

Física de los motores moleculares

Curso de Biofísica

2023

Facultad de Ciencias

Udelar

¿Qué son los motores moleculares?

- Son proteínas motoras, que se unen a un filamento citoesquelético y utilizan la energía derivada de ciclos repetidos de hidrólisis de ATP para moverse a lo largo de ellos.
- Difieren en el tipo de filamento al que se unen (actina, microtúbulos, ADN), la dirección en la que se mueven a lo largo del filamento y la "carga" que transportan.
- Muchas de éstas proteínas motoras llevan organelos membranosos (ej. mitocondrias, vesículas secretoras) hasta sus ubicaciones apropiadas en la célula.
- Otras hacen que los filamentos del citoesqueleto se deslizen uno contra el otro, generando la fuerza que impulsa fenómenos tales como la contracción muscular, el batir ciliar y la división celular.

Motores moleculares: Itinerario de la clase

1. Transportadores de membrana
2. Kinesinas y dineínas
3. Helicasas
4. Topoisomerasa II
5. Miosinas

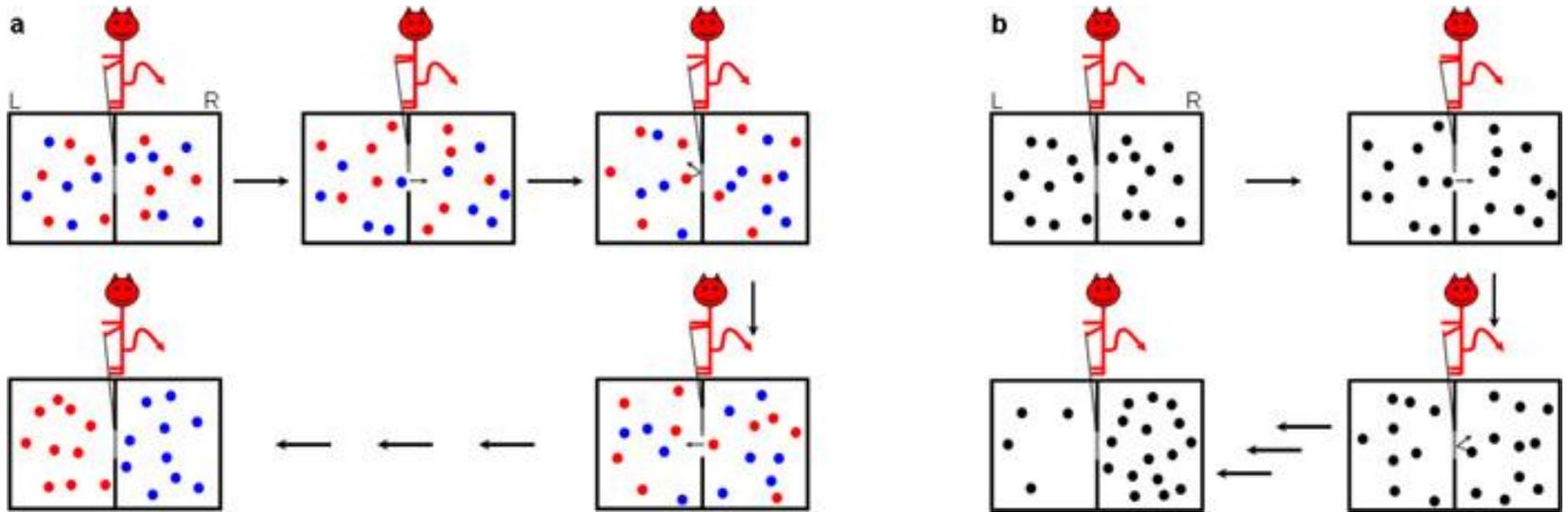
Los demonios de Maxwell existen

(pero acatan los postulados de la Termodinámica y el principio de Curie)



James Clerk Maxwell

Demonios de Maxwell



Versiones reales de demonios de Maxwell pueden encontrarse prácticamente en la totalidad de los sistemas biológicos, que son capaces de disminuir localmente la entropía, pero a costa de un gasto energético.

Un ejemplo de esto son los motores moleculares, que hidrolizando ATP, determinan la producción de movimiento (magnitud vectorial).

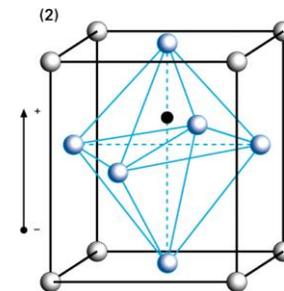
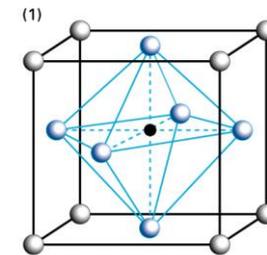
El Principio de Curie

When certain effects show a certain asymmetry, this asymmetry must be found in the causes which gave rise to them. (Curie 1894, 401)

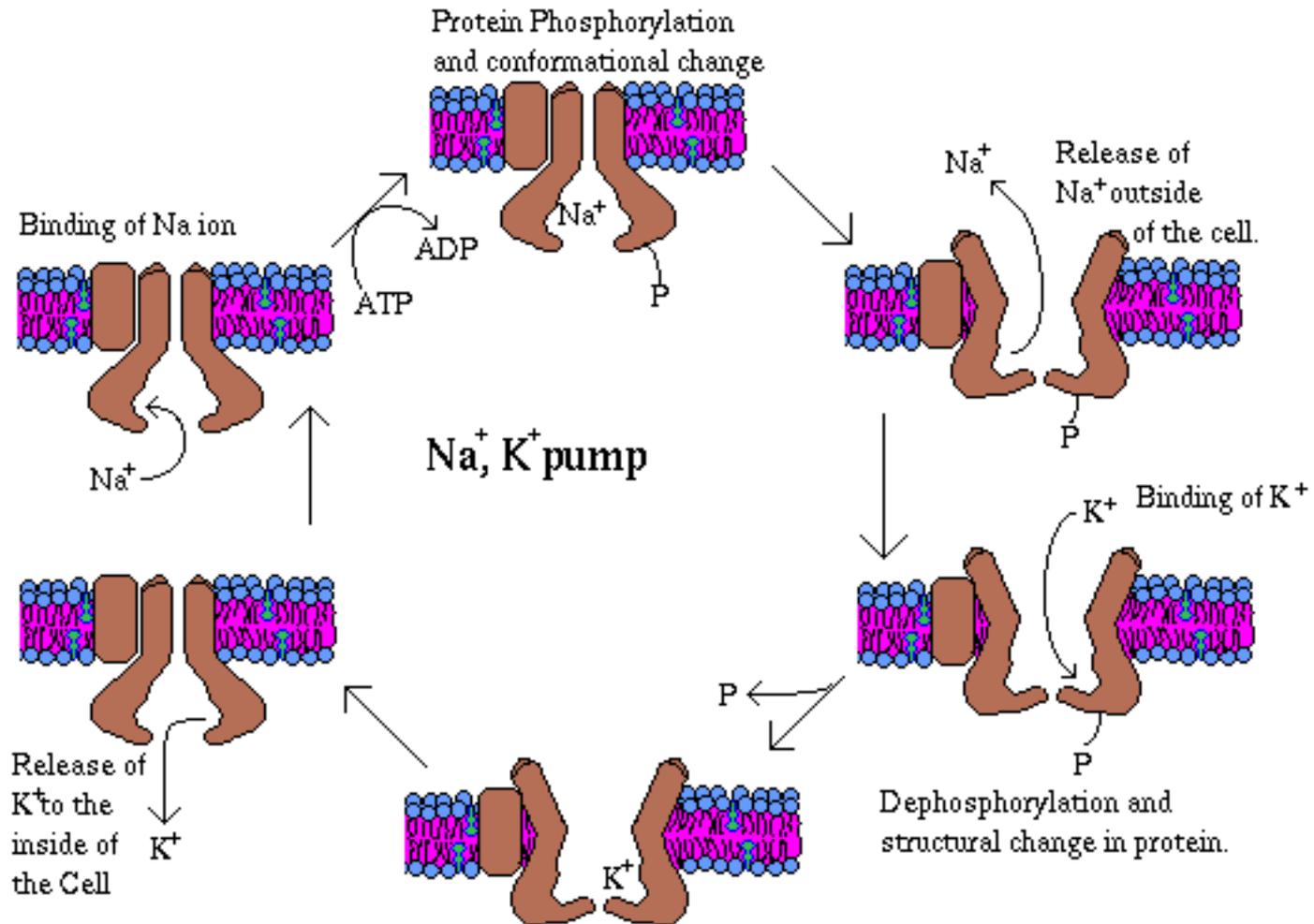
Curie, P.: 1894, 'On Symmetry in Physical Phenomena, Symmetry of an Electric Field and of a Magnetic Field', *Journal de Physique* **3**, 401.



Pierre Curie



La bomba de Na-K

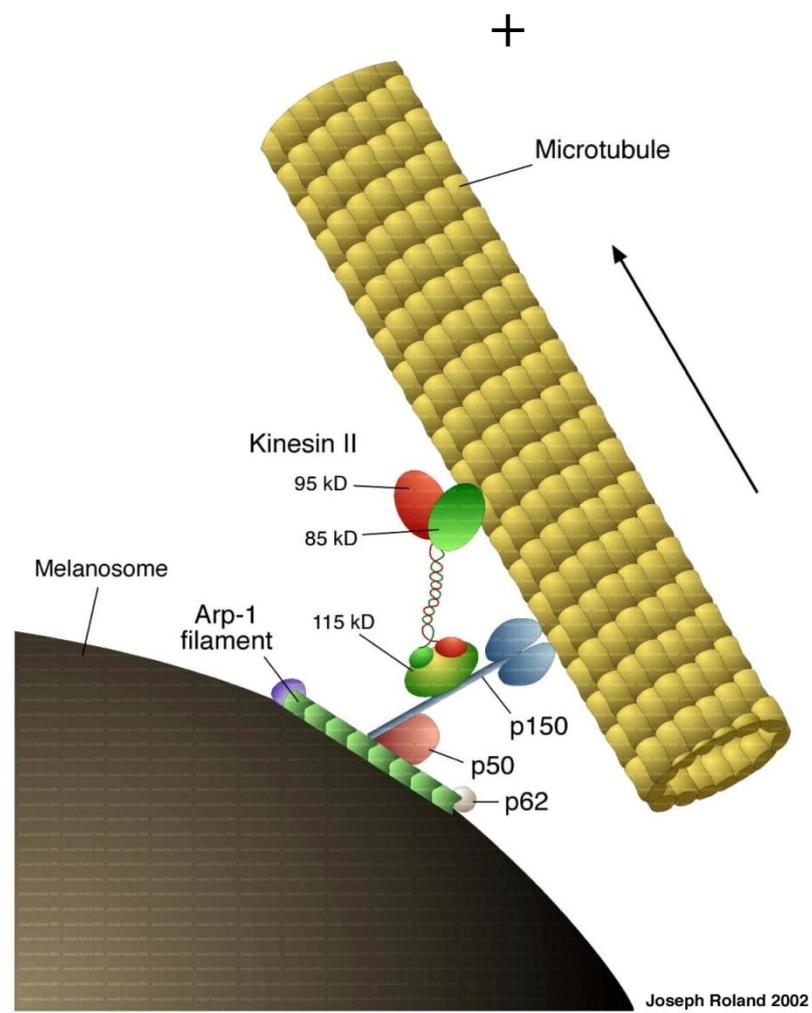
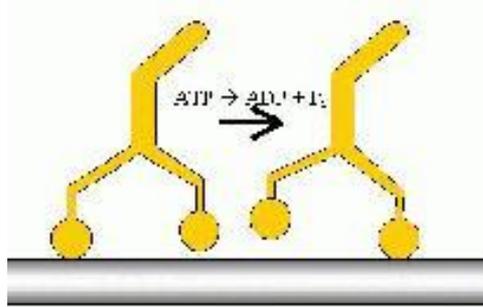
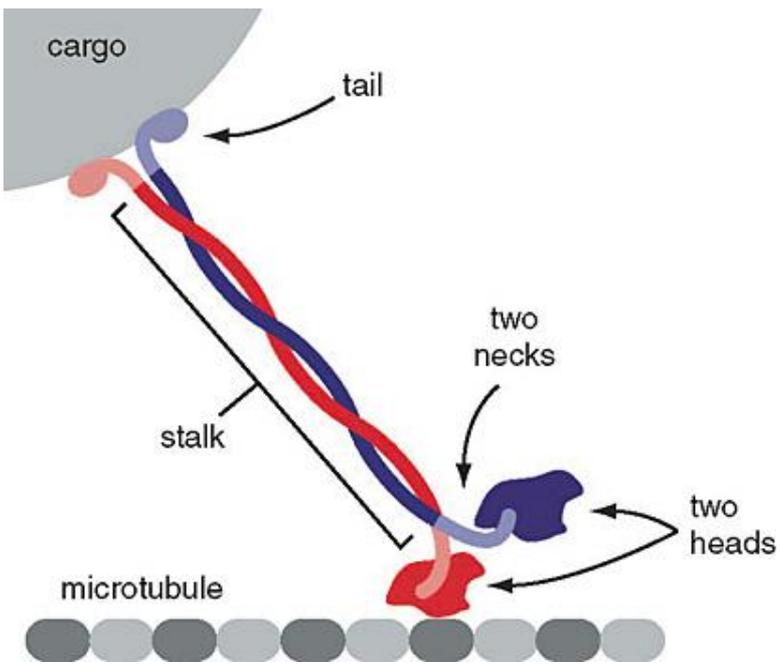


- The Top is the Outer membrane.
- The Bottom is the inner membrane (inside of the Cell)

Kinesinas

- Son las proteínas motoras que se mueven a lo largo de los microtúbulos.
- Es similar estructuralmente a la miosina II, al tener dos cadenas pesadas (cuello) y dos cadenas ligeras (cola) por molécula, dos cabezas, y un "tallo" en espiral alargado responsable de la dimerización de las cadenas pesadas.
- La mayoría de ellas tienen el dominio motor en el extremo N-terminal de la cadena pesada y caminan hacia el extremo "+" del microtúbulo.
- La mayoría de las kinesinas llevan un sitio de unión en la cola para unir un organelo membranoso, el cual trasladan a través de los microtúbulos.

Kinesinas



Kinesinas

Reconstrucción
cristalográfica :



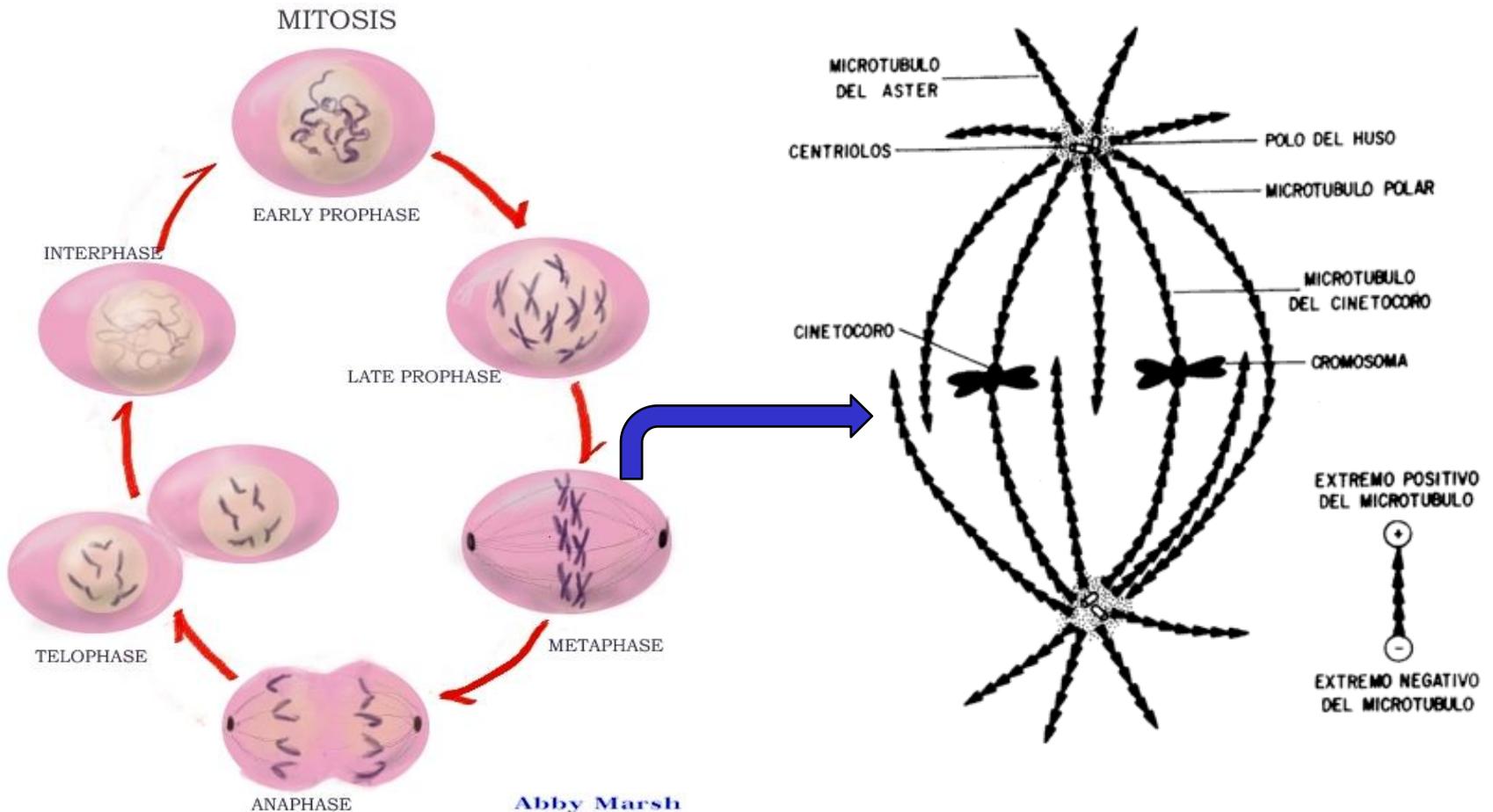
Kinesinas

Transporte de vesículas a lo largo del axón:

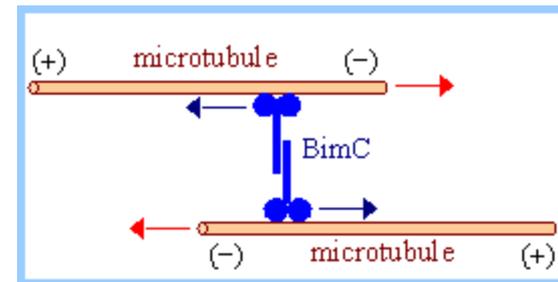
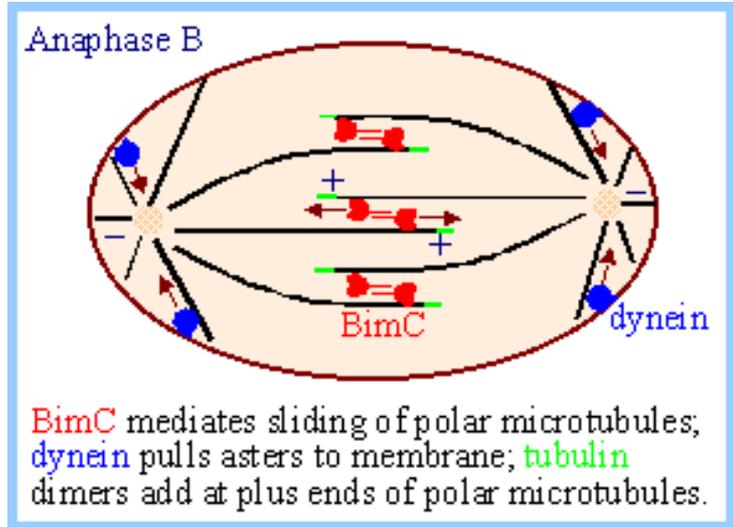


La mecánica de la mitosis

• Muchos de los miembros de la superfamilia de las kinesinas tienen papeles específicos en la formación tanto del huso mitótico como del meiótico, así como en la separación cromosómica durante la división celular.



- La kinesina BimC puede autasociarse a través del dominio de cola, formando un motor bipolar que desliza los microtúbulos con polaridad opuesta uno a través del otro.

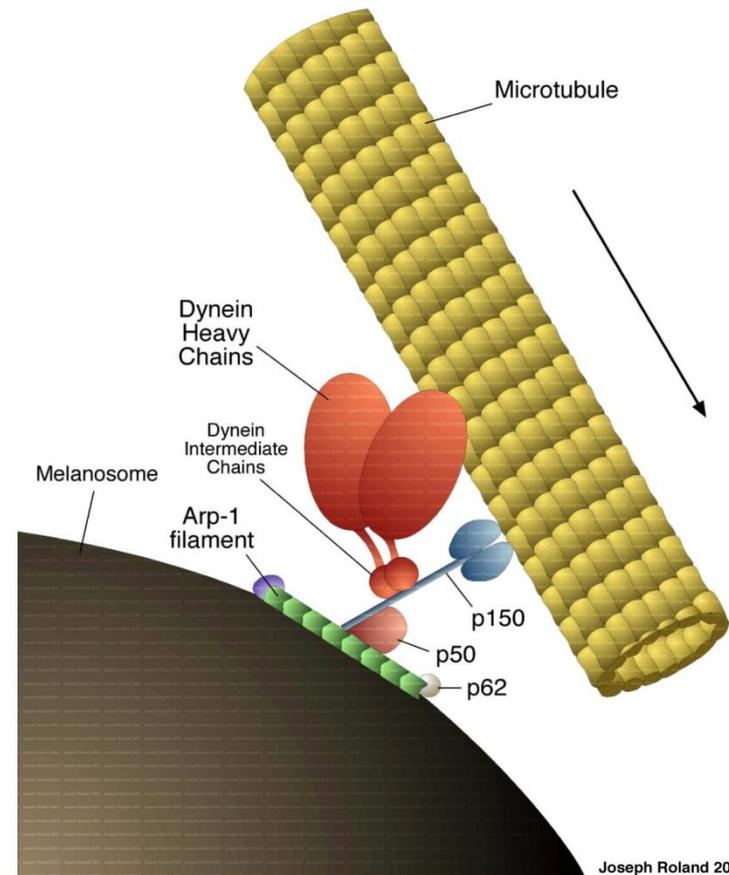
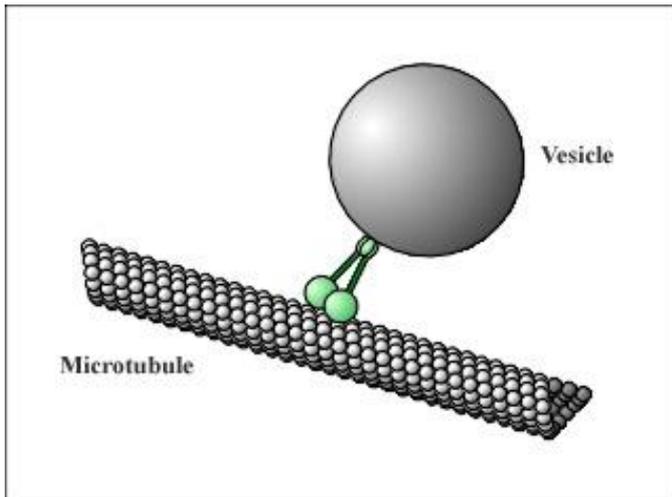
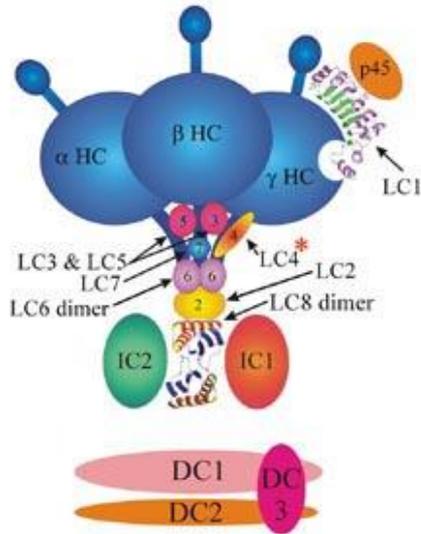


Dineínas

- Familia de proteínas motoras que también se asocian a los microtúbulos, pero a diferencia de las Kinesinas, se mueven hacia el extremo "-".
- Están compuestos de dos o tres cadenas pesadas (que incluyen el dominio motor) y un número grande y variable de cadenas ligeras asociadas.
- Las rama de las "dineínas citoplasmáticas" son importantes fundamentalmente para el tráfico de vesículas.
- La rama de las "dineínas axonémicas", está altamente especializada para los rápidos y eficientes movimientos de deslizamiento de los microtúbulos que impulsan el batido de los cilios y flagelos.

Dineínas (citoplasmáticas)

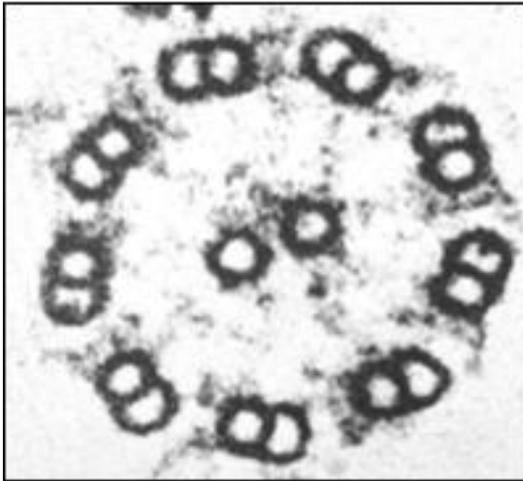
- Típicamente homodímeros de cadena pesada, con dos grandes dominios motores como cabezas.



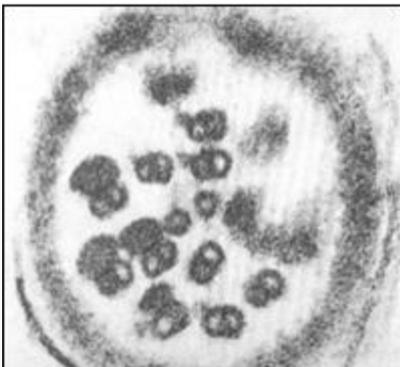
Dineínas (axonémicas)

Incluyen heterodímeros y heterotrímeros, con dos o tres cabezas de dominio motor, respectivamente.

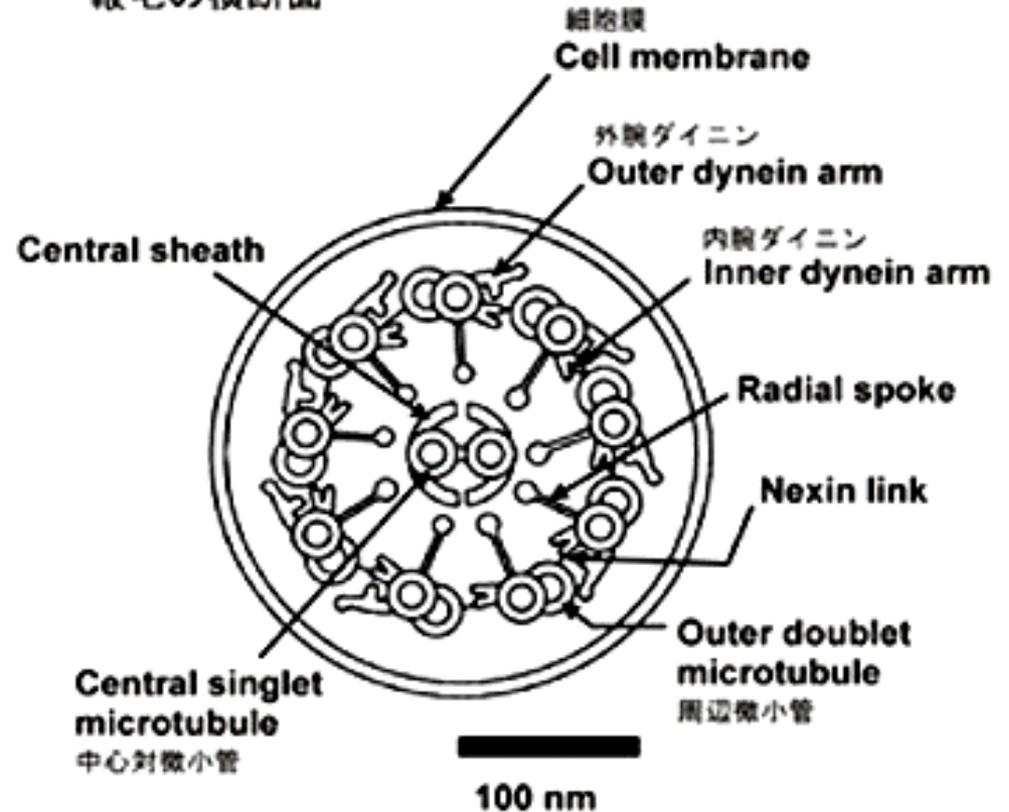
Electron Micrograph of the cross-section of a sperm tail



Cross-section of sperm tail with defective dynein



鞭毛の横断面



→ Síndrome de “disquinesia ciliar” o síndrome de “Kartagene”

Las proteínas motoras que se mueven unidireccionalmente a lo largo de los filamentos citoesqueléticos, recuerdan otras proteínas y complejos proteicos, que poseen la capacidad de utilizar energía química para propulsarse a sí mismos a lo largo de una "pista lineal." Todas ellas generan movimiento, al acoplar la hidrólisis del ATP a un cambio conformacional a nivel de la proteína.

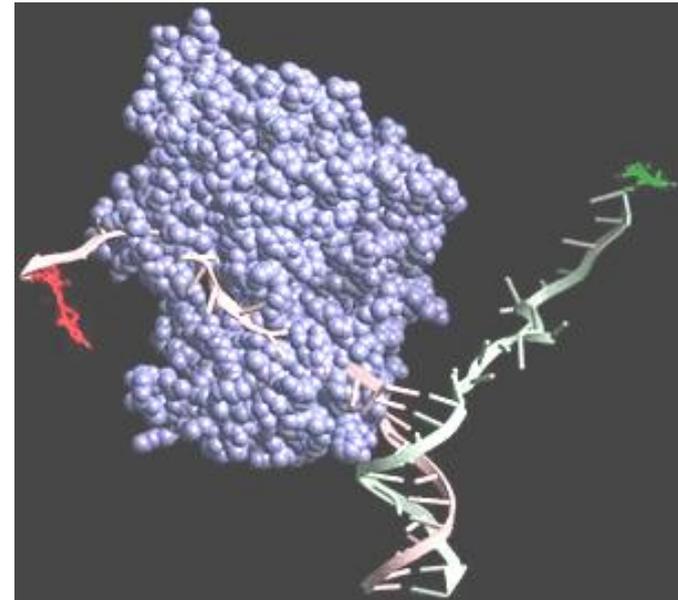
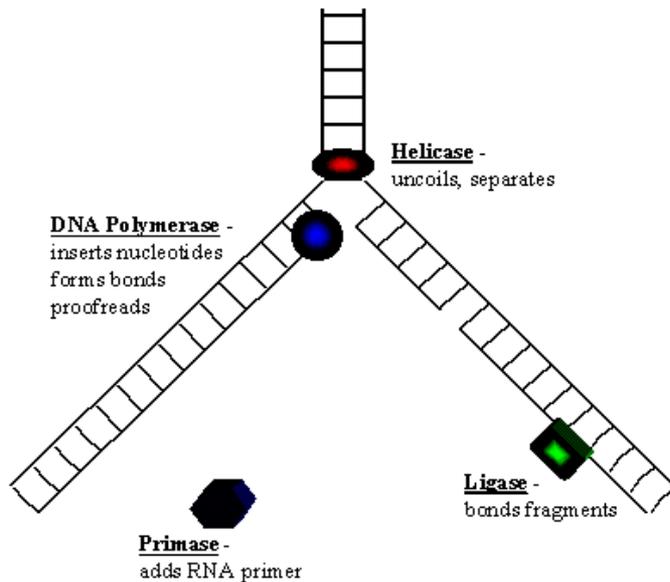
2 claros ejemplos son:

→ Helicasas

→ Topoisomerasa II

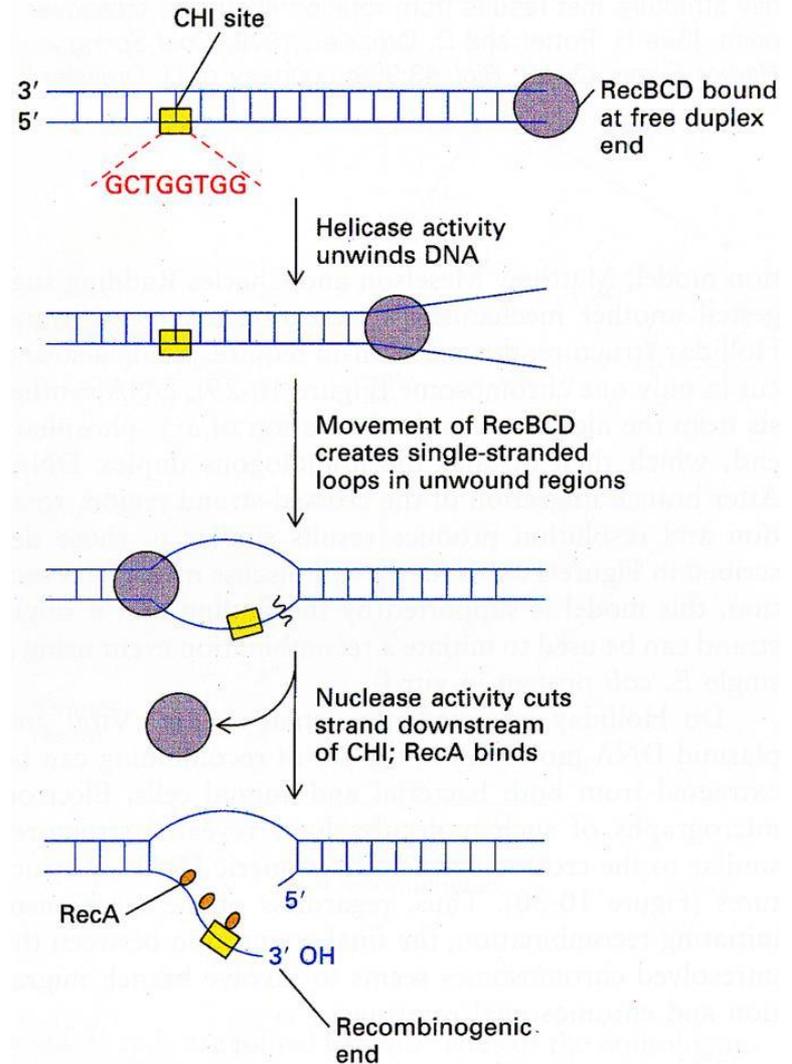
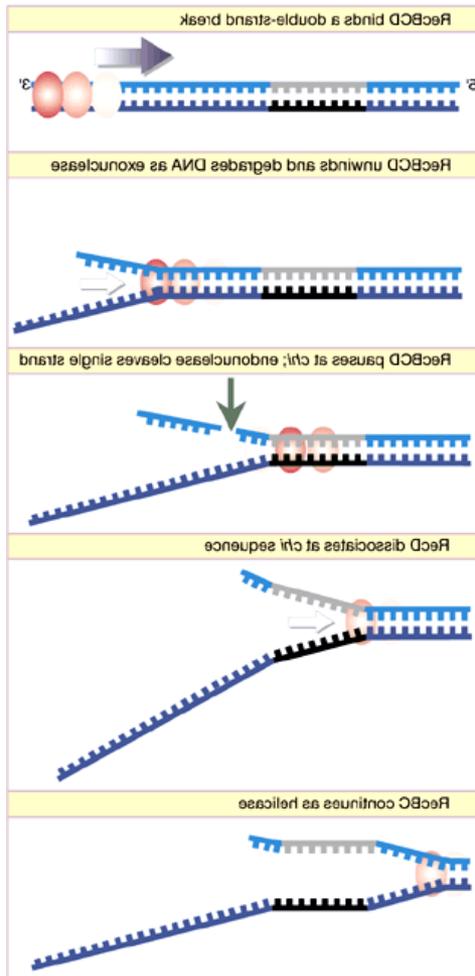
Helicasas

- Son proteínas que se desplazan longitudinalmente, separando las dos cadenas antiparalelas del ADN bicatenario, usando para ello la energía que se desprende de la hidrólisis de ATP.
- Su misión es romper los puentes de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas, haciendo así posible que otras enzimas puedan copiar la secuencia del ADN.
- Participa en los procesos de duplicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN.



Helicasas

RecBCD es una enzima de *E. coli* que inicia la reparación recombinacional de roturas de doble cadena potencialmente letales en el ADN.



La traslocación procesiva de la helicasa RecBCD

Bianco, P.R. et al. *Nature*, Vol 409, p. 374, January 2001

La enzima RecBCD es una helicasa y nucleasa que participa en la reparación del DNA cromosómico del bacteriófago lambda.

Datos cinéticos: desenrollamiento del dsDNA procesivo y continuo a una velocidad máxima de 972 pares de bases por segundo (0.3 micrómetros por segundo)

Elementos básicos de la metodología experimental

- 1) Colorante fluorescente intercalado en el DNA de cadena doble (YOYO-1)
- 2) "Estiramiento" hidrodinámico del complejo RecBCD-DNA
- 3) Trampa óptica
- 4) Desencadenamiento de la reacción por el agregado de ATP-Mg

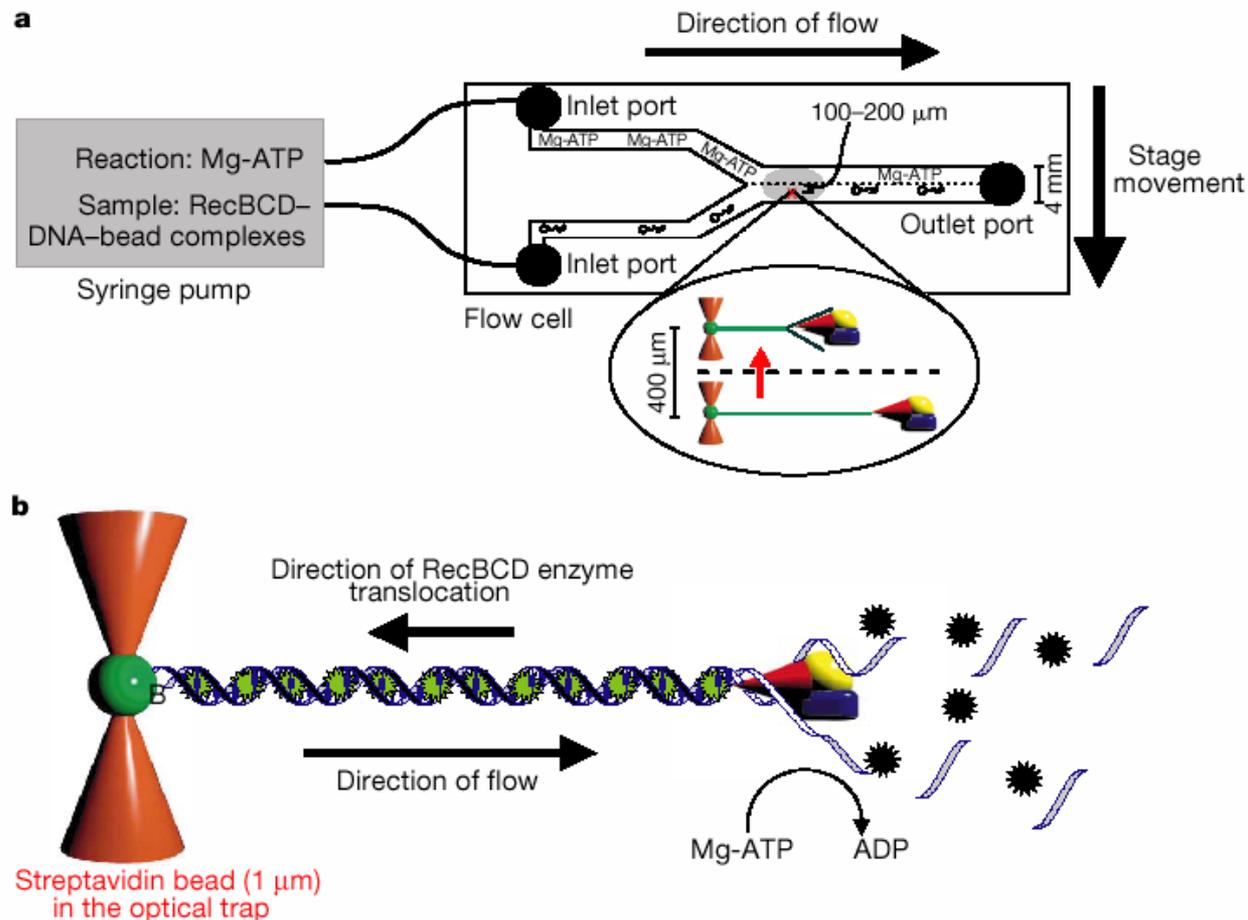


Figure 1 Visualization of DNA helicase action on individual DNA molecules. **a**, Syringe pump and flow cell: the sample syringe contains helicase–DNA–bead complexes, and the reaction syringe contains ATP. 'X' indicates the laser trap position, and the red arrow indicates movement of the trapped DNA–bead complex across the boundary between solutions. Inset, the trapped DNA with bound helicase, and its unwinding after relocation

into the reaction solution. **b**, Fluorescent DNA helicase assay⁷. A trapped and stretched, fluorescent DNA molecule is shown. As RecBCD enzyme translocates, it both unwinds and degrades the DNA, simultaneously displacing dye molecules (black stars). B, biotinylated oligonucleotide.

Visualización del proceso

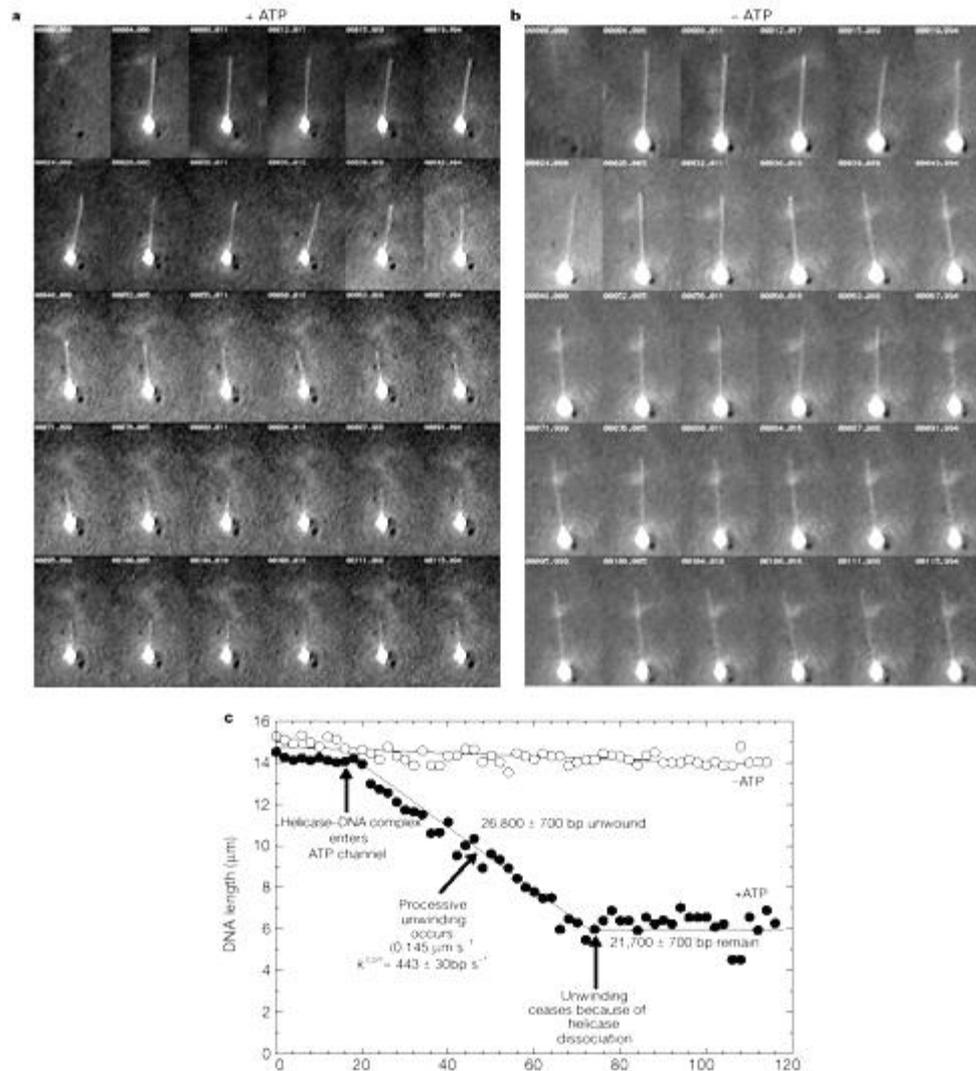
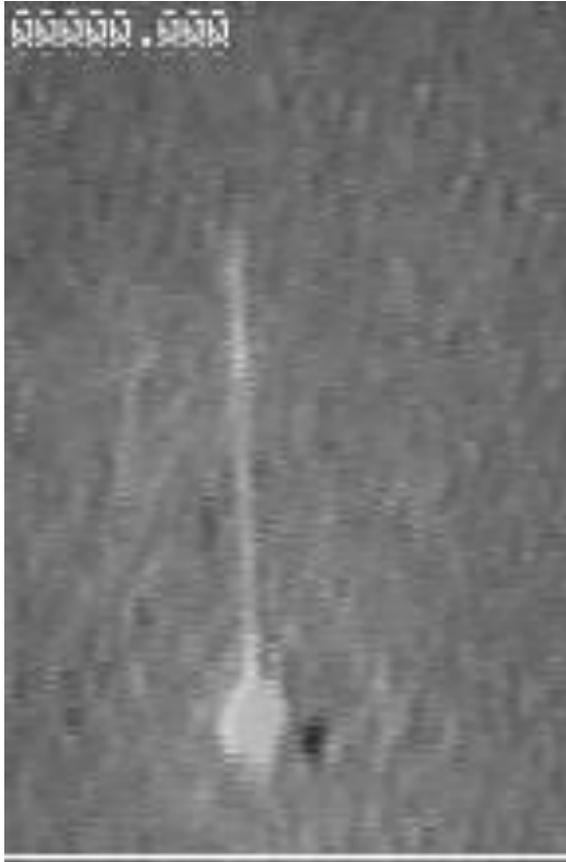


Figure 2 Unwinding of a DNA molecule by RecBCD enzyme. **a**, **b**: Selected, sequential frames from a video recording of reactions either in the presence (**a**) or absence (**b**) of ATP (1 mM). The direction of translocation and DNA unwinding by RecBCD enzyme is from the DNA end opposite the bead, towards the bead (that is, from the top of each frame towards the bottom). Numbers at the top of each frame indicate elapsed time. **c**: Analysis of the time courses in **a** and **b**.



No ATP



250 μ M ATP



1mM ATP

Velocidad y procesividad de la acción de la helicasa RecBCD

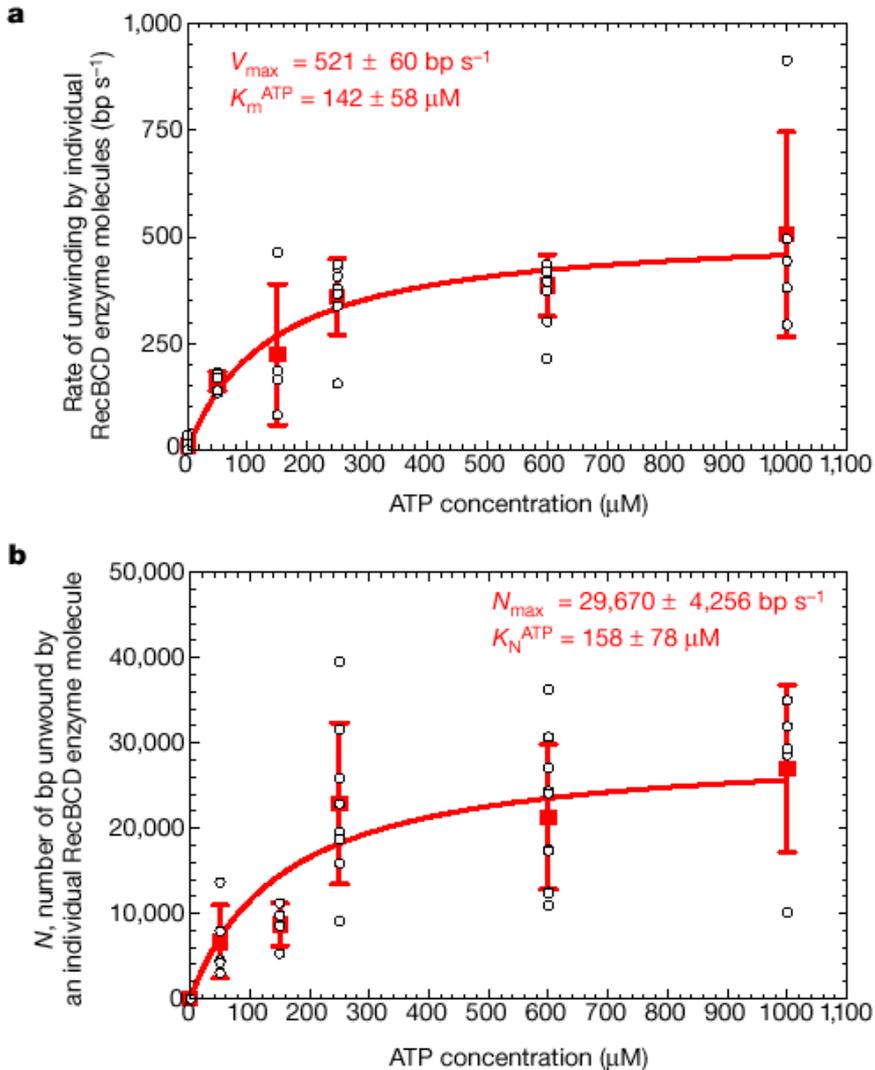
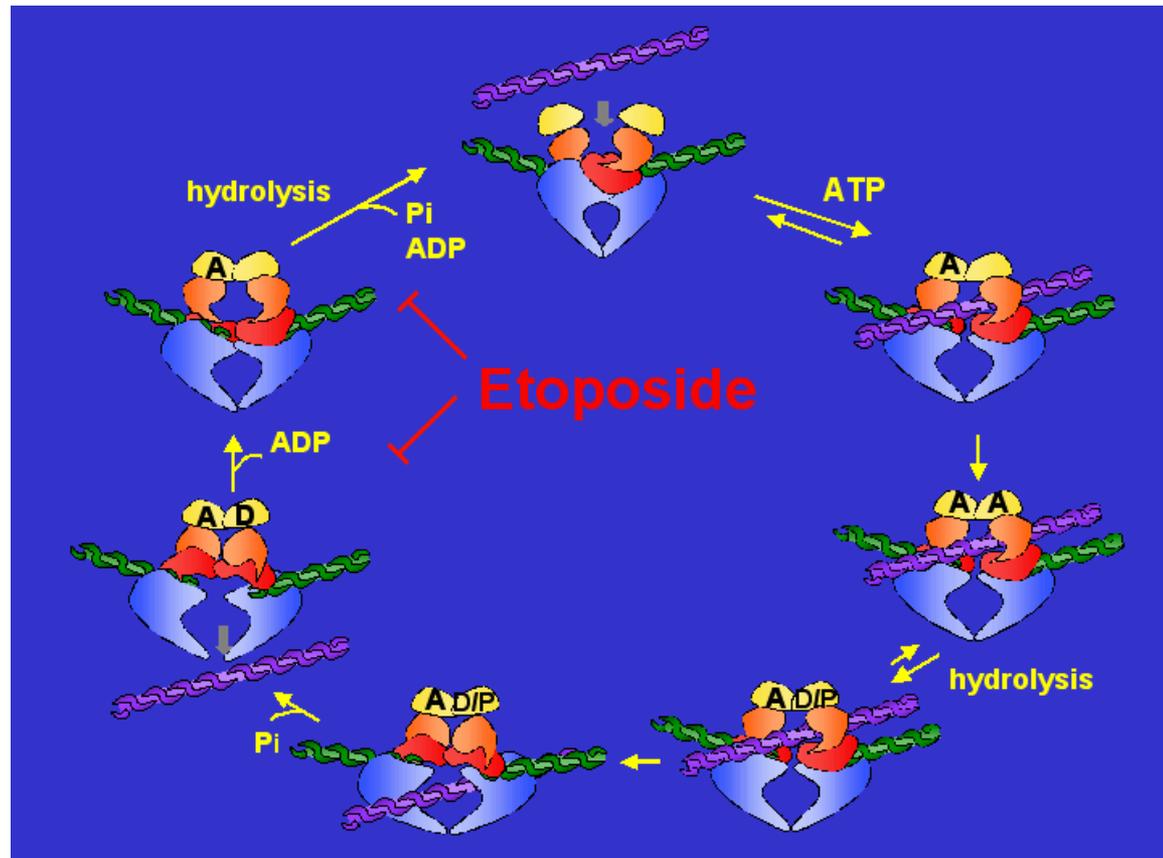
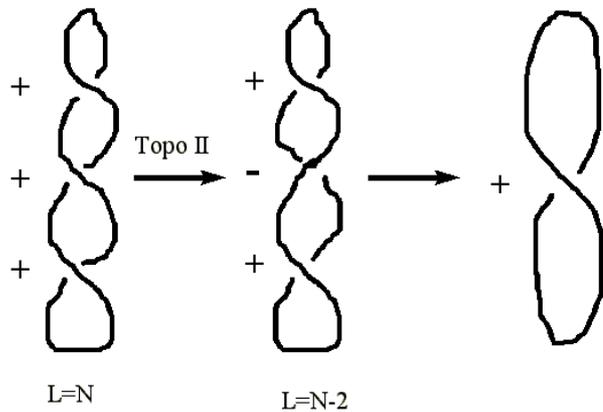


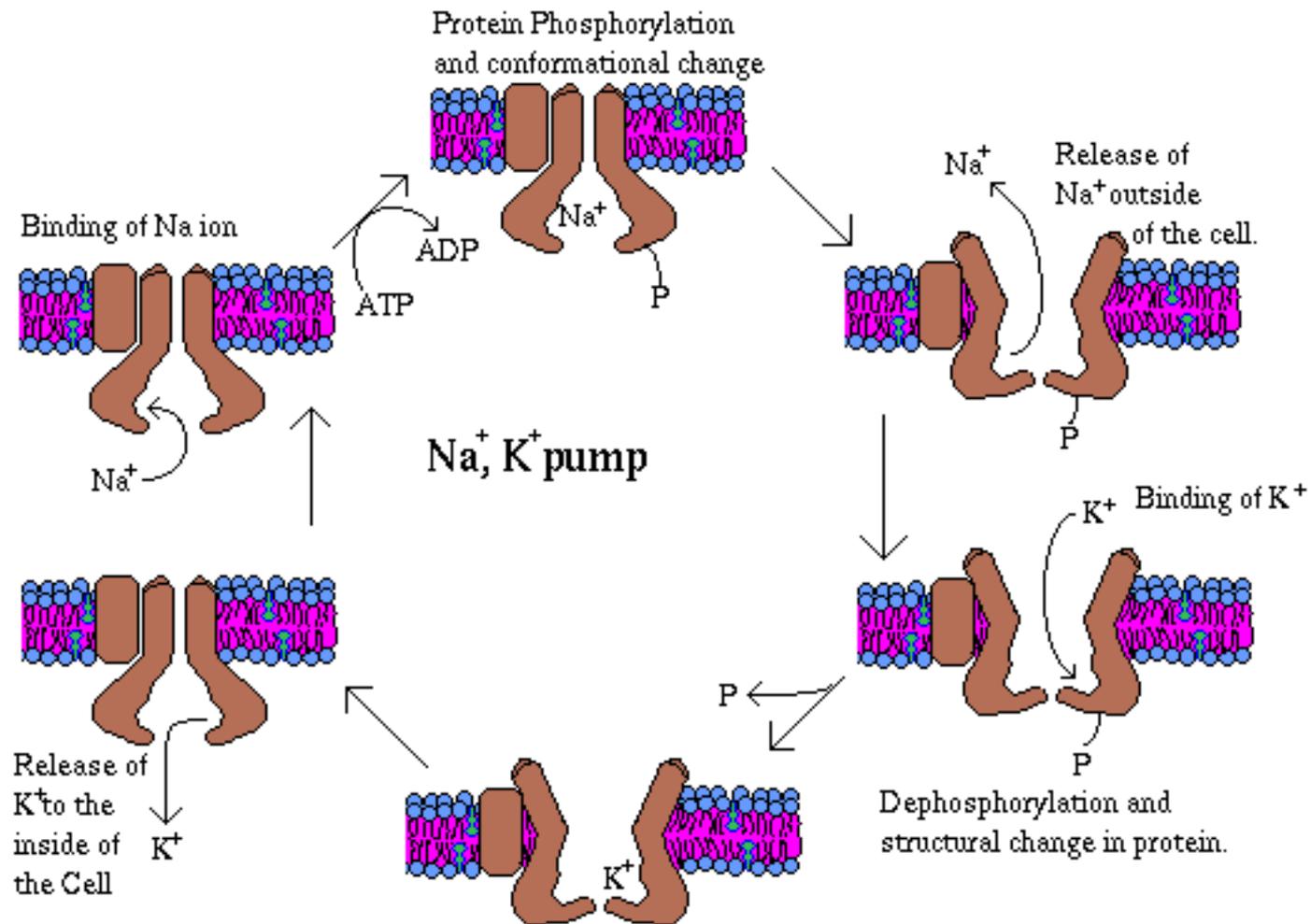
Figure 3 Both the rate and processivity for dsDNA unwinding by individual RecBCD enzyme molecules may vary, but their averages fall within ranges observed for bulk solution. For each ATP concentration (23 °C), 4–10 DNA molecules were measured on different days, using several different preparations. **a**, Unwinding rates for single RecBCD enzyme molecules; **b**, processivities for the same molecules. Open circles represent individual molecule results, and squares represent their average for a given ATP concentration (error bars indicate the standard deviation). Data were fitted to a hyperbola (red line) for comparison with previously published steady-state values¹.

Topoisomerasas II

- Desenredan, mediante la hidrólisis del ATP, el ADN para que controle la síntesis de proteínas así como para facilitar la replicación del mismo.



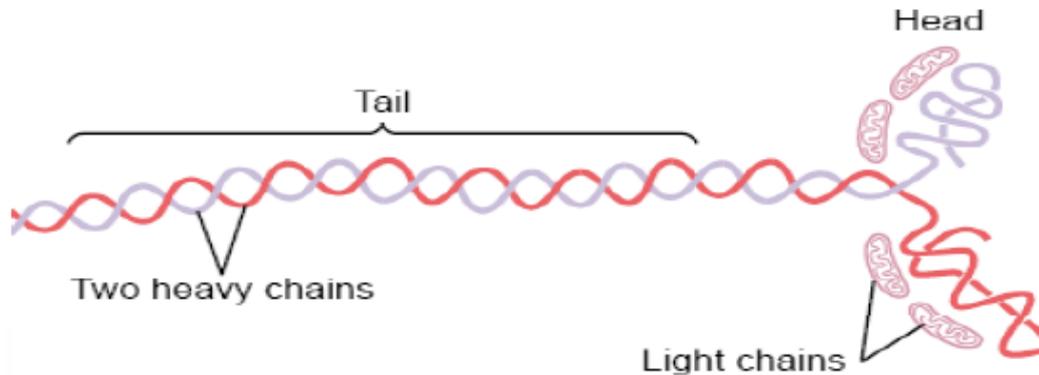
Similaridad del esquema previo con el ciclo de la bomba de Na-K



- The Top is the Outer membrane.
- The Bottom is the inner membrane (inside of the Cell)

Miosinas

-Proteínas responsables de generar la fuerza para la contracción muscular

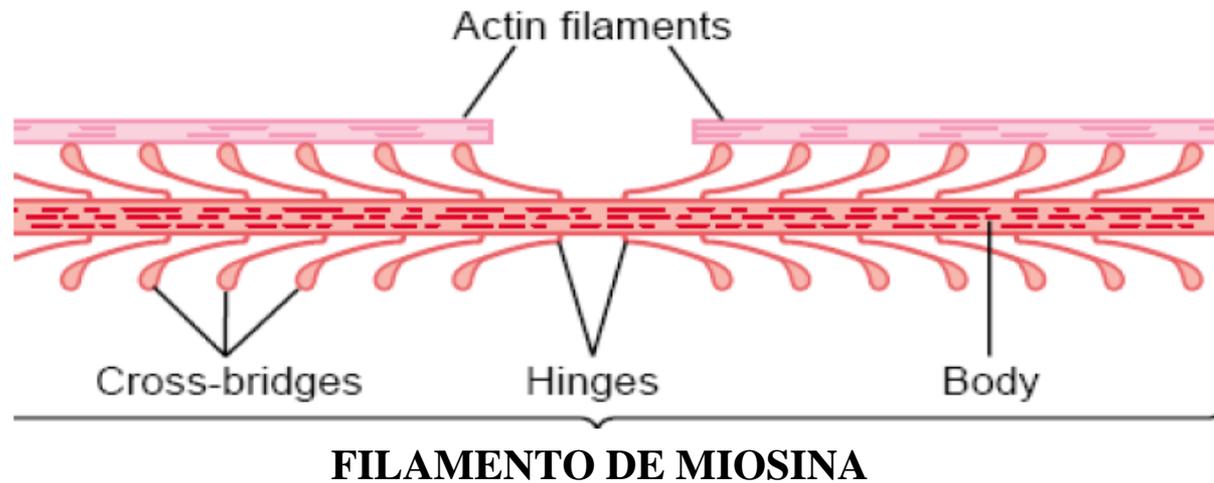


MOLÉCULA DE MIOSINA MUSCULAR (*MIOSINA II*)

-Cada molécula de miosina está formada por seis cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras.

-Las dos cadenas pesadas se enrollan helicoidalmente entre sí para formar una doble hélice que se denomina "cola de la molécula de miosina".

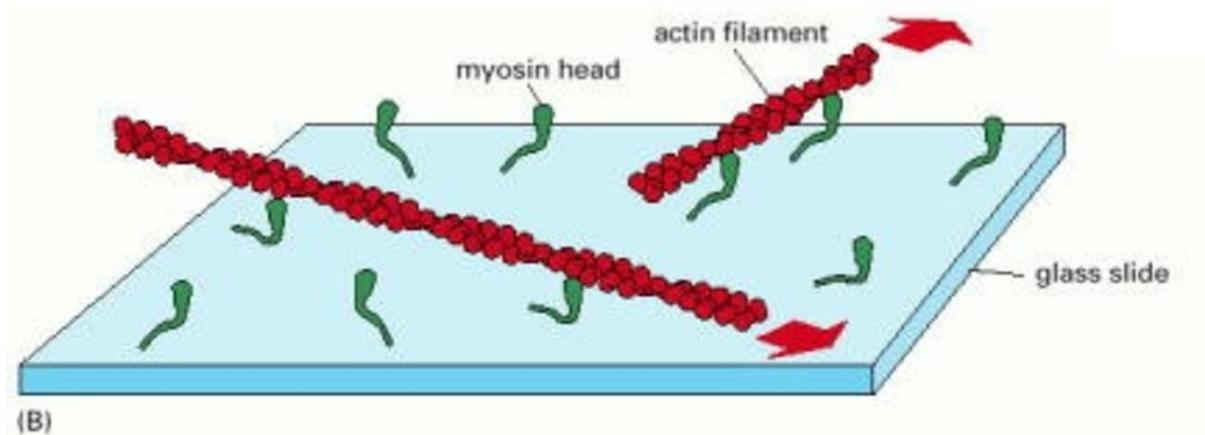
-Un extremo de cada una de las cadenas pesadas se pliega para formar una estructura globular denominada "cabeza de la miosina", que también está conformada por las cadenas ligeras.



- Están formados por 200 o más moléculas individuales de miosina.
- El cuerpo del filamento de miosina se conforma mediante agrupamientos de las colas de las moléculas de miosina.
- Además, parte de la cola de cada una de las moléculas de miosina se prolonga hacia la región lateral junto a la cabeza, formando de esta manera un brazo que separa la cabeza del cuerpo del filamento. Los brazos y las cabezas que protruyen de esta manera se denominan **"puentes cruzados"**.

Actividad ATPasa de la cabeza de miosina:

una característica de la cabeza de la miosina que es esencial para la contracción muscular es que se une e hidroliza el ATP, utilizando la energía liberada para caminar hacia el extremo positivo de un filamento de actina.



Direct evidence for the motor activity of the myosin head

K560-HTR
5/19/97

00:00:06

1:200 d11
40x obj

IRASING
DAVE DSUB
DADCM DSUB
DPRZ

DISPLAY
DPRZ DSTH1
DPRZ DSRM1
DPRZ DSEBR
BIT

ETHERCOMM
DSOLEDVIEW

BRIGHTNDV

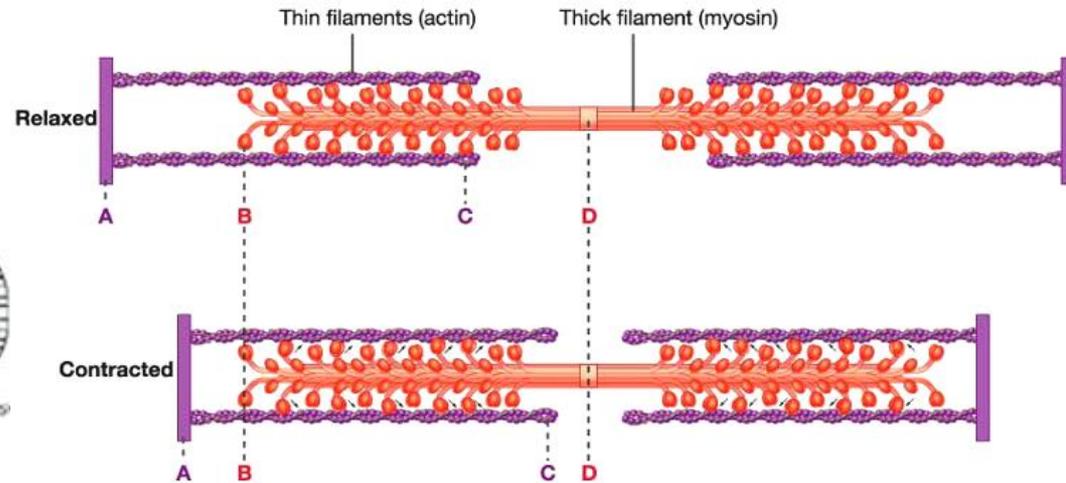
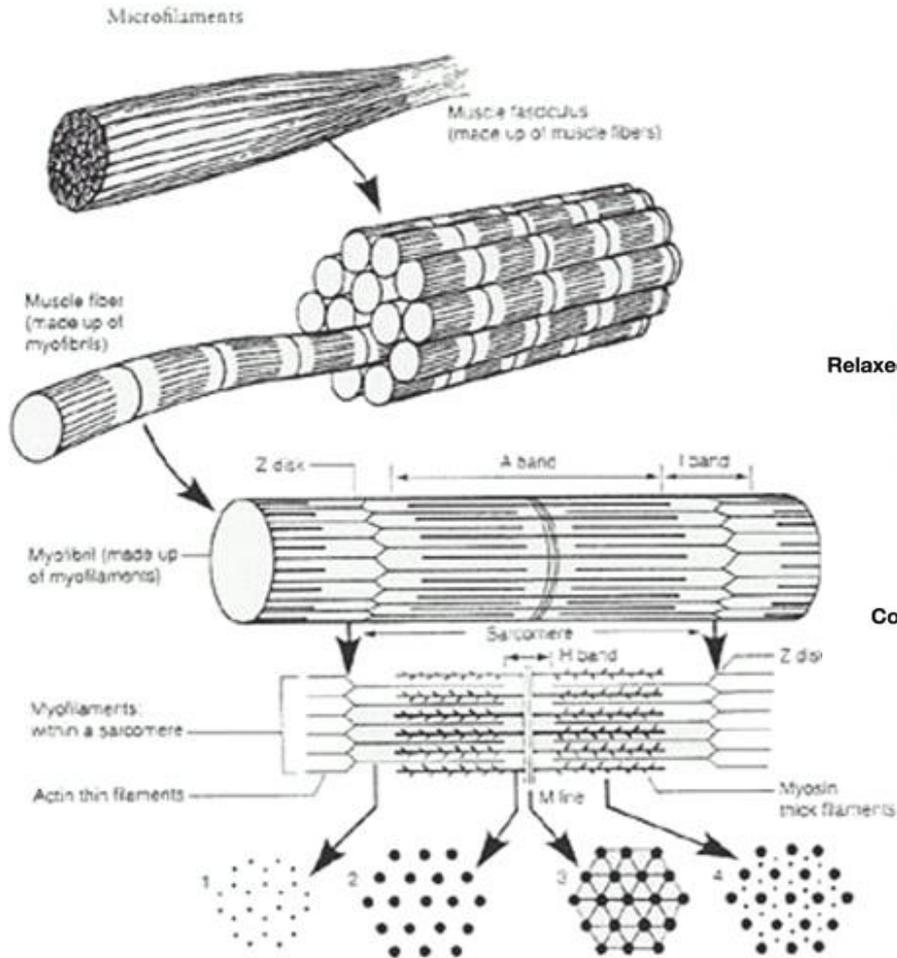
DCOLOR

STOP
DRESET
DPROSDIOD

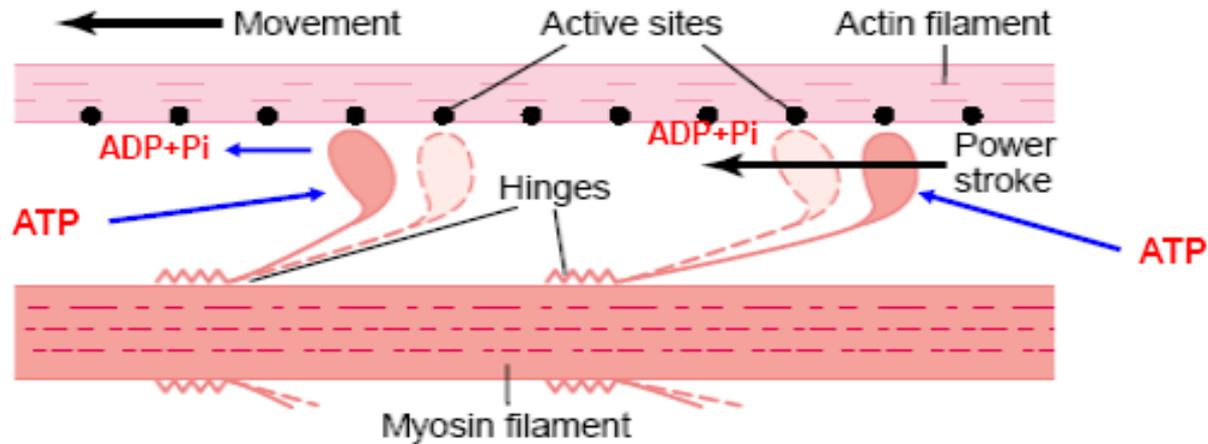
MEASURE
DLINE DAREA
DTRACEDCLR
DCOUNT

TRFTRFPHOT

El músculo

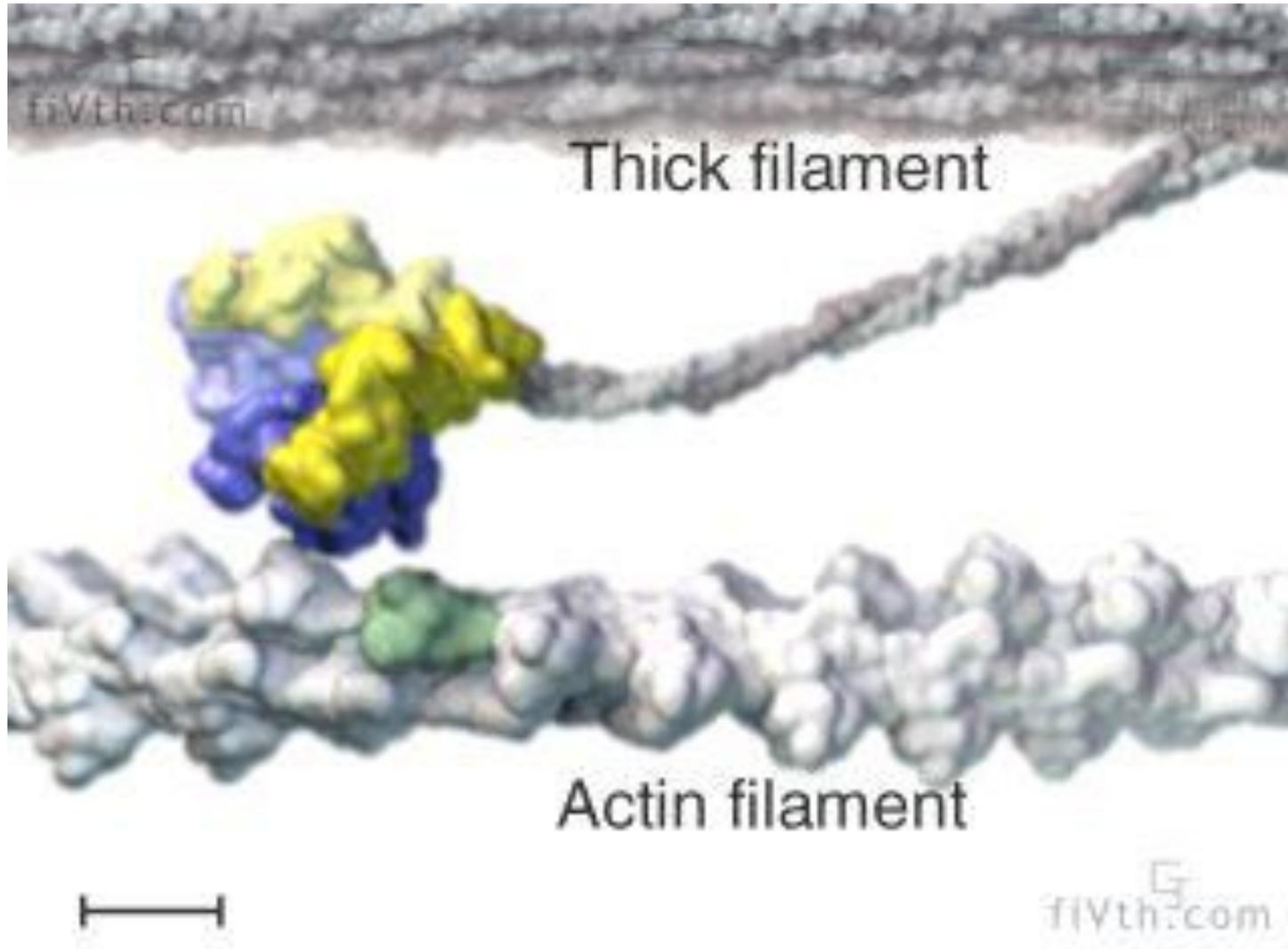


Teoría "paso a paso" de la contracción muscular

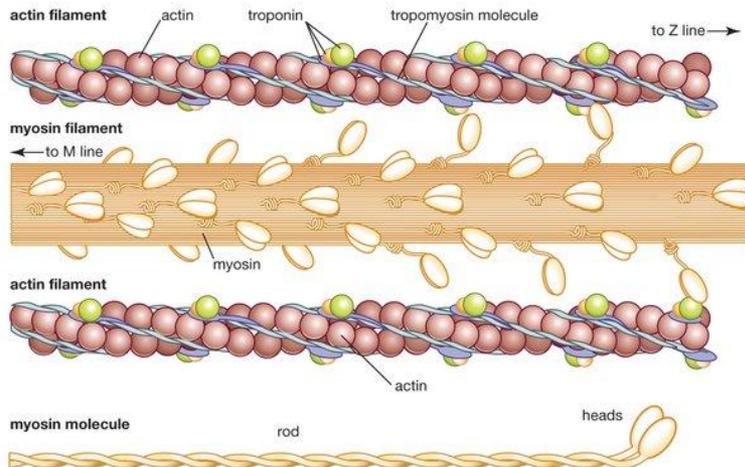
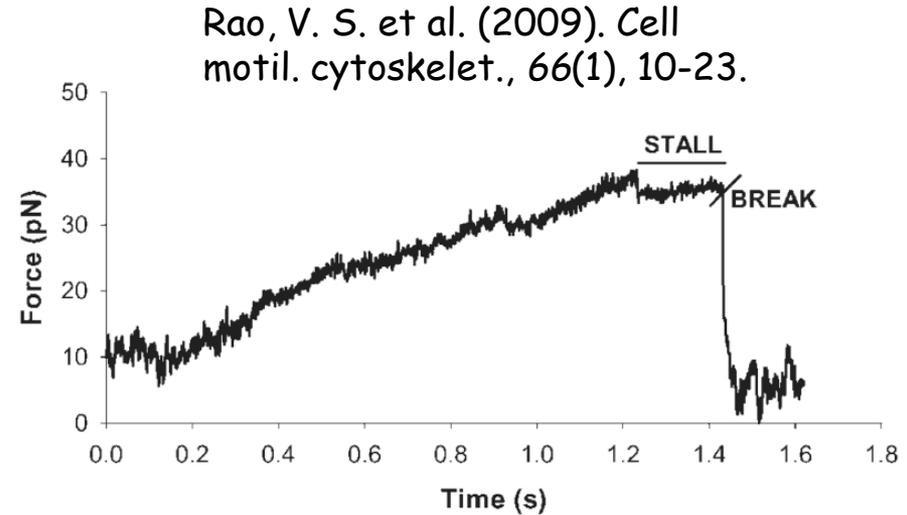
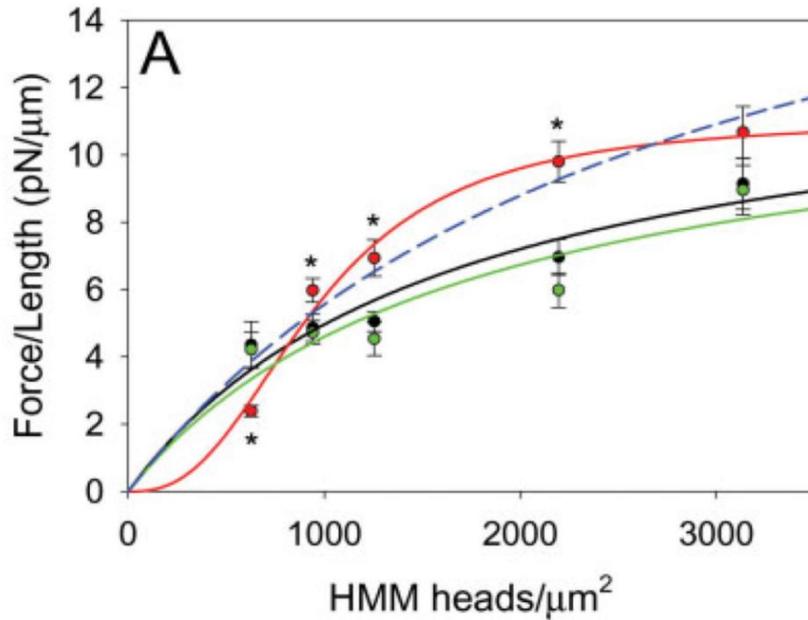


- Antes de la contracción, la cabeza de miosina se extiende perpendicularmente al filamento de actina y se une a una molécula de ATP.
- Su actividad ATPasa desdobla el ATP en ADP+Pi, que quedan unidos a ella.
- Cuando quedan expuestos los puntos activos, la cabeza de miosina se une.
- La cabeza se inclina hacia el brazo produciéndose el "golpe de fuerza" gracias a la energía proporcionada por el ATP. El filamento de actina es arrastrado hacia adentro.
- Se liberan el ADP y Pi de la cabeza de miosina, lo que separa la miosina de la actina para volver a su posición original, y comenzar un nuevo ciclo cuando se una otra molécula de ATP.

Reconstrucción cristalográfica:



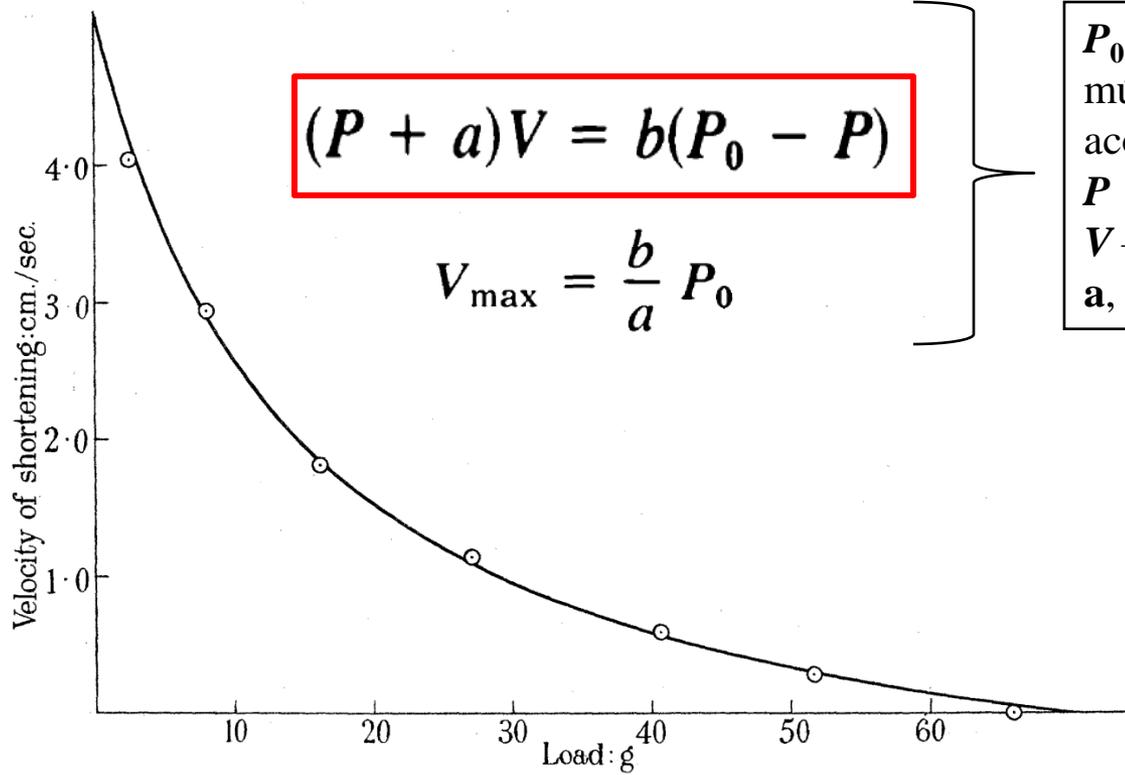
Comportamiento de unión receptor-ligando entre actina y miosina



El grado de fosforilación de la tropomiosina determina dinámicas de unión cooperativas o hiperbólicas entre los filamentos individuales de actina y las cabezas de miosina (HMM).

La ecuación de Hill "macroscópica"

- Ecuación empírica
- La velocidad de contracción V tiene una dependencia hiperbólica con respecto a la carga sustentada P



$$(P + a)V = b(P_0 - P)$$

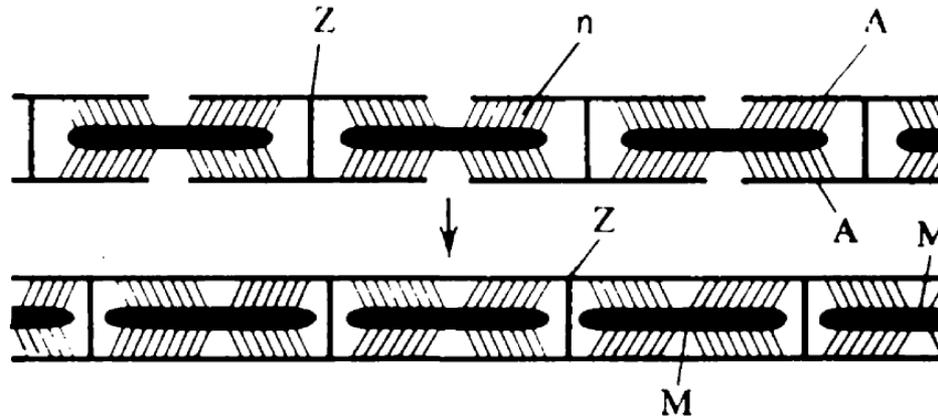
$$V_{\max} = \frac{b}{a} P_0$$

P_0 – máxima carga que el músculo puede soportar sin acortamiento o alargamiento.
 P – Carga aplicada
 V – Velocidad de contracción
 a, b – constantes

Hill, A. V. (1938). The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 126(843), 136-195.

Deducción de la ecuación de Hill "microscópica"

- ¿Podemos deducir la Ec. de Hill basándonos en los aspectos moleculares de la contracción muscular?



Queremos obtener:

$$(f + a)V = b(f_0 - f)$$

f_0 – fuerza desarrollada
por un puente cruzado
 f – fuerza externa aplicada
por puente cruzado

La teoría física de los motores moleculares está inacabada.

Dos ideas propuestas, respectivamente, por R. Feynman y E. Purcell dominan el escenario teórico actual.

Los “trinquetes y retenes” de Feynman

46

Ratchet and pawl

46-1 How a ratchet works

In this chapter we discuss the ratchet and pawl, a very simple device which allows a shaft to turn only one way. The possibility of having something turn only one way requires some detailed and careful analysis, and there are some very interesting consequences.

The plan of the discussion came about in attempting to devise an elementary explanation, from the molecular or kinetic point of view, for the fact that there is a maximum amount of work which can be extracted from a heat engine. Of course we have seen the essence of Carnot's argument, but it would be nice to find an explanation which is elementary in the sense that we can see what is happening physically. Now, there are complicated mathematical demonstrations which follow from Newton's laws to demonstrate that we can get only a certain amount of work out when heat flows from one place to another, but there is great difficulty in converting this into an elementary demonstration. In short, we do not understand it, although we can follow the mathematics.

In Carnot's argument, the fact that more than a certain amount of work cannot be extracted in going from one temperature to another is deduced from another axiom, which is that if everything is at the same temperature, heat cannot be converted to work by means of a cyclic process. First, let us back up and try to see, in at least one elementary example, why this simpler statement is true.

Let us try to invent a device which will violate the Second Law of Thermodynamics, that is, a gadget which will generate work from a heat reservoir with everything at the same temperature. Let us say we have a box of gas at a certain temperature, and inside there is an axle with vanes in it. (See Fig. 46-1 but take $T_1 = T_2 = T$, say.) Because of the bombardments of gas molecules on the vane, the vane oscillates and jiggles. All we have to do is to hook onto the other end of the axle a wheel which can turn only one way—the ratchet and pawl. Then when the shaft tries to jiggle one way, it will not turn, and when it jiggles the other, it will turn. Then the wheel will slowly turn, and perhaps we might even tie a flea onto a string hanging from a drum on the shaft, and lift the flea! Now let us ask if this is possible. According to Carnot's hypothesis, it is impossible. But if we just look at it, we see, *prima facie*, that it seems quite possible. So we must look more closely. Indeed, if we look at the ratchet and pawl, we see a number of complications.

First, our idealized ratchet is as simple as possible, but even so, there is a pawl, and there must be a spring in the pawl. The pawl must return after coming off a tooth, so the spring is necessary.

Another feature of this ratchet and pawl, not shown in the figure, is quite essential. Suppose the device were made of perfectly elastic parts. After the pawl is lifted off the end of the tooth and is pushed back by the spring, it will bounce against the wheel and continue to bounce. Then, when another fluctuation came, the wheel could turn the other way, because the tooth could get underneath during the moment when the pawl was up! Therefore an essential part of the irreversibility of our wheel is a damping or deadening mechanism which stops the bouncing. When the damping happens, of course, the energy that was in the pawl goes into the wheel and shows up as heat. So, as it turns, the wheel will get hotter and hotter. To make the thing simpler, we can put a gas around the wheel to take up some of the heat. Anyway, let us say the gas keeps rising in temperature, along with the wheel. Will it go on forever? No! The pawl and wheel, both at some temperature

46-1 How a ratchet works

46-2 The ratchet as an engine

46-3 Reversibility in mechanics

46-4 Irreversibility

46-5 Order and entropy

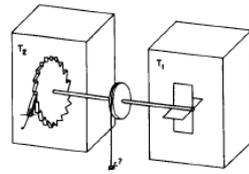


Fig. 46-1. The ratchet and pawl machine.

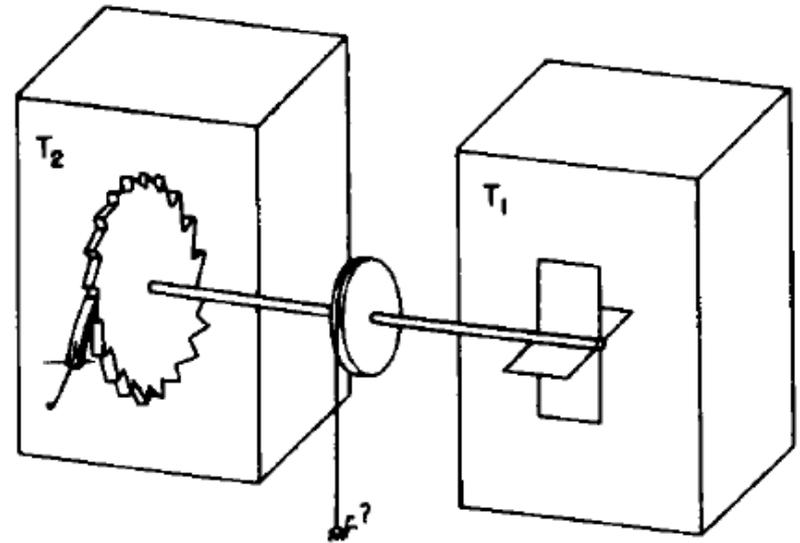
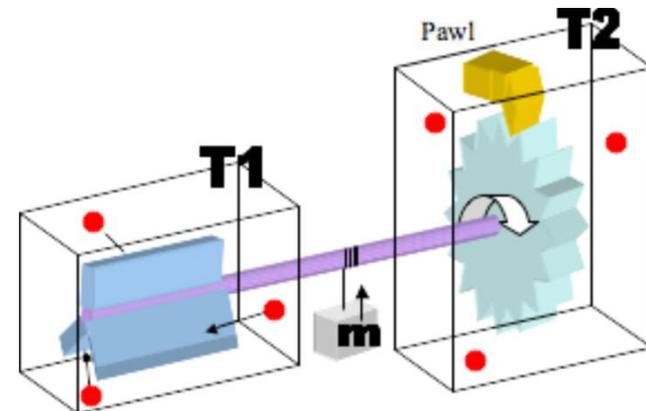


Fig. 46-1. The ratchet and pawl machine.



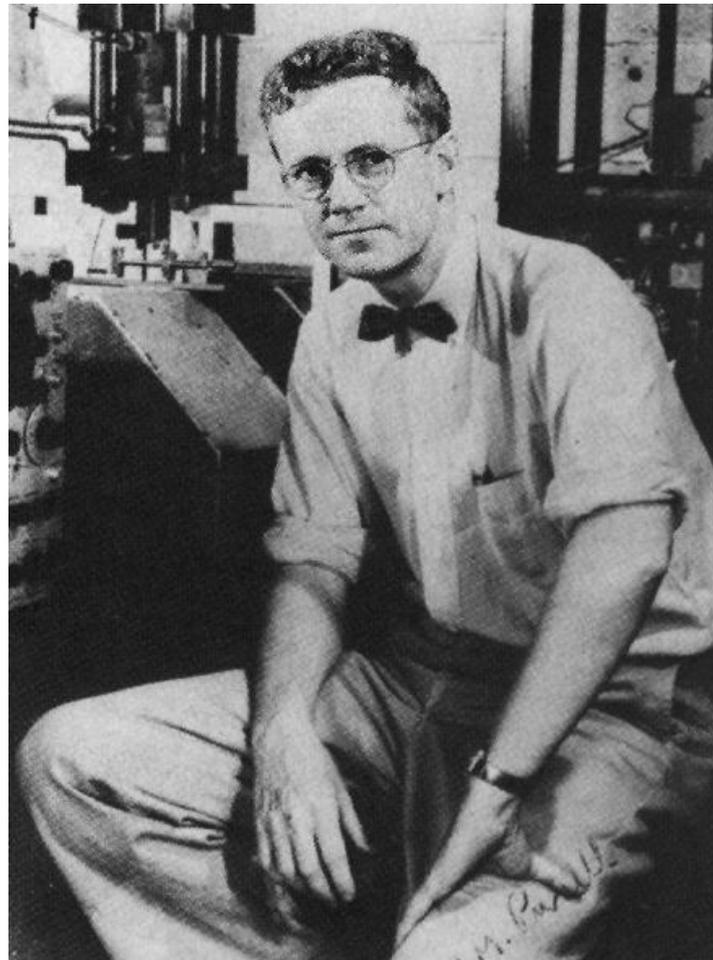
Life at Low Reynolds Number

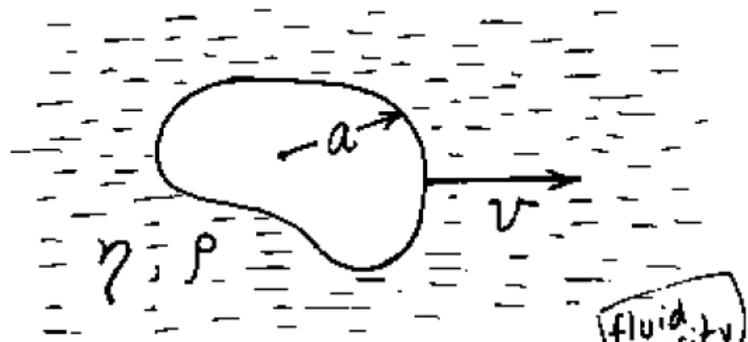
E.M. Purcell

Lyman Laboratory, Harvard University, Cambridge, Mass 02138

June 1976

American Journal of Physics vol 45, pages 3-11, 1977.





inertial forces
viscous forces

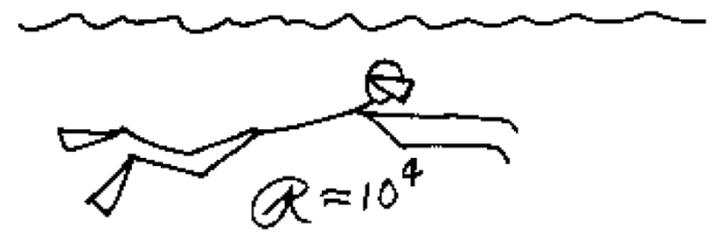
$$\approx \frac{av\rho}{\eta}$$

fluid density ρ
fluid viscosity η

$$R = \frac{av\rho}{\eta} = \frac{av}{\nu}$$

$$= 10^{-2} \frac{\text{cm}^2}{\text{sec}} \text{ for water}$$

Figure 1



$$R = 10^2$$



Los motores moleculares deben existir, ya que sino sería imposible la movilidad direccionada de los organismos unicelulares en un fluido.

Muchas gracias