



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Estudiando un motor molecular a nivel de moléculas individuales

Studying a molecular motor at the single-molecule level

Gutiérrez Medina, Braulio<sup>1\*</sup>

I. División de Materiales Avanzados y Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT)

\*Correspondencia. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., Col. Lomas 4ª Sección, San Luis Potosí, San Luis Potosí, CP 78216 Tel. +52 (444) 834-2000, [bgutierrez@ipicyt.edu.mx](mailto:bgutierrez@ipicyt.edu.mx)

### Resumen

Durante las últimas décadas se han desarrollado tecnologías que permiten estudiar macromoléculas a nivel individual. En el IPICYT hemos construido una de estas herramientas, un sistema de micro-manipulación por láser conocido como pinzas ópticas, por medio del cual logramos medir los desplazamientos y las fuerzas desarrollados por una proteína motora llamada cinesina al desplazarse sobre microtúbulos. Realizamos experimentos de transporte *in vitro* empleando cinesinas individuales o grupos de ellas unidas a un mismo cargamento (una microesfera). Al incrementar el número de motores sobre un mismo cargamento, encontramos eventos de transporte con desplazamiento y fuerza considerablemente mayores a los correspondientes a cinesinas individuales. Sin embargo, los valores promedio de desplazamiento o fuerza se modifican tan solo de manera marginal. Estas observaciones sugieren que el transporte efectuado por la cinesina involucra principalmente a motores individuales.

**Palabras clave:** Cinesina, transporte intracelular, pinzas ópticas.

### Abstract

During the last decades technologies have been developed that allow the study of macromolecules at an individual level. We have built one of these tools at IPICYT, a laser system of micro-manipulation known as optical tweezers that we use to measure the displacements and the forces developed by the motor protein called kinesin as it displaces on microtubules. We carry out *in vitro* transport experiments using individual kinesins or groups of them bound to the same cargo (a microsphere). By increasing the number of motors on the same cargo, we observed transport events with displacement and force considerably greater than those corresponding to individual kinesins. However, averages of displacement or force are modified only marginally. These observations suggest that the transport made by kinesin involves mainly individual motors.

**Key words:** Kinesin, intracellular transport, optical tweezers.

### Introducción

Los motores moleculares o proteínas motoras son macromoléculas que convierten energía química en trabajo mecánico. Dentro de la célula, los motores moleculares están involucrados en una diversidad de

funciones. Algunos ejemplos de proteínas motoras son: la cinesina, que acarrea cargamentos de un sitio a otro; la miosina, responsable de desarrollar la fuerza mecánica en un músculo; las transcriptasas, que replican el ácido desoxirribonucleico (ADN); las polimerasas, que transcriben el ADN en ácido

ribonucleico (ARN); los ribosomas, que llevan a cabo la traducción del ARN en proteínas; las helicasas, que despliegan estructuras complejas de ARN y ADN; la  $F_0F_1$  ATPasa, que transporta iones a través de la membrana celular, etc.

Todos estos motores hacen uso de cofactores, lo que les permite obtener la energía química necesaria para realizar sus funciones. Entre los cofactores más comunes está el trifosfato de adenosina o ATP. El ATP está integrado por una adenina, una ribosa y tres grupos de fosfato. Un enlace fosfoanhidrido que es altamente reactivo y puede liberar energía química mediante una reacción de hidrólisis, liberando unos 50 kJ/mol de energía. Esta energía  $E_0$  asociada a fluctuaciones térmicas ( $E_0 = k_B T$ , en donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es temperatura). En general, los motores moleculares unen su cofactor respectivo, promueven la reacción de hidrólisis y parte de la energía disponible se convierte en trabajo mecánico (otra parte se disipa como calor).

En las últimas dos décadas se ha registrado un aumento exponencial en el estudio de los motores moleculares. Este interés se debe en buena parte a los avances bioquímicos y tecnológicos que permiten estudiar y manipular una sola molécula a la vez. A este nuevo campo de estudio en donde se interrogan mecanismos de funcionamiento mediante la observación de una molécula se le conoce como *biofísica de molécula única* o *de moléculas individuales* [1-5]. La capacidad de estudiar una molécula a la vez permite: observar la localización celular de moléculas biológicas con precisión, estudiar variaciones en el comportamiento molecular que son automáticamente promediadas en experimentos bioquímicos, analizar la dinámica espacial y temporal de cambios estructurales, establecer los panoramas energéticos de interacción enzima-sustrato y conocer las características mecánicas de componentes celulares, entre otras posibilidades. En el Laboratorio de Biofísica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) hemos desarrollado un sistema de microscopía óptica que incorpora una herramienta conocida como *pinza óptica*, con la cual estudiamos el desplazamiento y la generación de fuerza de uno de los motores moleculares más pequeños conocidos: la cinesina [6].

### El motor molecular cinesina

El transporte intracelular en organismos eucariontes es esencial para establecer el alto grado de organización espacio-temporal de la célula. Este

transporte consiste en el traslado de moléculas, macromoléculas, vesículas y organelos en el interior celular [7]. En términos generales, los mecanismos de transporte intracelular pueden ser divididos en dos clases: transporte pasivo y transporte activo [8,9]. El transporte pasivo consiste esencialmente en difusión, debida a la energía térmica, en donde las moléculas efectúan desplazamientos estocásticos no dirigidos (movimiento Browniano). Este tipo de transporte es eficiente a distancias cortas, pero resulta ser lento en extremo para cubrir distancias largas: a una vesícula típica del citoplasma (con un coeficiente de difusión  $D = 3 \times 10^{11}$  cm<sup>2</sup>/s [10]) le tomaría, en promedio, un tiempo de 1 s para viajar 10 nm pero aproximadamente 100 días en recorrer 30  $\mu$ m (el diámetro de una célula HeLa). En contraste, el transporte intracelular activo es dirigido a sitios específicos y es llevado a cabo, fundamentalmente, por proteínas motoras asociadas al citoesqueleto. Estas proteínas pertenecen al grupo que hidroliza ATP y convierte la energía disponible en trabajo mecánico útil, desplazándose y llevando consigo cargamento a lo largo de filamentos del citoesqueleto. En este caso, a un grupo de motores moleculares les tomaría menos de un minuto transportar la misma vesícula del ejemplo anterior a lo largo de una célula HeLa. En resumen: el transporte de una vesícula para ir de un extremo a otro de una célula típica tarda 100 días por difusión y 1 minuto efectuado por la cinesina. De aquí entendemos la importancia de esta proteína motora.

Las cinesinas, dineínas y miosinas constituyen tres grupos de proteínas motoras del citoesqueleto; las cinesinas y las dineínas están asociadas a los microtúbulos (MTs) mientras que las miosinas están asociadas a la actina [11]. Dentro de la familia de las cinesinas, la Cinesina-1 (*Kinesin-1*, en inglés) es la más ampliamente estudiada. La Cinesina-1 participa en el transporte intracelular, desplazándose sobre MTs en forma unidireccional y anterógrada (es decir, hacia el extremo (+) de los MTs) [11,12], por lo que esta cinesina generalmente lleva cargamentos desde la región central hacia la periferia de la célula. Para llevar a cabo este transporte, la cinesina se enfrenta a un ambiente intracelular complejo [10,13,14]: un citoplasma densamente poblado, altamente viscoso y dinámico; en presencia de múltiples MTs; con varios motores moleculares actuando sobre un mismo cargamento; en presencia de proteínas asociadas a MTs (MAPs); bajo la influencia permanente de procesos de difusión; etc. En nuestro laboratorio nos interesa estudiar estos procesos.

La Cinesina-1 (también llamada “cinesina convencional” o simplemente “cinesina”) es la

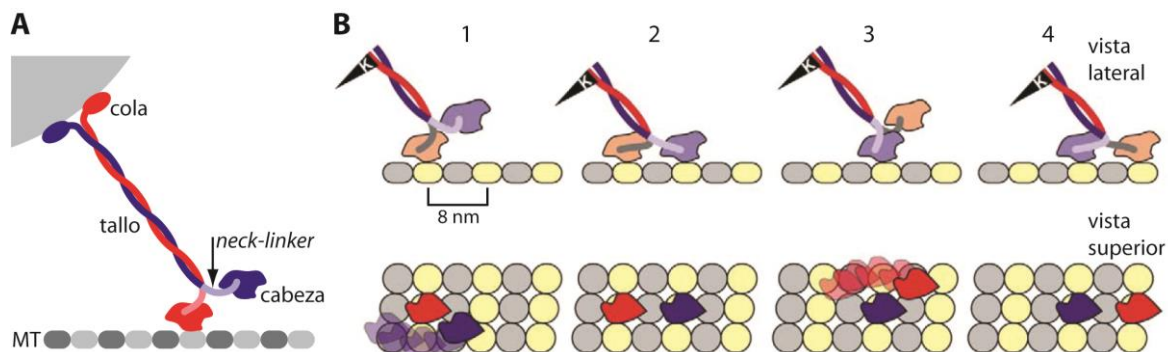
proteína fundadora de la superfamilia de cinesinas, identificada en 1985 como participante en el transporte intracelular rápido en axones y aislada a partir de extractos de células neurales [15]. A continuación se revisan brevemente algunos de los aspectos básicos de lo que se conoce hasta ahora sobre la Cinesina-1 y sus mecanismos de funcionamiento en el transporte intracelular. Por simplicidad, en este documento nos referiremos a la Cinesina-1 como “cinesina”.

### Función

En metazoos se ha encontrado que la cinesina participa en el transporte intracelular de cargamentos conformados por membranas, tales como mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico y vesículas. Asimismo, también transporta otro tipo de cargamentos, como mRNAs y filamentos intermedios [11]. En hongos, se ha encontrado que la cinesina participa en el transporte de vesículas de secreción dirigidas hacia la región apical en crecimiento [16]. Un motor individual de cinesina es capaz de recorrer 1  $\mu\text{m}$  por cada encuentro con un MT, con una velocidad típicas de  $\sim 1 \mu\text{m/s}$ , y generando hasta 7 pN de fuerza para efectuar el transporte [17].

### Estructura

La cinesina es una proteína homodimérica, conformada por dos cadenas polipeptídicas idénticas llamadas cadenas pesadas, las cuales constan de  $\sim 1000$  amino ácidos cada una y dimerizan por medio de una estructura alargada y flexible de tipo tallo a través de dominios “coiled-coil” (ver Figura 1A) [11,17]. Cada una de las dos cadenas pesadas que conforman el homodímero posee en su extremo N-terminal un dominio catalíticamente activo llamado “cabeza”. El dominio de cabeza es globular y posee subdominios con actividad de ATPasa así como de afinidad a los MTs. En el extremo C-terminal de cada cadena pesada se encuentran dominios globulares conocidos como “cola” los cuales están involucrados en la unión a cargamento así como en procesos de autoinhibición de la actividad de ATPasa del dominio de cabeza cuando la cinesina no está uniendo cargamento. En metazoos, la cinesina además asocia dos cadenas polipeptídicas idénticas llamadas cadenas ligeras. Las cadenas ligeras se unen a la cola de las cadenas pesadas y participan en el reconocimiento de cargamentos. Estudios en hongos filamentosos indican que la cinesina convencional de estos organismos carece de las cadenas ligeras [18].



**Figura 1. Esquema general de la cinesina convencional y su mecanismo de motilidad.** **A)** Esquema del homodímero de cinesina (cadenas pesadas) y sus principales dominios. Las dos cadenas polipeptídicas son idénticas y sólo se representan con colores diferentes por claridad. Los dominios que constituyen la cola de la cinesina participan en la unión al cargamento (mostrado parcialmente como un sector circular gris). El MT se muestra esquemáticamente con un protofilamento en donde se alternan los monómeros de alfa (gris oscuro) y beta (gris claro) tubulina. **B)** Modelo de avance “mano-sobre-mano” de la cinesina sobre el MT. En el paso 1 la cabeza libre (azul, vista superior) pasa por la derecha de la cabeza unida al MT (rojo, vista superior). En el paso 2 el neck-linker de la cabeza roja sufre una transición desorden-orden, posicionando la cabeza azul enfrente de la roja y facilitando la unión de la cabeza azul al siguiente sitio de unión en el MT. En los pasos 3 y 4 la cabeza roja se despega del MT (dejando a la cabeza azul unida al MT) y los papeles se invierten respecto a los pasos 1 y 2, por lo que la cabeza roja pasa a la azul ahora por la izquierda. El resultado de las secuencias 1-2-3 ó 2-3-4 es el desplazamiento neto de 8 nm del tallo de la proteína. El banderín muestra la orientación del tallo. Figura adaptada de la Ref. 17.

Debido a su importancia, la estructura a nivel atómico del dominio “cabeza” de la cinesina ya fue obtenida mediante cristalografía de rayos-X [19], con lo cual ha sido posible caracterizar sitios de unión a ATP y a MTs, así como el llamado “neck-linker” de la proteína: una región de  $\sim 13$  amino ácidos que conecta el dominio “cabeza” con el dominio de

dimerización tipo tallo. El neck-linker es de gran importancia para el mecanismo que genera motilidad (desplazamiento) en la proteína [20].

### Mecanismo de motilidad

Experimentos *in vitro* con cinesinas recombinantes truncas han demostrado que la cinesina en forma monomérica es suficiente para generar motilidad sobre MTs cuando grupos de varios monómeros actúan sobre el mismo cargamento [20]. Sin embargo, la motilidad de una cinesina individual sólo es posible en el homodímero, en donde cada cadena pesada trunca incluya el dominio de cabeza así como una región mínima de dimerización. A partir de estudios de microscopía óptica, que registran el movimiento de motores individuales, se ha concluido que la cinesina homodimérica se desplaza sobre el MT por medio de un mecanismo de “mano-sobre-mano” [17], en donde una cabeza avanza enfrente de la otra de manera alternada, lo cual asemeja la forma en la que una persona camina (ver Figura 1B). Cada “paso” de la cinesina mide 8.2 nm (determinado experimentalmente, ver la Sección 5 y la Figura 3), distancia que coincide con el espaciado entre los heterodímeros de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina que se repiten a lo largo de los protofilamentos que conforman el MT (Fig. 1B).

Una de las propiedades características de la cinesina convencional es su alta procesividad mecánica, es decir, que moléculas individuales avanzan en promedio  $\sim 100$  pasos sobre el MT antes de desprenderse del mismo. Al explicar la procesividad de la cinesina a partir del modelo de avance de “mano-sobre-mano”, se concluye que la proteína avanza manteniendo contacto continuo con el MT involucrando al menos una de sus cabezas. Para que esto ocurra, se requiere que exista una coordinación mecánico-química entre las dos cabezas para evitar que éstas se desprendan simultáneamente del MT de forma prematura. Estudios bioquímicos y a nivel de molécula única han encontrado que existe un acoplamiento estrecho entre el ciclo bioquímico y el ciclo mecánico del motor [17], en donde por cada paso de la cinesina se hidroliza una molécula de ATP y la afinidad de la proteína por el MT está modulada por el estado de hidrólisis del nucleótido unido en cada cabeza. Aunque se ha postulado que la comunicación cabeza-cabeza se transmite mediante tensión mecánica intramolecular, el mecanismo de coordinación cabeza-cabeza aún no está enteramente explicado.

### Las pinzas ópticas

Antes de describir a las pinzas ópticas y su empleo en la biología, es conveniente decir algunas palabras sobre la fuerza que la luz es capaz de ejercer

sobre la materia. Según la teoría de Maxwell, la luz conlleva un momento  $p = E/c$ , en donde  $E$  es la energía luminosa y  $c$  es la velocidad de la luz. De la mecánica elemental sabemos que la fuerza es la derivada de la energía respecto al tiempo ( $F = dp/dt$ ). Por lo tanto, la luz ejerce una fuerza (llamada de radiación) igual a  $F = dp/dt = (1/c)(dE/dt) = W/c$ , en donde  $W = dE/dt$  es la potencia del haz de luz, cuyas unidades son energía por unidad de tiempo o watts (W) en el Sistema Internacional de Unidades. La presión de radiación ( $PR$ ) es por tanto igual a fuerza por unidad de área:  $PR = F/A = W/(A c)$ , en donde  $A$  es el área sobre la cual incide el haz luminoso.

¿Cuál es la presión que se ejerce sobre nuestras cabezas debido a la luz solar? La cantidad de energía radiante que llega del sol a la parte superior de la atmósfera terrestre, en ángulo recto, es de 1.4 kilowatts por metro cuadrado ( $1.4 \text{ kW/m}^2$ ). La energía solar que llega al nivel del mar, después de pasar por la atmósfera, es de aproximadamente  $W/A = 1 \text{ kW/m}^2$  en un día de verano, sin nubes. Puesto que la velocidad de la luz es igual a  $c = 300\,000 \text{ km/s}$ , la presión de radiación es igual a  $PR = (1 \text{ kW/m}^2)/(300\,000 \text{ km/s}) = 0.000\,003 \text{ Pa}$ . La presión atmosférica, debida al peso del aire, es igual a  $P_{\text{atmósfera}} = 100\,000 \text{ Pa}$ , por lo que ¡La presión debido al empuje de la luz solar es  $10^{-10}$  veces menor a la atmosférica! Algo imperceptible en la vida cotidiana.

Sin embargo, consideremos el mundo celular. Una bacteria tiene un tamaño típico de  $1 \mu\text{m}$  y se desplaza a velocidades de  $25 \mu\text{m/s}$ . Al moverse en agua, la bacteria experimenta una fuerza de viscosidad o de arrastre  $F_v$ , la cual debe vencer desarrollando una fuerza igual o mayor para poder avanzar. Suponiendo que la bacteria tiene forma esférica, resulta que  $F_v = 6\pi\eta r v$ , en donde  $\eta$  es la viscosidad del agua ( $= 0.001 \text{ Pa s}$ ),  $r$  es el radio de la bacteria ( $= 1 \mu\text{m}$ ) y  $v$  es la velocidad ( $= 25 \mu\text{m/s}$ ). De este modo, la fuerza que debe desarrollar la bacteria es de al menos  $F_v = 5 \times 10^{-13} \text{ N}$ . La luz, como ya vimos, ejerce una fuerza sobre un absorbente perfecto igual a  $F_{\text{luz}} = W/c$ , por lo que la fuerza  $F_{\text{luz}} = 5 \times 10^{-13} \text{ N}$  que podría detener a una bacteria se logra con una potencia de la luz igual a  $W = 0.15 \text{ mW}$ . Si consideramos que un apuntador láser típico utilizado en salones de clase tiene una potencia de  $W = 1 \text{ mW}$ , entonces vemos que las fuerzas ejercidas por la luz pueden ser útiles en la práctica a nivel celular y molecular.

Las pinzas (o trampas) ópticas están constituidas por un haz de láser (longitud de onda en el infrarrojo,  $\lambda \sim 1 \mu\text{m}$ , para estudios biofísicos) que es fuertemente enfocado por medio de un objetivo de microscopio

de alta apertura numérica ( $AN \geq 1$ ), de modo que el diámetro del haz es reducido hasta alcanzar el tamaño mínimo establecido por la difracción óptica ( $\sim \lambda/2$ ). Al interactuar con el haz enfocado, partículas de materiales dieléctricos (tales como vidrio, plástico e inclusive células vivas) de tamaño micro y nanométrico son atraídas hacia el punto focal del láser y confinadas en las tres dimensiones espaciales, resultando atrapadas efectivamente [5]. Las partículas que pueden ser capturadas con pinzas ópticas tienen tamaños entre  $\sim 50$  nm- $10 \mu\text{m}$ , por lo que una proteína globular típica (100 kDa de peso molecular, 6 nm de diámetro) no puede ser atrapada por el láser de manera directa. Para manipular moléculas individuales con pinzas ópticas, se une de manera específica la molécula de interés a una microesfera de plástico que sí es posible atrapar (ver Figura 2A).

### Una pregunta sobre la kinesina

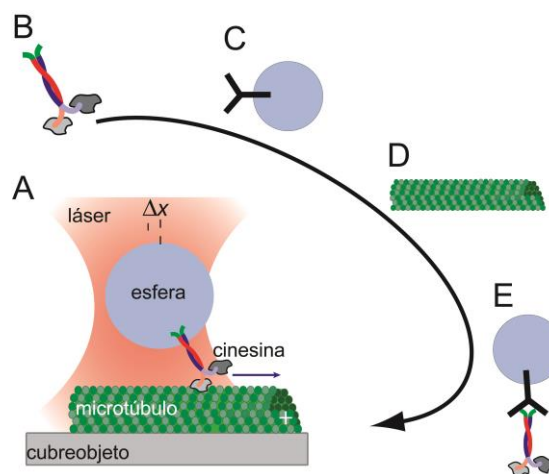
Estudios realizados con extractos celulares han establecido que múltiples kinesinas, así como motores moleculares de otros tipos, se encuentran unidos a una misma vesícula típica del citoplasma [13]. Por tanto, para comprender cómo ocurre el funcionamiento de la kinesina dentro de la célula es importante considerar el transporte de un mismo cargamento efectuado por varias copias de la kinesina. En este sentido, experimentos *in vitro* han encontrado que grupos de kinesinas actuando sobre un mismo cargamento contribuyen a incrementar la distancia recorrida sobre un MT en comparación a un solo motor [13]. En cambio, cuando motores de diferentes tipos como kinesinas y dineínas actúan sobre una misma vesícula se establece una competencia entre los movimientos anterógrado (debido a la kinesina) y retrógrado (debido a la dineína), lo que resulta en una alternancia en la dirección de los desplazamientos de la vesícula sobre el MT [13].

En nuestro laboratorio nos hemos hecho la pregunta: ¿Cómo se modifica el transporte de un cargamento al ser efectuado por una o varias kinesinas? Intentaremos responder esta pregunta mediante estudios *in vitro* manipulando kinesinas individuales con nuestro sistema de pinzas ópticas.

### Cómo emplear las pinzas ópticas para estudiar a la kinesina

Para nuestros estudios *in vitro* empleamos kinesinas recombinantes y MTs polimerizados a partir de tubulina disponible comercialmente. El sistema de pinzas ópticas desarrollado en el IPICYT

es totalmente funcional y cuenta con un sistema de video microscopía de campo claro que produce imágenes de alto contraste y mínimo ruido [6], lo cual es ideal para el seguimiento de micro y nanopartículas. A continuación se describe brevemente el protocolo experimental para llevar a la kinesina al sistema de pinzas ópticas (ver también Fig. 2A-E). Para mayor información se sugiere consultar las referencias 21 y 22.



**Figura 2. Interrogando una kinesina mediante pinzas ópticas y protocolo del ensayo de motilidad.** A) Diagrama del ensayo de pinzas ópticas, en donde el láser sujeta una microesfera que une una kinesina. En presencia de ATP la kinesina avanza sobre el microtúbulo hacia el extremo + (flecha horizontal), desplazando la esfera de su posición respecto al centro del láser. Este desplazamiento ( $\Delta x$ ) revela la distancia recorrida, así como permite determinar la fuerza desarrollada por el motor. El protocolo para llevar a cabo este ensayo incluye: contar con kinesina recombinante etiquetada con 6xHis (B); recubrir microesferas de poliestireno con anti-6xHis (C); polimerizar microtúbulos e inmovilizarlos sobre la superficie de un cubreobjeto (D); y formar complejos esfera-kinesina (E), los cuales pueden llevar una o varias kinesinas.

Partimos de cepas de *Escherichia coli* transformadas con un plásmido que contiene el gen que codifica para una kinesina derivada de la cadena pesada de la kinesina convencional de *Drosophila melanogaster* (DmK): DmK401. Al ser expresado el gen, la proteína contiene los primeros 401 aminoácidos de la kinesina de DmK [6] e incluye el dominio motor así como una región de dimerización que permite la formación del dímero necesario para obtener la kinesina funcional. La proteína incluye una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal, la cual es utilizada para purificar la proteína por afinidad, así como para unir el motor a microesferas de poliestireno mediante el uso de anticuerpos (Fig. 2B,E).



Para investigar el transporte de cargamento efectuado por la cinesina sobre MTs, se construye una microcelda formada por las superficies de un portaobjeto y de un cubreobjeto, separadas entre sí por una distancia pequeña (~100  $\mu\text{m}$ ) mediante cinta adhesiva de doble cara. Las superficies interiores de la microcelda se recubren con MTs (Fig. 2D), inmovilizados recubriendo al vidrio con L-polilisina. Después, insertamos en el espacio entre las dos superficies de vidrio una solución coloidal de microesferas dispersas en una solución amortiguadora apropiada (que contiene ATP). Las microesferas (500 nm de diámetro) son de poliestireno y llevan unidas una o más moléculas de cinesina DmK401, en donde la cinesina se une a la esfera mediante una unión 6xHis-anticuerpo (Fig. 2E).

Utilizando pinzas ópticas capturamos una de las microesferas cubiertas con cinesina y la colocamos sobre un MT (Fig. 2A), esperando a que por difusión rotacional la cinesina unida a la esfera encuentre la superficie del MT. Cuando la cinesina se une al MT emplea el ATP disponible en el medio para avanzar sobre el MT y acarrear consigo a la microesfera. Observamos el avance de la microesfera acarreada por cinesina sobre el MT mediante la imagen producida por el microscopio (no observamos a la cinesina ya que es muy pequeña). En este punto del ensayo podemos realizar dos tipos de experimentos:

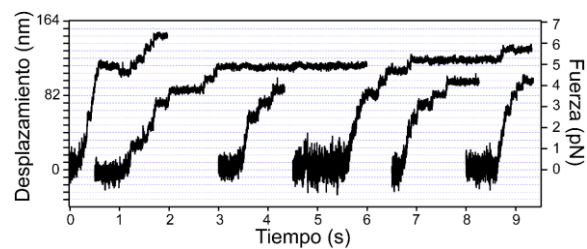
a) Obturamos el láser de la pinza óptica, por lo que la cinesina avanza sobre el MT hasta que (en un evento probabilístico) deja de estar unida al MT, evento que podemos identificar con facilidad ya que la esfera comienza a difundir (la posición de la microesfera cambia de manera estocástica). Este tipo de experimento nos permite medir la distancia total recorrida por la cinesina cada vez que se une a un MT.

b) Mantenemos la pinza óptica encendida, por lo que al avanzar la cinesina sobre el MT la fuerza del láser sobre la microesfera incrementa de manera proporcional a la distancia recorrida por el motor. Con este ensayo podemos medir tanto el desplazamiento efectuado como la fuerza desarrollados por la cinesina durante su avance sobre el MT (ver Figura 3).

### ¿Cómo se modifica el transporte de cargamento cuando en vez de una cinesina participan varias de ellas?

Para responder esta pregunta realizamos experimentos en los que medimos el desplazamiento

y la fuerza desarrollados por la cinesina (empleando la metodología descrita en la sección anterior) con la participación de un solo motor o de varios motores [21,22]. Es importante notar que en nuestros experimentos unimos motores de cinesina a las microesferas mediante incubaciones aleatorias, en donde el resultado final es que el número de motores por esfera está exponencialmente distribuido (es decir, la probabilidad de que una esfera tenga  $n$  motores es:  $P = \exp(-\lambda) \lambda^n/n!$ , en donde  $\lambda$  es el número promedio de motores por esfera y  $n!$  es el factorial de  $n$ ). Suponiendo esta distribución, es posible determinar la probabilidad de que las microesferas lleven dos o más motores,  $P(\geq 2)$  [23].



**Figura 3. Desplazamiento y fuerza desarrollados por una cinesina individual.** Se muestran seis ejemplos de desplazamiento y fuerza (linealmente proporcional al desplazamiento) desarrollados por una cinesina individual, obtenidos mediante el sistema de pinzas ópticas. Cada evento inicia con la microesfera en la posición central del láser (desplazamiento igual a cero). La distancia y la fuerza incrementan a medida que la cinesina avanza sobre el microtúbulo y acarrea a la microesfera. En cada uno de los seis registros se distinguen los pasos individuales de 8.2 nm efectuados por la cinesina. La distancia entre las líneas horizontales azules es 8.2 nm. Figura adaptada de la Ref. 6.

### Experimento de distancia

Medimos la distancia recorrida por la cinesina en dos situaciones diferentes. Primero, con condiciones tales que  $n = 0.7$  (un promedio de 0.7 cinesinas por esfera). A partir de repetidas mediciones, obtuvimos el valor promedio para la distancia recorrida por esferas acarreadas por la cinesina:  $L = 529 \pm 33$  nm (datos no mostrados). Después, repetimos el procedimiento para el caso  $n = 2.0$  (un promedio de 2 cinesinas por esfera). Al analizar los datos, obtuvimos el valor promedio para la distancia recorrida:  $L = 588 \pm 46$  nm. Por lo tanto, observamos que al incrementar la probabilidad de participación de dos motores o más (de  $P(\geq 2) = 0.02$  a 0.12) la distancia de avance promedio aumentó de manera marginal (10%). Sin embargo, se registraron eventos en donde la distancia recorrida fue de 6.8  $\mu\text{m}$  o mayor. Estos resultados sugieren que si bien puede haber más de una cinesina por esfera, la probabilidad de que estas cinesinas participen de manera simultánea en el transporte del cargamento es baja.

### Experimento de fuerza

Ahora medimos con pinzas ópticas la fuerza desarrollada por la cinesina, también en dos situaciones diferentes. Primero, con  $n = 0.3$  (promedio de 0.3 cinesinas por esfera). Observamos eventos en donde la fuerza máxima desarrollada es de 7 pN, correspondiente a lo que ya se conoce es capaz de ejercer una cinesina de manera individual (ver Figura 3). Al repetir el procedimiento para el caso  $n = 4.6$  (un promedio de 4.6 cinesinas por esfera), observamos el desarrollo de fuerzas mayores a 12 pN (ver Figura 4). Estos resultados indican que al aumentar el número de cinesina por esfera se presentan eventos en donde la fuerza desarrollada por los motores aumenta de manera significativa respecto al caso de motores individuales (12 pN vs 7 pN). Sin embargo, al realizar un análisis de cientos de eventos para el caso  $n = 4.6$  observamos que las instancias en donde se presentan fuerzas mayores a 7 pN ocurren el ~10% de las veces (estos datos no se muestran). De aquí reforzamos nuestra conclusión del experimento anterior: es baja la probabilidad de participación simultánea de múltiples cinesinas en el transporte de un mismo cargamento.

### Referencias

- Greenleaf WJ, Woodside MT, Block SM (2007) High-Resolution, Single-Molecule Measurements of Biomolecular Motion. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 36: 171-190.
- Bustamante C (2008) In singulo Biochemistry: When Less Is More. Annual Review of Biochemistry 77: 45-50.
- Selvin PR, Ha T, editors (2008) Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Weiss S (2000) Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy. Nat Struct Mol Biol 7: 724-729.
- Block SM (1992) Making light work with optical tweezers. Nature 360: 493-495.
- Hernández Candia CN, Tafoya Martínez S, Gutiérrez-Medina B (2013) A Minimal Optical Trapping and Imaging Microscopy System. PLoS ONE 8: e57383.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. (2002) Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science.
- Brangwynne CP, Koenderink GH, MacKintosh FC, Weitz DA (2009) Intracellular transport by active diffusion. Trends in Cell Biology 19: 423-427.
- Mignot T, Shaevitz JW (2008) Active and passive mechanisms of intracellular transport and localization in bacteria. Current Opinion in Microbiology 11: 580-585.
- Luby-Phelps K, Harry Walter DEB, Paul AS (1999) Cytoarchitecture and Physical Properties of Cytoplasm: Volume, Viscosity, Diffusion, Intracellular Surface Area. International Review of Cytology: Academic Press. pp. 189-221.
- Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. Cell 112: 467-480.
- Hirokawa N (1998) Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. Science 279: 519-526.
- Holzbaumer ELF, Goldman YE (2010) Coordination of molecular motors: from in vitro assays to intracellular dynamics. Current Opinion in Cell Biology 22: 4-13.
- Hirokawa N, Noda Y (2008) Intracellular Transport and Kinesin Superfamily Proteins, KIFs: Structure, Function, and Dynamics. Physiological Reviews 88: 1089-1118.
- Vale RD, Reese TS, Sheetz MP (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell 42: 39-50.
- Egan MJ, McClintock MA, Reck-Peterson SL (2012) Microtubule-based transport in filamentous fungi. Current Opinion in Microbiology 15: 637-645.
- Asbury CL (2005) Kinesin: world's tiniest biped. Curr Opin Cell Biol 17: 89-97.
- Seiler S, Kirchner J, Horn C, Kallipolitou A, Woehlke G, et al. (2000) Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. Nat Cell Biol 2: 333-338.

### Conclusiones

En el laboratorio de biofísica del IPICYT utilizamos pinzas ópticas para cuantificar *in vitro* el desplazamiento y la fuerza desarrollada por motores de cinesina al efectuar el transporte de microesferas sobre microtúbulos. Investigamos cuál es el efecto de incrementar el número de cinesinas por microesferas. Para el caso de múltiples motores unidos a una sola esfera observamos eventos de desplazamiento y fuerza con valores significativamente mayores a los correspondientes a moléculas individuales. Sin embargo, los valores promedio de desplazamiento y fuerza solo se modificaron de manera marginal. Esto sugiere que durante el transporte intracelular la presencia de múltiples motores en un mismo cargamento (organelo, vesícula, etc.) permite una rápida y efectiva unión a la red de filamentos del citoesqueleto, mientras que son motores individuales los principales involucrados en efectuar el transporte.

### Agradecimientos

Los resultados experimentales que se presentan en este texto forman parte del trabajo de tesis de maestría de Alma Rosa Oaxaca Camacho y Mónica Padilla Buendía, realizado en el IPICYT, a quienes se agradece su ayuda y colaboración. Esta investigación fue financiada por CONACYT a través del proyecto SEP-CB-2013-01-223377. Se agradece la ayuda experimental de Carmen Noemí Hernández Candia y Mónica Noemí Jiménez García.

19. Kozielski F, Sack S, Marx A, Thormahlen M, Schonbrunn E, et al. (1997) The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell* 91: 985-994.
20. Rice S, Lin AW, Safer D, Hart CL, Naber N, et al. (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402: 778-784.
21. Alma Rosa Oaxaca Camacho. Estudios de la cooperatividad entre proteínas motoras y los efectos de estabilizar microtúbulos con glutaraldehído. Tesis de Maestría, IPICYT: 2013.
22. Mónica Buendía Padilla. Medición de la procesividad de la cinesina-1 DmK401 mediante videomicroscopía. Tesis de Maestría, IPICYT: 2016.
23. Li, Stephen J. King, A. Gopinathan, and J. Xu (2016) Quantitative Determination of the Probability of Multiple-Motor Transport in Bead-Based Assays. *Biophysical Journal* 110:2720.



## DR. BRAULIO GUTIÉRREZ MEDINA

Cursó la Licenciatura en Física en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Realizó estudios de doctorado en la Universidad de Texas en Austin con especialidad en

el campo de física atómica experimental. Llevó a cabo una estancia posdoctoral en la Universidad de Stanford, trabajando en el área de la biofísica a nivel de moléculas individuales.

Desde el 2009 trabaja en el IPICYT como investigador asociado a las Divisiones de Materiales Avanzados y Biología Molecular. En su laboratorio realiza investigación interdisciplinaria, con énfasis en el estudio de sistemas biológicos asociados a receptores de luz, motilidad celular y transporte intracelular, así como en el desarrollo de nuevos métodos de microscopía óptica.

En el 2010 su trabajo fue reconocido con el Premio George Brown de la fundación UC-MEXUS.