerzo que has dedicado a mi formación, y por el apoyo constante que me has brindado. A José Mari, por confiar en mí para la realización de este trabajo y porque siempre has sabido encontrar tiempo para discutir de ciencia y resolver mis dudas.

Quiero agradecer a José L. Carrascosa, por sus sugerencias e inestimables indicaciones científicas, y a nuestros otros colaboradores Borja Ibarra, Fernando Moreno Herrero y Bodo M. Lange. Gracias también a las personas que me han ayudado con su trabajo o que han facilitado el mío: Javi Chichón, Mari Carmen Rodríguez, Pedro Tartaj, Trinidad Cuesta, Francisco Malpartida, Marco Marenchino, Ramón Campos Olivas y Guillermo Montoya.

No puedo dejar de dar las gracias a Carlos Bustamante (U. Berkeley) por impulsar la creación de nuestro laboratorio de biofísica de moléculas individuales, y a Steven B. Smith (U. Berkeley), por su valiosa ayuda en las etapas finales de la construcción de las pinzas ópticas y por su amabilidad al atender todas las dudas que surgían sobre el instrumento.

Gracias también a Marileen Dogterom, en cuyo laboratorio (FOM Institute AMOLF, Amsterdam) realicé una provechosa y didáctica estancia durante el verano de 2007. A Julien Husson, del que tanto aprendí, y al resto del grupo por su amabilidad y cálida acogida.

Muchas gracias a todos los que son y han sido compañeros en el CNB y en el Instituto Nicolás Cabrera (UAM), donde desarrollé la primera mitad de la tesis. No puedo imaginar un ambiente de trabajo más cómodo y agradable que el que he tenido la suerte de encontrar en estos dos laboratorios.

En el CNB, gracias a María, Ana C., Adriana y Elías, por ser tan buenos compañeros, por su afecto y por hacer que el día a día fuera tan agradable; a Marina, por recibir con una sonrisa todas mis consultas “tontas” sobre biología; a Jorge, de quien aprendí durante mis primeros meses en el laboratorio; y a todos mis queridos compañeros del S0, S1 y S5, especialmente, a Alina, Mari Ángeles, Ana B., José A., Álvaro, Roberto, Hugo, Mar, María José, Sonia, Elena, Dani, Encarna, Rocío, Jaime, JR y José Jesús (qué bueno es tener cerca a gente como vosotros). Gracias también a todo el personal del CNB, especialmente, a Nica por su profesionalidad en el taller del centro. No me olvido de Benjamín, Carolina y Maru, qué bien que cada vez haya más físicos investigando biología.

En el Instituto Nicolás Cabrera, quiero dar las gracias a Paloma (con quien tanto he compartido) y a Sara, Marta I., Amanda, Marta R., Bea, Pablo, Alfonso, Marisela, Raúl y Gonzalo G., por ser tan buenos compañeros dentro y fuera del laboratorio (cuánto me acuerdo de vosotros).

Muchísimas gracias a mi familia por su apoyo y confianza incondicionales, especialmente, a mi madre, Paqui, y a mi hermano, Raúl (no sé qué haría sin vosotros). Gracias también a Gonzalo por tantos motivos que no sé resumirlos. Gracias a todos mis buenos amigos y amigas, que han seguido de cerca mis progresos y frustraciones con la tesis.

Finalmente, quiero agradecer a la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid por la financiación de 4 años de beca-contrato de formación de personal investigador y de mi estancia en Holanda, y al Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA Nanociencia) por la financiación otorgada para acabar esta tesis doctoral.

Madrid, 18 de Marzo de 2010

Indice

Abreviaturas, siglas y símbolos	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1. Biofísica de moléculas individuales	8
1.2. Información disponible en los experimentos de moléculas individuales	10
1.3. Métodos para localizar moléculas	12
1.4. Medios de actuar sobre las moléculas	13
1.4.1. Transductores mecánicos	14
a. Micropalancas	
b. Microagujas y micropipetas	
1.4.2. Campos externos	15
a. Campos eléctricos	
b. Campos magnéticos	
c. Campos hidrodinámicos	
d. Campos de fotones	
1.5. Origen de la técnica de pinzas ópticas	18
1.6. Pinzas ópticas en biología molecular y celular	19
1.6.1. Pinzas ópticas en biología celular	21
1.6.2. Propiedades mecánicas de los ácidos nucleicos	22
1.6.3. Propiedades elásticas de otros polímeros y plegamiento de proteínas	24
1.6.4. Motores moleculares	25
a. Lineales	
b. Motores moleculares de unión a ácidos nucleicos	
c. Empaquetamiento viral	
1.7. Introducción a los proyectos biofísicos de esta tesis	29
1.7.1. ADN en condiciones de baja humedad	29
1.7.2. Centrosomas	32
Objetivos	35
Resultados	39
2. Construcción de un instrumento de pinzas ópticas que mide la fuerza a partir del cambio de momento de la luz	41
2.1. Origen de las fuerzas de atrapamiento	44
2.2. Teoría del sensor de fuerzas	46
2.3. Diseño instrumental	51
2.4. Óptica de rayos	53
2.4.1. Camino óptico de los láseres IR	54
2.4.2. Camino óptico de la luz de iluminación	55

2.4.3. Formación de la imagen de videomicroscopía	56
2.5. Medida de distancias	56
2.6. Control electrónico de las pinzas ópticas	57
2.7. Sistema de fluidos	60
3. Estabilidad mecánica de moléculas individuales de ADN en baja humedad con pinzas ópticas: estudio con pinzas ópticas	65
3.1. Materiales y métodos	68
3.1.1. Procesamiento de las muestras de ADN	68
3.1.2. Microesferas de poliestireno	71
3.1.3. Soluciones tampón y mezclas de etanol	72
3.1.4. Dicroísmo circular	72
3.1.5. Experimentos con pinzas ópticas	73
3.1.6. Determinación del cambio de longitud de contorno del ADN en soluciones etílicas	73
3.2. Resultados	74
3.2.1. Caracterización del ADN por dicroísmo circular	74
3.2.2. Caracterización mecánica de moléculas individuales de ADN en tampón	76
3.2.3. Comportamiento mecánico de moléculas individuales de ADN en mezclas de tampón y etanol	77
a. Condensación	
b. Transición de sobre-estiramiento	
c. Histéresis y desnaturalización	
4. Estabilidad mecánica de moléculas individuales de ADN en baja humedad con pinzas magnéticas y AFM	87
4.1. Materiales y métodos	90
4.1.1. Muestras de ADN, tampones y mezclas de etanol	90
4.1.2. Pinzas magnéticas	90
4.1.3. Microscopía de fuerzas atómicas	93
4.2. Resultados	93
4.2.1. Pinzas magnéticas	93
a. Experimentos a fuerza constante	
b. Condensación modulada por la tensión	
c. Curvas de fuerza-extensión	
4.2.2. AFM	97
5. Propiedades eléctricas e hidrodinámicas de centrosomas medidas con pinzas ópticas	99
5.1. Materiales y métodos	102
5.1.1. Preparación de centrosomas	102
5.1.2. Criomicroscopía electrónica	102
5.1.3. Experimentos de centrosomas con pinzas ópticas	102
5.1.4. Medidas de fuerza eléctrica	103
5.1.5. Soluciones tampón y microesferas de referencia	104
5.1.6. Análisis de tamaño hidrodinámico	104
a. Determinación del tamaño por la ley de Stokes	
b. Determinación del tamaño por ruido térmico	

5.1.7. Movilidad electroforética de microesferas de estreptavidina	106
5.1.8. Determinación de la carga eléctrica	106
5.2. Resultados	107
5.2.1. Comportamiento hidrodinámico	107
a. Tamaño hidrodinámico de microesferas de poliestireno	
b. Tamaño hidrodinámico de centrosomas	
5.2.2. Comportamiento eléctrico	113
a. Movilidad electroforética de microesferas control	
b. Carga y punto isoelectrico del centrosoma	
5.2.3. Dinámica estructural del centrosoma dependiente de pH	117
6. Discusión	121
6.1. Estabilidad mecánica de moléculas individuales de ADN en presencia de etanol y espermina	123
6.1.1. Estructura secundaria del plásmido piJ702	123
6.1.2. La transición B-A y la condensación	126
6.1.3. Efecto de la deshidratación sobre el ADN y su relevancia biológica	128
6.1.4. Perspectivas futuras	130
6.2. Propiedades eléctricas e hidrodinámicas de centrosomas	130
6.2.1. Dominios dinámicos del centrosoma	131
6.2.2. Implicaciones biológicas de la carga del centrosoma	131
6.2.3. Perspectivas futuras	133
Conclusiones	135
Anexos	139
A.1. Espectro de potencia de una partícula en una trampa óptica	141
A.2. Relación entre la apertura numérica de un haz y el tamaño del foco	143
A.3. Predicción teórica para la fuerza de la transición B-A	144
A.4. Artículos publicados durante el periodo de tesis	145
Bibliografía	147

Abreviaturas, siglas y símbolos

A	adenina
A/D	conversión analógico a digital
AFM	microscopía (o microscopio) de fuerzas atómicas
AN	apertura numérica
AT	contenido de adenina y timina
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BRB80	tampón con 80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 6.8
γ	coeficiente de fricción
C	citosa
D/A	conversión digital a analógico
DC	dicroísmo circular
DE	desviación estándar
ϵ	constante dieléctrica
f	distancia focal
G	guanina
GC	contenido de guanina y citosina
η	viscosidad
IR	infrarrojo
κ	constante de recuperación
λ	longitud de onda
L_0	longitud de contorno
ME	microscopía electrónica
MPC	material pericentriolar
P	longitud de persistencia
pb	par(es) de bases
PBS	tampón fosfato salino (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pI	punto isoeléctrico
p/v	proporción peso/volumen
rpm	revoluciones por minuto
σ	conductividad eléctrica
T	timina
TAE	tampón Tris-acetato-EDTA (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0)
TE	tampón Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5-8)
T _m	temperatura de desnaturalización
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
v/v	proporción volumen/volumen

Abstract

Recent years have witnessed the emergence of an entirely new field of science, often referred to as single-molecule biophysics. This interdisciplinary field is currently providing novel approaches to biochemical and biological problems. The capability of single-molecule methods of revealing the behavior of individual molecules having different conformation and properties is beyond the ability of their bulk counterparts, which describe the behavior of enormous ensembles of molecules, averaging the measured parameters over the entire molecular population.

Optical tweezers are one of these new techniques which allow the real-time manipulation of single molecules and cells. They have been used in a variety of biological systems to lead to a new understanding of the mechanical properties of the fundamental building blocks of the cell, and of the mechanism by which molecular machines function. This thesis comprises the implementation of an optical tweezers instrument as one of its research projects. The technique, the basic ideas behind the operating principles and the explanation of the components of the built set-up are described in Chapter 2.

The state-of-the-art optical tweezers instrument which we have developed constitutes the main experimental tool of the present thesis. It is used in two different investigations. Firstly, we study the mechanical stability of single DNA molecules under low humidity conditions. We analyze the simultaneous effect of tension and ethanol on two DNAs differing in both sequence and secondary structure in buffer to analyze GC content dependencies. Our results support that condensation co-exists with the A-form and that such association reinforce the conformational B-A transition (Chapter 3). This study is complemented with the characterization by two other single-molecule techniques, namely, magnetic tweezers and atomic force microscopy (Chapter 4). Secondly, we perform laser manipulation of individual *Drosophila* centrosomes which lead us to carry out single-organelle electrophoresis. We find that the centrosome is a net negatively charged organelle and, although we infer an effective charge significantly smaller than that of microtubules, we show that the charge of the centrosome has a remarkable influence over its own structure. Specifically, we investigate the hydrodynamic behavior of the centrosome by measuring its size by both Stokes law and thermal-fluctuation spectral analysis of force. We find that the hydrodynamic size of the centrosome is 60% larger than its electron microscopy diameter and that this physiological expansion is produced by the electric field that drains to the centrosome, a self-effect which modulates its structural behavior via environmental pH (Chapter 5).

1

Introducción

La fuerza, el torque, la tensión y la deformación o el trabajo son ejemplos de acciones mecánicas y elásticas íntimamente unidas a las reacciones químicas en la célula. Hasta no hace demasiado tiempo estas variables no se podían medir directamente, pero durante los últimos años esta situación ha cambiado gracias al desarrollo de métodos de manipulación de moléculas únicas. Estas técnicas están haciendo posible seguir, en tiempo real y a nivel de una sola molécula, los movimientos, fuerzas y tensiones que se desarrollan en el transcurso de una reacción. En esta introducción se explica la información biofísica accesible a través de una aproximación de molécula única, haciendo especial referencia a la importancia de las fluctuaciones en biología. También se describen los métodos experimentales más comunes para localizar y manipular moléculas individuales y para medir y ejercer fuerza, la mayoría de los cuales han sido utilizados a lo largo de esta tesis. Además, se ofrece un resumen de las configuraciones experimentales, aplicaciones y resultados recientes de las pinzas ópticas en biología molecular y celular. Finalmente, se introducen los dos proyectos biofísicos estudiados en esta tesis que atañen al ADN y a los centrosomas.

1.1. Biofísica de moléculas individuales

Las macromoléculas que componen la maquinaria celular operan en un medio muy diferente a las soluciones regulares y homogéneas del laboratorio. Por un lado, el citoplasma es un medio densamente poblado en el que las estructuras moleculares (cromosomas, ribosomas, polimerasas, motores moleculares, canales de membrana, centrosomas, huso mitótico, anillo contráctil,...) deben funcionar de forma coordinada. Por otro lado, muchas de estas estructuras están presentes en números notablemente pequeños, funcionan individualmente y están sujetas a grandes fluctuaciones que son, en muchos casos, una parte integral de su función.

Las moléculas biológicas han sido estudiadas tradicionalmente con métodos bioquímicos en los que un gran número de ellas se mide y se analiza simultáneamente. Este tipo de métodos y sus resultados se referirán como “macroscópicos”, “volumétricos” o “de volumen”. Estos experimentos macroscópicos proporcionan promedios temporales y poblacionales de las características individuales de cada molécula. El conjunto de propiedades deterministas obtenidas al promediar ofrece una visión idealizada donde las moléculas poseen una dinámica lenta y bien definida. Pero a nivel de la molécula individual la imagen es muy diferente puesto que su dinámica instantánea es rápida y aparentemente aleatoria y puede encontrarse en estados lejos del comportamiento promedio de la población. A este nivel de detalle, la imagen macroscópica falla y se hace necesaria una descripción microscópica.

Por ejemplo, cada cromosoma de las células eucariotas está compuesto por una única molécula de ADN muy larga, normalmente enrollada alrededor de histonas formando complejos altamente organizados. Durante el proceso de replicación y segregación de cromosomas, cada molécula de ADN es sometida a un amplio rango de fuerzas que la estiran, giran y curvan. Las propiedades medidas en muestras volumétricas proporcionan poca información sobre la respuesta del ADN a estas tensiones, y mucho menos sobre el papel que pueden jugar en los mecanismos moleculares de división celular. De igual manera, todas las células tienen un conjunto de motores moleculares que generan fuerzas y hacen posible el movimiento celular (incluyendo el desplazamiento, la división celular y el transporte de orgánulos). Las medidas sobre volúmenes de componentes purificados de estos motores (miosinas, quinesinas, etc.) proporcionan, por ejemplo, la tasa promedio de hidrólisis de ATP, pero no pueden revelar fácilmente la relación entre la catálisis y el movimiento mecánico. Incluso cuando es posible conocer la fuerza generada por un conjunto de motores y relacionarla con la tasa total de energía química o de velocidad mecánica, las medidas macroscópicas no revelan las propiedades de las moléculas individuales o los mecanismos por los que funcionan.

Con el fin de tratar este tipo de cuestiones, un número creciente de investigadores ha comenzado a emplear métodos que hacen posible el estudio y la investigación de moléculas de una en una. En estos experimentos llamados de “moléculas individuales”, las macromoléculas son aisladas e interrogadas individualmente, lo que permite medir tanto las propiedades moleculares promedio como sus fluctuaciones térmicas (desviaciones instantáneas del valor medio). Estos experimentos están empezando a vislumbrar el comportamiento de estas pequeñas máquinas a escala nanoscópica.

Los experimentos de moléculas individuales difieren de las medidas macroscópicas en dos aspectos principales. Primero, en la importancia de las fluctuaciones en el sistema bajo estudio y en el instrumento de medida, y segundo, en la importancia de la fuerza y el desplazamiento como variables bajo control experimental y sujetas a medidas experimentales directas.

Las macromoléculas inmersas en un baño térmico están sujetas a fluctuaciones que pueden inducir grandes cambios (en proporción) en su estado y conformación. Por ejemplo, la superficie de energía libre que controla la conformación de una macromolécula puede contener varios mínimos anchos y poco profundos y, por lo tanto, puede haber varios subestados de conformación posibles dentro de la energía térmica disponible. Incluso cuando la molécula está en equilibrio sin perturbaciones no es una estructura estática. Más bien ejecuta continuas fluctuaciones aleatorias alrededor de los mínimos en la superficie de energía libre, y puede incluso hacer transiciones inducidas térmicamente de un mínimo local a otro (esto es, de una conformación metaestable a otra). Asimismo, los cambios de conformación de una proteína catalizando una reacción química (por ejemplo, la hidrólisis de ATP) no seguirá la trayectoria predicha a partir de la superficie de energía libre. En su lugar, cada molécula ejecutará una trayectoria estocástica con muchas fluctuaciones aleatorias alrededor de un valor medio. En muchos casos las fluctuaciones experimentadas por el sistema microscópico son una componente esencial del mecanismo molecular responsable de su función. Así, la habilidad de las proteínas para catalizar las reacciones químicas depende de la superación inducida térmicamente de barreras de energía potencial, y la habilidad de los motores moleculares de generar fuerza depende de la difusión conducida térmicamente de una posición de un filamento (como la actina, el ADN o un microtúbulo) a la siguiente. Estas fluctuaciones microscópicas desaparecen en los promedios de largos periodos de tiempo y de grandes poblaciones de los experimentos macroscópicos y la mayoría de la información contenida en ellas se pierde.

En los experimentos de moléculas individuales, las partes cruciales de los instrumentos de medida también son pequeñas y están sujetas a las mismas fluctuaciones que el sistema bajo estudio. Así pues, los experimentos de moléculas individuales nos dan acceso a la dinámica microscópica que permanece oculta en los

experimentos macroscópicos, pero su interpretación está fuertemente afectada por la presencia de fluctuaciones térmicas tanto en el objeto a estudiar como en el instrumento en sí. La comprensión de la relación entre las fluctuaciones moleculares e instrumentales es una parte esencial del análisis y de la interpretación de los datos de moléculas únicas.

La habilidad para usar la fuerza como una variable experimental es importante en al menos dos extensas áreas (Bensimon, 1996). Para algunos sistemas, como los motores moleculares, la fuerza es fundamental para funcionar y el principal interrogante es el mecanismo molecular por el cual la energía química es convertida en fuerza. Para otros sistemas, las fuerzas no tienen por qué ser esenciales para funcionar, pero los experimentos se pueden diseñar de manera que fuerzas o torques externos aplicados proporcionen una manera de exploración única de las propiedades moleculares. Tanto la medida de las fuerzas generadas internamente como la aplicación de fuerzas externas son extremadamente complicadas en los experimentos volumétricos tradicionales. En los experimentos de moléculas únicas, las moléculas se pueden unir directamente de manera individual a asas usadas para medir o ejercer fuerza.

1.2. Información disponible en los experimentos de moléculas individuales

Como se ha mencionado anteriormente, dos características distinguen los experimentos de moléculas individuales de sus homólogos de volumen: i) el papel único desempeñado por las fuerzas y torques como observables directas o parámetros controlados del experimento; y ii) la importancia de las fluctuaciones que prácticamente no desempeñan ningún papel en los experimentos macroscópicos.

En los estudios de manipulación, las fuerzas externas se emplean para actuar directamente sobre las moléculas o, alternativamente, las fuerzas generadas por las moléculas se registran y miden. Estas fuerzas suelen venir acompañadas por desplazamientos moleculares. Este par de variables conjugadas (fuerza y desplazamiento) contiene información única sobre las propiedades estáticas y dinámicas del sistema. Tanto los valores medios como las fluctuaciones alrededor de la media se pueden medir directamente. Así pues, los experimentos de moléculas individuales a menudo generan información cualitativamente diferente a la que es accesible a través de experimentos de volumen. Algunos ejemplos incluyen:

- Caracterización de las relaciones entre tensión y deformación sobre moléculas individuales. En un experimento típico de esta clase, una macromolécula (proteína, ácido nucleico) se estira mecánicamente y su respuesta elástica se investiga como función de la fuerza aplicada y de parámetros ambientales. A diferencia de los estudios volumétricos, que

normalmente implican la desnaturalización química o térmica de las macromoléculas, los métodos de moléculas individuales permiten medir directamente la magnitud y naturaleza de las fuerzas responsables de mantener la conformación nativa.

- Investigación de la ruptura de enlaces individuales. La cantidad medida en los experimentos de interacciones macroscópicas es la energía libre de formación del complejo. En los experimentos de moléculas individuales, la cantidad que se obtiene fácilmente es la fuerza requerida para romper un complejo ya formado. Estas dos cantidades describen partes diferentes y complementarias de la función de energía potencial para la interacción ligando-receptor. Algunos ejemplos de parejas ligando-receptor estudiadas por métodos de moléculas individuales son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, pares de base de ADN, miosina-actina F, quinesina-tubulina, etc.
- Análisis de los promedios temporales y de las fluctuaciones moleculares (dependientes del tiempo) de fuerzas y distancias. Las biomoléculas individuales operan bajo condiciones en las que las fluctuaciones a menudo dominan su comportamiento. Estas fluctuaciones contienen información sobre la superficie de energía potencial y el efecto de los procesos de disipación (difusión, fricción, etc.) sobre la dinámica del sistema.
- Caracterización de estados moleculares de escasa representación y a menudo de difícil acceso en las poblaciones macroscópicas, como estados altamente enrollados o altamente extendidos de un polímero, estados transitorios de una proteína, etc.
- Descripción de la dinámica de sistemas complejos (motores moleculares, proteínas de transducción de energía) y sus procesos (como la replicación, transcripción y traducción). En los experimentos volumétricos solo los parámetros cinéticos (promediados) son accesibles porque el desfase térmico entre las moléculas individuales causa la pérdida de coherencia de la población. Por el contrario, los estudios sobre complejos individuales se ocupan directamente de su dinámica microscópica, incluyendo sus fluctuaciones inherentes.

El montaje experimental en los estudios de manipulación de moléculas individuales refleja el carácter único de las medidas de varias formas: i) el instrumento debe tener una forma de visualizar o, al menos, de localizar las moléculas espacialmente; ii) el instrumento debe poseer una forma de actuar sobre las moléculas o sentir la generación de fuerza dentro de las moléculas; y iii) al menos una parte del instrumento, típicamente la parte en contacto directo con la molécula, debe tener ella misma dimensiones microscópicas. Todos estos aspectos se describen en las siguientes secciones.

1.3. Métodos para localizar moléculas

En los experimentos de moléculas individuales las macromoléculas deben ser detectadas o localizadas por un microscopio capaz de operar en líquido. Solo dos tipos de microscopios cumplen esta condición: los microscopios ópticos y los microscopios de sonda [microscopio de efecto túnel (*Scanning Tunneling Microscope*, STM), microscopio de fuerzas atómicas (*Atomic Force Microscope*, AFM), microscopio óptico de campo cercano (*Near Field Scanning Optical Microscope*, NSOM)]. Estas dos clases de microscopios tienen capacidades diferentes y complementarias. Los microscopios ópticos son fáciles de usar y bastante adaptables, como en las aplicaciones de pinzas ópticas, pero su resolución está limitada a $\sim 0.3 \mu\text{m}$ por efecto de la difracción. Los microscopios de sonda, por otro lado, tienen resolución molecular en líquido pero su funcionamiento está limitado a moléculas unidas a una superficie. Esta exigencia les hace algo menos flexibles a configuraciones alternativas.

Debido a su limitada resolución espacial, los microscopios ópticos no pueden crear la imagen directa de las macromoléculas en solución. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos no es imprescindible resolver espacialmente la molécula, sino solo seguir su posición. Así, la detección espacial, más que la resolución espacial, es una capacidad crítica en los experimentos de moléculas individuales. Por consiguiente, en la mayoría de los experimentos las moléculas se hacen detectables a través de sondas o marcas externas. Una manera de marcar la molécula es por medio de sondas fluorescentes que hacen que la propia molécula emita luz. Otra forma de detectar la molécula es utilizar una partícula grande cuyas dimensiones estén dentro de las capacidades de detección y visualización del microscopio.

Por un lado, si la molécula que se investiga está marcada fluorescentemente, la señal óptica de la molécula marcada se puede detectar y grabar con un videomicroscopio de baja intensidad. En este caso, la molécula, estrictamente hablando, no se visualiza; en su lugar, la luz fluorescente emitida en un fondo negro revela la posición de la molécula. Debido a las condiciones de baja intensidad lumínica de estos experimentos, la configuración de la óptica, la naturaleza de la sonda fluorescente y la apertura numérica de los objetivos del microscopio deben escogerse cuidadosamente para optimizar el brillo y el contraste de las imágenes.

Una forma alternativa de localizar moléculas es unir las a partículas grandes (microesferas o micropartículas de poliestireno o vidrio, metálicas, etc.) que son más fáciles de detectar en un microscopio óptico, ya sea por su tamaño o porque ellas mismas son fluorescentes. Existen microesferas de diferente composición y tamaño disponibles comercialmente. Típicamente, las superficies de las microesferas se recubren con anticuerpos u otras proteínas capaces de unirse con gran afinidad a

algún residuo de la macromolécula diana. La dimensión, densidad y propiedades ópticas de las microesferas deben ser elegidas cuidadosamente para cada aplicación particular.

1.4. Medios de actuar sobre las moléculas

Todas las técnicas de manipulación de moléculas individuales requieren dos elementos básicos: una sonda, normalmente de tamaño microscópico, que puede generar o detectar fuerzas y desplazamientos; y un modo de localizar espacialmente las moléculas. Esta sección describe un conjunto de métodos para ejercer fuerza sobre moléculas individuales, en un rango que abarca casi siete órdenes de magnitud. Estos métodos se pueden ordenar en dos clases principales: transductores mecánicos y campos externos.

Método	Rango de fuerzas (N)	Desplazamiento mínimo (m)	Rigidez ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)	Aplicaciones	Ventajas
AFM, micro-palancas	10^{-11} - 10^{-7}	10^{-10}	0.001-100	Proteínas, polisacáridos. Fuerza de enlace	Resolución espacial. Comercial
Microagujas	10^{-11} - 10^{-10}	10^{-9}	10^{-6} -1	Fuerza motor miosina. Fuerza ADN/titina	Control operacional. Baja constante de recuperación
Campos eléctricos	0- 10^{-12}	10^{-8}	No definido	ADN. Electroforesis	Fácil diseño
Campos magnéticos	10^{-14} - 10^{-11}	10^{-8}	No definido	Elasticidad entrópica de ADN. Actividad de topoisomerasas	Especificidad magnética. Inducción de torque
Flujos laminares	10^{-13} - 10^{-9}	10^{-8}	No definido	Dinámica de ADN. ARN polimerasa	Cambio rápido de tampón. Fácil diseño
Trampas ópticas	10^{-13} - 10^{-10}	10^{-9}	10^{-10} - 10^{-3}	Motores moleculares. Desplegamiento de proteínas	Manipulación específica. Resolución en fuerza

Tabla 1.1 | Métodos de manipulación de moléculas individuales. Resumen del rango de fuerzas relevantes, desplazamiento mínimo, rigidez de la sonda, ejemplos de aplicación y ventajas relativas de cada técnica (Bustamante et al., 2000).

La Tabla 1.1 resume las características más importantes de los principales métodos de manipulación de moléculas individuales respecto al rango de fuerza, desplazamiento mínimo, rigidez de la sonda, aplicaciones y ventajas relativas.

1.4.1. Transductores mecánicos

Los transductores de fuerza mecánica aplican o detectan fuerzas a través del desplazamiento de una parte móvil del transductor, de ahí que puedan funcionar no solo como dispositivos para medir fuerzas sino también como sensores de posición. Los ejemplos más comunes son las micropalancas usadas en la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) y las microagujas. El control espacial de los transductores se logra eficazmente con dispositivos de posicionamiento piezoeléctricos. Los transductores mecánicos han sido empleados para investigar sistemas que abarcan tanto el desplegamiento de proteínas (Carrión-Vázquez et al., 1999) y la motilidad celular (Rotsch et al., 1999), como las fuerzas generadas por motores moleculares (Kishino y Yanagida, 1988). Los transductores mecánicos están muy extendidos porque poseen una respuesta lineal en un rango amplio de desplazamientos y fuerzas, dentro del cual la fuerza y la deflexión se relacionan por una constante de fuerza. Dos importantes factores determinan cómo los transductores mecánicos interaccionan con las moléculas individuales: su tamaño y su rigidez.

a. Micropalancas

Las palancas de fabricación micrométrica están disponibles en una amplia variedad de tamaños, formas y materiales. Los dispositivos AFM son también comerciales y algunos están diseñados específicamente para manipular moléculas individuales (Viani et al., 1999). Las ventajas del AFM son su alta resolución espacial, sensibilidad, rendimiento (habilidad para estudiar varias moléculas individuales al mismo tiempo sobre una superficie) y versatilidad. Así, por ejemplo, el AFM se puede usar como un instrumento de toma de imágenes y como un dispositivo de manipulación (Muller et al., 1999; Oosterhelt et al., 2000). En esta tesis, el AFM ha sido utilizado para analizar dos tipos de moléculas de ADN con diferente contenido GC adsorbidas sobre una superficie de mica (Capítulo 4).

Las micropalancas de AFM tienen una rigidez característica de 10^{-3} a $100 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Las micropalancas más rígidas tienen menor sensibilidad, ya que la fuerza se detecta siempre midiendo el desplazamiento que es inversamente proporcional a la rigidez. No obstante, son útiles cuando un proceso determinado (por ejemplo, un cambio de conformación) requiere la aplicación de fuerzas altas.

b. Microagujas y micropipetas

Generalmente, las microagujas y micropipetas se construyen estirando varillas de vidrio y capilares, respectivamente, calentados de forma local. Las

dimensiones laterales y longitudinales están determinadas por la composición del vidrio, la temperatura y la velocidad de estiramiento. De manera habitual, la microaguja está unida a una barra de vidrio gruesa que puede ser movida por un dispositivo piezoeléctrico. A causa de sus dimensiones (típicamente, 50-500 μm de largo, 0.1-1 μm de grosor), las microagujas de vidrio son normalmente más blandas que las micropalancas (Tabla 1.1). Esta propiedad les otorga una ventaja sobre las micropalancas de AFM para investigar los delicados sistemas biológicos. Sin embargo, las microagujas no están disponibles comercialmente y los dispositivos para detectar su desplazamiento están menos estandarizados que en AFM.

Las microagujas se han empleado con éxito para cuantificar la fuerza que la miosina ejerce sobre la actina, 9.6 pN (Kishino y Yanagida, 1988; Ishijima et al., 1996; Kitamura et al., 1999), determinar el tamaño del paso de la miosina sobre la actina, 5.3 nm (Kitamura et al., 1999), y la fuerza generada por el motor, $\sim 3\text{-}5$ pN (Finer et al., 1994; Ishijima et al., 1996).

1.4.2. Campos externos

Los campos eléctricos, magnéticos, hidrodinámicos y fotónicos (electromagnéticos) se usan para ejercer fuerza sobre las moléculas, tanto si actúan directamente sobre ellas o sobre sus asas (microesferas dieléctricas o magnéticas unidas a las moléculas). En general, la elección de un campo particular depende de la magnitud de la fuerza a emplear y del grado de control de la fuerza deseado. A diferencia de los transductores mecánicos, los campos externos hacen posible actuar sobre las moléculas a distancia. Aunque esto puede ser una ventaja en algunas aplicaciones puede complicar su uso en otras. Por ejemplo, cuando se aplica un campo magnético, este puede afectar simultáneamente a cada complejo molécula-microesfera dentro de un área de milímetros. Del mismo modo, un flujo generado por un fluido no solo afecta a la molécula de estudio, sino también a todas las que se encuentren en la corriente. A pesar de estas limitaciones, los campos han demostrado ser muy útiles en la manipulación de moléculas individuales, como se indica a continuación.

a. Campos eléctricos

En general, las células y las macromoléculas biológicas están cargadas en solución acuosa y se mueven por electroforesis. Un campo eléctrico en una solución se puede establecer con electrodos que produzcan la corriente y medir directamente con otros electrodos usados a modo de sonda. Pero hay que tener en cuenta que pasar una corriente a través de una solución puede causar un número de efectos espurios como son el calentamiento del tampón, la polarización de los electrodos o la solución debido a la acumulación de iones y, probablemente, la aparición de burbujas de gas en los electrodos. La electrólisis del agua, sin embargo, no tiene por qué representar

una limitación fundamental al campo máximo usado en la mayoría de las aplicaciones si la diferencia de potencial entre los electrodos permanece por debajo de ~ 1 V (el potencial de disociación del agua).

Los campos eléctricos también se pueden utilizar conjuntamente con otras técnicas de moléculas individuales. En particular, la combinación desarrollada en esta tesis de campos eléctricos y pinzas ópticas, ha permitido realizar electroforesis de centrosomas individuales, como se describirá en el Capítulo 5.

b. Campos magnéticos

En los experimentos de moléculas individuales, las fuerzas magnéticas se aplican generalmente a moléculas o células uniéndolas a microesferas magnéticas. Puesto que las soluciones tamponadas o cualquier medio celular carece de susceptibilidad magnética, la fuerza sobre la partícula no se ve afectada por su entorno como sí sucede en el caso de las fuerzas eléctricas. Se pueden crear pequeñas fuerzas muy estables con gradientes de campos magnéticos de imanes permanentes o de electroimanes.

Las fuerzas generadas con imanes permanentes sobre pequeñas microesferas magnéticas ($r < 3 \mu\text{m}$) son, en general, inferiores a 10 pN (Smith et al., 1992; Strick et al., 1996). Una desventaja de los campos magnéticos es que, normalmente, la fuerza magnética se tiene que medir de manera indirecta. Por ejemplo, las fuerzas que actúan sobre microesferas magnéticas se pueden calibrar determinando la velocidad alcanzada por las microesferas en líquido bajo un cierto campo y utilizando la ley de Stokes (Smith et al., 1992).

La fuerza magnética se ha utilizado para aplicar tensión rotacional a moléculas individuales de ADN. Las microesferas magnéticas tienen una dirección de magnetización preferencial que les hace orientarse en un campo externo y rotar cuando el campo lo hace. Strick *et al.* aprovecharon esta propiedad para enrollar y desenrollar moléculas individuales de ADN unidas a una superficie de vidrio y una microesfera magnética, con el fin de determinar el comportamiento fuerza-extensión del ADN superenrollado (Strick et al., 1996). Más recientemente, esta misma configuración se ha utilizado para investigar la relajación del ADN superenrollado por moléculas topoisomerasas II a nivel individual (Strick et al., 2000).

En esta tesis, se han utilizado las pinzas magnéticas para estudiar el régimen de elasticidad de baja fuerza de moléculas individuales de ADN en condiciones de baja humedad. Estos experimentos, junto con los realizados a fuerza constante para seguir el efecto de la deshidratación sobre moléculas únicas de ADN en tiempo real, se describen en el Capítulo 4.

c. Campos hidrodinámicos

Los campos hidrodinámicos o de fluidos ejercen fuerza sobre los objetos a través de la transferencia de momento desde el fluido al objeto. El flujo es fácil de generar pero limitado para proporcionar un control preciso sobre una molécula individual o un dominio molecular. En condiciones de flujo laminar (cada partícula del fluido sigue una trayectoria suave, en oposición a flujo turbulento), la fuerza de arrastre entre un líquido en movimiento de viscosidad η y velocidad v , y una esfera estacionaria de radio r , se puede calcular utilizando la ley de Stokes ($F = 6\pi\eta r v$). Para esferas de cualquier tamaño en agua, la ley de Stokes es válida hasta fuerzas de ~ 10 nN. Para fuerzas mayores aparecen turbulencias.

Entre las ventajas de utilizar campos hidrodinámicos para experimentos de moléculas individuales se incluye el hecho de que el líquido que rodea la macromolécula sujeta puede reemplazarse fácilmente. Esta característica es importante en muchos estudios de enzimas, que requieren el cambio de las condiciones del tampón. Además, esta técnica es muy conveniente y sencilla para combinar con otras técnicas de moléculas individuales, como las pinzas ópticas y magnéticas y el AFM, y puede usarse fácilmente como test de calibración. En esta tesis, se ha utilizado la fuerza de un flujo laminar y la ley de Stokes para, en combinación con las pinzas ópticas, medir el tamaño hidrodinámico de centrosomas individuales atrapados ópticamente (Capítulo 5).

d. Campos de fotones

Una herramienta muy efectiva en la manipulación de macromoléculas biológicas es la que utiliza un haz de luz láser, focalizado a través de la lente de un objetivo de microscopio, para atrapar, mover y aplicar fuerza a objetos microscópicos refractivos. Cuando un haz de fotones es absorbido o dispersado por un objeto, este siente un impulso de reacción igual pero de sentido opuesto al cambio del momento de la luz. Cualquier objeto que refleje, refracte o absorba luz sentirá esta fuerza (Gordon, 1973) pero, para evitar efectos de calentamiento, se utilizan partículas transparentes, es decir, dieléctricas y no absorbentes.

Es esta fuerza que ejerce la luz, también llamada presión de radiación, la responsable de que ciertos objetos (una esfera dieléctrica micrométrica, por ejemplo) puedan ser mantenidos en un haz láser focalizado, con el cual es posible generar una fuerza como la de un muelle (lineal con el desplazamiento). Como sucede con los transductores mecánicos, la rigidez de la trampa óptica es un parámetro importante para la resolución en fuerza y posición. En general, la rigidez es mucho más pequeña que la de una micropalanca (Tabla 1.1). La fuerza ejercida sobre un objeto refractivo depende de la potencia del láser, las dimensiones y la geometría del objeto y la

relación entre el índice de refracción del objeto y del medio circundante (Ashkin, 1992; Wright et al., 1994).

Para aplicar fuerzas del orden del piconewton con decenas de milivatios de potencia las microesferas deben tener, al menos, un diámetro del orden de la longitud de onda, porque para tamaños inferiores la fuerza de atrapamiento varía como la tercera potencia del diámetro de la partícula. Este tipo de microesferas pueden ser pegadas a las macromoléculas. Existen varias ventajas de las pinzas ópticas sobre otras técnicas de campos externos. En primer lugar, la presión de radiación solo atrapa la microesfera cerca del foco del haz láser, así que el campo de fotones no afecta simultáneamente a otras microesferas. En segundo lugar, la transferencia de momento entre el objeto atrapado y el haz láser puede ser calibrado fácilmente frente al desplazamiento y la fuerza, proporcionando así un método directo de alta resolución para medir la fuerza y la posición (<1 pN y <10 nm). Por último, el rango de fuerzas correspondiente del campo de fotones (10^{-13} - 10^{-10} N) es adecuado para medir procesos mecánicos en los sistemas biológicos de tamaño molecular.

Una desventaja de las pinzas ópticas es el posible daño del láser a los sistemas biológicos activos. Así, se ha mostrado el efecto negativo de la exposición al láser sobre la vida funcional de complejos biológicos en experimentos de la ARN polimerasa. La exposición a la luz láser de longitud de onda más compatible con las biomoléculas ($\lambda = 835$ nm) aún disminuía la vida activa de la enzima desde más de 300 s, cuando no había exposición al láser, a 89 s a 90 mW de potencia láser. Otra desventaja es el bajo caudal de datos que se obtiene con las pinzas ópticas ya que, a diferencia de los campos hidrodinámicos, solo una molécula se manipula cada vez.

Por su adecuación al rango de fuerza y desplazamiento implicado en los sistemas biológicos que queremos estudiar, la técnica de pinzas ópticas ocupa un papel protagonista en el trabajo de esta tesis. Además, la implementación de un instrumento de pinzas ópticas se planteó como el primer objetivo de la tesis y ahora es uno de sus resultados más palmarios. En el Capítulo 2 de este manuscrito se ofrece una descripción detallada de los fundamentos y características del instrumento construido. A continuación, se refiere el origen de la técnica y se resumen los principales resultados obtenidos con ella en el campo de la biología.

1.5. Origen de la técnica de pinzas ópticas

Aunque el estudio de las fuerzas ejercidas por las ondas de luz comenzó en la década de los 70, el nacimiento de la técnica de pinzas ópticas se ha datado habitualmente en 1986. En este año, Ashkin *et al.* (1986) informaron de la observación de la primera trampa óptica de un haz. El hecho de que la luz lleve asociado momento lineal y angular y, por lo tanto, pueda ejercer fuerza sobre la materia se puede entender por su naturaleza corpuscular. Ya en el siglo XVII,

Johannes Kepler propuso que la presión de radiación de los rayos del sol era la razón por la cual la cola de los cometas se alejaba del sol. Los efectos de las fuerzas de la luz eran tan minúsculos para la física práctica de aquel momento que no se consideraron relevantes hasta la invención del láser en la década de los 60. Arthur Ashkin, de los laboratorios Bell (Lucent Technologies, EEUU), y Vladilen Letokhov junto con otros investigadores de la antigua URSS, fueron los primeros en estudiar el efecto de los fotones en los átomos en los años 70. Los experimentos del primero promovieron el atrapamiento y manipulación de partículas microscópicas y de células vivas. Ashkin demostró que los virus, levaduras, bacterias, protozoos y orgánulos dentro de células vivas podían ser manipulados bajo condiciones inocuas (Ashkin y Dziedzic, 1987; Ashkin et al., 1987; Ashkin y Dziedzic, 1989).

La biología no es la única rama de la ciencia donde las trampas ópticas han demostrado ser una técnica poderosa. Paralelamente a los ensayos de células y moléculas individuales, el campo del enfriamiento de átomos por atrapamiento experimentó un rápido progreso. La idea de que un átomo pueda ser enfriado cuando interacciona con la radiación fue desarrollada en una serie de experimentos que condujeron al premio Nobel de física en 1997 (otorgado a S. Chu, C. Cohen-Tannoudji y W. D. Phillips). El enfriamiento de átomos a esta escala implica su confinamiento en un volumen muy pequeño y la reducción de su energía cinética. Las trampas ópticas combinadas con las magnéticas han permitido obtener las temperaturas experimentales más bajas. Estos experimentos han sido de vital importancia para el logro de la condensación de Bose-Einstein (Ketterle, 1999) y el láser atómico (Balykin y Letokhov, 1989). También se han producido avances prácticos en relojes atómicos y en la medida de las fuerzas gravitatorias (Kasevich y Chu, 1991).

1.6. Pinzas ópticas en biología molecular y celular

Como se ha mencionado con anterioridad, la capacidad de las pinzas ópticas para ejercer y medir fuerzas pequeñas es adecuada para investigar una gran variedad de fenómenos en biología molecular y celular. El rango de configuraciones experimentales es diverso y continúa creciendo. Básicamente, el espécimen y el movimiento o cambios de conformación que se espera medir son los que dictan la estrategia experimental, que condiciona tanto la preparación bioquímica de la muestra como el montaje óptico. Las células individuales se pueden mantener directamente en una trampa óptica mientras que el manejo de moléculas individuales requiere diferentes estrategias. La Fig. 1.1 describe algunas de las configuraciones más representativas. La combinación de una trampa óptica con una superficie de vidrio (Fig. 1.1 (A)) o una micropipeta (Fig. 1.1 (B)) permite el anclaje de los especímenes a superficies que pueden moverse de forma independiente. La trampa óptica actúa como un sensor de fuerza y el sistema de referencia lo da un manipulador independiente, en forma de una superficie de vidrio o de una micropipeta. Con el

propósito de reducir la deriva de los soportes mecánicos, también se pueden emplear dos trampas ópticas simultáneas (Fig. 1.1 (C)).

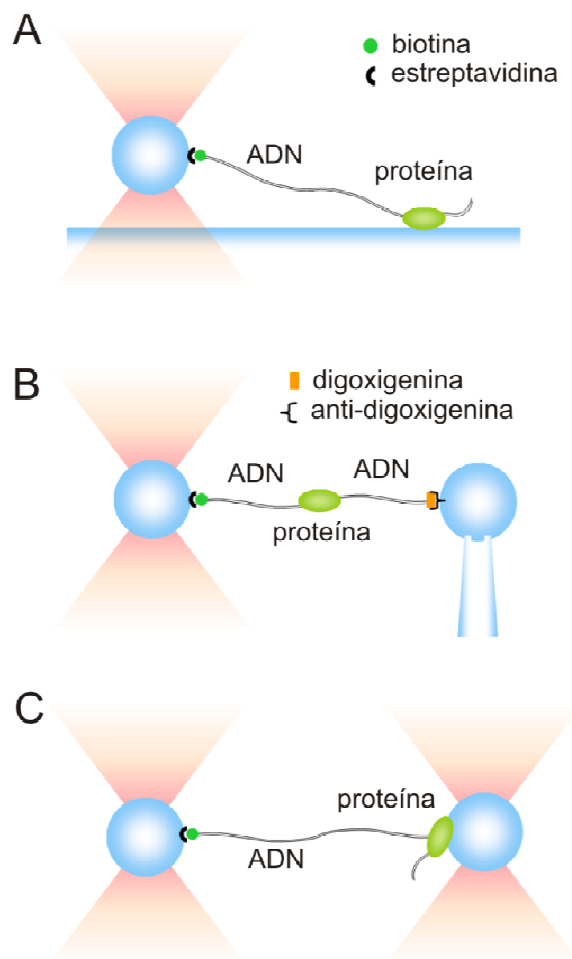


Figura 1.1 | Configuraciones experimentales para la manipulación de células y biomoléculas con pinzas ópticas. Normalmente, la molécula es sujeta por dos sitios específicos diferentes por medio de fragmentos de ADN o superficies que actúan como asas moleculares y mecánicas, respectivamente. **(A)** Configuración de una microesfera mantenida en una trampa óptica y una superficie de vidrio. **(B)** Configuración de una microesfera en una trampa óptica y una segunda microesfera mantenida por succión sobre una micropipeta. Esta es la configuración utilizada en esta tesis. **(C)** Configuración con dos trampas ópticas independientes. Las uniones químicas que se diseñan para asir una proteína no deben perjudicar su función. Las asas de ADN, que están unidas químicamente a las microesferas, también ayudan a mantener la separación entre las dos superficies para una manipulación adecuada.

1.6.1. Pinzas ópticas en biología celular

El atrapamiento óptico en biología se centró inicialmente en la manipulación de células y componentes subcelulares intactos. Ashkin *et al.* mostraron por primera vez que especímenes biológicos individuales, como virus, bacterias, levaduras, células eucariotas (Ashkin y Dziedzic, 1987; Ashkin *et al.*, 1987) e incluso orgánulos situados en el interior de células vivas (Ashkin y Dziedzic, 1989), se pueden atrapar y mover sin daño óptico alguno. Un año más tarde, fueron capaces de estimar la fuerza producida *in vivo* por una única mitocondria moviéndose a lo largo de microtúbulos dentro de la ameba gigante *Reticulomyxa* (Ashkin *et al.*, 1990). De manera parecida, Huber *et al.* utilizaron las pinzas ópticas para seleccionar arqueas individuales de un cultivo en un medio anaeróbico para experimentos de clonación (Huber *et al.*, 1995). La capacidad de atrapar una célula sin contacto se aprovechó también en el estudio de la estructura y propiedades de deformación de los glóbulos rojos en ausencia de interacciones de superficie (Svoboda *et al.*, 1992; Bronkhorst *et al.*, 1995) y en el estudio del torque generado por el motor del flagelo bacteriano (Block *et al.*, 1989; Ryu *et al.*, 2000). En un tipo diferente de experimentos, Maier *et al.* (2004) estudiaron el transporte de ADN a través de la envoltura celular en *Bacillus subtilis*. Para ello unieron moléculas individuales de ADN suspendidas desde microesferas atrapadas ópticamente a bacterias inmovilizadas sobre una superficie de vidrio, utilizando una configuración similar a la de la Fig. 1.1 (A). También se realizaron experimentos similares de introducción de ADN dentro de núcleos reconstituidos (Salman *et al.*, 2001).

La combinación de pinzas ópticas infrarrojas con pulsos de luz UV o con láseres Nd:YAG (acrónimo del inglés *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) que funcionan como escalpelos o tijeras, ofrece a los biólogos celulares la posibilidad de cortar células y orgánulos de manera precisa y de moverlos de forma no invasiva. Steubing *et al.* (1991) realizaron una fusión celular inducida por láser de manera muy específica, sin medios químicos o eléctricos, simplemente cortando con pulsos de láser UV la pared común de dos células puestas en contacto en una trampa óptica. Existe un número importante de experimentos que combinan ambas técnicas (Berns *et al.*, 1998), la mayoría relacionados con la microdisección de cromosomas (Greulich, 1992), la clonación de genes usando técnicas de PCR (Monajembashi *et al.*, 1986; Djabali *et al.*, 1991; He *et al.*, 1997) y la reproducción. Respecto a este último tema, el manejo de espermatozoides humanos individuales con pinzas ópticas se ha utilizado para estudiar la motilidad de estas células (Tadir *et al.*, 1989), y en procedimientos de fertilidad con el objetivo de facilitar el transporte selectivo de espermatozoides individuales hasta su contacto final con los oocitos (Tadir *et al.*, 1991; Schopper *et al.*, 1999). Schutze *et al.* (1994) probaron por primera vez la combinación de pinzas y tijeras láser en la perforación de canales en la zona pelúcida de los oocitos para facilitar la penetración del esperma. El objetivo de estos trabajos es conseguir una tecnología de reproducción asistida sin contacto utilizando láseres

(Ebner et al., 2005) que asegure la ausencia de daño radiativo (Konig et al., 1995; Liang et al., 1996). Las pinzas ópticas también se han utilizado para estudiar la mitosis, en particular, para seguir y alterar el movimiento de los cromosomas con el fin de estudiar el huso mitótico durante la división celular (Berns et al., 1989; Liang et al., 1993; Vorobjev et al., 1993).

Para investigar la respuesta inmune, Seeger *et al.* (1991) guiaron ópticamente linfocitos T a sus células diana, y observaron los cambios morfológicos y las oscilaciones de la membrana de estas últimas después del contacto. La regeneración de las sinapsis retinianas entre fotorreceptores y neuronas ha sido estudiada gracias a la habilidad de las pinzas ópticas para controlar específicamente las interacciones célula-célula, a diferencia de los estudios de asociaciones aleatorias creadas entre células (Townes-Anderson et al., 1998). Aunque aún no se ha explotado completamente, las pinzas ópticas también tienen un uso potencial en biología del desarrollo. Welte *et al.* estudiaron la regulación del transporte intracelular en embriones de *Drosophila* siguiendo el transporte de gotitas de lípidos atrapadas ópticamente a lo largo de los microtúbulos y midiendo la fuerza generada (Welte et al., 1998; Gross et al., 2000). Las propiedades mecánicas de las membranas y la reorganización dinámica de los constituyentes del citoesqueleto también se han investigado uniendo microesferas de poliestireno a la superficie externa de células, y estirándolas con una trampa óptica (Dai y Sheetz, 1995). Este tipo de propuestas de “sondas ópticas” son también muy útiles para investigar la adhesión celular. Así, se han utilizado microesferas cubiertas con ligandos que se unen a posiciones específicas de la superficie externa de células migratorias para imitar el efecto de la matriz extracelular, proporcionando una forma de estudiar la respuesta celular a fuerzas de resistencia (Schmidt et al., 1993; Choquet et al., 1997). Asimismo, se ha investigado la difusión de proteínas en la membrana. En estos experimentos, las pinzas ópticas han servido para arrastrar las macromoléculas en el plano de la membrana y podrían ser usadas para aclarar el mecanismo de interacción de las proteínas de membrana con el citoesqueleto (Edidin et al., 1991; Kusumi et al., 1998; Sako et al., 1998).

1.6.2. Propiedades mecánicas de los ácidos nucleicos

La eficiente replicación, transcripción, empaquetamiento o modificación de los ácidos nucleicos es llevada a cabo por proteínas que aprovechan las propiedades físicas de estas cadenas de nucleótidos. La tensión y el torque aplicados por proteínas de interacción con ADN pueden inducir cambios estructurales, abrir o desenrollar las dos hebras de la doble hélice. El primer experimento de moléculas individuales sobre la elasticidad del ADN de cadena doble se realizó con pinzas magnéticas (Smith et al., 1992). En este caso, la molécula se estiró hasta una fuerza máxima de 30 pN. Cuatro años más tarde, el mismo equipo caracterizó la elasticidad de este polímero a fuerzas más altas, hasta 80 pN, esta vez utilizando pinzas ópticas (Smith et al., 1996). Simultáneamente, se obtuvieron resultados similares en este rango de fuerza con

microagujas de vidrio (Cluzel et al., 1996). Smith *et al.* utilizaron una configuración experimental similar a la mostrada en la Fig. 1.1 (B). El ADN se inmovilizó uniendo un extremo a una microesfera atrapada ópticamente y el otro a una segunda microesfera mantenida por succión en una micropipeta. Al alejar la micropipeta respecto a la microesfera de la trampa, la molécula se estiró longitudinalmente. Se ha estudiado el comportamiento de la forma B del ADN tensionado bajo cambios de importantes parámetros fisiológicos, como variaciones de pH (Williams et al., 2001a), fuerza iónica (Baumann et al., 1997; Wenner et al., 2002) o temperatura (Williams et al., 2001b). Todos estos experimentos han revelado cuatro regímenes de extensión distintivos de la molécula de ADN (Fig. 1.2). Por debajo de 10 pN, el polímero se comporta como una cadena flexible e inelástica. En este régimen, llamado de *elasticidad entrópica*, la doble hélice se alinea desde su conformación globular aleatoria a fuerza cero. Para fuerzas en el rango de 10 a 50 pN, el polímero muestra su *elasticidad intrínseca*. Aquí la molécula de ADN es tensionada aproximando y sobrepasando su longitud de contorno. A los ~65 pN, la molécula se estira hasta 1.7 veces su longitud de contorno canónica de la forma B, en un rango de fuerzas muy estrecho (*régimen de sobre-estiramiento*; en inglés, *overstretching*). Este cambio brusco se ha interpretado como una transición altamente cooperativa entre la forma B y la llamada forma S (del inglés, *stretched*) del ADN (Cluzel et al., 1996; Smith et al., 1996), o como una desnaturalización inducida por la fuerza (Rouzina y Bloomfield, 2001a, 2001b). La reversibilidad que exhiben las moléculas de ADN es llamativa: en la relajación hasta los 0 pN, la molécula recupera su forma B original y cada ciclo sucesivo de estiramiento-relajación muestra repetidamente los regímenes comentados arriba. Finalmente, el *régimen de escisión* aparece cuando las fuerzas rebasan los 500 pN. Antes de que el polímero se rompa, las dos hebras del polímero se desnaturalizan—debido a su tensión diferencial mutua—a fuerzas que dependen de la temperatura, la secuencia y las condiciones de la solución (Clausen-Schaumann et al., 2000). Smith *et al.* (1996) también estiraron ADN monocatenario, observando que es más contráctil y flexible que su homólogo de doble cadena (Fig. 1.2).

Los experimentos de torque sobre moléculas individuales de ADN se realizaron por primera vez utilizando pinzas magnéticas (Strick et al., 1996). El ADN sujeto por las dos hebras en ambos extremos de la cadena se estiró y enrolló simultáneamente, lo que permitió caracterizar su rigidez a torsión hasta fuerzas de estiramiento de 8 pN. Algunos años más tarde, Bryant *et al.* (2003) utilizaron las pinzas ópticas para describir el superenrollamiento del ADN a tensiones longitudinales más altas. En este experimento, el tubo de la micropipeta, como se muestra en la Fig. 1.1 (B), se alineó con la doble hélice del ADN y se hizo rotar para transmitir torsión al polímero a diferentes fuerzas de estiramiento. Puesto que la microesfera atrapada puede rotar, una tercera microesfera (llamada “microesfera rotor”) se unió a un lado de la molécula de ADN y se mantuvo estacionaria con un flujo durante la rotación de la micropipeta, lo que hizo que los giros se acumularan en

la doble hélice. Estos experimentos permiten la descripción de transiciones estructurales inducidas por torque, a saber, desde la habitual forma B a la forma de alta helicidad del ADN llamada estructura P (estructura de Pauling) (Allemand et al., 1998).

También es posible aplicar fuerzas para separar, o abrir, las hebras complementarias de moléculas de ADN y ARN. Varias técnicas de moléculas individuales se han utilizado con este propósito (Allemand et al., 2003; Bockelmann, 2004). Respecto a las pinzas ópticas, Bockelmann *et al.* (2002) abrieron y cerraron mecánicamente una molécula de ADN con alta resolución, combinando pinzas ópticas e interferometría. La fuerza de apertura mostraba saltos entre diferentes valores a posiciones específicas y reveló rasgos característicos dependientes de la secuencia en una escala de menos de 10 pb. Liphardt *et al.* (2001) describieron un comportamiento similar en experimentos de plegamiento y extensión de ARN. En este caso, una horquilla de ARN se abrió a través de extensiones híbridas de ADN-ARN que la conectaban a dos microesferas, como en la configuración mostrada en la Fig. 1.1 (B). Cuando la horquilla se mantenía bajo una fuerza constante de ~ 14.5 pN, la estructura saltaba entre un estado abierto y otro cerrado, mostrando un equilibrio biestable dependiente de la fuerza. El efecto de la tensión sobre esta y otras estructuras de ARN más complejas (Onoa et al., 2003) ayuda a entender la respuesta del ARN a la tensión aplicada por las polimerasas o helicadas, o durante la traducción.

1.6.3. Propiedades elásticas de otros polímeros y plegamiento de proteínas

Las pinzas ópticas se han convertido en un instrumento muy útil para estudiar

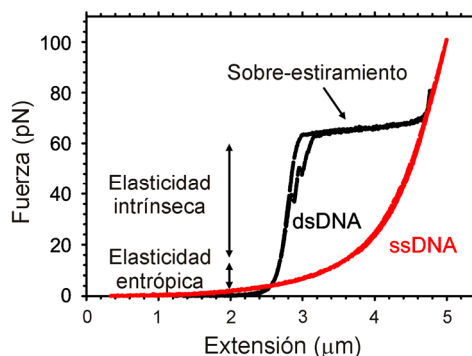


Figura 1.2 | Curvas de fuerza-extensión características del ADN. La curva negra muestra un ciclo completo de estiramiento y relajación de una molécula de ADN bicatenario (dsDNA) procedente del plásmido pBACgus11 (8 kpb) en 80 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5. Las flechas indican los distintos regímenes de elasticidad del ADN bicatenario (régimen de escisión no mostrado). La curva roja muestra un ciclo completo de estiramiento y relajación de una molécula de ADN monocatenario (ssDNA) procedente del mismo plásmido en una mezcla de tampón Tris y 20% etanol.

las propiedades mecánicas de otros biopolímeros, como los microtúbulos (Kurachi et al., 1995; Felgner et al., 1996), los filamentos de actina (Tsuda et al., 1996) o las fibras de ADN-RecA (Hegner et al., 1999; Shivashankar et al., 1999). Estos experimentos han supuesto contribuciones relevantes para la comprensión de diversos fenómenos celulares como la contracción muscular, la morfología, la polaridad, el movimiento, la división celular y el transporte de orgánulos. También se ha examinado el comportamiento mecánico de la cromatina estirando fibras individuales (Cui y Bustamante, 2000; Bennink et al., 2001; Brower-Toland et al., 2002). Además, las pinzas ópticas se han utilizado con éxito para estudiar el plegamiento de proteínas. Manipulando una proteína cada vez con resolución en fuerzas por debajo del piconewton los estados intermedios se hacen accesibles y se puede estudiar la cinética de la reacción de plegamiento-extensión en tiempo real.

1.6.4. Motores moleculares

Los motores moleculares son proteínas que convierten energía química de la hidrólisis de nucleótidos (ATP, principalmente) en trabajo mecánico. Su complejidad abarca desde moléculas individuales con una tarea específica hasta grandes complejos macromoleculares que realizan actividades altamente coordinadas. Las pinzas ópticas y otras técnicas de moléculas individuales se están utilizando para seguir su dinámica con el fin de desentrañar su complicado mecanismo.

a. Lineales

Los motores lineales, aquellos que se mueven a lo largo de vías o pistas moleculares, como los ácidos nucleicos o las fibras del citoesqueleto, han sido objeto de numerosos estudios. Un ejemplo de motor lineal bien estudiado es la quinesina. La quinesina es un motor capaz de desarrollar cientos de ciclos catalíticos sin disociarse de su pista. Se mueve a lo largo de microtúbulos transportando carga y participa en el proceso de separación de cromosomas durante la división de la célula. Block *et al.* (1990) utilizaron pinzas ópticas para atrapar microesferas de sílice cubiertas de moléculas de quinesina y colocarlas directamente sobre microtúbulos unidos a la superficie de un portaobjetos. La configuración experimental es muy parecida a la mostrada en la Fig. 1.1 (A). Cuando la quinesina se mueve a lo largo de un microtúbulo, su posición puede ser medida ópticamente monitorizando su carga (la microesfera de sílice). Unos años más tarde, Svoboda *et al.* (1993) resolvieron pasos discretos de 8 nm, que es la longitud del dímero de tubulina, intercalados con periodos de pausas de distinta duración. Dado que la microesfera en la trampa óptica actúa como la carga, es posible ejercer una fuerza opuesta al movimiento de la quinesina. Haciendo esto se ha establecido que la quinesina puede caminar contra fuerzas máximas de 5-7 pN (Svoboda et al., 1993; Kojima et al., 1997). Estos experimentos de motilidad *in vitro* requieren sistemas de detección muy sensibles para distinguir el movimiento nanométrico de la proteína del ruido térmico (Block y

Svoboda, 1995), y también un análisis estadístico detallado de los datos registrados y las fluctuaciones (Knight et al., 2001; Shaevitz et al., 2005). Experimentos sucesivos mostraron que la quinesina hidroliza una molécula de ATP por cada paso de 8 nm con una velocidad dependiente del ATP, según la cinética de Michaelis-Menten (Schnitzer y Block, 1997; Visscher et al., 1999). El objetivo de estos experimentos es establecer la base mecano-química de la generación de fuerza que conduce al movimiento de la proteína. La unión e hidrólisis del ATP provoca cambios de conformación, pero el mecanismo detallado aún no está claro.

La dineína citoplasmática es una mecano-enzima de transporte estructuralmente diferente a la quinesina y de arquitectura más compleja. Su movimiento hacia el extremo (-) de los microtúbulos ha sido estudiado con una construcción similar a la utilizada para la quinesina (Wang et al., 1995; Mallik et al., 2004). Mallik *et al.* (2004) han propuesto un mecanismo molecular dependiente de ATP que actúa en respuesta de diferentes cargas y minimiza el consumo de ATP.

También hay motores moleculares que funcionan de manera diferente a los motores de las familias de las quinesinas y las dineínas. Son motores que dan solo unos pocos pasos a lo largo del polímero antes de disociarse, requiriendo un enfoque experimental distinto para su estudio. Utilizando pinzas ópticas de dos trampas, como en la configuración de la Fig. 1.1 (C), se ha detectado el movimiento de una molécula de miosina II sobre un filamento de actina (Finer et al., 1994) y se ha estudiado su reacción mecánica en relación con los fenómenos de unión de ATP (Ishijima et al., 1998). Las diferencias en el tiempo de recorrido mostradas por las isoformas de miosinas cumplen un papel biológico específico. Por ejemplo, mientras que la miosina II del músculo esquelético tiene una distancia de trabajo de 5 nm (Kitamura et al., 1999), la miosina V (Mehta et al., 1999) y la miosina VI (Rock et al., 2001) son motores implicados en el transporte intracelular de vesículas y orgánulos, con largos recorridos de ~30 nm.

b. Motores moleculares de unión a ácidos nucleicos

Las pinzas ópticas han demostrado ser una técnica exitosa para investigar los motores moleculares de unión a ácidos nucleicos en condiciones fisiológicas. La ARN polimerasa, la enzima responsable de la transcripción del ADN, asocia la liberación de energía libre durante la unión del nucleótido a su movimiento a lo largo del molde de ADN. Para el estudio a nivel de molécula individual, se inmoviliza sobre la superficie de una microesfera o de un cubreobjetos un complejo constituido por una ARN polimerasa, el molde de ADN y una cadena de ARN nascente. El extremo libre del ADN se une a una microesfera atrapada ópticamente (configuración similar a la mostrada en la Fig. 1.1 (A) y (B)). Mientras sucede la transcripción, la polimerasa arrastra la microesfera atrapada hacia fuera del foco y hace posible detectar el movimiento de la enzima. Esto posibilita el estudio tanto de su dinámica

como de su cinética. Utilizando la primera configuración, Yin *et al.* (1995) observaron que la ARN polimerasa de *Escherichia coli* se puede mover a lo largo del ADN molde a velocidades superiores a los 10 nucleótidos/s. Las pinzas ópticas también pueden ser usadas para aplicar fuerza externa, de forma que se puede estudiar la dependencia de la tasa de polimerización con la fuerza. Wang *et al.* (1998) mostraron que la ARN polimerasa puede trabajar contra fuerzas de hasta ~25 pN sin efectos perceptibles sobre su velocidad, pero que una fuerza más alta causa que la enzima se pare. Existen también pausas en la actividad de la ARN polimerasa que aparecen intercaladas con períodos de transcripción continua. Las pausas son detectadas como períodos en que la longitud del ADN permanece igual para una tensión fija. Utilizando flujo hidrodinámico para ejercer fuerza opuesta a la transcripción, Davenport *et al.* (2000) mostraron que las pausas en el movimiento de la ARN polimerasa están distribuidas con mayor probabilidad en sitios específicos a lo largo del ADN, proponiendo que la pausa es un estado intermedio entre el estado activo y el detenido. Un estudio más detallado de las pausas de larga duración (>20 s) en el que se utilizaban pinzas de doble trampa y resolución cercana al par de bases, ha confirmado la presencia de un movimiento hacia atrás de la ARN polimerasa asociado a un mecanismo de corrección de errores (Shaevitz *et al.*, 2003). La presencia de factores de transcripción, como GreA y GreB, acorta la duración de las pausas incrementando la eficiencia global. Neuman *et al.* (2003) utilizaron el mismo experimento de alta resolución con dos trampas para determinar la existencia de pausas cortas (3 s de media) que son frecuentes, aleatorias e independientes de la carga. Estos autores proponen que *in vivo* estas pausas pueden limitar la tasa de polimerización del ARN mensajero para ajustarla a la tasa de síntesis de proteínas, que en procariotas sucede simultáneamente. Más recientemente, utilizando unas pinzas ópticas de doble trampa con mejor resolución, Abbondanzieri *et al.* (2005) midieron pasos discretos de 3.7 Å para la ARN polimerasa de *E. coli*, valor que es equivalente a la distancia promedio entre pares de bases encontrada en el ADN tipo B. Además, concluyeron que la dinámica del motor es consistente con un modelo de trinquete browniano (del inglés, *Brownian ratchet*; modelo en el que el movimiento es producido por las fluctuaciones térmicas), incorporando un segundo sitio de unión de nucleótidos.

La ADN polimerasa también ha sido estudiada con pinzas ópticas. Wuite *et al.* (2000b) estiraron un ADN entre dos microesferas para investigar el efecto de la tensión del molde sobre la actividad de la ADN polimerasa de T7. Observaron cambios en la curva fuerza-extensión del ADN a medida que la enzima convertía el ADN de cadena sencilla en cadena doble, encontrando actividad de exonucleólisis inesperada a fuerzas que sobrepasaban los 40 pN.

Las topoisomerasas y helicasas, que son enzimas responsables de separar las dos hebras del ADN durante la replicación *in vivo*, también se han estudiado con pinzas ópticas. Las helicasas desenrollan y abren la doble hélice del ADN en sus

cadenas sencillas, mientras que las topoisomerasas desenredan los enrollamientos rompiendo un enlace fosfodiéster en una o ambas cadenas. Entre los numerosos estudios existentes mencionaremos aquí como ejemplo el de Stone *et al.* (2003), quienes suspendieron dos moléculas de ADN, con un enlace fosfodiéster roto, entre una microesfera en una trampa óptica y otra microesfera en una micropipeta que rotaba para crear enrollamientos positivos y negativos. Investigaron así el mecanismo por el que la topoisomerasa IV de *E. coli* reconoce la quiralidad del ADN y su preferencia por enrollamientos positivos, arrojando luz sobre su ciclo mecano-químico. Más recientemente, Dumont *et al.* (2006) aplicaron tensión sobre una horquilla de ARN que fue asida entre dos microesferas para observar la actividad de la helicasa HCV (virus de la hepatitis C) NS3. En estos experimentos estudiaron los ciclos de translocación y desplegamiento del ARN en tiempo real y explicaron cómo la actividad de la enzima está coordinada por el ATP.

c. Empaquetamiento viral

El mecanismo por el cual el fago $\Phi 29$ de *Bacillus subtilis* puede empaquetar un ADN dentro de una cápsida de 42 nm $\times$ 54 nm, venciendo restricciones entrópicas y electrostáticas, ha sido estudiado con pinzas ópticas (Smith *et al.*, 2001). Cápsidas de $\Phi 29$ que habían empaquetado parcialmente un ADN bicatenario de 6.6 μ m se unieron a una microesfera en una micropipeta. El extremo libre del ADN empaquetado se unió a otra microesfera atrapada ópticamente. Smith *et al.* mostraron que el motor de este fago introduce el ADN ejerciendo fuerzas de hasta ~ 57 pN, lo que representa una de las fuerzas más grandes jamás observadas para un motor biológico. Más recientemente, Chemla *et al.* (2005) propusieron un ciclo mecano-químico para la ATPasa translocadora de ADN del fago.

1.7. Introducción a los proyectos biofísicos de esta tesis

1.7.1. ADN en condiciones de baja humedad

El ADN posee una considerable carga eléctrica en solución acuosa que, desde el punto de vista de la magnitud de las interacciones electrostáticas, le hace diferente de otros biopolímeros: las moléculas de agua y los contraiones condensados desempeñan un papel más importante en la unión de biomoléculas y en la estructura del ADN que en las proteínas (Saenger, 1984). Por un lado, las interacciones electrostáticas hacen del ADN un polímero mecánicamente maleable para que las proteínas puedan trabajar sobre él (Bustamante et al., 2003). Por otro lado, las interacciones electrostáticas proveen al ADN de una estructura dinámica muy sensible a las fluctuaciones térmicas y a las condiciones ambientales. Así, el ADN es capaz de cambiar sus propiedades mecánicas y su conformación dependiendo de la temperatura (Williams et al., 2001b; Mao et al., 2005), el pH (Williams et al., 2001a), la fuerza iónica y naturaleza de los contraiones (Baumann et al., 1997; Wenner et al., 2002) y la humedad relativa (Brahms y Mommaerts, 1964; Piskur y Rupprecht, 1995).

La asociación entre las hélices del ADN se favorece por la reducción de la actividad del agua alrededor del polímero. Este fenómeno puede conducir a la condensación y la agregación reversible (Bloomfield, 1997), que son formas de estructura terciaria y cuaternaria del ADN, respectivamente. El colapso de las moléculas de ADN en mezclas de agua y alcohol y su consiguiente precipitación se conoce desde hace tiempo (Lang, 1969). *In vivo*, la actividad del agua se puede encontrar reducida localmente (a nivel de unos pocos pares de bases) debido a la unión de ligandos (Lu et al., 2000), motores moleculares (Hormeno y Arias-Gonzalez, 2006), drogas (Yang y Wang, 1999), cationes multivalentes (como poliaminas (Thomas y Thomas, 2001), surfactantes catiónicos (Husale et al., 2008) y lípidos (Matulis et al., 2002)), e histonas y protaminas (Besteman et al., 2007). Estas uniones pueden inducir además cambios conformacionales que implican transiciones estructurales (Leslie et al., 1980; Bustamante et al., 2003), deformaciones por doblamiento y estiramiento (Hagerman, 1988; Bustamante et al., 2003; Pastre et al., 2006), desnaturalización (o *melting*) (Thomas y Bloomfield, 1984) y mecanismos de protección (Becker y Zhou, 1989; Setlow, 1992; D'Agostino et al., 2005). De manera más global, la hidratación se reduce alrededor de largas cadenas de ADN en las estructuras altamente comprimidas y organizadas dentro de las cápsidas virales. Por todo ello, la comprensión de la regulación de la actividad acuosa alrededor del ADN (Pastor, 2005) puede contribuir a explicar procesos como la replicación (Eom et al., 1996) y la transcripción (Florentiev y Ivanov, 1970; Beabealashvily et al., 1972; Suzuki et al., 1996), en los cuales el mecanismo de acción de polimerasas y helicasas ha de ser compatible con las propiedades elásticas de los ácidos nucleicos y sus híbridos (Cheetham y Steitz, 1999). Además, la modulación *in vivo* de los

condensados tiene consecuencias importantes en los procesos de empaquetamiento general del ADN (Reich et al., 1991): desde el empaquetamiento de ácidos nucleicos dentro de las precabezas virales, que proporcionan al ADN un ambiente hidrofóbico óptimo para favorecer el empaquetamiento ordenado (Lepault et al., 1987), a la organización del ADN genómico (Wahl y Sundaralingam, 1997). De hecho, la condensación del ADN *in vitro* produce diferentes regímenes de organización que son función de la constante dieléctrica (ϵ) del medio: desde la condensación en estructuras toroidales y cilíndricas (Lang, 1969; Widom y Baldwin, 1980; Fang et al., 1999; Hud y Downing, 2001), a redes de agregados de fibras de ADN con estructura secundaria tipo A (Arscott et al., 1995).

La deshidratación del ADN por la adición de solventes no polares, como alcoholes, tiene una influencia notable en la organización del polímero. Las moléculas del solvente no polar desplazan a las moléculas de agua y sustituyen los enlaces de hidrógeno entre estas y el ADN. Para la mayoría de los aspectos de la condensación, el efecto del alcohol se puede racionalizar utilizando la ϵ del solvente (Arscott et al., 1995): las interacciones electrostáticas se vuelven más fuertes al decrecer ϵ y, consecuentemente, se intensifica la condensación de contraiones (Manning, 1978), facilitando la condensación y la agregación del ADN. Fisiológicamente, la unión de contraiones al ADN tiene el efecto local de competir con las moléculas de agua disponibles, reduciendo la actividad acuosa en la vecindad de la superficie del polímero (Saenger et al., 1986; Subirana y Soler-Lopez, 2003). Las poliaminas son pequeños cationes multivalentes orgánicos involucrados en diversos procesos celulares (Thomas y Thomas, 2001). Se sabe que las poliaminas y también el ión inorgánico hexamina cobalto III, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (Arscott et al., 1995; Bauer y Wang, 1997; Kankia et al., 2001), pueden inducir la condensación del ADN (Bloomfield, 1997) y su estabilización en formas compactas (Gosule y Schellman, 1976; Raspaud et al., 1999) en condiciones de baja humedad (van Dam et al., 2002).

La estructura secundaria del ADN y las transiciones entre sus diferentes formas (Ivanov et al., 1974) ha constituido uno de los primeros problemas estudiados en biología molecular y estructural. En particular, el estudio de la transformación desde la forma B en condiciones fisiológicas a la forma A deshidratada del ADN (las características principales de cada una se recogen en la Tabla 1.2) se remonta a 1953 (Franklin y Gosling, 1953; Watson y Crick, 1953). Existen además otras formas de ADN (Girod et al., 1973; Ivanov et al., 1973; Leslie et al., 1980), incluyendo estructuras con helicidad opuesta (Jovin et al., 1987). En contraste al polimorfismo del ADN, es llamativo que el ARN bicatenario no manifieste cambios estructurales de este tipo y permanezca siempre en forma A (Arnott et al., 1968; Saenger, 1984; Abels et al., 2005). Este hecho, junto con la existencia de la forma A en los híbridos ARN-ADN, ha llevado a sugerir que la conformación A podría ser importante desde un punto de vista evolutivo, para ayudar al ADN a sustituir al ARN como portador de la información genética en un período de transición desde un mundo de ARN a otro de

ADN (Trantirek et al., 2000). La transición B-A se induce experimentalmente en solución añadiendo un alcohol. Los cationes multivalentes también se han usado para promover esta transición a partir de una concentración crítica de alcohol más baja (Minyat et al., 1979), e incluso, en solución acuosa con secuencias de ADN apropiadas (Xu et al., 1993; Robinson y Wang, 1996), debido a su habilidad para reducir la actividad acuosa en la vecindad de la superficie del ADN.

Tipo de estructura	Forma A	Forma B
Diámetro hélice	2.55 nm	2.37 nm
Distancia axial/pb	0.256 nm	0.338 nm
Pares de bases/vuelta	~11	~10
Inclinación pb respecto a la normal al eje	+19°	-1°
Configuración azúcar	C3'-endo	C2'-endo

Tabla 1.2 | Principales formas de estructura secundaria del ADN. Resumen de los parámetros característicos de las formas estructurales A y B del ADN (Saenger, 1984). El parámetro local más representativo de la estructura en forma A frente a la B es la configuración de plegamiento del azúcar de cada nucleótido. La conformación C3'-endo corresponde con el ADN en forma A y la C2'-endo con la forma B. Esta notación indica qué átomo de carbono de la desoxirribosa se dispone fuera del plano que forma el anillo del azúcar. La configuración del azúcar constriñe la distancia entre los grupos fosfatos (5.9 Å en C3'-endo y 7 Å en C2'-endo) y define la forma global de la hélice.

La secuencia de las bases de los nucleótidos está también implicada en diversos fenómenos como el polimorfismo del ADN (Leslie et al., 1980; Calladine y Drew, 1984), la estabilidad mecano-química (elasticidad longitudinal y desnaturalización, entre otros) (Clausen-Schaumann et al., 2000) y en la transcripción y el reconocimiento molecular (Arnott y Selsing, 1974). En particular, se sabe que las regiones ricas en GC (guanina, citosina) son más propensas a adoptar la forma A que las regiones ricas en AT (adenina, timina), que son más resistentes a adoptar la forma A incluso a muy baja humedad (Usaty y Shlyakhtenko, 1974; Narainui et al., 1985; Nishimura et al., 1985; Minchenkova et al., 1986; Becker y Zhou, 1989; Albiser et al., 2001; Mazur, 2005; Borovok et al., 2007).

Hasta la fecha, los experimentos de estiramiento a baja humedad se han realizado con muchas fibras de ADN agregadas, uniendo un contrapeso a uno de los extremos del haz. De esta forma, la información que se obtiene proviene de las medidas de todo el complejo, sin acceso a la información de una sola fibra de ADN. Con estos experimentos se ha estudiado la longitud relativa del haz agregado como función de la temperatura y las condiciones iónicas en diferentes humedades relativas, arrojando luz sobre las transiciones estructurales promovidas por la baja actividad del agua (Fornells et al., 1983; Albiser et al., 1988; Rupprecht et al., 1994).

1.7.2. Centrosomas

El centrosoma es un orgánulo complejo de células eucariotas que suele estar localizado cerca del núcleo, en la zona central de la célula (Doxsey, 2001; Bettencourt-Dias y Glover, 2007). Su estructura es heterogénea y varía según el tipo celular y el organismo (Bornens, 2002), pero normalmente está compuesta por un par de centriolos rodeados del denominado material pericentriolar (MPC) (Fig. 1.3). Los centriolos son estructuras cilíndricas que se disponen perpendicularmente uno a otro, en una configuración en forma de “L” (Moritz et al., 1995; Lange y Gull, 1996; Ibrahim et al., 2008). Generalmente, comprenden nueve tripletes de microtúbulos, junto con otros elementos. El MPC es una matriz de fibras que proporciona al centrosoma un andamiaje para anclar proteínas involucradas en la nucleación de microtúbulos y otras actividades. Actúa como una red molecular altamente dinámica que participa en los cambios de morfología y actividad del centrosoma durante el ciclo celular (Baron et al., 1994; Gonzalez et al., 1998; Doxsey, 2001; Bettencourt-Dias y Glover, 2007). El desarrollo del centrosoma es bastante más complejo que el de otros orgánulos y conlleva su duplicación durante el ciclo celular. Esta habilidad única, solo compartida por los cromosomas, parece estar ligada a la progresión del ciclo celular en, por ejemplo, la activación de las etapas finales de la citoquinesis y en la liberación de las células desde un punto de control. También tiene que estar coordinado con el ciclo de los cromosomas. El centrosoma desempeña un papel relevante en la nucleación, anclaje y liberación de microtúbulos. Estos procesos son esenciales para la formación y el posicionamiento del huso mitótico durante la división celular, y para la organización del citoesqueleto. También son importantes para la adhesión y la regulación de la motilidad celular, e influyen en la polaridad de la célula. A pesar de la importancia del centrosoma, aún están por determinar de manera precisa su composición molecular, características estructurales, función y regulación (Doxsey, 2001; Bettencourt-Dias y Glover, 2007).

Los fenómenos eléctricos, que son clave para explicar las estructuras moleculares y sus interacciones, desempeñan funciones sutiles pero esenciales en los procesos celulares en la nanoescala (McCaig et al., 2005). Las estructuras cargadas y los campos eléctricos locales son ubicuos en la célula (Tyner et al., 2007; Kovacic, 2008) y, por lo tanto, la naturaleza eléctrica de los complejos supramoleculares es de suma importancia. El denso medio celular alberga una compleja dinámica que involucra a multitud de procesos locales, aunque integrados globalmente. En este escenario, las grandes estructuras cargadas, como los microtúbulos, las membranas o el citoesqueleto (Vassilev y Kanazirska, 1985; Gagliardi, 2002; Stracke et al., 2002; van den Heuvel et al., 2007; Gagliardi, 2008), deben estar implicadas en la distribución y el movimiento de las macromoléculas (McCaig et al., 2005; Tyner et al., 2007; Kovacic, 2008). Los campos eléctricos pequeños afectan a importantes procesos como la división celular (Zhao et al., 1999) y, en este contexto, las propiedades eléctricas del centrosoma son fundamentales para comprender sus

interacciones, difusión y función dentro de la célula. Además, debido a las grandes dimensiones del centrosoma y a la carencia de un límite morfológico, tamaño y forma definidos, una carga eléctrica tendría implicaciones sobre su propia estructura.

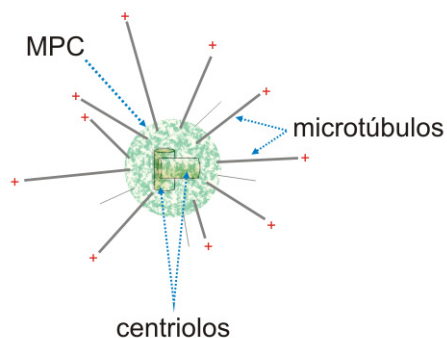


Figura 1.3 | Estructura esquemática de un centrosoma con microtúbulos. El centrosoma comprende dos centriolos rodeados por una matriz porosa de fibras que forma el llamado material pericentriolar (MPC). Los microtúbulos crecen radialmente desde el MPC. El extremo (-) de cada microtúbulo está inmerso en el centrosoma, mientras que el extremo (+) está libre en el citoplasma.

Un gran ensamblado macromolecular es un sistema complejo cuya carga y punto isoelectrico (pI) son difíciles de inferir a través del examen directo de sus piezas moleculares, porque su nivel superior de organización influye en la distribución de la carga. El pI de los microtúbulos es ~ 4.2 (Stracke et al., 2002), significativamente inferior al de los monómeros de tubulina individuales (5.45-5.65 y 5.30-5.45 para α - y β -tubulina, respectivamente (Detrich y Overton, 1986; Linhartova et al., 1993)). El desconocimiento de los detalles moleculares y estructurales del centrosoma hace que sea más difícil aun predecir el pI de este ensamblaje macromolecular.

Existe un buen número de trabajos que versan sobre la densidad de carga superficial de los microtúbulos (Baker et al., 2001; Stracke et al., 2002; van den Heuvel et al., 2007), mientras que hasta la fecha no hay información sobre la carga de los centrosomas, ni siquiera se sabe si la carga neta es positiva o negativa en condiciones fisiológicas. Del mismo modo, no se sabe su orden de magnitud y su importancia relativa respecto a la densidad de carga de los microtúbulos, sus compañeros funcionales más inmediatos. La caracterización hidrodinámica del centrosoma en condiciones fisiológicas está también ausente en la literatura científica, en contraste con las caracterizaciones hidrodinámicas de los microtúbulos (van den Heuvel et al., 2007).

Objetivos

Los objetivos de este trabajo de tesis se centran en tres proyectos diferentes:

- La construcción e implementación de un instrumento de pinzas ópticas para el desarrollo de estudios en el campo de la biofísica molecular y celular.
- El estudio del comportamiento elástico de moléculas individuales de ADN en condiciones de baja humedad. En este escenario aparecen dos fenómenos que también son objeto de investigación: la condensación intramolecular y la transición estructural entre las formas de estructura secundaria B y A del ADN. Se pretenden analizar los efectos de la acción simultánea de la tensión, el etanol y el polication espermina sobre moléculas únicas de ADN y estudiar su dependencia con la composición de la secuencia.
- La caracterización biofísica de centrosomas individuales. Se pretende analizar, por un lado, el comportamiento hidrodinámico de los centrosomas a través de la manipulación óptica de especímenes únicos en solución. Además, se pretende estudiar el efecto de un catión biológicamente relevante como es el Ca^{2+} sobre la estructura del centrosoma. Por otro lado, se persigue analizar el comportamiento de los centrosomas en presencia de campos eléctricos, con el fin de determinar la presencia de carga intrínseca en los mismos.

Resultados

2

Construcción de un instrumento de pinzas ópticas que mide la fuerza a partir del cambio de momento de la luz

La forma más sencilla de montar un instrumento de pinzas ópticas de un haz para aplicaciones en biología es hacerlo dentro de un microscopio convencional (Svoboda y Block, 1994; Wuite et al., 2000a). Para ello se necesitan una serie de elementos básicos, a saber, una lente de objetivo de alta focalización, una cámara de fluidos para las muestras, una lente condensadora y un sistema de detección de luz. El desplazamiento de la microesfera atrapada es lineal a lo largo de un amplio rango de fuerzas y, por lo tanto, la trampa óptica se puede caracterizar por una constante de recuperación, como un análogo óptico de una micropalanca mecánica. Después, a través del registro de la luz desviada por la microesfera, se pueden medir tanto la fuerza como el movimiento de la microesfera. Un sistema de doble haz, el cual básicamente consiste en dos haces iguales contrapropagantes y con el mismo foco, permite una reducción significativa del daño por radiación, mientras que mantiene un rango de fuerzas similar al de una trampa de un solo haz; por ejemplo, el sistema de pinzas ópticas de doble haz ideado por Smith *et al.* (2003). Este grupo también introdujo la medida de la fuerza a partir del principio de conservación del momento, lo cual es posible esencialmente recogiendo toda la luz saliente de la trampa. Respecto a la iluminación del láser, es preferible una longitud de onda próxima al infrarrojo para aplicaciones biológicas, porque el agua y los especímenes biológicos exhiben una adecuada transparencia entre 780 y 1100 nm. Una potencia de salida de unos ~200 mW es suficiente normalmente para generar fuerzas de un centenar de pN. La luz dispersada por la muestra en la trampa es dirigida a fotodetectores sensibles a la posición, como se muestra en la Fig. 2.1, para después obtener la medida de la fuerza y la posición.

Uno de los objetivos de esta tesis es la construcción de un instrumento de pinzas ópticas para su aplicación en biología molecular y celular. En este capítulo se describe el instrumento construido siguiendo el diseño original de Steve B. Smith, de la Universidad de Berkeley (EEUU) (Smith et al., 2003). Se muestran las bases físicas del instrumento, se explica su funcionamiento y se describen los elementos ópticos, mecánicos y electrónicos que lo componen.

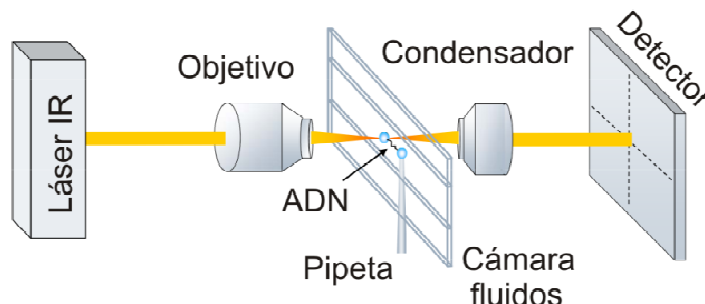


Figura 2.1 | Elementos básicos de un instrumento de pinzas ópticas. La luz del láser (típicamente infrarroja) es focalizada por un objetivo de microscopio y recogida por una lente condensadora. La trampa óptica se genera en el interior de una cámara de fluidos que contiene las microesferas (o células) en solución. Una micropipeta insertada en la cámara se puede usar para mantener por succión una segunda microesfera. El haz dispersado a la salida es recogido y registrado en un fotodetector sensible a la posición. La figura muestra un experimento de molécula individual en el que se estira una fibra de ADN entre dos microesferas.

2.1. Origen de las fuerzas de atrapamiento

La fuerza ejercida por un campo de fotones sobre una partícula depende de su índice de refracción. Debido a esta propiedad material, las partículas se clasifican generalmente en dieléctricas (no conductoras) y metálicas (conductoras). Se ha demostrado que las partículas dieléctricas son atraídas a regiones de mayor intensidad de campo. Por el contrario, las partículas metálicas pueden estar sujetas a fuerzas que las atraigan o bien las expulsan de las regiones de mayor intensidad (Arias-Gonzalez y Nieto-Vesperinas, 2002, 2003). Se sabe que las células y las biomoléculas se comportan como partículas dieléctricas (Ashkin y Dziedzic, 1987; Ashkin et al., 1987; Ashkin y Dziedzic, 1989), mientras que los átomos poseen un comportamiento más complejo.

Las partículas dieléctricas sienten dos tipos de fuerzas ópticas bajo la acción de la luz: una fuerza de dispersión (o *scattering*), producida por los fotones que empujan la partícula en la dirección de propagación; y la fuerza de gradiente, que tira de la partícula hacia la región de mayor intensidad del campo. Para ilustrar el origen de estas componentes de la fuerza, pensemos en una esfera dieléctrica ($\text{diámetro} > \lambda$) de alto índice de refracción, sobre la que incide un haz de luz con un perfil de intensidad gaussiano, como muestra la Fig. 2.2 (A). Un rayo de luz se puede concebir como un torrente de fotones, cada uno de ellos llevando un momento asociado. Los fotones que siguen las trayectorias marcadas como “a” y “b” se refractan en las superficies de entrada y salida de la partícula (despreciando las reflexiones

superficiales), siguiendo los caminos que se muestran en la figura. Esa refracción manifiesta la interacción a nivel atómico de los fotones con la materia que forma la esfera y debido a la cual cambian su momento lineal. La variación de momento experimentada por cada fotón es transferida a la partícula, generando así las fuerzas F_a y F_b . Puesto que hay más fotones que siguen el camino “b” que el “a”, porque la intensidad del haz es mayor a lo largo del primero, la fuerza F_b es mayor que F_a . La suma de las componentes de los vectores F_a y F_b , y de todas las trayectorias de los fotones que componen el haz, en la dirección de propagación de la onda y en la perpendicular, da como resultado dos fuerzas netas sobre la partícula: la fuerza de dispersión, que empuja la partícula en la dirección de propagación del haz incidente, y la fuerza de gradiente, dirigida hacia la línea central del haz, esto es, apuntando hacia la intensidad creciente.

En la Fig. 2.2 (A) hay estabilidad transversal para una partícula sobre el eje, ya que aquí $F_a = F_b$, y no hay fuerza neta vertical. Para conseguir una trampa tridimensional, se debe lograr además la estabilidad axial, es decir, la fuerza de dispersión se tiene que compensar del mismo modo. Ashkin (1970) hizo esto posible por primera vez utilizando dos haces iguales enfrentados entre sí. Una trampa generada de esta manera se conoce como pinzas ópticas de doble haz. También demostró la levitación óptica utilizando un haz vertical para el que la estabilidad axial dependía del equilibrio de la fuerza de dispersión y la gravedad (Ashkin y Dziedzic, 1971). Pero la trampa más manejable y fácil de implementar que ideó consistía en un haz láser y un objetivo (Ashkin et al., 1986). Simplemente focalizando el haz láser (Fig. 2.2 (B)), la región focal se convierte en el máximo de intensidad y se genera así un gradiente de fuerza axial hacia esta región cuando la partícula está en su vecindad. Si la focalización es suficientemente fuerte, el efecto de gradiente domina sobre la estabilidad axial. Esta trampa constituyó las primeras pinzas ópticas de un solo haz.

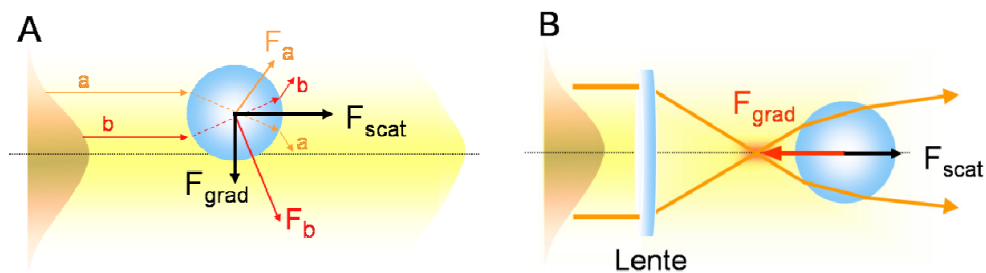


Figura 2.2 | Fuerzas ópticas sobre una esfera dieléctrica. (A) Origen de las componentes de dispersión o *scattering* (F_{scat}) y gradiente (F_{grad}) de la fuerza óptica sobre una esfera dieléctrica debido a un haz láser gaussiano. (B) Estabilidad axial de una esfera dieléctrica en un haz láser focalizado, establecida por la fuerza de gradiente a lo largo de la propagación del haz, hacia la región focal. Ver detalles en el texto.

2.2. Teoría del sensor de fuerzas

La mayoría de los métodos para medir fuerza tratan la trampa óptica como un pozo de potencial armónico o “muelle virtual”, que atrae a la partícula hacia el centro de la trampa. Midiendo el desplazamiento Δx de la partícula dentro de la trampa y estimando la constante de recuperación κ , la fuerza viene dada por $F = \kappa \Delta x$. La posición de una partícula esférica dentro de una trampa se puede medir con precisión sub-nanométrica, por lo que esta técnica ha demostrado ser muy efectiva. Desafortunadamente, la calibración del muelle virtual conlleva algunas dificultades técnicas que complican ciertas medidas (Smith et al., 2003). La calibración de la constante de recuperación de la trampa se suele realizar aplicando una fuerza de arrastre conocida a la esfera y midiendo su desplazamiento en la trampa (método de la ley de Stokes) o registrando el movimiento browniano de la microesfera dentro de la trampa y determinando su frecuencia *corner* (método de la frecuencia *corner*) (Svoboda y Block, 1994). Sin embargo, tanto la ley de Stokes como el método de la frecuencia *corner* requieren conocer el tamaño y forma de la microesfera, así como la viscosidad del fluido para obtener el coeficiente de fricción de la partícula. Además, el coeficiente de fricción aumenta para las partículas cerca de una superficie estacionaria como un cubreobjetos o la pared celular (Happel y Brenner, 1991). Alternativamente, otro método para estimar κ sin usar el coeficiente de fricción consiste en aplicar el teorema de equipartición, que relaciona el desplazamiento cuadrático medio $\langle \Delta x^2 \rangle$ de una partícula (del centro de la trampa) con su energía térmica media: $\frac{1}{2} \kappa \langle \Delta x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$. Este método requiere la determinación del desplazamiento del objeto con sensibilidad nanométrica a lo largo del eje correspondiente a un grado de libertad. También es susceptible al ruido de baja frecuencia y a la deriva térmica (Simmons et al., 1996).

Existe un tipo diferente de sensor de fuerza que evita las limitaciones descritas arriba midiendo directamente los cambios del flujo de momento de la luz causados por la interacción partícula-trampa (Smith et al., 2003). La variación del cambio de momento de todos los fotones que entran y salen de la trampa es igual a la fuerza que actúa sobre la partícula atrapada, por conservación de momento lineal. Para construir un sensor de fuerza basado en este principio es necesario: i) recoger toda la luz que ha interactuado con la partícula; y ii) analizar la dirección e intensidad de la luz para extraer las componentes del momento. La Fig. 2.3 muestra un esquema de un dispositivo para medir la fuerza a partir del cambio de momento de la luz. Aquí la luz se muestra entrando desde la izquierda y convergiendo a través de un objetivo en un foco en el que la partícula dieléctrica es atrapada (Fig. 2.3 (A)). La luz que sale de la trampa hacia la derecha es recogida por un objetivo similar. Cuando una fuerza externa actúa sobre la partícula (Fig. 2.3 (B)), la luz es desviada fuera del eje óptico y sale de la trampa con una distribución angular diferente. Un

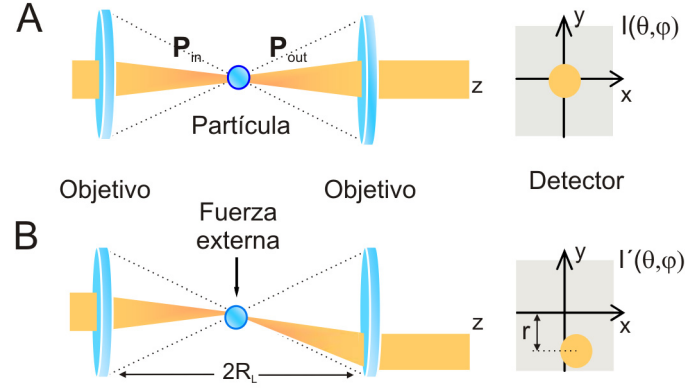


Figura 2.3 | Trampa óptica que analiza el flujo de momento de la luz. **(A)** Las líneas discontinuas indican los rayos más externos recogidos por los objetivos, definiendo la apertura numérica de la lente. El cono interno (coloreado en naranja) representa el haz láser que entra por la izquierda, pasa a través de la microesfera, es recogido por el objetivo de la derecha y sale. **(B)** La aplicación de una fuerza externa a la microesfera causará que se equilibre ligeramente desplazada del centro de la trampa, de forma que la presión de la luz del haz desviado iguale exactamente la fuerza externa. La deflexión angular, θ , de un rayo a la salida de la trampa es transformada por el objetivo derecho en una distancia al eje óptico, r , tal que $r/R_L = n_l \sin \theta$, donde n_l es el índice de refracción del líquido y R_L es la distancia focal de la lente. La fuerza óptica transversal F que siente una microesfera al desviar un rayo de luz de intensidad W un ángulo θ está dada por $F = (n_l W/c) \cdot \sin \theta$, donde c es la velocidad de la luz. Por tanto, $F = (W/c) \cdot (r/R_L)$.

detector de fotodiodo sensible a la posición (a la derecha de la figura) mide la potencia y la desviación de la luz para inferir la fuerza externa.

Consideremos la luz que es transmitida a través de un líquido transparente de índice de refracción n_l y que interacciona con un objeto sumergido en ese líquido. Una onda de luz porta un flujo de momento dado por (Gordon, 1973)

$$d\left(\frac{d\mathbf{P}}{dt}\right) = \left(\frac{n_l}{c}\right) \mathbf{S} dA \quad (2.1)$$

donde $\mathbf{S}$ es el vector de Poynting, c es la velocidad de la luz y dA es un elemento de área perpendicular a $\mathbf{S}$. La fuerza producida por la luz sobre el objeto es la diferencia entre el flujo de momento que entra ($\mathbf{P}_{in}$) y que sale ($\mathbf{P}_{out}$) de la vecindad del objeto. La fuerza se puede obtener integrando la intensidad de la luz que entra ($\mathbf{S}_{in}$) y que sale ($\mathbf{S}_{out}$) a través de una superficie alrededor del objeto, suponiendo que los elementos de esa superficie (dA) son normales a $\mathbf{S}$:

$$\mathbf{F} = \frac{d\mathbf{P}_{in}}{dt} - \frac{d\mathbf{P}_{out}}{dt} = \frac{n_l}{c} \iint (\mathbf{S}_{in} - \mathbf{S}_{out}) dA \quad (2.2)$$

Para una trampa óptica, la integración se puede realizar sobre una superficie esférica distante ($R \gg \lambda$) centrada en el punto focal. Aquí $\mathbf{S}_{in}$ es perpendicular a la superficie porque la onda incidente es esférica, y $\mathbf{S}_{out}$ es perpendicular porque emana de un punto (u objeto) en la trampa. Puesto que el radio de la esfera, R , es arbitrario, se puede definir una distribución angular de intensidad para la onda de luz que entra o sale del foco, $I(\theta, \phi) \mathbf{u}_r d\Omega = S dA$, donde $\mathbf{u}_r$ es un vector unitario radial con origen en el foco, θ y ϕ son los ángulos que se muestran en la Fig. 2.4, y $d\Omega \equiv dA/R^2 = d\theta \sin\theta d\phi$, es un elemento de ángulo sólido.

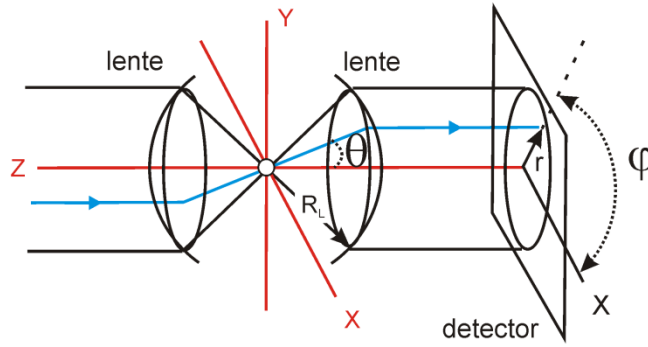


Figura 2.4 | Sistema de referencia de la trampa óptica. La luz entra desde la izquierda y es focalizada por la primera lente. La microesfera está en el foco. Una segunda lente, de distancia focal R_L , convierte la luz saliente en un haz paralelo, que incide sobre el detector.

Aunque es difícil predecir $I(\theta, \phi)$ para la luz dispersada por un objeto arbitrario atrapado en el foco, no es difícil medir $I(\theta, \phi)$. Una vez que esto se ha hecho, la fuerza ejercida por la luz sobre el objeto se puede calcular como

$$\mathbf{F} = \frac{n}{4\pi c} \iint I(\theta, \phi) (\mathbf{i} \sin\theta \cos\phi + \mathbf{j} \sin\theta \sin\phi + \mathbf{k} \cos\theta) d\Omega \quad (2.3)$$

Aquí, $I(\theta, \phi)$ es la intensidad de la luz, medida en $\text{watio} \cdot \text{estereorradián}^{-1}$, considerada negativa para los rayos que entran en la trampa y positiva para los rayos que salen de ella. Si la trampa está vacía (sin partícula que desvíe los rayos) entonces $I(\theta, \phi) = -I(-\theta, -\phi)$ y la integral sobre todos los ángulos es igual a cero.

Una forma conveniente de medir $I(\theta, \phi)$ la proporciona una versión de la condición del seno de Abbe (Pluta, 1988), la cual afirma que cualquier rayo que sale del foco principal de una lente de objetivo libre de coma, inclinado un ángulo θ sobre el eje óptico pero aún incidiendo en la lente, saldrá del plano principal imagen de esa lente a una distancia r desde el eje óptico dada por

$$r = R_L n_l \sin\theta_l \quad (2.4)$$

Aquí n_l es el índice de refracción del líquido en el que está el objeto y R_L es un radio efectivo para la lente igual a su distancia focal. Aunque en la Fig. 2.4 no aparezcan las superficies de vidrio y aire que típicamente atraviesa la luz en su camino desde el foco a la lente, la cantidad $n_l \sin \theta_l = n_{\text{vidrio}} \sin \theta_{\text{vidrio}} = n_{\text{aire}} \sin \theta_{\text{aire}}$ es invariante (por la ley de Snell) para cualquier rayo que atravesase un tampón, una superficie de vidrio y aire, por lo que la Ec. (2.4) es independiente de las propiedades refractivas de estos medios.

Si los rayos que salen de la trampa en un elemento de ángulo sólido $d\Omega/4\pi$ son proyectados sin pérdidas en un elemento de área dA' ($= r d\phi dr$) del plano principal imagen de la lente, entonces, por conservación de la energía, la irradiancia E (en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) sobre dA' viene dada por $E(r, \phi) dA' = I(\theta, \phi) d\Omega/4\pi$. Si las lentes recogen toda la luz que sale de la trampa, entonces la expresión para la fuerza se puede escribir como

$$\mathbf{F} = \frac{1}{c} \iint E(r, \phi) \left(\mathbf{i} \frac{r}{R_L} \cos \phi + \mathbf{j} \frac{r}{R_L} \sin \phi + \mathbf{k} \sqrt{n_l^2 - \frac{r^2}{R_L^2}} \right) r d\phi dr \quad (2.5)$$

donde la integral es ahora sobre la superficie de los planos principales imagen de los objetivos.

Las componentes transversales ($\mathbf{i}$ y $\mathbf{j}$) de la fuerza se pueden integrar colocando detectores fotodiodo sensibles a la posición en esos planos principales. Un detector biaxial de este tipo da dos señales diferentes, D_x y D_y , cada una proporcional a la sensibilidad Ψ del detector de silicio, y a la suma de las irradiancias locales multiplicadas por sus distancias relativas al centro del detector x/R_D o y/R_D , donde R_D es la mitad de la anchura del detector. Las señales de posición de la luz en el detector vienen dadas por las expresiones

$$\begin{aligned} D_x &= \Psi \iint E(x, y) \left(\frac{x}{R_D} \right) dA' = \Psi \iint E(r, \phi) \left(\frac{r}{R_D} \cos \phi \right) dA' \\ D_y &= \Psi \iint E(x, y) \left(\frac{y}{R_D} \right) dA' = \Psi \iint E(r, \phi) \left(\frac{r}{R_D} \sin \phi \right) dA' \end{aligned} \quad (2.6)$$

donde las integrales son sobre toda la superficie del detector. Combinando las Ecs. (2.5) y (2.6), las expresiones para las dos componentes de la fuerza transversal al eje óptico, F_x y F_y , se pueden obtener en términos de las señales de los detectores y de constantes conocidas,

$$F_x = \frac{D_x R_D}{c \Psi R_L}; \quad F_y = \frac{D_y R_D}{c \Psi R_L} \quad (2.7)$$

Las medidas de la intensidad de la luz ponderadas según la distancia se pueden obtener proyectando la luz que sale de la trampa sobre un fotodetector sensible a la posición de tipo continuo. Este tipo de detectores son diferentes de los detectores de cuadrante y consisten en un fotodiodo con una gran área de unión PIN (formada por la unión de tres materiales semiconductores con distintas propiedades) asociado a un resistor plano (Smith et al., 2003). Básicamente, en estos detectores la corriente producida por un haz de luz incidente es proporcional a la potencia del haz y se divide proporcionalmente entre los terminales de salida del resistor, dependiendo de la localización inicial del rayo. Las corrientes de todos los rayos que inciden sobre el detector son ponderadas de esta forma y sumadas linealmente (Ec. 2.6). Los detectores de doble eje (en este caso, DL-10, United Detector Technology) ofrecen señales para las intensidades ponderadas en el eje x e y . Estas señales se pueden usar directamente como las componentes de la fuerza en estos ejes sobre una partícula atrapada si las señales de salida del detector en x e y se anulan cuando no hay ningún objeto en la trampa. Cuando una partícula es atrapada, la luz incide simétricamente sobre el eje óptico del detector (Fig. 2.3) anulando las señales de salida. Sin embargo, si una fuerza externa actúa sobre una microesfera desde una molécula unida a ella o por un campo de fluidos, entonces la suma de las señales de los detectores es proporcional a la fuerza externa de acuerdo con las Ecs. (2.7).

Para obtener la fuerza a lo largo del eje óptico, F_z , hace falta un tipo diferente de detector capaz de medir la concentración de potencia del haz incidente (Bustamante y Smith, 2006). Aunque el instrumento se construyó con detectores para medir F_z , solo se utilizaron estos datos como medidas accesorias. Concretamente, en los experimentos de estiramiento de moléculas de ADN (Capítulos 3 y 4), la observación de las medidas de F_z sirve como control del alineamiento de los láseres: el desplazamiento sobre el eje óptico de la microesfera atrapada se traduce en valores no nulos de F_z durante el estiramiento, lo que refleja que los láseres no convergen exactamente en el mismo foco y deben ser reajustados.

Es importante destacar que la calibración de un sistema como el descrito es independiente de la potencia del láser porque los detectores miden la potencia de la luz ellos mismos. Más aun, las pérdidas de luz en las lentes de los objetivos y la óptica asociada se pueden incluir en una sensibilidad efectiva de los detectores, Ψ . Las Ecs. (2.7) tampoco hacen referencia al índice de refracción del tampón, n_l , o al tamaño de la partícula, su forma o su índice de refracción. Si una partícula se puede atrapar con luz, entonces la fuerza sobre esa partícula, sin importar su tamaño o forma, se puede inferir a partir de la deflexión y potencia de los haces de luz, siempre y cuando toda la luz sea recogida y analizada.

2.3. Diseño instrumental

El esquema de medida descrito en la Fig. 2.3 no puede ser usado para una trampa óptica de un solo haz porque un cono de luz tan estrecho (como el que muestra la figura) no atraparía eficazmente un objeto. La fuerza de dispersión debido a la luz reflejada superaría la fuerza de gradiente (de atrapamiento) y el objeto escaparía hacia la derecha. Pero si en su lugar se utilizara un haz de alta apertura numérica (AN), la lente colectora mostrada en la Fig. 2.3 no recogería los rayos salientes marginales, los que más se desvían. Tras interaccionar con la microesfera (sometida a una fuerza externa), los rayos marginales de una trampa de un solo haz serían desviados muy lejos del eje y quedarían fuera de la AN de la lente colectora. Para evitar esta disyuntiva, Smith *et al.* (2003) construyeron una trampa óptica de doble haz con láseres contrapropagantes, similar a la descrita por Buican (1991). Aquí, el uso de haces de baja AN dentro de objetivos de alta AN permite una importante deflexión del haz mientras que se recoge toda la luz. Este hecho es imprescindible para poder medir la fuerza a partir del cambio de momento de la luz. En un diseño de dos haces simétricos como este, se puede producir una alta fuerza de atrapamiento transversal utilizando una potencia relativamente baja.

La Fig. 2.5 muestra un dibujo esquemático de las pinzas ópticas construidas y que han sido utilizadas en los experimentos presentados en esta tesis. En este montaje se distinguen dos tipos de haces: i) los haces de atrapamiento (líneas amarilla y verde), que siguen caminos ópticos equivalentes desde los láseres de diodo hasta los fotodetectores; y ii) el haz de iluminación (línea discontinua blanca), desde la lámpara LED hasta la cámara CCD.

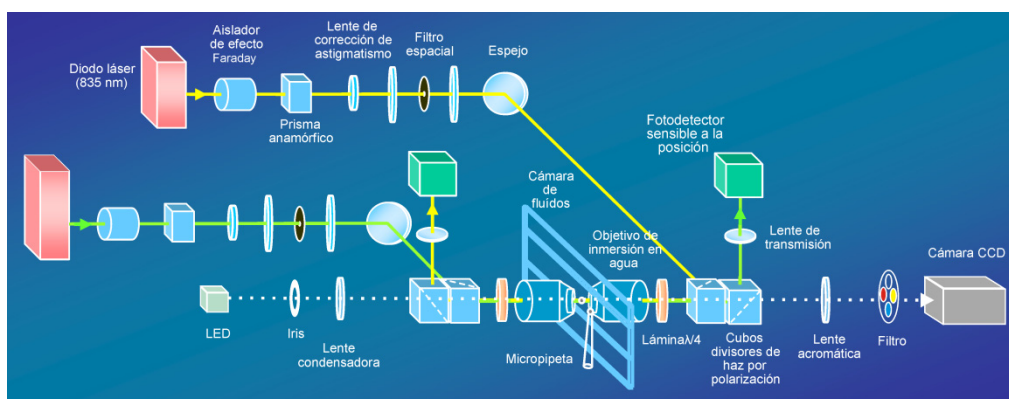


Figura 2.5 | Montaje óptico. Los láseres de atrapamiento en el infrarrojo (líneas amarilla y verde) pasan por una serie de componentes ópticos con el fin de mejorar la calidad de los haces y dirigirlos hasta los fotodetectores. Dos objetivos de microscopio cofocalizan los láseres para generar la trampa. Esta se encuentra en el interior de una cámara de fluidos en la que se realizan los experimentos. Ver detalles en el texto.

Como láseres de atrapamiento se emplean láseres de diodo (SDL-5431-G1, Newport, $\lambda = 835$ nm, 200 mW). Se utiliza una longitud de onda en el infrarrojo (IR) porque con ella se minimiza la absorción y la dispersión en el material biológico. Los láseres están insertados en monturas especiales conectadas a controladores para mantenerlos a su temperatura óptima de 25°C, y evitar así fluctuaciones en la longitud de onda. A la salida de los láseres se colocaron sendos aisladores de efecto Faraday (Optics for Research) para proteger los láseres de inestabilidades causadas por retrorreflexiones en el sistema óptico. Los haces se vuelven circulares y se expanden al atravesar prismas anamórficos (06GPA004, Melles Griot), resultando un haz con AN ~ 0.5 . A continuación, los haces atraviesan un filtro espacial que deja pasar el $\sim 80\%$ de la potencia inicial del láser y limita la anchura de los haces, haciendo el atrapamiento más eficaz. Cada filtro está compuesto por una lente de entrada (06LXP009/076, Melles Griot, $f = 110$ mm), un diafragma de 40 μm de apertura (NT39-887, Edmund Optics) y una lente de salida (LA1608-B, Thorlabs, $f = 75$ mm). Los láseres de diodo suelen presentar astigmatismo, es decir, que los focos de la luz procedente de dos ejes ortogonales entre sí y perpendiculares al eje óptico no coinciden. El astigmatismo limita la capacidad del láser de converger en un foco pequeño, por eso es importante corregirlo al máximo utilizando una lente apropiada (06LCC006/077, Melles Griot). Después de observar la calidad de la imagen en la cámara CCD en función de la posición de la lente de corrección de astigmatismo, se decidió colocar esta lente detrás de la entrada al filtro espacial (delante en la Fig. 2.5 por claridad). A través de espejos (BB1-R2, Thorlabs) y cubos separadores de haz por polarización (03PBS065, $\lambda = 830$ nm, Melles Griot), los dos haces son dirigidos hacia los objetivos. Estos cubos separan en direcciones ortogonales las componentes de polarización s y p de la luz que tenga $\lambda \sim 830$ nm, transmitiendo la luz con polarización p y desviando 90° la luz con polarización s . Inicialmente, los láseres llegan a los cubos con polarización lineal, por lo que no hay separación de componentes, y toda la luz es reflejada hacia la apertura trasera de los objetivos de inmersión en agua (Nikon CFI Plan-Apochromat, 60x, AN = 1.2), que focalizan los láseres en el plano del espécimen (trampa óptica). Cada objetivo es utilizado dos veces, focalizando un haz y recogiendo el otro haz para el análisis. El uso de láminas de cuarto de onda ($\lambda/4$) antes de los objetivos asegura que la luz reflejada por la partícula atrapada no vuelve a los láseres, sino que es dirigida a los detectores, donde su cambio de momento se registra adecuadamente. Específicamente, la luz que tiene polarización lineal vertical adquiere polarización circular al atravesar la primera lámina $\lambda/4$, sale de la trampa y pasa por la segunda lámina $\lambda/4$ de su recorrido, adquiere polarización lineal horizontal y se dirige al detector a través de otro cubo divisor. Dos lentes de transmisión—planoconvexas (KPX094AR.16, Newport, $f = 100$ mm) con sus caras convexas enfrentadas y en contacto; distancia focal efectiva de las dos lentes, $f = 50$ mm—trasladan la luz del plano focal imagen de los objetivos a los fotodetectores. Todas las lentes del camino óptico de los láseres de atrapamiento se compraron con cobertura anti-reflexiones en el IR.

Para iluminar el plano del espécimen y obtener la imagen por videomicroscopía se utiliza un LED azul y el sistema de iluminación Köhler, el habitual de los microscopios actuales. Los rayos de la fuente de luz atraviesan, primero, un iris cuya apertura regula la cantidad de luz que pasa y, después, una lente condensadora biconvexa (KBX052AR.14, Newport, $f = 50.2$ mm) que los traslada hasta el plano focal imagen del objetivo izquierdo en la Fig. 2.5, para iluminar la muestra en la región de atrapamiento. Los cubos divisores que encuentra la luz azul del LED en su camino óptico no afectan su trayectoria. Una lente acromática doble (PAC064, Newport, $f = 200$ mm) colocada a la salida del objetivo derecho en la Fig. 2.5 minimiza la aberración cromática de la luz. Esta lente está insertada en una montura (LP-1-XYZ, Newport) que permite ajustar su posición en las tres direcciones hasta enfocar la imagen del plano del espécimen en la cámara CCD (Watec LCL-903K, monocromática, Edmund Optics). Una rueda de filtros con cinco filtros diferentes que transmiten varias λ en el IR y visible (Melles Griot) se colocó delante de la cámara CCD para evitar reflexiones y depurar la imagen.

Todos los componentes se montaron sobre un banco óptico (Newport) con un sistema de amortiguación de aire comprimido para minimizar las vibraciones y maximizar la estabilidad durante las medidas. Los haces de atrapamiento discurren paralelos a la superficie de la mesa (a 10.16 cm sobre ella) hasta llegar al segundo cubo divisor en el recorrido de cada haz, donde los láseres son dirigidos hacia los fotodetectores en dirección perpendicular a la superficie. Los detectores se sitúan en unas monturas especialmente diseñadas para albergarlos. La cámara de fluidos, en cuyo interior cofocalizan los láseres de atrapamiento y que contendrá la muestra, se montó sobre una plataforma piezo-posicionadora (MDT-631, Thorlabs) que permite la traslación en la dirección perpendicular (x e y , paralela y perpendicular a la superficie del banco, respectivamente) y longitudinal (z) a los láseres. Uno de los objetivos (el derecho en la Fig. 2.5) se montó sobre otra plataforma del mismo tipo para permitir la focalización precisa de uno de los láseres en las tres direcciones espaciales. El otro objetivo (el izquierdo en la Fig. 2.5) se situó sobre un carril que permite su desplazamiento en la dirección z , para poder aumentar la distancia entre objetivos al sustituir la cámara de fluidos. El resto de los componentes del montaje óptico se dispuso sobre el banco utilizando bases, postes y monturas de Thorlabs. Además, se utilizaron dos obturadores (846HP, Newport) (no dibujados en la Fig. 2.5), uno en cada camino óptico de los láseres de atrapamiento, para poder interrumpir la trayectoria y anular el efecto de cada láser de manera independiente. Esta característica fue muy útil para compaginar el atrapamiento con doble haz o un solo haz utilizado y descrito en el Capítulo 5 de esta tesis.

2.4. Óptica de rayos

En este apartado se describen las trayectorias de los haces de atrapamiento y de iluminación a través de los componentes de cada camino óptico. No se ha

pretendido hacer una recopilación minuciosa del efecto de todos los componentes ópticos, sino de los más importantes, y ofrecer así una idea de conjunto muy útil para comprender el principio de funcionamiento de las pinzas ópticas. Ciertamente, la perfecta disposición de los elementos ópticos y el alineamiento de los láseres son esenciales para el adecuado funcionamiento del instrumento.

2.4.1. Camino óptico de los láseres IR

La Fig. 2.6 muestra el trazado de rayos parcial de los láseres de atrapamiento. Los rayos de cada láser IR llegan colimados a la lente de entrada al filtro espacial. El foco imagen de esta lente se hace coincidir con la abertura del diafragma de $40\ \mu\text{m}$ utilizando una montura que proporciona movilidad a la lente en las tres direcciones espaciales (ST1XY-A, Thorlabs). La posición de la abertura también coincide con el foco objeto de la lente de salida, de manera que los rayos salen del filtro colimados, dirigiéndose hacia los objetivos. El primer objetivo de cada camino óptico (O1) focaliza los rayos en el plano del espécimen, en el interior de la cámara de fluidos colocada entre los objetivos. Los rayos son recogidos por el segundo objetivo (O2), colimados y conducidos hasta la lente de transmisión (LT) que los transporta hasta los fotodetectores. La lente de transmisión está situada a la distancia s_o

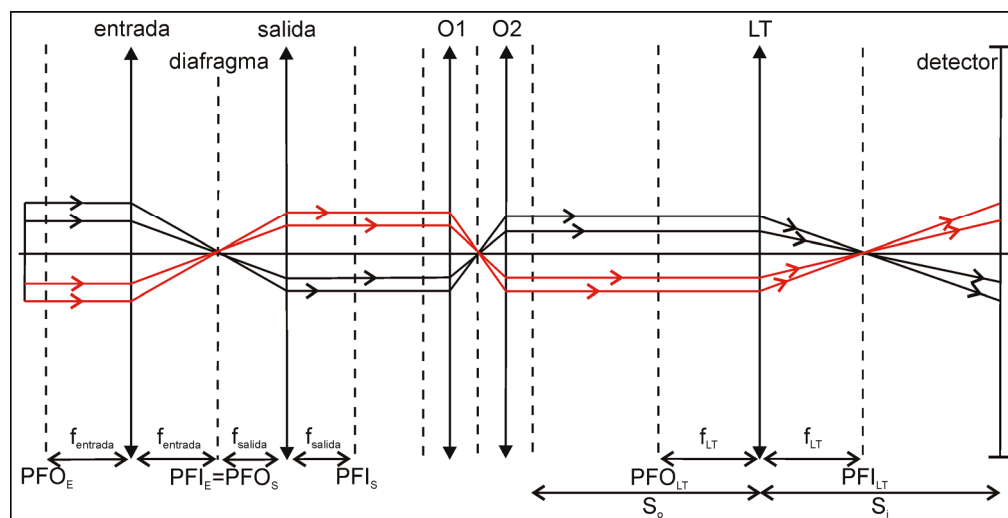


Figura 2.6 | Trazado de rayos simplificado de los láseres de atrapamiento. Se representa la trayectoria de cuatro rayos IR desde el láser hasta el detector a través del filtro espacial (lente de entrada, diafragma y lente de salida), los objetivos (O1 y O2) y la lente de transmisión (LT). Aunque los objetivos son sistemas compuestos aquí se han tratado como una única lente delgada para simplificar el esquema. Las líneas verticales discontinuas representan los planos focales objeto e imagen de cada lente (PFO y PFI), cuya posición viene determinada por la distancia focal (f). El esquema no está a escala por lo que las distancias relativas son orientativas.

del plano focal imagen del objetivo O2 y a la distancia s_i del plano del detector, de manera que estos dos planos son planos conjugados, es decir, cumplen: $s_o^{-1} + s_i^{-1} = f_{LT}^{-1}$. Nótese que el instrumento consta de dos caminos ópticos como el descrito aquí, y que es la focalización de los dos láseres enfrentados lo que genera la trampa óptica en el foco común.

2.4.2. Camino óptico de la luz de iluminación

La Fig. 2.7 muestra la trayectoria de los rayos de la fuente de iluminación hasta la cámara CCD. Como se explicó en la Sección 2.3, el camino óptico de estos rayos pasa por una lente condensadora (LC), los dos objetivos (O1 y O2) y una lente acromática (LA). Los haces que salen de la lámpara inciden sobre la lente condensadora con distintos ángulos y forman la imagen sobre el plano focal imagen del objetivo O1 (PFI_{O1}). Al tener foco común, estas superficies se definen como planos conjugados y su alineamiento es crítico para conseguir la iluminación Köhler y aprovechar así la luz emitida desde varias posiciones de la lámpara. Los haces no

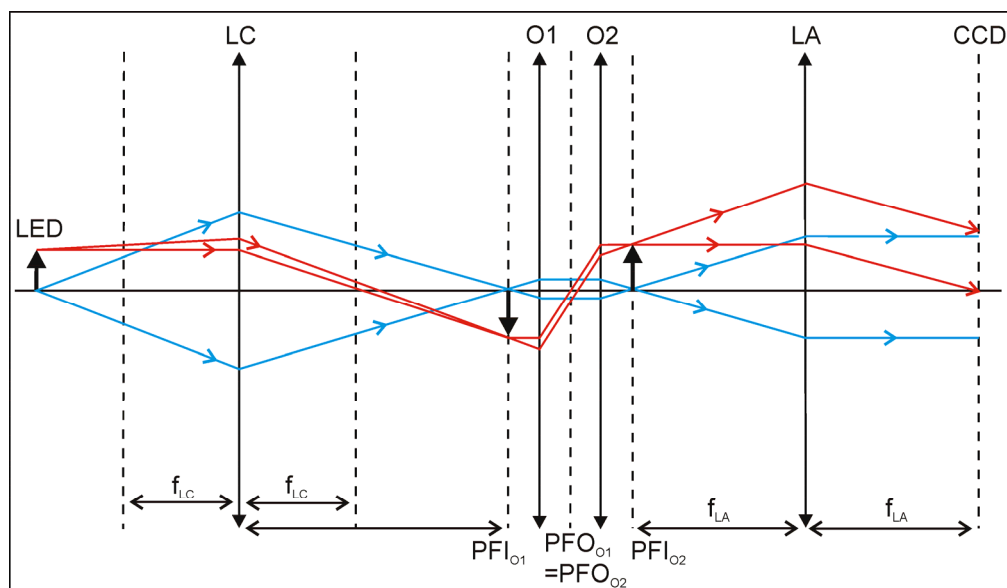


Figura 2.7 | Trazado de rayos de la luz de iluminación. Se representan las trayectorias de un par de rayos que salen de la lámpara en el eje óptico (líneas azules) y de dos rayos que salen a una determinada altura sobre el eje óptico (líneas rojas). La luz del LED atraviesa la lente condensadora (LC), los dos objetivos (O1 y O2) y la lente acromática (LA) hasta incidir sobre la cámara CCD. Por simplicidad, se ha representado cada objetivo como una lente delgada. Las líneas verticales discontinuas representan los planos focales objeto (PFO) e imagen (PFI) de cada elemento óptico. Los rayos de iluminación pasan paralelos entre sí a través del plano focal objeto común de los objetivos para iluminar la muestra.

focalizan en el plano de la muestra sino que pasan paralelos a través de la cámara de fluidos (situada sobre el PFO de los dos objetivos) iluminándola y mejorando el contraste. La imagen se vuelve a formar en el plano focal imagen del objetivo O2. A partir de aquí pueden suceder dos cosas en función de la distancia a la que se coloque la lente acromática: i) si se hace coincidir el plano focal imagen del objetivo O2 con el plano focal objeto de la lente acromática (situación recreada en la Fig. 2.7), la imagen de esta lente se formará en el infinito y los haces entrarán en la cámara CCD paralelos entre sí; y, ii) si los planos mencionados no coinciden (por ejemplo, porque se aleje la lente acromática respecto al objetivo O2) los haces pueden llegar a converger y formar la imagen del LED sobre la cámara CCD. La situación del sistema óptico real es intermedia a los dos casos planteados ya que el plano focal de la lente acromática no coincide con el plano focal imagen del objetivo O2 pero no se visualiza el LED en la cámara CCD, puesto que lo importante es visualizar el plano de la muestra.

2.4.3. Formación de la imagen de videomicroscopía

La Fig. 2.8 muestra la trayectoria de los haces que forman la imagen de la muestra en la cámara CCD. La imagen de un objeto que se encuentre en el plano focal objeto de los objetivos se formará en la cámara CCD independientemente de la posición de la lente acromática.

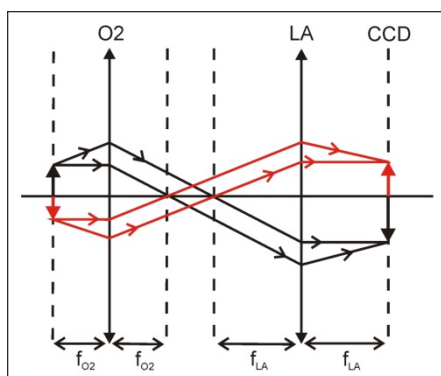


Figura 2.8 | Trazado de rayos de la luz que forma la imagen de la muestra. La imagen del espécimen en la trampa óptica se traslada hasta la cámara CCD pasando por el objetivo O2 y la lente acromática (LA). Las líneas verticales discontinuas representan los planos focales. El plano focal objeto de la lente acromática no coincide con el plano focal imagen del objetivo O2.

2.5. Medida de distancias

El principal uso de las pinzas ópticas en biología ha sido realizar medidas de fuerza frente a extensión molecular (o posición), de manera que es imprescindible contar con un sistema rápido y preciso para medir posiciones. En nuestro caso, uno de los métodos para medir la posición de la partícula es la videomicroscopía. Sobre las imágenes capturadas por la cámara CCD se aplica un algoritmo que localiza el centro

de las esferas y devuelve la posición promedio en píxeles en x e y . Este método requiere la calibración previa del instrumento para conocer la relación $\text{pixel}/\mu\text{m}$.

Un método con mayor resolución para conocer la posición de la partícula sobre la micropipeta se consigue al acoplar un sistema basado en la refracción de luz (o *light-lever*) al marco de sujeción de la pipeta (Fig. 2.9). Este dispositivo está compuesto por una fibra óptica unida a un láser de diodo (LPF-3224-635-FC, Thorlabs), un detector sensible a la posición (DL-10, United Detector Technology) y una lente (C140TM-B, Nikon, $f = 1.45 \text{ mm}$) insertada en el marco de la cámara de fluidos. Esta lente colima la luz desde la fibra y dirige el haz de salida sobre el fotodetector. Puesto que la distancia focal de la lente es muy pequeña en comparación con su distancia al detector (640 mm), un desplazamiento pequeño de la lente (y, por lo tanto, de la micropipeta insertada en la cámara de fluidos) se traduce en un movimiento ~ 420 mayor de la luz sobre el detector.

Por otro lado, para medir desplazamientos y velocidades se utilizaron unos dispositivos sensores de la posición LVDT (del inglés, *linear variable differential transformer*; PCA 116-100, Shaevitz) acoplados a la plataforma piezoeléctrica de la cámara de fluidos. De esta forma, las distancias en el plano x - y se determinan con precisión micrométrica a través de una tarjeta conversora conectada al ordenador principal de las pinzas, como se detalla a continuación.

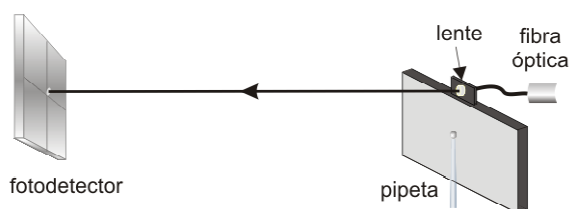


Figura 2.9 | Esquema del sistema “light-lever” para medir el desplazamiento de la microesfera de la pipeta. Los elementos que lo componen son: un láser diodo transportado por una fibra óptica, una lente insertada en el marco de la cámara de fluidos y un fotodetector sensible a la posición.

2.6. Control electrónico de las pinzas ópticas

La potencia y la temperatura de los láseres IR se pueden ajustar utilizando controladores externos (Newport) al ordenador de las pinzas ópticas. Sin embargo, es a través de este ordenador como se controla y se opera sobre el instrumento, según muestra el esquema de la Fig. 2.10. Las plataformas piezoeléctricas—una bajo la cámara de fluidos y otra bajo uno de los objetivos—y los dispositivos LVDT se controlan a través de una tarjeta D/A (C-10-DAC-08, Omega Engineering) instalada en el PC. Las señales de voltaje de los tres detectores sensibles a la posición (DL-10) son amplificadas y registradas en el PC utilizando los canales de entrada analógica de

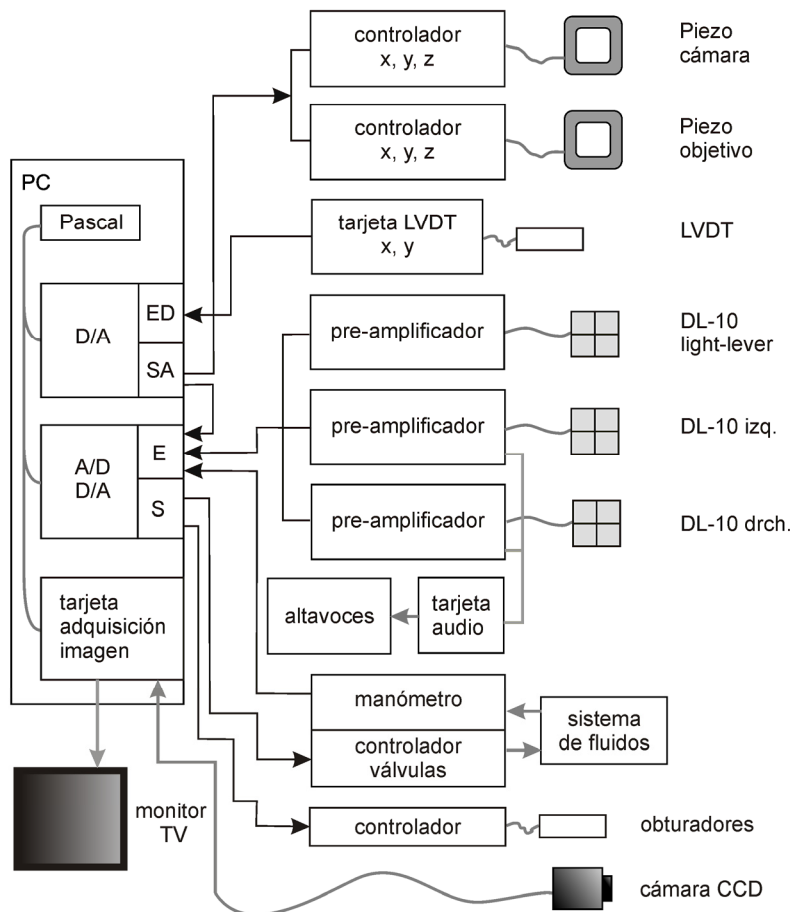


Figura 2.10 | Control del instrumento de pinzas ópticas desde el PC. El esquema muestra las conexiones de los elementos electrónicos del montaje y sus tarjetas controladoras con el ordenador principal del instrumento. El PC contiene una tarjeta de adquisición de datos y otra de adquisición de imágenes, ambas se controlan con programas en lenguaje Pascal. Las abreviaturas utilizadas en esta figura son: ED, entrada digital; D/A, digital a analógico; A/D, analógico a digital.

una tarjeta A/D-D/A multifuncional de adquisición de datos (PCI-DAS1602/16, National Instruments). Esta tarjeta también controla el sistema de fluidos y los obturadores. Los canales de salida de la tarjeta de adquisición de datos se utilizan para controlar los elementos desde el PC. Todos los circuitos electrónicos de las tarjetas controladoras fueron diseñados por Steve Smith (U. Berkeley). Las imágenes de la cámara CCD son grabadas en el PC utilizando una tarjeta de captura de fotogramas (en inglés, *frame grabber*; DT-55, Data Translation) y se visualizan utilizando un

monitor en blanco y negro. Por otro lado, las tarjetas que recogen las señales de los detectores DL-10 de los láseres de atrapamiento están conectadas a una tarjeta de audio y unos altavoces. De esta forma, un objeto en la trampa óptica produce una emisión acústica de fondo a través de los altavoces, cuya intensidad es proporcional al tamaño del objeto atrapado. Del mismo modo, si un segundo objeto cae en la trampa aumentan las deflexiones de los láseres y con ellas la intensidad del sonido. Este sencillo mecanismo ha demostrado ser muy útil para detectar el atrapamiento múltiple de especímenes de pequeñas dimensiones difíciles de distinguir por videomicroscopía, como es el caso de los centrosomas (véase el Capítulo 5).

En el ordenador de las pinzas ópticas, un programa en Pascal es el que controla simultáneamente las plataformas piezoeléctricas, los obturadores, el manómetro y el controlador del sistema de fluidos y registra las señales de los fotodetectores, los LVDT y la cámara CCD. Una vez calibrado el instrumento en distancias (pixel/ μm) y determinadas las sensibilidades de los fotodetectores Ψ (en ADC *counts*/W; utilizando un medidor de potencia (840-C/220, Newport)), estas constantes se usan para calcular las fuerzas y la extensión a partir de las señales de voltaje de los fotodetectores DL-10. El programa también se usa para controlar el movimiento de la cámara de fluidos de varias formas: i) directamente desde un ratón de bola (*trackball*), que puede controlar el movimiento de la plataforma piezoeléctrica en las direcciones x , y , z ; ii) modo de retroalimentación, la plataforma se mueve de manera que la fuerza sobre la partícula atrapada se mantiene constante; iii) modo de extensión, la plataforma se mueve según los parámetros introducidos en el ordenador, por ejemplo, a velocidad constante ($\mu\text{m/s}$) entre dos fuerzas $F_{\min}$ y $F_{\max}$. Utilizando un algoritmo de seguimiento se determinan las posiciones (x , y) de dos microesferas en la imagen de la cámara. Los parámetros que se escriben en el ordenador y se recogen como archivos de datos para ser analizados son, habitualmente: tiempo (s), posición de las microesferas (nm) y deflexiones de la luz en los detectores (ADC *counts*).

La Fig. 2.11 es una fotografía de las pinzas ópticas construidas en la que se aprecian algunos de los elementos descritos en esta sección y en las anteriores: PC, monitores, controladores y componentes ópticos, principalmente. En la parte inferior izquierda del banco óptico se dispone la parte visible del sistema de fluidos del instrumento, que se describe a continuación.

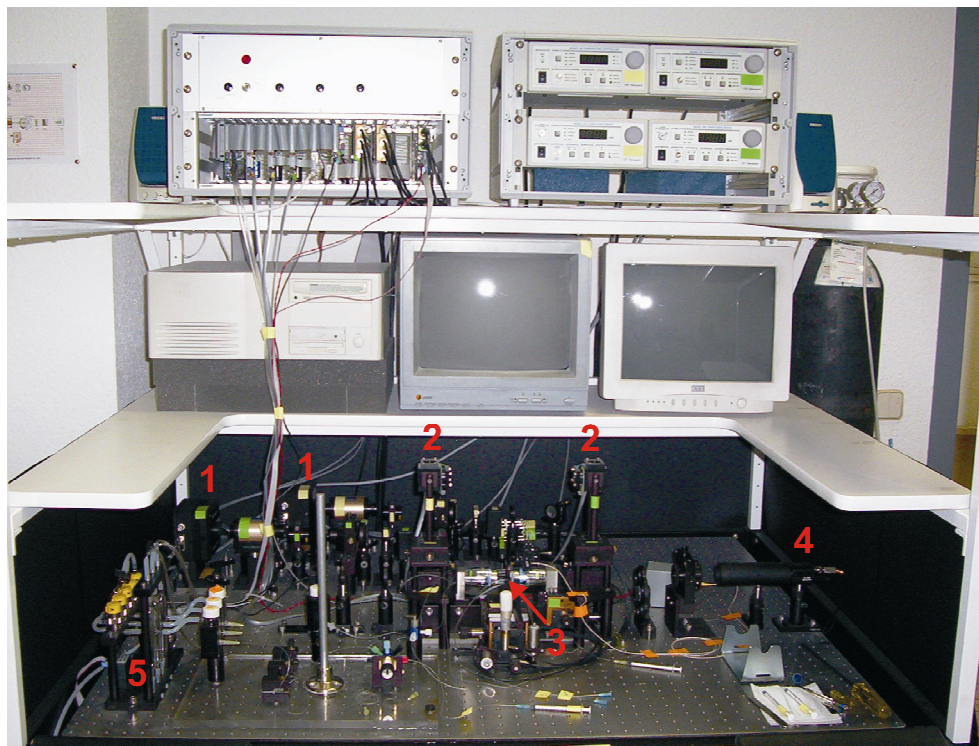


Figura 2.11 | Fotografía de las pinzas ópticas construidas. En la balda superior, desde la izq., se observa: módulo con fuentes de alimentación y tarjetas controladoras y módulo con los controladores de intensidad y de temperatura de los dos láseres infrarrojos. En la balda inferior, desde la izq.: PC principal, monitor de videomicroscopía y monitor del PC. Sobre el banco óptico se disponen todos los elementos que se describen en las secciones 2.3, 2.5 y 2.7. Los números designan algunos de ellos: (1) los dos láseres IR, (2) los dos fotodetectores de los láseres de atrapamiento, (3) la cámara de fluidos entre los dos objetivos, (4) la cámara CCD y (5) el sistema de fluidos.

2.7. Sistema de fluidos

Como ya se ha mencionado, la trampa óptica se genera en el interior de una cámara que contiene la muestra en solución. Utilizando un sistema de fluidos las soluciones experimentales se pueden cambiar fácilmente y a velocidad controlada, permitiendo además la capacidad de ejercer presión hidrodinámica. Por otro lado, en biofísica de moléculas individuales se debe realizar un número considerable de experimentos para poder elaborar una estadística, de manera que un sistema de fluidos que permita un alto rendimiento de las medidas es esencial.

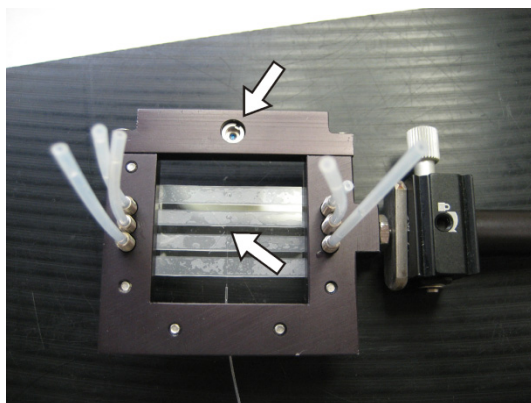


Figura 2.12 | Imagen de una cámara de fluidos acoplada al marco de sujeción utilizada en los experimentos. La flecha inferior señala la posición de la punta de la micropipeta. La flecha superior señala la lente utilizada en el sistema *light-lever*, al que se hizo referencia en la Sección 2.5.

En la Fig. 2.12 se muestra un ejemplo de cámara de fluidos colocada en el marco de sujeción y unida al poste utilizado para montar la cámara sobre el piezo-posicionador. Todo el conjunto se sitúa sobre la plataforma piezoeléctrica de manera que la cámara de fluidos se puede mover en las tres direcciones y alinearse con el foco de atrapamiento. Las cámaras utilizadas tienen tres orificios de entrada y tres de salida (a la derecha e izquierda en la Fig. 2.12, respectivamente). Se utilizaron tubos de polietileno para conectar las entradas y salidas a jeringas y botes con los tampones necesarios en cada experimento. El flujo desde estas jeringas y botes hasta la celda se puede controlar manualmente, utilizando el émbolo de las jeringas, o desde un sistema de fluidos controlado por ordenador. Entre la cámara de fluidos y los botes de entrada se introdujeron válvulas de control manual para permitir cambiar el tipo de tampón o bloquear completamente un canal. La flecha inferior en la Fig. 2.12 señala la punta de la micropipeta (no visible a esta escala), que se conecta con una jeringa a través de un tubo de polietileno para generar la succión.

La Fig. 2.13 es una ilustración esquemática del procedimiento de montaje de la cámara de fluidos. En cada cámara se utilizan dos cubreobjetos (24 mm × 60 mm, Menzel Gläser) y dos láminas de Nescofilm (Karlau). Se usa una grabadora y cortadora láser (C-200, Universal Laser Systems) para taladrar seis agujeros en uno de los cubreobjetos y grabar tres canales en ambas láminas de Nescofilm. Unos tubos, uno para albergar la micropipeta (diámetro externo: 130 μm ; diámetro interno: 90 μm) y otros dos del mismo tipo para conectar los canales superior e inferior con el canal central (d. ext: 100 μm ; d. int: 25 μm) se cortaron a partir de capilares de cristal (Garner Glass Company). La cámara de fluidos se ensambla como muestra la Fig. 2.13, se coloca entre dos portaobjetos y se transfiere a una placa térmica precalentada a 120°C. Mientras se aplica presión, la celda de fluidos es calentada hasta que el Nescofilm se funde (unos 5 min), formando un sello hermético con el cristal. La

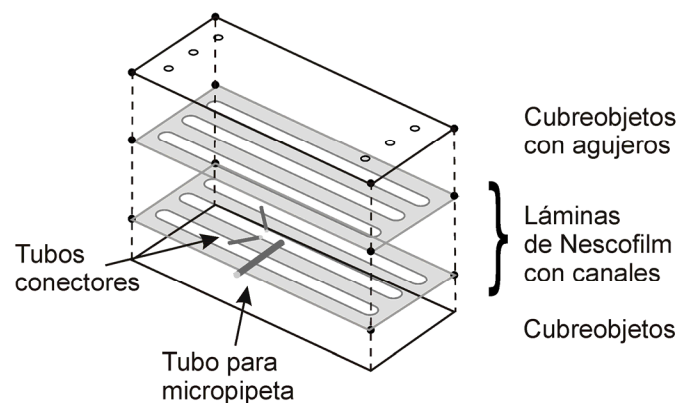


Figura 2.13 | Disposición de componentes para el ensamblaje de la cámara de fluidos. Después del montaje, el conjunto se calienta para sellar la unión entre el cristal y las láminas de Nescofilm.

distancia entre las caras internas de la cámara es $\sim 200 \mu\text{m}$.

La mayoría de los experimentos descritos en esta tesis se realizaron utilizando una micropipeta de cristal. Las micropipetas se construyeron utilizando un aparato de tracción de pipetas fabricado a medida (U. Berkeley). Para construir una micropipeta, un capilar hueco de cristal (d. ext: $80 \mu\text{m}$; d. int: $40 \mu\text{m}$, Garner Glass Company) se calienta localmente utilizando un filamento de platino incandescente con forma circular. Al fundirse el cristal, los dos extremos del capilar se separan por un peso sujeto a uno de los lados del mismo. Esto da lugar a una micropipeta cuya abertura disminuye gradualmente hasta alcanzar $0.5\text{-}1 \mu\text{m}$ de diámetro en su extremo más estrecho. La micropipeta se conecta a un tubo de polietileno utilizando un tubo de plástico termo-retráctil. Una pistola de aire caliente de baja velocidad se emplea para fundir y sellar las conexiones entre tubos. Después, la micropipeta se introduce en el tubo de sujeción previamente ensamblado en la cámara utilizando un microscopio estereoscópico (Stemi DV4, Zeiss).

La Fig. 2.14 es un diagrama esquemático del sistema utilizado para el control del flujo desde los tres botes con las soluciones experimentales hasta la cámara de fluidos. Cambiando la presión en los botes se modifica la velocidad del flujo que llega a la cámara. Para cambiar la presión se utilizan tres válvulas de solenoide (Clippard Valve) de dos posiciones (2-way) y dos válvulas de solenoide de 3 posiciones (3-way), que son operadas desde los controladores de presión y la tarjeta A/D-D/A, de manera que el bote seleccionado se conecta a un dispensador de aire comprimido (P_{alta}), un colector de vacío (P_{baja}) o a la presión atmosférica (P_{atm}). En particular, la Fig. 2.14 muestra uno de los botes que se conecta con la P_{alta} mandando un '1' en

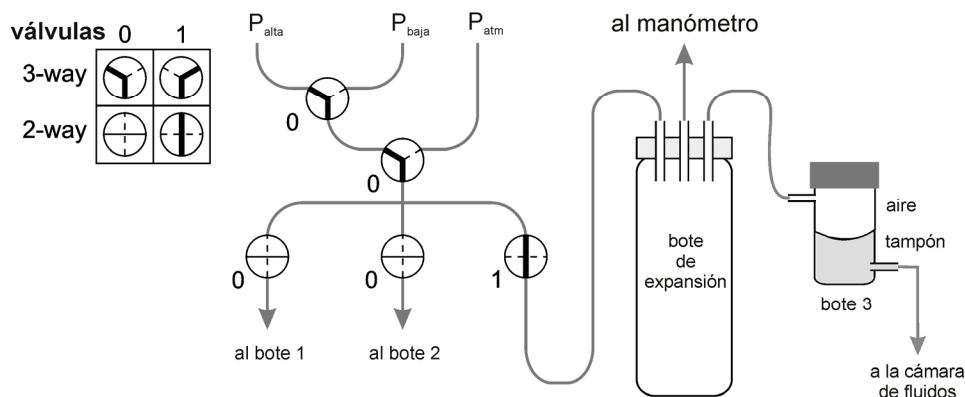


Figura 2.14 | Diagrama esquemático del sistema utilizado para controlar la velocidad de flujo de los tampones a la cámara de fluidos. El flujo del tampón desde el bote (derecha) se regula variando la presión dentro de él. Esto se hace cambiando las posiciones de las cinco válvulas del sistema de manera que el bote se conecte con el vacío (P_{baja}), el aire comprimido (P_{alta}) o una válvula abierta (P_{atm}). En el diagrama, el bote 3 se conecta con P_{alta} . Los botes 1 y 2 son iguales al bote 3.

sistema binario a una de las cinco válvulas, a través de la salida digital de la tarjeta del PC. Esto hace que se mueva un flujo de aire entre P_{alta} y el bote, haciendo que aumente la presión en el bote y un mayor flujo se mueva hacia la cámara de fluidos. Un bote de expansión (~30 ml) se introduce entre válvula y bote (~20 ml) para mantener la presión aproximadamente constante a medida que el bote del tampón se vacía. Se utilizan tubos de Tygon (Saint-Gobain) para todas las conexiones entre las válvulas y los botes.

El diseño de cámara de fluidos de la Fig. 2.13 es el estándar de los experimentos con ADN de esta tesis (Capítulos 3 y 4) aunque también se han usado otros diseños con dispensadores adicionales o tubos para albergar electrodos en los experimentos con centrosomas (Capítulo 5). En general, todas las cámara de fluidos construidas constan de tres canales: dos canales exteriores, que se conectan a jeringas que contienen las suspensiones con microesferas y un canal central, que contiene el tampón experimental. Algunas microesferas que fluyen por los canales externos llegan por difusión hasta el canal central a través de los tubos dispensadores como ilustra la Fig. 2.15. Los tubos dispensadores se colocan de forma oblicua y opuesta al sentido de la corriente para evitar la llegada masiva de microesferas al canal central. En la zona ampliada de la representación de la Fig. 2.15 se puede ver cómo se realiza un experimento típico. La trampa óptica se utiliza para atrapar las microesferas de cada tubo dispensador. Esto se hace moviendo la celda de fluidos con tornillos micrométricos de acción manual acoplados a la plataforma piezoeléctrica. Primero,

una microesfera atrapada se transfiere a la punta de la micropipeta donde se mantiene por succión. Después, una microesfera procedente del otro canal es atrapada y llevada frente a la microesfera de la pipeta (micrografía en la Fig. 2.15). Desde esta disposición inicial el experimento comienza, poniendo las dos microesferas en contacto y probando las conexiones de, por ejemplo, hebras de ADN o proteínas. Si no se produce ninguna conexión, las microesferas se desechan y se repite el proceso anterior con microesferas diferentes.

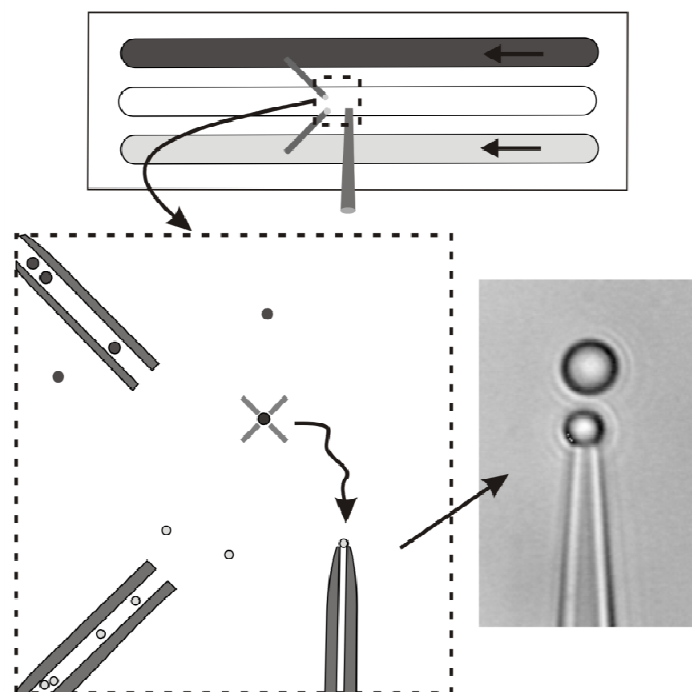


Figura 2.15 | Ilustración esquemática de la metodología experimental típica. Arriba: por los canales externos fluyen suspensiones de microesferas de distinto tipo y por el canal central fluye el tampón del experimento. Abajo izq.: las microesferas son atrapadas al salir de los tubos dispensadores procedentes de los canales exteriores y llevadas hasta la micropipeta, en el centro de la cámara. Abajo dcha.: micrografía de una microesfera de $\sim 3\ \mu\text{m}$ en la trampa óptica y una microesfera de $\sim 2\ \mu\text{m}$ mantenida por succión en la micropipeta.

3

Estabilidad mecánica de moléculas individuales de ADN en baja humedad con policationes: estudio con pinzas ópticas

El carácter electrostático del ADN está determinado, principalmente, por la actividad del agua y de los contraiones en el esqueleto de fosfatos de la molécula. Junto con la secuencia de las bases, el carácter electrostático confiere al ADN su organización estructural y determina su interacción con proteínas. En estos experimentos, se han estirado moléculas individuales de ADN bicatenario en soluciones de tampón y etanol para investigar la modulación de la estabilidad mecánica del ADN por la hidratación y los polielectrolitos. Se han utilizado dos tipos de ADN con diferente secuencia y estructura secundaria en tampón, según revelan las medidas de dicroísmo circular: una molécula de ADN de 8 kpb con 48% GC y forma B; y una molécula de ADN de 5.7 kpb con 70% GC y forma A. Esta última presenta mayor estabilidad aunque, cualitativamente, se ha encontrado que ambas especies se desnaturalizan al aumentar la concentración de etanol y disminuir la de espermina. Esto se manifiesta en el aumento de la histéresis entre las curvas de estiramiento y relajación, con una transición brusca al 10% etanol y un comportamiento opuesto al 70%, y también en la pérdida de cooperatividad de la transición de sobre-estiramiento. Se ha observado que aparecen efectos de condensación para el ADN en soluciones etílicas a baja fuerza que aumentan dramáticamente en presencia de espermina. Sin embargo, para fuerzas que evitan la condensación, no se han encontrado evidencias de la transición cooperativa B-A en condiciones que sí la promueven en experimentos volumétricos. El ADN presenta aproximadamente longitud de contorno y de sobre-estiramiento correspondientes a forma B con independencia de las condiciones o la secuencia. Los resultados obtenidos apoyan que la condensación coexiste con la forma A y que esta asociación recíproca refuerza la transición B-A.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Procesamiento de las muestras de ADN

Se ha trabajado con dos tipos de moléculas de ADN con diferente contenido en GC: una molécula de ADN de 8022 pares de bases (pb) con 48% GC, obtenida del plásmido pBACgus11 (8041 pb), y una molécula de ADN de 5682 pb con 70% GC del plásmido piJ702 (5724 pb) (véase la comparación del contenido GC de cada secuencia en la Fig. 3.1). El ADN pBACgus11 se compró a Novagen y el ADN piJ702 se purificó de *Streptomyces* (Katz et al., 1983). Los plásmidos circulares se linealizaron por digestión con *Hind*III (pBACgus11) y *Nde*I (piJ702) para los experimentos de difracción circular (DC); y con *Bam*HI y *Hind*III (pBACgus11) y *Bam*HI y *Xho*I (piJ702) para los experimentos de pinzas ópticas. La diferencia en longitud del ADN entre las preparaciones finales para cada técnica, DC o pinzas ópticas, es menor que el 0.8%. Todas las enzimas de restricción se compraron a New England Biolabs. Para la unión a las microesferas en los experimentos de pinzas ópticas, se utilizaron asas de ADN modificadas de la siguiente manera: un asa de ~400 pb con digoxigeninas insertadas por PCR se ligó al extremo *Bam*HI de cada ADN; para el extremo opuesto, se usaron dos oligos complementarios de ~20 pb que contenían dos biotinas en el extremo 5', con extremos cohesivos diferentes para la ligación al extremo *Hind*III de la molécula principal de pBACgus11 o al extremo *Xho*I de la molécula principal de piJ702. A continuación, se especifican los procedimientos seguidos en el tratamiento de las moléculas de ADN para su adecuación a los experimentos de manipulación individual.

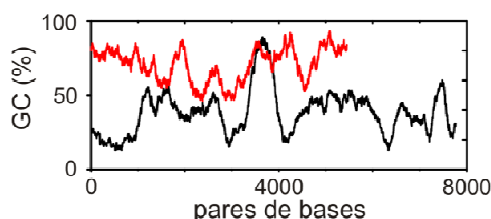


Figura 3.1 | Contenido de GC (GC%) promediado sobre 275 pb a lo largo de la secuencia de pBACgus11 (curva negra) y piJ702 (curva roja).

Conservación de cepas de XL1-blue. Las cepas de XL1-blue (Stratagene) se conservaron congeladas a -80°C , en presencia de glicerol aproximadamente al 50% (v/v). Para ello, se añadieron 0.9 ml de glicerol al 87% (v/v) a 0.9 ml de cultivo en medio LB crecido durante una noche con presión de selección. Para volver a crecer las células, se sembraron en una placa de LB-agar con presión de selección.

Conservación del plásmido piJ702 purificado. El plásmido circular piJ702 purificado fue amablemente cedido por el Dr. Francisco Malpartida (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC). Este plásmido procede de *Streptomyces* (Katz et al., 1983) y

contiene un 70.16% de GC. El plásmido se conservó a 4°C y se utilizó en el plazo máximo de un año.

Transformación de células competentes. Se extrajo una alícuota de células competentes comerciales XL1-blue, se dejó descongelar en hielo durante unos minutos. Se añadió el ADN del plásmido pBACgus11 que se deseaba transformar (~100 ng) y se mantuvieron las células durante 30 min en hielo. La entrada del ADN al interior de las células se facilitó mediante un choque térmico por incubación a 42°C durante 30 s y enfriamiento posterior en hielo durante 2 min. Se añadió 1 ml de LB a temperatura ambiente y se incubaron las células durante 1 h a 37°C en incubador con agitación constante, para permitir la recuperación de la integridad de la membrana y la expresión de los vectores. Por último, se sembraron diferentes volúmenes en placas de LB y se incubaron las placas a 37°C hasta la aparición de colonias (1 noche).

Selección de colonias y purificación de pBACgus11. Para obtener más masa celular, se inocularon 3 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml) con una colonia aislada de las células transformadas. Cada cultivo se dejó crecer a 37°C con agitación durante una noche. El ADN plasmídico se extrajo de las células utilizando el kit QIAprep Miniprep de QIAGEN. Conforme al protocolo del kit, las células se sedimentaron por centrifugación a 10000 rpm durante 3 min y se resuspendieron en 250 µl de 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA con 100 µg/ml RnasaA. Después, se lisaron con 250 µl de 200 mM NaOH, 1% (p/v) SDS (dodecilsulfato sódico). El pH de la muestra se neutralizó con 350 µl de tampón de neutralización. La mezcla se trasladó a las columnas del kit para su purificación, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Para purificar el ADN que se adsorbe en la resina de la columna, se lavó con 500 µl de tampón PB, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Para eliminar las sales, se añadieron 750 µl de tampón PE que contiene etanol y se centrifugó dos veces la columna a 13000 rpm durante 1 min. Para separar el ADN plasmídico de la membrana se colocó la columna sobre un tubo eppendorf y se añadieron 30-50 µl (según la concentración final deseada) de tampón de elución (10 mM Tris-HCl, pH8.5), se incubó 3 min y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min. El rendimiento de la purificación se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en TAE 1x. La concentración del plásmido se midió con un espectrofotómetro de volúmenes micrométricos (NanoDrop Technologies).

Electroforesis en geles de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon al 0.7-1% (p/v) en TAE 1x, dependiendo del tamaño del ADN que se quería detectar o purificar. Las electroforesis se desarrollaron a 80-100 V con voltaje constante. En todos los casos se utilizaron como patrones de masa molecular escaleras de 100 pb o de 1 kpb (Promega). Las muestras se aplicaron en tampón de aplicación 6x. Una vez finalizado el proceso electroforético se detectó el ADN por tinción con bromuro de etidio (1

µg/ml) y se observaron las bandas bajo luz ultravioleta. También se utilizaron geles de agarosa con bajo punto de fusión para la purificación específica según la longitud o la purificación de productos de amplificación por PCR. El desarrollo de estas electroforesis se realizó a 4°C y 80V.

Digestión con endonucleasas de restricción y purificación. La utilización de estas enzimas permitió la obtención de moléculas de ADN que hicieron posible la formación de construcciones útiles para su utilización en las pinzas ópticas. Todas las digestiones enzimáticas del ADN se realizaron en condiciones de temperatura óptimas para cada enzima, normalmente, 2 h a 37°C, con agitación. En cada caso se utilizó una mezcla de reacción consistente en el tampón adecuado para cada enzima—para una doble digestión, un tampón de compromiso en el que ambas enzimas trabajaban adecuadamente—y albúmina de suero bovino (BSA, 1 mg/ml), si procedía. En los casos en los que fue necesario, la enzima fue posteriormente inactivada por calentamiento a 65°C durante 15 min. El rendimiento de las digestiones se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en TAE 1x. El plásmido pBACgus11 se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El plásmido piJ702 se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. Para los experimentos de DC que solo requerían los plásmidos linealizados, se digirió el plásmido pBACgus11 con *Hind*III y el plásmido piJ702 con *Nde*I. Para purificar el resultado de la digestión de pBACgus11 se utilizó el kit QIAquick de QIAGEN, mientras que el plásmido piJ702 digerido se purificó por fenolización. En este último proceso, la muestra se mezcló con tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) y fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). La fase acuosa se precipitó añadiendo 1/10 (v/v) de acetato potásico 3 M y 1 volumen de isopropanol, dejándolo durante 15 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. El piJ702 así precipitado se lavó dos veces con etanol al 75%, se dejó secar en una campana con flujo laminar y, una vez seco, se disolvió en ~50 µl de TE. La pureza se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x. La concentración de la muestra se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop.

Preparación de asas con digoxigeninas. Este fragmento de ADN que contiene digoxigeninas permite la unión de uno de los extremos de la molécula principal (pBACgus11 o piJ702) a microesferas cubiertas de anti-digoxigenina. Para construir estas asas se partió del vector pUC19 (2686 pb) y se introdujeron nucleótidos modificados con digoxigeninas (digoxigenina-11-dUTP, Roche) por PCR. Se usaron como cebadores dos oligos (5'-CCT CTG ACA CAT GCA GCT CC-3' y 5'-CGC GGC CTT TTT ACG GTT CC-3') y se preparó una mezcla de dTTP, dATP, dCTP y dGTP (10 mM) y MgCl₂ en el tampón de reacción. Se utilizó la enzima TaqPol Platinum® (Invitrogen) en las condiciones de PCR apropiadas y un volumen final de reacción de 100 µl. Las asas de ADN con digoxigeninas se purificaron utilizando el kit de purificación de fragmentos de PCR QIAquick de QIAGEN, siguiendo el

protocolo estándar descrito en el kit. Posteriormente, las asas se digirieron con *Bam*HI y se volvieron a purificar con el mencionado kit. La purificación final de las asas se realizó por extracción de la banda de un gel de agarosa con bajo punto de fusión, utilizando el kit QIAquick Gel Extraction. Según sus instrucciones, se procedió inicialmente a fundir el bloque de agarosa que contenía la banda de interés por incubación a 50°C. Una vez completada la fusión, se añadió rápidamente 1 volumen de isopropanol (considerando el volumen del fragmento del gel según 100 mg $\approx$ 100 μ l). Posteriormente, la muestra se añadió a una columna y se procesó según las instrucciones hasta la elución final de las asas con digoxigeninas purificadas.

Preparación de asas con biotinas. Para la unión del otro extremo de la molécula principal (pBACgus11 o piJ702) a microesferas cubiertas de estreptavidina, se generó un asa con dos biotinas. Este fragmento se creó por hibridación de dos oligos complementarios sintéticos de 20 pb. Estos oligos son: 5'-5Phos/AGC TAT CAG GCT TAC AAA-3' y 5'-[Bio]G[Bio]GG TTT GTA AGC CTG AT-3'), con un extremo cohesivo de unión al extremo *Hind*III de pBACgus11 digerido; y 5'-5Phos/TCG AAT CAG GCT TAC AAA-3' y 5'-[Bio]G[Bio]GG TTT GTA AGC CTG AT-3'), con un extremo cohesivo de unión a *Xho*I de piJ702 digerido.

Ligación de las asas a la molécula principal. La reacción de ligación de las dos asas, con digoxigeninas (2:1, respecto a la concentración de plásmido) y biotinas (10:1), al plásmido doblemente digerido se realizó utilizando la ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche). La mezcla de reacción se completó con el tampón de la ligasa y se mantuvo a 15°C durante unas 15 h. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo por calentamiento a 65°C durante 10 min. En el caso de las reacciones de ligación de pBACgus11 se eliminó el Mg^{2+} , la ligasa y se cambió el tampón, y se purificó el resultado con el kit QIAquick de QIAGEN. En el caso de las reacciones de ligación de piJ702, se optó por no purificar la mezcla de la reacción, solo diluirla, y utilizarla directamente para su unión a microesferas, debido a que el rendimiento de cada proceso de purificación de piJ702 es muy bajo. La eficiencia de la ligación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1x.

3.1.2. Microesferas de poliestireno

Se utilizaron microesferas de poliestireno cubiertas de estreptavidina de 2.10 μ m de diámetro y cubiertas de proteína G de 3.18 μ m de la marca Spherotech. Las microesferas de estreptavidina se diluyeron $\sim$ 250 veces en el tampón experimental y se utilizaron directamente en las pinzas ópticas. Las microesferas cubiertas de proteína G se trataron según el protocolo que se describe a continuación para recubrirlas con anti-digoxigenina. En primer lugar, el tampón inicial de las microesferas se substituyó por una solución de 100 mM fosfato sódico y 100 mM NaCl. Después, las microesferas se mezclaron con dimetil pimelimidato

dihidrocloreto (DMP) y con anticuerpos de anti-digoxigenina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), previamente disueltos en tampón fosfato salino (PBS) a pH 7. El DMP une covalentemente la anti-digoxigenina a la proteína G de las microesferas mediante la incubación durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las microesferas se precipitaron por centrifugación a 3000 rpm durante 3 min y se resuspendieron en 2 M Tris para parar la reacción de unión. Tras 2 h las microesferas se centrifugaron de nuevo, se resuspendieron en PBS y se conservaron a 4°C.

Para recubrir las microesferas con ADN se mezclaron $\sim 3 \mu\text{l}$ de microesferas de anti-digoxigenina, $\sim 3 \mu\text{l}$ de ADN con asas y $\sim 3 \mu\text{l}$ de tampón 80 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5 (la relación entre estas cantidades se optimizaba cada día de medida hasta conseguir ~ 1 molécula de ADN por microesfera). La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, se mezcló con pipeta cada 3 min para homogeneizar, y después se diluyó en 500 μl del tampón Tris anterior. Este volumen se introdujo en las pinzas ópticas a través de una jeringa conectada al sistema de fluidos del instrumento para comenzar el experimento (Fig. 2.15).

3.1.3. Soluciones tampón y mezclas de etanol

Los tampones utilizados contienen 1 mM u 80 mM NaCl, y 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5. Estos tampones se mezclaron con etanol ($\sim 99.9\%$ pureza; Merck) para preparar mezclas de tampón y etanol de baja o alta concentración de sal, respectivamente. Todas las mezclas fueron sonicadas durante 5-10 min antes de cada uso. La concentración de etanol en las mezclas se expresa siempre en % (v/v). También se utilizó tetrahidrocloreto de espermina (Sigma) a partir de soluciones concentradas en agua desionizada (sistema de purificación de agua Milli-Q; conductividad del agua: 5.5×10^{-5} mS/cm a 25°C).

3.1.4. Dicroísmo circular

Los espectros de DC se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J-810 a 20°C utilizando una cubeta de cuarzo con 0.2 cm de camino óptico. La concentración final de los plásmidos completos linealizados (sin asas) era 15-40 ng/ μl . Los espectros de DC fueron resultado del promedio de diez medidas distintas. Los espectros de las soluciones sin ADN se tomaron como la señal de fondo y se sustrajeron de los espectros finales del ADN. La velocidad de muestreo fue 100 nm/min. La intensidad de la señal de DC está expresada como elipticidad molar por residuo, θ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$). Los experimentos de DC se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

3.1.5. Experimentos con pinzas ópticas

El diseño óptico del instrumento de pinzas ópticas y su funcionamiento ha sido detallado ya en el Capítulo 2. Aquí solamente se describirá la metodología empleada en los experimentos para estudiar la acción simultánea de la tensión y los cambios de actividad acuosa del medio sobre el ADN. En cada experimento, una única molécula de ADN es unida por cada extremo a dos microesferas: una cubierta de digoxigenina, que es atrapada ópticamente, y una cubierta de estreptavidina, que es mantenida por succión en una micropipeta insertada en la cámara de fluidos (véase la configuración en la Fig. 1.1(B) y la metodología en la Sección 2.7). La fuerza sobre la molécula de ADN se genera moviendo la micropipeta respecto a la microesfera atrapada a través de la plataforma piezoeléctrica, y su extensión se determina a partir de la distancia entre los centros de las dos microesferas. Las moléculas de ADN se estiraron y relajaron a 500 nm/s, salvo que se especifique otra velocidad. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, 23 ± 1 °C.

La respuesta mecánica en condiciones de baja humedad se determinó llenando la cámara de fluidos con una mezcla de tampón y etanol a diferentes concentraciones de etanol. Las soluciones se fluyeron dentro de la cámara por medio del sistema de fluidos del instrumento (Sección 2.7). Con este método, los tampones y las mezclas de etanol se pueden intercambiar con cuidado a velocidad controlada, mientras que una molécula individual de ADN permanece unida entre las microesferas, permitiendo así los experimentos en diferentes soluciones con la misma molécula. Para estar seguros del intercambio completo de la solución en el proceso, las soluciones se fluyeron durante 10-15 min, que es un periodo más de 5 veces superior al que se necesita para llenar el volumen de la cámara (~25 μ l) a la velocidad de flujo utilizada. Cuando la nueva solución con etanol llenaba completamente la cámara, se observaba una dramática pérdida de focalización de los láseres debido al cambio en el índice de refracción del medio, lo que permitía la monitorización del proceso de intercambio. Durante este proceso, la molécula se mantuvo con una extensión cercana a su longitud de contorno para evitar la condensación o interacciones inespecíficas con las microesferas. La fuerza medida por el sensor de momento de la luz calibrado a partir de primeros principios no depende del índice de refracción de la solución y, por lo tanto, el llenado sucesivo de la cámara de fluidos solo requiere la focalización de los láseres en el nuevo medio sin ninguna otra calibración del equipo.

3.1.6. Determinación del cambio de longitud de contorno del ADN en soluciones etílicas

Para investigar el comportamiento mecánico del ADN como función de la actividad del agua, se estiraron moléculas individuales en mezclas de tampón y etanol con concentración de etanol en el rango de 10 al 100%. Para detectar las variaciones

en longitud de contorno que pudieran aparecer como consecuencia de una transición estructural B→A inducida por la baja humedad, se midió el cambio en longitud de contorno del ADN en relación con la longitud en tampón a 20 pN. Más concretamente, los experimentos de moléculas individuales de fuerza-extensión se realizaron como sigue: en primer lugar, se hicieron 2 ó 3 ciclos de estiramiento y relajación (por encima de la transición de sobre-estiramiento) de una molécula individual de ADN en tampón, para chequear la calidad de la molécula y de las uniones a las microesferas. En general, el origen de coordenadas para medir el desplazamiento de la molécula a extensión cero está modificado por una cantidad desconocida. Esto es así debido a que existe una incertidumbre en la posición de unión del extremo del ADN con biotina a la superficie de la microesfera sobre la micropipeta, como se explicará en la Sección 3.2.2. Por lo tanto, en el último ciclo, se dejó que las microesferas colisionaran suavemente para determinar un origen de extensión relativa para cada molécula. En segundo lugar, las microesferas se separaron ligeramente para mantener la molécula de ADN cerca de su longitud de contorno completa mientras que el tampón de la cámara de fluidos se reemplazaba por una mezcla de etanol y tampón. Finalmente, la molécula se estiró y relajó otra vez en la nueva solución, y se terminó en un nuevo contacto de las dos microesferas en el último ciclo. El uso de este protocolo para cada molécula permite una evaluación de la longitud de contorno relativa con el mismo origen de coordenadas en soluciones de diferente actividad acuosa.

3.2. Resultados

3.2.1. Caracterización del ADN por dicroísmo circular

El espectro de DC del ADN en forma B está compuesto por una banda positiva con un máximo a una longitud de ~ 270 nm y una banda negativa con un mínimo a ~ 247.5 nm, ambas de magnitud semejante (Ranjbar y Gill, 2009). En el curso de la transición B→A, la intensidad de la banda positiva aumenta, mientras que la banda negativa casi desaparece (Gray et al., 1992). La Fig. 3.2 muestra la caracterización de los plásmidos linealizados pBACgus11 y piJ702 en un tampón de baja sal y en mezclas de tampón y etanol. De acuerdo con la literatura publicada (Brahms y Mommaerts, 1964; Ivanov et al., 1973; Gray et al., 1992), las medidas de pBACgus11 (48% GC) muestran espectros de DC característicos de ADN en forma B, tanto en tampón como en mezclas de tampón y etanol por debajo del 70% etanol (Fig. 3.2 (A)). Un cambio en la señal de DC que indica la existencia de una transición desde la conformación B a la A se encontró a concentraciones de etanol de entre 70% y 80%. El hecho de que este cambio suceda en un rango pequeño de concentración de etanol, Fig. 3.2 (B), es un signo de la cooperatividad de la transición B-A (Ivanov et al., 1973). Además, como se ha mostrado previamente (Minyat et al., 1979), la presencia de policationes desplaza esta transición hacia concentraciones de etanol

más bajas: al 60% etanol con 7 μM espermina la señal de DC muestra el comienzo de la transición B-A para el pBACgus11 (Fig. 3.2 (A)).

Por otro lado, resulta muy interesante que las medidas de DC del plásmido piJ702 (70% GC) muestren señal de forma A incluso a alta actividad acuosa, es decir, en tampones sin etanol. La Fig. 3.2 (C) muestra espectros de DC característicos de ADN en forma A en condiciones que abarcan tanto la solución tampón como las mezclas de tampón y etanol con actividad acuosa decreciente. Por consiguiente, las bandas de DC a 270 nm y 247.5 nm como función de la concentración de etanol no muestran cambios sustanciales (Fig. 3.2 (D)).

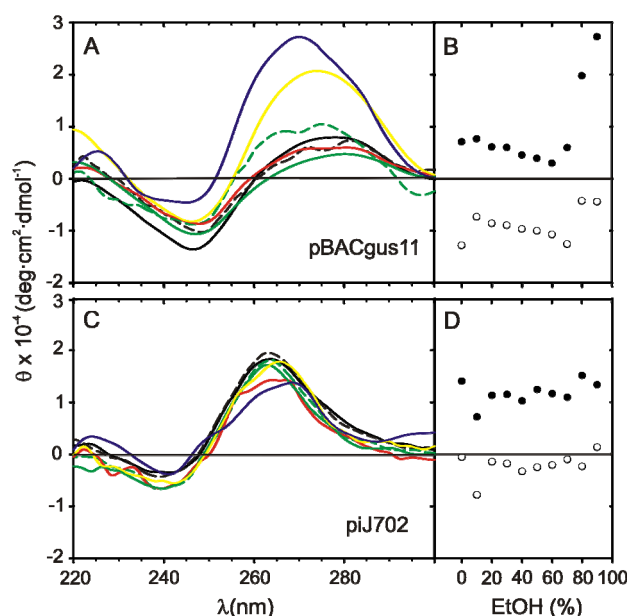


Figura 3.2 | Caracterización por dicroísmo circular de los dos plásmidos linealizados. En los paneles de la izquierda se muestran los espectros de DC normalizados (elipticidad molar por residuo) de (A) pBACgus11 (concentración: $(0.4-0.9) \times 10^{-4}$ M de residuos) y (C) piJ702 (concentración: $(0.6-1.4) \times 10^{-4}$ M de residuos) en diferentes soluciones. Línea negra continua, ADN en tampón Tris con 1 mM NaCl; línea negra discontinua, ADN en tampón Tris con 1 mM NaCl y 17.5 μM espermina. Resto de curvas: ADN en mezclas de tampón Tris con 1 mM NaCl y etanol al 30% (roja), 60% (verde), 60% y 7 μM espermina (verde discontinua), 80% (amarilla) y 90% (azul). Los paneles de la derecha muestran la dependencia de la señal de DC en elipticidad molar por residuo con la concentración de etanol para (B) pBACgus11 y (D) piJ702 a 270 nm (●) y 247.5 nm (○).

3.2.2. Caracterización mecánica de moléculas individuales de ADN en tampón

La Fig. 3.3 muestra unas curvas típicas de fuerza-extensión de pBACgus11 y piJ702 en tampón Tris a varias fuerzas iónicas. Tal y como se ha descrito previamente en la bibliografía (Wenner et al., 2002), la fuerza de sobre-estiramiento aumenta con la concentración de sal, mientras que la histéresis de desnaturalización entre las curvas de estiramiento y relajación de cada ciclo muestra la tendencia opuesta. Además, la histéresis es menor para piJ702 que para pBACgus11, haciendo así el ciclo de estiramiento-relajación prácticamente reversible para el primero, incluso a baja concentración de sal. Por otro lado, la transición de sobre-estiramiento para este ADN ocurre dentro de un rango de fuerzas más estrecho, lo que demuestra que la cooperatividad de esta transición aumenta con la densidad de GC. Por ejemplo, la pendiente de la región de sobre-estiramiento de la molécula de pBACgus11 a 80 mM NaCl en la Fig. 3.3 (A) es 5.03 pN/nm, y es 2.47 pN/nm para la molécula de piJ702 a la misma fuerza iónica en la Fig. 3.3 (B). Aunque las fuerzas de apertura de la doble hélice de las regiones ricas en GC son más altas que aquéllas de las regiones ricas en AT (Essevaz-Roulet et al., 1997), las fuerzas de sobre-estiramiento de pBACgus11 y piJ702 son similares: 58.6 ± 0.7 pN ($n = 19$) y 58 ± 1 pN ($n = 12$), respectivamente, a 1 mM NaCl. Respecto a la longitud de contorno, L_0 , de estas moléculas de ADN, la sal no muestra ningún efecto apreciable sobre pBACgus11 o piJ702 de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente para iones monovalentes y multivalentes sobre el ADN del fago λ (Baumann et al., 1997). Sin embargo, el hecho de que piJ702 muestre estructura secundaria en forma A en los espectros de DC contrasta con la semejanza cualitativa de las curvas de fuerza-extensión de este ADN respecto de las del pBACgus11 (forma B en los espectros de DC), así como respecto de las de ADN del fago λ (Smith et al., 1996; Baumann et al., 1997). Más aun, la región de sobre-

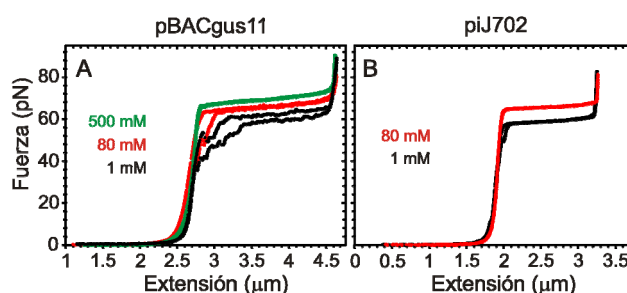


Figura 3.3 | Curvas fuerza-extensión de los dos tipos de ADN en tampón con pinzas ópticas. (A) pBACgus11 y (B) piJ702 en tampón Tris a diferente fuerza iónica: línea negra, 1 mM NaCl; línea roja, 80 mM NaCl; y línea verde, 500 mM NaCl. Las curvas de estiramiento y relajación se muestran en el mismo color. Los datos han sido desplazados sobre el eje horizontal hasta ajustar la longitud de contorno de cada plásmido.

estiramiento para piJ702 concuerda con exactitud con una longitud de $0.7 \times L_0$, que es una ley empírica que ha sido observada en todas las moléculas naturales de ADN hasta la fecha (Smith et al., 1996), incluyendo pBACgus11 aquí. También destaca la ausencia de cambio cooperativo en la extensión desde una longitud de contorno de forma A hacia una de forma B, que ocurriría si la fuerza estuviera desestabilizando la conformación A de piJ702. Una transición así debería expandir repentinamente la longitud de contorno del ADN un $\sim 25\%$ en la curva de estiramiento (desde 0.26 nm/pb en la forma A, a 0.34 nm/pb en la forma B).

En lo referente a la longitud de contorno de las moléculas de ADN, se han obtenido los siguientes valores medios para pBACgus11 y piJ702 en tampón Tris con 80 mM NaCl: $\langle L_0 \rangle = 2.35 \pm 0.29 \mu\text{m}$ ($n = 30$) y $\langle L_0 \rangle = 1.68 \pm 0.13 \mu\text{m}$ ($n = 129$), respectivamente. Si se asume una distancia canónica por par de bases de 0.34 nm, la L_0 teórica de la forma B predicha para estas moléculas de ADN son 2.73 y 1.93 μm , respectivamente. Por lo tanto, con independencia del plásmido, se ha encontrado que las longitudes de contorno experimentales son, en promedio, un 13% más cortas de lo esperado. Aparte de las fluctuaciones rotacionales en la microesfera de la trampa óptica, cuyos efectos disminuyen con la fuerza de estiramiento (Seol et al., 2007), esta discrepancia entre la extensión medida y la teórica se debe a la posición en que cada molécula de ADN se une a la microesfera situada sobre la micropipeta: mientras que la microesfera en la trampa óptica es libre para rotar y, por lo tanto, el extremo con digoxigeninas del ADN se acaba alineando con la dirección de estiramiento, el extremo con biotinas no se orienta como el anterior porque la microesfera sobre la micropipeta no puede rotar (su posición angular está fija). Como consecuencia, la molécula de ADN no es necesariamente paralela a la dirección de estiramiento y, por lo tanto, la longitud medida es la proyección de la extensión del ADN sobre la dirección de estiramiento. Las subestimaciones de la longitud de contorno de este tipo ocurrieron igualmente para pBACgus11 y piJ702, y son habituales en los experimentos con esta configuración (Wang et al., 1997; Seol et al., 2007). Por consiguiente, este acortamiento no se puede atribuir a un cambio en la conformación que, como se ha mencionado anteriormente, debería expandir la longitud de contorno de la molécula de piJ702, con tendencia a adoptar la conformación A, en un $\sim 25\%$. En estos experimentos, se atrapó el ADN entre dos microesferas aproximando la esfera de la micropipeta hacia la atrapada ópticamente siempre en línea con la dirección de estiramiento. Este procedimiento se siguió cuidadosamente de manera sistemática para minimizar la incertidumbre descrita sobre la coordenada de extensión del ADN a fuerza cero de molécula en molécula.

3.2.3. Comportamiento mecánico de moléculas individuales de ADN en mezclas de tampón y etanol

La Fig. 3.4 muestra curvas de fuerza-extensión de moléculas individuales de ADN en mezclas de tampón y etanol. Cada gráfica presenta un experimento en el cual

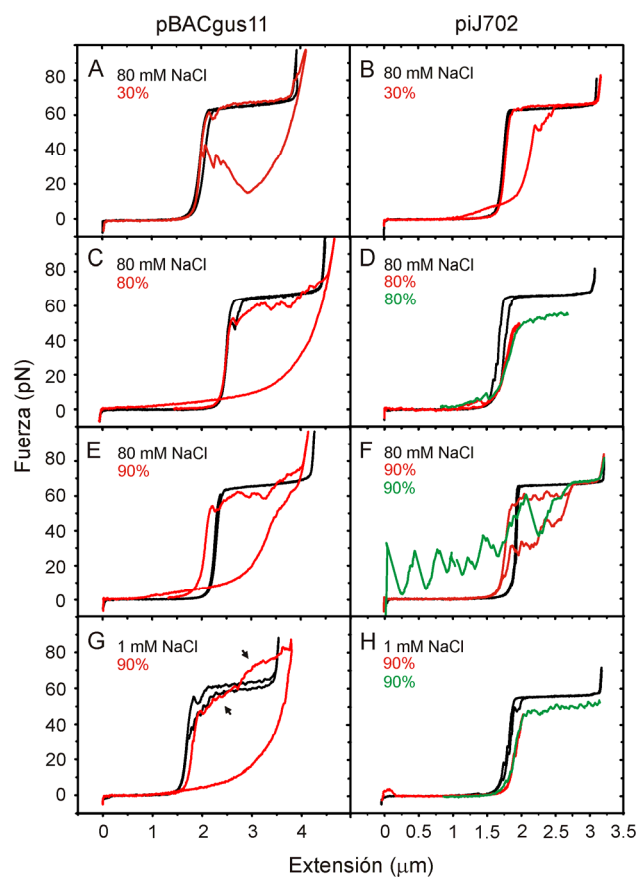


Figura 3.4 | Curvas de fuerza-extensión del ADN en presencia de etanol. Columna izq.: pBACgus11. Columna dcha.: piJ702. En cada panel, una molécula individual de ADN bicatenario es estirada y relajada, primero, en tampón Tris (línea negra; [NaCl] especificada en cada panel) y, posteriormente, en una mezcla del mismo tampón con etanol (líneas roja y verde; % especificado en cada panel). Nótese que, en particular, las moléculas de piJ702 en (D) y (H) en mezclas de tampón-etanol, fueron primero estiradas por debajo de la transición de sobre-estiramiento (curva roja) y, en un ciclo posterior, se soltaron de las microesferas antes de la relajación (curva verde). Las flechas en (G) señalan el centro de los dos escalones de la región de sobre-estiramiento. Las curvas de estiramiento y relajación se muestran en el mismo color. La bajada repentina de la fuerza a extensión cero indica que las microesferas están en contacto y marca un origen de extensión relativo para cada molécula en diferentes condiciones.

la misma molécula primero es estirada y relajada en tampón (curvas negras) y, a continuación, es estirada y relajada de nuevo durante uno o dos ciclos (curvas roja y

verde) en presencia de una determinada concentración de etanol. La Fig. 3.5 muestra el mismo tipo de experimentos esta vez en presencia de espermina, una poliamina de cuatro cargas positivas. En las siguientes subsecciones, se estudia la estabilidad del ADN como función de la actividad del agua a través del análisis del comportamiento de las siguientes transiciones a nivel de moléculas individuales: condensación, sobre-estiramiento y desnaturalización.

a. Condensación

Los experimentos de fuerza-extensión en presencia de etanol (con o sin espermina) habitualmente presentaban saltos repentinos en la fuerza cuando la molécula era estirada desde un estado totalmente relajado (esto es, cuando su extensión era más corta que la longitud de contorno). Estos saltos en la fuerza ocurrían con independencia del tipo de plásmido y son debidos a la liberación

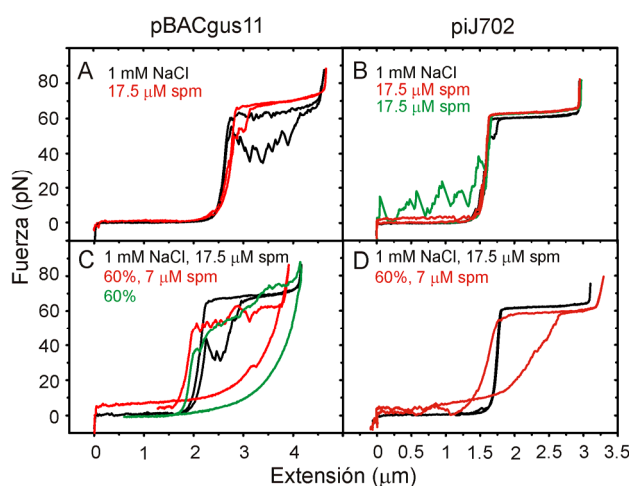


Figura 3.5 | Curvas de fuerza-extensión del ADN en presencia de etanol y espermina. Columna izq.: pBACgus11. Columna dcha.: piJ702. (A) y (B), una molécula individual de ADN es estirada y relajada, primero, en tampón Tris con 1 mM NaCl (curva negra), y, posteriormente, en el mismo tampón con 17.5 μ M espermina (spm) (curvas roja y verde). (C) y (D), una molécula individual de ADN es estirada y relajada, primero, en tampón Tris con 1 mM NaCl y 17.5 μ M espermina (curva negra) y, posteriormente, en una mezcla del mismo tampón con 60% de etanol (concentración final de espermina, 7 μ M) (línea roja). La línea verde en (C) corresponde con una molécula de pBACgus11 diferente en 60% etanol sin espermina, dibujada junto a la curva en presencia de espermina para comparar la influencia de esta poliamina sobre la cooperatividad de la transición de sobre-estiramiento y la histéresis. Las curvas de estiramiento y relajación se muestran en el mismo color. La bajada repentina de la fuerza a extensión cero indica que las microesferas están en contacto y marca un origen de extensión relativo para cada molécula en diferentes condiciones.

causada por la tensión de las interacciones intramoleculares inespecíficas dentro de la estructura globular que adopta el polímero en solución. A diferencia de los saltos aleatorios, existen saltos de fuerza periódicos que indican una mayor organización estructural. Estos saltos, que generan un patrón de dientes de sierra o en zigzag, aparecen en presencia de policondensationes en solución acuosa (Baumann et al., 2000; Murayama et al., 2003). Aquí se ha encontrado que este tipo de comportamiento es también inducido por las altas concentraciones de etanol (>80%). La Fig. 3.4 (F) (curva verde) muestra un patrón de dientes de sierra típico para piJ702 al 90% etanol mientras que la Fig. 3.5 (B) (curva verde) muestra un patrón de dientes de sierra en solución acuosa con espermina, condiciones similares a las utilizadas en (Baumann et al., 2000; Murayama et al., 2003). El análisis de la distancia entre los picos de la descondensación de piJ702 en etanol se muestra en la Fig. 3.6. Los patrones de dientes de sierra han sido interpretados como el resultado de la apertura de una estructura globular colapsada, como el ADN enrollado o el superenrollamiento toroidal (Baumann et al., 2000; Murayama et al., 2003). Basándose en esta interpretación, las distancias entre los picos han sido relacionadas con un proceso de desenrollamiento modular. Los experimentos con ADN en soluciones etílicas, con y sin espermina, son consistentes con esta explicación. En promedio, se ha observado una periodicidad en la longitud del patrón de dientes de sierra en el rango de 150 a 250 nm (Fig. 3.6), muy similar al encontrado para el ADN del fago λ condensado con espermidina e iones $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (Baumann et al., 2000; Murayama et al., 2003). Sin embargo, no se ha encontrado patrones de dientes de sierra periódicos para pBACgus11 en etanol. Este resultado está de acuerdo con que las interacciones intramoleculares son más fuertes en un ADN con alto contenido en GC (Kyrp et al., 2009).

Para poder estudiar la elasticidad de las moléculas en condiciones de alta condensación pero sin los efectos del patrón de dientes de sierra, se siguió un protocolo (véase la Sección 3.1.6) en el cual, antes de que la molécula fuera estirada por primera vez en etanol se mantuvo a una extensión próxima a su longitud de contorno para evitar interacciones intramoleculares (Baumann et al., 2000). Excepto para las curvas verdes en las Figs. 3.4 (F) y 3.5 (B), el resto de las curvas en las Figs. 3.4 y 3.5 fueron medidas bajo este protocolo. Así pues, la Fig. 3.5 muestra que la presencia de espermina produce además una elevación de la región entrópica o escalón de 1-2 pN (pBACgus11, curva roja en la Fig. 3.5 (A)) y de ~3 pN (piJ702, curva roja en la Fig. 3.5 (B)). Este efecto es característico del proceso de separación de un estado condensado a uno extendido (Baumann et al., 2000; Ritort et al., 2006) y es de nuevo más acusado para el plásmido piJ702 puesto que el levantamiento de la región entrópica es mayor para él. En presencia de 60% etanol y 7 μM espermina, la condensación es todavía más patente en ambos tipos de ADN ya que la región entrópica crece hasta una fuerza de ~6 pN, Fig. 3.5 (C) y (D). A la resolución del instrumento (0.1 pN), no se detectó ningún incremento de la región entrópica para el

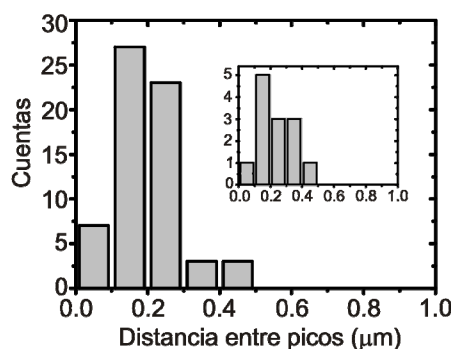


Figura 3.6 | Histograma de la distancia entre los picos de fuerza durante la extensión de moléculas individuales de piJ702. Se ha medido la distancia entre picos del patrón de dientes de sierra del plásmido piJ702 para mezclas de tampón Tris con 1 mM NaCl y 80 mM NaCl y etanol al 80% y al 90%. Se han contado 63 distancias entre picos en 27 patrones de dientes de sierra. Recuadro: Histograma de la distancia entre picos durante la extensión de piJ702 en 60% etanol mezclado con tampón Tris con 1 mM NaCl en presencia de 7 μ M espermina (13 distancias entre picos de 7 patrones de dientes de sierra). El intervalo más probable para la distancia entre picos está en el rango de 150 a 250 nm.

ADN en las mezclas con etanol sin espermina (comparar con la Fig. 3.4). En contraste con el desplegamiento violento del polímero que da lugar al patrón de dientes de sierra, la aparición de una elevación suave, en equilibrio, de la región a bajas fuerzas sugiere que la espermina induce una conformación más definida a través de interacciones laterales entre segmentos del ADN en la estructura globular colapsada (Baumann et al., 2000). En resumen, estos resultados a nivel de molécula individual muestran que la acción conjunta de la baja actividad del agua y los policationes en la molécula de ADN estabiliza una estructura globular soportada por interacciones laterales.

b. Transición de sobre-estiramiento

La Fig. 3.7 muestra la fuerza de sobre-estiramiento para el plásmido pBACgus11 en mezclas de etanol y tampón Tris con 1 mM (círculos llenos) u 80 mM (círculos huecos) NaCl. La fuerza de la transición decrece al añadir etanol en elevadas concentraciones, una tendencia esperable debido al efecto desnaturizador de la fase no polar de la solución. Sin embargo, se observa la tendencia opuesta a bajas concentraciones de alcohol. La Fig. 3.4 (A) y (B), muestra este efecto en las curvas de fuerza-extensión al 30% etanol: se observa un aumento en la fuerza de sobre-estiramiento de 2-3 pN en relación a aquella en tampón en ambos tipos de ADN. Este efecto es similar al causado por un aumento de la concentración de iones

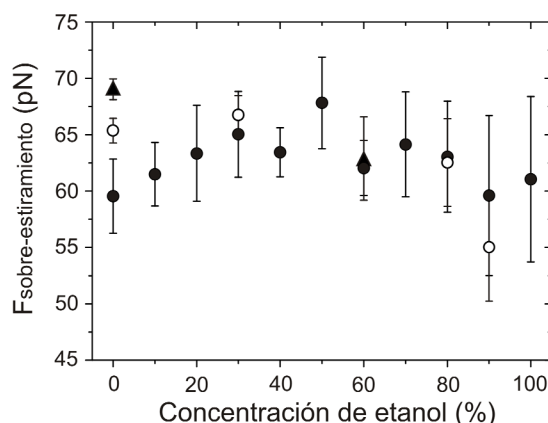


Figura 3.7 | Fuerza de sobre-estiramiento frente a la concentración de etanol para pBACgus11. Los datos fueron recogidos en mezclas de etanol y tampón Tris con 1 mM NaCl (●) u 80 mM NaCl (○). También hay dos condiciones tomadas en mezclas de etanol y tampón Tris con 1 mM NaCl y espermina (▲): 0% y 60% etanol con 17.5 μ M y 7 μ M espermina de concentración final, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos 6 experimentos individuales (cada uno con una molécula diferente) a cada concentración de etanol. La fuerza de sobre-estiramiento representada es el valor de la fuerza a la mitad de la transición para las mezclas de alta fuerza iónica (mezclas con tampón Tris y 80 mM NaCl o 1 mM NaCl y 7 μ M espermina). Debido a la pérdida de cooperatividad a baja fuerza iónica (esto es, en mezclas con tampón Tris y 1 mM NaCl), la fuerza de sobre-estiramiento en estas condiciones se tomó como el valor medio entre los dos escalones de fuerza.

monovalentes en el tampón (Fig. 3.3) (Wenner et al., 2002) y, por lo tanto, se explica por un fenómeno local de aumento de la concentración de cationes a baja ϵ alrededor de la superficie del polímero de ADN. De esta forma, los cationes minimizan el contacto con las moléculas no polares de etanol de la solución (Manning, 1978). Para concentraciones de etanol más altas, las interacciones hidrofóbicas de apilamiento de las bases se desestabilizan y, como resultado, la cooperatividad de la transición de sobre-estiramiento disminuye. La pérdida de cooperatividad de la transición de sobre-estiramiento con la concentración de etanol se manifiesta en un aumento de la inclinación (la transición se expande sobre un rango de fuerzas más amplio) y de la rugosidad. Estos efectos son más comedidos en el ADN de contenido en GC más alto (compárese, por ejemplo, la Fig. 3.4 (E) y (F)). Cuando se utiliza un tampón de baja sal para hacer las mezclas de tampón-etanol (1 mM NaCl, Fig. 3.4 (G) y (H), en vez de 80 mM NaCl, Fig. 3.4 (A)-(F)), hay una pérdida de cooperatividad más fuerte en la región de sobre-estiramiento. Además, se observan dos escalones en la transición de sobre-estiramiento de pBACgus11 (Fig. 3.4 (G)). Estos dos escalones se encontraron a todas las concentraciones de etanol estudiadas (de 10 al 100%) cuando se utilizó un

tampón de baja sal (1 mM NaCl) para las mezclas con el alcohol. Este resultado es similar al descrito para las curvas fuerza-extensión a altas temperaturas (Mao et al., 2005).

El hecho de que la transición de sobre-estiramiento se convierta en un proceso fuera de equilibrio en presencia de etanol se demuestra, además, por la dependencia de esta transición con la velocidad de estiramiento y relajación. En particular, la región de sobre-estiramiento y el área de histéresis del plásmido pBACgus11 en tampón no cambian ostensiblemente cuando este ADN es estirado a diferentes velocidades, mientras que muestran una creciente pérdida de cooperatividad y mayor histéresis con la velocidad cuando está en 30% etanol (Fig. 3.8). Concretamente, en presencia de 30% etanol, la transición de sobre-estiramiento empieza a ~50 pN y termina a ~70 pN para una velocidad de 500 nm/s.

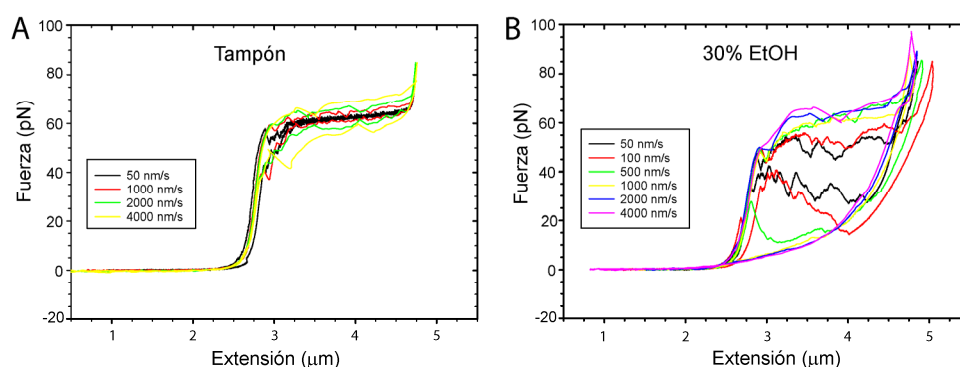


Figura 3.8 | Curvas de fuerza-extensión de pBACgus11 a diferentes velocidades en tampón y en presencia de etanol. **(A)** Cuatro ciclos completos de estiramiento-relajación de una misma molécula de pBACgus11 a 50, 1000, 2000 y 4000 nm/s en 1 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5. **(B)** Seis ciclos de una molécula diferente de pBACgus11 estirada y relajada repetidamente a 50, 100, 500, 1000, 2000 y 4000 nm/s en una mezcla del mismo tampón con 30% etanol. La transición de sobre-estiramiento es ligeramente dependiente de la velocidad de estiramiento en tampón, mientras que presenta una pronunciada dependencia con la velocidad al 30% etanol. Las curvas de estiramiento y relajación se muestran en el mismo color. Los datos han sido desplazados sobre el eje horizontal hasta ajustar la longitud de contorno del plásmido.

Finalmente, se ha encontrado que la espermina tiene la habilidad de recuperar la cooperatividad de la transición de sobre-estiramiento del efecto desnaturizador de la baja concentración de sal (Fig. 3.5 (A)) o del alcohol (Fig. 3.5 (C)), compárense las curvas roja y verde). En solución acuosa, también se observa un aumento en la fuerza de sobre-estiramiento con respecto al mismo experimento en tampón sin espermina (triángulo en la Fig. 3.7 y curvas fuerza-extensión individuales en la Fig. 3.5 (A) y

(B)), un efecto cualitativamente idéntico al producido por una concentración de sal monovalente muy alta (rango molar) (Wenner et al., 2002).

c. Histéresis y desnaturalización

Al decrecer la concentración de sal monovalente, el ADN no vuelve al estado relajado por la trayectoria de estiramiento, observándose la aparición de histéresis en la curva de fuerza-extensión como muestra la Fig. 3.3. Sin embargo, el efecto de una fase no polar en la solución es más radical y la desestabilización de la estructura del ADN con la fuerza es mayor. La Fig. 3.9 muestra el área de histéresis promedio para el plásmido pBACgus11 en mezclas de tampón y etanol. El área de histéresis en solución acuosa determina el mínimo para una determinada concentración de sal monovalente, mientras que el área de histéresis máxima se obtiene cuando la molécula relaja como ADN monocatenario. Estos límites están indicados en la Fig. 3.9 por líneas horizontales discontinuas para el caso de mezclas de etanol y tampón Tris con 1 mM NaCl. En estas mezclas de tampón de baja sal y etanol, la histéresis es muy pronunciada, como se refleja en el repentino aumento del área de histéresis entre 0 y 10% etanol (la mayoría de las moléculas relajan como ADN de cadena sencilla por encima de 10% etanol). Sin embargo, a pesar de la alta desnaturalización, las dos hebras de la molécula normalmente vuelven a aparearse cuando la tensión cesa. Concretamente, se ha observado que ciclos posteriores de estiramiento, libres de efectos de condensación, normalmente muestran el perfil de elasticidad característico del ADN bicatenario y no monocatenario. En las mezclas con tampón de alta sal y etanol, el aumento de la histéresis es más gradual y, por ejemplo, al 30% etanol muchas moléculas reaparean durante la relajación, como se ve en la Fig. 3.4 (A) y (B). Ya se mencionó previamente que la espermina estabiliza la doble hélice del ADN. Este hecho se ha reflejado también en la histéresis: al añadir 7 μ M espermina a una mezcla de 60% etanol y tampón de baja sal (1 mM NaCl), la histéresis media disminuye notablemente (Fig. 3.9, triángulo). La tendencia de la histéresis a crecer con la concentración de etanol mostrada en la Fig. 3.9 es similar a la causada por la temperatura sobre moléculas de ADN del fago λ bajo tensión (Mao et al., 2005), lo que refleja otra vez la similitud cualitativa entre la desnaturalización mecánica causada por altas temperaturas y por baja actividad del agua. piJ702 (ADN con alto GC) siempre mostró menor área de histéresis que pBACgus11 para las mismas condiciones (compárense, por ejemplo, los experimentos individuales para ambos tipos de moléculas en las Figs. 3.3, 3.4 y 3.5). Sin embargo, resultó mucho más difícil obtener un buen número de datos con ciclos completos de estiramiento y relajación a altas concentraciones de etanol como para hacer un análisis cuantitativo análogo al de pBACgus11 (los fuertes saltos repentinos en la fuerza, efecto de la condensación, provocaban que el ADN se despegara de las microesferas con mucha frecuencia).

Es interesante observar la disminución del área de histéresis a concentraciones de etanol por encima del 60%, como consecuencia de una mayor

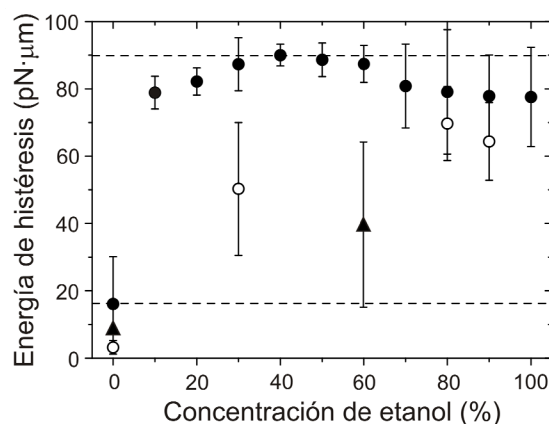


Figura 3.9 | Área de histéresis entre las curvas de estiramiento y relajación para pBACgus11. Los datos fueron recogidos en mezclas de etanol y tampón Tris con 1 mM NaCl (●) u 80 mM NaCl (○). También hay dos condiciones tomadas en mezclas de etanol y tampón Tris con 1 mM NaCl y espermina (▲): 0% y 60% etanol con 17.5 μ M y 7 μ M espermina de concentración final, respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos 6 experimentos individuales (cada uno con una molécula diferente) a cada concentración de etanol. Las líneas horizontales discontinuas marcan el límite superior e inferior del área de histéresis para pBACgus11 en mezclas de etanol con tampón Tris con 1mM NaCl. El límite superior se obtiene cuando el ADN se separa totalmente en dos hebras sencillas y el inferior cuando está en solución acuosa.

incidencia de reapareamiento (o más rápido) de las hebras durante la relajación (Fig. 3.9). Esta observación está en consonancia con un aumento repentino de la temperatura de desnaturalización o de *melting* (T_m), que fue descrito en experimentos volumétricos para altas concentraciones de etanol (Usatyí y Shlyakhtenko, 1974; Piskur y Rupprecht, 1995) y con policonaciones (Minyat et al., 1979). Este aumento de la T_m se asoció a dos fenómenos que suceden en distintos rangos de concentración de etanol: i) durante la transición B-A de fibras de ADN (70-80% etanol en 10 mM NaCl, KCl o CsCl); ii) durante la agregación del ADN (por encima de 92% etanol), donde las fibras de ADN se comportan como estructuras térmicamente estables (Usatyí y Shlyakhtenko, 1974; Piskur y Rupprecht, 1995). También se ha descrito que el efecto estabilizador de la espermina favorece la condensación del ADN en forma A con el aumento simultáneo de la temperatura de desnaturalización (Minyat et al., 1979). Además, se sugirió que el ADN tipo A posee una fuerte tendencia a auto-adherirse (Arscott et al., 1995). Así, esta disminución de la desnaturalización, reflejada en la histéresis decreciente a altas concentraciones de etanol, puede entenderse en términos de una mayor estabilidad de las hebras de ADN debido al aumento de las interacciones electrostáticas a baja ϵ , las cuales finalmente llevan a toda la estructura hacia a un estado condensado.

4

Estabilidad mecánica de moléculas individuales de ADN en baja humedad con policationes: estudio con pinzas magnéticas y AFM

Los experimentos de pinzas ópticas del capítulo anterior han mostrado que la transición A→B inducida por la tensión no ocurre en el régimen de fuerza de las decenas de piconewton, en el que esta técnica ofrece resolución de alta calidad. A estas fuerzas, el ADN aparece ya en forma B por lo que si existe una transición cooperativa a nivel de molécula única, esta ha de tener lugar a fuerzas muy bajas, por debajo de 5 pN, donde coexistiría con la condensación y podría quedar oculta por ella. Así pues, con el propósito de intentar distinguir cualquier señal de la transición A-B de los efectos de condensación, se han realizado un conjunto de experimentos con pinzas magnéticas. Esta técnica ofrece mejor resolución que las pinzas ópticas a fuerzas bajas ($0.01 \text{ pN} < F < 4 \text{ pN}$) y, además, permite realizar experimentos a fuerza constante evitando los problemas de desfocalización y realineamiento derivados de la diferencia en índice de refracción entre el tampón y el etanol. Así, se han realizado experimentos a fuerza constante en el régimen de elasticidad entrópica de pBACgus11 (48% GC y forma B) y piJ702 (70% GC y forma A) para investigar el colapso de moléculas individuales en tiempo real, en presencia de etanol y espermina, evitando los patrones de dientes de sierra que aparecían en los experimentos de fuerza-extensión de pinzas ópticas. En otro tipo de experimentos, se han estirado las moléculas dentro del régimen entrópico en solución acuosa, aprovechando las características únicas de piJ702 para adoptar forma A, con el fin de identificar una posible transición B-A sin el efecto de la condensación. Finalmente, se ha utilizado la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) para analizar las conformaciones y las longitudes de contorno de estas moléculas de ADN adsorbidas sobre mica.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Muestras de ADN, tampones y mezclas de etanol

Se han utilizado las mismas muestras de ADN descritas en el capítulo anterior, esto es, moléculas procedentes del plásmido pBACgus11 (8041 pb, 48% GC) y del plásmido piJ702 (5724 pb, 70% GC). Para los experimentos de pinzas magnéticas las moléculas fueron procesadas siguiendo el protocolo descrito para los experimentos de pinzas ópticas (Sección 3.1.1). Análogamente, para generar las muestras de AFM se siguió el mismo protocolo de linealización de los plásmidos descrito para los experimentos de DC (Sección 3.1.1). Además, para asegurar la pureza y uniformidad de tamaños de las muestras visualizadas por AFM, el ADN se purificó a partir de la extracción de la banda de un gel preparativo de agarosa (véase la Fig. 4.5 (A)).

Los tampones estándar utilizados en los experimentos de pinzas magnéticas contenían 1 mM u 80 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5. Estos tampones se utilizaron para fabricar mezclas con etanol. En particular, se prepararon las siguientes mezclas de tampón-etanol: tampón 80 mM NaCl-90% etanol; tampón 1 mM NaCl-30% etanol; y tampón 1 mM NaCl-60% etanol, con 7 μ M espermina de concentración final.

4.1.2. Pinzas magnéticas

En las pinzas magnéticas, una molécula de ADN se inmoviliza por ambos extremos en una cámara de fluidos entre la superficie de vidrio de esta y una microesfera superparamagnética por medio de enlaces no covalentes. En particular, se usaron microesferas (en este capítulo, siempre superparamagnéticas, aunque no se mencione explícitamente) de 1 μ m de diámetro cubiertas de estreptavidina (Invitrogen) y se recubrió la superficie de vidrio de anti-digoxigenina (Fig. 4.1 (A)). La Fig. 4.1 (B) muestra la configuración de las pinzas magnéticas. Encima de la cámara de fluidos, se sitúan un par de imanes permanentes que permiten aplicar una fuerza vertical sobre la microesfera según

$$\mathbf{F} = \frac{1}{2} \nabla (\mathbf{m} \cdot \mathbf{B}) \quad (4.1)$$

donde $\mathbf{m}$ es el momento magnético inducido de la microesfera en un campo magnético externo, $\mathbf{B}$. La fuerza puede disminuirse o aumentarse moviendo los imanes arriba y abajo, respectivamente. Por otro lado, la luz que ilumina la cámara interacciona con la microesfera y produce anillos de difracción concéntricos en el plano focal del objetivo situado bajo la cámara. La imagen del patrón de difracción es grabada con una cámara CCD y analizada en un ordenador para después extraer de ella los parámetros fuerza y extensión vertical del ADN. Para determinar la extensión

(*l*) se utiliza un método de calibración basado en la correlación del patrón de difracción de la microesfera con la distancia entre la microesfera y el plano focal del objetivo, tomando imágenes para varias posiciones verticales de este (Gosse y Croquette, 2002). Si se mide un perfil de calibración equivalente para una microesfera de referencia fija en la superficie, próxima a la microesfera con ADN, se determina la distancia entre la superficie y el objetivo. Finalmente, la diferencia entre las dos distancias medidas da la extensión de la molécula. Para determinar la fuerza aplicada se requieren la extensión de la molécula (*l*) y la medida de las fluctuaciones de la posición de la microesfera en el plano (Vilfan et al., 2009):

$$F = \frac{k_B T l}{\langle \delta x^2 \rangle} \quad (4.2)$$

donde $\langle \delta x^2 \rangle$ es la varianza de las fluctuaciones de la microesfera, obtenida del análisis estadístico de la posición de la partícula en el tiempo. Las curvas de fuerza-extensión se generan tomando, típicamente, 8192 ó 16384 imágenes para cada posición de los imanes. La elección del número de imágenes depende de la amplitud

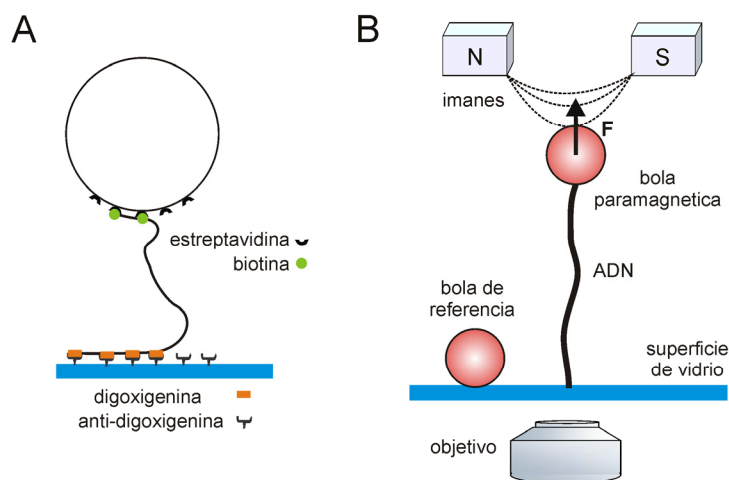


Figura 4.1 | Configuración experimental de las pinzas magnéticas. **(A)** Esquema de las uniones del ADN en las pinzas magnéticas. La molécula de ADN se une por el extremo con dos biotinas a una microesfera magnética cubierta de estrepavidina y, por el extremo con digoxigeninas, a la superficie del cubreobjetos cubierta de anti-digoxigenina. **(B)** Representación esquemática de una microesfera unida a la superficie de un cubreobjetos a través de una molécula de ADN y de una microesfera de referencia pegada a la superficie. En el gradiente de campo creado por los imanes, la microesfera experimenta una fuerza de estiramiento vertical, *F*. Los desplazamientos de la microesfera son medidos y comparados con los de la microesfera de referencia para inferir la extensión de la molécula.

de las fluctuaciones: a fuerzas bajas se adquiere el doble de imágenes que a fuerzas altas porque la indeterminación de la posición de la microesfera es mayor. Se tomaron imágenes a 60 Hz con los imanes situados a 19 alturas distintas.

Las cámaras de fluidos de las pinzas magnéticas contaban con un orificio de entrada y otro de salida para poder intercambiar el tampón o introducir las soluciones de etanol durante el experimento. La cámara estaba conectada a través de un tubo de poliestireno a una jeringa colocada en una bomba que permitía controlar la velocidad del flujo (típicamente, 10-100 $\mu\text{l}/\text{min}$). El procedimiento para crear una cámara de fluidos incluye la limpieza previa de los cubreobjetos por sonicación en acetona e isopropanol. Después, el cubreobjetos que forma la pared inferior de la cámara se recubrió con 1% poliestireno (70000 g/mol). Posteriormente, la cámara ya ensamblada se incubó con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-digoxigenina durante 24 h a 37°C.

Las microesferas magnéticas cubiertas de estreptavidina se lavaron dos veces en tampón PBS antes de cada experimento. Posteriormente, se mezclaron $\sim 5 \mu\text{l}$ de la solución de microesferas con el ADN procesado con biotinas y digoxigeninas (1 ng/ μl). La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para que se produjera la unión del ADN a las microesferas a través del enlace biotina-estreptavidina. Posteriormente, la mezcla se diluyó añadiendo 100 μl de tampón 10 mM fosfato, 10 mM NaN_3 , 0.2 mg/ml BSA y 0.1% Tween, pH 7.5 y se fluyó dentro de la cámara de fluidos manteniendo los imanes suficientemente alejados para prevenir interacciones con las microesferas magnéticas. Tras observar por videomicroscopía que las microesferas habían llegado a la cámara, se paró el flujo y se esperó 10 min para que las moléculas de ADN se unieran a la superficie con anti-digoxigenina. Al disminuir la distancia entre imanes y superficie, solo las microesferas que se hayan unido a la superficie a través del ADN se mantendrán en su posición. El tampón fosfato mencionado se retiró lavando con uno de los tampones Tris estándar antes de comenzar los experimentos. De esta manera, el flujo arrastraba las microesferas no unidas y además se evitaba la influencia del BSA sobre el ADN (Besteman et al., 2007).

Por otro lado, las microesferas utilizadas tienen un momento magnético que, en equilibrio, se alinea con el campo externo y que hace que las microesferas giren en un campo rotatorio. Puesto que las moléculas no se inmovilizan por las dos hebras de cada extremo (las dos biotinas están en la misma hebra), una microesfera magnética con una única cadena de ADN unida puede rotar con el campo magnético sin que se acumulen giros en la molécula ni cambie su grado de enrollamiento. Esta circunstancia se aprovecha para identificar si una microesfera está unida a la superficie a través de una o más moléculas de ADN: si al girar los imanes la microesfera desciende, hay más de una molécula unida y la microesfera se descarta para los experimentos.

4.1.3. Microscopía de fuerzas atómicas

Básicamente, un AFM consta de una punta afilada y fina en el extremo de un elemento flexible denominado micropalanca (Binnig et al., 1986) (véase la Sección 1.4.1). La micropalanca se puede desplazar con gran precisión utilizando una plataforma piezoeléctrica. Cuando la punta interacciona con una molécula, la micropalanca se desvía. La reflexión de un haz láser sobre la micropalanca se recoge en un fotodetector que posibilita la medida de su desviación. Para un cierto rango de deflexiones, el sistema se comporta como un muelle, de manera que la desviación es proporcional a la fuerza. Así, mientras la punta escanea la superficie las interacciones entre la punta y la muestra se registran con una sensibilidad del orden del nanonewton. Esto permite generar imágenes tridimensionales o mapas topográficos de la superficie, incluso en solución. Existen varios modos de producir las imágenes de AFM: el modo contacto, en el que se mantiene constante la fuerza o la altura de la micropalanca; y el modo dinámico, en el que la punta oscila cerca de su frecuencia de resonancia mientras se monitorizan la amplitud y la fase de la micropalanca y se toman como señales para generar la imagen.

En los experimentos, una solución de ~20 µl de moléculas de ADN en tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) con 15 mM MgCl₂ se depositó sobre un disco de mica recién exfoliada. Después de esperar ~30 s, el disco se lavó con agua desionizada y filtrada, y se secó con gas nitrógeno. Las muestras se tomaron en aire a temperatura ambiente con un microscopio de fuerzas atómicas comercial (Nanotec Electronica, S.L.). Se operó en modo dinámico de modulación de amplitud. Se utilizaron micropalancas con una frecuencia de resonancia de 330 kHz y una constante de recuperación de 42 N/m (PPP-NHC, Nanosensors). Se tardó 3 min en adquirir cada imagen de 1 µm × 1 µm (512 × 512 píxeles). Las imágenes se procesaron y analizaron utilizando el programa WSxM (Horcas et al., 2007).

4.2. Resultados

Los experimentos que se describen a en este capítulo se realizaron en colaboración con Fernando Moreno Herrero (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC).

4.2.1. Pinzas magnéticas

a. Experimentos a fuerza constante

Para desarrollar experimentos a fuerza constante, se mantuvo fija la altura de los imanes mientras se intercambiaba el tampón inicial de la cámara por una mezcla de tampón y etanol a una determinada concentración. Así, el efecto de la solución entrante sobre la extensión del ADN se observó directamente y en tiempo real. La Fig. 4.2 muestra algunas de las curvas de extensión *versus* tiempo obtenidas en estos

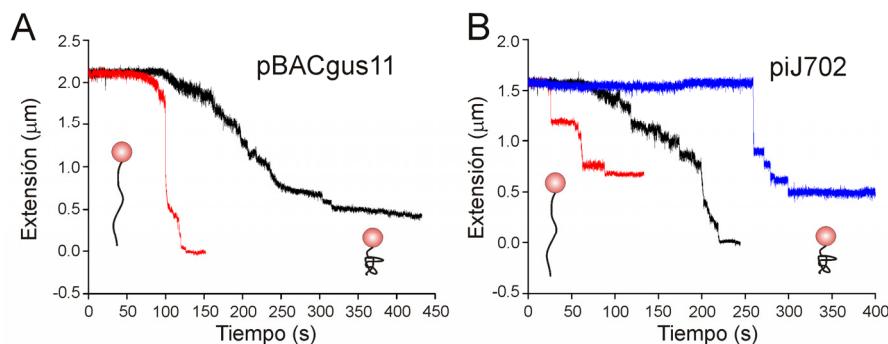


Figura 4.2 | Condensación del ADN en tiempo real. Moléculas de pBACgus11 (A) y piJ702 (B) mantenidas a una tensión de 1 pN (excepto la correspondiente a la curva roja en (B), a 0.5 pN) bajo el influjo de mezclas de tampón y etanol con 8 mM NaCl y 90% etanol (curvas negras); 0.4 mM NaCl, 7 μ M espermina y 60% etanol (curvas rojas); y de tampón con 1 mM NaCl y 17.5 μ M espermina (curva azul). El tiempo que tarda la mezcla con etanol o espermina en alcanzar al ADN e interactuar con él es indeterminado ya que depende del volumen de la cámara de fluidos y de la velocidad de flujo. Los datos experimentales fueron desplazados en el eje de extensión hasta hacer coincidir las curvas en un origen común cuya posición la determina la molécula más larga de cada panel.

experimentos. En particular, se muestra el comportamiento de pBACgus11 (Fig. 4.2 (A)) y piJ702 (Fig. 4.2 (B)) bajo el influjo de una solución de tampón y etanol al 90% (8 mM NaCl concentración final de la mezcla) y al 60% en presencia de 7 μ M espermina (0.4 mM NaCl, concentración final). Se eligió trabajar con estas mezclas de tampón y etanol porque se sabe que causan la transición B-A en experimentos de volumen (Ivanov et al., 1974; Minyat et al., 1979) y, en particular, se comprobó que el espectro de DC de pBACgus11 (Fig. 3.2 (A)) tenía características propias de la forma A en estas condiciones (recuérdese que piJ702 (70% GC) presentaba espectro de DC de forma A incluso en tampón). Cuando estas mezclas de tampón y etanol llegaban a la posición de la microesfera, se observó un gran cambio en la longitud del ADN, con acortamientos tanto escalonados como graduales. La extensión de las moléculas decrece en un 75-100% respecto de la extensión inicial (9 moléculas diferentes) para una fuerza de 1 pN. Esta disminución de la extensión no es compatible con un acortamiento causado únicamente por una transición desde la estructura B a la A (~25%), sino que refleja el colapso o la condensación total del ADN. En este sentido, se observó una disminución de extensión del piJ702 (a 1 pN) de la misma magnitud al fluir tampón con 1 mM NaCl y 17.5 μ M espermina (línea azul, en Fig. 4.2 (B)). La espermina por sí sola condensa el ADN pero no causa transiciones estructurales sobre secuencias naturales (Robinson y Wang, 1996;

Besteman et al., 2007). Este hecho y la similitud entre los datos de la espermina en tampón y de las mezclas con etanol, señalan a la condensación como el efecto observado en estos experimentos.

También se encontró que la extensión inicial medida de las moléculas en tampón Tris con 1 mM u 80 mM NaCl es menor que la longitud de contorno teórica asumiendo forma B (2.73 y 1.93 μm , para pBACgus11 y piJ702, respectivamente) (Fig. 4.2). Esta discrepancia entre el valor experimental y el teórico de L_0 que, como se explicó en el capítulo anterior (Sección 3.2.2), también sucede en las pinzas ópticas, tiene aquí su origen en la unión del ADN a la microesfera magnética. Más concretamente, como la microesfera tiene momento magnético y no puede rotar, es frecuente que una fracción de la molécula quede recubriendo la microesfera, de ahí que la extensión medida sea menor que L_0 . En cualquier caso, esta incertidumbre experimental no afecta a las medidas relativas de cambio de extensión.

b. Condensación modulada por la tensión

En contraste con el efecto del 90% etanol, un porcentaje de etanol moderadamente bajo como es el 30% no producía condensación a la misma tensión y escala temporal. Así, en mezclas de tampón y etanol al 30% (0.7 mM NaCl, concentración final), no se detectó ningún cambio en la extensión del ADN cuando este se mantenía estirado con fuerzas ≥ 1 pN, incluso después de esperar varios minutos (hasta 8 min). Sin embargo, al reducir la fuerza en pasos discretos sí se observó la condensación de los dos tipos de ADN (Fig. 4.3 (A) y (B)). El efecto es reversible y al aumentar nuevamente la fuerza el ADN se descondensa recuperando gran parte de su extensión inicial. Finalmente, se acaban estos experimentos volviendo a la solución tampón con 10 mM Tris y 1 mM NaCl, lo que facilita la descondensación del ADN y la extensión total de la estructura colapsada (las flechas en la Fig. 4.3 (A) y (B) indican estos sucesos causados por la llegada del tampón).

c. Curvas de fuerza-extensión

Posteriormente, se midió la extensión del ADN como función de la tensión, obteniendo curvas de fuerza-extensión de pBACgus11 y piJ702 con pinzas magnéticas (Fig. 4.4). La fuerza aplicada varía típicamente en el rango [0.01, 5] pN, mientras que las curvas fuerza-extensión realizadas con pinzas ópticas (Fig. 3.3) comprendían un rango de fuerzas mucho mayor [0.1, 80] pN. Las curvas de pinzas magnéticas ofrecen, sin embargo, mayor resolución en el régimen de elasticidad entrópico.

El diagrama fuerza-extensión de una molécula de ADN se describe convenientemente por un modelo de física de polímeros llamado WLC (del inglés,

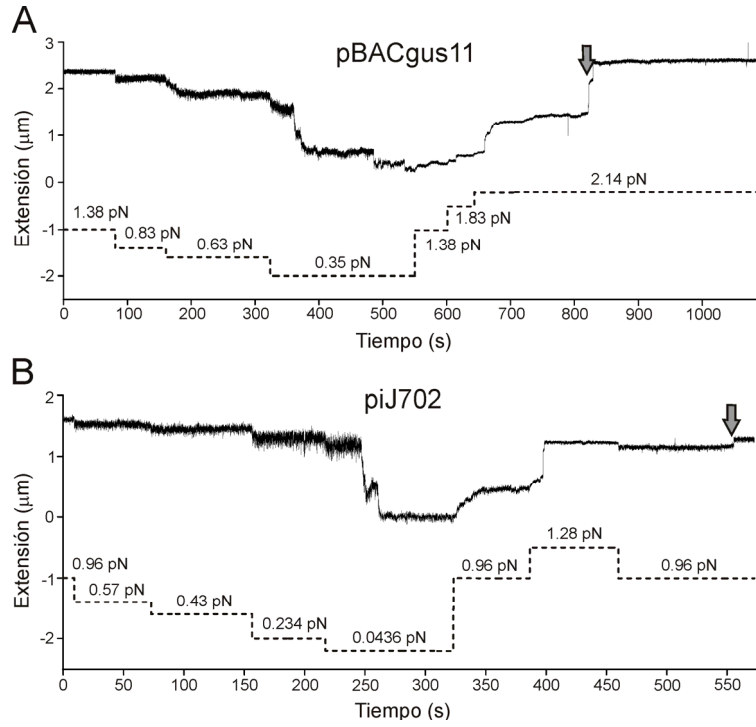


Figura 4.3 | Condensación y descondensación inducidas por fuerza. Cambio en tiempo real de la extensión de moléculas de pBACgus11 (A) y piJ702 (B) en una solución con 0.7 mM NaCl y 30% etanol al variar la tensión aplicada sobre el ADN. La línea punteada muestra el perfil de fuerza durante el experimento. Finalmente, se introduce tampón Tris con 1 mM NaCl cuya llegada aproximada a la posición de la microesfera se indica con flechas verticales.

worm-like chain) (Bustamante et al., 1994). Las curvas de fuerza-extensión se modelaron aquí utilizando un modelo WLC refinado (Bouchiat et al., 1999):

$$F = \frac{k_B T}{P} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L_0} \right)^i \right] \quad (4.3)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura en kelvin, P es la longitud de persistencia, es decir, la longitud media en que las fluctuaciones térmicas curvan el ADN. De manera más precisa, la probabilidad de que dos segmentos separados una distancia L a lo largo de la molécula estén alineados viene dada por $\exp(-L/P)$. L_0 es la longitud de contorno, y las constantes α_i tienen los valores: $\alpha_2 = -0.5164228$, $\alpha_3 = -2.737418$, $\alpha_4 = 16.07497$, $\alpha_5 = -38.87607$, $\alpha_6 = 39.49944$ y $\alpha_7 = -14.17718$ (Bouchiat et al., 1999). La longitud de persistencia es un parámetro estadístico que se usa

habitualmente para describir la resistencia intrínseca de la molécula a las deformaciones. Para las moléculas representadas en la Fig. 4.4, del ajuste al modelo WLC se deducen unos valores de $L_0 = 2.92 \pm 0.01 \mu\text{m}$ y $P = 47.2 \pm 1.9 \text{ nm}$ para el plásmido pBACgus11 (Fig. 4.4 (A)) y de $L_0 = 1.85 \pm 0.01 \mu\text{m}$ y $P = 49.9 \pm 2.6 \text{ nm}$ para el plásmido piJ702 (Fig. 4.4 (B)). Repitiendo estos experimentos para varias moléculas distintas se obtuvieron los valores medios de $\langle L_0 \rangle = 2.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ y $\langle P \rangle = 47 \pm 3 \text{ nm}$ para pBACgus11 ($n = 14$) y de $\langle L_0 \rangle = 1.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ y $\langle P \rangle = 48 \pm 5 \text{ nm}$ para el plásmido piJ702 ($n = 10$), donde se indica la desviación estándar de la media y el número de moléculas medidas. Puesto que las moléculas utilizadas tienen 8022 pb (pBACgus11) y 5682 pb (piJ702), se deduce una distancia axial media entre pares de bases de $0.35 \pm 0.01 \text{ nm}$ y $0.32 \pm 0.02 \text{ nm}$, respectivamente, los cuales son semejantes al valor canónico de 0.34 nm del ADN tipo B que aparece en la literatura (Saenger, 1984). Los datos de la longitud de persistencia obtenidos son semejantes al valor típico para el ADN bicatenario en condiciones fisiológicas, $P \sim 50 \text{ nm}$ (Bustamante et al., 2003). En comparación, la longitud de persistencia de moléculas individuales de ARN bicatenario (hélice en forma A) medida con pinzas magnéticas en experimentos idénticos a los realizados aquí, es $P \sim 64 \text{ nm}$ (Abels et al., 2005).

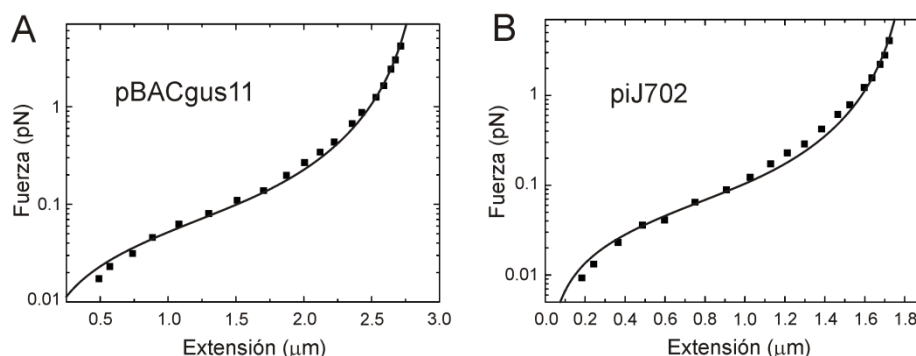


Figura 4.4 | Los ajustes de las curvas de fuerza-extensión evidencian forma B en los dos tipos de ADN. Cada panel muestra un ejemplo de experimento de pinzas magnéticas para una molécula de pBACgus11 (A) y otra de piJ702 (B). Los puntos se corresponden con los datos experimentales promediados durante 2.3 ó 4.55 min, mientras que la curva es el ajuste de los mismos al modelo WLC (Ec. 4.3). Estos experimentos se realizaron en un tampón con 80 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5.

4.2.2. AFM

A continuación, se tomaron imágenes de AFM de las dos muestras de ADN con el fin de observar su conformación y medir sus longitudes de contorno en

ausencia de fuerza. Las moléculas utilizadas proceden de los plásmidos pBACgus11 (8041 pb) y piJ702 (5724 pb) linealizados y purificados a partir de la extracción de la banda de un gel de agarosa preparativo (sin asas de biotinas y digoxigeninas). Se usaron iones Mg^{2+} y polilisinas para promover la adsorción del ADN sobre las superficies de mica, pero solo se utilizaron las imágenes del ADN adsorbido con Mg^{2+} para medir la longitud de contorno (Fig. 4.5). La longitud de las moléculas adsorbidas resultó ser $\langle L_0 \rangle = 2.85 \pm 0.03 \mu m$ ($n = 3$) y $\langle L_0 \rangle = 2.01 \pm 0.08 \mu m$ ($n = 22$)

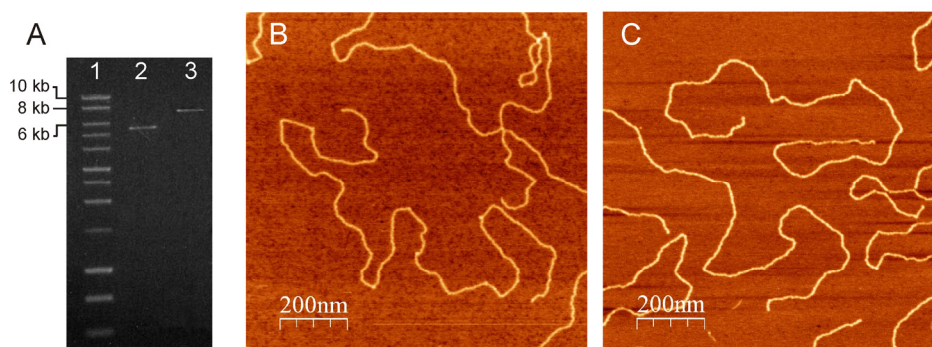


Figura 4.5 | Experimentos de AFM. (A) Gel de electroforesis (agarosa, 1%) de las moléculas de piJ702 (5724 pb, carril 2) y pBACgus11 (8041 pb, carril 3) utilizadas en los experimentos de AFM. Como referencia se muestra una escalera de 1 kb en el carril 1. Imágenes de AFM de moléculas de pBACgus11 (B) y piJ702 (C) depositadas sobre mica utilizando Mg^{2+} . Las imágenes tienen un tamaño de $1 \mu m \times 1 \mu m$ (512×512 píxeles).

para pBACgus11 y piJ702, respectivamente. Estos datos dan una distancia axial media por par de bases de 0.354 ± 0.004 nm (pBACgus11) y 0.35 ± 0.01 nm (piJ702) que, nuevamente, están de acuerdo con estructuras en forma B. Por otro lado, no se han encontrado dificultades en la adsorción de piJ702 sobre superficies de mica en presencia de $MgCl_2$. Abels *et al.* (2005) encontraron que el ARN bicatenario no se adsorbía eficazmente sobre la mica en presencia de $MgCl_2$ y sugirieron que este comportamiento se debía a las características estructurales de la hélice del ARN. Propusieron que el Mg^{2+} no era capaz de crear el puente de unión entre las cargas negativas del esqueleto de fosfatos y la superficie de mica cargada negativamente, debido a la pequeña distancia entre los grupos fosfato del ARN y a su orientación (enfrentándose unos a otros). La doble hélice del ARN da señal de DC de forma A equivalente a la de piJ702. Aquí no se ha encontrado diferencias en la adsorción sobre mica con Mg^{2+} entre piJ702 y pBACgus11.

5

Propiedades eléctricas e hidrodinámicas de centrosomas medidas con pinzas ópticas

El centrosoma es el mayor centro organizador de microtúbulos de células animales y consta de un par de centriolos rodeados por un material pericentriolar. En este capítulo, se muestra la manipulación por láser de centrosomas individuales de embriones tempranos de *Drosophila* entre dos microelectrodos, con el fin de revelar que es un orgánulo con carga neta negativa y una región isoelectrica muy baja (3.1 ± 0.1). De esta electroforesis a nivel de orgánulo individual se infiere una carga efectiva inferior o del orden de 10^3 electrones, que corresponde con una densidad de carga superficial significativamente más pequeña que la de los microtúbulos. Se muestra, sin embargo, que la carga del centrosoma tiene una notable influencia sobre su propia estructura. En particular, se ha investigado el comportamiento hidrodinámico del centrosoma midiendo su tamaño por la ley de Stokes y por el análisis espectral de las fluctuaciones térmicas de la fuerza. Se ha encontrado, por un lado, que el tamaño hidrodinámico del centrosoma es un 60% mayor que el diámetro obtenido por microscopía electrónica y, por otro lado, que esta expansión fisiológica está producida por el campo eléctrico que origina el centrosoma, un efecto que modula su comportamiento estructural a través de las condiciones de pH. Además, esta metodología se revela útil para estudiar la acción de diferentes condiciones ambientales, como la presencia de Ca^{2+} , sobre la estructura dinámica del centrosoma.

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Preparación de centrosomas

Se han utilizado centrosomas de embriones tempranos de *Drosophila* en mitosis, provistos por Bodo M. H. Lange (Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlín, Alemania) en el marco de la colaboración científica establecida entre nuestros dos grupos. La purificación de los centrosomas se realizó según protocolos publicados (Moritz et al., 1995; Lange et al., 2005) en los que este grupo colaborador es experto y que incluyen el tratamiento con DNasas de pureza electroforética (libres de proteasas). Se evaluó la presencia de centrosomas en fracciones de sacarosa por microscopía de inmuno-fluorescencia con el marcador anti- γ -tubulina GTU-88. Las fracciones con niveles más altos se distribuyeron en alícuotas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Todos los experimentos descritos se realizaron a temperatura ambiente, $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.1.2. Criomicroscopía electrónica

Para comprobar la calidad de la purificación se tomaron varias imágenes de la preparación con criomicroscopía electrónica de baja resolución. Para ello, se aplicaron muestras de centrosomas en tampón BRB80 (Sección 5.1.5) sobre rejillas agujereadas con soporte de carbón (Quantifoil 3.1/1) y se sumergieron en etano líquido con un Leica EM-CPC (Leica Microsystems). Las imágenes se tomaron en condiciones de baja dosis por una cámara CCD (“gatan slow scan”, modelo 794) en un criomicroscopio electrónico FEI TecnaiG2 (FEI Company) operando a 200 kV a diferentes aumentos.

5.1.3. Experimentos de centrosomas con pinzas ópticas

Después de realizar varios ensayos, se optó por utilizar la geometría de trampa de doble haz para los experimentos control con microesferas de poliestireno y para los experimentos de determinación de tamaño con centrosomas individuales. Sin embargo, se utilizó una trampa de un solo haz para las medidas eléctricas de centrosomas individuales con el fin de incrementar la sensibilidad en fuerza del transductor óptico en el rango del sub-piconewton. La potencia sobre el espécimen biológico se mantuvo constante a ~ 70 mW o ~ 140 mW (geometría de un solo haz o dos láseres enfrentados, respectivamente). Al diseño estándar de cámara de fluidos (Fig. 2.13) se añadió un canal dispensador que conectaba el canal central con una jeringa que contenía los centrosomas, para poder fluirlos directamente y optimizar la muestra.

Una cuestión sustancial de este trabajo correspondía a la certeza de estar manipulando un solo centrosoma cada vez. Los centrosomas en solución eran seguidos en tiempo real por videomicroscopía y a consecuencia de su carga (como se

describirá en los Resultados) no aparecían formando agregados. Además, la tarjeta de audio conectada a los pre-amplificadores de los detectores hacía que se emitiera sonido por los altavoces cada vez que un espécimen caía en la trampa óptica (véase la Sección 2.6). Este sistema ha resultado muy práctico para controlar la manipulación de uno o más centrosomas durante los experimentos. Aun así, para descartar cualquier dato experimental que pudiera haber sido tomado con más de un centrosoma, se utilizó el análisis de tamaño. La detección de este tipo de sucesos con este análisis es posible porque los tamaños medidos de varios centrosomas atrapados aparecen, aproximadamente, como múltiplos de la media de la distribución de tamaños de un solo centrosoma. En este sentido, se realizó la estadística en profundidad de sucesos de atrapamiento de dos centrosomas. Estos experimentos muestran que la distribución de tamaños obtenida tenía su pico, aproximadamente, al doble del diámetro respecto a los sucesos de atrapamiento de un único centrosoma. Asimismo, se atraparon unos cuantos agregados de más de dos centrosomas para confirmar la progresión múltiple de estas estadísticas, aun cuando estos agregados se pueden identificar claramente por videomicroscopía y descartar para el estudio. Las impurezas de cromatina—que a veces se arrastran en el proceso de purificación (Lange et al., 2005)—eran escasas y mostraban una desviación de tamaño continua de la media de la distribución del centrosoma. Además, se podían distinguir de los centrosomas en solución acuosa, por videomicroscopía en tiempo real, por su ausencia aparente de una estructura compacta y patrones brownianos reproducibles en movimiento y morfología.

5.1.4. Medidas de la fuerza eléctrica

Para los experimentos de fuerza eléctrica fue necesario realizar modificaciones en la cámara de fluidos utilizada habitualmente (Fig. 2.13). En particular, se cambió el diseño para acomodar dos cables de tungsteno cubiertos de oro de 25 μm de grosor (Luma-Metall) separados 1-2 mm. Los cables de los electrodos fueron insertados en el canal central y fijados entre las dos láminas de Nescofilm a través de tubos de vidrio para controlar la separación y el paralelismo entre los cables (véase la Fig. 5.4 (B)). La posición de atrapamiento de las microesferas o centrosomas se mantuvo equidistante con respecto a los dos electrodos.

Para estudiar el efecto sobre el centrosoma atrapado se aplicaron pulsos tipo onda cuadrada de 3-5 V. La magnitud del voltaje y la frecuencia de pulsos se eligieron para prevenir la electrólisis del tampón y las consiguientes corrientes del fluido debido a la diferencia de presión generada por la formación de burbujas.

5.1.5. Soluciones tampón y microesferas de referencia

El tamaño del centrosoma en condiciones fisiológicas se determinó en el tampón BRB80 (80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, pH 6.8). Para estudiar el efecto del calcio, se usó un tampón con 80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , pH 6.8. Las propiedades eléctricas del centrosoma y los tamaños asociados a diferentes valores de pH fueron medidos en una variedad de tampones con concentraciones diluidas de las soluciones *stock*. Esta condición era deseable para disminuir la fuerza iónica de las soluciones y así evitar el fuerte apantallamiento eléctrico que podría dificultar la respuesta eléctrica observable, y para disminuir la conductividad de las soluciones y así evitar la formación de burbujas debido a la electrólisis. Para las medidas eléctricas, se utilizó tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) para pH 8.19, con conductividad $\sigma = 2.360$ mS/cm y fuerza iónica 96 mM. Se prepararon tampones acetato a pH 2.92, 3.10, 3.13 y 3.64, con $\sigma = 0.450$, 0.413, 0.399 y 0.655 mS/cm y fuerza iónica de 96.43, 100, 100 y 100 mM, respectivamente, neutralizando acetato sódico con ácido acético. Finalmente, el tampón a pH 2.66 con $\sigma = 2.050$ mS/cm y fuerza iónica 12.12 mM se obtuvo neutralizando cloruro potásico con ácido clorhídrico. Cuando se utilizó agua desionizada (agua del sistema de purificación Milli-Q (Millipore), con conductividad 5.5×10^{-5} mS/cm a 25°C) a pH 7.60, la conductividad se incrementó por la presencia de tampón fosfato salino (PBS) en experimentos con microesferas (es el tampón óptimo de conservación de las microesferas), o tampón BRB80 en experimentos con centrosomas, hasta valores finales de 0.0822 y 0.0535 mS/cm y fuerza iónica de 0.0765 y 1.7 mM.

Como referencia en los experimentos de tamaño, se usó una variedad de microesferas, en particular, microesferas de poliestireno de 0.53 y 3.18 μm de diámetro y microesferas de poliestireno cubiertas de estreptavidina de 2.10 μm de diámetro, todas ellas compradas a Spherotech. Como referencia para las medidas de las propiedades eléctricas del centrosoma, se utilizaron microesferas cubiertas de estreptavidina de 2.10 μm . Se caracterizó su comportamiento eléctrico midiendo su movilidad electroforética en cada tampón usado y se confirmó la concordancia con el valor de pI determinado anteriormente para monocapas de estreptavidina en superficie (Sivasankar et al., 1998).

5.1.6. Análisis de tamaño hidrodinámico

a. Determinación del tamaño por la ley de Stokes

La fuerza requerida para arrastrar un pequeño objeto inmerso en un fluido viene descrita por la ley de Stokes (en módulo),

$$F = \gamma v \quad (5.1)$$

donde γ es el coeficiente de fricción del objeto y v es su velocidad en relación con la del fluido. Si se asume que, en promedio, la morfología del centrosoma de embriones tempranos de *Drosophila* es esférica, entonces

$$\gamma = 3\pi d\eta \quad (5.2)$$

donde d es el diámetro hidrodinámico o de Stokes del objeto y η es la viscosidad del medio. Para obtener d , se generaron diferentes velocidades de flujo moviendo manualmente la cámara de fluidos hacia delante y hacia atrás en el eje x , por medio de una plataforma de traslación piezoeléctrica, mientras el objeto se mantenía en la trampa óptica y las fuerzas de arrastre resultantes eran registradas en la dirección x . La velocidad de la cámara se registró determinando distancias por medio de un sensor LVDT (Sección 2.5) y tiempos con el reloj incorporado a la tarjeta de adquisición de datos del ordenador. Si se asume que la viscosidad del tampón es igual a la del agua a 25°C, es decir, $\eta_{\text{agua}} = 0.894 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, d se puede recuperar de la regresión lineal de los datos de fuerza *versus* velocidad utilizando las Ecs. (5.1) y (5.2).

b. Determinación del tamaño por ruido térmico

La densidad espectral de potencia en equilibrio de las fluctuaciones de la fuerza de una partícula amortiguada en un potencial armónico viene dada por (Wang y Uhlenbeck, 1945; Berg-Sorensen y Flyvbjerg, 2004; Mao et al., 2005) (Véase el origen de la expresión en el Anexo A.1):

$$\langle \Delta F^2(f) \rangle_{eq} = 2\gamma k_B T \frac{f_c^2}{f^2 + f_c^2} \quad (5.3)$$

en unidades de fuerza al cuadrado por frecuencia, donde $\langle \dots \rangle$ representa el promedio sobre colectividades, $f_c = \kappa/2\pi\gamma$ es la llamada frecuencia *corner*, γ es el coeficiente de fricción de la partícula, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, κ es la constante de recuperación óptica en la trampa láser y f es la frecuencia de muestreo en hercios. Se derivó el diámetro, d , del centrosoma a partir del coeficiente de fricción asumiendo una forma esférica en promedio. Con este propósito, se midió una señal de voltaje proporcional a la fuerza ejercida por las fluctuaciones térmicas sobre un centrosoma atrapado en intervalos de 5.24 s a 100 kHz. El intervalo de tiempo se separó entonces en 128 partes de 40.96 ms. A continuación, se hizo la transformada de Fourier en el dominio temporal $(-\infty, +\infty)$ de las fluctuaciones de la fuerza (en unidades de voltaje) en cada intervalo y se promedió sobre 128 muestras. Los datos resultantes, en unidades de voltaje al cuadrado por frecuencia, se ajustaron a la Ec. (5.3) para obtener el coeficiente de fricción del centrosoma, γ_{cs} . El mismo procedimiento se usó para obtener el coeficiente de fricción de microesferas de poliestireno de diámetro conocido, γ_{esfera} . Para dar d en las unidades habituales, se calibró el tamaño de los centrosomas, d_{cs} , de esta forma medido, en relación con el de

las microesferas de referencia, d_{esfera} , a partir del cociente de los coeficientes de fricción:

$$d_{cs} = d_{esfera} \cdot \frac{\gamma_{cs}}{\gamma_{esfera}} \quad (5.4)$$

5.1.7. Movilidad electroforética de microesferas de estreptavidina

Se caracterizó la movilidad electroforética de las microesferas de poliestireno de 2.10 μm cubiertas de estreptavidina que fueron utilizadas como referencia en las medidas eléctricas. Para ello, se usó un instrumento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instrument). Con esta técnica se mide el potencial zeta—que determina las interacciones eléctricas del espécimen—de dispersiones de partículas, emulsiones o biomoléculas en solución. No proporciona, sin embargo, una medida directa de la carga superficial del espécimen, sino de la carga en el plano de corte (*shear/slipping plane*, en inglés), una superficie imaginaria que separa la fase de iones condensados alrededor de la partícula (y que se mueven con movimiento browniano con ella) del resto de la solución. El potencial zeta se mide aplicando un campo eléctrico a través de la dispersión. Las partículas con potencial zeta migrarán hacia el electrodo de carga opuesta con una velocidad proporcional a la magnitud de este potencial. La velocidad se mide por efecto Doppler: el desplazamiento de la frecuencia o la fase de un haz láser incidente causado por las partículas en movimiento se registra como la movilidad de las partículas, y esta movilidad se convierte en potencial zeta aplicando las teorías de Smoluchowski o Huckel. Para la caracterización de las microesferas control se midió la velocidad de las partículas a partir del análisis de la fase, utilizando la técnica M3-PALS (*Phase Analysis Light Scattering*) en varios tampones con diferente pH.

5.1.8. Determinación de la carga eléctrica

Una partícula inmersa en un campo eléctrico está sujeta a una fuerza, F , proporcional a su carga neta, q , de acuerdo con: $F = qE$; donde E es el campo eléctrico efectivo aplicado al espécimen en la solución. Utilizando la ley de Ohm, el campo eléctrico se puede expresar en términos de la corriente eléctrica en la solución, I , su conductividad, σ , y del área del electrodo, S : $F = qI/\sigma S$. Esta ecuación no tiene en cuenta efectos de retardo (van den Heuvel et al., 2007). En los experimentos realizados, se aplicaron voltajes constantes de unos pocos voltios que generaban campos eléctricos de magnitud $\sim 10^3$ V/m. Utilizando esta ecuación, se derivó la carga de las microesferas cubiertas de estreptavidina y los centrosomas a diferente pH. La fabricación de la cámara de fluidos y la geometría de los electrodos puede influir en la uniformidad y homogeneidad del campo eléctrico y, consecuentemente, en las estimaciones de la carga efectiva así calculada. Asimismo, para cubrir un amplio rango de pH, las cargas efectivas se midieron en tampones preparados con diferentes

especies químicas, difiriendo así en fuerza iónica y conductividad. Por lo tanto, las cargas efectivas medidas están influenciadas también por un apantallamiento eléctrico diferente.

5.2. Resultados

Los centrosomas de embriones tempranos de *Drosophila* (Moritz et al., 1995; Gonzalez et al., 1998; Lange et al., 2005) se fluyeron a una velocidad controlada dentro de la cámara de fluidos. Se atraparon centrosomas individuales en diferentes soluciones tamponadas por medio del sistema de pinzas ópticas de doble haz descrito en el Capítulo 2. Conviene recordar que este aparato da una medida directa de la fuerza ejercida sobre un espécimen atrapado a partir del cambio de flujo de momento en los haces de luz de atrapamiento causado por su interacción con el espécimen. Ya que este método no está basado en la constante de recuperación de la trampa, la calibración de la fuerza es independiente del tamaño, forma o índice de refracción de la partícula; la viscosidad o índice de refracción del tampón; y las variaciones en la potencia del láser (Smith et al., 2003). Los centrosomas, cuyo tamaño es comparable con las longitudes de onda ópticas, se vuelven perceptibles en el tampón por videomicroscopía debido a su movimiento browniano. El análisis posterior de tamaño hace posible distinguir entre las medidas correspondientes al atrapamiento de uno o varios centrosomas, de manera que estas últimas se pueden descartar del conjunto de datos experimentales. En estos experimentos, un centrosoma individual permanecía atrapado establemente en una trampa de un solo haz o dos haces enfrentados con baja AN cuando las fuerzas externas no excedían de ~ 10 pN y ~ 20 pN, respectivamente. Este hecho demuestra que el centrosoma es un espécimen biológico con una constante dieléctrica considerable a frecuencias ópticas. Esto es consistente con tener una concentración de tubulina muy alta (Lange y Gull, 1996) puesto que este complejo dimérico tiene una elevada constante dieléctrica (Mershin et al., 2004).

5.2.1. Comportamiento hidrodinámico

Se ha podido investigar el comportamiento hidrodinámico de los centrosomas a partir de la manipulación óptica de especímenes individuales en diferentes condiciones de tampón. Una caracterización de este tipo, no realizada hasta la fecha, es importante porque el centrosoma carece de membrana que delimite su extensión. Se ha inferido el tamaño de cada espécimen en condiciones fisiológicas (esto es, en las condiciones del tampón BRB80, con pH 6.8 fisiológico y 1 mM $MgCl_2$, que hacen al centrosoma funcional *in vitro*) a partir de medidas de su coeficiente de fricción por medio de dos métodos independientes, a saber, la ley de Stokes y el análisis del espectro de las fluctuaciones térmicas de la fuerza (Sección 5.1.6). Como control, también se realizaron estos experimentos con una variedad de micropartículas de poliestireno de diámetro conocido. La Fig. 5.1, (A) y (B), ilustra el uso de la ley de Stokes y el análisis de las fluctuaciones térmicas del centrosoma sujeto ópticamente,

respectivamente, y muestra el rango de distancias sobre el que el centrosoma es desplazado en cada método. El centrosoma de un embrión temprano de *Drosophila* tiene forma global esférica debido a su abundante MPC (Lange et al., 2005) y, consecuentemente, constituye un buen modelo para la caracterización hidrodinámica de este orgánulo. Además, la acción de las fluctuaciones térmicas sobre el MPC difusivo en solución acuosa promedia los detalles moleculares a este nivel dinámico de resolución. El tamaño fisiológico así obtenido para cada centrosoma es independiente de la orientación y, por lo tanto, se puede comparar con anteriores caracterizaciones de microscopía electrónica (ME) realizadas, por contra, en condiciones de deshidratación (Lange et al., 2005).

La Fig. 5.1, (C) y (D), compara los datos de fuerza *versus* velocidad y las densidades de potencia espectral, respectivamente, de un centrosoma individual y de una microesfera de poliestireno de 2.10 μm de diámetro, atrapados dentro de la cámara de fluidos a temperatura ambiente. Puesto que los especímenes fueron atrapados a más de 80 μm de distancia de las superficies de la microcámara de fluidos (es decir, a una distancia igual a ~ 20 veces el diámetro de la microesfera de 2.10 μm), los efectos de las paredes son despreciables. Para el método de la ley de Stokes (Fig. 5.1 (C)), se aplicaron velocidades de arrastre bajas al centrosoma con el fin de evitar desviaciones de la linealidad en el gráfico de fuerza-velocidad que pudieran surgir de las deformaciones del orgánulo. Como se mencionó antes, se mantuvo una AN de haz baja (~ 0.5) en el instrumento de pinzas ópticas para ejercer gradientes de fuerza transversal débiles sobre el espécimen biológico (véase la justificación del uso de haces de baja AN en el Anexo A.2). Además, este diseño facilita la difusión de traslación y rotación del centrosoma, y permite el proceso de auto-promediado en el tamaño medido que se mencionó anteriormente. En el método del análisis térmico (Fig. 5.1 (D)), las curvas del espectro que corresponden al centrosoma y a la microesfera se diferencian tanto en la altura sobre el eje de ordenadas como en la longitud del gráfico en escala doblemente logarítmica debido a sus diferentes propiedades de fricción y ópticas, respectivamente. Estos dos parámetros se obtienen de los ajustes de la ecuación de la densidad espectral de potencia (Ec. 5.3). Como se explicó anteriormente, el primer parámetro es proporcional al coeficiente de fricción del espécimen atrapado y, el segundo, que no se usa en esta tesis, está establecido por la llamada frecuencia *corner*. Así pues, es importante señalar que la determinación de tamaños solo depende de las medidas del coeficiente de fricción del espécimen atrapado, y este parámetro depende exclusivamente de la forma (geometría) de la partícula y la viscosidad del medio.

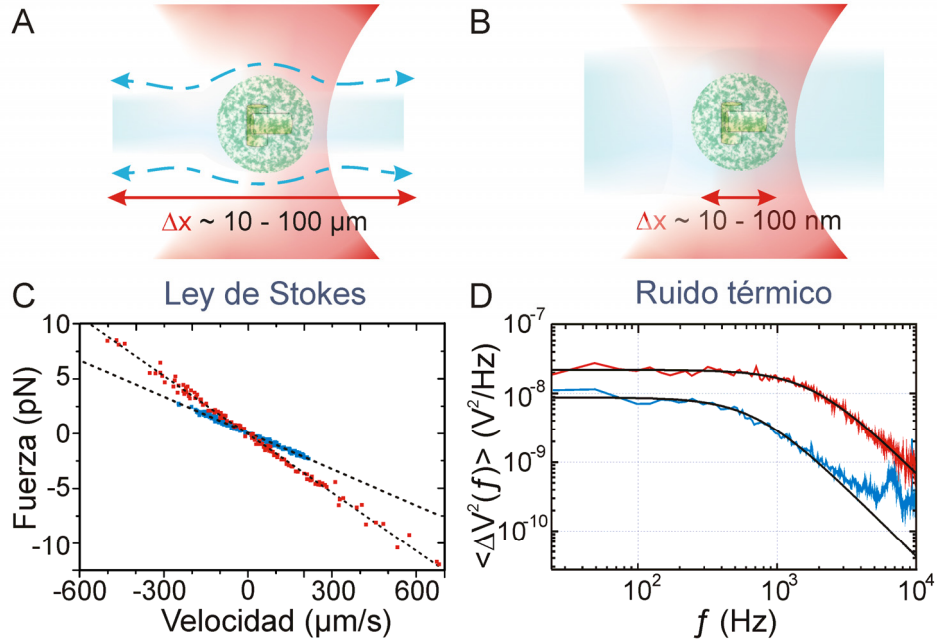


Figura 5.1 | Análisis hidrodinámico de centrosomas individuales de *Drosophila* en condiciones fisiológicas. Se usaron dos aproximaciones: **(A)** la ley de Stokes y **(B)** el análisis del ruido térmico. Los dibujos muestran además el rango de los desplazamientos de cada método. **(C)** Datos de fuerza *versus* velocidad para un centrosoma en tampón BRB80 (puntos azules) y una microesfera de poliestireno de 2.10 μm en agua desionizada (puntos rojos). Las líneas negras punteadas son regresiones lineales. Los diámetros inferidos para el centrosoma y la microesfera de 2.10 μm de esta gráfica según las Ecs. (5.1) y (5.2) son 1.31 ± 0.01 y 2.10 ± 0.01 μm , respectivamente. **(D)** Distribución de la densidad espectral de potencia de las fluctuaciones de la fuerza para un centrosoma en tampón BRB80 (línea azul) y una microesfera de poliestireno de 2.10 μm en agua desionizada (línea roja). Las unidades son voltios al cuadrado por hercio (V^2/Hz) puesto que medimos un voltaje proporcional a la fuerza fluctuante. Solo se miden las fluctuaciones en la dirección horizontal. Las curvas negras son ajustes a la función de la densidad espectral de potencia mostrada en la Ec. (5.3). A bajas y altas frecuencias, el ruido electrónico puede sumarse a las fluctuaciones térmicas, y causar desviaciones del espectro esperado. La frecuencia *corner* para el centrosoma y la microesfera de 2.10 μm de esta gráfica son 693 ± 13 Hz y 1795 ± 16 Hz, respectivamente, y los diámetros correspondientes son 0.87 ± 0.01 y 2.14 ± 0.01 μm . Estas medidas fueron tomadas con las pinzas ópticas de doble haz, con cada láser de diodo trabajando a 200 mW y longitud de onda de 835 nm.

a. Tamaño hidrodinámico de microesferas de poliestireno

Para confirmar la precisión de los dos métodos de determinación de tamaño, se analizó primero el diámetro de tres clases de microesferas de poliestireno de tamaño y desviación estándar (DE) conocidos, a saber, 0.530 ± 0.013 , 2.100 ± 0.051 y

3.180 μm (el fabricante no proporcionó la DE de estas últimas). Se tomaron medidas sobre diez microesferas individuales de la misma clase de tamaño con el fin de cancelar las desviaciones medias provenientes del proceso de fabricación o de las fluctuaciones de la potencia del láser en las medidas. Ambos métodos mostraron buena coincidencia entre sí y también con la información del fabricante (Spherotech). Esta empresa mide el tamaño de sus microesferas fabricadas utilizando dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*, NICOMP Laser Particle Sizer) o ME de barrido. Los resultados de tamaño de microesferas mostrados a continuación, con la ley de Stokes y con el análisis del ruido térmico, se obtuvieron en agua desionizada, aunque también se realizaron medidas en las soluciones tamponadas utilizadas en el resto del trabajo, y no se encontró ningún cambio significativo. El diámetro de Stokes y las DE obtenidos para las tres clases de microesferas son 0.53 ± 0.04 , 2.08 ± 0.06 y 3.16 ± 0.11 μm , respectivamente. Los tamaños determinados por el ruido térmico son 0.50 ± 0.02 , 2.16 ± 0.13 y 3.13 ± 0.19 μm , respectivamente.

b. Tamaño hidrodinámico de centrosomas

La Fig. 5.2 muestra la distribución de tamaños de los centrosomas de embriones tempranos de *Drosophila* medidos por los dos métodos referidos a partir de especímenes manipulados individualmente. Un suceso de manipulación múltiple de centrosomas se puede detectar porque el tamaño del agregado resultante aparece aproximadamente como un múltiplo de la media de la distribución. Los dos métodos empleados proporcionan diámetros promedio para el centrosoma que son considerablemente mayores que el diámetro promedio de ME (0.75 μm (Moritz et al., 1995; Lange et al., 2005); véase también la Fig. 5.3), y revelan efectos hidrodinámicos subyacentes. El diámetro de Stokes promedio es 1.21 ± 0.36 μm (~60% mayor que el diámetro de ME), mientras que diámetro del análisis del ruido térmico es 0.95 ± 0.20 μm (~30% mayor que el diámetro de ME). También es interesante señalar que los diámetros hidrodinámicos medidos por los dos métodos difieren. Una regresión lineal del tamaño medido por ambos métodos (0.83, coeficiente de correlación) confirma que el diámetro de Stokes es 1.3 veces mayor que el diámetro derivado del ruido térmico (Fig. 5.2 (E)). Por el contrario, como se ha mencionado ya, no se han observado diferencias de tamaño para las partículas compactas y sólidas utilizadas como referencia, lo que indica que la estructura global del centrosoma es flexible y difusiva en solución tamponada. En particular, aunque ambos métodos deducen el diámetro de la misma magnitud física (γ), el rango de distancias en el que el espécimen es desplazado es diferente, e influye tanto sobre la estructura como sobre el tamaño del centrosoma. En el método de la ley de Stokes, el centrosoma entero es arrastrado a lo largo de distancias de varios micrómetros (Fig. 5.1 (A)), mientras que en el método del ruido térmico, el centrosoma describe fluctuaciones de la posición más pequeñas, en el rango del nanómetro dentro de su entorno hidrodinámico (Fig. 5.1 (B)). Por otro lado, no se considera que las orientaciones transitorias o preferentes de la muestra biológica dentro de la trampa

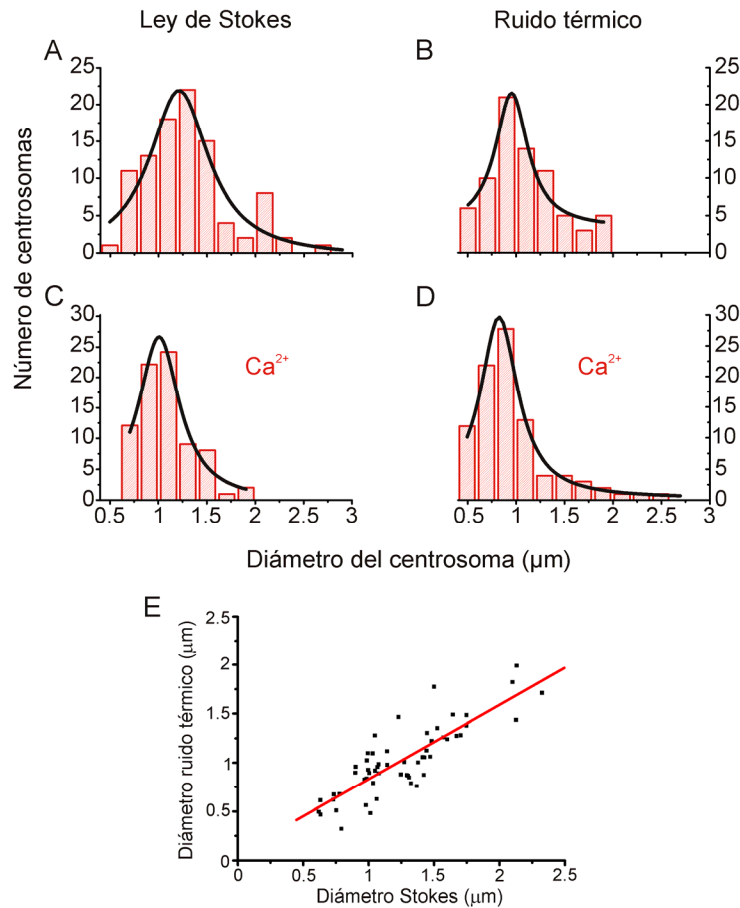


Figura 5.2 | Tamaño hidrodinámico de centrosomas de *Drosophila* en condiciones fisiológicas. Fila superior: Distribuciones de tamaño en BRB80 medidas por (A) la ley de Stokes ($n = 97$) y (B) el análisis del ruido térmico ($n = 75$). Fila inferior: Distribuciones de tamaño en BRB80 con 5 mM CaCl_2 y sin EGTA, medidas por (C) la ley de Stokes ($n = 78$) y (D) el análisis del ruido térmico ($n = 91$). Las líneas negras son ajustes a la distribución de Lorentz. La heterogeneidad de tamaños en la población del centrosoma puede reflejar la progresión en el ciclo nuclear o la pérdida o ganancia de MPC a lo largo del procedimiento de purificación de centrosomas (Lange et al., 2005). (E) Relación entre el diámetro medido por la ley de Stokes y el análisis del ruido térmico de 57 centrosomas diferentes en tampón BRB80. El ajuste lineal de la distribución da una relación entre tamaños de $d_{\text{Stokes}}/d_{\text{ruido}} = 1.3$.

sea un factor sustancial, puesto que los centrosomas de embriones tempranos de *Drosophila* poseen simetría esférica global. Además, no se han encontrado discrepancias de tamaño más allá de los márgenes del error experimental cuando el

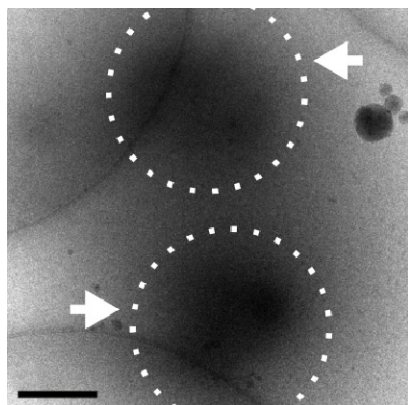


Figura 5.3 | Imagen de crío-ME de baja resolución de dos centrosomas individuales de *Drosophila*. Los dos centrosomas están señalados por flechas blancas y encerrados en sendos círculos de líneas punteadas que marcan los límites aproximados de su extensión. Barra: 0.5 μm . Nótese que el tamaño de estos dos centrosomas de la muestra es consistente con un diámetro medio de 0.75 μm , como se ha descrito anteriormente (Lange et al., 2005). La forma esférica, sin embargo, no se aprecia aquí por el bajo nivel de resolución. Imágenes de ME de alta resolución de este tipo de centrosomas se pueden encontrar en el anterior trabajo citado (Lange et al., 2005).

tamaño de cada centrosoma individual es medido con el método del ruido térmico en dos direcciones mutuamente ortogonales, transversales al flujo de fotones.

Debido a la naturaleza difusiva del MPC, los resultados obtenidos sugieren que el entorno hidrodinámico del centrosoma comprende no solo moléculas de agua y contraiones condensados, los cuales rodean cualquier estructura cargada en solución sino que, principalmente, consiste en fibrillas de naturaleza proteica pertenecientes a la parte más externa de la matriz pericentriolar (llamemos a este entorno hidrodinámico “entorno del MPC”). Así pues, el tamaño efectivo medido por el método del ruido térmico es solo el de un núcleo más denso, térmicamente fluctuante (de aquí en adelante referido como “núcleo centriolar”), constituido por los centriolos y la matriz pericentriolar proximal (sin el entorno del MPC).

La organización del centrosoma, tal y como se ha descrito por EM, varía en presencia de cationes divalentes (Paintrand et al., 1992; Baron et al., 1994). En particular, se ha mostrado que los iones Ca^{2+} contraen la estructura global del centrosoma de la línea celular humana de linfoblastoma KE37, un proceso que atañe a la estructura del centriolo y el MPC (Paintrand et al., 1992). Para seguir este efecto en condiciones fisiológicas, se ha utilizado la misma aproximación de orgánulo individual, esta vez con centrosomas de embriones de *Drosophila* en BRB80 con 5 mM CaCl_2 y sin EGTA. Las distribuciones de tamaño resultantes, mostradas en la Fig. 5.2, (C) y (D), están desplazadas hacia diámetros más cortos, y confirman una contracción fisiológica. El diámetro medio es $1.00 \pm 0.25 \mu\text{m}$ (reducción del 20%) según se mide por el método de la ley de Stokes, y $0.83 \pm 0.24 \mu\text{m}$ (reducción del 13%) por el análisis del ruido térmico, lo que indica que los iones Ca^{2+} tienen efectos diferentes sobre los dos dominios hidrodinámicos del centrosoma. Específicamente, el

calcio tiene una influencia mayor sobre el dominio del núcleo centriolar que sobre el entorno del MPC. Esto está de acuerdo con una disminución en la distancia intercentriolar en presencia de Ca^{2+} descrita en la literatura (Paintrand et al., 1992).

5.2.2. Comportamiento eléctrico

a. Movilidad electroforética de microesferas control

Previamente a los experimentos eléctricos con especímenes individuales, se realizó la caracterización volumétrica de la movilidad de las microesferas de $2.10\ \mu\text{m}$ cubiertas de estreptavidina usadas como control. La movilidad electroforética, que se define como el cociente entre la velocidad de las microesferas y el campo eléctrico aplicado, es proporcional (y del mismo signo) a la carga de la partícula en el plano de corte. La Tabla 5.1 muestra los resultados de la movilidad en unidades de $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$, de las microesferas control en varios tampones con pH y conductividad diferentes obtenidos con un instrumento Zetasizer Nano-ZS. Los resultados son consistentes con los de Sivasankar *et al.* (1998) quienes mostraron que monocapas de estreptavidina en superficie tienen un pI de 5-5.5, diferente del de la molécula de estreptavidina en solución, que es 6.3. Se observan aquí valores de movilidad negativa en pH 6.3 (agua desionizada), 6.8 (BRB80) y 8.3 (TAE), que indican carga eléctrica negativa en el plano de corte de las microesferas, y movilidad positiva en pH 3.10 (tampón acetato), que indica carga eléctrica positiva en el plano de corte.

Tampón	pH	σ (mS/cm)	Fuerza iónica (mM)	Movilidad ($\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$)
Acetato	3.10	0.413	100	3.5 ± 0.1
H ₂ O	6.3	0.0822	0.0765	-2.56 ± 0.09
BRB80	6.8	10.36	340	-0.45 ± 0.05
TAE	8.3	2.360	96	-0.57 ± 0.05

Tabla 5.1 | Movilidad electroforética de microesferas de poliestireno de $2.10\ \mu\text{m}$ cubiertas de estreptavidina. Nótese que los tampones empleados tenían diferente fuerza iónica y conductividad, lo que producían apantallamiento eléctrico diferente.

b. Carga y punto isoeléctrico del centrosoma

Puesto que las pinzas ópticas también son capaces de sentir fuerzas ultra-pequeñas, del orden del piconewton, se han utilizado para analizar las propiedades eléctricas de especímenes aislados en diferentes ambientes. Con este método, el análisis se puede realizar con cantidades bajas de muestras purificadas, algo que puede limitar otros métodos electroforéticos (como el mencionado en el apartado anterior). Además, las señales de la fuerza de centrosomas individuales causada por

un campo eléctrico no se confunden por la presencia simultánea de otros especímenes o por la dinámica estocástica que surge de efectos de aglomeración. Como se detalla en la Sección 5.1.4, se ensamblaron dos cables que hacen de electrodos, de $25\ \mu\text{m}$ de grosor, dentro de la cámara de fluidos y se conectaron a una fuente de alimentación. Los especímenes se atraparon a mitad de distancia de ambos electrodos, como se muestra en la Fig. 5.4.

Se aplicaron pulsos de voltaje constante de unos pocos voltios encendiendo y apagando la fuente de alimentación en intervalos de $\sim 1\ \text{s}$ (esto es, a $\sim 1\ \text{Hz}$ de frecuencia) y promediando las medidas simultáneas de la fuerza ejercida sobre especímenes individuales en presencia del campo eléctrico durante $17\ \text{ms}$ ($\sim 60\ \text{Hz}$).

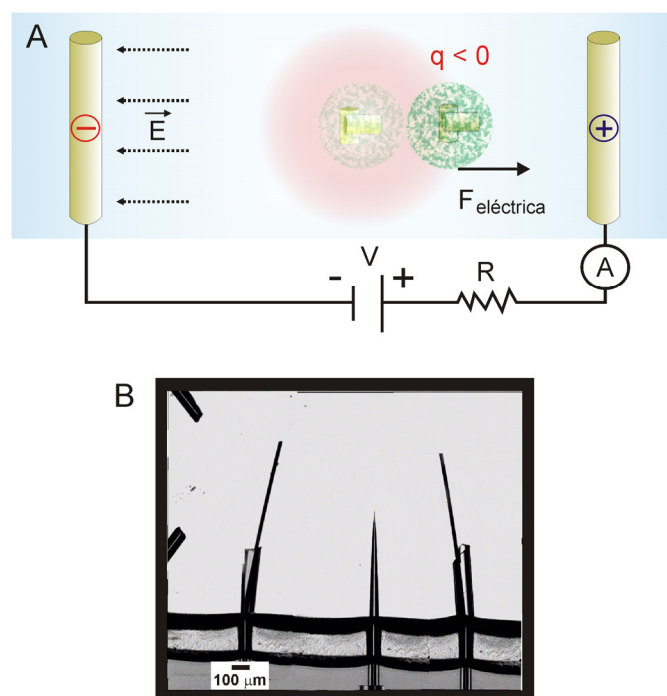


Figura 5.4 | Configuración experimental para la medida de la fuerza eléctrica. **(A)** Esquema ilustrativo de los elementos básicos. Un único centrosoma mantenido en la trampa óptica es desplazado del centro del foco común de los láseres (halo rojo; nótese que el camino de la luz es perpendicular al plano del dibujo) debido al campo eléctrico, E , entre los dos electrodos (cilindros dorados). La configuración del circuito es tal que una fuerza positiva ($F_{\text{eléctrica}}$) hacia el ánodo implica un espécimen cargado negativamente. Los elementos básicos del circuito eléctrico son una fuente de potencial (V), un amperímetro (A) y una resistencia ($R = 1\ \text{k}\Omega$). El esquema no está hecho a escala. **(B)** Fotografía real de una cámara con electrodos adquirida con un microscopio con aumento 5x. Además de los dos electrodos, se distinguen también dos tubos dispensadores, a la izquierda, y la micropipeta, en el centro.

Esta última frecuencia está por debajo de la frecuencia *corner* del espécimen en la trampa óptica, lo que mantiene el ruido browniano de baja frecuencia, y muy por encima de la frecuencia de estimulación, lo que permite la detección de la respuesta con resolución temporal suficiente. Un corte a 60 Hz suaviza el conjunto de datos de la fuerza filtrando todas las altas frecuencias del ruido de fondo, como el ruido electrónico de alta frecuencia. El esquema del circuito es tal que una fuerza positiva implica un espécimen cargado negativamente, que se mueve hacia el ánodo desde su posición de reposo en la trampa óptica.

La Fig. 5.5 (columna izquierda) muestra experimentos de centrosomas individuales en diferentes tampones que cubren un amplio rango de valores de pH. Como control, también se examinaron microesferas de poliestireno de 2.10 μm de diámetro, cubiertas de estreptavidina y cuyo comportamiento electroforético se conocía (Fig. 5.5, columna derecha). Los campos eléctricos en soluciones con fuerza iónica alta están sujetos a fuerte atenuación por el apantallamiento de los contraiones y, por lo tanto, su magnitud decrece muy rápidamente a lo largo de una distancia igual a varias longitudes de Debye (la longitud de Debye es una estimación de la distancia a partir de la cual una carga queda apantallada por otras de signo opuesto, dejando de tener efectos apreciables para el resto). Así pues, se usaron tampones de baja fuerza iónica para aumentar el contraste de la respuesta eléctrica respecto al ruido de fondo. A este respecto, el apantallamiento eléctrico sobre centrosomas y microesferas en BRB80 impedía observar la señal de fuerza por debajo de la resolución del instrumento (0.1 pN) (Smith et al., 2003). Por el contrario, la señal en agua desionizada—el caso de fuerza iónica más baja—la señal de la fuerza se distingue fácilmente de las rápidas oscilaciones de fondo que surgen del ruido térmico e instrumental. Los resultados para las microesferas cubiertas de estreptavidina muestran un cambio en el signo de la fuerza conforme a los valores de pI descritos anteriormente para monocapas de estreptavidina en superficie (esto es, pI = 5-5.5 (Sivasankar et al., 1998)) y conforme a la caracterización adicional de la movilidad volumétrica del apartado anterior. Con respecto al centrosoma, todos los especímenes individuales probados en tampones con $\text{pH} \geq 3.13$ experimentaban una fuerza positiva (carga negativa), mientras que en aquellos con $\text{pH} \leq 2.92$, la fuerza era siempre negativa (carga positiva). Alrededor de pH 3.10, la carga era pequeña y su signo difería de centrosoma a centrosoma. Por tanto, estos experimentos marcan la isoelectricidad del centrosoma de *Drosophila* en la región de $\text{pH } 3.1 \pm 0.1$.

En la Tabla 5.2 se muestran las estimaciones de la carga efectiva del centrosoma y la correspondiente al plano de corte de las microesferas cubiertas de estreptavidina usadas como referencia (Wada et al., 2002). Como se esperaba, cerca del pI, el centrosoma se aproxima a la neutralidad, y muestra su carga neta más baja. La neutralidad total del centrosoma alrededor de $\text{pH} \approx 3.1$ también se manifestó por la aparición gradual de agregados de centrosomas en el tampón acetato a este pH. Por el contrario, la carga neta de las microesferas de poliestireno cubiertas de estreptavidina

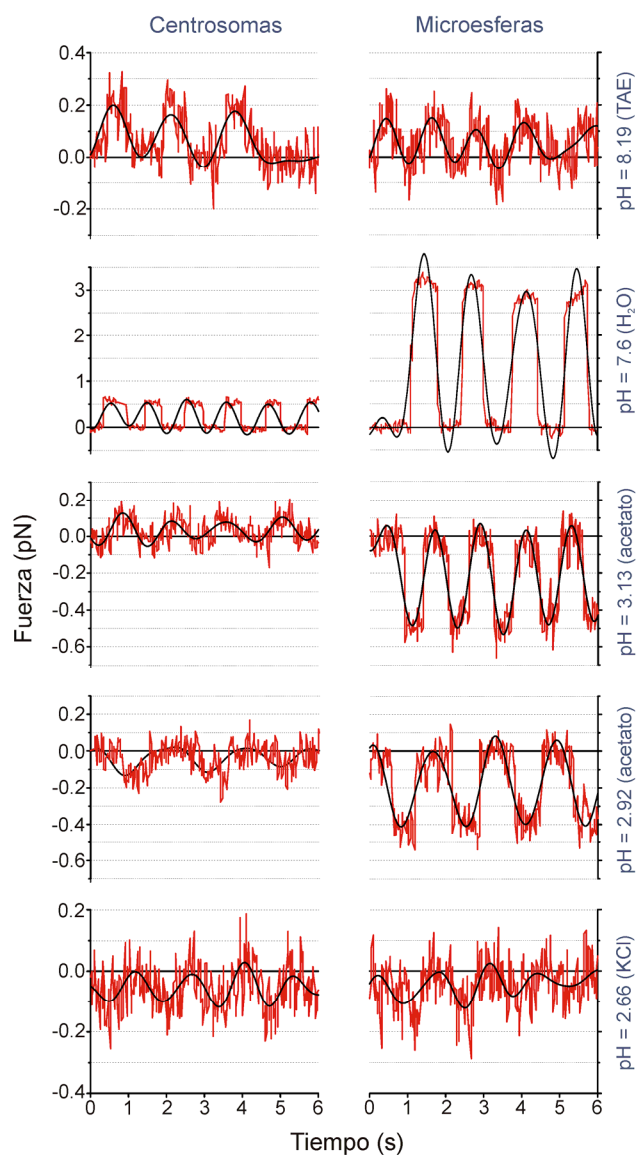


Figura 5.5 | Fuerza eléctrica sobre centrosomas y microesferas control a diferentes condiciones de pH. Centrosomas (columna izquierda) y microesferas cubiertas de estreptavidina de $2.10\ \mu\text{m}$ de diámetro (columna derecha) se sometieron a pulsos de voltaje constante de $\sim 1\ \text{s}$. Conviene puntualizar que la magnitud de la fuerza no depende sólo del pH, sino también de la fuerza iónica y la movilidad de las especies de sal del tampón para un voltaje aplicado determinado. Se utilizaron pulsos de $3.5\ \text{V}$, excepto en agua desionizada ($3.9\ \text{V}$ y $4.3\ \text{V}$ para los experimentos con centrosomas y microesferas, respectivamente), y excepto para los experimentos con microesferas en TAE ($3.1\ \text{V}$). Las líneas negras son filtros pasa bajo de los datos a $1\ \text{Hz}$.

a este pH es mucho mayor porque las moléculas de estreptavidina que recubren las microesferas están lejos de su pI (Sivasankar et al., 1998). En agua desionizada, ambos especímenes exhiben cargas muy grandes debido a que están lejos de sus respectivos pI y en condiciones de baja fuerza iónica y baja conductividad del tampón. Cerca de las condiciones fisiológicas, la densidad de carga superficial del centrosoma es más pequeña que la de los microtúbulos, como se discutirá más tarde.

Tampón	pH	Carga neta (e) [†]		Densidad de carga [‡] (C/m^2)	
		centrosoma	microesfera	centrosoma	microesfera
KCl	2.66	$+9.4 \times 10^2$	$+1.4 \times 10^3$	$+4.4 \times 10^{-5}$	$+1.6 \times 10^{-5}$
Acetato	3.10	$+1.5 \times 10^2$	$+1.6 \times 10^3$	$+1.1 \times 10^{-5}$	$+1.9 \times 10^{-5}$
Acetato	3.13	-4.6×10^2	$+1.5 \times 10^3$	-3.6×10^{-5}	$+1.7 \times 10^{-5}$
H ₂ O	7.60	-5.0×10^3	-1.9×10^4	-2.7×10^{-4}	-2.2×10^{-4}
TAE	8.19	-2.1×10^3	-5.0×10^3	-9.3×10^{-5}	-5.8×10^{-5}

Tabla 5.2 | Carga eléctrica efectiva de centrosomas y microesferas cubiertas de estreptavidina. Las características geométricas de la cámara de fluidos y los electrodos pueden afectar la uniformidad del campo eléctrico. No se tuvieron en cuenta efectos de retardo. Para cubrir un amplio rango de pH, se prepararon tampones de diferentes especies químicas, difiriendo en fuerza iónica y conductividad (Sección 5.1.5). Estos hechos afectan el apantallamiento eléctrico y, consecuentemente, la magnitud de la carga del espécimen desnudo. [†] e es la carga del electrón en valor absoluto, es decir, $+1.6021 \times 10^{-19}$ C. [‡]Estimada teniendo en cuenta el comportamiento del tamaño versus pH del centrosoma de la Fig. 5.6.

5.2.3. Dinámica estructural del centrosoma dependiente de pH

Antes de cada ensayo eléctrico, se obtuvo una medida de tamaño de cada centrosoma por el análisis del ruido térmico. Como se muestra en la Fig. 5.6, un gráfico del tamaño *versus* pH revela que las dimensiones del centrosoma decrecen monótonamente desde pH altos y bajos hasta alcanzar un tamaño mínimo cerca del pH donde el espécimen muestra isoelectricidad. Al modelar ambos decaimientos de tamaño con la tendencia más simple, esto es, lineal con el pH, se obtuvo un diámetro mínimo medio de 0.77 ± 0.15 μm en la intersección. Este valor para el espécimen neutro es muy similar al diámetro medio medido en muestras de ME deshidratadas: 0.75 μm (Lange y Gull, 1996; Lange et al., 2005). La correspondencia entre ambos valores es esperable, puesto que ambas condiciones experimentales no producen influencia eléctrica sobre el centrosoma. Las grandes variaciones de tamaño con el pH observadas para los centrosomas, junto con aquellas discutidas previamente en presencia de Ca^{2+} , no pueden estar generadas únicamente por sucesos de organización de las moléculas de agua y contraiones condensados alrededor de su estructura. Esto

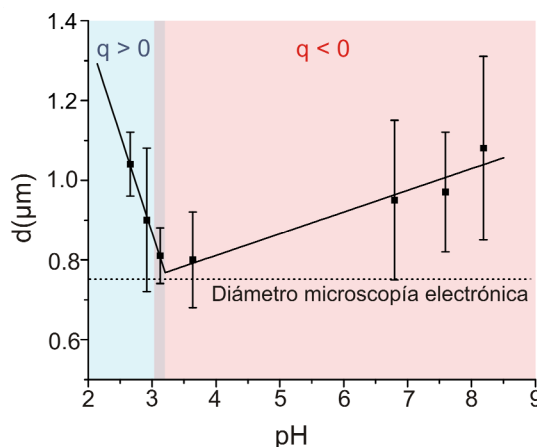


Figura 5.6 | Efecto del pH sobre el tamaño del centrosoma. Los puntos de datos a cada pH representan el valor medio de la distribución de tamaños (poblaciones de 13 a 75 centrosomas, medidos por el método del ruido térmico) y las barras de error son las correspondientes anchuras de las distribuciones a la mitad de la altura máxima. Nótese que se han usado diferentes tampones para cubrir el rango de pH dibujado. Las líneas negras son dos regresiones lineales independientes de los datos de tamaño correspondiente a dos comportamientos eléctricos diferentes del centrosoma con el pH ($q > 0$ y $q < 0$). El fondo rojo indica la región de carga negativa y el azul la región de carga positiva. La barra vertical sombreada delimita la región de isoelectricidad. La línea horizontal punteada marca el tamaño del centrosoma de *Drosophila* determinado por ME (Lange et al., 2005).

es así porque, como en el análisis del efecto del Ca^{2+} , no se apreció ninguna variación de tamaño para las microesferas cubiertas de estreptavidina usadas como referencia en diferentes tampones y pH. Por lo tanto, este resultado sugiere que el campo eléctrico del centrosoma, que prueba estar regulado por el pH, produce una dinámica electrofisiológica y autoestructural que involucra tanto el entorno del MPC como el núcleo centriolar. Las condiciones de purificación y los subsiguientes pasos de manipulación del centrosoma se diseñaron para bloquear la nucleación de microtúbulos. Además, cualquier microtúbulo incipiente que pudiera haber nucleado en la muestra de centrosomas no puede explicar este comportamiento estructural porque su longitud de persistencia es demasiado grande comparada con el tamaño del centrosoma (Van den Heuvel et al., 2008).

Se sabe que existen variaciones en el pH intracelular con el tiempo (ciclo celular) y la posición *in vivo* (Madhus, 1988). Sin embargo, dados los grandes cambios de pH utilizados en este trabajo, se comprobó la reversibilidad de los resultados con el propósito de detectar cualquier daño global al orgánulo en las condiciones ácidas. Para ello, los centrosomas se fluyeron desde el tampón acetato con pH 2.92, en el que según muestra la Fig. 5.6, la carga era positiva y el tamaño era

$0.90 \pm 0.18 \mu\text{m}$, dentro de una cámara de fluidos llena con TAE a pH 8.19, donde la carga es negativa y el tamaño es $1.08 \pm 0.23 \mu\text{m}$. Se ha encontrado que el comportamiento de carga negativa se recuperaba y que, durante los pocos segundos requeridos para el experimento, el tamaño aumentó, de acuerdo a la tendencia en la Fig. 5.6, hasta un valor de $0.95 \pm 0.23 \mu\text{m}$. Un cambio similar, esta vez una reducción de 1.08 ± 0.23 a $0.99 \pm 0.05 \mu\text{m}$, se observó cuando los centrosomas se fluyeron desde un tampón TAE a una cámara de fluidos llena de tampón acetato. La recuperación del signo de la carga y la tendencia del tamaño con el pH en estas pruebas sugiere que las condiciones de pH bajas no producen una desnaturalización fuerte e irreversible de la estructura central del centrosoma ni una gran pérdida de MPC.

6

Discusión

6.1. Estabilidad mecánica de moléculas individuales de ADN en presencia de etanol y espermina

En los capítulos 3 y 4 de esta tesis se ha presentado la investigación del comportamiento mecánico de moléculas individuales de ADN en condiciones de baja humedad con el objeto de entender la acción del solvente en la estructura elástica del ADN. Se ha imitado el efecto de la deshidratación en solución utilizando mezclas de tampón con etanol. Se ha utilizado espermina, además de sal monovalente, para analizar el efecto de los contraiones condensadores en la estabilización mecánica del ADN. Para estudiar el efecto de la composición, se han utilizado dos plásmidos linealizados con diferente proporción de GC. El primero de ellos tiene aproximadamente 50% GC y adopta la conformación B en solución acuosa, y el segundo contiene 70% GC y es estable en una forma A en la misma solución tampón. La estructura secundaria de estos plásmidos, tanto en tampón como en diferentes medios con baja humedad, se ha caracterizado utilizando dicroísmo circular (Fig. 3.2). Se ha trabajado con tres técnicas de moléculas individuales diferentes y complementarias: pinzas ópticas, pinzas magnéticas y AFM.

6.1.1. Estructura secundaria del plásmido piJ702

Durante el desarrollo de este trabajo se produjo un resultado inesperado: el hecho de que un ADN natural tuviera características de forma A en solución acuosa. Se sabe que el ADN rico en GC favorece la forma A en bajas concentraciones de etanol (Narainui et al., 1985) y, de hecho, el polímero sintético poly(dG)·poly(dC) puede adoptar la forma A incluso en solución acuosa (Nishimura et al., 1985). Otras moléculas de ADN naturales de similar contenido en GC a piJ702 (por ejemplo, *Micrococcus luteus*, 72% GC) tienen una gran tendencia a adoptar la forma A a bajas concentraciones de etanol y policationes, según indican los cambios del espectro de DC (Usaty y Shlyakhtenko, 1974; Minyat et al., 1979; Narainui et al., 1985; Reich et al., 1991). Sin embargo, este ADN exhibe espectros de DC de la forma B en soluciones tamponadas cuando es sonificado en fragmentos cortos (~50-250 pb) (Narainui et al., 1985). Como se demostró previamente para varios tipos de ADN con diferente GC, el peso molecular también afecta al espectro de DC. En particular, la señal de DC de la forma A de moléculas de ADN largas e intactas en condiciones que favorecen la forma A puede cambiar a la de la forma B cuando estas se rompen en fragmentos cortos (Narainui et al., 1985). Aquí, se han utilizado plásmidos intactos, linealizados, suficientemente largos para poder plegarse sobre sí mismos (es decir, con longitud de contorno mucho mayor que su longitud de persistencia). Por tanto, piJ702 probablemente deba su fuerte capacidad para adoptar la forma A, no solo a la configuración de apilamiento de las bases inducida por la alta densidad de GC, sino también a la alta tendencia concomitante a auto-adherirse (Kypr et al., 2009). Puesto que no se habían encontrado referencias previas de un ADN natural con forma A en solución acuosa, las medidas de DC de piJ702 en tampón se repitieron tres veces, e

incluso se verificaron una cuarta vez con un equipo diferente (Jasco J-715, en cubeta circular con baño circulante y camino óptico de 0.1 cm, Dept. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid), con muestras de dos purificaciones de *Streptomyces* distintas. En todos los casos, los espectros eran indistinguibles entre sí e iguales al mostrado en la Fig. 3.2 (C). Estos experimentos se hicieron simultáneamente con el plásmido pBACgus11 en tampón como control, obteniéndose siempre el espectro característico de la forma B en este caso (Fig. 3.2 (A)).

En contraste con el resultado de DC, las curvas de fuerza-extensión realizadas con pBACgus11 y piJ702 en solución acuosa con las pinzas ópticas muestran una longitud de contorno y de la región de sobre-estiramiento correspondientes a moléculas en forma B en los dos casos (Fig. 3.3). Puesto que la distancia axial entre pares de bases del ADN es 0.256 nm en la forma A y 0.34 nm en la forma B, no es sorprendente que la fuerza de estiramiento favorezca esta última conformación (Fornells et al., 1983). Por encima de la transición de sobre-estiramiento, la estructura del ADN debería ser estrictamente diferente de la forma A o B (Williams et al., 2001a; Bustamante et al., 2003). Si la transición A→B inducida por tensión, ocurriera en el régimen de elasticidad intrínseca, debería aparecer un cambio repentino en la extensión a una cierta fuerza crítica, pero esta transición nunca se observó para piJ702 en solución acuosa. Con el fin de resolver mejor el régimen de fuerza entrópico del ADN, se han realizado curvas de fuerza-extensión de pBACgus11 y piJ702 en solución acuosa con pinzas magnéticas (Fig. 4.4). Los datos de estiramiento de los dos tipos de ADN se ajustan razonablemente bien al modelo de elasticidad de polímeros WLC. Los parámetros derivados del ajuste corresponden, de nuevo, con moléculas en forma B.

Estos resultados a nivel de molécula individual y su discrepancia con la caracterización volumétrica de DC en el caso del ADN rico en GC, son consistentes con el hecho de que la tensión dentro del régimen entrópico actúe como una restricción mecánica que evita la auto-adhesión del ADN y desestabiliza la forma A que la molécula adopta en solución. Debido a la naturaleza de los experimentos de estiramiento con pinzas ópticas, la observación de una desestabilización de este estilo en las curvas de fuerza-extensión en el régimen entrópico podría quedar oculta tras el cambio rápido en extensión del ADN. A pesar de la resolución que ofrecen las pinzas magnéticas en este régimen de elasticidad, no se ha observado ningún signo de cooperatividad que se pueda atribuir a una transición B→A. Aun así, si se comparan los experimentos de estiramiento con pinzas magnéticas de piJ702 y pBACgus11, se observa una mayor desviación de los datos experimentales respecto al modelo WLC en piJ702, en el intervalo comprendido entre 0.1 y 1 pN (Fig. 6.1). Parece razonable pensar que el alejamiento de piJ702 del WLC se deba a su alto contenido en GC. Sin embargo, la longitud de persistencia media obtenida en estos experimentos es similar en los dos tipos de ADN. Así, se ha encontrado para las moléculas de pBACgus11 en

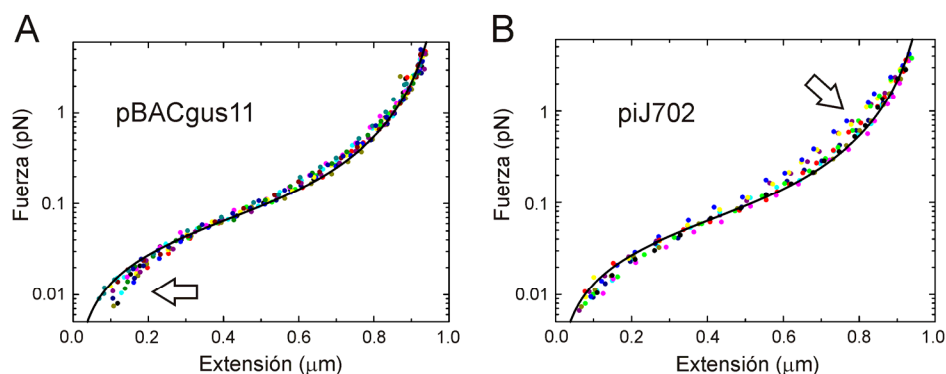


Figura 6.1 | Comparativa entre las gráficas de fuerza-extensión de las dos moléculas de ADN. Los puntos son los datos de 16 experimentos de pBACgus11 (A) y 10 experimentos de piJ702 (B). Las curvas representan el modelo WLC al tomar como longitud de contorno el valor teórico de la forma B y como longitud de persistencia, P , los valores medios de cada población ($P = 47$ nm para pBACgus11 y $P = 48$ nm para piJ702). Las flechas indican las regiones de mayor dispersión y desviación de los datos respecto del modelo para cada ADN. Los datos se recogieron en un tampón con 80 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5.

tampón Tris y 80 mM NaCl, $\langle P \rangle = 47 \pm 3$ nm ($n = 14$) y para piJ702, $\langle P \rangle = 48 \pm 5$ nm ($n = 10$), que son valores muy parecidos entre sí y que, por sí solos, no indican que la estructura de piJ702 tenga más tendencia a curvarse que la de pBACgus11. Por otro lado, se sabe que las moléculas de ADN ricas en guanina tienen tendencia a asociarse entre sí y formar disposiciones ordenadas entre varias hebras (Kypr et al., 2009). De manera análoga a esta agregación intermolecular, las interacciones intramoleculares serán más importantes en una molécula rica en GC y suficientemente larga como para poder plegarse sobre sí misma. En tal caso, cuando la molécula se estire desde su conformación relajada, se eliminarán las interacciones intramoleculares que se hayan creado a fuerza cero. Como la fuerza necesaria para alinear una molécula de ADN bicatenario contra la elasticidad entrópica es del orden de $k_B T/P \sim 0.1$ pN, este podría ser el motivo de la dispersión y la desviación de los datos de fuerza para una extensión dada de piJ702 a partir de ese valor. Este resultado evidenciaría la existencia de contactos intramoleculares más fuertes en el ADN rico en GC. Además, este argumento concuerda con que la dispersión que denota el alineamiento se dé en pBACgus11 a fuerzas menores (0.01-0.03 pN).

Finalmente, de las imágenes de las dos muestras de ADN depositadas sobre mica, en aire, en presencia de $MgCl_2$ (Fig. 4.5), se desprende el mismo resultado respecto a la estructura secundaria de las dos moléculas: en ambos casos, la longitud de contorno medida corresponde con ADN en forma B. Además, el hecho de no haber encontrado dificultades en la adsorción de piJ702 sobre la mica con Mg^{2+} no coincide

con las observaciones y el modelo propuesto del comportamiento del ARN bicatenario (con hélice tipo A) sobre superficies de mica en presencia de estos iones. Por otro lado, las moléculas de pBACgus11 y piJ702 son morfológicamente indistinguibles cuando se hallan adsorbidas sobre la mica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que durante la adsorción sobre una superficie plana, la conformación del ADN se modifica inevitablemente por el paso de tres a dos dimensiones (Rivetti et al., 1996). Por tanto, la imagen de AFM muestra la conformación de equilibrio que adopta la molécula sobre la mica con Mg^{2+} , pero no puede interpretarse de manera absoluta como el reflejo de la conformación de la molécula en solución.

6.1.2. La transición B-A y la condensación

La estructura secundaria del ADN, más allá de consideraciones a nivel del par de bases (es decir, de la configuración de plegamiento del azúcar y el apilamiento de las bases) está caracterizada por una serie de parámetros que definen geométricamente la doble hélice. Estos son, entre otros, la distancia y el ángulo de rotación por residuo y el diámetro de la hélice (Tabla 1.2). La aproximación de molécula individual de esta tesis permite acceder a los cambios en la longitud de contorno del ADN y se han medido en secuencias de ADN y en condiciones ambientales que inducen la conformación A en experimentos de volumen. Debido a la naturaleza de los experimentos mecánicos, es de esperar que el ADN tipo B sea favorecido por la aplicación de fuerza: el ADN tipo A posee una distancia entre pares de bases menor y, consecuentemente, da lugar a una longitud de contorno más corta para la doble hélice (Fang et al., 1999). Así, empezando desde condiciones ambientales que inducen el ADN tipo A, según se caracterizó por DC (Fig. 3.2), la fuerza debería desplazar el equilibrio $A \leftrightarrow B$ en la dirección $A \rightarrow B$. Existen numerosos estudios en los que se han descrito cambios estructurales cooperativos inducidos por tensión en los ácidos nucleicos a nivel de molécula individual: transición de sobre-estiramiento en ADN bicatenario (Williams et al., 2001a; Bustamante et al., 2003), transición de apertura de hebras complementarias de ADN (Essevaz-Roulet et al., 1997) y horquillas de ARN (Liphardt et al., 2001), transiciones conformacionales cooperativas de ADN estirado inducidas por torque (Bustamante et al., 2003). Sin embargo, nunca se ha observado esa biestabilidad del ADN ni en secuencias con tendencia a adoptar estructura A ni en condiciones ambientales que potencialmente inducen la transición $A \leftarrow B$.

A este respecto, la Fig. 6.2 muestra un diagrama con los cambios de longitud de contorno a nivel de molécula individual normalizados al número de pares de bases con el fin de comparar los resultados obtenidos con los datos de volumen de las familias conformacionales A y B. Los experimentos comparativos en los cuales la misma molécula individual es estirada en condiciones estabilizadoras de la forma B y A (tampón y mezclas de tampón y etanol con policationes, respectivamente) y con secuencias preferentes por la forma A y B, no muestran ninguna tendencia en el

cambio de longitud de contorno. Es decir, no se ha encontrado repetidamente ningún incremento en longitud de contorno de molécula a molécula en experimentos con condiciones ambientales fijas. En su lugar, se observa una gran dispersión entre las distintas moléculas con valor medio dentro del rango de la familia B (barras de longitud y flechas verticales, respectivamente, en la Fig. 6.2). Estas dispersiones en el cambio de longitud de contorno son continuas en vez de discretas y, por lo tanto, pueden ser entendidas en términos de desviaciones de la elasticidad tipo B como consecuencia de las condiciones altamente desnaturalizantes impuestas por las mezclas etílicas. El hecho de que algunas moléculas presentaran una disminución en la longitud de contorno puede atribuirse a la condensación. Esta sugerencia ha sido propuesta con anterioridad para pequeñas reducciones de la longitud de contorno, de hasta el 10% y 5% debido a la acción de surfactantes (Husale et al., 2008) y dendrímeros (Ritort et al., 2006), respectivamente. Finalmente, también es importante señalar que la región de fuerza de sobre-estiramiento siempre cumple ser igual a $0.7 \times [\text{longitud de contorno}]$ (Smith et al., 1996), independientemente del tipo de ADN y de las condiciones ambientales utilizadas. Además, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, se ha encontrado que el ARN bicatenario tiene una región de sobre-estiramiento con una extensión de $0.7 \times [\text{longitud de contorno de forma A}]$ (Herrero-Galán et al., comunicación interna, trabajo en progreso). Juntos, todos estos datos son consistentes con un ADN que está en la forma B para fuerzas por encima del régimen entrópico.

La tensión es, por lo tanto, una restricción mecánica que evita la transición estructural $A \leftarrow B$: las fuerzas de estiramiento bajas (en el régimen entrópico) desestabilizan la estructura secundaria compacta A, haciendo que la molécula recupere su longitud de contorno de forma B. El hecho de que ese efecto desestabilizador ocurra conjuntamente con los efectos de descondensación del ADN, junto con el hecho de que una transición cooperativa B-A se obtuviera en moléculas agregadas bajo tensión (Fornells et al., 1983; Albiser et al., 1988; Rupprecht et al., 1994) y no a nivel de molécula individual (esta tesis), lleva a la conclusión de que la condensación y la transición B-A no solo coexisten a bajas fuerzas, sino que se promueven la una a la otra. Las predicciones teóricas de la diferencia de energía libre en la transición B-A (Noy et al., 2007) sugieren de igual forma que la transición debería suceder a fuerzas bajas (véase la estimación de la fuerza en el Anexo A.3). En ausencia de fuerza de estiramiento, las interacciones intramoleculares entre segmentos de ADN producen la auto-adhesión y la transición concomitante $A \leftarrow B$ si la actividad acuosa es suficientemente baja. Las interacciones intramoleculares en solución tampón son débiles con respecto a las que exhiben en alcohol o con policationes, pero aumentan en presencia de alto contenido en GC y pueden ellas solas producir asociaciones débiles entre las hélices (interacciones de unión dentro del régimen entrópico de fuerza, Figs. 3.3, 4.4 y 6.1) con la consiguiente señal de ADN en forma A en DC (Fig. 3.2). Las interacciones entre moléculas, que aumentan a baja

actividad acuosa, finalmente provocan la condensación del ADN (Figs. 3.4, 3.5, 4.2 y 4.3), lo que facilita la estabilización del ADN tipo A (Fig. 3.2) y mantiene baja la actividad del agua dentro de la estructura empaquetada resultante. Esta conclusión está además de acuerdo con un modelo sobre la transición B-A en el que la energía de interacción electrostática entre moléculas de ADN favorece la forma A (Rudd et al., 2007).

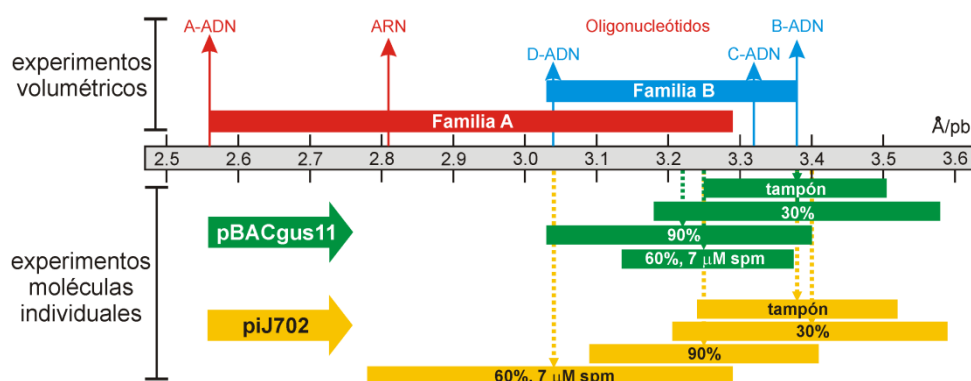


Figura 6.2 | Diagrama comparativo de los resultados de esta tesis respecto a la distancia entre pares de bases de ADN y los valores clásicos de experimentos volumétricos. Se representan los valores de distancia por resituo (esto es, longitud de contorno dividido por el número de pares de bases) de los experimentos de moléculas individuales realizados y los valores obtenidos en experimentos volumétricos para las familias conformacionales A y B y sus principales miembros: A-ADN y ARN bicatenario, que pertenecen a la familia A; y, B-, C- y D-ADN, que pertenecen a la familia B (datos volumétricos obtenidos de (Saenger, 1984)). Para nuestros datos de moléculas individuales, las flechas verticales señalan los valores medios de, al menos, seis experimentos individuales (cada uno con una molécula diferente) y las barras longitudinales representan su desviación estándar. Los promedios y las desviaciones estándar de los datos en tampón Tris con 1 mM NaCl, 80 mM NaCl o 1 mM NaCl más 17.5 μ M espermina, no diferían apreciablemente en esta representación y han sido agrupados en la barra "tampón". Las barras etiquetadas como "30%" y "90%" representan mezclas de etanol al 30% y 90%, respectivamente, con tampón Tris con 80 mM NaCl. La barra etiquetada como "60%, 7 μ M spm" representa la mezcla de etanol al 60% con tampón Tris 1 mM NaCl y 7 μ M espermina (concentración final).

6.1.3. Efecto de la deshidratación sobre el ADN y su relevancia biológica

El ADN es una molécula flexible y altamente cargada en solución tampón que interacciona dinámicamente con las proteínas. Los procesos biológicos a nivel molecular requieren, por un lado, estructuras precisas con funciones especializadas y, por otro lado, una organización correcta que genere un número pequeño de

conformaciones posibles. Mientras que el ADN cumple con la especialización funcional como transportador de la información genética, sus niveles estructurales de organización son numerosos, desde un estado globular desordenado con estructura secundaria polimórfica hasta partículas altamente empaquetadas. Para conseguir esta polivalencia estructural y mantener a la vez una correcta accesibilidad a los motores moleculares, el ADN necesita un buen equilibrio entre la estabilidad fisico-química y la maleabilidad estructural. Los experimentos de esta tesis demuestran que la estabilidad fisico-química del ADN se mantiene cuando se considera este cable molecular fuera de su medio natural. Lejos de las condiciones fisiológicas, en particular, en medios no polares muy diferentes de los que hacen posible su función biológica, el ADN se comporta como una estructura de doble hélice que mantiene sus regímenes elásticos y conformaciones estructurales con gran reversibilidad. Esto es posible principalmente debido al equilibrio crítico entre la magnitud de las interacciones hidrofóbicas de apilamiento de las bases y las interacciones electrostáticas entre los pares de bases de la molécula en soluciones de baja polaridad (baja ϵ). Específicamente, el ADN en soluciones etílicas mantiene sus regímenes elásticos de forma B y, aunque exhibe alta histéresis de desnaturalización, sus hebras complementarias son capaces de volver a aparearse repetidamente después de que la tensión cese. Este comportamiento en alcohol guarda una gran similitud con el efecto desnaturalizante producido por las altas temperaturas (Mao et al., 2005). La condensación de contraiones aumenta en medios de polaridad reducida, como muestra el aumento de la fuerza de sobre-estiramiento a baja concentración de alcohol. La fuerza iónica, tanto de sales monovalentes como multivalentes, modula la reversibilidad estructural y mecánica de la molécula, reduciendo su histéresis de desnaturalización y recuperando la cooperatividad de la transición de sobre-estiramiento (Figs. 3.4 y 3.5). Los cationes (principalmente, multivalentes) en condiciones ambientales no polares son también potentes inductores de la organización estructural de mayor grado a través de las asociaciones electrostáticas no específicas que neutralizan de manera crítica las interacciones repulsivas entre los segmentos de la hélice. Mediante la regulación de la actividad del agua y los cationes, se ha mostrado que el ADN colapsa en estructuras que soportan fuerzas de varios piconewtons. Las condiciones que causan la transición B→A en soluciones con moles de moléculas de ADN siempre inducen condensación, tal y como han manifestado claramente los experimentos sobre moléculas individuales a fuerza constante (Fig. 4.2). Esto sugiere que esta transición intramolecular, que es semejante a la agregación intermolecular, media en la acomodación de la estructura secundaria del ADN desde la forma B a la forma A, y que esta última es muy sensible a la tensión mecánica.

Juntas, estas propiedades fisico-químicas convierten al ADN en un cable molecular transportador de información con extraordinaria estabilidad. Los resultados descritos aquí sostienen además que, junto con las modificaciones químicas que regulan la función del ADN, las propiedades elásticas y su organización—modulada

por las condiciones ambientales celulares—son los ingredientes esenciales del trabajo mecánico de la maquinaria celular a nivel de unos pocos pares de bases.

6.1.4. Perspectivas futuras

El trabajo presentado en esta tesis sobre la estabilidad mecánica del ADN en condiciones de baja humedad ha sido desarrollado durante unos cinco años. Se han realizado medidas exhaustivas y, actualmente, se considera completada la caracterización realizada con pinzas ópticas. A lo largo de este tiempo, han sido muchas las dificultades prácticas encontradas al trabajar con ADN en etanol y también en lo referente al análisis e interpretación de los resultados obtenidos, principalmente, a causa de la ubicuidad de la condensación. Con la experiencia adquirida en este tiempo, la continuidad de la investigación de la transición estructural B-A y de la condensación por etanol a nivel de una única molécula se abordaría con una técnica que no estuviera basada en el atrapamiento óptico, como las pinzas magnéticas. En este sentido, son varios los experimentos que podrían realizarse, empezando por un estudio más sistemático de la condensación molecular con la concentración de etanol.

A pesar de los cientos de artículos que forman parte de la bibliografía sobre la transición estructural entre las formas A y B del ADN, no existe aún una explicación clara y definitiva del proceso ni de las condiciones que la promueven. Como está sucediendo con otros problemas biológicos, las investigaciones con técnicas de moléculas individuales—entre ellas, la contribución de esta tesis—nos han permitido ofrecer una nueva perspectiva sobre la naturaleza de la transición B-A.

6.2. Propiedades eléctricas e hidrodinámicas de centrosomas

En el Capítulo 5 se han descrito los resultados obtenidos sobre una propiedad física básica—la carga eléctrica (q)—de un elemento biológico fundamental, el centrosoma. Los experimentos realizados muestran la importancia de la electrostática en la escala nanométrica dentro de la célula y el papel desarrollado por este orgánulo (los estudios previos han proporcionado solo hipótesis respecto a esta cuestión (Gagliardi, 2002, 2008)). Al mismo tiempo, se ha caracterizado el comportamiento hidrodinámico del centrosoma en condiciones fisiológicas, y se ha encontrado que este está ligado a su comportamiento eléctrico. La naturaleza difusiva del material pericentriolar (MPC) hace esta descripción hidrodinámica aún más necesaria para comprender la interacción entre la dinámica estructural del centrosoma y las fluctuaciones térmicas del baño acuoso. Se ha medido una densidad superficial de carga para el centrosoma que es más pequeña que la de los microtúbulos (su pareja funcional inmediata) en 1-2 órdenes de magnitud (Stracke et al., 2002; van den Heuvel et al., 2007). Sin embargo, se ha encontrado que la carga tiene un efecto muy

notable sobre su propia estructura. Concretamente, del estudio de su comportamiento hidrodinámico, se ha encontrado que el campo eléctrico que este orgánulo genera autoinduce una dinámica estructural dependiente del pH que modula la estructura del MPC.

Para realizar estas investigaciones se ha ideado una forma de manipulación de centrosomas individuales por láser. Como se explicó en la Sección 1.6.1, Ashkin y Dziedzic (1987, 1989) prepararon el terreno para el atrapamiento y manipulación óptica de especímenes biológicos individuales, como virus, células e incluso orgánulos situados dentro de células vivas, sin daño óptico. Un desarrollo adicional de Fuhr *et al.* (1998) combinaba campos eléctricos de alta frecuencia con manipulación óptica de partículas y células individuales dentro de una trampa electro-óptica. La metodología de orgánulo individual presentada en este capítulo, además de complementar a los experimentos volumétricos, también ha demostrado ser valiosa para investigar la sensibilidad de un centrosoma a diferentes condiciones o componentes del tampón, como los iones Ca^{2+} .

6.2.1. Dominios dinámicos del centrosoma

En este trabajo se ha revelado la carga eléctrica del centrosoma y sus implicaciones estructurales. Debido al contraste estructural entre el MPC difusivo y el núcleo más compacto de los centriolos, se han podido obtener medidas del coeficiente de fricción por medio de la ley de Stokes y el análisis espectral de las fluctuaciones térmicas de la fuerza. El espécimen es desplazado en un rango de distancias diferente en cada uno de estos métodos, y este hecho ha permitido distinguir dos dominios dinámicos del centrosoma en base a la respuesta a estas fluctuaciones inducidas. Estos dominios dinámicos son, por un lado, las fibras más externas de la matriz del MPC (entorno del MPC) y, por otro lado, la parte interna más condensada que comprende el núcleo de centriolos más la parte interna del MPC (núcleo centriolar). Esta distinción dinámica y las propiedades biofísicas caracterizadas se determinaron por manipulación láser de centrosomas individuales en condiciones fisiológicas, lo cual constituye, desde un punto de vista metodológico, una electroforesis a nivel de orgánulo individual. Esta aproximación es específica, independientemente de la composición molecular y la organización estructural del espécimen, y proporciona señales unívocas de especímenes individuales que no se confunden por efectos de aglomeración. Este método también se puede usar para estudiar la sensibilidad del centrosoma a diferentes condiciones ambientales y para seguir la progresión del ciclo del centrosoma.

6.2.2. Implicaciones biológicas de la carga del centrosoma

El centrosoma es un orgánulo clave en células animales que está implicado en procesos celulares básicos como la división celular y la organización de microtúbulos.

Estos procesos son fundamentales para la motilidad celular y la adhesión. Los fenómenos eléctricos que son, por otro lado, clave para comprender la estructura molecular y sus interacciones, tienen importantes implicaciones en los procesos celulares puesto que todo componente celular lleva un comportamiento eléctrico asociado.

Respecto al citoplasma, la carga neta negativa medida en este trabajo para el centrosoma en condiciones *in vitro*, así como la influencia de campos eléctricos endógenos, como los originados desde las membranas y los microtúbulos (Stracke et al., 2002; Mershin et al., 2004; McCaig et al., 2005; van den Heuvel et al., 2007), tienen importantes implicaciones *in vivo* en la nanoescala (distancias del orden de la longitud de Debye), y podrían producir efectos secundarios a distancias mayores (Pokorný et al., 1998; Zhao et al., 1999; Gagliardi, 2002, 2008) en escalas de tiempo mayores que el milisegundo. Cuando se comparan las medidas de esta tesis con resultados anteriores de experimentos de electroforesis con microtúbulos (Stracke et al., 2002; van den Heuvel et al., 2007), se observa que la densidad de carga superficial efectiva del centrosoma a pH fisiológico tiene el mismo signo pero es significativamente menor, en valor absoluto, que la de los microtúbulos. Compárese la densidad de carga superficial efectiva de $(-3.67 \pm 0.04) \times 10^{-2} \text{ C/m}^2$ para los microtúbulos (pH 6.9) (van den Heuvel et al., 2007) con los datos de la Tabla 5.2 para los centrosomas de embriones tempranos de *Drosophila*.

Además, se sabe que las oscilaciones de pH son un modulador importante del control celular y que se alcanza un máximo de pH al comienzo de la mitosis (Madhus, 1988), etapa celular en la que aumenta dramáticamente la nucleación de microtúbulos (Kuriyama y Borisy, 1981). Del efecto estructural auto-modulado dependiente de pH encontrado también en esta tesis, el campo eléctrico que surge del centrosoma cargado negativamente *in vivo* podría ser suficiente para conducir los dímeros de tubulina en la vecindad del centrosoma hacia un alineamiento paralelo con respecto a las líneas de campo eléctrico cercano, orientando así sus dipolos eléctricos y proporcionando equilibrio de torque al dipolo de la tubulina (Stracke et al., 2002; Mershin et al., 2004). De esta forma, el campo eléctrico cercano del centrosoma facilitaría el reclutamiento de dímeros de tubulina a distancias del orden de la longitud de Debye. Este efecto pasivo inherente a los microtúbulos nacientes, es compatible con la acción de proteínas de unión al extremo (+) de los microtúbulos y con la acción de las polimerasas de microtúbulos sobre dímeros de tubulina que difunden en la vecindad del centrosoma (Barr y Gergely, 2008; Brouhard et al., 2008).

Es también destacable que la disposición α - β del dímero de tubulina relativa al centrosoma sea consistente con la estabilidad que las fuerzas eléctricas darían al microtúbulo naciente en ausencia de otros fenómenos, según la distribución de carga de los extremos del microtúbulo (Baker et al., 2001). Además, una carga neta

negativa tanto en el centrosoma como en los microtúbulos podría ayudar a explicar porqué estos últimos inicialmente crecen con direccionalidad radial desde el centrosoma. Al mismo tiempo, la correspondiente carga lateral negativa a pH fisiológico de los microtúbulos que nuclean en el centrosoma podría contribuir a este efecto, generando fuerzas repulsivas entre los microtúbulos nacientes hasta distancias de separación donde sus cargas se apantallen eléctricamente. Como consecuencia, fuerzas eléctricas de campo cercano podrían tener un importante papel en la organización del áster de microtúbulos. Los campos eléctricos laterales originados en los microtúbulos podrían ser necesarios después para ensamblar el huso mitótico al evitar el apilamiento de microtúbulos y permitir mecanismos de disposición más finos, regulados por pH e iones (Stebbing y Hunt, 1982) y proteínas asociadas a microtúbulos (Hirokawa, 1994), así como el preciso control de los mecanismos de deslizamiento mediados por motores moleculares (Sharp et al., 2000).

Estos fenómenos—captación y orientación de dímeros de tubulina y crecimiento radial de los microtúbulos emergentes—podrían facilitar un desarrollo temprano del áster de forma organizada y, de este modo, podrían tener un papel funcional en los procesos mediados por centrosomas, como la mitosis.

6.2.3. Perspectivas de futuro

La metodología desarrollada en esta tesis abre un camino a las caracterizaciones eléctricas e hidrodinámicas de otros orgánulos y grandes ensamblajes supramoleculares. Aunque el coeficiente de fricción medido en una situación dinámica puede ser de claro interés, las fluctuaciones y la orientación de atrapamiento requerirían consideraciones de mayor profundidad sobre las medidas de tamaño de orgánulos no esféricos para asegurar un cierto grado de precisión.

Respecto a los centrosomas, la organización morfológica de este orgánulo en respuesta a las condiciones ambientales a escala nanoscópica puede representar una importante contribución sobre la comprensión del papel del centrosoma en la organización del citoesqueleto durante el ciclo celular. Así, continuando con la línea de trabajo desarrollada en esta tesis, en un futuro próximo se pretende aplicar esta nueva metodología al estudio del efecto de la fosforilación sobre la estructura del centrosoma. La fosforilación es un factor relacionado con el proceso de duplicación del centrosoma durante la división celular (Alvarado-Kristensson et al., 2009), por lo que esta caracterización tendrá importantes repercusiones biológicas. Por otro lado, sería interesante estudiar las diferencias entre centrosomas con distinta funcionalidad, por ejemplo, que se encuentren en distintas etapas del ciclo celular, así como otros tipos de centrosomas con diferente contenido de MPC y tamaño de centriolos como, por ejemplo, los centrosomas de mamíferos.

Finalmente, el objetivo último de cualquier investigación es comprender la función del espécimen biológico dentro de su medio natural, es decir, la célula viva. Por tanto, la investigación más importante a realizar en el futuro sería conectar las propiedades biofísicas que se han encontrado con la situación biológicamente más relevante *in vivo*. Sin embargo, el desafío es enorme dada la complejidad de la materia viva y las capacidades actuales de las técnicas de manipulación. Debido a la gran densidad molecular del interior celular, por un lado, y al límite de resolución de Rayleigh, por otro lado, sería necesario marcar fluorescentemente el MPC (específicamente, proteínas abundantes como la γ -tubulina o la pericentrina) y los centriolos para seguir la posición de los centrosomas dentro de la célula. Asimismo, sería necesario emplear un instrumento que combinara una trampa óptica con la microscopía de fluorescencia. La manipulación óptica de centrosomas *in vivo* parece factible dada la capacidad no invasiva de la luz de penetrar dentro de las células sin efectos dañinos fáciles de detectar. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, hay cuestiones físicas y biológicas que limitan la manipulación cuantitativa *in vivo*: i) El tamaño físico de una trampa óptica y la densidad del interior celular. La difracción limita el tamaño de un haz láser focalizado, otorgándole a la trampa óptica un tamaño del orden de unos cientos de nanómetros. Puesto que la célula es un medio muy denso, una trampa óptica no solo atraparía el orgánulo de interés, también todo lo que haya alrededor, principalmente macromoléculas. ii) El índice de refracción dentro de la célula es inhomogéneo y dinámico. Esto limitaría las comparaciones directas de la manipulación *in vitro* de centrosomas con los ensayos *in vivo*. Y, de manera más importante, las medidas de la fuerza no serían tan precisas como *in vitro*. Una alternativa interesante a la manipulación óptica de centrosomas *in vivo* la ofrece la manipulación magnética. Esta técnica es única respecto a la selectividad que proporciona, ya que la aplicación de un campo magnético sólo afecta a las partículas magnéticas que hayan sido unidas específicamente al centrosoma, sin efectos sobre el resto de la célula. En cualquier caso, el proyecto de manipulación de centrosomas (u otros orgánulos) dentro de la célula viva precisa de un desarrollo técnico muy importante en el que ya se está trabajando en nuestro laboratorio.

Conclusiones

Pinzas ópticas

1. Se ha construido un instrumento de pinzas ópticas que permite medir y ejercer fuerzas de entre 0.1 pN y 200 pN y ofrece resolución sub-nanométrica en distancias.

ADN

2. Se han caracterizado, por primera vez, las propiedades mecánicas del ADN en soluciones con baja humedad a nivel de molécula única. Los regímenes de elasticidad y la desnaturalización en solventes de baja polaridad muestran el balance crítico entre las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas para mantener la estabilidad mecánica del ADN en estas condiciones.
3. Se ha investigado la mecanoquímica de la transición B-A a nivel de molécula única. Los experimentos muestran que esta transición no es cooperativa ni tampoco está promovida exclusivamente por una biestabilidad de la propia molécula.
4. Las condiciones ambientales que desencadenan la transformación desde la forma estructural B a la forma A del ADN en experimentos volumétricos producen condensación intramolecular como efecto dominante.
5. Los resultados obtenidos indican que la condensación coexiste con la forma A del ADN y que la asociación entre las hélices que implica promueve la transición conformacional B-A.

Centrosomas

6. Se ha desarrollado una nueva metodología que permite realizar electroforesis de orgánulo individual.
7. El tamaño hidrodinámico de los centrosomas de embriones tempranos de *Drosophila melanogaster* es un 60% mayor que su diámetro medido por microscopía electrónica.
8. El centrosoma de los embriones tempranos de *Drosophila* es un orgánulo con carga neta negativa en condiciones fisiológicas y una región isoelectrica muy baja, $pI = 3.1 \pm 0.1$.
9. El campo eléctrico de los centrosomas autoinduce una dinámica estructural dependiente del pH.

Anexos

A.1. Espectro de potencia de una partícula en una trampa óptica

La ecuación que describe el movimiento de una partícula en un potencial armónico es la ecuación de Langevin, y viene dada por la teoría del movimiento browniano de Einstein-Ornstein-Uhlenbeck (Coffey et al., 1996):

$$m\ddot{x}(t) + \gamma\dot{x}(t) + \kappa x(t) = \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t) \quad (\text{A. 1.1})$$

donde $x(t)$ es la trayectoria de la partícula browniana; m , la masa; $-\gamma dx(t)/dt$, es la fuerza de fricción; γ , el coeficiente de fricción; $-\kappa x(t)$, es el potencial armónico, por ejemplo, de una trampa óptica; κ , la constante de recuperación; y, $(2k_B T \gamma)^{1/2} \xi(t)$, es una variable aleatoria gaussiana que representa las fuerzas brownianas a temperatura absoluta T .

Para todo t y t' se cumple que

$$\langle \xi(t) \rangle = 0; \langle \xi(t) \xi(t') \rangle = \delta(t - t') \quad (\text{A. 1.2})$$

siendo $\langle \dots \rangle$, el promedio estadístico sobre colectividades. La distribución delta de Dirac se puede expresar como:

$$\delta(v) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt \cdot \exp(\pm 2\pi i v t) \quad (\text{A. 1.3})$$

O bien,

$$\delta(v) = \frac{1}{t_m} \int_{-\frac{t_m}{2}}^{+\frac{t_m}{2}} dt \cdot \exp(\pm 2\pi i v t), \quad t \in \left[\frac{-t_m}{2}, \frac{t_m}{2} \right] \quad (\text{A. 1.4})$$

Debido a la presencia del fluido, la partícula se encuentra amortiguada en el potencial armónico. Si se supone que la inercia de la partícula es despreciable y que la disipación de energía cinética en el sistema es muy grande, se puede obviar el término inercial en la Ec. (A.1.1). La ecuación queda así (Berg-Sorensen y Flyvbjerg, 2004):

$$\gamma\dot{x}(t) + \kappa x(t) = \sqrt{2k_B T \gamma} \xi(t) \quad (\text{A. 1.5})$$

La transformada de Fourier compleja, en Hz y en toda la recta real, se define como:

$$\tilde{f}(v) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt \cdot f(t) \exp(-2\pi i v t) \quad (\text{A. 1.6})$$

La transformada de Fourier inversa es:

$$f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} dv \cdot \tilde{f}(v) \exp(2\pi i v t) \quad (\text{A. 1.7})$$

Teniendo en cuenta la siguiente propiedad para la transformada de Fourier de la derivada de orden n de una función,

$$TF[f^{(n)}(t)] = (2\pi i v)^n \tilde{f}(v) \quad (\text{A. 1.8})$$

se puede tomar la transformada de Fourier a ambos lados de la Ec. (A.1.5):

$$2\pi i v \tilde{x}(v) + \kappa \tilde{x}(v) = \sqrt{2k_B T \gamma} \tilde{\xi}(v) \quad (\text{A. 1.9})$$

y se puede despejar

$$\tilde{x}(v) = \frac{\sqrt{2k_B T \gamma}}{2\pi i v \gamma + \kappa} \tilde{\xi}(v) \quad (\text{A. 1.10})$$

De las Ecs. (A.1.2) y (A.1.3) se sigue que

$$\langle \tilde{\xi}(v) \rangle = 0; \langle \tilde{\xi}(v) \tilde{\xi}^*(v') \rangle = t_m \cdot \delta(v - v') \quad (\text{A. 1.11})$$

El espectro de potencia, $p(v)$, se define como:

$$p(v) \equiv \frac{\langle |\tilde{x}(v)|^2 \rangle}{t_m} \quad (\text{A. 1.12})$$

Si se usan las Ecs. (A.1.11), se tiene que $\langle |\tilde{\xi}(v)|^2 \rangle = t_m$, por lo que el espectro de potencia resulta:

$$p(v) = \frac{k_B T}{2\pi^2 \gamma (v^2 + v_c^2)} \quad (\text{A. 1.13})$$

Donde $v_c = \kappa/2\pi\gamma$ es la llamada frecuencia *corner*. Esta frecuencia fija un límite a la velocidad con la que se pueden medir los procesos. El espectro de potencia también se puede ver escrito como $\langle \Delta x^2(v) \rangle_{eq}$. Teniendo en cuenta que para un potencial armónico, $F = -\kappa x$, se puede definir el espectro de potencia de la fuerza como

$$\langle \Delta F^2(v) \rangle_{eq} = 2\gamma k_B T \frac{v_c^2}{(v^2 + v_c^2)} \quad (\text{A. 1.14})$$

En unidades de fuerza al cuadrado dividido por hercio. Esta es la Ec. (5.3), la expresión que se ha utilizado para ajustar los datos experimentales y derivar el tamaño del centrosoma por el método del espectro de potencia.

A.2. Relación entre la apertura numérica de un haz y el tamaño del foco

El uso de haces de baja apertura numérica (AN) dentro de objetivos de alta AN permite una deflexión significativa del haz al tiempo que se recoge toda la luz que se desvía (Smith et al., 2003) (véase la Fig. 2.3). Como se ha mencionado en el Capítulo 2, este hecho es fundamental para poder medir la fuerza a partir de la conservación del momento de la luz. Aunque esta es la principal razón para utilizar haces de baja AN, existe una ventaja adicional referida a la manipulación de especímenes biológicos que se describe en este apéndice.

En los experimentos de manipulación de centrosomas (Capítulo 5), un haz de AN ~ 0.5 fue suficiente para atrapar eficazmente estos orgánulos de manera individual, y demostrar que los haces de baja AN no son una limitación para la manipulación de este espécimen biológico. Respecto a la concentración de energía y el daño por radiación, es cierto que un haz de alta AN asegura un atrapamiento eficiente y, por lo tanto, necesita menos potencia de láser en la región focal para obtener una rigidez óptica suficiente. Sin embargo, aunque la potencia total en el volumen de la trampa no depende de la AN del haz, el volumen de atrapamiento (región focal) sí depende de la AN. De manera específica, el volumen de la región focal aumenta cuando la AN decrece, con la consiguiente disminución de la potencia por unidad de volumen.

La siguiente discusión cualitativa pretende ilustrar esta justificación sobre el uso de haces de baja AN. El comportamiento del tamaño de la región focal *versus* AN puede describirse, en una aproximación paraxial, estimando el tamaño del foco de un haz débilmente focalizado. La divergencia de un haz gaussiano paraxial de este tipo está dada por (Saleh y Teich, 2007):

$$\theta_0 \approx \frac{\lambda}{n\pi W_0} \quad (\text{A. 2.1})$$

donde λ es la longitud de onda, n es el índice de refracción del agua y W_0 es el radio de la cintura del haz en el centro. $2W_0$ también se llama diámetro del foco. La profundidad del foco es (Saleh y Teich, 2007):

$$2z_0 = \frac{2n\pi W_0^2}{\lambda} \approx \frac{2\lambda}{n\pi\theta_0^2} \quad (\text{A. 2.2})$$

El comportamiento del volumen en la región focal puede estimarse considerando el comportamiento de estos dos parámetros, $2W_0$ y $2z_0$. En la aproximación paraxial, $\sin\theta_0 \approx \theta_0$ y $\theta_0 \approx \text{AN}/n$. Por tanto, el diámetro y la profundidad del foco están relacionados con la AN del haz por las siguientes ecuaciones:

$$W_0 \approx \frac{\lambda}{\pi AN} \quad (\text{A. 2.3})$$

que muestra que el diámetro de la región focal aumenta cuando AN disminuye y,

$$z_0 \approx \frac{\lambda n}{\pi (AN)^2} \quad (\text{A. 2.4})$$

que muestra que la profundidad del foco aumenta cuando $(AN)^2$ disminuye. Consecuentemente, para una potencia incidente dada, la fracción de potencia que llega al espécimen disminuye cuando la AN disminuye porque la energía se extiende sobre un volumen mayor. La potencia por unidad de área, o intensidad, transmitida al espécimen también sigue esta tendencia.

En los experimentos descritos, $AN = 0.5$, $n_{\text{agua}} = 1.33$, $\lambda = 835 \text{ nm}$; por tanto, $\theta_0 \approx \sin\theta_0 = 0.5/1.33 = 0.376$, la aproximación paraxial es adecuada para estos parámetros experimentales. El diámetro y la profundidad del foco son:

$$2W_0 = 2 \cdot \frac{835}{0.5\pi} \approx 1000 \text{ nm}$$

$$2z_0 = 2 \cdot \frac{835 \cdot 1.33}{0.25\pi} \approx 3000 \text{ nm}$$

Estos valores describen el tamaño característico de la región focal en los experimentos (sin considerar la difracción en los objetivos ni la dispersión en el centrosoma). Este tamaño sería más pequeño si se utilizaran haces de alta AN, aumentando así la concentración de energía sobre el espécimen.

A.3. Predicción teórica para la fuerza de la transición B-A

Los valores de la energía libre del cambio conformacional B-A determinados a través de simulaciones se pueden utilizar para estimar la fuerza teórica asociada a la transición. Así, existen predicciones numéricas (Noy et al., 2007) para la diferencia de energía libre entre las formas A y B del dodecámero de Dickerson, $(\text{dGCGCAATTGCGC})_2$. A una concentración de etanol del 85%, la energía libre para la transición conformacional $B \rightarrow A$ es $\Delta G_{B \rightarrow A}(85\% \text{ etanol}) = 0.8 \text{ kcal/mol}$. Este valor se puede usar para inferir una fuerza aproximada para la transición B-A en los experimentos de estiramiento. En presencia de una fuerza de estiramiento externa, la energía libre intrínseca de la transición está aumentada por el trabajo necesario para tirar de la microesfera en oposición a la fuerza externa, $f \Delta l$, donde Δl es el cambio en la longitud de la molécula y f es la fuerza de estiramiento. A la fuerza a la que sucede

la transición entre los dos estados, f^* , los dos términos energéticos se equilibran (si se aproxima la fuerza f^* a una velocidad cercana al equilibrio):

$$\Delta G + f^* \Delta l = 0 \quad (\text{A.3.1})$$

Si se utiliza la energía libre por residuo, $\Delta G = 4.6 \times 10^{-22}$ J, y los datos cristalográficos (Saenger, 1984) para el cambio en extensión por par de bases, $\Delta l = 0.338 - 0.256 = 0.082$ nm, se obtiene la fuerza de la transición $f^* = 5.6$ pN. Según los experimentos para el ADN de pBACgus11 al 85% etanol, esta fuerza está dentro de los efectos de la condensación y, por lo tanto, la predicción teórica coincide con la coexistencia de fases entre la condensación y la forma A.

Por otro lado, la diferencia de energía libre para el dodecámero de Dickerson obtenida por Noy *et al.* (2007) para la transición conformacional B→A al 85% etanol es mucho menor que la de A→B en agua, $\Delta G_{A \rightarrow B}(\text{agua}) = 11.4$ kcal/mol. Se pueden expresar estas energías en unidades de $k_B T$ por residuo (k_B , constante de Boltzmann) a $T = 25^\circ\text{C}$ para comparar su magnitud con la energía de las fluctuaciones térmicas ($\sim k_B T$): $\Delta G_{A \rightarrow B}(\text{agua}) = 1.60$ $k_B T$ por residuo y $\Delta G_{B \rightarrow A}$ (85% etanol) = 0.11 $k_B T$ por residuo. Según estos cálculos, mientras que la estabilidad de un par de bases en el ADN tipo B con respecto a la estabilidad en el tipo A en agua es del orden de la energía libre de apilamiento de las bases (SantaLucia, 1998), la estabilidad de un par de bases del ADN tipo A con respecto a la del tipo B al 85% etanol está muy por debajo de esta energía. En estas últimas condiciones, el ADN tipo A sería muy poco estable porque estaría sujeto muy fuertemente a las fluctuaciones térmicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos cálculos teóricos no incluyen efectos de agregación. La agregación (y la condensación, si la molécula es más larga que su longitud de persistencia) proporcionaría mayor estabilidad a la molécula en forma A, superior a 0.11 $k_B T$ por residuo en mezclas de etanol y agua.

Los resultados presentados en esta tesis y los mencionados de Noy *et al.* (2007) sugieren que la forma A del ADN (estructura secundaria) en 85% etanol está parcialmente promovida por su secuencia (estructura primaria) y, finalmente, está estabilizada por la condensación (estructura terciaria).

A.4. Artículos publicados durante el periodo de tesis

Hormeño, S. y Arias-González, J. R. (2006) Exploring mechanochemical processes in the cell with optical tweezers. *Biology of the cell*. 98, 679-695.

Hormeño, S., Ibarra, B., Chichon, F. J., Habermann, K., Lange, B. M. H., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. y Arias-Gonzalez, J. R. (2009) Single centrosome manipulation reveals its electric charge and associated dynamic structure. *Biophysical Journal*. 97, 1022-1030.

Bibliografía

- Abbondanzieri, E.A., W.J. Greenleaf, J.W. Shaevitz, R. Landick y S.M. Block. (2005) Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature* **438**: 460-5.
- Abels, J.A., F. Moreno-Herrero, T. van der Heijden, C. Dekker y N.H. Dekker. (2005) Single-molecule measurements of the persistence length of double-stranded RNA. *Biophys. J.* **88**: 2737-44.
- Albiser, G., M. Harmouchi y S. Premilat. (1988) Influence of a mechanical tension on the B-A and B-C conformational transitions in DNA fibres. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**: 359-66.
- Albiser, G., A. Lamiri y S. Premilat. (2001) The A-B transition: temperature and base composition effects on hydration of DNA. *Int. J. Biol. Macromol.* **28**: 199-203.
- Allemand, J.F., D. Bensimon y V. Croquette. (2003) Stretching DNA and RNA to probe their interactions with proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 266-74.
- Allemand, J.F., D. Bensimon, R. Lavery y V. Croquette. (1998) Stretched and overwound DNA forms a Pauling-like structure with exposed bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 14152-7.
- Alvarado-Kristensson, M., M.J. Rodriguez, V. Silio, J.M. Valpuesta y A.C. Carrera. (2009) SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nat. Cell. Biol.* **11**: 1081-92.
- Arias-Gonzalez, J.R. y M. Nieto-Vesperinas. (2002) Radiation pressure over dielectric and metallic nanocylinders on surfaces: polarization dependence and plasmon resonance conditions. *Optics Letters* **27**: 2149-51.
- Arias-Gonzalez, J.R. y M. Nieto-Vesperinas. (2003) Optical forces on small particles: attractive and repulsive nature and plasmon-resonance conditions. *JOSA A* **20**: 1201-9.
- Arnott, S., W. Fuller, A. Hodgson y I. Prutton. (1968) Molecular conformations and structure transitions of RNA complementary helices and their possible biological significance. *Nature* **220**: 561-4.
- Arnott, S. y E. Selsing. (1974) The structure of polydeoxyguanylic acid with polydeoxycytidylic acid. *J. Mol. Biol.* **88**: 551-2.
- Arscott, P.G., C. Ma, J.R. Wenner y V.A. Bloomfield. (1995) DNA condensation by cobalt hexaammine (III) in alcohol-water mixtures: dielectric constant and other solvent effects. *Biopolymers* **36**: 345-64.
- Ashkin, A. (1970) Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* **24**: 156-9.
- Ashkin, A. (1992) Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.* **61**: 569-82.
- Ashkin, A. y J.M. Dziedzic. (1971) Optical Levitation by Radiation Pressure. *Appl. Phys. Lett.* **19**: 283.
- Ashkin, A. y J.M. Dziedzic. (1987) Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* **235**: 1517-20.
- Ashkin, A. y J.M. Dziedzic. (1989) Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 7914-8.
- Ashkin, A., J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm y S. Chu. (1986) Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters* **11**: 288-90.
- Ashkin, A., J.M. Dziedzic y T. Yamane. (1987) Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* **330**: 769-71.

- Ashkin, A., K. Schutze, J.M. Dziedzic, U. Euteneuer y M. Schliwa. (1990) Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature* **348**: 346-8.
- Baker, N.A., D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst y J.A. McCammon. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 10037-41.
- Balykin, V.I. y V.S. Letokhov. (1989) Laser optics of neutral atomic-beams. *Physics Today* **42**: 23-8.
- Baron, A.T., V.J. Suman, E. Nemeth y J.L. Salisbury. (1994) The pericentriolar lattice of PtK2 cells exhibits temperature and calcium-modulated behavior. *J. Cell Sci.* **107**: 2993-3003.
- Barr, A.R. y F. Gergely. (2008) MCAK-independent functions of ch-Tog/XMAP215 in microtubule plus-end dynamics. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 7199-211.
- Bauer, C. y A.H.J. Wang. (1997) Bridged cobalt amine complexes induce DNA conformational changes effectively. *J. Inorg. Biochem.* **68**: 129-35.
- Baumann, C.G., V.A. Bloomfield, S.B. Smith, C. Bustamante, M.D. Wang y S.M. Block. (2000) Stretching of single collapsed DNA molecules. *Biophys. J.* **78**: 1965-78.
- Baumann, C.G., S.B. Smith, V.A. Bloomfield y C. Bustamante. (1997) Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 6185-90.
- Beabealashvily, R.S., V.I. Ivanov, L.E. Minchenkova y L.P. Savotchkina. (1972) RNA polymerase-DNA complexes. I. The study of the conformation of nucleic acids at the growing point of RNA in an RNA polymerase-DNA system. *Biochim. Biophys. Acta* **259**: 35-40.
- Becker, M.M. y W. Zhou. (1989) B-A transitions within a 5-S ribosomal-RNA gene are highly sequence-specific. *J. Biol. Chem.* **264**: 4163-7.
- Bennink, M.L., S.H. Leuba, G.H. Leno, J. Zlatanova, B.G. de Grooth y J. Greve. (2001) Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 606-10.
- Bensimon, D. (1996) Force: a new structural control parameter? *Structure* **4**: 885-9.
- Berg-Sorensen, K. y H. Flyvbjerg. (2004) Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.* **75**: 594-612.
- Berns, M.W., Y. Tadir, H. Liang y B. Tromberg. (1998) Laser scissors and tweezers. *Methods Cell Biol.* **55**: 71-98.
- Berns, M.W., W.H. Wright, B.J. Tromberg, G.A. Profeta, J.J. Andrews y R.J. Walter. (1989) Use of a laser-induced optical force trap to study chromosome movement on the mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 4539-43.
- Besteman, K., K. Van Eijk y S.G. Lemay. (2007) Charge inversion accompanies DNA condensation by multivalent ions. *Nature Physics* **3**: 641-4.
- Bettencourt-Dias, M. y D.M. Glover. (2007) Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**: 451-63.
- Binnig, G., C.F. Quate y C. Gerber. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**: 930-3.
- Block, S.M., D.F. Blair y H.C. Berg. (1989) Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature* **338**: 514-8.
- Block, S.M., L.S. Goldstein y B.J. Schnapp. (1990) Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* **348**: 348-52.

- Block, S.M. y K. Svoboda. (1995) Analysis of high resolution recordings of motor movement. *Biophys. J.* **68**: 230s-41s.
- Bloomfield, V.A. (1997) DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* **44**: 269-82.
- Bockelmann, U. (2004) Single-molecule manipulation of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 368-73.
- Bockelmann, U., P. Thomen, B. Essevaz-Roulet, V. Viasnoff y F. Heslot. (2002) Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips. *Biophys. J.* **82**: 1537-53.
- Bornens, M. (2002) Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**: 25-34.
- Borovok, N., T. Molotsky, J. Ghabboun, H. Cohen, D. Porath y A. Kotlyar. (2007) Poly(dG)-poly(dC) DNA appears shorter than poly(dA)-poly(dT) and possibly adopts an A-related conformation on a mica surface under ambient conditions. *FEBS Letters* **581**: 5843-6.
- Bouchiat, C., M.D. Wang, J. Allemand, T. Strick, S.M. Block y V. Croquette. (1999) Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements. *Biophys. J.* **76**: 409-13.
- Brahms, J. y W.F. Mommaerts. (1964) A study of conformation of nucleic acids in solution by means of circular dichroism. *J. Mol. Biol.* **10**: 73-88.
- Bronkhorst, P.J., G.J. Streekstra, J. Grimbergen, E.J. Nijhof, J.J. Sixma y G.J. Brakenhoff. (1995) A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophys. J.* **69**: 1666-73.
- Brouhard, G.J., J.H. Stear, T.L. Noetzel, J. Al-Bassam, K. Kinoshita, S.C. Harrison, J. Howard y A.A. Hyman. (2008) XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**: 79-88.
- Brower-Toland, B.D., C.L. Smith, R.C. Yeh, J.T. Lis, C.L. Peterson y M.D. Wang. (2002) Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 1960-5.
- Bryant, Z., M.D. Stone, J. Gore, S.B. Smith, N.R. Cozzarelli y C. Bustamante. (2003) Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature* **424**: 338-41.
- Buican, T.N. (1991). Automated cell separation techniques based on optical trapping, en *Cell separation science and technology*. D.S. Kompala y P.T. Todd, eds. American Chemical Society, pp. 59-72.
- Bustamante, C., Z. Bryant y S.B. Smith. (2003) Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature* **421**: 423-7.
- Bustamante, C., J.C. Macosko y G.J. Wuite. (2000) Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 130-6.
- Bustamante, C., J.F. Marko, E.D. Siggia y S. Smith. (1994) Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* **265**: 1599-600.
- Bustamante, C. y S.B. Smith (2006). Light-force sensor and method for measuring axial optical-trap forces from changes in light momentum along an optic axis. *Estados Unidos*. **7133132**.
- Calladine, C.R. y H.R. Drew. (1984) A base-centred explanation of the B-to-A transition in DNA. *J. Mol. Biol.* **178**: 773-82.

- Carrión-Vázquez, M., A.F. Oberhauser, S.B. Fowler, P.E. Marszalek, S.E. Broedel, J. Clarke y J.M. Fernandez. (1999) Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 3694-9.
- Cheetham, G.M. y T.A. Steitz. (1999) Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science* **286**: 2305-9.
- Chemla, Y.R., K. Aathavan, J. Michaelis, S. Grimes, P.J. Jardine, D.L. Anderson y C. Bustamante. (2005) Mechanism of force generation of a viral DNA packaging motor. *Cell* **122**: 683-92.
- Choquet, D., D.P. Felsenfeld y M.P. Sheetz. (1997) Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* **88**: 39-48.
- Clausen-Schaumann, H., M. Rief, C. Tolksdorf y H.E. Gaub. (2000) Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophys. J.* **78**: 1997-2007.
- Cluzel, P., A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.L. Viovy, D. Chatenay y F. Caron. (1996) DNA: an extensible molecule. *Science* **271**: 792-4.
- Coffey, W.T., Y.P. Kalmykov y J.T. Waldron. (1996) *The Langevin equation with applications in Physics, Chemistry and Electrical Engineering*. Singapore, World Scientific.
- Cui, Y. y C. Bustamante. (2000) Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 127-32.
- D'Agostino, L., M. di Pietro y A. Di Luccia. (2005) Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation. *FEBS J.* **272**: 3777-87.
- Dai, J. y M.P. Sheetz. (1995) Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers. *Biophys. J.* **68**: 988-96.
- Davenport, R.J., G.J. Wuite, R. Landick y C. Bustamante. (2000) Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by E. coli RNA polymerase. *Science* **287**: 2497-500.
- Detrich, H.W., 3rd y S.A. Overton. (1986) Heterogeneity and structure of brain tubulins from cold-adapted Antarctic fishes. Comparison to brain tubulins from a temperate fish and a mammal. *J. Biol. Chem.* **261**: 10922-30.
- Djabali, M., C. Nguyen, I. Biunno, B.A. Oostra, M.G. Mattei, J.E. Ikeda y B.R. Jordan. (1991) Laser microdissection of the fragile X region: identification of cosmid clones and of conserved sequences in this region. *Genomics* **10**: 1053-60.
- Doxsey, S. (2001) Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**: 688-98.
- Dumont, S., W. Cheng, V. Serebrov, R.K. Beran, I. Tinoco, Jr., A.M. Pyle y C. Bustamante. (2006) RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* **439**: 105-8.
- Ebner, T., M. Moser y G. Tews. (2005) Possible applications of a non-contact 1.48 microm wavelength diode laser in assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod. Update* **11**: 425-35.
- Edidin, M., S.C. Kuo y M.P. Sheetz. (1991) Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science* **254**: 1379-82.
- Eom, S.H., J. Wang y T.A. Steitz. (1996) Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* **382**: 278-81.
- Essevaz-Roulet, B., U. Bockelmann y F. Heslot. (1997) Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 11935-40.

- Fang, Y., T.S. Spisz y J.H. Hoh. (1999) Ethanol-induced structural transitions of DNA on mica. *Nucl. Acids Res.* **27**: 1943-9.
- Felgner, H., R. Frank y M. Schliwa. (1996) Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. *J. Cell Sci.* **109**: 509-16.
- Finer, J.T., R.M. Simmons y J.A. Spudich. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**: 113-9.
- Florentiev, V.L. y V.I. Ivanov. (1970) RNA polymerase: two-step mechanism with overlapping steps. *Nature* **228**: 519-22.
- Fornells, M., J.L. Campos y J.A. Subirana. (1983) Changes of conformation of DNA produced by mechanical forces. *J. Mol. Biol.* **166**: 249-52.
- Franklin, R.E. y R.G. Gosling. (1953) Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **171**: 740-1.
- Fuhr, G., T. Schnelle, T. Müller, H. Hitzler, S. Monajembashi y K.O. Greulich. (1998) Force measurements of optical tweezers in electro-optical cages. *Appl. Phys. A* **67**: 385-90.
- Gagliardi, L.J. (2002) Electrostatic force in prometaphase, metaphase, and anaphase-A chromosome motions. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter. Phys.* **66**: 011901.
- Gagliardi, L.J. (2008) Induced electrostatic charge in poleward motion of chromosomes during mitosis. *J. Electrostat.* **66**: 147-55.
- Girod, J.C., W.C. Johnson, Jr., S.K. Huntington y M.F. Maestre. (1973) Conformation of deoxyribonucleic acid in alcohol solutions. *Biochemistry* **12**: 5092-6.
- Gonzalez, C., G. Tavosanis y C. Mollinari. (1998) Centrosomes and microtubule organisation during *Drosophila* development. *J. Cell Sci.* **111**: 2697-706.
- Gordon, J.P. (1973) Radiation forces and momenta in dielectric media. *Phys. Rev. A* **8**: 14.
- Gosse, C. y V. Croquette. (2002) Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys. J.* **82**: 3314-29.
- Gosule, L.C. y J.A. Schellman. (1976) Compact form of DNA induced by spermidine. *Nature* **259**: 333-5.
- Gray, D.M., R.L. Ratliff y M.R. Vaughan. (1992) Circular dichroism spectroscopy of DNA. *Methods Enzymol.* **211**: 389-406.
- Greulich, K.O. (1992) Chromosome microtechnology: microdissection and microcloning. *Trends Biotechnol.* **10**: 48-51.
- Gross, S.P., M.A. Welte, S.M. Block y E.F. Wieschaus. (2000) Dynein-mediated cargo transport *in vivo*. A switch controls travel distance. *J. Cell. Biol.* **148**: 945-56.
- Hagerman, P.J. (1988) Flexibility of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**: 265-86.
- Happel, J. y H. Brenner. (1991) *Low Reynolds number hydrodynamics*. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic.
- He, W., Y.G. Liu, M. Smith y M.W. Berns. (1997) Laser microdissection for generation of a human chromosome region-specific library. *Microscopy and Microanalysis* **3**: 47-52.
- Hegner, M., S.B. Smith y C. Bustamante. (1999) Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 10109-14.
- Hirokawa, N. (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 74-81.

- Horcas, I., R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero y A.M. Baro. (2007) WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **78**: 013705.
- Hormeno, S. y J.R. Arias-Gonzalez. (2006) Exploring mechanochemical processes in the cell with optical tweezers. *Biol. Cell* **98**: 679-95.
- Huber, R., S. Burggraf, T. Mayer, S.M. Barns, P. Rossmagel y K.O. Stetter. (1995) Isolation of a hyperthermophilic archaeum predicted by in situ RNA analysis. *Nature* **376**: 57-8.
- Hud, N.V. y K.H. Downing. (2001) Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 14925-30.
- Husale, S., W. Grange, M. Karle, S. Burgi y M. Hegner. (2008) Interaction of cationic surfactants with DNA: a single-molecule study. *Nucl. Acids Res.* **36**: 1443-9.
- Ibrahim, R., C. Messaoudi, F.J. Chichon, C. Celati y S. Marco. (2008) Electron tomography study of isolated human centrioles. *Microsc. Res. Tech.* **72**: 42-8.
- Ishijima, A., H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka y T. Yanagida. (1998) Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell* **92**: 161-71.
- Ishijima, A., H. Kojima, H. Higuchi, Y. Harada, T. Funatsu y T. Yanagida. (1996) Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: unitary steps and forces. *Biophys. J.* **70**: 383-400.
- Ivanov, V.I., L.E. Minchenkova, E.E. Minyat, M.D. Frank-Kamenetskii y A.K. Schyolkina. (1974) The B to A transition of DNA in solution. *J. Mol. Biol.* **87**: 817-33.
- Ivanov, V.I., L.E. Minchenkova, A.K. Schyolkina y A.I. Poletayev. (1973) Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism. *Biopolymers* **12**: 89-110.
- Jovin, T.M., D.M. Soumpasis y L.P. McIntosh. (1987) The transition between B-DNA and Z-DNA. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **38**: 521-60.
- Kankia, B.I., V. Buckin y V.A. Bloomfield. (2001) Hexamminecobalt(III)-induced condensation of calf thymus DNA: circular dichroism and hydration measurements. *Nucl. Acids Res.* **29**: 2795-801.
- Kasevich, M. y S. Chu. (1991) Atomic interferometry using stimulated Raman transitions. *Phys. Rev. Lett.* **67**: 181-4.
- Katz, E., C.J. Thompson y D.A. Hopwood. (1983) Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2703-14.
- Ketterle, W. (1999) Experimental studies of Bose-Einstein condensation. *Physics Today* **52**: 30-5.
- Kishino, A. y T. Yanagida. (1988) Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334**: 74-6.
- Kitamura, K., M. Tokunaga, A.H. Iwane y T. Yanagida. (1999) A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres. *Nature* **397**: 129-34.
- Knight, A.E., C. Veigel, C. Chambers y J.E. Molloy. (2001) Analysis of single-molecule mechanical recordings: application to acto-myosin interactions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **77**: 45-72.

- Kojima, H., E. Muto, H. Higuchi y T. Yanagida. (1997) Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.* **73**: 2012-22.
- Konig, K., H. Liang, M.W. Berns y B.J. Tromberg. (1995) Cell damage by near-IR microbeams. *Nature* **377**: 20-1.
- Kovacic, P. (2008) Bioelectrostatics: Review of widespread importance in biochemistry. *J. Electrostat.* **66**: 124-9.
- Kurachi, M., M. Hoshi y H. Tashiro. (1995) Buckling of a single microtubule by optical trapping forces: direct measurement of microtubule rigidity. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **30**: 221-8.
- Kuriyama, R. y G.G. Borisy. (1981) Microtubule-nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle. *J. Cell Biol.* **91**: 822-6.
- Kusumi, A., Y. Sako, T. Fujiwara y M. Tomishige. (1998) Application of laser tweezers to studies of the fences and tethers of the membrane skeleton that regulate the movements of plasma membrane proteins. *Methods Cell Biol.* **55**: 173-94.
- Kypr, J., I. Kejnovska, D. Rencuk y M. Vorlickova. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucl. Acids Res.* **37**: 1713-25.
- Lang, D. (1969) Collapse of single DNA molecules in ethanol. *J. Mol. Biol.* **46**: 209.
- Lange, B.M. y K. Gull. (1996) Structure and function of the centriole in animal cells: progress and questions. *Trends Cell Biol.* **6**: 348-52.
- Lange, B.M., G. Kirfel, I. Gestmann, V. Herzog y C. Gonzalez. (2005) Structure and microtubule-nucleation activity of isolated *Drosophila* embryo centrosomes characterized by whole mount scanning and transmission electron microscopy. *Histochem. Cell Biol.* **124**: 325-34.
- Lepault, J., J. Dubochet, W. Baschong y E. Kellenberger. (1987) Organization of double-stranded DNA in bacteriophages: a study by cryo-electron microscopy of vitrified samples. *EMBO J.* **6**: 1507-12.
- Leslie, A.G., S. Arnott, R. Chandrasekaran y R.L. Ratliff. (1980) Polymorphism of DNA double helices. *J. Mol. Biol.* **143**: 49-72.
- Liang, H., K.T. Vu, P. Krishnan, T.C. Trang, D. Shin, S. Kimel y M.W. Berns. (1996) Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping. *Biophys. J.* **70**: 1529-33.
- Liang, H., W.H. Wright, S. Cheng, W. He y M.W. Berns. (1993) Micromanipulation of chromosomes in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical force (optical tweezers). *Exp. Cell Res.* **204**: 110-20.
- Linhartova, I., E. Draberova, V. Viklicky y P. Draber. (1993) Distribution of non-class-III beta-tubulin isoforms in neuronal and non-neuronal cells. *FEBS Letters* **320**: 79-82.
- Liphardt, J., B. Onoa, S.B. Smith, I.J. Tinoco y C. Bustamante. (2001) Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. *Science* **292**: 733-7.
- Lu, X.J., Z. Shakked y W.K. Olson. (2000) A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures. *J. Mol. Biol.* **300**: 819-40.
- Madhus, I.H. (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem. J.* **250**: 1-8.
- Maier, B., I. Chen, D. Dubnau y M.P. Sheetz. (2004) DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 643-9.

- Mallik, R., B.C. Carter, S.A. Lex, S.J. King y S.P. Gross. (2004) Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* **427**: 649-52.
- Manning, G.S. (1978) Molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to electrostatic properties of polynucleotides. *Quart. Rev. Biophys.* **11**: 179-246.
- Mao, H., J.R. Arias-Gonzalez, S.B. Smith, I. Tinoco, Jr. y C. Bustamante. (2005) Temperature control methods in a laser tweezers system. *Biophys. J.* **89**: 1308-16.
- Matulis, D., I. Rouzina y V.A. Bloomfield. (2002) Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: roles of electrostatics and hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 7331-42.
- Mazur, A.K. (2005) Electrostatic polymer condensation and the A/B polymorphism in DNA: Sequence effects. *J. Chem. Theory Comput.* **1**: 325-36.
- McCaig, C.D., A.M. Rajnicek, B. Song y M. Zhao. (2005) Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol. Rev.* **85**: 943-78.
- Mehta, A.D., R.S. Rock, M. Rief, J.A. Spudich, M.S. Mooseker y R.E. Cheney. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400**: 590-3.
- Mershin, A., A.A. Kolomenski, H.A. Schuessler y D.V. Nanopoulos. (2004) Tubulin dipole moment, dielectric constant and quantum behavior: computer simulations, experimental results and suggestions. *Biosystems* **77**: 73-85.
- Minchenkova, L.E., A.K. Schyolkina, B.K. Chernov y V.I. Ivanov. (1986) CC/GG contacts facilitate the B to A transition of DNA in solution. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**: 463-76.
- Minyat, E.E., V.I. Ivanov, A.M. Kritzyn, L.E. Minchenkova y A.K. Schyolkina. (1979) Spermine and spermidine-induced B to A transition of DNA in solution. *J. Mol. Biol.* **128**: 397-409.
- Monajembashi, S., C. Cremer, T. Cremer, J. Wolfrum y K.O. Greulich. (1986) Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam. *Exp. Cell Res.* **167**: 262-5.
- Moritz, M., M.B. Braunfeld, J.C. Fung, J.W. Sedat, B.M. Alberts y D.A. Agard. (1995) Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* **130**: 1149-59.
- Muller, D.J., W. Baumeister y A. Engel. (1999) Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 13170-4.
- Murayama, Y., Y. Sakamaki y M. Sano. (2003) Elastic response of single DNA molecules exhibits a reentrant collapsing transition. *Phys. Rev. Lett.* **90**: 018102-4.
- Narainui, H., H. Akutsu y Y. Kyogoku. (1985) Alcohol induced B-A transition of DNAs with different base composition studied by circular-dichroism. *J. Biochem.* **98**: 629-36.
- Neuman, K.C., E.A. Abbondanzieri, R. Landick, J. Gelles y S.M. Block. (2003) Ubiquitous transcriptional pausing is independent of RNA polymerase backtracking. *Cell* **115**: 437-47.
- Nishimura, Y., C. Torigoe y M. Tsuboi. (1985) An A-form poly(dG)·poly(dC) in H₂O solution. *Biopolymers* **24**: 1841-4.
- Noy, A., A. Perez, C. A. Laughton y M. Orozco. (2007) Theoretical study of large conformational transitions in DNA: the B $\leftrightarrow$ A conformational change in water and ethanol/water. *Nucleic Acids Res.* **35**: 3330-8.

- Oesterhelt, F., D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H.E. Gaub y D.J. Muller. (2000) Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* **288**: 143-6.
- Onoa, B., S. Dumont, J. Liphardt, S.B. Smith, I. Tinoco, Jr. y C. Bustamante. (2003) Identifying kinetic barriers to mechanical unfolding of the T. thermophila ribozyme. *Science* **299**: 1892-5.
- Paintrand, M., M. Moudjou, H. Delacroix y M. Bornens. (1992) Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J. Struct. Biol.* **108**: 107-28.
- Pastor, N. (2005) The B- to A-DNA transition and the reorganization of solvent at the DNA surface. *Biophys. J.* **88**: 3262-75.
- Pastre, D., O. Pietrement, F. Landousy, L. Hamon, I. Sorel, M.O. David, E. Delain, A. Zozime y E. Le Cam. (2006) A new approach to DNA bending by polyamines and its implication in DNA condensation. *Eur. Biophys. J.* **35**: 214-23.
- Piskur, J. y A. Rupprecht. (1995) Aggregated DNA in ethanol solution. *FEBS Letters* **375**: 174-8.
- Pluta, M. (1988) *Advanced light microscopy, Vol. I*. Amsterdam, Elsevier Science Publishing.
- Pokorný, J., F. Jelínek y V. Trkal. (1998) Electric field around microtubules. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **45**: 239-45.
- Ranjbar, B. y P. Gill. (2009) Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses. *Chem. Biol. Drug. Des.* **74**: 101-20.
- Raspaud, E., I. Chaperon, A. Leforestier y F. Livolant. (1999) Spermine-induced aggregation of DNA, nucleosome, and chromatin. *Biophys. J.* **77**: 1547-55.
- Reich, Z., R. Ghirlando y A. Minsky. (1991) Secondary conformational polymorphism of nucleic acids as a possible functional link between cellular parameters and DNA packaging processes. *Biochemistry* **30**: 7828-36.
- Ritort, F., S. Mihadja, S.B. Smith y C. Bustamante. (2006) Condensation transition in DNA-polyaminoamide dendrimer fibers studied using optical tweezers. *Phys. Rev. Lett.* **96**: 118301.
- Rivetti, C., M. Guthold y C. Bustamante. (1996) Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.* **264**: 919-32.
- Robinson, H. y A.H. Wang. (1996) Neomycin, spermine and hexaamminecobalt (III) share common structural motifs in converting B- to A-DNA. *Nucl. Acids Res.* **24**: 676-82.
- Rock, R.S., S.E. Rice, A.L. Wells, T.J. Purcell, J.A. Spudich y H.L. Sweeney. (2001) Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 13655-9.
- Rotsch, C., K. Jacobson y M. Radmacher. (1999) Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 921-6.
- Rouzina, I. y V.A. Bloomfield. (2001a) Force-induced melting of the DNA double helix 1. Thermodynamic analysis. *Biophys. J.* **80**: 882-93.
- Rouzina, I. y V.A. Bloomfield. (2001b) Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions. *Biophys. J.* **80**: 894-900.
- Rudd, L., D.J. Lee y A.A. Kornyshev. (2007) The role of electrostatics in the B to A transition of DNA: from solution to assembly. *J. Phys. Condens. Matter* **19**: 416103-22.

- Rupprecht, A., J. Piskur, J. Schultz, L. Nordenskiöld, Z.Y. Song y G. Lahajnar. (1994) Mechanochemical study of conformational transitions and melting of Li-, Na-, K-, and CsDNA fibers in ethanol-water solutions. *Biopolymers* **34**: 897-920.
- Ryu, W.S., R.M. Berry y H.C. Berg. (2000) Torque-generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature* **403**: 444-7.
- Saenger, W. (1984) *Principles of nucleic acid structure*. Nueva York, Springer-Verlag.
- Saenger, W., W.N. Hunter y O. Kennard. (1986) DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups. *Nature* **324**: 385-8.
- Sako, Y., A. Nagafuchi, S. Tsukita, M. Takeichi y A. Kusumi. (1998) Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking: corralling and tethering by the membrane skeleton. *J. Cell Biol.* **140**: 1227-40.
- Saleh, B.E.A. y M.C. Teich. (2007) *Fundamentals of photonics*. Nueva Jersey, Wiley.
- Salman, H., D. Zbaida, Y. Rabin, D. Chatenay y M. Elbaum. (2001) Kinetics and mechanism of DNA uptake into the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7247-52.
- SantaLucia, J., Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 1460-5.
- Schmidt, C.E., A.F. Horwitz, D.A. Lauffenburger y M.P. Sheetz. (1993) Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J. Cell Biol.* **123**: 977-91.
- Schnitzer, M.J. y S.M. Block. (1997) Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* **388**: 386-90.
- Schopper, B., M. Ludwig, J. Edenfeld, S. Al-Hasani y K. Diedrich. (1999) Possible applications of lasers in assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.* **14**: 186-93.
- Schutze, K., A. Clement-Sengewald y A. Ashkin. (1994) Zona drilling and sperm insertion with combined laser microbeam and optical tweezers. *Fertil. Steril.* **61**: 783-6.
- Seeger, S., S. Monajembashi, K.J. Hutter, G. Fütterman, J. Wolfrum y K.O. Greulich. (1991) Application of laser optical tweezers in immunology and molecular genetics. *Cytometry* **12**: 497-504.
- Seol, Y., J. Li, P.C. Nelson, T.T. Perkins y M.D. Betterton. (2007) Elasticity of short DNA molecules: theory and experiment for contour lengths of 0.6-7 microm. *Biophys. J.* **93**: 4360-73.
- Setlow, P. (1992) DNA in dormant spores of *Bacillus* species is in an A-like conformation. *Mol. Microbiol.* **6**: 563-7.
- Shaevitz, J.W., E.A. Abbondanzieri, R. Landick y S.M. Block. (2003) Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution. *Nature* **426**: 684-7.
- Shaevitz, J.W., S.M. Block y M.J. Schnitzer. (2005) Statistical kinetics of macromolecular dynamics. *Biophys. J.* **89**: 2277-85.
- Sharp, D.J., G.C. Rogers y J.M. Scholey. (2000) Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**: 41-7.
- Shivashankar, G.V., M. Feingold, O. Krichevsky y A. Libchaber. (1999) RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: the role of ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 7916-21.

- Simmons, R.M., J.T. Finer, S. Chu y J.A. Spudich. (1996) Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys. J.* **70**: 1813-22.
- Sivasankar, S., S. Subramaniam y D. Leckband. (1998) Direct molecular level measurements of the electrostatic properties of a protein surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12961-6.
- Smith, D.E., S.J. Tans, S.B. Smith, S. Grimes, D.L. Anderson y C. Bustamante. (2001) The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* **413**: 748-52.
- Smith, S.B., Y. Cui y C. Bustamante. (1996) Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* **271**: 795-9.
- Smith, S.B., Y. Cui y C. Bustamante. (2003) Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum. *Methods Enzymol.* **361**: 134-62.
- Smith, S.B., L. Finzi y C. Bustamante. (1992) Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* **258**: 1122-6.
- Stebbing, H. y C. Hunt. (1982) The nature of the clear zone around microtubules. *Cell Tissue Res.* **227**: 609-17.
- Steubing, R.W., S. Cheng, W.H. Wright, Y. Numajiri y M.W. Berns. (1991) Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap. *Cytometry* **12**: 505-10.
- Stone, M.D., Z. Bryant, N.J. Crisna, S.B. Smith, A. Vologodskii, C. Bustamante y N.R. Cozzarelli. (2003) Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 8654-9.
- Stracke, R., K.J. Bohm, L. Wollweber, J.A. Tuszyński y E. Unger. (2002) Analysis of the migration behaviour of single microtubules in electric fields. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 602-9.
- Strick, T.R., J.F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon y V. Croquette. (1996) The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* **271**: 1835-7.
- Strick, T.R., V. Croquette y D. Bensimon. (2000) Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature* **404**: 901-4.
- Subirana, J.A. y M. Soler-Lopez. (2003) Cations as hydrogen bond donors: a view of electrostatic interactions in DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**: 27-45.
- Suzuki, M., D. Loakes y N. Yagi. (1996) DNA conformation and its changes upon binding transcription factors. *Adv. Biophys.* **32**: 53-72.
- Svoboda, K. y S.M. Block. (1994) Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 247-85.
- Svoboda, K., C.F. Schmidt, D. Branton y S.M. Block. (1992) Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* **63**: 784-93.
- Svoboda, K., C.F. Schmidt, B.J. Schnapp y S.M. Block. (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* **365**: 721-7.
- Tadir, Y., W.H. Wright, O. Vafa, L.H. Liaw, R. Asch y M.W. Berns. (1991) Micromanipulation of gametes using laser microbeams. *Hum. Reprod.* **6**: 1011-6.
- Tadir, Y., W.H. Wright, O. Vafa, T. Ord, R.H. Asch y M.W. Berns. (1989) Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap. *Fertil. Steril.* **52**: 870-3.

- Thomas, T. y T.J. Thomas. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life. Sci.* **58**: 244-58.
- Thomas, T.J. y V.A. Bloomfield. (1984) Ionic and structural effects on the thermal helix-coil transition of DNA complexed with natural and synthetic polyamines. *Biopolymers* **23**: 1295-306.
- Townes-Anderson, E., R.S. St Jules, D.M. Sherry, J. Lichtenberger y M. Hassanain. (1998) Micromanipulation of retinal neurons by optical tweezers. *Mol. Vis.* **4**: 12.
- Trantirek, L., R. Stefl, M. Vorlickova, J. Koca, V. Sklenar y J. Kypr. (2000) An A-type double helix of DNA having B-type puckering of the deoxyribose rings. *J. Mol. Biol.* **297**: 907-22.
- Tsuda, Y., H. Yasutake, A. Ishijima y T. Yanagida. (1996) Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by *in vitro* micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 12937-42.
- Tyner, K.M., R. Kopelman y M.A. Philbert. (2007) "Nanosized voltmeter" enables cellular-wide electric field mapping. *Biophys. J.* **93**: 1163-74.
- Usaty, A.F. y L.S. Shlyakhtenko. (1974) Melting of DNA in ethanol-water solutions. *Biopolymers* **13**: 2435-46.
- van Dam, L., N. Korolev y L. Nordenskiöld. (2002) Polyamine-nucleic acid interactions and the effects on structure in oriented DNA fibers. *Nucl. Acids Res.* **30**: 419-28.
- van den Heuvel, M.G., S. Bolhuis y C. Dekker. (2007) Persistence length measurements from stochastic single-microtubule trajectories. *Nano Lett.* **7**: 3138-44.
- Van den Heuvel, M.G., M.P. de Graaff y C. Dekker. (2008) Microtubule curvatures under perpendicular electric forces reveal a low persistence length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 7941-6.
- Vassilev, P. y M. Kanazirska. (1985) The role of cytoskeleton in the mechanisms of electric field effects and information transfer in cellular systems. *Med. Hypotheses* **16**: 93-6.
- Viani, M.B., T.E. Schaffer, A. Chand, M. Rief, H.E. Gaub y P.K. Hansma. (1999) Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules. *J. Appl. Phys.* **86**: 2258-62.
- Vilfan, I.D., J. Lipfert, D.A. Koster, S.G. Lemay y N.H. Dekker (2009). Magnetic tweezers for single-molecule experiments. *Handbook of single-molecule biophysics*. P. Hinterdorfen y A. van Oijen, eds. Springer, pp. 371-95.
- Visscher, K., M.J. Schnitzer y S.M. Block. (1999) Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* **400**: 184-9.
- Vorobjev, I.A., H. Liang, W.H. Wright y M.W. Berns. (1993) Optical trapping for chromosome manipulation: a wavelength dependence of induced chromosome bridges. *Biophys. J.* **64**: 533-8.
- Wada, K., K. Sasaki y H. Masuhara. (2002) Electric charge measurement on a single microparticle using thermodynamic analysis of electrostatic forces. *Appl. Phys. Lett.* **81**: 1768-70.
- Wahl, M.C. y M. Sundaralingam. (1997) Crystal structures of A-DNA duplexes. *Biopolymers* **44**: 45-63.
- Wang, M.C. y G.E. Uhlenbeck. (1945) On the theory of the Brownian motion II. *Rev. Mod. Phys.* **17**: 323-42.

- Wang, M.D., M.J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles y S.M. Block. (1998) Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* **282**: 902-7.
- Wang, M.D., H. Yin, R. Landick, J. Gelles y S.M. Block. (1997) Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.* **72**: 1335-46.
- Wang, Z., S. Khan y M.P. Sheetz. (1995) Single cytoplasmic dynein molecule movements: characterization and comparison with kinesin. *Biophys. J.* **69**: 2011-23.
- Watson, J.D. y F.H. Crick. (1953) Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-8.
- Welte, M.A., S.P. Gross, M. Postner, S.M. Block y E.F. Wieschaus. (1998) Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell* **92**: 547-57.
- Wenner, J.R., M.C. Williams, I. Rouzina y V.A. Bloomfield. (2002) Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophys. J.* **82**: 3160-9.
- Widom, J. y R.L. Baldwin. (1980) Cation-induced toroidal condensation of DNA studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$. *J. Mol. Biol.* **144**: 431-53.
- Williams, M.C., J.R. Wenner, I. Rouzina y V.A. Bloomfield. (2001a) Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA melting. *Biophys. J.* **80**: 874-81.
- Williams, M.C., J.R. Wenner, I. Rouzina y V.A. Bloomfield. (2001b) Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching. *Biophys. J.* **80**: 1932-9.
- Wright, W.H., G.J. Sonek y M.W. Berns. (1994) Parametric study of the forces on microspheres held by optical tweezers. *Appl. Opt.* **33**: 1735-48.
- Wuite, G.J., R.J. Davenport, A. Rappaport y C. Bustamante. (2000a) An integrated laser trap/flow control video microscope for the study of single biomolecules. *Biophys. J.* **79**: 1155-67.
- Wuite, G.J., S.B. Smith, M. Young, D. Keller y C. Bustamante. (2000b) Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity. *Nature* **404**: 103-6.
- Xu, Q., R.K. Shoemaker y W.H. Braunlin. (1993) Induction of B-A transitions of deoxyoligonucleotides by multivalent cations in dilute aqueous solution. *Biophys. J.* **65**: 1039-49.
- Yang, X.L. y A.H.J. Wang. (1999) Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol. Ther.* **83**: 181-215.
- Yin, H., M.D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S.M. Block y J. Gelles. (1995) Transcription against an applied force. *Science* **270**: 1653-7.
- Zhao, M., J.V. Forrester y C.D. McCaig. (1999) A small, physiological electric field orients cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 4942-6.