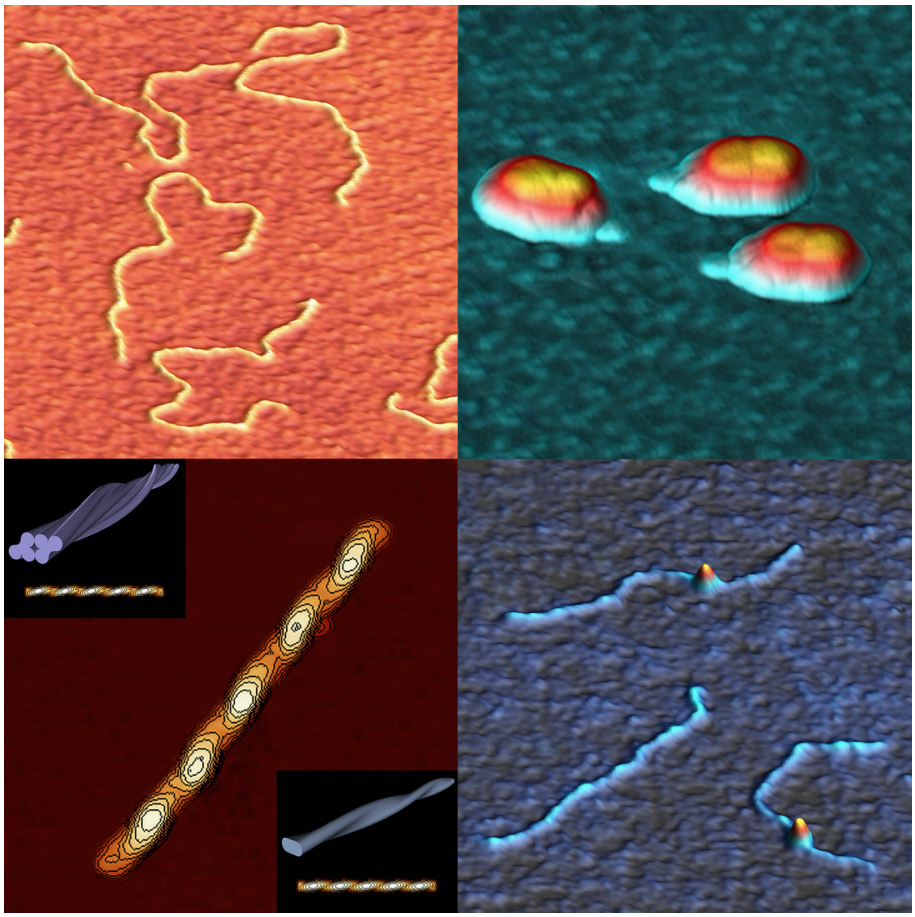
Aplicaciones de la microscopía de fuerzas al estudio de sistemas de moléculas biológicas individuales



Tesis Doctoral
Enero de 2003

Fernando Moreno Herrero

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Física de la Materia Condensada

Aplicaciones de la microscopía de fuerzas al estudio de sistemas de moléculas biológicas individuales

Memoria presentada por D. Fernando Moreno Herrero para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas

dirigida por el Dr. Arturo M. Baró Vidal

en el Departamento de Física de la Materia Condensada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

A mis padres, Pilar y Fernando

Las ideas tienen vida propia, no pertenecen, afortunadamente,
a aquellos que las conciben

"El Siglo de la Ciencia", J. M. Sánchez Ron

Índice general

Introducción 15

Capítulo 1.

Métodos no invasivos para medidas en material biológico

1.1. Introducción 21

1.2. Fundamento de la microscopía de fuerzas 23

1.3. Técnicas de medida topográfica en AFM 26

1.3.1. Modo clásico de contacto 28

1.3.1.1. Las fuerzas laterales 28

1.3.2. Dynamic Atomic Force Microscopy (DAFM) 30

1.3.3. Jumping Mode (JM) 33

1.4. Métodos no invasivos para medidas en aire ambiente 36

1.5. Métodos no invasivos para medidas en líquido 40

1.5.1. DAFM en medio líquido 44

1.5.2. JM en medio líquido 51

1.5.2.1. Experimentos sobre ADN 54

1.5.2.2. Experimentos sobre el bacteriófago ϕ29 57

1.6. JM versus DAFM en líquido 60

1.7. Mapas de adhesión en líquidos 64

1.8. Resumen 65

Capítulo 2.

Propiedades físicas de biomoléculas: la conductividad eléctrica del ADN

2.1. Introducción 67

2.2. Contexto histórico 69

2.3. Preparación de muestras de ADN 70

2.3.1. Preparación de muestras de ADN usando $MgCl_2$ 71

2.3.2. Preparación de muestras de ADN usando APTES 72

2.4. Experimentos con contacto 72

2.4.1. Experimentos en Poly(dG)-Poly(dC) 75

2.4.2. Medidas con otros metales y en otros substratos 76

2.5. Experimentos sin contacto 78

2.5.1. Experimento electrostático sobre ADN 81

2.5.2. Experimento electrostático sobre ADN y nanotubos 82

2.6. Búsqueda de otros conductores moleculares basados en ADN 85

2.7. El *M*-ADN 85

2.8. Fabricación de *M*-ADN 87

2.8.1. Concentraciones de Ni^{2+} y Co^{2+} 89

2.8.2. Influencia del pH, tiempo de reacción y estabilidad 90

2.8.3. Reversibilidad de la reacción 91

2.8.4. El experimento radioactivo 92

2.9. Caracterización topográfica del *M*-ADN 95

2.10. Experimentos de conductividad en *M*-ADN 97

2.11. La conductividad del ADN: una visión en perspectiva 98

2.12. Resumen 101

Capítulo 3.

Caracterización estructural de biomoléculas: los filamentos apareados helicoidales de la enfermedad de Alzheimer

3.1. Introducción 103

3.2. Resolución del AFM 104

3.2.1. Resolución vertical 105

3.2.2. Resolución lateral 105

3.2.2.1. Modo contacto 106

3.2.2.2. Modos dinámicos y de no contacto 109

3.3. La enfermedad de Alzheimer y los filamentos apareados helicoidales 111

3.4. Caracterización por AFM de los PHFs en aire ambiente 114

3.4.1. Puntas estándar 114

3.4.2. Puntas ultra-finas 119

3.5. Caracterización por AFM de los PHFs en medio líquido 121

3.6. Análisis de resultados, modelos y simulaciones 124

3.6.1. Modelos de trabajo 125

3.6.2. Simulaciones 129

3.6.2.1. Modelo cinta gruesa en líquido 130

3.6.2.2. Modelo cinta gruesa en aire ambiente 131

3.6.2.3. Modelo Wischik-Crowther en líquido 133

3.6.2.4. Modelo Wischik-Crowther en aire ambiente 135

3.6.2.5. Conclusiones 138

3.7. Experimentos con filamentos fabricados *in vitro* 139

3.7.1. La proteína tau 140

3.7.2. Filamentos *in vitro* formados por ½ R de tau 140

3.7.3. Filamentos *in vitro* formados por tau completo 144

3.8. Resumen 144

3-A. Anexo al capitulo 3. Algoritmo de la dilación 147

Capítulo 4.

Interacciones entre biomoléculas

4.1. Introducción 149

4.2. Identificación de secuencias reguladoras con el microscopio de fuerzas 150

4.3. Interacción ADN-proteína 153

4.3.1. El sistema control Pho4-*PHO5* 154

4.3.2. El sistema *Mig1-HXK2* 158

4.3.3. El sistema *Med8-SUC2* 162

4.3.4. El sistema *Med8-HXK2* 164

4.4. Estudio de interacciones ADN-proteína con el AFM 164

4.5. Interacción proteína-proteína 167

4.5.1. El sistema Med8-Med8 168

4.6. La microscopía de fuerzas como una herramienta para la biología molecular 170

4.7. Resumen 171

Anexo A.

Breves nociones de biología molecular y técnicas básicas de manipulación de ADN

A.1. Introducción 175

A.2. Ácidos nucleicos 176

A.2.1. Estructura tridimensional del ADN: el modelo de Watson-Crick 178

A.2.2. Funciones biológicas de los ácidos nucleicos 180

A.2.2.1. Replicación: de ADN a ADN 180

A.2.2.2. Transcripción: de ADN a ARN 181

A.2.2.3. Traducción: de ARN a proteína 181

A.3. Proteínas 183

A.3.1. Estructura tridimensional de las proteínas 185

A.4. Factores transcripcionales (el *on/off* de la transcripción) 186

A.5. Enzimas de restricción y ligasas (tijeras y pegamento) 188

A.6. Electroforesis en gel de agarosa 189

A.7. Ejemplo práctico. Linearización de plásmidos 191

A.8. ADN Polimerasa (un motor molecular) 194

A.9. Polymerase Chain Reaction (PCR) 195

A.10. Ejemplo práctico. Fabricación de muestras de ADN para realizar ensayos enzimáticos y experimentos con pinzas ópticas. 197

A.10.1. Fabricación del Asa 1 199

A.10.2. Fabricación del Asa 2 201

A.10.3. Fabricación de la parte central 201

A.10.4. Experimentos con las pinzas ópticas 202

Anexo B.

Calibración del microscopio de fuerzas

B.1. Calibración del AFM para visualizar moléculas individuales 207

B.1.1. Calibración Z 208

B.1.2. Calibración XY 209

Conclusiones 211

Publicaciones 215

Agradecimientos 217

Índice de figuras 221

Índice de tablas 227

Referencias 229

Abreviaturas 243

Introducción

La física ha dominado una gran parte de la ciencia del siglo XX hasta la irrupción, en las últimas décadas, de la bioquímica y en particular de la biología molecular. Si analizamos la historia veremos que prácticamente toda la física moderna se desarrolló en la primera mitad del siglo. Pero la física y la bioquímica han crecido mucho más unidas de lo que uno podría pensar en un principio. Numerosos físicos ilustres se han interesado por los problemas biológicos e incluso han tenido relevantes aportaciones a la ciencia. Quizás uno de los más relevantes fue Francis Crick que, junto con James Watson propusieron el modelo de la estructura del ADN en 1953.

Sin embargo, la presencia de físicos involucrados en el estudio de problemas biológicos no es habitual y, posiblemente, el nexo histórico de unión entre físicos y biólogos han sido las técnicas experimentales desarrolladas por los primeros para uso de los segundos. Por ejemplo, el descubrimiento de la radioactividad por parte de Marie y Pierre Curie dio lugar muchos años más tarde, hacia 1946, a la descripción de muchas rutas metabólicas mediante el uso de isótopos radioactivos en las reacciones bioquímicas. Hoy en día el uso de isótopos radioactivos en un laboratorio de biología molecular es una realidad cotidiana. Todos los descubrimientos físicos relacionados con los modelos atómicos simples; partículas elementales como el electrón; las teorías de dualidad onda-corpúsculo etc... de principios del siglo XX, posibilitaron la invención del microscopio electrónico en la década de los 30 y el desarrollo de la cristalografía de rayos X. Y no debemos

olvidar el desarrollo de la resonancia magnética nuclear, otra técnica desarrollada por físicos y de gran importancia, no sólo en investigación sino también en biomedicina. Y ya más recientemente, el desarrollo tecnológico de sistemas de posicionamiento mecánico con precisión sub-nanométrica (materiales piezoeléctricos) dio lugar a la invención de los microscopios de proximidad: el microscopio de efecto túnel, el microscopio de fuerzas y el microscopio óptico de campo cercano. Sin duda, el crecimiento espectacular del conocimiento bioquímico durante las últimas cuatro décadas se debe directamente al desarrollo de poderosas técnicas de investigación.

		FÍSICA	BIOQUÍMICA Y BIO. MOL.
1900	Planck	Cuantos de energía	
	Drude	Modelo de conductividad eléctrica	
1905	**Einstein**	Efecto fotoeléctrico	
		Teoría de la relatividad especial	
1911	Onnes	Descubrimiento de la superconductividad	
	Rutherford	Modelo del átomo de Rutherford	
1912	Bohr	Modelo del átomo de Bohr	
1914	Franck		
	Hertz	Estados estacionarios del átomo de Bohr	
1915	**Einstein**	Teoría de la relatividad general	
1916	Sommerfeld	Generalización del átomo de Bohr	
1918	Bohr	Principio de correspondencia	
1921	Landé	Explicación efecto Zeeman anómalo	
1922	Stern		
	Gerlach	Cantización espacial del átomo de Bohr	
1922	Catalán	Multipletes	
	Sommerfeld	Introduce un nuevo número cuántico	
1923	Compton	Aspectos corpusculares de la luz	
1924	de Broglie	Dualidad onda-corpúsculo	
1924		Estadística de Bose-Einstein	
1924	Kramers	Teoría cuántica de la dispersión	
1925	**Pauli**	Principio de exclusión	
1925	**Heisenberg**	Mecánica cuántica, principio de incertidumbre	
1926	**Schrödinger**	Mecánica cuántica ondulatoria	
1926	**Fermi**	Estadística de Fermi	
1927	Davisson		
	Germer	Difracción de electrones	
1928	Dirac	Ecuación relativista del electrón	
1930-	Lawrence	Aceleradores de partículas	
		Física de altas energías. Física nuclear	
1931	Ruska, Knoll	Microscopio electrónico	
1938	Hahn,		
	Strassmann	Física del Uranio	
1945		Bomba atómica	

		FÍSICA	BIOQUÍMICA Y BIO. MOL.
1945	**Sanger**		Técnicas de secuenciación de proteínas
1947	**Bardeen**		
	Shockley		
	Brattain	El transistor	
1948	Gamow	Teoría del Big Bang	
	Feymann	Electrodinámica cuántica	
1950	Hershey		
	Chase		Demostraron que el ADN es el material genético
1953	**Watson, Crick**		Modelo teórico de la estructura del ADN
1955	**Sanger,** Tuppy		Secuencia de la insulina
1956	Landau	Teorías líquidos cuánticos	
1958	**Kornberg**		Mecanismos de síntesis de ácidos nucleicos
1959	**Ochoa**		Mecanismos de síntesis de ácidos nucleicos
1960	Perutz		Difracción de Rayos X de una proteína
1965	Ochoa, Nirenberg		
	Khorana		El código genético
1966	Gell-mann	Quarks y Modelo Estándar	
1967	Penzias y Wilson	Rad. de fondo del universo	
			Aislamiento de la enzima ADN ligasa
1968	Arber,		
	Nathans, Smith		Descubrimiento de los enzimas de restricción
1970-			Tecnicas de ADN recombinante
	Berg y Lobban		1ªMolecula de ADN recombinante
	Sanger		Técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos
1977			Corte selectivo del ADN mediante mét. químicos
1980	Klug		Estructura de la cromatina
1982	Binnig y Rohrer	Mic. de efecto túnel	
			Regulación génica en eucariotas
1986	Binnig,		
	Gerber y Quate	Mic. de fuerzas atómicas	
			Estructura cristalográfica del complejo ADN-prot.
1985	**Mullis**		Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
1996			Genoma de la levadura
1997			Clonacion de animales (la oveja Dolly)
2000	Celera genomics		
	Sanger Center		
	MIT		Secuenciación del genoma humano

Visión personal de los avances más espectaculares del siglo XX en física y en bioquímica. En negrita aparecen los científicos más relevantes. Como se puede observar la física domina la primera mitad del siglo mientras que la biología molecular lo hace en la segunda mitad.

En mi opinión, la física puede aportar mucho a la comprensión de los sistemas más complejos que existen en la naturaleza: los sistemas biológicos. Esta es la motivación principal que me impulsó a la hora de aceptar el reto que me

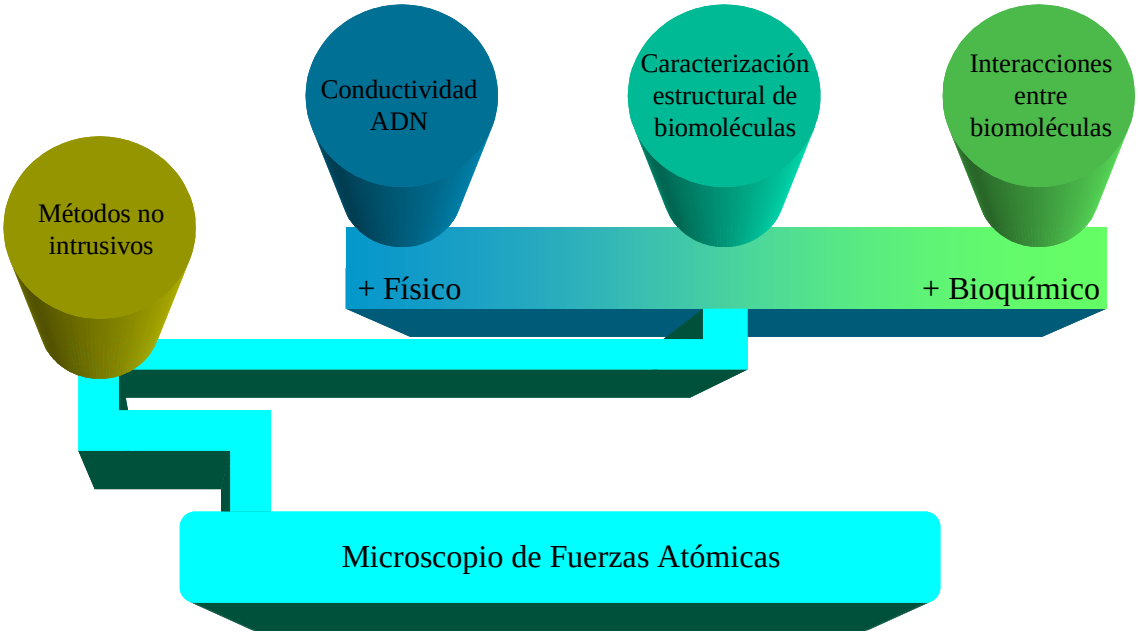
propuso mi director de tesis hace ya más de cuatro años. Este reto consistía en investigar en el campo de la biofísica utilizando el microscopio de fuerzas. Pero, ¿qué es “hacer biofísica”? La respuesta es, ciertamente, complicada. Quizás, considerar a la biofísica como la disciplina que estudia los sistemas biológicos desde un punto de vista físico sea una definición acertada. Y esto nos lleva a la siguiente pregunta: ¿cómo podemos estudiar sistemas biológicos con el microscopio de fuerzas? Ésta es, precisamente, la cuestión sobre la que gira esta tesis. Por eso no es mi intención responderla en este momento y lo que hago es animarles e invitarles a que lean y disfruten de este trabajo que intenta resumir la labor investigadora desarrollada durante los más de cuatro años de estancia en el Laboratorio de Nuevas Microscopias en la Universidad Autónoma de Madrid.

El Laboratorio de Nuevas Microscopias es sin duda un referente mundial en técnicas de campo cercano, principalmente en microscopía de efecto túnel (STM) y en microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Acercar la biología molecular y la física en un laboratorio en el que prácticamente no se tenía ninguna experiencia en material biológico no ha sido una tarea sencilla. En la actualidad el Laboratorio de Nuevas Microscopias dispone de la instrumentación básica de un laboratorio de biología molecular que permite manipular ADN. Aparatos que permiten preparar disoluciones de todo tipo al pH apropiado; realizar cortes con enzimas de restricción o hacer una electroforesis; visualizar el resultado en un transiluminador o tomar una fotografía del resultado del gel.

Esta tesis está dividida en 4 capítulos y 2 anexos. El primer capítulo está dedicado a las técnicas de medida del microscopio de fuerzas orientadas a la visualización de moléculas biológicas. Los otros tres capítulos se refieren a tres aspectos que intentan abarcar el amplio espectro de aplicaciones de la microscopía de fuerzas a sistemas biológicos. El primero de ellos es un concepto físico y trata sobre el estudio de las propiedades eléctricas de la molécula biológica por excelencia: el ADN (capítulo 2). El segundo aspecto usa una capacidad esencial del AFM como es la visualización de superficies. En este caso aplicado a un polímero de una proteína llamada tau que forma unos filamentos de estructura característica que son responsables en parte de la demencia senil de Alzheimer (capítulo 3). El tercer tema abordado en esta tesis es puramente bioquímico y se refiere a las interacciones entre biomoléculas. En concreto entre proteínas y entre ADN y proteínas (capítulo 4). Los tres temas están ordenados de forma que vamos de un problema más físico hacia un problema más bioquímico. El primero de los

anexos que incluyo intenta proporcionar unas nociones básicas de biología molecular, especialmente orientadas a aquellos lectores no familiarizados con los términos y la nomenclatura bioquímica básica y muy útiles para comprender esta tesis en su totalidad. Hacia la parte final de ese anexo incluyo parte de los trabajos realizados con pinzas ópticas en diferentes estancias en el laboratorio del Prof. Carlos Bustamante en la Universidad de California en Berkeley. El otro anexo muestra una manera alternativa a la hora de calibrar el microscopio de fuerzas que consiste en usar moléculas de ADN de tamaño conocido. La tesis finaliza con las correspondientes secciones de conclusiones, publicaciones, bibliografía y agradecimientos.

Aplicaciones de la microscopía de fuerzas al estudio de sistemas de moléculas biológicas individuales



Esquema que muestra la estructura de la presente tesis doctoral.

1. Métodos no invasivos para medidas en material biológico

1.1. Introducción.

Por material biológico nos referimos a las moléculas o conjuntos de moléculas que desempeñan algún papel dentro del ser vivo. Es, ciertamente, un concepto muy amplio y vago que no se caracteriza por una uniformidad en tamaños. Material biológico es una molécula de ADN que tiene un diámetro típico de 2 nm, pero también lo es una célula completa de varias decenas de micras.

Desde el punto de vista de las propiedades mecánicas, la característica común de los materiales biológicos es que son blandos. Sin embargo, tampoco hay uniformidad en los módulos de Young de diferentes tipos de células ni entre los diferentes componentes que forman una célula. Así, por ejemplo, mientras el módulo de Young de una célula blanda de músculo es de 50-70 Pa (Maksym et al. 2000) el de un fibroblasto es de 2.2 kPa (Wu et al. 1998). Ya dentro de la célula, mientras los filamentos de actina o los microtúbulos tienen un módulo de Young de 1 GPa (Alberts et al. 1994; Janmey. 1995) polímeros como el ADN tiene un módulo de Young de 0.340 GPa (Gromiha et al. 1996). A pesar de la gran dispersión en los valores del módulo de Young del material biológico, éstos son siempre, al menos

dos órdenes de magnitud menores que las constantes elásticas de otros sólidos. Por ejemplo el módulo de elasticidad de un cristal de silicio es 166 GPa (Launay. 1956) y el del cristal de hierro vale 234 GPa (Rayne & Chandrasekhar. 1961; Ashcroft & Mermin. 1976). Por tanto si algo tienen en común proteínas, membranas, ácidos nucleicos, lípidos, etc... es que son materiales blandos. Sin embargo, no es ésta la característica que hace único al material biológico sino el carácter de *vida* que hay intrínseco en él, es decir la posibilidad de llevar a cabo un proceso químico o biológico en medio acuoso.

Por tanto, si queremos estudiar materiales biológicos debemos tener en cuenta que tratamos con materiales blandos que preservan sus propiedades físicas y biológicas en medio líquido. El Microscopio de Fuerzas Atómicas o AFM (Atomic Force Microscopy) (Binnig et al. 1986) es la única técnica que permite la caracterización topográfica de moléculas biológicas individuales en su medio fisiológico y con una resolución del orden del nanómetro. No es por tanto gratuito que durante los últimos 10 años se hayan creado grandes expectativas en torno al AFM como una técnica con grandes posibilidades en biología molecular.

Sin embargo, mientras el AFM es actualmente una técnica enormemente extendida en diversas disciplinas, no ha tenido todavía la repercusión esperada en el campo de la biofísica. En mi opinión, tres factores explican este hecho. Por una parte, a fecha de hoy la técnica no es tan sencilla y estándar como lo es, por ejemplo, la microscopía electrónica. Esto, sin duda, no facilita un acercamiento de los biólogos a la técnica pues en la mayoría de los casos se necesita un técnico físico que obtenga las medidas e interprete los resultados lo que, muchas veces, no es tarea sencilla. Por otra parte, mientras los sistemas de operación de la microscopía de fuerzas en medio ambiente o en condiciones de vacío han experimentado un fuerte desarrollo y caracterización no ha ocurrido lo mismo para medidas en medio líquido, lugar donde tiene un nicho importante el AFM en biología. Esto es porque la operación en líquido es, sin duda, mucho más complicada que en aire ambiente o en vacío. La tercera razón es que la microscopía de fuerzas es una técnica única solamente si su operación cumple los tres requisitos antes mencionados: estudio de moléculas *individuales*, en su medio *fisiológico* y con una resolución de *~nanómetro*. La falta de alguna de estas tres características hace que el AFM ya no sea la mejor técnica a utilizar. Por ejemplo si se quiere sacrificar la alta resolución, la técnica a utilizar es la microscopía óptica, con la que el estudio de procesos biológicos *in vivo* es posible (Howard et al. 1989). Si lo que se busca es la máxima resolución posible, entonces la

caracterización por resonancia magnética nuclear (NMR) o por rayos X son las técnicas que consiguen la máxima resolución (~Å) (Kim et al. 1995). Por último si el interés principal es el estudio de procesos biológicos que dependen de la fuerza en moléculas individuales, sin importar su caracterización topográfica, la técnica de las pinzas ópticas es la mejor elección (Wuite et al. 2000).

El desarrollo de métodos de medida y operación que garanticen la alta resolución y el estudio de moléculas individuales en medio fisiológico es un aspecto clave para potenciar el AFM en biología. En este sentido está escrito este capítulo en el que me centro en las técnicas de medida de esta microscopía más apropiadas para el estudio de material biológico en aire ambiente y en medio líquido.

El capítulo comienza con una breve introducción a la microscopía de fuerzas. A continuación muestro los tres métodos de medida topográfica utilizados en esta tesis: el modo contacto o CM (Contact Mode), los modos dinámicos de modulación en amplitud o DAFM (Dynamic Atomic Force Microscopy) y el método de salto o JM (Jumping Mode). Tras describir los métodos de medida, analizaré su aplicación a los dos ambientes empleados: aire y líquido. Veremos que mientras en aire ambiente el método más apropiado para visualizar material biológico es el DAFM, en medio líquido el mejor método es el JM.

1.2. Fundamento de la microscopía de fuerzas

El microscopio de fuerzas pertenece a la familia de la microscopía de proximidad o SPM (Scanning Probe Microscopy) en la que se encuentra el microscopio de efecto túnel o STM (Scanning Tunneling Microscopy) (Binnig & Rohrer. 1982); el microscopio óptico de campo cercano o SNOM (Scanning Near-field Optical Microscopy) (Pohl. 1990) y el microscopio de fuerzas o AFM (Atomic Force Microscopy) (Binnig et al. 1986). Los microscopios de proximidad se basan en la interacción que existe entre una sonda muy afilada y una superficie. Al igual que un ciego usa sus dedos para leer en lenguaje Braille, el AFM utiliza una punta muy afilada de radio de curvatura típico de 10 nm que pasa sobre una superficie. El microscopio de fuerzas nos proporciona una imagen amplificada de la topografía de la superficie. El mecanismo por el cual el AFM adquiere una imagen de la topografía es mantener constante la interacción, entre la punta y la superficie, a medida que la muestra se mueve en la dirección X e Y. Este

movimiento de la muestra se realiza mediante un tubo piezoeléctrico, que además del movimiento en XY permite también el movimiento en la dirección Z. La interacción se mantiene constante gracias a un sistema de realimentación que ajusta de manera precisa el valor Z del piezo, aplicando el voltaje apropiado. La representación de estos voltajes constituye la imagen topográfica de la muestra. El AFM es, por tanto, un microscopio de barrido.

Una de las partes esenciales del AFM es la sonda o punta que explora la superficie, ya que ésta es el sensor de la interacción. Normalmente, estas puntas están construidas en silicio o en nitruro de silicio mediante técnicas de microfabricación[1] y se encuentran al final de una palanca de magnitudes micrométricas (micropalanca) de 100-200 μm de longitud y 20-40 μm de ancho. La constante de fuerza (K) y la frecuencia de resonancia (ω_{res}) son las características esenciales de las micropalancas y varían entre 0.015 N/m y 100 N/m y entre 5 y 500 kHz respectivamente.

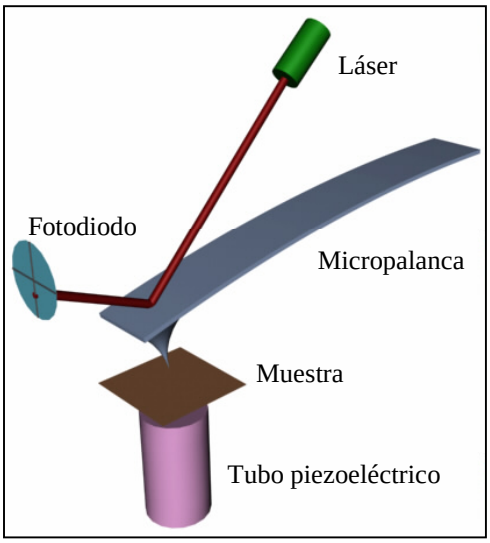


Figura 1.1. Esquema de los componentes básicos de la parte mecánica del microscopio de fuerzas utilizado: la micropalanca con el sistema de detección, la muestra y el tubo piezoeléctrico para realizar el barrido en XYZ.

La detección del movimiento de la micropalanca se realiza habitualmente haciendo incidir un haz láser sobre el extremo de la misma. El haz reflejado se hace incidir sobre un fotodiodo segmentado en 4 sectores. La señal resultante de

[1] Desde el punto de vista técnico, el investigador necesita utilizar micropalancas de baja constante de fuerza (para minimizar cualquier daño sobre la muestra) y altas frecuencias de resonancia. Si tenemos en cuenta la ecuación de un oscilador armónico, $\omega_{res}=\sqrt{(K/m)}$, la única manera de conseguirlo es usando masas pequeñas solamente accesibles usando técnicas de microfabricación.

la diferencia de intensidad entre los cuadrantes superiores e inferiores mide la deflexión de la micropalanca y esta señal es proporcional a la fuerza normal. Análogamente, la diferencia de intensidad entre los cuadrantes laterales mide la torsión de la micropalanca y es proporcional a la denominada fuerza lateral.

Los componentes esenciales de la mecánica de un microscopio de fuerzas típico son: la micropalanca, el sistema de detección de la deflexión de la misma, la muestra y el tubo piezoeléctrico que realiza el barrido en XYZ. Un esquema donde se muestra la disposición de estos elementos se puede ver en la Fig.1.1.

Otra de las características de un microscopio es la resolución que alcanza. La resolución del microscopio de fuerzas depende de muchos factores: del medio ambiente en el que se trabaje; de la técnica de medida topográfica que se emplee y de la muestra utilizada entre otros. Por estos motivos no es fácil hablar de números absolutos en lo que concierne a la resolución del AFM. Sin embargo algunos números que conviene tener siempre presentes son que en medio ambiente y con técnicas de no contacto (éstas son generalmente las condiciones empleadas en esta tesis) se alcanza resolución sub-nanométrica en la dirección Z y del orden del radio de la punta en la dirección X e Y[2]. En cuanto al barrido en XY el tamaño típico varía desde imágenes de pocas decenas de nm hasta de varias decenas de micras.

Hoy en día el microscopio de fuerzas es una herramienta común en una gran variedad de laboratorios de investigación y la técnica es perfectamente conocida para la mayoría de la comunidad científica. Por esta razón, no es mi intención realizar una explicación detallada y exhaustiva de las diferentes microscopías de campo cercano ni en concreto del AFM. Para una explicación más detallada del AFM véase (Luna. 1998; de Pablo. 2000; Gil. 2001); para el STM (Pascual. 1998; Custance. 2002) y para el SNOM véase (Pohl. 1990).

El microscopio de fuerzas utilizado en esta tesis está construido íntegramente en el Laboratorio de Nuevas Microscopías de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Una versión muy similar la comercializa Nanotec Electrónica S.L. La fotografía del mismo se muestra en la Fig.1.2. En la misma figura aparece un corte longitudinal

[2] En el Cap. 3, en el que se estudian las posibilidades de la caracterización estructural de biomoléculas con AFM se desarrolla con más detalle el tema de la resolución del AFM.

de la cabeza del microscopio que muestra el camino óptico del láser. El sistema empleado se caracteriza por un láser de longitud de onda, λ : 635 nm y 3.5 mW de potencia para detectar la deflexión de la micropalanca y por el sistema de adquisición de datos que se realiza de manera digital mediante un procesador digital de señal o DSP (Digital Signal Processor). El AFM utilizado permite la adquisición de imágenes usando modos dinámicos y de contacto (ver Sección. 1.3) y la visualización óptica de la superficie simultáneamente. La adquisición, la representación y tratamiento de las imágenes se realizó con el programa WSxM disponible en http://www.nanotec.es.

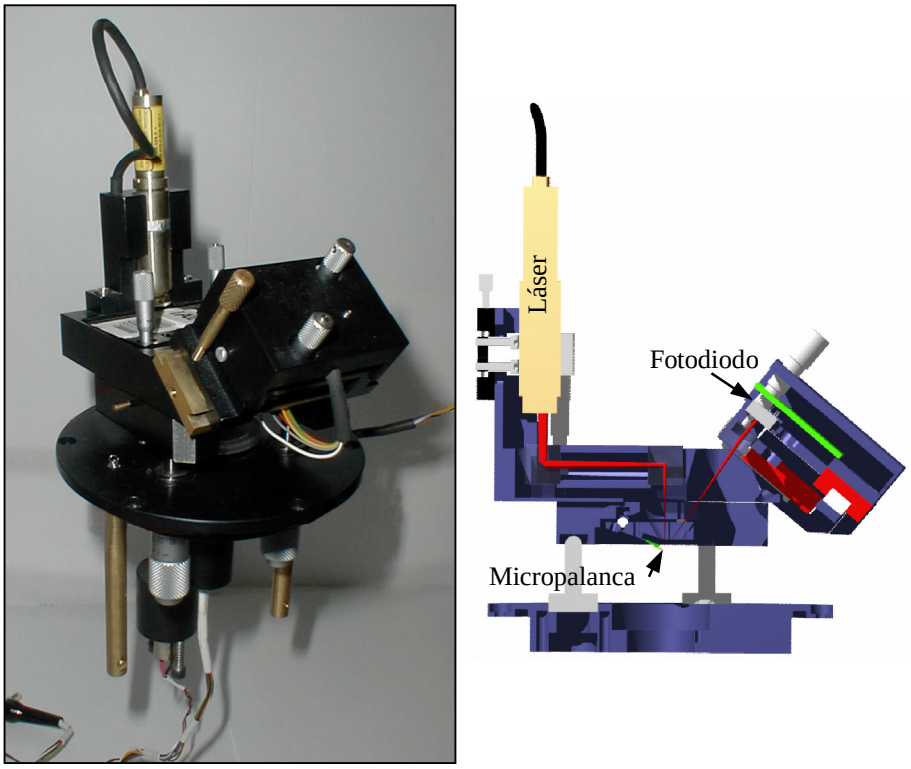


Figura 1.2. Fotografía del microscopio de fuerzas empleado durante el desarrollo de esta tesis (izda.) y corte longitudinal de la cabeza del microscopio (dcha.) en el que se pueden ver las partes más importantes: el láser, el camino del haz láser (rojo), la micropalanca y el fotodiodo.

1.3. Técnicas de medida topográfica en AFM

El potencial V que describe la interacción entre la punta de un AFM y la superficie de la muestra que se quiere analizar puede tener distintos orígenes y

contribuciones. Dependiendo del sistema a estudiar una interacción predomina sobre las demás. De manera general las interacciones más importantes en AFM son: la interacción repulsiva de corto alcance que origina las fuerzas de contacto, en las que se incluye la fuerza normal a la superficie y las fuerzas laterales; la interacción magnética y electrostática que originan las fuerzas magnéticas y electrostáticas de largo alcance y la interacción de van der Waals (vdW) que da origen a las fuerzas de alcance intermedio[3]. Si se trabaja en medio ambiente debemos añadir la interacción capilar que surge de la presencia de la película de agua adsorbida en la superficie. Esta película origina las fuerzas de adhesión[4].

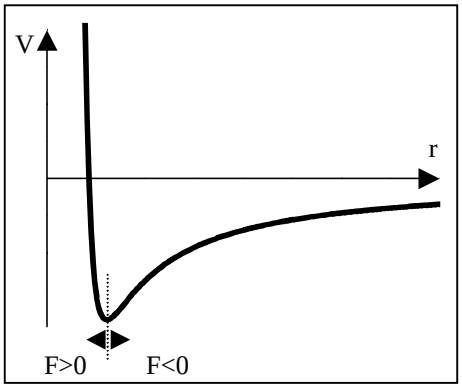


Figura 1.3. Curva cualitativa que describe el potencial de interacción entre punta-muestra en un AFM en aire ambiente. La presencia de un mínimo muy marcado permite definir una región de fuerzas negativas, atractiva o de no contacto y una región de fuerzas positivas, repulsiva o de contacto.

De manera general el potencial que gobierna la interacción punta-muestra en un microscopio de fuerzas viene descrito por la curva de la Fig.1.3. Ya que la fuerza es $F=-\partial V/\partial r$ se puede definir una región atractiva o de no contacto ($F<0$) y otra repulsiva o de contacto ($F>0$). Los modos de medida en AFM se pueden dividir en dos grupos: estáticos y dinámicos. Dentro de los modos estáticos el modo de contacto es el más usado. Este modo de medida trabaja en la región repulsiva de la Fig.1.3. Los modos dinámicos pueden trabajar tanto en la región repulsiva como en la atractiva. En los siguientes apartados describiré los modos de

[3] Las fuerzas intermoleculares de van der Waals son en general menos intensas que otras interacciones atractivas de largo alcance como son la interacción electrostática o la magnética. Para la microscopía de fuerzas, la fuerzas de van der Waals entre una esfera (punta) y un plano (muestra) vale: $F_{vdW}(z)=-HR/6z^2$ siendo H la constante de Hamaker, R el radio de la punta y z la distancia punta-muestra.

[4] Debemos añadir en este contexto que las fuerzas de adhesión tienen principalmente dos orígenes: uno químico según la interacción química de las superficies y otro proveniente del menisco líquido que se forma en aire ambiente. En medio acuoso esta interacción última desaparece y las fuerzas de adhesión se reducen en varios ordenes de magnitud.

medida utilizados en esta tesis: el modo de contacto, el modo dinámico de modulación en amplitud y el modo de salto.

1.3.1. Modo clásico de contacto

El método de contacto fue el primer modo de medida utilizado (Binnig et al. 1986). Este modo de operación trabaja en la zona repulsiva de la Fig.1.3 y funciona manteniendo la deflexión de la micropalanca (la fuerza) constante[5]. Mientras la deflexión de la micropalanca se mantiene constante el tubo piezoeléctrico realiza el barrido en XY y el sistema ajusta la altura Z para mantener la deflexión constante. El voltaje aplicado en la dirección Z nos define la superficie a una determinada fuerza de contacto. El parámetro principal de este modo de medida es, por tanto, la fuerza que se aplica sobre la superficie.

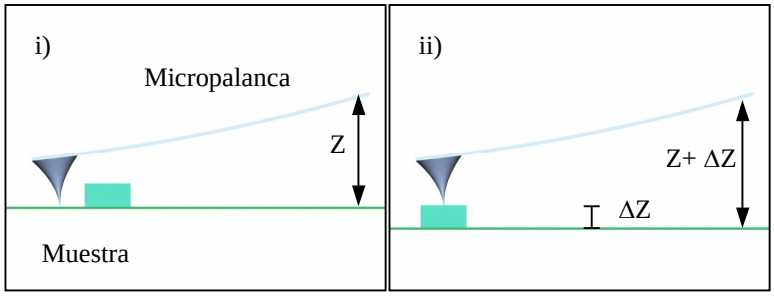


Figura 1.4. Modo clásico de contacto. La deflexión de la micropalanca se mantiene constante a lo largo de la imagen (i y ii). El voltaje que le llega al piezo Z se adapta para mantener esta fuerza moviendo la muestra la distancia ΔZ.

1.3.1.1. Las fuerzas laterales

Debemos detenernos en este apartado pues este tipo de fuerzas son de gran importancia a la hora de medir muestras blandas siendo además consideradas como las más destructivas.

Las fuerzas laterales se refieren normalmente a las relacionadas con la torsión de la micropalanca. La constante de torsión de la micropalanca (K_{xy}) es, en general, mucho mayor que la constante de fuerza normal ($K_z=K$) con lo que para el mismo desplazamiento la fuerza lateral es siempre mayor que la normal. Este

5 Habitualmente a la fuerza que proviene de la deflexión de la micropalanca en sentido vertical se le denomina fuerza normal y es ésta la señal que utiliza el sistema para la realimentación.

tipo de fuerzas están presentes en el modo de medida de contacto (Fig.1.5 A) y pueden arrastrar material e incluso llegar a cortarlo. En este caso la punta se comporta como un cuchillo a escala nanométrica. Este tipo de fuerzas laterales se derivan del barrido del piezo en la dirección X. Los modos dinámicos se desarrollaron, en principio, para eliminar este tipo de fuerzas laterales. Sin embargo estos modos de operación no eliminan totalmente las fuerzas laterales ya que siempre que se produzca contacto entre punta y muestra vamos a tener una fuerza lateral que se deriva de la fuerza normal según se muestra en la Fig.1.5 B. Los ángulos entre la micropalanca y la superficie a menudo no son despreciables y se pueden tener fuerzas laterales de hasta el 10% de la fuerza normal, valores que normalmente son destructivos.

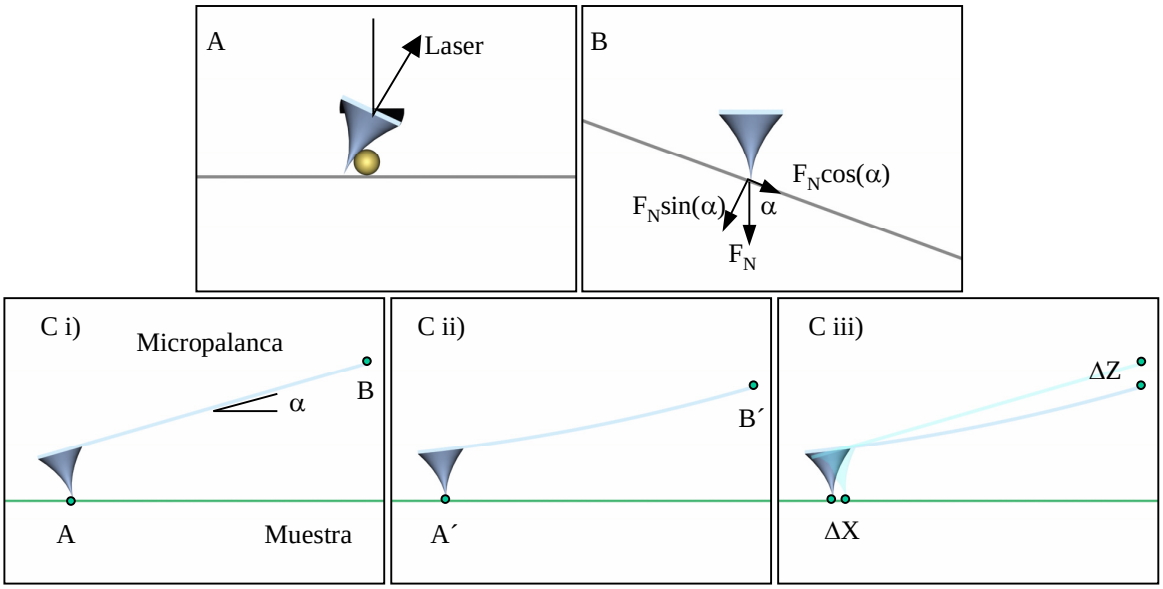


Figura 1.5. Fuerzas laterales derivadas del barrido en X (A) presentes en el modo clásico de contacto. Fuerzas laterales derivadas de las fuerzas normales cuando se produce contacto entre punta y muestra si no se desplaza la punta sobre la superficie (B) y cuando hay desplazamiento (C). El momento en el que se produce el contacto (i) la micropalanca entra con un determinado ángulo de incidencia (α). El movimiento del piezo Z continúa hasta que se alcanza una determinada deflexión (ii). Como consecuencia del movimiento ΔZ se produce un desplazamiento ΔX de la punta sobre la muestra que actúa como un cuchillo.

Por último debemos notar otro tipo de fuerzas laterales que, aunque mucho menores que las descritas en las partes A y B de la Fig.1.5., también están presentes cuando se tiene contacto entre punta y muestra. Estas fuerzas se muestran en la parte C de la Fig.1.5. En primer lugar la micropalanca incide con un ángulo α. A medida que la base de la micropalanca se acerca a la superficie

(evolución del punto B) se produce un desplazamiento (ΔX) del punto A que induce una fuerza de cizalla en este caso en la dirección del eje de la micropalanca.

De la Fig.1.5 se deduce también que cuanto mayor sea la fuerza aplicada mayores son las fuerzas laterales. En este sentido cualquier método de medida que involucre contacto con la muestra va a tener fuerzas laterales y como consecuencia si queremos minimizar las fuerzas laterales es necesario también minimizar la fuerza normal.

1.3.2 Dynamic Atomic Force Microscopy (DAFM)

Los modos dinámicos se empezaron a desarrollar en 1987 (Martin et al. 1987; Thundat et al. 1993), como un intento de minimizar el daño que se producía en las muestras debido a las fuerzas de fricción derivadas del barrido. El método consiste en hacer oscilar la micropalanca con una determinada amplitud (típicamente entre 10 y 100 nm) cerca de su frecuencia de resonancia libre y mantener constantes según se hace el barrido en XY la amplitud de la oscilación o la diferencia de fase entre la señal excitadora y la deflexión de la micropalanca[6]. Ya que la amplitud de la oscilación de la micropalanca depende fuertemente, y en primera aproximación de manera lineal, de la distancia punta-muestra en las proximidades de la superficie, mantener una amplitud constante significa mantener una distancia punta-muestra constante. Estas distancias son típicamente de pocos nanómetros. A pesar de que en las primeras etapas del desarrollo de esta técnica algunos investigadores mostraban evidencias de que la oscilación de la punta tenía lugar en ausencia de contacto con la muestra (Anselmetti et al. 1994), se generalizó la idea de que la punta de la micropalanca tocaba intermitentemente la superficie por lo que a este método de medida se le llamó *Tapping Mode* (Zhong et al. 1993; Dreier et al. 1994; Hansma et al. 1994; Putman et al. 1994). Esto es posiblemente lo que ocurre en medio líquido pero en medio ambiente o en ultra alto vacío se demostró, posteriormente, que el contacto entre punta y muestra no ocurría siempre y que era posible obtener una imagen en régimen de no contacto (Giessibl. 1995; Kitamura & Iwatsuki. 1995; Sugawara et al. 1995; Veyana et al. 1995; Luna et al. 1998; de Pablo et al. 2000a;

[6] Algunos autores definen el modo dinámico de modulación de amplitud a aquel en el que el parámetro de realimentación es la amplitud de oscilación y modo dinámico de modulación en frecuencia cuando el parámetro de control es la frecuencia de resonancia o el desfase entre señal excitadora y respuesta de la micropalanca. El primero es el más extendido y se usa habitualmente en medio ambiente mientras que el segundo es el modo utilizado en Ultra Alto Vacio (UHV).

San Paulo & Garcia. 2000). Ya que, desde un punto de vista práctico, la manera de operar el microscopio es exactamente igual en modo contacto intermitente que en modo de no contacto muchos autores siguen utilizando de manera errónea el término *Tapping* para designar un modo de medida en el que no hay contacto entre punta y muestra. Se ha demostrado que el que se produzca contacto o no, depende de las condiciones experimentales (Luna et al. 1998; Nony et al. 1999; de Pablo et al. 2000a; San Paulo & Garcia. 2000). Nuestros experimentos muestran que en medio ambiente la mayor calidad y nitidez de imágenes se consigue cuando no se produce contacto entre la punta y la muestra (Moreno-Herrero et al. 2000). Una descripción detallada de la teoría de los modos dinámicos del AFM se puede encontrar en (Nony et al. 1999; García & Pérez. 2002; San Paulo. 2002).

La Fig.1.6 nos muestra un esquema que describe el modo de funcionamiento del modo dinámico de no contacto. La amplitud de la oscilación es proporcional, en primera aproximación, a la distancia de la punta a la superficie. Si mantenemos esta amplitud constante, mantendremos también constante la distancia punta-superficie (d). Por tanto, si la punta encuentra un objeto de altura ΔZ, el sistema de realimentación se verá obligado a suministrar el voltaje correspondiente al piezo Z para que éste se desplace esa misma cantidad.

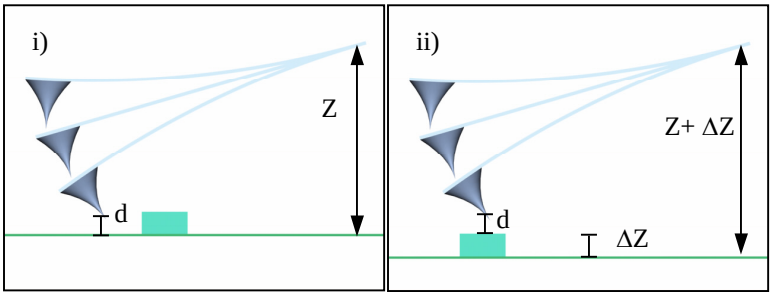


Figura 1.6. Esquema que muestra el funcionamiento del modo dinámico de no contacto. La micropalanca se hace oscilar cerca de su frecuencia de resonancia libre. El valor de la amplitud se utiliza como señal de feedback. Como la amplitud depende fuertemente de la distancia punta-muestra, el sistema se ve obligado a retraer el piezo Z la cantidad ΔZ (la altura del objeto) para mantener la distancia punta-muestra (d) constante.

El modo dinámico utilizado en esta tesis realiza la modulación en amplitud. Los parámetros típicos utilizados en aire ambiente se muestran en la Fig.1.7. Las puntas utilizadas son de 0.75 N/m con frecuencias de resonancias típicas de 77 kHz.

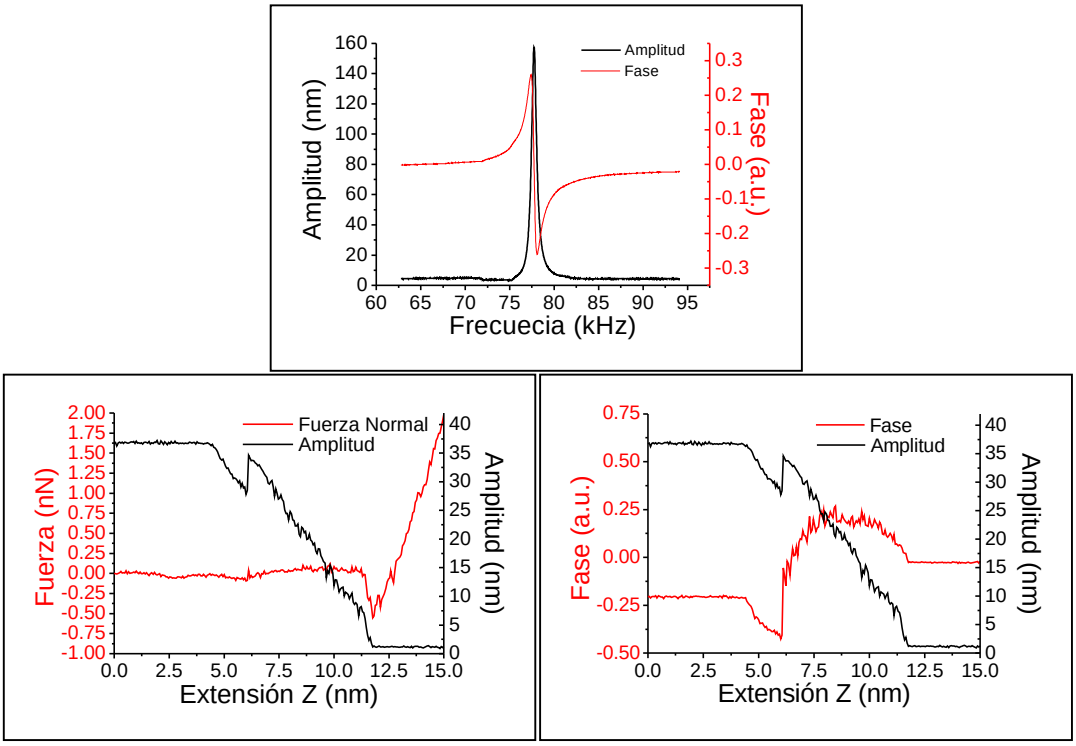


Figura 1.7. Parámetros típicos de operación en DAFM utilizando micropalancas de 0.75 N/m. La figura de la parte superior nos muestra la frecuencia de resonancia de las micropalancas empleadas (~77 kHz). En la parte inferior se muestran las curvas de amplitud, fuerza normal y fase frente a la distancia punta-muestra.

La parte superior de la Fig.1.7 nos muestra la curva de resonancia y la amplitud libre muy lejos de la superficie de la muestra que es típicamente de 160 nm. Las micropalancas utilizadas son consideradas blandas si las comparamos con las micropalancas empleadas habitualmente para los modos dinámicos que son de 40 N/m. Por esta razón aparece una fuerte disminución en amplitud a medida que nos acercamos a la muestra hasta que la curva de amplitud entra en un régimen en el que disminuye fuertemente con la distancia. En este momento nos encontramos a una amplitud típica de 40 nm (ver gráficas de amplitud en la parte inferior). El punto de control se sitúa levemente por debajo de este punto de inflexión en la amplitud (~10%). En las gráficas de la parte inferior podemos ver los parámetros típicos de operación: amplitud, distancia punta-muestra etc. Por otra parte es interesente la forma cualitativa de la curva de amplitud frente a distancia. Se observa una discontinuidad que algunos autores achacan al salto a la región repulsiva (Nony et al. 1999; San Paulo & Garcia. 2000). Todas

nuestras medidas se han realizado por encima de esta discontinuidad (es decir usando una amplitud de ~35 nm y distancias punta-muestra típicas de 5 nm) Nuestra experiencia muestra que si se opera por debajo de la discontinuidad (de 30 nm hasta 0 nm) las imágenes aparecen con baja calidad y se producen daños irreversibles sobre las muestras sugiriendo que nos encontramos en un régimen de contacto intermitente (ver también: San Paulo & Garcia. 2000). Este aspecto también se demuestra en los datos de la fase (desfase entre señal excitadora y respuesta de la micropalanca). El hecho de que la fase disminuya con la distancia indica que nos encontramos en un régimen atractivo o de no contacto mientras que como se puede ver por debajo de la discontinuidad la fase aumenta lo que demuestra que estamos en régimen de contacto intermitente (Nony et al. 1999). También se aprecia un aumento del ruido por debajo de la discontinuidad. Es importante resaltar que a pesar de que la amplitud disminuye, el valor de la fuerza normal es nulo hasta que la punta salta al contacto y en donde lógicamente la amplitud se anula. La ausencia de fuerza normal medible es una prueba evidente de la sensibilidad de los modos dinámicos.

1.3.3. Jumping Mode (JM)

Durante los últimos años se han desarrollado diversos métodos para estudiar la interacción punta-muestra y minimizar las fuerzas. Entre los principales destacan Jumping Mode (JM) (de Pablo et al. 1998), Pulsed Force Mode (PFM) (Rosa-Zeise et al. 1997) o Force Volume (FV) (Digital Instruments), todos ellos basados en la idea introducida en 1994 por van der Werf et al. (van der Werf et al. 1994). El modo de funcionamiento de estos métodos es muy similar. La imagen es dividida en un número discreto de puntos y se realiza una curva de fuerza frente a distancia en cada uno de estos puntos. Los tres modos de medida citados se diferencian en la manera de tratar los datos y en los métodos de adquisición. Mientras JM y FV son métodos de software implementados en una electrónica digital, el PFM está implementado usando una unidad analógica que trabaja en paralelo con la electrónica. Otra diferencia importante es que, mientras JM y PFM almacenan sólo ciertos puntos importantes de la curva de fuerza frente a distancia, el FV almacena toda la curva.

En cada punto de la imagen, JM realiza un ciclo que tiene dos partes, una con feedback y otra sin él. Durante la primera parte del ciclo el feedback se establece para obtener un determinado valor de fuerza normal, es decir, la

distancia punta-muestra se ajusta de tal forma que la fuerza ejercida alcance un determinado valor. Durante la segunda parte del ciclo el feedback se desconecta y la punta se separa de la muestra. En el punto más alejado de la superficie la punta se mueve lateralmente hasta el punto contiguo de la imagen y entonces se vuelve a aproximar a la superficie. A continuación el feedback se vuelve a conectar y comienza un nuevo ciclo. Durante todo el proceso, la posición Z del piezo, la fuerza y en principio cualquier otra magnitud puede ser medida. A partir de estos datos en cada punto de la imagen, la posición Z a la que se obtiene el valor de fuerza normal, prefijado por el usuario, y la adhesión (fuerza necesaria para despegar la punta de la muestra) se calculan en tiempo real y se representan como dos imágenes distintas.

En la Fig.1.8 se muestra una curva de fuerza frente a distancia obtenida en medio ambiente con una micropalanca de constante de fuerza de 0.75 N/m. En (A) la micropalanca se acerca a la superficie de la muestra, cuando llega al punto (B) la punta siente una fuerza atractiva y se adhiere a la muestra debido a las fuerzas capilares. En (C) se alcanza la máxima deflexión y el *feedback* es conectado durante un tiempo. Finalmente se retrae el piezo Z alcanzándose la máxima adhesión en el punto D. En el punto más alejado de la muestra (A) se produce el desplazamiento lateral de la punta con respecto a la muestra.

Los parámetros fundamentales para la operación de JM son cuatro: el valor de *set point* que selecciona la máxima fuerza normal; la separación máxima entre la punta y la muestra (*Jump off*), el tiempo en el que se mantiene el feedback a la máxima fuerza y el tiempo de acercamiento o alejamiento para cada curva de fuerza frente a distancia. Estos dos últimos tiempos están controlados por los parámetros *Control Cycles (CC)* y *Jump Sample (JS)*. La velocidad a la que se adquiere una imagen depende de estos dos últimos valores de las frecuencias de interrupción del DSP. Los procesos de acercamiento y alejamiento se controlan a una frecuencia de interrupción de 40 kHz (f_{JS}) y el proceso de feedback a 15 kHz (f_{CC})[7]. El tiempo que se tarda en adquirir una imagen usando JM se puede calcular usando la Ecu. 1-1.

[7] Las frecuencias de interrupción dependen del DSP utilizado. Las aquí mencionadas son del DSP (TMS320C32)

$$T_{image} = \left(\frac{CC}{f_{CC}} + \frac{JS}{f_{JS}} + C \right) \cdot N \qquad (1\text{-}1)$$

donde C es una constante que incluye el tiempo que se tarda en cambiar entre frecuencias (aproximadamente 0.13 ms) y N es el número de puntos de la imagen (normalmente 256x256).

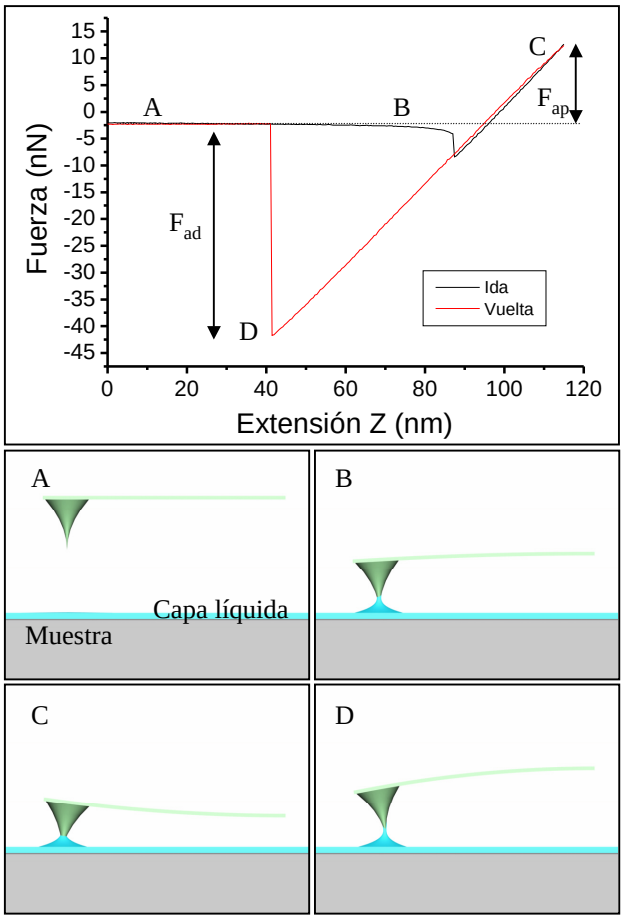


Figura 1.8. En la parte superior se muestra una curva experimental de fuerza frente a distancia obtenida en aire ambiente. En la parte inferior se esquematizan las diferentes partes de un ciclo de JM en aire ambiente. En A la micropalanca se encuentra muy alejada de la superficie y no siente interacción alguna. A medida que se acerca la palanca se deflexiona (se puede ver en la curva FvsZ) hasta que salta al contacto produciéndose, presumiblemente, un cuello líquido (B). El movimiento en Z continúa hasta que se alcanza la máxima fuerza (C). En el movimiento de retirada se mide la máxima adhesión (D) hasta que se rompe el cuello líquido y se vuelve a la posición A en la cual se produciría el desplazamiento lateral al punto de la imagen siguiente.

Es importante notar que la fuerza total (F_{tot}) (Ec. 1-2) que se ejerce sobre la muestra viene dada como suma de la fuerza aplicada (F_{ap}) y que se fija por el usuario y la fuerza de adhesión (F_{ad}) que depende de las condiciones experimentales y del tipo de muestra (Fig.1.8). En este contexto cualquier procedimiento para minimizar las fuerzas de adhesión minimizará también las fuerzas totales ejercidas sobre la muestra.

$$F_{tot} = |F_{ad}| + F_{ap} \quad (1\text{-}2)$$

Los parámetros de JM están íntimamente relacionados. Normalmente valores altos de *Jump Off* (como es el caso de las medidas en aire ambiente) supone el uso de valores altos de *Jump Sample* y de *Control Cycles* y por tanto velocidades bajas de barrido. En los siguientes apartados describiré la operación de éste método en aire ambiente y en medio líquido.

1.4. Métodos no invasivos para medidas en aire ambiente

Como ya hemos comentado nuestro objetivo es emplear técnicas de medida que no destruyan o modifiquen las muestras biológicas. La curva típica que muestra el potencial de interacción frente a la distancia (Fig.1.3) en aire ambiente abre la posibilidad de medidas en régimen de no contacto al estar claramente definidas las regiones atractivas y repulsivas. Por otra parte la presencia de fuerzas laterales como las que se producen en el modo de contacto deben de ser evitadas a toda costa. Por estos motivos de los tres métodos de medida topográfica expuestos en la sección 1.3, decidimos centrarnos en los modos diseñados para minimizar las fuerzas laterales: el DAFM y el JM.

A continuación expondré los resultados obtenidos sobre muestras de ADN adsorbido sobre mica al aplicar estos dos métodos de medida. Las muestras se prepararon según se detalla en la sección 2.3.1. El experimento realizado es muy sencillo y los resultados se ilustran en la Fig.1.9. En primer lugar obtenemos una imagen en DAFM (A), a continuación en la misma región obtenemos otra en JM (B) y finalmente volvemos a adquirir una imagen en modo dinámico para observar las diferencias (parte C). La primera impresión es que mientras el DAFM permite obtener imágenes nítidas y con buena resolución las imágenes de JM presentan inestabilidades y ruido.

En los apartados D-G se muestran detalles de las zonas más importantes de las Fig.1.9 A y C en los que se pueden ver diversas alteraciones realizadas sobre la muestra. Por ejemplo se pueden producir roturas en las moléculas de ADN (detalles F y G) o movimiento de las mismas (D y E). También se aprecia el desplazamiento de material desde puntos próximos (D y E) o desde otros puntos de la imagen (F y G).

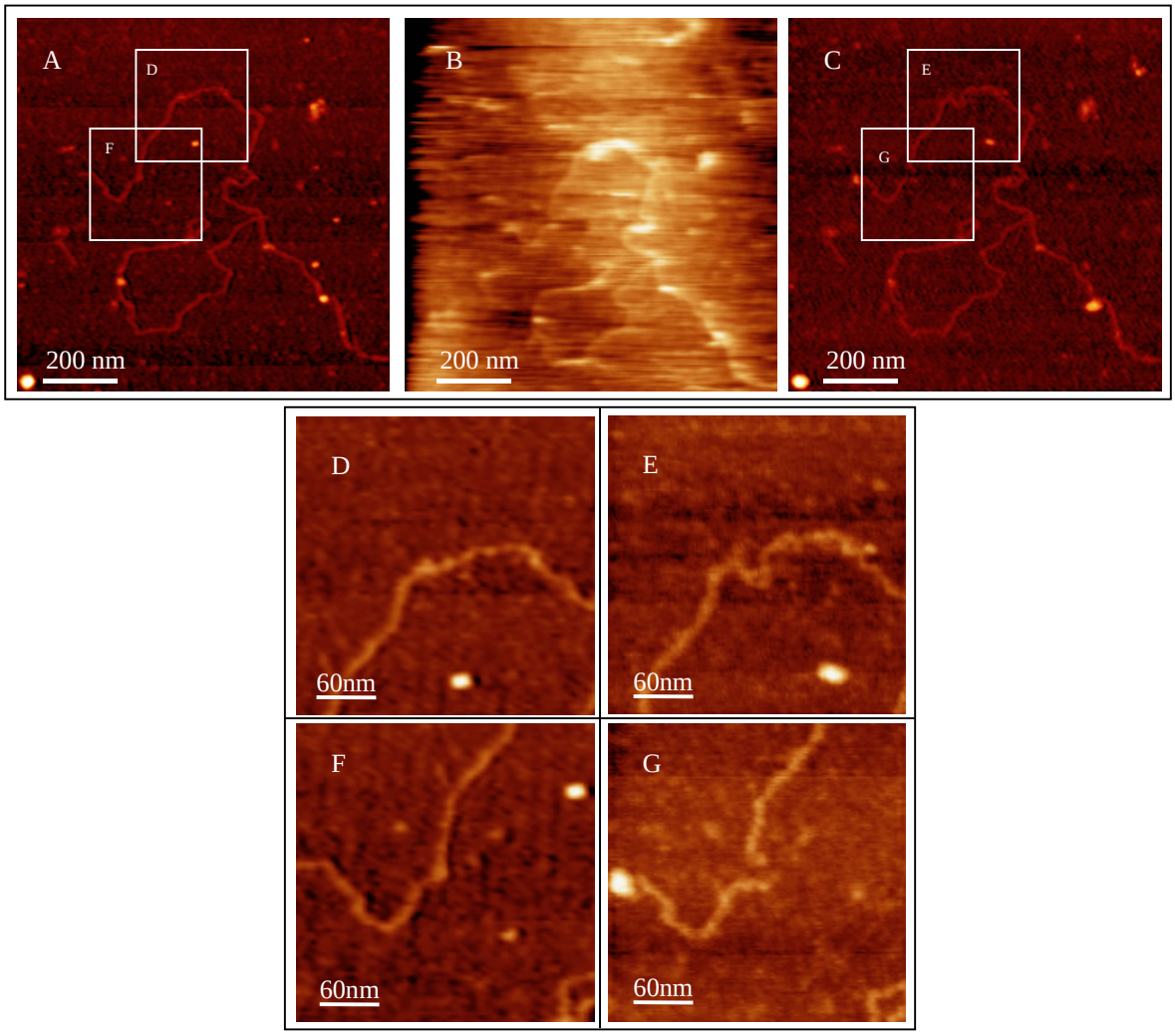


Figura 1.9. Comparativa de JM y DAFM en aire ambiente sobre moléculas de ADN adsorbidas sobre mica. (A) es una imagen adquirida en DAFM, a continuación se adquiere una imagen en JM (B) y posteriormente se vuelve a tomar una imagen en DAFM (C). En (D-G) se muestran detalles de las imágenes (A) y (C) donde se puede ver el efecto de las medidas en JM sobre muestras blandas en aire ambiente.

La constante de fuerza de las micropalancas fue escogida de manera que fuesen lo más blandas posibles pero que permitiesen la adquisición en modo dinámico con el fin de comparar JM y DAFM. No nos fue posible operar en no contacto con micropalancas de constante de fuerza menores de 0.5 N/m en aire ambiente ya que las fuerzas capilares tienden a adsorber la punta, por esta razón las micropalancas empleadas fueron de 0.75 N/m. Por otro lado, JM al aire tampoco permite usar valores de constante de fuerza muy bajos porque en este

caso el desplazamiento del piezo Z que hay que realizar para superar la adhesión es demasiado grande.

	DAFM	JM
Constante de Fuerza (N/m)	0.75 N/m	0.75 N/m
Frecuencia de resonancia (kHz)	80 kHz	No se aplica
Q	100	No se aplica
Amplitud (nm)	10 nm	100 nm
Contacto	No	Si
Tiempo de contacto	No se aplica	1.3 ms
Fuerza aplicada (nN)	No se aplica	5 nN
Desplazamiento lateral fuera de contacto	Si	Si
Tiempo por punto (ms)	2 ms	6 ms
Ciclos por punto	150	1
Tiempo de imagen	120 s	>360 s
Dispositivo experimental adicional	Si	No

Tabla 1-I. Parámetros experimentales de los modos DAFM y JM usados para las medidas en aire ambiente.

En principio las dos técnicas utilizadas fueron diseñadas para minimizar las fuerzas laterales presentes en el modo de contacto, sin embargo las imágenes de la Fig.1.9 y los datos de la Tabla 1-I presentan al JM como un modo de medida claramente desfavorable frente al DAFM en muestras blandas en medio ambiente. Para entender el carácter invasivo del JM debemos remitirnos a los diagramas de la Fig.1.5 y a la Fig.1.10. Es importante recordar que en JM la punta se desplaza perpendicularmente al plano medio de la superficie y paralelamente al mismo siempre fuera del contacto. Lo que podemos ver es que dependiendo de la posición relativa entre la punta y la molécula se puede producir daño irreversible. En particular si la posición relativa entre la punta y la muestra es la que aparece en la Fig.1.10 C, entonces las fuerzas laterales derivadas de las fuerza normal (F_N, ver Fig.1.5 B) producirán un desplazamiento de la molécula provocando una deformación irreversible (Fig.1.10 D).

En medio ambiente el parámetro que determina el daño sobre las muestras es la presencia o no de contacto de la punta con la superficie. La existencia de fuerzas capilares presentes en medio ambiente suponen fuerzas de adhesión del

orden de decenas de nN (Fig.1.8). Son precisamente estas fuerzas capilares las que impiden usar micropalancas más blandas. Nuestros resultados con otras moléculas biológicas en medio líquido muestran que fuerzas superiores a ~0.5 nN provocan modificaciones irreversibles sobre las mismas. Valores de fuerza menores que ~1 nN son prácticamente imposibles de conseguir al aire con técnicas en las que exista contacto entre punta y muestra. Nuestros resultados muestran que usando el modo DAFM con los parámetros descritos en la Tabla 1-I no se produce contacto entre la punta y la muestra, ya que en el caso de que éste se produjera las fuerzas laterales derivadas de la fuerza normal, que presumiblemente sería del orden de la fuerza de adhesión, (ver sección 1.3.1) deberían estar presentes y provocarían un daño irreversible sobre las muestras.

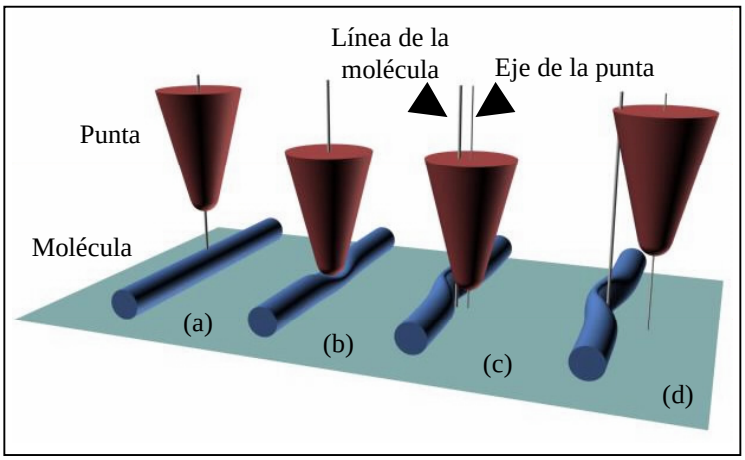


Figura 1.10. Efecto de la fuerza lateral sobre una molécula de ADN. Cuando el eje de la molécula y de la punta coinciden no se produce desplazamiento lateral (parte a y b). Sin embargo cuando la punta toca de forma lateral la molécula una fuerza no despreciable es capaz de producir un desplazamiento irreversible de la molécula (parte c y d).

Las dimensiones laterales del ADN medidas con DAFM son del orden de 15 nm. El microscopio de fuerzas presenta el fenómeno de dilación con la superficie cuando el tamaño de los objetos a visualizar, como es el caso del ADN, es menor que el radio de curvatura de la punta. A partir de argumentos geométricos se puede estimar este radio a partir del diámetro de la molécula medida y del tamaño real de la misma (Bustamante et al. 1993; Margeat et al. 1998). Estimaciones del radio de la punta coinciden con los valores nominales del

fabricante (en torno a 20 nm). Una descripción más detallada sobre el fenómeno de dilación se da en el Cap. 3.

Aunque nuestros resultados presentan al JM en clara desventaja para obtener imágenes al aire, no se debe subestimar el potencial de la técnica para obtener mapas de adhesión local (de Pablo et al. 1999) o el estudio de la interacción punta-muestra en distintos materiales y a humedades relativas diferentes (Gil et al. 2001).

Por tanto para medidas sobre material biológico en medio ambiente el modo de medida más apropiado es el DAFM, ya que bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 1-I se obtienen imágenes reproducibles y sin aparente daño con una resolución lateral del orden del radio de la punta. Es necesario mencionar aquí que las imágenes presentadas en esta tesis obtenidas en aire ambiente han sido adquiridas, salvo que se especifique lo contrario, usando este modo de medida.

1.5. Métodos no invasivos para medidas en líquido

No existe en la actualidad otra técnica que presente las potenciales virtudes que tiene el AFM para la caracterización de moléculas individuales con alta resolución en su medio fisiológico. Por esta razón es especialmente importante desarrollar métodos que permitan conseguir los tres factores clave: moléculas individuales, alta resolución y medio nativo.

Las fuerzas presentes entre una punta y una superficie en medio líquido se pueden explicar en términos de dos fuerzas: las fuerzas de van der Waals (vdW) y la fuerza electrostática de la doble capa de Debye o fuerza EDDL (Electrostátic Debye Double-Layer Force) tal y como se propone en la teoría DLVO llamada así por Derjaguin y Landau (Derjaguin & Landau. 1941) y Verwey y Overbeek (Verwey & Overbeek. 1948).

La fuerza de vdW surge de la interacción entre los dipolos inducidos en átomos y moléculas. Ya que todos los materiales son polarizables este tipo de fuerzas aparecen siempre entre cualquier tipo de átomo o superficie. La fuerza entre dos átomos es relativamente débil y de corto alcance, con una disminución

proporcional a r^{-7} para separaciones pequeñas y r^{-8} para distancias mayores. El cálculo de esta fuerza en sistemas de muchos átomos es un problema complicado ya que la fuerza entre átomos individuales no es aditiva y el tratamiento moderno de las fuerzas vdW, conocida como la teoría de Lifshiftz es una combinación de electrodinámica cuántica y de datos espectroscópicos. Afortunadamente, si asumimos aditividad, lo que es una aproximación razonable en muchos casos, se pueden derivar algunas ecuaciones sencillas. Por ejemplo para una esfera de radio R y un plano separados una distancia r, la fuerza vdW vale:

$$F_{vdW} = -\frac{H \cdot R}{6 \cdot r^2} \tag{1-3}$$

donde H es la constante de Hamaker que depende de las propiedades dieléctricas de los materiales que interactúan y del medio entre ellos. Habitualmente las fuerzas vdW son atractivas, aunque también pueden ser repulsivas. La constante de Hamaker define el grado de intensidad de esta fuerza. Para hidrocarbonos en agua es 0.2-1x10^{-20} J, para metales en agua 0.8-5x10^{-20} J y para metales al aire 30-40x10^{-20} J (Butt et al. 1995). Típicamente la constante de Hamaker es al menos un orden de magnitud menor en medio líquido que en aire ambiente con lo cual las fuerzas vdW en medio líquido son mucho menores que al aire.

La fuerza EDDL es la otra contribución a la fuerza DLVO. Esta fuerza surge de las cargas superficiales presentes en las intercaras. La carga superficial es cancelada por los contra-iones disueltos que se ven atraídos hacia la superficie por el campo eléctrico pero a su vez dispersados por la superficie para aumentar su entropía. Los iones y la superficie cargada es lo que se denomina doble capa de Debye o DDL (Debye Double-Layer). Cuando otra superficie se acerca, aparece una interacción electrostática fruto de la superposición de la DDL de ambas superficies, que da origen a una fuerza de origen electrostático conocida como fuerza EDDL.

Para potenciales superficiales bajos (por debajo de 50 mV) la fuerza EDDL entre una esfera y un plano tiene un comportamiento exponencial con la distancia. Por ejemplo la fuerza EDDL entre una esfera (punta) y un plano (muestra) vale:

$$F_{EDDL} = \frac{4\pi R \sigma_s \sigma_t}{\varepsilon_m \varepsilon_0} e^{-z/\lambda_D} \tag{1-4}$$

donde R es el radio de la esfera (punta), σ_s y σ_t son las densidades superficiales de la superficie y de la punta, ε_0 la permitividad del vacío y ε_m la constante dieléctrica del medio. Esta disminución exponencial se caracteriza por la distancia de Debye λ_D la cual depende la temperatura, del medio y de la valencia iónica q_i y la concentración, c_i, del electrolito i componente del líquido (Israelachvili. 1991). Ya que habitualmente los experimentos se realizan a temperatura constante y el medio es agua la dependencia principal de λ_D viene dada por q_i y por c_i:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m k_B T}{e^2 \sum_i c_i q_i^2}} \approx \frac{0.3}{\sqrt{\sum_i c_i [mol/l] \cdot q_i^{\,2}}} \quad nm \tag{1-5}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, e la unidad de carga, ε_0 es la permitividad del vacío y ε_m la constante dieléctrica del medio, normalmente agua (valor macroscópico ε_m = 81). Notar la fuerte dependencia de la longitud de Debye con la valencia de los iones.

Ya que en medio líquido tendremos las dos tipos de fuerzas, vdW (atractivas) y EDDL (repulsivas), es posible controlar la repulsión entre las superficies a partir de la concentración de iones presentes en la solución (concentración de sales y de protones (pH)). Algunos autores calculan que estas fuerzas de interacción en líquido van desde pocos nN hasta pocos pN dependiendo de las tampones empleados (Müller et al. 1999). La mayoría de los experimentos presentados en la tesis realizados en medio acuoso utilizaron un tampón PBS (Phosfate Buffered Saline) (0.1 M NaCl, pH 7.4).

En resumen, la situación en medio líquido es radicalmente distinta a la que se presenta en medio ambiente. La interacción capilar, muy importante en aire ambiente, desaparece y la interacción de van der Waals se atenúa. Las fuerzas EDDL pueden ser minimizadas jugando con la concentración de iones y el pH. De manera general la forma que tiene la curva que nos describe las interacciones en medio líquido se muestra en la Fig 1.11. Si la comparamos con la mostrada en la Fig.1.3, la principal diferencia que salta a la vista es la práctica ausencia del mínimo local que define las regiones de contacto y de no contacto. En efecto, la posibilidad de trabajar en no contacto en medio líquido no está clara y todavía se encuentra en discusión.

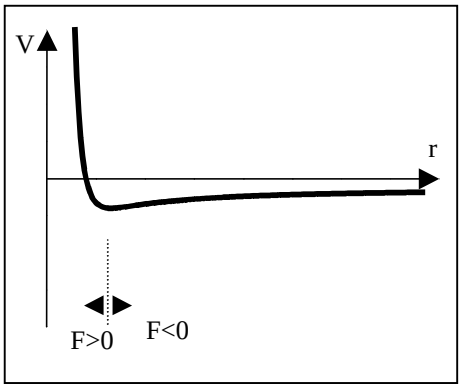


Figura 1.11. Curva general que describe el potencial de interacción entre punta-muestra en un AFM en medio líquido. Las áreas de interacción repulsiva y atractiva no están tan claramente marcadas como ocurre en aire ambiente.

Desde el punto de vista técnico, en medio líquido la operación del microscopio es siempre más complicada que en aire ambiente. Se necesita diseñar un recipiente (celda líquida) en el que se encuentre la muestra y el líquido en el que se sumerge. Este líquido en general posee un pH y una concentración de sales determinada en el cual las biomoléculas son funcionales y que se denomina *tampón*. El uso de distintos tampones supone un mantenimiento de la celda líquida y una limpieza cuidadosa para no contaminar el experimento actual con otro pasado. Por este motivo las muestras deben prepararse siempre en el momento de hacer el experimento y se desechan una vez terminado el mismo. Los experimentos no exceden en general más de unas horas con lo cual el crecimiento de microorganismos que pudiesen contaminar de manera permanente la celda líquida es muy improbable. La presencia de un medio líquido supone el diseño de otras partes del microscopio que no deben entrar en contacto con el mismo, como es el caso de la pieza en la que se apoya la micropalanca y de procedimientos diferentes, como por ejemplo la manera de fijar la micropalanca con el soporte. Habitualmente para medidas en aire la micropalanca se pega con un adhesivo conductor. Sin embargo, en medio líquido cualquier tipo de contaminación debe ser evitada, y por esta razón se emplean adhesivos insolubles en agua, como son la parafina o la grasa de vacío. Este es sólo un ejemplo que ilustra que el cambio de medio conlleva importantes reformas instrumentales y de procedimiento.

El empleo del modo de contacto y del JM en medio líquido no presenta ninguna modificación adicional en la mecánica del microscopio ya que no se requiere ninguna modificación sobre la micropalanca y los métodos están implementados por software. No ocurre lo mismo con los modos dinámicos en los que se debe hacer oscilar la micropalanca a su frecuencia de resonancia mediante

un piezo laminar. La necesidad de aislar este piezo del medio líquido supone un diseño más complejo de la pieza sobre la que se coloca la micropalanca.

1.5.1. DAFM en medio líquido

La aplicación de los métodos dinámicos en medio líquido produjo resultados espectaculares incrementando la resolución respecto a los modos clásicos de contacto (Zhong et al. 1993; Bustamante et al. 1994; Hansma et al. 1994; Putman et al. 1994; Bustamante et al. 1997). Un estudio de los métodos no-invasivos en medio líquido tiene, por tanto, una parada obligada en los modos dinámicos. Para poder utilizar el método dinámico descrito en la sección 1.3.2 tenemos que hacer oscilar la micropalanca a su frecuencia de resonancia. En la Fig.1.12 se muestran diversos métodos empleados en esta tesis para hacer oscilar la micropalanca.

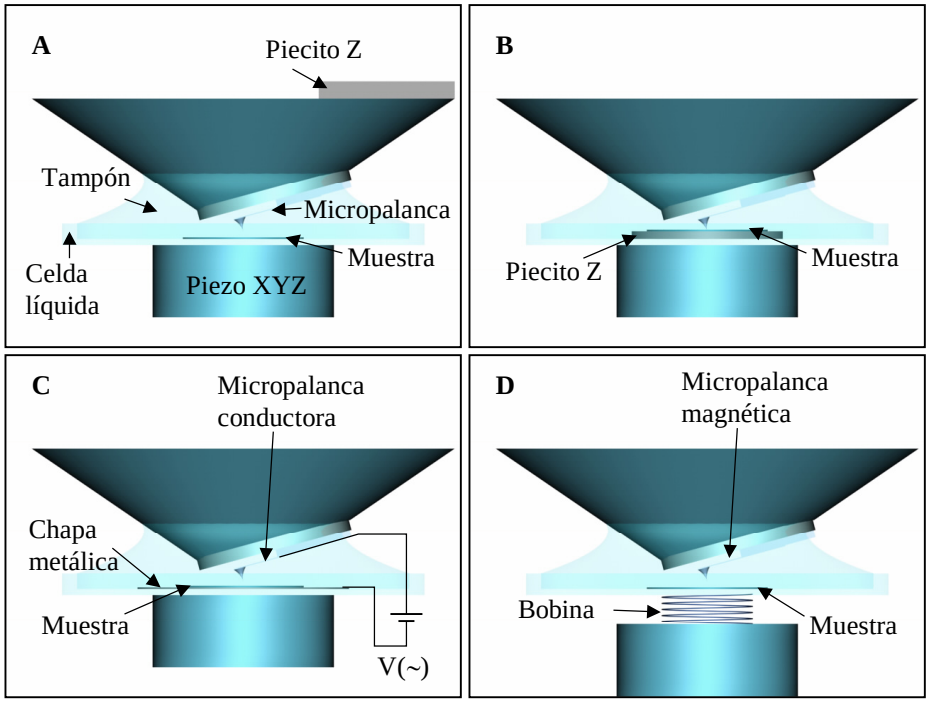


Figura 1.12. Esquemas que muestran la estructura de la celda líquida empleada y diferentes métodos de hacer oscilar la micropalanca en medio líquido y empleados en esta tesis.(A) para oscilar la micropalanca se coloca un pequeño piezo en la parte trasera de la celda líquida. (B) el piezo se coloca debajo de la muestra con lo que el movimiento de la muestra induce el movimiento de la micropalanca. (C) DAFM electrostático y (D) DAFM magnético. En estos dos últimos casos la micropalanca se hace oscilar mediante un campo eléctrico o mediante un campo magnético.

En primer lugar (Fig.1.12 A) se puede hacer oscilar todo el soporte en el que se encuentra la micropalanca meditante un pequeño piezo Z. Este es el método que utiliza el sistema comercial de Digital Instruments. El principal problema de este método es la excitación de numerosas resonancias de los distintos elementos presentes en la celda líquida debido a la propagación del sonido a través del medio líquido. En la Fig.1.13 se muestra un espectro de frecuencias obtenido usando este método de excitación de la micropalanca.

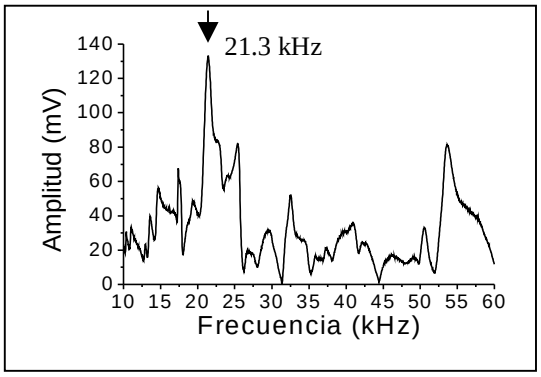


Figura 1.13. Espectro de resonancia de una micropalanca de 0.75 N/m en medio líquido al hacerla oscilar mediante el método descrito en la Fig.1.12 A.

Uno de los problemas de colocar el piezo Z sobre todo el bloque de la celda líquida era la gran masa que debía mover. Por esta razón decidimos colocar el piezo de excitación justo debajo de la muestra (Fig.1.12 B). Nótese que en este método de excitación el piezo Z no está en contacto físico con la micropalanca. Sin embargo, al hacer oscilar la muestra que se encuentra a pocas micras de distancia de la micropalanca, ésta también oscila. El movimiento de la masa de aire presente entre la muestra y la micropalanca es lo que la hace oscilar. Las curvas de resonancia libre, y los parámetros de operación de este método al aire son comparables a las obtenidas mediante métodos tradicionales (compárese la Fig.1.14 con la 1.7). Curiosamente la inestabilidad presente en la amplitud se encuentra mucho más cercana del contacto en este experimento si se compara con los resultados de la figura 1.7. Las imágenes de grafito pirolítico obtenidas con este método en aire ambiente poseen una calidad y resolución comparable a las obtenidas con el método tradicional de excitación de la micropalanca mediante un pequeño piezo situado en contacto con la micropalanca (ver Fig.1.15 A).

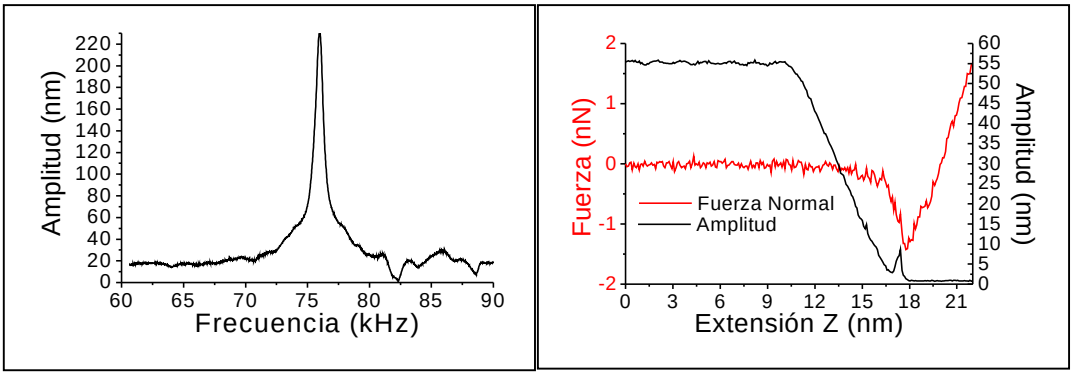


Figura 1.14. Parámetros de operación de DAFM al aire cuando se hace oscilar la micropalanca mediante el método descrito en la figura 1.12 B.

Para emplear este método, que en aire presentaba buenos resultados, en medio líquido tuvimos que aislar el piezo Z que estaría inmerso en el tampón. El espectro de resonancias que se obtuvo fue muy similar al expuesto en la Fig.1.13 a pesar de que el volumen de agua empleado era de tan solo 200 μl. Una imagen de grafito obtenida en agua se muestra en la Fig.1.15 B.

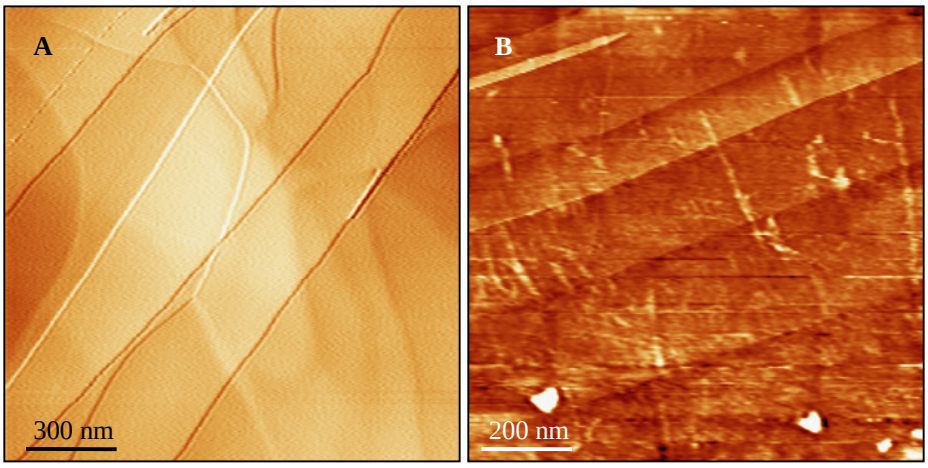


Figura 1.15. Imagen de HOPG obtenida mediante el método de la figura 1.12 B en aire ambiente (A) y en agua (B).

La presencia de numerosas resonancias dificulta la operación de los métodos de excitación acústicos en medio líquido. Por un lado no es sencillo encontrar la resonancia de la micropalanca y por otro la presencia de resonancias cercanas puede provocar saltos en la distancia Z en la imagen debido a que el sistema

puede cambiar de pico de resonancia y seguir otra resonancia que no es la de la micropalanca.

Un tercer método empleado fue excitar la micropalanca mediante un campo eléctrico (Fig.1.12 C). Para ello realizábamos un contacto en la micropalanca de silicio[8] y un segundo electrodo se colocaba debajo de la muestra. De esta manera se puede aplicar un campo alterno y excitar la micropalanca a su frecuencia de resonancia. Si se aplica un voltaje U entre la punta y la muestra de la forma:

$$U = A\sin(\omega t) \tag{1-6}$$

se crea un campo eléctrico que da lugar a una energía de interacción V:

$$V(d) = \frac{1}{2}C(d)U^2 \tag{1-7}$$

Ya que la fuerza es F=-∂V/∂d, entonces vemos que la fuerza seguirá una frecuencia que vale 2ω:

$$F = -\frac{\partial C(d)}{\partial d}A'\cos(2\omega t) + Cte \tag{1-8}$$

Esto es importante ya que para excitar a la frecuencia de resonancia de la micropalanca (ω_{res}) debemos aplicar una señal al piezo Z de frecuencia ω_{res}/2.

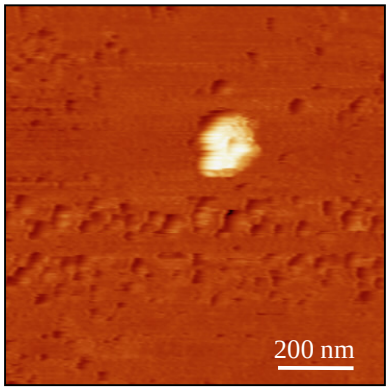


Figura 1.16. Imagen de la superficie de vidrio obtenida mediante el método de excitación electrostático ilustrado en la Fig.1.12 C, en aire ambiente

[8] El silicio empleado en las micropalancas utilizadas es conductor con resistividades típicas de 0.01-0.025 Ω·cm

También es posible obtener imágenes en aire ambiente utilizando este método de excitación (Fig.1.16). Sin embargo al introducirlo en medio líquido la oscilación de la palanca se atenúa tanto que no es posible modular en amplitud.

El cuarto método utilizado se basa en excitar la micropalanca mediante un campo magnético, M-DAFM (Han et al. 1996) (Fig.1.12 D). Éste es el método empleado por la casa comercial Molecular Imaging. Para excitar la micropalanca, que debe estar recubierta de un material magnético, se coloca una pequeña bobina (L=4.7 mH, 50 mA, 20.5 Ω) debajo de la celda líquida, a través de la cual que se hace pasar una corriente. El campo magnético que produce una bobina de dimensiones (l : longitud; a : radio) a una distancia z_0 del borde de la bobina es axial y lineal con la corriente y vale (Reitz et al. 1986):

$$\vec{B}(\omega) = C(l, a, z_0)\mu\, N\, I(\omega)\vec{k} \tag{1-9}$$

siendo N el número de espiras de la bobina, C (l,a,z_0) una constante que depende de las dimensiones de la bobina y $\vec{k}$ un vector unitario en la dirección axial de la bobina. Este campo magnético alterno excita la micropalanca. Sin embargo el método no es tan sencillo pues en un circuito RL la corriente alterna que circula depende de la frecuencia, debido al carácter resistivo de la bobina a altas frecuencias. La corriente que pasa por un circuito RL vale:

$$I(\omega) = \frac{V(\omega)}{\sqrt{\left(R_{eq}{}^2 + L^2\omega^2\right)}} \tag{1-10}$$

siendo $V(\omega)$ la señal de voltaje alterno que se aplica en los bornes del circuito, R_{eq} la resistencia ohmica equivalente y L la inducción de la bobina. Como el campo magnético es proporcional a la corriente, una manera de aumentar el campo es minimizar la impedancia total del circuito introduciendo un condensador en serie con la bobina. Para el circuito RCL, la corriente vale:

$$I(\omega) = \frac{V(\omega)}{\sqrt{\left(R_{eq}{}^2 + \left(L\omega - \frac{1}{C\omega}\right)^2\right)}} \tag{1-11}$$

donde la impedancia se puede reducir a R_{eq} si ajustamos $C=1/L\omega^2$. Podemos realizar un sencillo calculo para obtener el orden de magnitud de los

condensadores que debemos emplear. Para L=4.7 mH y en aire ambiente (f~75 kHz, $\omega=2\pi f$) debemos emplear condensadores de ~1 nF. Si queremos emplear el método magnético en medio líquido (f~25 kHz) deberemos usar condensadores de ~10 nF alrededor de un orden de magnitud mayores que en aire. La realidad experimental es que los valores de los condensadores empleados siempre fueron un orden de magnitud menores que los calculados, posiblemente debido a otros elementos resistivos y capacitivos presentes en el circuito.

La principal ventaja del método magnético tanto en medio ambiente como en medio líquido es que sólo se excita la resonancia de la micropalanca eliminando así cualquier tipo de resonancia secundaria proveniente de otras partes del microscopio. Una de las desventajas es que las micropalancas deben ser evaporadas con un material magnético, por ejemplo cobalto. El uso de este método en aire ambiente no presenta ninguna dificultad y pueden ser empleados los parámetros expuestos en la Fig.1.7.

La Fig.1.17 muestra los parámetros típicos de operación en medio líquido. Las micropalancas usadas fueron de 0.75 N/m sobre las que se evaporó 300 nm de cobalto. Si se compara esta figura con la correspondiente de DAFM en aire (Fig.1.7) se observan importantes diferencias. En primer lugar la frecuencia de oscilación es mucho menor, aproximadamente un factor 3, en torno a 25 kHz. Esto se debe a un fuerte aumento de la masa efectiva de la micropalanca en medio líquido (típicamente un factor 10) ya que ésta debe mover la masa del líquido que la rodea. Como se puede ver la operación a bajas frecuencias permite registrar valores de fuerza normal en distintos puntos de la oscilación. Sin embargo, no debemos tener en cuenta los valores absolutos de amplitud pico a pico de esta curva ya que el DSP no es lo suficientemente rápido para registrar la oscilación completa y los valores de amplitud de la deflexión están infravalorados. Lo que si es correcto es la forma general de la curva de fuerza normal. En concreto se observa que en cuanto la amplitud disminuye el valor medio de la fuerza normal aumenta sugiriendo la posibilidad de contacto intermitente entre punta y muestra[9]. Más aún, los datos de la fase muestran que ésta aumenta en cuanto la amplitud disminuye lo que indica que no hay posibilidad de operar con estos parámetros en régimen de no contacto (Nony et al. 1999). Notar, también, que la amplitud de la

[9] Recuérdese que en aire ambiente la amplitud de la oscilación decrecía sin aparente variación de la fuerza normal.

fuerza normal se hace cero justo cuando la amplitud se anula. Es, por cierto, interesante que la parte final de la curva de amplitud se atenúa de manera gradual sin que haya ninguna inestabilidad como ocurre en aire con el salto al contacto (Fig.1.7 y 1.8). Por otra parte, dada la dureza de las micropalancas empleadas las fuerzas ejercidas están en el orden de los nN, valores destructivos para material blando (Persson. 1987). Otro aspecto importante es la ausencia de la inestabilidad que aparecía en aire ambiente. En aire ambiente esta inestabilidad es debida al cambio de la zona atractiva a la repulsiva. En medio líquido esto no ocurre lo que sugiere que el cambio entre ambas regiones se produce de manera gradual.

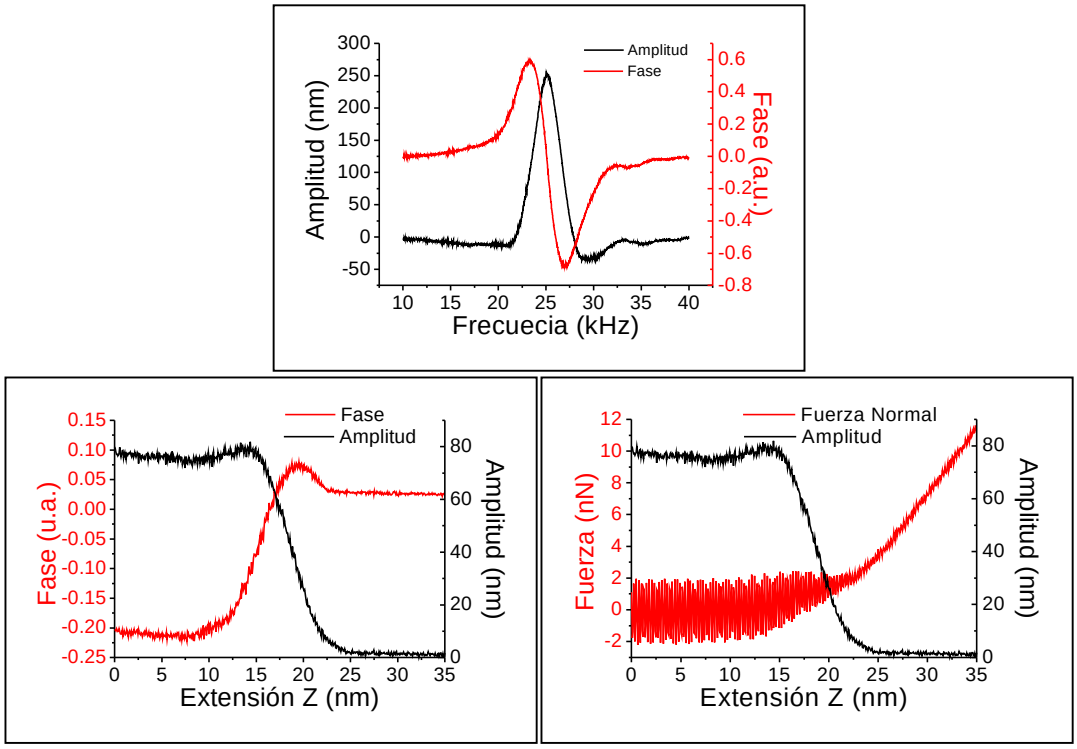


Figura 1.17. Parámetros de operación en M-DAFM utilizando micropalancas de 0.75 N/m y evaporadas con 300 nm de Cobalto. La figura de la parte superior nos muestra las curvas de amplitud y fase muy lejos de la muestra y la de la parte inferior las curvas de amplitud y fuerza normal frente a distancia en las proximidades de la superficie.

El método magnético de oscilación en líquidos decidimos emplearlo en muestras de ADN adsorbido sobre mica. Idealmente las muestras biológicas deben estar adheridas al substrato de manera firme para evitar que el barrido las mueva pero, por otro lado, esta interacción no debe ser tan fuerte que modifique su estructura fisiológica. Por estos motivos la preparación de las muestras en medio

líquido no es una tarea sencilla. Las muestras aquí presentadas se prepararon siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.2.

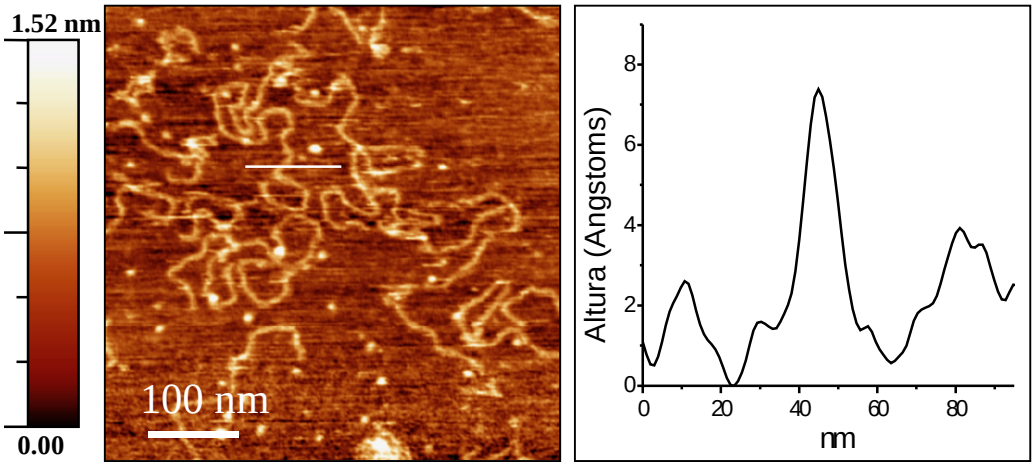


Figura 1.18. Imagen de ADN adsorbido sobre mica en tampón PBS y obtenida usando M-DAFM. En la parte de la derecha se ha representado un perfil de una de las moléculas. Se obtiene una altura típica de las moléculas de menos de 1 nm.

La Fig.1.18 muestra una imagen de moléculas de ADN adsorbidas sobre mica tomada con DAFM magnético. La altura media de las moléculas de ADN es menor que 1 nm lo que coincide con otros trabajos (Bustamante et al. 1992; Hansma et al. 1992; Lyubchenko et al. 1993; Shaiu et al. 1993; Hansma et al. 1996; Thomson et al. 1996; Lyubchenko et al. 1997; Maeda et al. 1999; Ye et al. 2000) pero está muy por debajo de la altura nominal del ADN que es 2 nm. El valor medido con DAFM en medio líquido es similar al que se obtiene en aire ambiente usando la misma técnica. Diversas causas se apuntan para explicar la baja altura medida en aire ambiente con DAFM como son la deformación inducida por la punta (Bustamante et al. 1992; Lyubchenko et al. 1993; Yang & Shao. 1993); la deshidratación de la molécula (Bustamante et al. 1997) o la presencia de restos de sal provenientes de la preparación (Shaiu et al. 1993; Vesenka et al. 1993). En medio líquido estas dos últimas posibilidades deben ser descartadas. Posiblemente, si se produce contacto entre la punta y la muestra la baja altura se deba a la deformación de la molécula por la punta.

1.5.2. JM en medio líquido

A partir de los experimentos realizados con DAFM en medio líquido se deduce que la posibilidad de operación en no contacto es complicada y que

habitualmente hay contacto entre punta y muestra. Ya que se produce contacto, debemos buscar métodos en los que éste sea lo más controlado y delicado posible. En este caso, la amplitud de la oscilación ya no es un buen parámetro a controlar sino la máxima fuerza que se ejerce sobre la muestra. En este escenario el JM se presenta como el método ideal *a priori*.

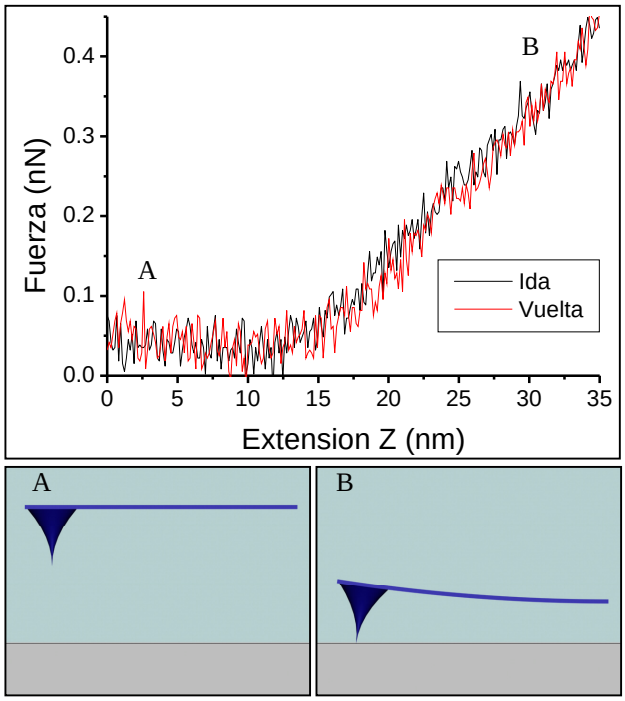


Figura 1.19. Esquema que muestra las diferentes partes de un ciclo de JM en medio líquido. La curva de fuerza frente a distancia se caracteriza por la ausencia de salto al contacto y de adhesión. La curva se tomó con una micropalanca de 0.02 N/m y permite medir fuerzas tan pequeñas como 100 pN.

En la Fig.1.19 se muestra una curva de fuerza frente a distancia donde se observan las características esenciales de la operación en líquidos, que son dos:

1.- Ausencia de adhesión. En medio líquido no tenemos fuerzas capilares con lo cual la adhesión se minimiza. Esto no significa que nunca tengamos fuerzas de adhesión en líquidos, sino que si existen tienen otro origen: principalmente químico o bioquímico. La ausencia de fuerzas de adhesión es esencial para la operación de JM en líquidos ya que no son necesarios amplios recorridos en la dirección Z (altura del salto) para despegar la punta de la muestra. Esto permite reducir el parámetro de salto (*Jump Off*) y en consecuencia su parámetro de muestreo (*Jump-Sample*) lo que supone un recorte considerable en el tiempo de adquisición. Es posible operar JM en líquido con un salto de tan sólo 10 nm. Recordemos que este valor es similar a la amplitud de oscilación del DAFM. En este sentido JM en líquido y DAFM son muy similares, diferenciándose esencialmente en la frecuencia

de oscilación de la micropalanca, que en JM (f_{JM}) la determinan otros factores. De la Ec. 1.1 se deduce fácilmente que f_{JM} se puede calcular según:

$$f_{JM} = \frac{1}{\frac{CC}{f_{CC}} + \frac{JS}{f_{JS}} + C} \tag{1-12}$$

Parámetros típicos empleados en medio líquido son 8-20 para CC y 20-100 para JS, con lo cual la frecuencia de oscilación de la palanca está alrededor de 0.8-0.2 kHz. Ya que JM realiza una curva de fuerza frente a distancia en cada punto, este valor marca el tiempo de adquisición de una imagen.

Tampoco tenemos la típica inestabilidad de salto al contacto que aparece en aire ambiente. La entrada al contacto se produce de manera gradual. Según el modelo de Hertz (Hertz & Reine. 1882), el radio de contacto (a_c) es:

$$a_c = \sqrt[3]{\frac{3F_n R}{4E^*}} \tag{1-13}$$

donde F_n es la fuerza normal, R el radio de la punta y E^* el módulo de Young efectivo que vale $1/E^* = (1-\nu^2_{muestra})/E_{muestra} + (1-\nu^2_{punta})/E_{punta}$ con E_{punta}, $E_{muestra}$, y ν_{punta}, $\nu_{muestra}$ los módulos elásticos y los coeficientes de Poison de la punta y de la muestra. Por otra parte la pendiente (m) de la curva de fuerza frente a distancia (Fig.1.19) está relacionada con la dureza del sistema punta-muestra. Esta pendiente depende de la constante de fuerza de la micropalanca (K) y de la dureza (s) del contacto punta-muestra de la forma:

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{s} + \frac{1}{K} \tag{1-14}$$

La dureza del contacto entre punta y muestra viene dada por la relación $s = E^* \cdot a_c$ según el modelo de Hertz. Por tanto el comportamiento de la pendiente de la curva de fuerza frente a distancia medida en líquido indica que, mientras en aire ambiente el radio de contacto varía de manera súbita de cero a un valor no nulo, en líquido el radio de contacto varía de forma gradual y suave.

En esta región las fuerzas provenientes de la capa doble de Debye, es decir la interacción electrostática de los iones en el medio líquido pueden jugar un papel

importante. Por esta razón es interesante realizar curvas de fuerza frente a distancia jugando con los parámetros de fuerza iónica (concentración de iones y pH) para minimizar esta interacción.

2.- Fuerzas de decenas de pN. La ausencia de fuerzas de adhesión permite usar micropalancas de muy baja constante de fuerza (hasta 20 pN/nm) con lo que se pueden adquirir imágenes aplicando una fuerza de tan solo 0.1 nN. Diversos estudios dan este valor de fuerza como el límite para evitar deformaciones en la superficie de las proteínas (Muller et al. 1995; Muller et al. 1997). Nótese que las fuerzas en líquidos son alrededor de 2 órdenes de magnitud menores que en aire ambiente (comparar las gráficas de las Fig.1.8 y 1.19).

1.5.2.1. Experimentos sobre ADN

En la Fig.1.20 se muestra una imagen de ADN adsorbido sobre mica en medio líquido tomada con JM aplicando una fuerza máxima de ~150 pN. La calidad es comparable a la de imágenes tomadas en DAFM en aire ambiente. Sin embargo hay una diferencia esencial y es que mientras las medidas sobre ADN usando DAFM dan una altura para el ADN de menos de 1 nm (Fig.1.18) la altura medida con JM (1.8±0.3 nm) está, dentro del error experimental, de acuerdo con la altura nominal de la molécula. Además, experimentos realizados usando JM con micropalancas de constante de fuerza intermedia (0.1 N/m) y aplicando una fuerza de ~300 pN permiten medir una altura comprendida entre los dos valores apuntados anteriormente (1.4±0.3 nm) (Moreno-Herrero et al. 2002b). Estos resultados sugieren que la altura medida en el ADN depende de la fuerza que se le aplica, es decir que la principal causa de la baja altura que presenta el ADN en medio líquido es debida a la compresión por la punta. Esto también significa que las fuerzas involucradas en DAFM en líquidos con micropalancas de 0.75-0.5 N/m son considerablemente mayores que las producidas con JM y como consecuencia comprimen más la molécula.

Si asumimos que la ley de Hooke es aplicable para calcular la deformación del ADN en medio líquido:

$$\frac{\Delta h}{h} = \frac{P}{E} \qquad (1\text{-}15)$$

con Δh la deformación, h la altura de la molécula (2 nm), E el modulo de Young del ADN (0.34×10^9 N/m^2) y P la presión ejercida por la punta sobre la molécula. Para una fuerza máxima aplicada de 300 pN y asumiendo un área de contacto de 4 nm^2 la deformación es ~0.4 nm. Si la fuerza la reducimos a la mitad (150 pN) entonces la deformación también lo hará. Si tenemos en cuenta la deformación calculada según la ecuación anterior, los valores que se obtienen para la altura de la molécula coinciden bastante bien con los obtenidos en JM.

La Fig.1.21 nos muestra un esquema que simula la deformación ejercida por la punta sobre la molécula de ADN en medio líquido (Moreno-Herrero et al. 2002a).

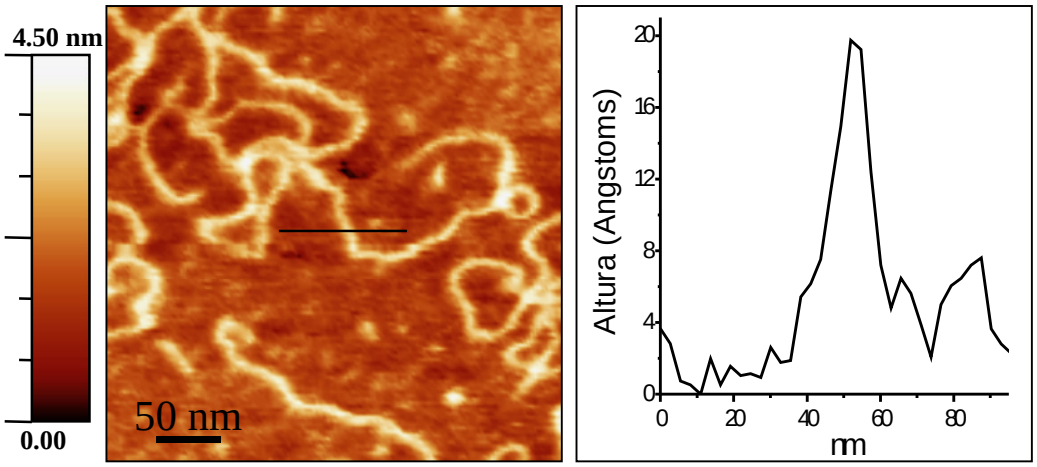


Figura 1.20. Imagen de ADN adsorbido sobre mica tomada en tampón PBS y usando JM. En la parte de la derecha se ha representado un perfil de una de las moléculas. Se obtiene una altura típica de las moléculas de 1.8±0.3 nm, valor que está de acuerdo con la altura nominal del ADN.

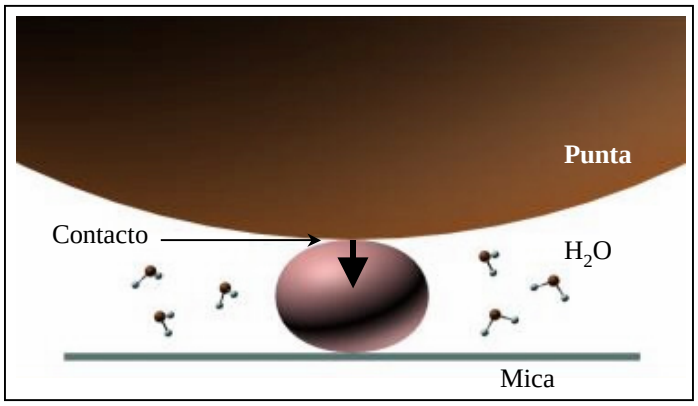


Figura 1.21. Esquema que muestra el modelo de compresión del ADN por medio de la punta de un AFM. La punta y la molécula de ADN están representadas a escala.

La anchura a media altura de las moléculas de ADN medida en líquido está en torno a 10 nm, valor considerablemente menor que el medido con DAFM en aire ambiente. Sin embargo la nitidez que se obtiene con DAFM al aire no se alcanza en medio líquido cuando visualizamos moléculas biológicas. La interacción molécula-substrato es mucho más débil en medio líquido que en aire ambiente, de hecho posiblemente las interacciones molécula-substrato y punta-molécula son en muchos casos muy similares. Por esta razón no es posible ejercer altas fuerzas sobre las moléculas ya que sino se despegan de la superficie. Por otra parte nuestra experiencia nos muestra que es necesario ejercer cierta fuerza sobre la muestra para conseguir la máxima nitidez. Este aspecto es debido a que debemos penetrar la DDL para poder acercarnos a las moléculas. En consecuencia, debemos buscar la concentración iónica apropiada y alcanzar un compromiso entre el valor máximo de fuerza normal y la nitidez de las imágenes.

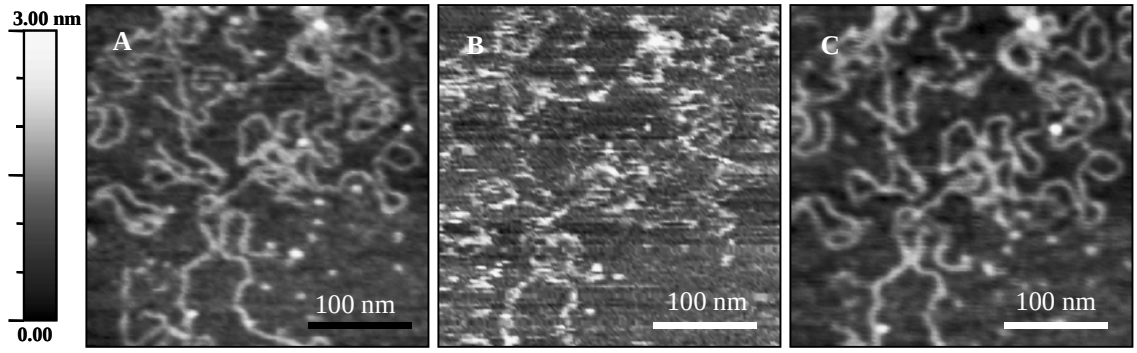


Figura 1.22. Imágenes de ADN sobre mica usando JM (A), CM (B) y JM (C) obtenidas de manera consecutiva sobre una misma zona. Mientras que las imágenes de JM presentan reproducibilidad y buena calidad. Las imágenes de contacto presentan baja calidad y distorsión.

Parece claro que un parámetro clave para las medidas en líquido es la fuerza normal. El método clásico de contacto también permite obtener una imagen para un valor de fuerza normal constante. Para comparar el JM con el CM realizamos un experimento similar al mostrado en la Fig.1.9 pero en medio acuoso. Primero obtenemos una imagen en JM, a continuación cambiamos al método de contacto y finalmente volvemos a adquirir una imagen en JM. Este experimento se muestra en la Fig.1.22.

Como se puede observar la imagen en modo contacto presenta baja calidad y distorsión en las moléculas. Sin embargo, contrariamente a lo que cabría pensar, durante el barrido en contacto prácticamente no se ha modificado la superficie, tal

y como muestra la imagen posterior obtenida en JM (Fig.1.22 C). La fuerza ejercida en el modo contacto fue de 100 pN, la misma que la empleada en JM. La baja calidad que muestra la imagen de contacto es debida al movimiento de las moléculas mientras se realiza el barrido pero se concluye que las fuerzas empleadas no son suficientes para despegar las moléculas de la superficie.

1.5.2.2. Experimentos sobre el bacteriofago ϕ29

Para extender el modo de operación JM a otras moléculas mayores iniciamos una colaboración con el grupo de la Dra. Margarita Salas de Centro de Biología Molecular de la UAM, grupo de reconocido prestigio internacional por sus investigaciones sobre el bacteriofago ϕ29 (Bernad et al. 1989; Serrano et al. 1990).

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Como todos los virus, los bacteriófagos son metabólicamente inertes en su estado extracelular y se reproducen usando el metabolismo de la célula huésped, que en el caso del ϕ29 es la bacteria *Bacillus subtilis*. El mecanismo por el cual estos virus infectan bacterias consiste en introducir su genoma en la célula huésped de manera que éste utiliza la maquinaria celular para llevar a cabo el ciclo vital del fago. El resultado es la completa destrucción de la célula con la lisis de la misma y la liberación de cientos de virus que pueden infectar nuevas bacterias. El bacteriofago ϕ29 está formado por tres partes principales: una cabeza con forma de icosaedro prolato y con filamentos, en la que se encuentra el material genético altamente condensado; un cuello o conector con 12 apéndices, lugar por el que sale el ADN del virus para infectar a la bacteria y una cola que sirve para anclarse sobre la bacteria que va a ser infectada (Anderson et al. 1966; Carrascosa et al. 1981). Esta estructura es claramente visible en imágenes de microscopía electrónica como la que se muestra en la Fig.1.23.

A partir de estas imágenes de microscopía electrónica se ha podido determinar que el bacteriófago ϕ29 posee una cabeza en forma de icosaedro prolato de 41.5x31.5 nm (largo x alto) y un complejo cuello-cola de 15x41 nm (ancho x largo) (Carrascosa et al. 1982). Los primeros trabajos con microscopía de campo cercano sobre este organismo se remontan a 1985 con el STM (Baro et al. 1985). Sin embargo debido a la pobre conductividad del material biológico el microscopio de fuerzas ha ido ganando terreno al microscopio de efecto túnel.

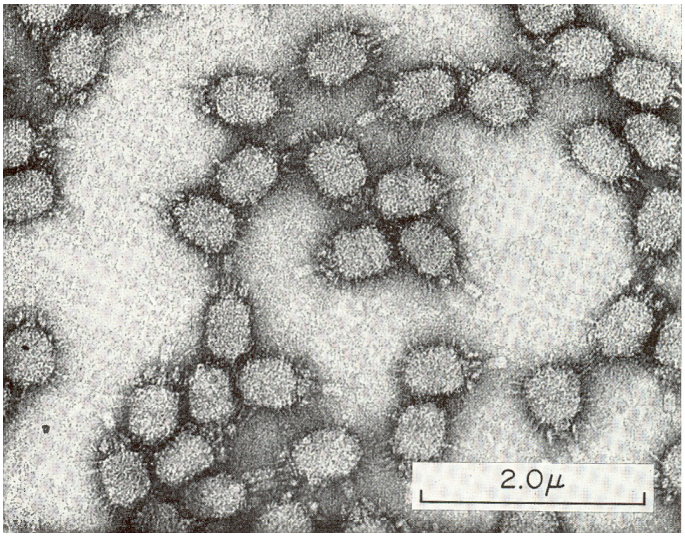


Figura 1.23. Imagen de microscopía electrónica que muestra numerosos bacteriófagos ϕ29 (imagen sacada de (Viñuela & Salas.)). Las tres partes características del virus: cabeza, conector y cola son claramente visibles.

La Fig.1.24 muestra los resultados obtenidos con DAFM en aire ambiente. Los resultados de microscopía de fuerzas son comparables a las imágenes de microscopía electrónica (Fig 1.23). Las tres partes del virus se distinguen perfectamente. No se distingue, sin embargo, las estructuras filamentosas de la cabeza, posiblemente debido al proceso de secado. En aire ambiente los virus tienen unas dimensiones de 30 nm × 65 nm × 115 nm (altura × ancho × largo) y presentan un hundimiento de la cabeza en su parte central que achacamos a la deshidratación y a las fuerzas de atracción hacia la superficie que distorsionan la molécula. Sin embargo, es importante notar que la altura de estas moléculas medida en aire ambiente se encuentra muy cercana a su altura nominal, hecho que no ocurría con el ADN. Esto posiblemente se debe a que el genoma del virus se encuentra compactado a altas presiones en el interior de la cabeza a densidades próximas a las del ADN cristalizado (Smith et al. 2001), lo que hace que no se distorsione la cápsida.

Otro aspecto interesante observado es que, al igual que en las preparaciones de microscopía electrónica (Carrascosa et al. 1982), algunos virus se encuentran vacíos. Esto se aprecia claramente porque las alturas de estas moléculas medidas con AFM en aire ambiente son mucho menores que las del resto (~20 nm) y porque la cápsida se encuentra hundida y deformada en la parte central. También hemos observado que los virus expulsan su material genético con el tiempo al estar adsorbidos sobre una superficie, lo cual dificulta poder obtener imágenes de microscopía de fuerzas de los virus en su medio fisiológico.

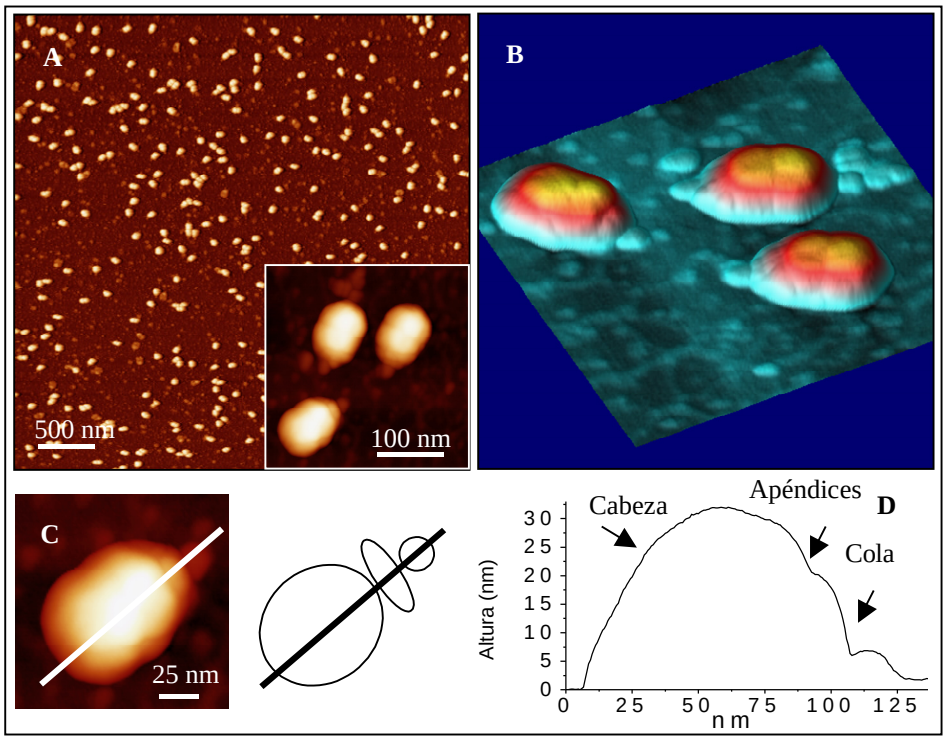


Figura 1.24. Imágenes de microscopía de fuerzas del bacteriófago ϕ29 obtenidas mediante DAFM en aire ambiente. La imagen de la izquierda (A) muestra un campo amplio de 4 μm x 4 μm en el que se observan numerosas moléculas. En (B) se muestra una representación tridimensional de un detalle de alta resolución de tres de ellas. En (C y D) una molécula individual es analizada en detalle mostrando las tres partes características del virus: cabeza, apéndices del conector y cola.

Los bacteriófagos también han sido visualizados usando JM en medio fisiológico (Fig 1.25). Como ya se comentó antes, hemos observado que los virus pierden el material genético con el tiempo al estar adsorbidos. Este hecho supone que sea difícil encontrar moléculas de virus completos. Además, la baja adhesión al substrato que presentan en medio líquido hace que sea, en general, una molécula mucho más difícil de visualizar que el ADN. El carácter longitudinal de la molécula de ADN implica una gran superficie de contacto. Los virus poseen una estructura más esférica con poca superficie de contacto con lo que la adherencia al substrato es menor.

Las dimensiones de los bacteriófagos medidas usando JM en medio líquido son 32 nm × 65 nm × 115 nm (altura × ancho × largo). En general las moléculas aparecen menos comprimidas contra el substrato. La depresión observada en aire ambiente no aparece cuando se mide en medio líquido y la forma icosaédrica es

mucho más marcada. Las alturas medidas coinciden con la altura nominal del virus. Estos resultados indican que el JM reproduce la estructura nativa que la molécula presenta en medio líquido.

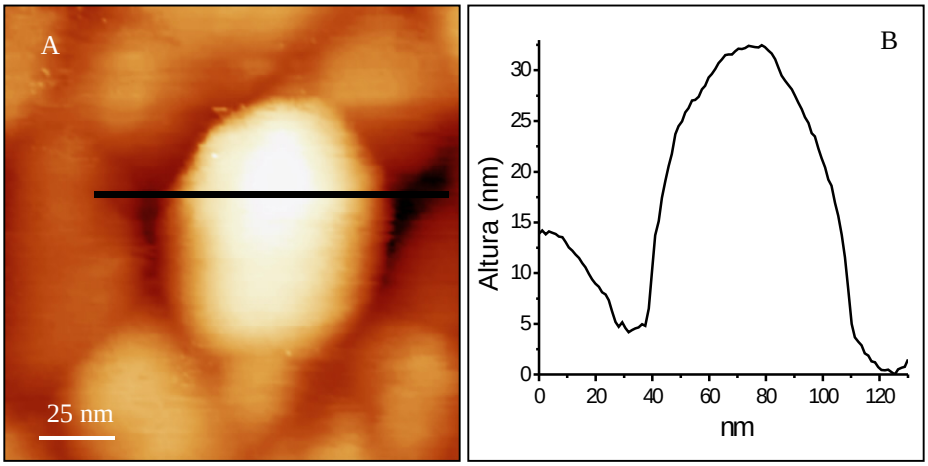


Figura 1.25. Imagen de microscopía de fuerzas del bacteriófago ϕ29 obtenida en JM en tampón PBS. La estructura icosaédrica de la cabeza se observa claramente en el perfil mostrado en B. La altura de la molécula es mayor que la obtenida en aire ambiente con DAFM.

1.6. JM versus DAFM en líquido

Hasta la fecha para la mayoría de las medidas sobre muestras biológicas realizadas en medio líquido se ha usado DAFM, bien mecánico o bien magnético. Sin embargo, el DAFM en medio líquido presenta algunos inconveniente técnicos ausentes en JM. Hemos visto que lo conveniente es excitar la micropalanca magnéticamente. Este hecho supone la evaporación de un material magnético sobre las puntas, aspecto que en numerosas ocasiones no es sencillo. No solamente la evaporación puede ser un problema sino también evitar que el material magnético se desprenda de la micropalanca al introducirla en el tampón. Este aspecto es de gran relevancia ya que la pérdida de material magnético implica una disminución en la amplitud de oscilación y el consiguiente cambio en la distancia punta-muestra. Estos fenómenos aparecen en las imágenes como inestabilidades o saltos bruscos en las alturas. Otro inconveniente técnico de usar DAFM en líquidos es la complicación en el diseño de la celda líquida en la que hay que incorporar un pequeño solenoide para excitar la micropalanca, además de los circuitos externos que hay que emplear para producir el campo magnético.

	DAFM	**JM**
Constante de Fuerza (N/m)	0.75 N/m	0.02 N/m
Frecuencia de resonancia (kHz)	25 kHz	No se aplica
Q	10	No se aplica
Amplitud (nm)	10 nm	10 nm
Contacto	Probablemente sí	Si
Tiempo de contacto	No está claro	0.5 ms
Fuerza aplicada (nN)	No está claro	0.1 nN
Desplazamiento lateral fuera de contacto	No está claro	Si
Tiempo por punto (ms)	2 ms	3 ms
Ciclos por punto	50	1
Tiempo de imagen	120 s	180 s
Dispositivo experimental adicional	Si	No

Tabla 1-II. Parámetros experimentales de los modos DAFM y JM usados para las medidas en aire ambiente.

En la Tabla 1-II se muestran los parámetros típicos de operación de ambos métodos en medio acuoso (Moreno-Herrero et al. 2002c). De manera general vemos que las condiciones de operación de ambos métodos se aproximan cuando se usan en medio líquido con la diferencia esencial de que DAFM controla en amplitud y JM en fuerza normal. Ventajas del DAFM al aire como son la velocidad de barrido (~3 min por imagen), el número de ciclos por punto o las altas frecuencias de resonancia dejan de ser tales en medio líquido. JM en líquido adquiere una imagen en poco más de 3 minutos y el número de ciclos y la frecuencia de resonancia de la micropalanca en DAFM en líquido se reduce en un factor 3.

El principal problema del DAFM en medio líquido es que la operación en régimen atractivo o de no contacto no está clara con lo que la magnitud ideal a controlar ya no es la amplitud o el desfase sino la fuerza normal, siendo este parámetro el de control en JM. Por otra parte la fuerte interacción hidrodinámica de la palanca con el medio que la rodea produce una fuerte atenuación de la amplitud de oscilación y en consecuencia un bajo factor de calidad (Q). Con el objeto de mejorar el factor Q se han desarrollado diversos métodos (Dürig et al. 1992; Mert et al. 1993; Tamayo et al. 2001). La idea de estos métodos es minimizar el factor de atenuación que existe en medio líquido.

La ecuación de movimiento en una dimensión de un oscilador no lineal de masa puntual amortiguado y forzado es (Marion & Thornton. 1995):

$$m\ddot{z} + b\dot{z} + kz = F_0 \cos(\omega t) + F_{\text{int}}(z) \tag{1-16}$$

siendo m y k la masa efectiva y la constante de fuerza de la micropalanca; b el factor de atenuación; $F_0 \cos(\omega t)$ la fuerza de excitación externa y $F_{int}(z)$ el conjunto de fuerzas de interacción entre la punta y la muestra. La frecuencia de resonancia de la micropalanca (ω_{res}) y el factor de calidad Q valen:

$$\omega_{res} = \sqrt{\omega_0 - \frac{b^2}{2m^2}} \qquad Q = \frac{m\omega_{res}}{b} \tag{1-17}$$

siendo ω_0 la frecuencia de resonancia libre que vale $\omega_0^2 = k/m$. Habitualmente en los experimentos realizados al aire el factor Q es del orden de 100 o más y las ecuaciones anteriores se simplifican: $\omega_{res} \approx \omega_0$ y $Q \approx \omega_0 m/b$. En medio líquido el factor de calidad se atenúa enormemente alcanzando valores típicos de 5 o incluso menos, con lo que estas aproximaciones no son válidas. Por otra parte la solución estacionaria de la ecuación de movimiento de la micropalanca es de la forma:

$$z(t) = A\cos(\omega t - \delta) \tag{1-18}$$

donde δ es el desfase entre la señal excitadora y la respuesta de la micropalanca. La idea para aumentar el factor Q en líquidos es la siguiente: como hemos visto el factor de calidad es inversamente proporcional al factor de atenuación (b). Por tanto si minimizamos este valor aumentaremos el Q. Por otra parte b va, en la ecuación de movimiento, multiplicado por $\dot{z}$ que vale $\dot{z} = A'\cos(\omega t - \delta + \pi/2)$. Si añadimos este factor a la ecuación podremos ajustar la constante A' para minimizar el factor de atenuación y así aumentar el factor de calidad:

$$m\ddot{z} + b\dot{z} + kz = F_0 \cos(\omega t) + GA\cos(\omega t - \delta + \pi/2) + F_{\text{int}}(z) \tag{1-19}$$

El método consiste por tanto en añadir a la señal de excitación una señal proporcional a la respuesta de la micropalanca y desfasada en 90°(Tamayo et al. 2001).

El método de aumentar el factor de calidad no estaba implementado aún en el sistema empleado durante esta tesis. Sin embargo se debe notar que el aumento del factor Q no cambia la física de la interacción entre punta y muestra.

Otra posible solución para operar el DAFM en medio líquido es utilizar micropalancas blandas pero de alta frecuencia de resonancia (Viani et al. 1999). Para un oscilador ligeramente amortiguado el factor de calidad se puede aproximar a $Q \approx \omega_0 / \Delta\omega$ con lo que un aumento de la frecuencia de resonancia libre también aumentaría el factor de calidad. Este tipo de micropalancas ya han demostrado parte de su potencial para visualizar interacciones entre proteínas en tiempo real (Viani et al. 2000). Lamentablemente, este tipo de puntas no se encuentran disponibles comercialmente.

JM en líquidos también presenta algunas limitaciones. Por un lado las actuales micropalancas de 20 pN/nm poseen bajas frecuencias de resonancia (en torno a 7 kHz) lo que impide aumentar la velocidad de barrido ya que entonces se excitaría la resonancia de la propia micropalanca. Con el objeto de solucionar este problema se han fabricado micropalancas que poseen altas frecuencias y baja constante de fuerza como ya comentamos anteriormente (Viani et al. 1999).

Por otro lado la amplitud del ruido térmico de la micropalanca sigue una ecuación de la forma (Butt & Jaschke. 1995):

$$\Delta z_{térmico} = \sqrt{\frac{4k_B T}{3K}} = \frac{0.074}{\sqrt{K}} \ \text{nm} \qquad (1\text{-}20)$$

siendo K la constante de fuerza de la micropalanca, k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura. El uso de micropalancas de baja constante de fuerza supone grandes amplitudes de ruido térmico con la consiguiente dificultad técnica para encontrar el valor medio de la deflexión en el cual realizar la realimentación. El ruido que se observa en la Fig.1.19 es precisamente ruido térmico de la micropalanca (50 pN en nuestro caso). Desde el punto de vista teórico el uso de micropalancas de mayor constante de fuerzas es mejor siempre que el control de la fuerza sea muy preciso, sin embargo las limitaciones técnicas obligan a emplear micropalancas más blandas pues así cualquier imprecisión en el control de la fuerza no tiene consecuencias graves para la muestra.

1.7. Mapas de adhesión en líquidos

Al igual que el modo DAFM permite obtener simultáneamente con la imagen de topografía imágenes del desfase entre la señal excitadora y la respuesta de la micropalanca, JM puede adquirir, simultáneamente con la topografía, mapas de adhesión. Este aspecto es especialmente relevante cuando se intentan estudiar interacciones específicas en tiempo real entre biomoléculas mediante la funcionalización de las micropalancas.

En la Fig.1.26 se muestran imágenes de adhesión de las dos muestras mostradas en este capitulo obtenidas con JM en medio fisiológico. Como se puede ver la adhesión es prácticamente nula sobre las moléculas adsorbidas, mientras que es distinta de cero en el substrato. Recientes experimentos nos muestran que esta adhesión es debida a la adsorción de sales u otros productos químicos presentes en el tampón de las muestras sobre el substrato. Notar que típicamente la adhesión no sobrepasa 0.5 nN.

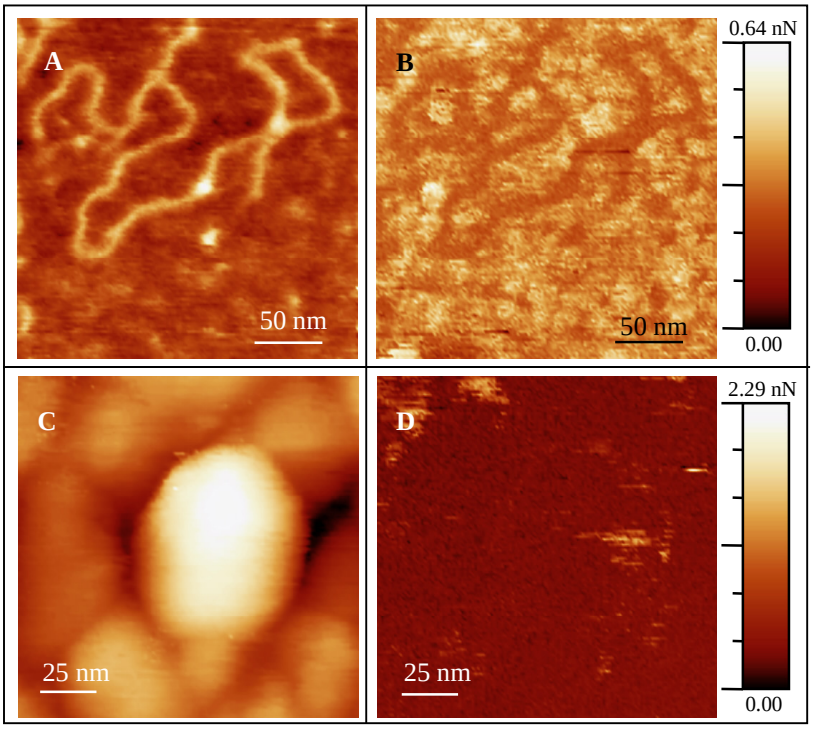


Figura 1.26. Mapas de adhesión sobre ADN (B) y sobre el bacteriófago ϕ29 (D) obtenidos en JM a la vez que se adquieren sus correspondientes imágenes de topografía (A y C).

1.8. Resumen

La microscopía de fuerzas se presenta como una técnica de caracterización única en el campo de la bioquímica y la biología molecular siempre que permita la visualización de moléculas individuales en su medio fisiológico y con resolución nanométrica.

El desarrollo de métodos de medida y operación que permitan la obtención de imágenes en los supuestos anteriores es un aspecto clave para potenciar el AFM en biología.

En medio ambiente es posible operar el microscopio en régimen atractivo o de no contacto. Esta posibilidad hace que el modo DAFM, que permite la operación en no contacto, sea preferible a métodos que involucren contacto como el JM para visualizar materiales blandos.

En medio líquido la posibilidad de trabajar en el régimen de no contacto no está clara y habitualmente se produce contacto entre punta y muestra. En este contexto, mientras no se desarrollen modos de medida que eviten el contacto con la muestra, el parámetro a controlar debe ser la fuerza que se aplica sobre la muestra. Estos razonamientos nos han llevado a desarrollar JM como un modo de operación que controla el valor de la fuerza normal, con lo que es preferible al DAFM en medio líquido. JM permite obtener imágenes aplicando una fuerza normal máxima de ~100 pN, valor éste considerado como umbral para producir daño irreversible sobre el material biológico.

Los experimentos realizados sobre ADN en medio líquido usando DAFM y JM muestran que la altura de la molécula depende de la fuerza normal que se aplica sobre ella y sugieren que en la operación de DAFM en medio líquido se produce contacto mecánico de la punta con la muestra.

A la vista de los buenos resultados obtenidos sobre ADN, hemos generalizado el uso de JM en líquido a otras moléculas de mayor tamaño como es el bacteriófago ϕ29, presentando al JM como una técnica general de visualización de moléculas individuales en medio fisiológico con alta resolución.

JM presenta algunas ventajas sobre DAFM en líquidos: no necesita un montaje experimental adicional al que se necesita para medir en el modo clásico de contacto; no se necesita modificar las puntas y permite la obtención, simultáneamente con la topografía, de mapas de adhesión, una magnitud relevante para el estudio de interacciones entre moléculas.

JM también tiene algunas limitaciones fundamentales como son la velocidad de barrido debida a la frecuencia de resonancia de las micropalancas y la amplitud del ruido térmico debido a la baja constante de fuerza de las puntas.

2. Propiedades físicas de biomoléculas: la conductividad eléctrica del ADN

2.1. Introducción.

En los próximos capítulos expondré los resultados obtenidos en las tres líneas de investigación principales de mi tesis doctoral. Aunque todas ellas se caracterizan por el estudio de biomoléculas mediante el microscopio de fuerzas, los problemas estudiados son muy distintos entre sí. En primer lugar estudiamos una propiedad física — la conductividad eléctrica — de una biomolécula (el ADN), línea de investigación que podría incluirse dentro de un programa de física de la materia condensada. El segundo tema de investigación intenta explorar las capacidades de la microscopía de fuerzas para la caracterización estructural de biomoléculas. Éste es un tema más biofísico que el primero. Por último nos ocupamos de un problema bioquímico como son las interacciones entre biomoléculas estudiadas con el microscopio de fuerzas. Por tanto los próximos tres capítulos muestran tres aplicaciones de la microscopía de fuerzas que involucran moléculas biológicas con una clara evolución desde un problema físico hacia un problema bioquímico.

La motivación principal del trabajo expuesto en este capítulo era la búsqueda de un conductor molecular. En los últimos años se ha iniciado una carrera frenética en busca del conductor nanométrico que cambie el concepto de microelectrónica a nanoelectrónica. Estos hechos han abierto una nueva rama de la ciencia denominada nanotecnología o tecnología basada en el nanómetro. Sin duda el uso de moléculas de tamaño típico de pocos nanómetros como parte esencial de los circuitos electrónicos constituirá la nueva era nanotecnológica. Numerosos hilos moleculares han sido propuestos como posibles candidatos para constituir los nuevos nano-circuitos: nanohilos de oro (Pascual et al. 1993), moléculas orgánicas (Rosei et al. 2002), monocapas autoensambladas (Datta et al. 1997), fibras de pentóxido de vanadio (Muster et al. 2000), nanotubos de carbono o CNT´s (Carbon Nanotubes) (Iijima. 1991; Mintmire et al. 1992) y también el ADN (Fink & Schonenberger. 1999). Sin embargo mientras en algunos de ellos sus propiedades eléctricas han sido perfectamente contrastadas, como es el caso de los CNT, en otros como en el ADN la situación no está clara. Durante los 4 años de trabajo de investigación he tenido la suerte de ser testigo de primera fila del nacimiento del *boom* de la conductividad del ADN (Fink & Schonenberger. 1999) y posiblemente también de su muerte (de Pablo et al. 2000c; Gómez-Navarro et al. 2002b).

En este estudio hemos empleado dos tipos de moléculas: ADN procedente del bacteriófago λ (λ-ADN[1]) y ADN modificado con metales *M*-ADN (Lee et al. 1993). Los trabajos mostrados en este capítulo sobre λ-ADN se pueden dividir en dos partes. La primera parte fue iniciada junto con P. J. de Pablo y constituyó una parte de su tesis doctoral. En esta parte se estudiaron las propiedades eléctricas del ADN basándonos en las ideas empleadas en el estudio de propiedades eléctricas de nanotubos de carbono (de Pablo et al. 2000b), en las que se realiza un contacto mecánico entre la molécula de ADN y la punta metálica del AFM. La segunda parte la constituye los experimentos realizados sobre ADN en los que no hay contacto mecánico con las moléculas. En esta segunda parte es justo reconocer la participación de C. Gómez-Navarro.

La última parte de este capítulo describe los trabajos de fabricación, caracterización topográfica y estudio de las propiedades eléctricas de un nuevo

[1] ADN en forma β de secuencia aleatoria

tipo de ADN que tiene la peculiaridad de que incorpora iones divalentes metálicos. Esta nueva molécula se denomina *M*-ADN.

2.2. Contexto histórico

Hasta abril de 1999, la opinión general sobre la condición eléctrica del ADN era que era una molécula aislante. Trabajos previos con STM mostraban la gran dificultad para obtener imágenes de la molécula biológica debido a la pobre conductividad de la misma (Salmeron et al. 1990; Garcia et al. 1992; Dunlap et al. 1993). Guckenberger et al. obtuvieron en 1994 imágenes de STM de ADN adsorbido sobre mica. En aquellos experimentos explicaron que las imágenes se obtuvieron gracias a la presencia de una capa de agua adsorbida sobre la muestra, la cual contiene iones H^+ (Guckenberger et al. 1994). A pesar de que los experimentos negaban posibles aplicaciones tecnológicas con el ADN, el interés por usar al ADN como un conductor molecular no decayó. En 1998 se uso la estructura cuasi-unidimensional del ADN para adsorber *clusters* de plata y usar el nuevo hilo molecular como conductor (Braun et al. 1998). En abril de 1999 se publicó en la revista científica *Nature* un sorprendente y revolucionario trabajo firmado por los investigadores Fink y Schonenberger (Fink & Schonenberger. 1999) en el que mostraban un comportamiento lineal de la corriente y resistividades para la molécula del ADN de 10^{-4} Ω·cm. Para una molécula de ADN con una longitud de micras, esta resistividad supone resistencias típicas de pocos MΩ. Estas características eléctricas convertían al ADN en un conductor excepcional capaz de transportar ~nA al aplicar unos pocos voltios. A partir de este trabajo un grupo reducido pero muy activo de investigadores se emplearían en reproducir o refutar los hallazgos de Fink y Schonenberger con el fin de averiguar si el ADN realmente presentaba un comportamiento de conductor molecular.

Desde la aparición del citado artículo en 1999, numerosos trabajos han sido publicados con resultados dispares. Dependiendo del trabajo el ADN puede ser un buen conductor con característica I/V lineal (Fink & Schonenberger. 1999), un conductor con un gap que aumenta con la temperatura (Porath et al. 2000), un aislante bastante bueno (Guckenberger et al. 1994; Braun et al. 1998; de Pablo et al. 2000c; Storm et al. 2001; Gómez-Navarro et al. 2002b) o incluso un superconductor con una pequeña resistencia a temperatura ambiente (Kasumov et al. 2001). Además el ADN puede ser dopado para convertirlo de semiconductor a conductor metálico con característica I/V lineal

(Rakitin et al. 2001). A partir de los trabajos publicados sería justo considerar al ADN como una molécula milagrosa ya que presenta una conductividad que abarca 10 ordenes de magnitud!

Medir las propiedades eléctricas de una molécula tan pequeña no es tarea sencilla. De hecho, todos los trabajos antes mencionados obtienen sus resultados mediante métodos distintos: microscopio de efecto túnel (Guckenberger et al. 1994); microscopio de proyección (Fink & Schonenberger. 1999); técnicas de atrapamiento electrostático entre dos electrodos micro-fabricados (Porath et al. 2000) o simplemente mediante la colocación de la molécula de ADN sobre dos pequeños electrodos (Rakitin et al. 2001). Nosotros decidimos aplicar las técnicas empleadas en los experimentos realizados sobre CNT al ADN (de Pablo et al. 2000b; de Pablo et al. 2001), pero para ello debemos controlar, en primer lugar, la preparación de muestras de ADN sobre distintos substratos.

2.3. Preparación de muestras de ADN

En la actualidad existen diversos protocolos para adsorber moléculas de ADN sobre diferentes substratos. La molécula de ADN, es quizás una de las moléculas que presenta mayor densidad de carga (1 carga negativa cada 0.34 nm) a pH normal (Ver Anexo A). Por esta razón, la interacción que predomina en el proceso de adsorción es la interacción electrostática. Generalmente se emplea una molécula puente entre el ADN y el substrato que normalmente también presenta una carga superficial. Históricamente, la molécula 3-aminopropyltrietoxysilane o APTES (Sigma-A3648) fue la molécula *pegamento* elegida para pegar moléculas de ADN sobre mica (Bustamante et al. 1992; Lyubchenko et al. 1992) y en general todavía se emplea (Umemura et al. 2001). El APTES es una molécula que contiene un grupo amino (NH_3^+) en un extremo y un Si en el otro. El Si reacciona con el substrato de forma que la superficie exhibe una carga positiva dada por los grupos amino. El APTES se puede utilizar para adsorber ADN a substratos como vidrio u oxido de silicio. La principal desventaja del uso del APTES es que, debido a la fuerte carga que presenta, no permite discriminar entre ADN y otras moléculas, pegando también a la superficie las impurezas presentes en la solución. Esto exige el empleo de muestras de gran pureza. Existen otros métodos mas selectivos, como puede ser el empleo de tioles (Hegner et al. 1993; Hegner et al. 1995), pero mucho más

complicados. En numerosos casos se sacrifica cierta limpieza por un procedimiento rápido y sencillo.

En cuanto a los substratos que se emplean el más extendido es la mica. La mica posee ciertas propiedades que la convierten en el substrato idóneo para adsorber moléculas biológicas para microscopía de fuerzas. En primer lugar cuando se exfolia presenta una superficie limpia, atómicamente plana y con carga, aspecto este último muy apropiado para adsorber biomoléculas pues éstas en general también tienen carga. Lo habitual para adsorber moléculas de ADN sobre mica es utilizar iones divalentes, como Zn^{2+} or Mg^{2+} (Thomson et al. 1996).

2.3.1. Preparación de muestras de ADN usando $MgCl_2$

El protocolo para preparar muestras de ADN adsorbido sobre mica consiste en una mezcla final de 1-10 mM $MgCl_2$ y 10-100 ng de ADN diluido en un tampón estándar Tris-EDTA (pH 7.5). Esta solución se deposita sobre un disco de mica recién exfoliado, se deja adsorber durante un minuto, se aclara con agua ultrapura y desionizada (agua milli-Q) y se seca con aire o N_2. Preparar una muestra de ADN siguiendo este protocolo lleva menos de 5 minutos. La concentración de ADN se ajusta a partir de las imágenes de AFM. La Fig.2.1 muestra diferentes imágenes de ADN sobre mica. Este tipo de preparación es la preferida si la muestra se va a emplear en aire ambiente. Para medio líquido es preferible usar la preparación con APTES pues fija las moléculas al sustrato de manera más firme.

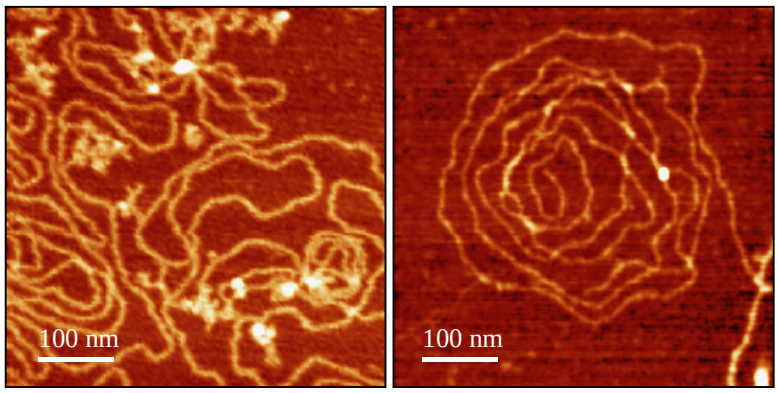


Figura 2.1. Imágenes de ADN sobre mica. Las muestras fueron preparadas utilizando iones Mg^{2+}(drcha.) y Co^{2+}(izda.) según se describe en la sección 2.3.1.

2.3.2. Preparación de muestras de ADN usando APTES

La preparación de muestras de ADN usando APTES es más complicada que usando $MgCl_2$ y más larga (1 hora). En primer lugar es necesario cargar positivamente los substratos. Para cargar los substratos se sumergen durante 15 minutos en una solución 0.1% de volumen de APTES disuelto en agua milli-Q. A continuación los aclaramos con 2-propanol y con agua. Luego los secamos con N_2 o aire. De esta manera los substratos se encuentran cargados positivamente. Luego depositamos 15-30 μl de solución con ADN durante una hora. Se debe poner especial atención en que la gota depositada sobre el substrato no llegue a evaporarse. Si la evaporación, debido a las condiciones atmosféricas, es muy fuerte, se puede colocar la muestra en una atmósfera húmeda. Si las muestras se quieren visualizar al aire debemos aclarar con agua y secarlas con aire o nitrógeno seco. Si por el contrario las muestras se quieren visualizar en su medio fisiológico debemos omitir el paso del secado, colocarlas en la celda líquida y llenarla con el tampón apropiado. Es importante no dejar que la muestra llegue a secarse.

Siguiendo este protocolo es posible adsorber ADN sobre varios substratos: SiO_2, vidrio, zafiro o mica. En la Fig.2.2 se muestran imágenes de ADN adsorbido en diferentes substratos.

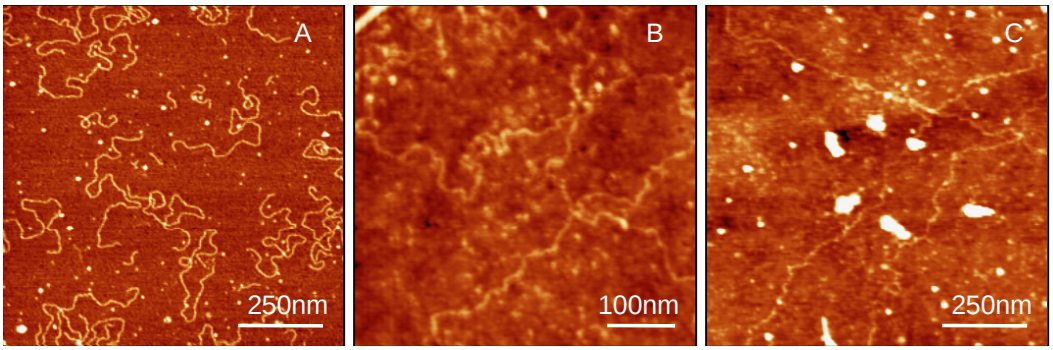


Figura 2.2. ADN sobre mica (A), vidrio (B) y zafiro (C) depositado utilizando APTES para cargar positivamente la superficie de los substratos.

2.4. Experimentos con contacto

En este apartado resumiré los resultados obtenidos en los experimentos basados el contacto mecánico de la punta de AFM con las moléculas de ADN. El experimento reproduce el montaje experimental utilizado para medir la

conductividad de CNT´s (de Pablo et al. 2000b). Consiste en adsorber moléculas de ADN sobre un substrato aislante como la mica; evaporar un electrodo de oro sobre una parte de las moléculas y realizar un contacto mecánico entre la punta metálica de AFM y las moléculas de ADN que a su vez están conectadas a tierra mediante el electrodo de oro. En el punto de contacto se aplica una rampa de voltaje (V) entre la punta y el electrodo y se mide la corriente (I) que circula por el circuito y que, necesariamente, debe pasar por la molécula. En la Fig.2.3 se muestra un esquema que explica la preparación de la muestra así como el aspecto de las muestras utilizadas.

Medidas que eran directas y reproducibles con CNT, resultaron en una ausencia de corriente cuando se empleaban moléculas de ADN. Las corrientes descritas por Fink y Schonenberger deberían ser fácilmente medibles con nuestro montaje experimental, pero nunca se midieron. Aplicamos hasta 12 V pero no medimos corriente alguna por encima de nuestro nivel de ruido (1 pA). Nuestro resultado contrastaba con los resultados que se seguían publicando en revistas de alto prestigio como el artículo que apareció en *Nature* en febrero de 2000 (Porath et al. 2000). En este artículo se estudiaban las propiedades eléctricas de moléculas cortas de ADN que tenían la peculiaridad de tener una secuencia definida por Citosinas (C) y Guaninas (G). Estos experimentos presentaban al ADN como una molécula semiconductora con un gap de 2 V y resistencias de 3 GΩ a 4 V. El tamaño de las moléculas que emplearon era de tan sólo 10 nm de longitud y la resistividad medida fue en su caso de 10 Ω·cm.

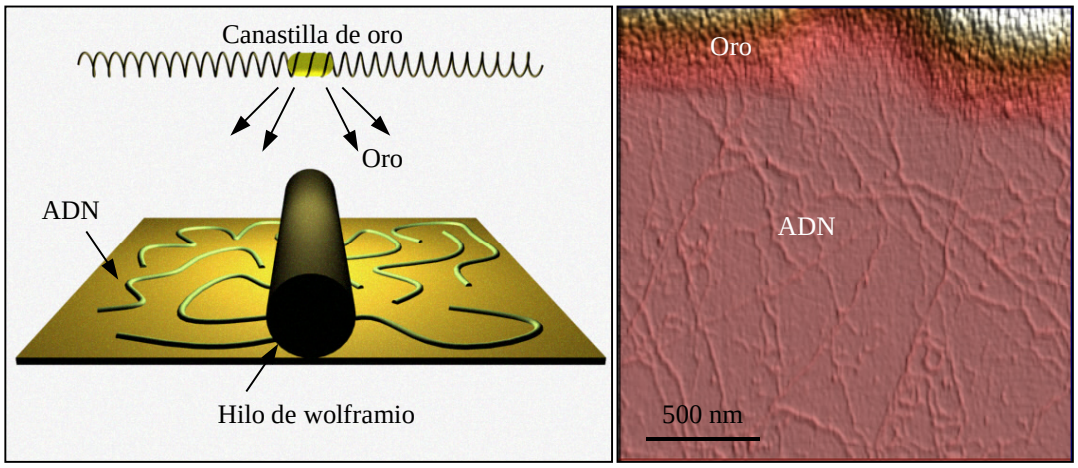


Figura 2.3. Esquema mostrando la preparación de las muestra (parte izda) y el aspecto general de la muestra tras la evaporación. Las moléculas de ADN se ven claramente saliendo del electrodo de oro.

Con el fin de aumentar la sensibilidad de nuestras medidas, realizamos nuevos experimentos con moléculas de mayor tamaño. El genoma del bacteriófago λ está disponible comercialmente y se caracteriza por ser una única molécula de secuencia aleatoria de ~44000 pares de bases (pb) o ~15 μm de longitud (λ-ADN Sigma D9768). Con estas moléculas conseguimos realizar redes de ADN conectadas por dos electrodos metálicos separados 4 μm. El canal de 4 μm tenía una longitud de pocos milímetros, con lo que podíamos estimar el número de moléculas que conectaban ambos electrodos a partir de una imagen de AFM de un área local. Estimamos que teníamos decenas de miles de moléculas conectando ambos electrodos. Una vez preparada la muestra, medir la característica I *vs* V del circuito es trivial. Lamentablemente este experimento confirmó nuestros resultados anteriores: ausencia de corriente en moléculas de ADN adsorbidas en mica. Este tipo de experimentos aumentaron la cota superior de la resistividad de las moléculas a 10^5 Ω·cm, valor ya muy por encima de los resultados publicados. La Fig.2.4 muestra una imagen AFM de las muestras empleadas para este tipo de experimento.

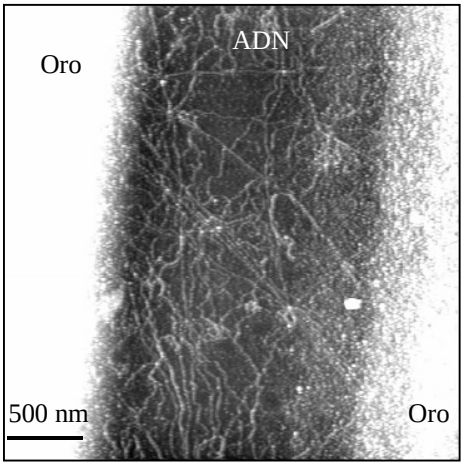


Figura 2.4. Imagen de AFM de la muestra empleada para medir la conductividad de λ-ADN. La longitud de estas moléculas permite conectar los dos electrodos de oro que se encuentran separados una distancia de menos de 2 μm. Varias moléculas que conectan los electrodos son visibles en la imagen.

Por otra parte cálculos teóricos, basados en la teoría del funcional de la densidad, realizados sobre pequeños fragmentos de ADN Poly(dG)-Poly(dC) predecían un comportamiento mas aislante cuanto mayor era el desorden introducido en la molécula. La variable desorden se refiere a la aleatoriedad en la secuencia de bases. En nuestro caso, el ADN empleado se puede considerar de secuencia aleatoria.

2.4.1. Experimentos en Poly(dG)-Poly(dC)

Cálculos teóricos y resultados experimentales como los que se mostraban en (Porath et al. 2000) indicaban que la configuración C-G era la más favorable para una posible conducción eléctrica en el ADN. Por estos motivos decidimos adsorber moléculas de ADN de secuencia Poly(dG)-Poly(dC)[2]. Este tipo de moléculas tienen citosinas en una de las cadenas y guaninas en la complementaria. El primer problema que tienen este tipo de moléculas es su longitud. Ya que no existen en la naturaleza, los productos artificialmente elaborados sólo tienen decenas de nanómetros de longitud. Este hecho nos obligó a emplear nuevas máscaras en la evaporación con el fin de conseguir escalones de oro de pocas decenas de nanómetros (Fig.2.5).

A pesar de que los escalones de oro de las nuevas evaporaciones tenían un ancho de poco más de 50 nm (comparable al diámetro de la punta), y era posible hacer un contacto mecánico muy cerca del oro, reprodujimos los resultados anteriores una vez más.

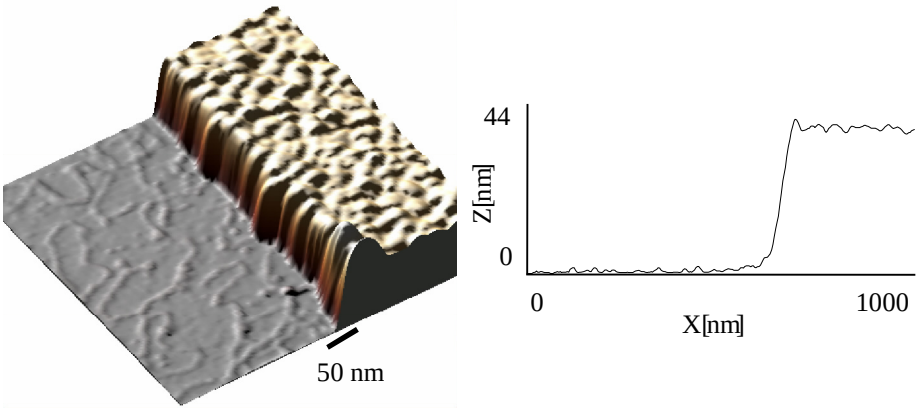


Figura 2.5. Imagen de AFM de moléculas de ADN de secuencia conocida Poly(dG)-Poly(dC). El escalón de oro obtenido en esta evaporaciones de sólo 50 nm como se puede observar en el perfil de la derecha.

Paradójicamente, en la literatura seguían apareciendo trabajos que mostraban resultados contradictorios con los nuestros. Por ejemplo el artículo publicado en *Appl. Phys. Lett.* por Cai et al (Cai et al. 2000). En este trabajo medían

[2] Poly(dG)·Poly(dC) (Sigma P3136) Polydeoxyguanylic acid·Polydeoxycytidylic acid sodium salt.

corriente en redes de cadenas de ADN Poly(dG)-Poly(dC) contactando las moléculas con una punta metalizada de AFM en un experimento muy similar a los nuestros. O incluso el artículo publicado en enero de 2001 en *Science* (Kasumov et al. 2001), en el que describían una conductividad de las cadenas de ADN similar a la de los nanotubos de carbono a temperatura ambiente y una transición a superconductor a 1 K. Posteriormente se publicaron otros trabajos en los que afirmaban un transporte de corriente por huecos y por túnel entre bases de Adenina (Giese et al. 2001). El experimento de Kasumov et al. completaba la gama de posibilidades para el ADN que abarcaba desde superconductor a muy buen aislante.

2.4.2. Medidas con otros metales y en otros substratos

Puesto que no se alcanzaba un consenso sobre el comportamiento eléctrico del ADN, decidimos trabajar sobre otros factores que pudiesen afectar a nuestras medidas: el metal evaporado y el substrato sobre el que se adsorben las moléculas de ADN.

Algunas publicaciones (Kasumov et al. 2001) señalaron la importancia que podría tener el contacto metal-ADN a la hora de estudiar sus propiedades eléctricas. La función de trabajo del metal que realiza el contacto con el ADN puede ser un factor importante a la hora de inyectar electrones sobre la molécula. Por este motivo decidimos emplear otros metales. A parte del oro usamos plata, estaño y carbono. El oro y la plata son metales de características similares. Ambos tienen funciones de trabajo parecidas, 4.25 eV y 4.31 eV respectivamente, así como bajas temperaturas de fusión (≈1200-1300 K) (AIP handbook). Estos metales se pueden evaporar fácilmente por sublimación térmica, sencillamente haciendo pasar una corriente por un hilo que rodea al grano de oro o de plata tal y como se muestra en la Fig.2.3. El estaño se evapora, también, fácilmente y tiene una función de trabajo menor, 3.62 eV. Por último evaporamos carbono. Según Kasumov et al. el contacto del ADN con el carbono podría ser un factor determinante. El carbono tiene una función de trabajo de 4.39 eV, presenta temperaturas de fusión muy altas (por encima de los 3000 K), y se evapora por *sputtering* o por sublimación producida por un arco eléctrico. Es por tanto mucho más difícil de evaporar que los metales empleados antes. En la Fig.2.6 aparecen imágenes de las muestras usando distintos metales.

El oro y la plata dieron resultados similares. El estaño presenta un crecimiento columnar con lo cual no es fácil obtener un buen contacto entre el ADN y el electrodo. Además, al no formar una película continua la conducción para películas delgadas era muy baja. Con el carbono tuvimos muchos problemas. En primer lugar es difícil de evaporar si no se tiene el sistema apropiado de *sputtering*. Por otra parte debido a la alta difusión que presenta cuando toca la superficie los átomos de carbono difundían por debajo de la máscara empleada. El problema de la evaporación lo solucionamos haciendo pasar una corriente elevada por una sección pequeña de carbono. Este proceso provoca que se evapore carbono por sublimación ya que se alcanzan temperaturas muy elevadas en el arco eléctrico que se produce. Para minimizar la difusión de los átomos de C por la superficie de la mica se realizaron evaporaciones en las que la muestra se mantuvo a baja temperatura (100 K). Sin embargo a pesar de los esfuerzos, no fuimos capaces de conseguir unas muestras con una calidad similar a la obtenida en muestras de oro o plata: las moléculas de ADN se veían débilmente en las evaporaciones de carbono. La baja calidad de las imágenes nos obligó a desechar el uso del carbono como electrodo.

A pesar de los problemas en las evaporaciones y de la baja calidad de las imágenes decimos repetir el experimento básico del contacto. En ningún caso se detectó corriente por encima del nivel de ruido eléctrico.

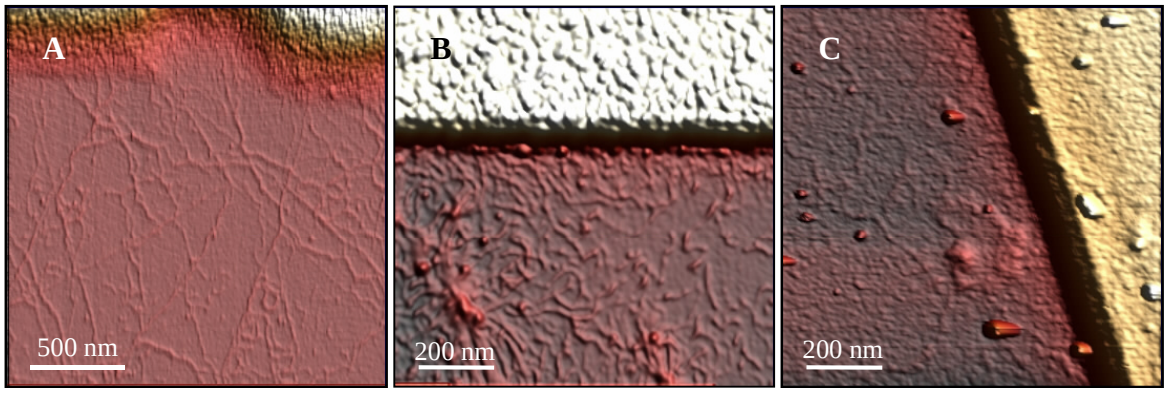


Figura 2.6. Imágenes de microscopía de fuerzas de ADN adsorbido sobre mica en donde se han hecho contactos usando diferentes metales: oro (A), plata (B), y carbono (C).

Los resultados anteriores probaban que la unión metal-ADN no era un factor clave en nuestras medidas, al menos con los metales empleados. Por otra parte al aplicar una tensión al ADN la carga suministrada, debía irse por el substrato en

lugar de por la molécula en sí. Esto implicaba que la resistividad de la molécula era al menos similar a la del substrato. En esta línea se prepararon muestras sobre otros substratos como vidrio o zafiro de resistividades superiores a la de la mica (Fig.2.2). El uso de otros substratos está bastante limitado debido a la baja altura de las moléculas de ADN adsorbidas (0.8 nm). Esto implica que debemos emplear substratos extraordinariamente planos como es el caso de la mica.

El empleo de otros substratos, de diferentes resistividades, tampoco cambio nuestra conclusión principal: el ADN adsorbido se comporta como una molécula aislante.

2.5. Experimentos sin contacto

La principal objeción a los experimentos descritos hasta este momento era el contacto punta-molécula. Con el objeto de eliminar este posible problema desarrollamos el siguiente experimento en el cual no se produce contacto alguno entre la punta de la micropalanca y la molécula a estudiar.

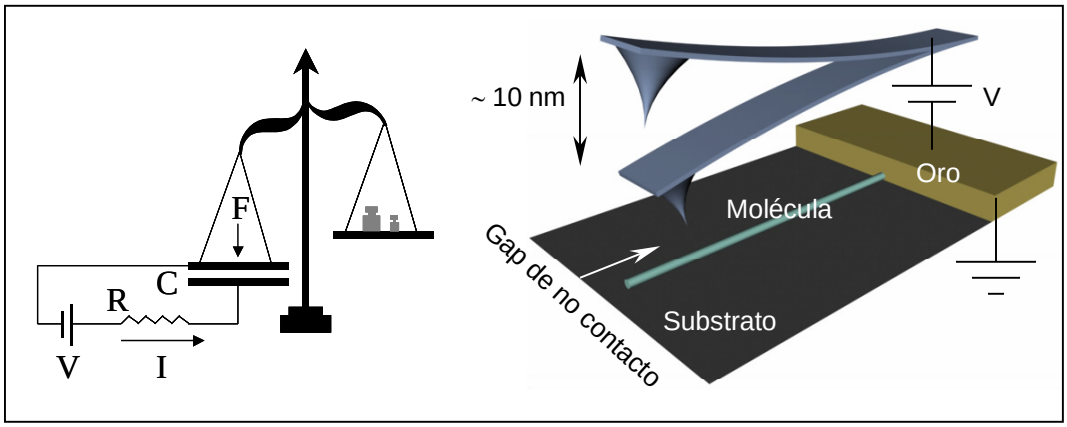


Figura 2.7. Esquema que muestra la idea principal de los experimentos de electrostática sobre moléculas largas.

El principio físico de estos experimentos está relacionado con las fuerzas electrostáticas presentes entre un objeto metálico y un dieléctrico. Estas fuerzas están determinadas por la densidad de cargas móviles y fijas. La habilidad de las cargas móviles para moverse determinará las propiedades eléctricas del objeto. Desde un punto de vista electrostático cualquier conductor molecular puede ser

reducido a un simple circuito con una resistencia (R) y un condensador (C) en serie (Fig.2.7). En esta situación las cargas pasan a través de la resistencia cargando el condensador. La cantidad de carga suministrada a las placas del condensador puede ser medida mediante un detector de fuerza que fijamos a la placa superior del condensador. Las placas del condensador se atraen debido a la fuerza electrostática que existe entre ambas. El sensor de esta *balanza electrotática* a escala nanométrica puede ser la micropalanca de un AFM (Terris et al. 1989; Schoenenberger & Alvarado. 1990; Hao et al. 1991; Hu et al. 1995).

Para medir esta fuerza hacemos oscilar la micropalanca de frecuencia de resonancia ω_0 y constante de fuerza K a su frecuencia de resonancia libre mientras se registra la amplitud de la oscilación y la diferencia de fase entre la señal excitadora y la respuesta de la micropalanca. Si aplicamos una diferencia de potencial constante entre la punta y la molécula (U) se induce un campo eléctrico de forma que la energía de interacción entre la punta y molécula ($V_{punta\text{-}muestra}$) vale (ver Ec. 1-7):

$$V_{punta-muestra}(z) = \frac{1}{2} C(z) \cdot U^2 \tag{2-1}$$

donde *C(z)* es la capacidad existente entre punta y muestra y dependiente de la distancia entre ambas[3]. Como consecuencia tenemos una fuerza atractiva de origen electrostático (F_e) que depende de la distancia entre la punta y la muestra que vale (ver Ec. 1-8):

$$F_e(z) = -\frac{\partial V(z)}{\partial z} = -\frac{1}{2}\frac{\partial C(z)}{\partial z} U^2 \tag{2-2}$$

La ecuación de movimiento de la micropalanca será:

$$m\ddot{z} + b\dot{z} + kz = F_0 \cos(\omega t) + F_e(z) \tag{2-3}$$

Una de las formas de resolver esta ecuación es asumir que la fuerza de interacción es lineal con la distancia (aproximación armónica) de forma que $F_e(z) \approx F_e(z_0) + F_e'(z_0)(z - z_0)$ donde z_0 es la posición de reposo de la micropalanca en

[3] En el sentido riguroso tenemos dos condensadores en serie: la molécula y la atmósfera gaseosa que existe entre punta y molécula. Si la molécula es conductora el sistema se reduce a un único condensador entre punta y molécula.

presencia de la fuerza de interacción. Se puede demostrar que en este caso la nueva frecuencia de resonancia es[4]:

$$\omega_0{}' = \omega_0 \sqrt{1 - \frac{F_e'(z_0)}{K}} \tag{2-4}$$

Ya que el valor de la constante de fuerza efectiva de la micropalanca $F'(z_0)$ es en general mucho menor que el valor de la constante nominal K entonces podemos aproximar la Ec. 2-4 por:

$$\omega_0{}' \approx \omega_0 \left(1 - \frac{1}{2K} F_e'(z_0)\right) \tag{2-5}$$

con lo cual vemos que los cambios en la fuerza electrostática con la distancia originan un desplazamiento de la frecuencia de resonancia de la micropalanca hacia valores menores que su frecuencia de resonancia libre que vale:

$$\frac{\Delta\omega}{\omega_0} \approx -\left(\frac{1}{2K}\right)\frac{dF_e}{dz}\bigg|_{z_0} \tag{2-6}$$

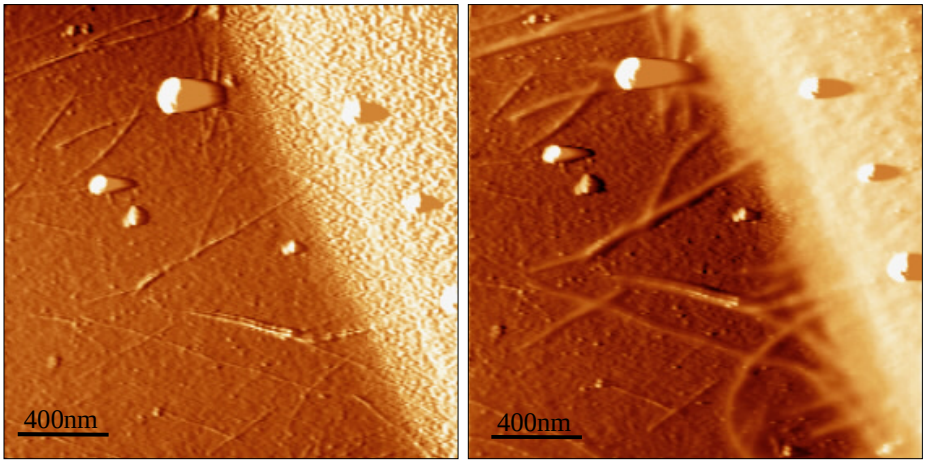


Figura 2.8. Experimento de la interacción electrostática sobre nanotubos de carbono. En la imagen de la izquierda aparecen nanotubos de capa simple distribuidos de manera aleatoria sobre un substrato de oxido de silicio y parcialmente cubiertos por un electrodo de oro ($U_{punta\text{-}muestra}$=0). En la imagen de la derecha tenemos una diferencia de potencial de 2 V entre la punta y el electrodo de oro. Como consecuencia de la interacción electrostática los nanotubos parecen engordar o brillar. (Imágenes de (de Pablo et al. 2001))

[4] Para una descripción más detallada ver (San Paulo. 2002)

Al sacar a la micropalanca de su frecuencia de resonancia natural se produce una disminución de la amplitud (ver Fig.1.6) y puesto que el sistema de realimentación debe mantener la amplitud constante, el sistema reacciona retrayendo el piezoeléctrico y separando la punta de la muestra para recuperar el valor de amplitud de oscilación prefijado. Como la distancia media entre la punta y la muestra aumenta, se produce una perdida en resolución que se traduce en un efecto topográfico en las imágenes: las moléculas conectadas al electrodo de oro parecen aumentar de tamaño, engordar o *brillar*. Este efecto es claramente visible sobre nanotubos de carbono (Fig.2.8).

Es importante notar que en este experimento la punta nunca llega a tocar la superficie. Es por tanto un método no-invasivo. Si las moléculas fueran aislantes, éstas no se cargarían y en consecuencia no habría desplazamiento en la frecuencia de resonancia, no habría cambio en amplitud de oscilación de la micropalanca, no habría cambio en la distancia media punta-muestra y finalmente ningún cambio en la imagen topográfica.

2.5.1. Experimento electrostático sobre ADN

El experimento realizado sobre nanotubos de carbono se repitió sobre muestras de ADN de cadena aleatoria (λ-ADN) y de secuencia definida Poly(dG)-Poly(dC). En la Fig.2.9 se muestra el experimento realizado sobre este último tipo de moléculas. En la imagen de la izquierda podemos ver una representación tridimensional del escalón de oro y de las moléculas de ADN que se encuentran parcialmente cubiertas por él. En esta imagen no se ha aplicado ninguna diferencia de potencial entre la punta y la muestra. En la imagen de la derecha se aplica una diferencia de potencial de 1.8 V, valor suficiente para perder la resolución en el electrodo de oro pero no en la molécula de ADN cuya imagen topográfica permanece inalterada.

Este experimento demuestra que el fenómeno de *engorde* que sufren los nanotubos (Fig. 2.8) no ocurre en el ADN (Fig.2.9), sugiriendo que estas moléculas poseen una resistividad del orden de la del substrato en el que están adsorbidas.

Quedaba sin embargo realizar el experimento electrostático sobre CNT y ADN conjuntamente. Para ello es necesario adsorber en la misma superficie ambas moléculas. Estos experimentos se detallan en la sección próxima.

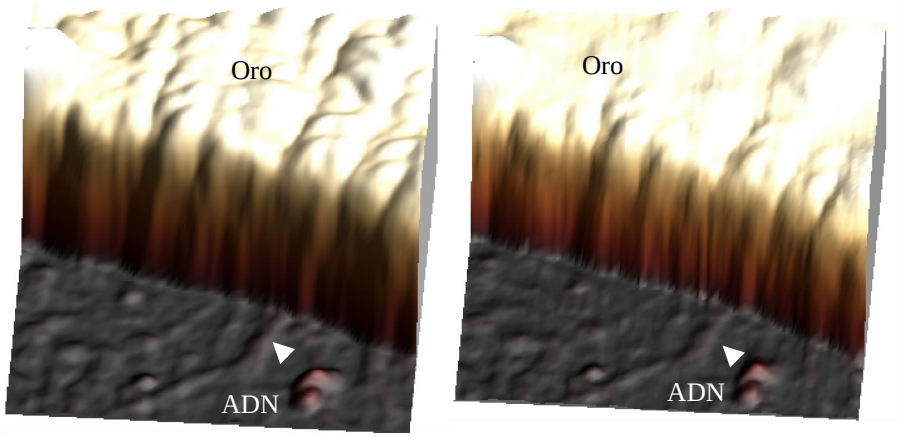


Figura 2.9. Moléculas de ADN de secuencia Poly(dG)-Poly(dC) adsorbidas sobre mica y parcialmente cubiertas por un electrodo de oro. En la imagen de la izquierda no se aplica ninguna diferencia de potencial entre punta y muestra, mientras que en la de la derecha hay aplicados 1.8 V entre la punta y el electrodo de oro. Se aprecia una pérdida de resolución en el oro mientras que las moléculas de ADN no sufren ninguna alteración.

2.5.2. Experimento electrostático sobre ADN y nanotubos

Para adsorber conjuntamente CNT y moléculas de ADN usamos el protocolo descrito en la sección 2.3.2, es decir empleamos la molécula APTES para cargar positivamente la superficie de la muestra. El protocolo de preparación de los CNT está compuesto de los siguientes pasos: en primer lugar deben ser tratados con SDS[5] u otro surfactante para cargar su superficie negativamente, a continuación se someten a ultrasonidos para separar los nanotubos entre si y finalmente se centrifugan para decantar las partículas más pesadas[6]. En la Fig.2.10 se muestran imágenes de AFM en las que aparecen moléculas de ADN y nanotubos de carbono adsorbidos sobre distintos substratos: mica, vidrio y zafiro. Ambas moléculas son fácilmente distinguibles por su aspecto además de por su altura ya que los nanotubos presentan una altura de 1.4 nm frente a los 0.8 nm del ADN.

Una vez co-adsorbidas ambas moléculas se realizó la evaporación de oro y se repitió el experimento electrostático descrito en la sección anterior. El resultado del experimento se ilustra con las imágenes de la Fig.2.11. En esta figura se puede ver una molécula de ADN y un CNT adsorbidos sobre un substrato aislante y

[5] SDS o Sodium Dodecyl Sulfate (Sigma L-4522)

[6] La disolución con CNT fue suministrada por Mª Teresa Martínez (Ins. Carboquímica, Zaragoza)

parcialmente cubiertos por una película de oro. La imagen de la izquierda se tomo en ausencia de voltaje entre punta y muestra y la de la derecha con una diferencia de potencial de 3 V. A partir de las imágenes se puede ver que mientras los nanotubos presentan un aumento de las dimensiones topográficas como era previsible, las moléculas de ADN no presentan ningún cambio en la imagen topográfica. Esto significa que las cargas libres presentes en el oro no han pasado a la molécula de ADN, lo que implica que la conductividad DC del ADN es despreciable.

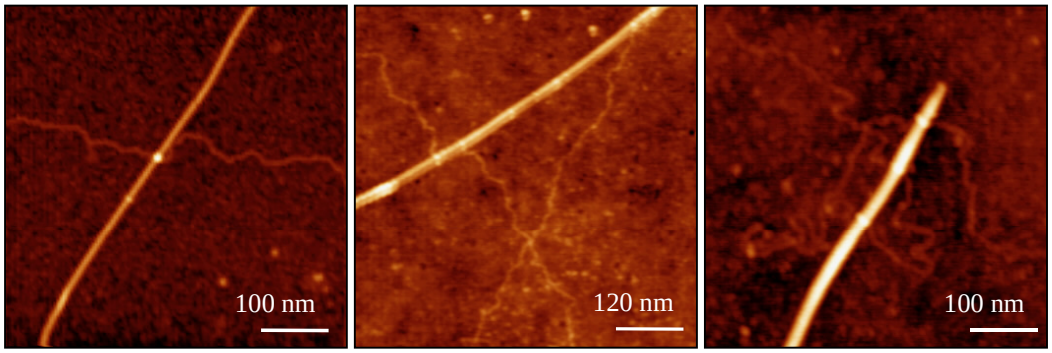


Figura 2.10. Imágenes de AFM de nanotubos y moléculas de ADN co-adsorbidas sobre distintos susbtrados (de izquierda a derecha: mica, vidrio y zafiro)

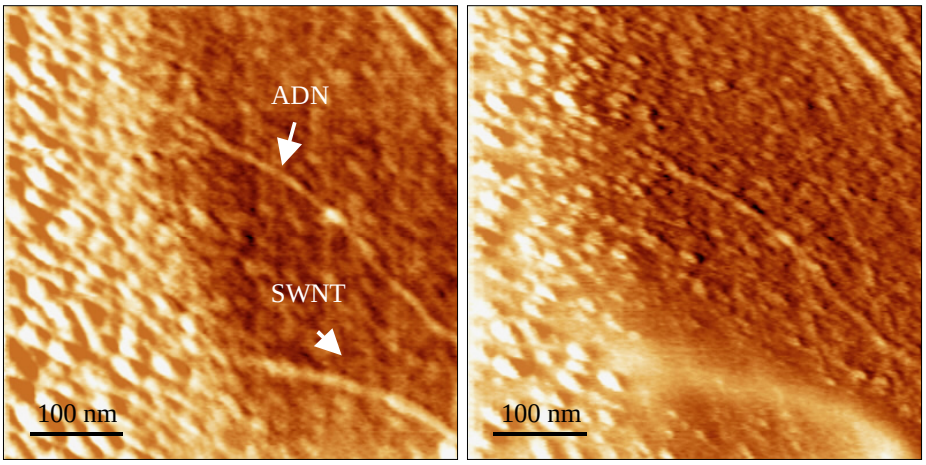


Figura 2.11. Experimento electrostático sobre ADN y nanotubos co-adsorbidos sobre mica y parcialmente cubiertos con oro. En la parte de la izquierda no hay aplicada ninguna diferencia de potencial entre la punta y la muestra y en la derecha se aplican 3 V. Las conclusiones que se desprenden de las imágenes es que mientras el nanotubo presenta un aumento de tamaño debido a la interacción electrostática las moléculas de ADN no presentan contraste alguno.

La electrostática trata sobre sistemas de cargas en equilibrio. En un conductor el equilibrio electrostático se alcanza mucho antes del tiempo típico de adquisición de una imagen de AFM, que es aproximadamente de 3 min. En este contexto cuando tomamos una imagen de un nanotubo, según el dispositivo experimental descrito en secciones precedentes, lo que estamos es tomando una imagen de un sistema en equilibrio electrostático. Las cargas pasan del electrodo al CNT hasta que el potencial electrostático de éste iguala al del electrodo, y el tiempo en el que esto se produce, *tiempo de relajación* τ, ($\tau = \varepsilon/\sigma$ con ε la permitividad del medio y σ la conductividad) es muy pequeño. Para un conductor típico como el cobre $\varepsilon \approx \varepsilon_0$ y $\sigma \approx 5.8\text{x}10^7\ \Omega^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ con lo que $\tau \approx 10^{-19}$ s (Wangsness. 1999). Para un nanotubo de carbono se mide una resistencia de 100 kΩ para una longitud de 1 μm (de Pablo et al. 2002). Esto significa que $\sigma_{CNT} \approx 0.5\text{x}10^7\ \Omega^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ con lo que $\tau \approx 10^{-18}$ s. Si en lugar de una molécula con una buena conductividad eléctrica, como es el caso del CNT, tenemos otra con una conductividad mala pero no nula, lo que ocurre es que el tiempo de equilibrio electrostático puede ser muy grande. En esta situación, si el aislante sobre el que se adsorben las moléculas fuera perfecto, entonces deberíamos ser capaces de ver, a medida que se toma una imagen de AFM con un voltaje bias aplicado, cómo la molécula presenta contraste electrostático a medida que las cargas pasan lentamente por ella. La situación real es que este efecto de carga nunca fue observado en nuestros experimentos lo que indica que las cargas se pierden o bien por el substrato o bien por el medio ambiente que rodea a la molécula. Ya que no se ve ningún contraste electrostático entre el ADN y el substrato concluimos que las moléculas de ADN presentan una resistividad comparable a la del substrato. Para el caso del vidrio, uno de los substratos usados, ésta es de $10^{12}\ \Omega\cdot\text{cm}$.

Este experimento muestra por primera vez una medida electrostática sobre CNT y ADN co-adsorbidos sobre el mismo substrato, lo que permite la comparación directa de las propiedades eléctricas de ambas moléculas. Además, este experimento se caracteriza por que no hay contacto entre punta y muestra, eliminando cualquier argumento sobre la calidad del contacto. (Gómez-Navarro et al. 2002a; Gómez-Navarro et al. 2002b)

2.6. Búsqueda de otros conductores moleculares basados en ADN

Con el paso del tiempo la comunidad científica parece que ha aceptado que el ADN en su forma natural se comporta como un aislante cuando se encuentra adsorbido en una superficie. Sin embargo, las características naturales tan excepcionales que presenta la molécula tales como gran longitud y pequeño diámetro, sumadas a todo el conocimiento que se tiene sobre el manejo y la manipulación de ADN, hace que la comunidad científica sea reacia a abandonar su estudio y en la actualidad la investigación se orienta a la construcción de hilos moleculares basados en la estructura de esta biomolécula.

El primer trabajo realizado en este sentido usaba la estructura física del ADN como soporte donde adsorber clusters de átomos de plata. Este nuevo hilo molecular de piel de plata y corazón de ADN presenta características conductoras (Braun et al. 1998) pero tiene el inconveniente de tener grandes dimensiones (diámetro ~100 nm).

Otras estrategias más sofisticadas se basan en la modificación química de la molécula con el fin de cambiar sus propiedades eléctricas. En este sentido se construyó el denominado ADN-G4 o hilos de Guaninas. ADN-G4 es un ácido nucleico de estructura helicoidal en la que se disponen 4 Guaninas que se unen mediante puentes de hidrógeno (Marsh et al. 1995). Para la formación de este tipo de ADN es necesario la presencia de cationes metálicos monovalentes y/o divalentes que se colocan en la parte central del hilo molecular.

Otro tipo de hilo molecular basado en ADN es el *M*-ADN, del que me ocuparé durante el resto del capítulo.

2.7. El *M*-ADN

El *M*-ADN se describe por primera vez en 1993 (Lee et al. 1993) como un cambio conformacional cooperativo inducido por iones divalentes. Curiosamente, sus creadores no vieron su potencial como conductor molecular hasta 1999 en el que Aich et al. (Aich et al. 1999) presentaron al *M*-ADN como un conductor molecular.

En este experimento estudiaban fragmentos de hasta 54 pb (~18 nm) en los que habían modificado los extremos con dos moléculas fluorescentes: rodamina y fluoresceina. Estas dos moléculas se caracterizan por que la primera es capaz de aceptar electrones (aceptor) y la segunda de donarlos (donor). Lo que observaron fue que la fluorescencia de la fluoresceina desaparecía solamente cuando en el otro extremo se encontraba la rodamina y se empleaba el ADN modificado. En teoría la desaparición de la fluorescencia del sistema fluoresceina-rodamina sólo puede ocurrir o por transferencia electrónica o mediante FRET (Fluorescen Resonance Energy Transfer). Ya que FRET tiene una dependencia con la distancia de la forma $1/r^6$ se consideró que este posible mecanismo era altamente improbable ya que la longitud de las moléculas era de ~18 nm (Cheung. 1991). Por estos motivos atribuyeron la desaparición de la fluorescencia a un proceso de transferencia electrónica entre las bases del ADN modificado.

El ADN modificado descrito en (Lee et al. 1993; Aich et al. 1999) presenta las siguientes características:

- El ADN en forma β (β-ADN) incorpora los iones metálicos Co^{2+}, Ni^{2+} y Zn^{2+} a pH por encima de 8 (pH alcalino) y se le denomina *M*-ADN[7].
- El ADN en forma β no incorpora Mg^{2+} ni Ca^{2+} bajo las mismas condiciones.
- El proceso de formación presenta histéresis: el *M*-ADN es estable a bajo pH durante horas.
- El *M*-ADN no incorpora bromuro de etidio, y presenta la misma movilidad electroforética que el β-ADN.
- El proceso de fabricación de *M*-ADN es reversible a β-ADN si se añade EDTA.

Y, por supuesto, según Aich et al., presenta un comportamiento de conductor molecular.

En cuanto a la estructura exacta del *M*-ADN todavía se desconoce, ya que no se ha publicado hasta la fecha ningún trabajo en el que se muestre la estructura

[7] El ADN en forma β es la estructura conformacional del ADN más común, en la que el apareamiento de las bases sigue el modelo de Watson y Crick y la distancia entre bases sucesivas es de 0.34 nm y el diámetro de la molécula de 2 nm.

cristalina de la molécula obtenida por NMR o Rayos X. El modelo propuesto por Aich et al. consiste en la presencia de un átomo de Ni o Co por cada par de bases, A·T y C·G, y dispuesto entre ellas, tal y como se muestra en la Fig.2.12. La molécula modificada presenta una parte central positiva y por esta razón este tipo de molécula no intercala bromuro de etidio. La distancia media entre los iones metálicos es de 4 Å.

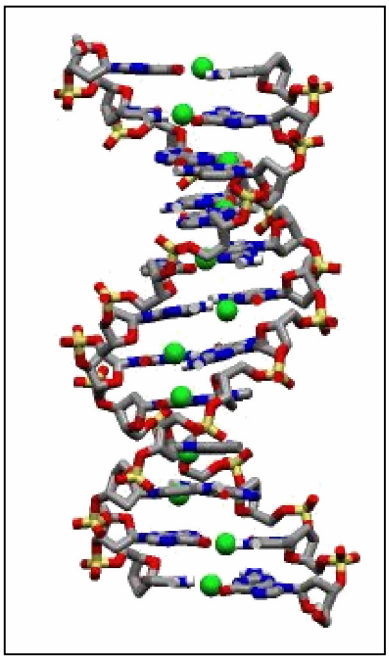


Figura 2.12. Modelo de M-ADN. La molécula presenta una estructura muy parecida a la de β-ADN, con un apareamiento de las bases Watson-Crick. Un átomo metálico se intercala entre ellas de forma que la distancia media entre ellas es de 4 Å.

2.8. Fabricación de *M*-ADN[8]

En este apartado describiré con detalle el procedimiento para crear moléculas de ADN modificadas con iones de Ni^{2+} y Co^{2+}. Para aquellos que no esten familiarizados con técnicas básicas de visualización y manejo de ADN les remito al Anexo A.6.

Una de las características que según Lee et al. posee el *M*-ADN es que no es capaz de intercalar bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una molécula que se intercala al β-ADN y que emite luz en el visible cuando se la ilumina con luz

[8] El protocolo de fabricación de *M*-ADN se desarrolló durante una estancia en el laboratorio del Prof. F. Moreno en el Dep. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo.

ultravioleta. Por tanto una característica del *M*-ADN es que es invisible cuando se coloca sobre un transiluminador de luz ultravioleta. Esta será la huella que nos indicará si hemos conseguido fabricar *M*-ADN.

La búsqueda de un protocolo de fabricación requiere habitualmente mucho trabajo y supone un gran consumo de tiempo y dinero. A lo largo de esta sección describiré los diferentes pasos para construir el protocolo de fabricación de este ADN modificado con iones metálicos.

A partir de las características del *M*-ADN descritas por Aich et al. elaboramos un protocolo modelo de la siguiente forma:

1. Preparar soluciones de $CoCl_2$, $NiCl_2$ y $ZnCl_2$. Las disoluciones de Co y de Ni presentan un pH entre 6 y 7, mientras que el $ZnCl_2$ sólo se disuelve a pH básico, lo que significa que a valores altos de pH tenemos un precipitado de Zn[9].
2. Las disoluciones de los metales se añaden al ADN disuelto en un tampón estándar (1xTris-Borato, pH 8.5 sin EDTA).
3. Se añade KOH (pH 9) para reajustar el valor de pH por encima de 8.5.
4. Se deja un tiempo a temperatura ambiente.
5. Se hace un ensayo de fluorescencia de bromuro de etidio en una electroforesis en gel de agarosa.

Queda por tanto ajustar las incógnitas del protocolo modelo respondiendo a las preguntas siguientes: ¿cuál es la concentración de los metales que hay que usar? ¿cuál es el pH óptimo para la fabricación de *M*-ADN? ¿cuánto tiempo debe durar la reacción? ¿es estable el producto con el tiempo? ¿es reversible la reacción cuando se añade EDTA? ¿cuál es el aspecto físico del ADN modificado? Y finalmente, ¿presenta comportamiento de conductor molecular? A lo largo de las siguiente secciones intentaré responder a todas estas preguntas y elaborar un protocolo detallado.

[9] Debido a la precipitación de Zn a valores altos de pH, requisito éste último necesario para fabricar *M*-ADN, decidimos centrarnos en la producción de *M*-ADN con cobalto y niquel.

2.8.1. Concentraciones de Ni^{2+} y Co^{2+}

El experimento realizado para determinar las concentraciones de $NiCl_2$ y $CoCl_2$ para fabricar *M*-ADN consiste en preparar una serie de reacciones en las que se incluye: el β-ADN que se quiere modificar, las sales a diferentes concentraciones y una cantidad de KOH determinada para mantener el pH por encima de 8.5 (en este experimento fue de 45 mM). El tiempo de reacción fue de 45 min a temperatura ambiente. Las diferentes reacciones se visualizan mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. El resultado del experimento se ilustra en las fotografías tomadas del gel (Fig.2.13 y Fig.2.14).

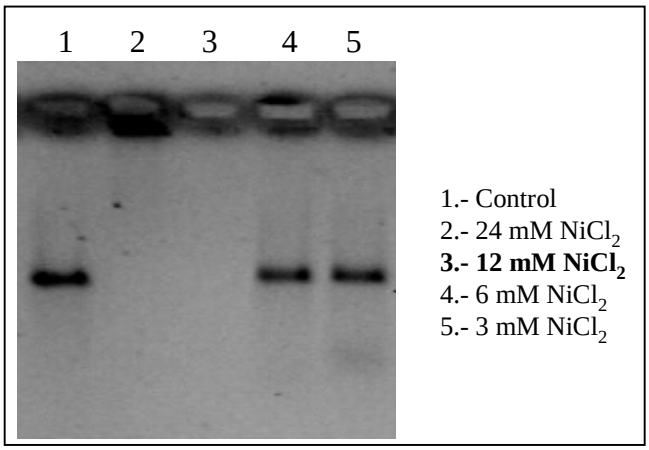


Figura 2.13. Electroforesis en gel de agarosa en la que se muestra el experimento para determinar la concentración de Ni necesaria para fabricar M-ADN. Usando una concentración típica de 12 mM de $NiCl_2$ la banda de ADN desaparece.

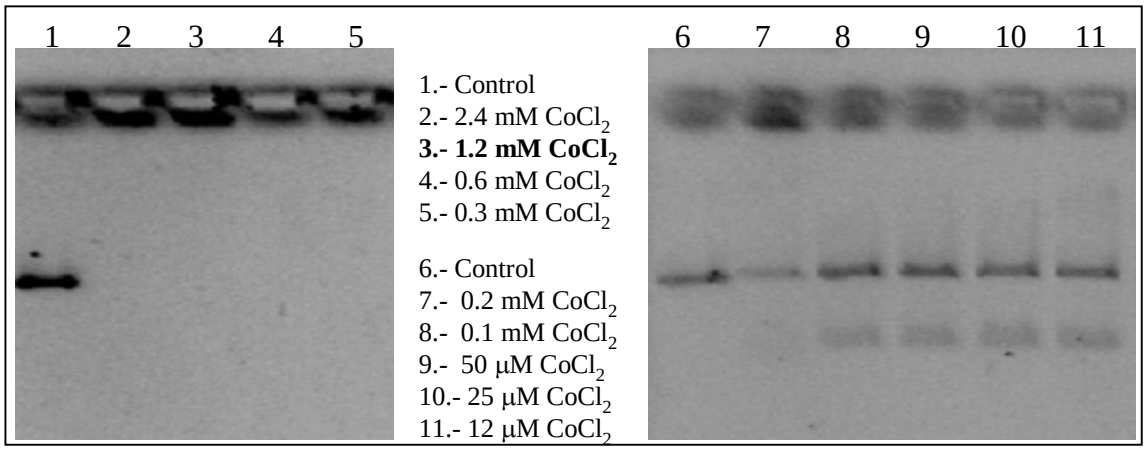


Figura 2.14. Electroforesis en gel de agarosa en la que se muestra el experimento para determinar la concentración de Co necesaria para fabricar M-ADN. En este caso la banda desaparece usando una concentración típica de 1.2 mM de $CoCl_2$.

La primera conclusión que se observa es que hay ciertas bandas que no se ven en la fotografía del gel (calles 2 y 3 de la Fig.2.13 y calles 2-5 de la Fig.2.14). Ésta es precisamente la huella que nos indica la formación de *M*-ADN. Determinar la concentración de sales es entonces sencillo, ya que a partir de una concentración umbral la banda de ADN vuelve a aparecer. Esta concentración ocurre aproximadamente para 15 mM de $NiCl_2$ y para 1.5 mM de $CoCl_2$. Vemos por tanto que se necesita un orden de magnitud menos en la concentración de cobalto que de níquel para producir el mismo efecto en el ADN. Estos resultados están de acuerdo con los publicados previamente (Aich et al. 1999). Otra conclusión importante es que, a primera vista, la reacción se produce en tan sólo 45 min. y añadiendo 45 mM KOH (pH 9). En la siguiente sección analizaremos el papel del pH a la hora de la producción de *M*-ADN.

2.8.2. Influencia del pH, tiempo de reacción y estabilidad

El protocolo descrito en la sección 2.8 supone añadir una determinada cantidad de KOH (pH 9) para subir el pH de la reacción (paso 3). Para estudiar la influencia del pH en la reacción medimos el pH final según la cantidad de KOH que añadíamos. Los resultados, tanto para el Ni^{2+} como para Co^{2+}, se muestran en las Fig.2.15 y 2.16 respectivamente.

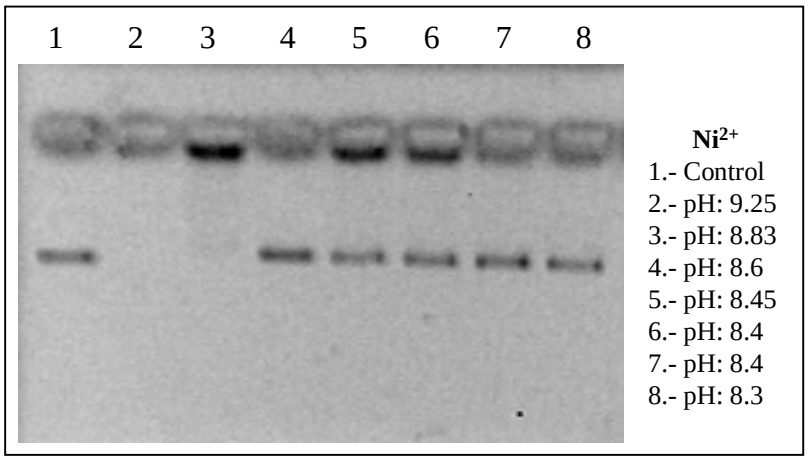


Figura 2.15. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la influencia del pH en la reacción de producción del M-ADN con Ni^{2+}. La banda de ADN desaparece siempre que se mantenga el pH por encima de 8.6.

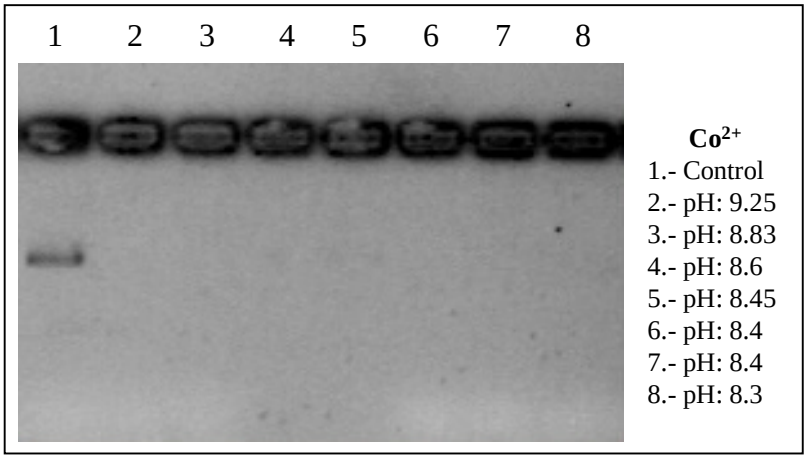


Figura 2.16. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la influencia del pH en la reacción de producción de M-ADN con Co^{2+}. En este caso la banda de ADN desaparece siempre que se mantenga el pH por encima de 8.3.

Estos experimentos revelan que la producción de *M*-ADN ocurre a pH mayor para el caso del níquel que para el caso del cobalto. En cuanto al tiempo de reacción y estabilidad realizamos experimentos en los que variábamos el tiempo de reacción y a continuación evaluábamos en un gel de agarosa la presencia o no de bandas de ADN. Estos experimentos mostraron un tiempo mínimo de 30-45 min. Las muestras preparadas de *M*-ADN permanecen estables varios días a 4°C, aunque a medida que pasa el tiempo se observan mayores agrupamientos de las moléculas (como se muestra en imágenes de AFM en secciones posteriores) y precipitación. Por esta razón es aconsejable la preparación de la muestra en el mismo instante en que se vaya a utilizar. El proceso de fabricación de *M*-ADN lleva aproximadamente 2 h.

2.8.3. Reversibilidad de la reacción

Otra de las cuestiones importantes era saber si esta reacción era reversible, es decir si podíamos controlar la producción de β-ADN a *M*-ADN y viceversa. Trabajos previos mostraban que al añadir EDTA la reacción era reversible. El EDTA es una molécula que se une a iones divalentes. Ya que muchas reacciones necesitan la presencia de este tipo de iones libres en solución, como es el caso del Mg^{2+}, el EDTA se usa en general para inhibir reacciones que involucren la presencia de iones divalentes. El experimento ideado consistió en producir *M*-ADN según el protocolo descrito en la sección 2.8 usando las concentraciones de sales

y de KOH correctas. A continuación se añade 5 μl de Ni o Co-*M*-ADN a 20 μl de un tampón 90 mM Tris-borate, 150 mM EDTA (pH 8.5), se deja reaccionar durante 45 min. y se visualiza en un gel de agarosa que contiene bromuro de etidio. Los resultados se muestran en la Fig.2.17.

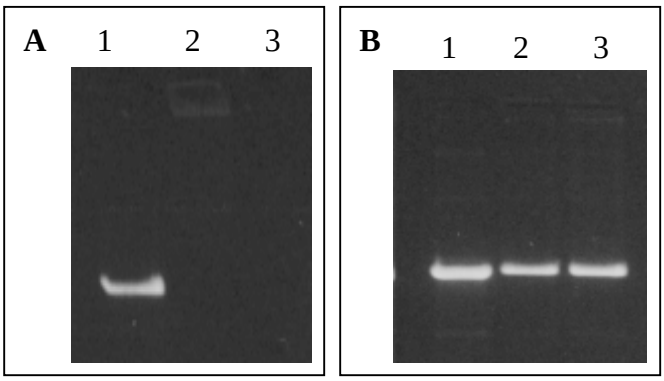


Figura 2.17. Electroforesis en gel de agarosa que muestra el estudio de la reversibilidad de la reacción de producción de M-ADN según la presencia o no de EDTA. En (A) se muestra el experimento típico de producción de M-ADN. Las calles 2 y 3 correspondientes a Ni-M-ADN y Co-M-ADN no aparecen en la fotografía del gel. En la parte B se muestra el mismo experimento pero se ha añadido EDTA a la muestra hasta una concentración final de 120 mM. Como se puede observar el ADN recobra su movilidad normal correspondiente a la forma β.

Como podemos comprobar a partir de la Fig.2.17, la producción de *M*-ADN es un proceso reversible al añadir EDTA en las concentraciones antes descritas.

Los experimentos descritos en estas secciones muestran que bajo la presencia de ciertas condiciones (concentraciones de sal, pH etc...) la banda de ADN que debería aparecer en una electroforesis en gel de agarosa no aparece. Esto puede ser debido a varias razones: puede ocurrir que la presencia de estos iones cargue al ADN de manera positiva y entonces migre en sentido contrario, también podría ocurrir que el ADN modificado no consiga entrar en la matriz del gel o que simplemente no intercale bromuro de etidio como se apuntó en trabajos previos. El experimento descrito en la sección siguiente está orientado a responder estas cuestiones.

2.8.4. El experimento radioactivo

Una de las preguntas obvias que uno se hace a la vista de los resultados descritos en secciones precedentes es ¿dónde está el ADN modificado que no es

visible en el gel? Está claro que la técnica para visualizar el ADN basada en la fluorescencia de bromuro de etidio no es válida. En este caso la técnica que empleamos se basa en el marcaje del ADN que se quiere visualizar mediante un isótopo radioactivo (α-^{32}P). Este isótopo radioactivo del fósforo es muy utilizado en los laboratorios de bioquímica y biología molecular debido al rápido decaimiento de su actividad radiactiva con el tiempo y la facilidad para la descontaminación de los productos que han estado en contacto con él.

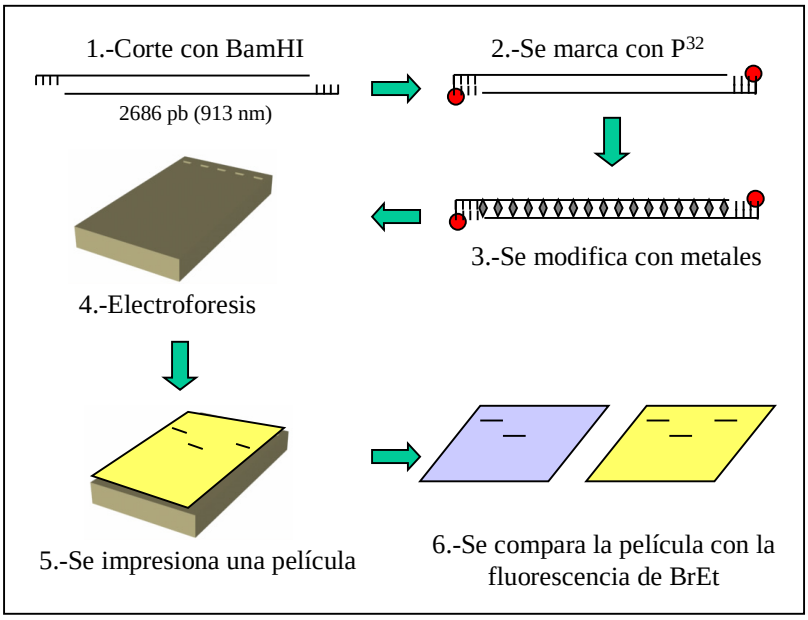


Figura 2.18. Esquema que muestra el experimento radioactivo orientado a la búsqueda del ADN modificado cuando se somete a una electroforesis en gel de agarosa.

El experimento está descrito en la Fig.2.18. Partimos de un ADN plasmídico de 2686 pb (pUC18) (Sigma-D-4154). A continuación lo cortamos con el enzima de restricción *Bam*HI (Sigma-R-0260) y obtenemos dos extremos con 4 bases de ADN de cadena simple no apareadas. Luego mediante una reacción de *filling* marcamos radiactivamente estos extremos con la ayuda del fragmente Klenow de la ADN Polimerasa I y el nucleótido radioactivo (α-^{32P})dCTP. Cada molécula de ADN marcada contiene dos átomos de fósforo radioactivo. Una vez marcadas las moléculas se realiza la reacción de producción del *M*-ADN y se corre un gel de agarosa exactamente igual a como se hizo anteriormente, sólo que omitimos el paso final en el que teñimos el gel con bromuro de etidio. Lo que hacemos para visualizar las moléculas marcadas es usar una película fotográfica en la que queda

impresionada la radioactividad. La película la comparamos con la fotografía del gel de agarosa. Este resultado se muestra en la Fig.2.19.

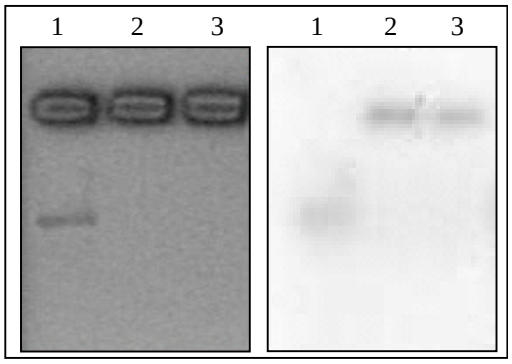


Figura 2.19. Resultado del experimento radioactivo descrito en la figura anterior. En la imagen de la izquierda se muestra la fotografía de la fluorescencia de bromuro de etidio del gel de agarosa. Como ya se mostró las bandas correspondientes a las especies modificadas de ADN con Ni (calle 2) y Co (calle 3) no aparecen. En la imagen de la derecha se muestra la impresión radioactiva de una película fotográfica. Las bandas correspondientes al M-ADN aparecen en la parte superior, es decir el ADN modificado no entra en la matriz del gel de agarosa.

El experimento radioactivo presentado en esta sección nos proporciona valiosa información concerniente al ADN modificado. Nos muestra claramente que el *M*-ADN no penetra en la matriz del gel de agarosa quedándose en el pocillo en el cual se depositó al principio. El resultado mostrado en la Fig.2.19 se puede explicar de dos maneras: o bien el *M*-ADN ha perdido su carga y entonces no se ve afectado por el campo eléctrico externo o bien la razón por la que no entra en el gel es porque no cabe por el tamaño del poro. El tamaño del poro de un gel de agarosa de 0.8% es de aproximadamente 50 nm (Rebecca et al. 1995). Si esta última es la verdadera razón, el ADN modificado debería tener una estructura de decenas de nm. El resultado mostrado en la Fig.2.19 está en contradicción con los resultados de Aich et al. en dónde se afirmaba que el *M*-ADN tenía una movilidad electroforética muy similar a la del β-ADN

Hasta ahora hemos descrito al *M*-ADN mediante técnicas y argumentos puramente bioquímicos. Sabemos las concentraciones de sales así como las condiciones de pH y tiempo de reacción en las que modificamos el ADN. Sin embargo el viejo dicho popular “una imagen vale más que mil palabras” cobra aquí especial relevancia y en este contexto el microscopio de fuerzas puede

proporcionar información relevante que no es accesible mediante técnicas bioquímicas tradicionales. Sobre esta idea volveremos en el capítulo 4.

2.9. Caracterización topográfica del *M*-ADN

La primera diferencia del *M*-ADN con el β-ADN aparece en la preparación de las muestras para el AFM. Mientras que, como ya vimos, la adsorción del ADN se lleva a cabo a través de iones divalentes como el Mg^{2+} (ver Apto. 2.3.1), para adsorber *M*-ADN en mica no fue necesario añadir ningún tipo de ion divalente. Este hecho muestra que las moléculas de *M*-ADN presentan ya una carga positiva, y por tanto debemos descartar el tema de la carga como una de las posibles causas de que no entrase en el gel de agarosa.

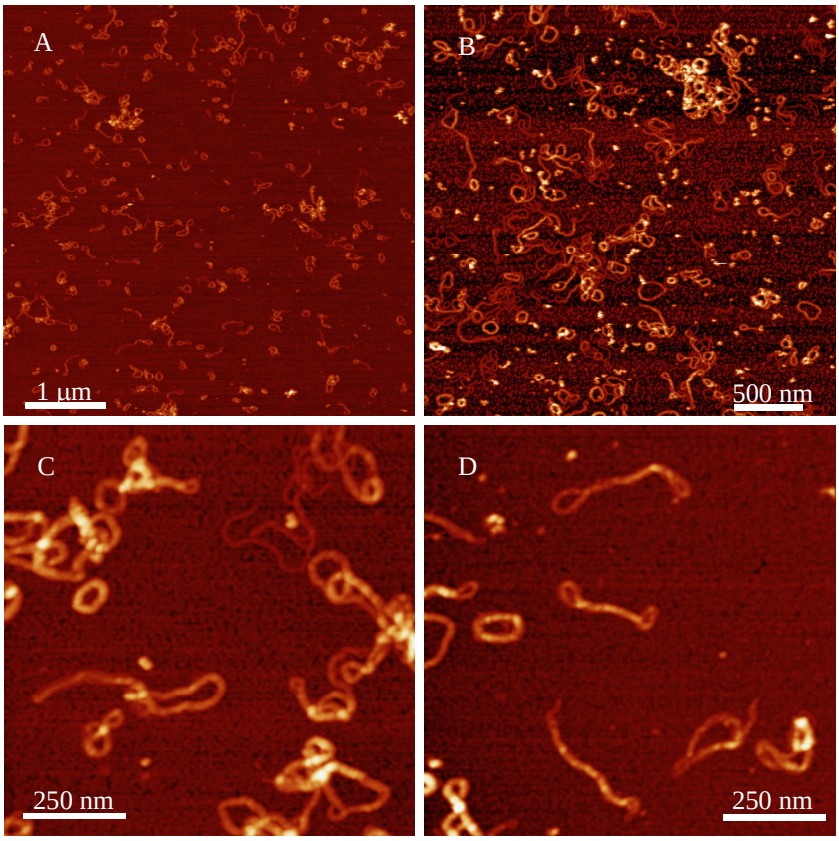


Figura 2.20. Imágenes de AFM de M-ADN sobre mica. Las moléculas de ADN modificado presentan un aspecto muy distinto al de las moléculas de ADN normal (ver Fig.2.1 para comparar).

La Fig.2.20 muestra un conjunto de imágenes de AFM tomadas usando los parámetros descritos en el Apto. 1.4 en modo DAFM. En primer lugar vemos que las moléculas de *M*-ADN, tanto las modificadas con Co^{2+} como las modificadas con Ni^{2+}, presentan un aspecto muy distinto al de las moléculas típicas de ADN. En la Fig.2.20 se muestra el aspecto del ADN modificado con cobalto (A) y con níquel (B-D). En este experimento en concreto la longitud de las moléculas de ADN en forma B es de 10667 pb (3.6 μm), sin embargo la longitud de las moléculas que aparecen en las imágenes es muy variable, aunque nunca por encima de 600-700 nm. La primera conclusión que vemos es que el *M*-ADN es mucho más corto que el ADN en forma β.

El segundo aspecto relevante se refiere a la altura de las moléculas (Fig.2.21). La altura de las moléculas de *M*-ADN es mucho mayor que la altura del ADN en forma β. Como ya vimos la altura del ADN adsorbido en una superficie y medido con el AFM se encuentra en torno a 0.8 nm. Las moléculas de *M*-ADN presentan una altura entre 5 y 6 nm y por lo tanto casi un orden de magnitud mayor (Moreno-Herrero et al. 2003).

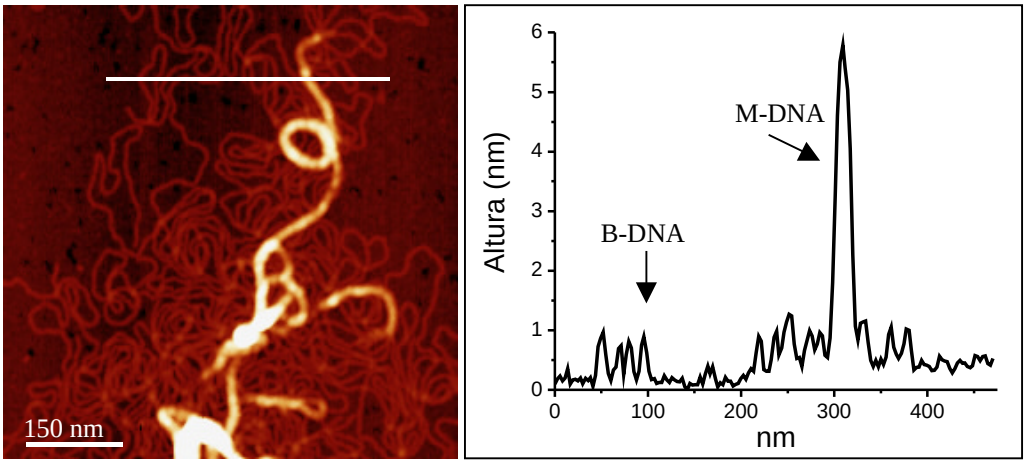


Figura 2.21. El M-ADN presenta una altura de 6 nm, casi un orden de magnitud mayor que la altura del ADN normal.

Debemos añadir aquí que el experimento bioquímico en el que se comprobaba la reversibilidad de la reacción al añadir EDTA fue comprobado también mediante AFM. En este caso, las imágenes de AFM de *M*-ADN tratado con EDTA muestran moléculas de alturas en torno a 0.8 nm, demostrando así la

reversibilidad del proceso no solo bioquímicamente (Fig.2.17) sino también con el AFM.

En resumen, las imágenes de AFM de *M*-ADN nos muestran que el ADN en forma β, cuando se trata con ciertos metales y en ciertas condiciones, sufre un fenómeno de condensación por el cual la longitud de las moléculas se reduce aproximadamente en un factor 5 y la altura de las mismas aumenta en casi un factor 10. Precisamente, la posible condensación del ADN había sido descartada en trabajos previos, ya que veían que la movilidad electroforética del ADN modificado era la misma que la del ADN sin modificar. En aquellos experimentos el tamaño máximo de las moléculas empleadas era de 154 pb (52 nm), con lo cual aunque se produjera condensación la longitud de las moléculas sería de tan sólo de 10 nm, tamaño éste suficientemente pequeño como para poder penetrar en el gel. El tamaño de las moléculas empleadas en los experimentos relatados en secciones precedentes es de varios miles de pares de bases. Nuestra conclusión, por tanto, es que la condensación de estas moléculas origina estructuras que no caben por el poro del gel de agarosa.

2.10. Experimentos de conductividad en *M*-ADN

Una vez terminada la caracterización y desarrollados los protocolos de fabricación del *M*-ADN decidimos repetir los experimentos de conductividad realizados sobre λ-ADN. Para ello se evaporó un electrodo de oro sobre una muestra de moléculas de *M*-ADN adsorbidas sobre mica. Como ya vimos la longitud de las moléculas de *M*-ADN se reduce a pocos cientos de nm. En este sentido es esencial que la longitud de la intercara oro-mica sea lo más pequeña posible. El experimento electrostático (ver Apto. 2.5) realizado sobre *M*-ADN se muestra en la Fig.2.22.

Lamentablemente los experimentos realizados sobre *M*-ADN mostraron unos resultados idénticos a los encontrados sobre λ-ADN: ausencia de conducción. Como podemos ver en la Fig.2.22, el *M*-ADN no presenta ningún contraste electrostático, resultado éste compatible con que la molécula presenta una resistividad, al menos, del orden de la del substrato sobre el que están adsorbidas (Moreno-Herrero et al. 2003).

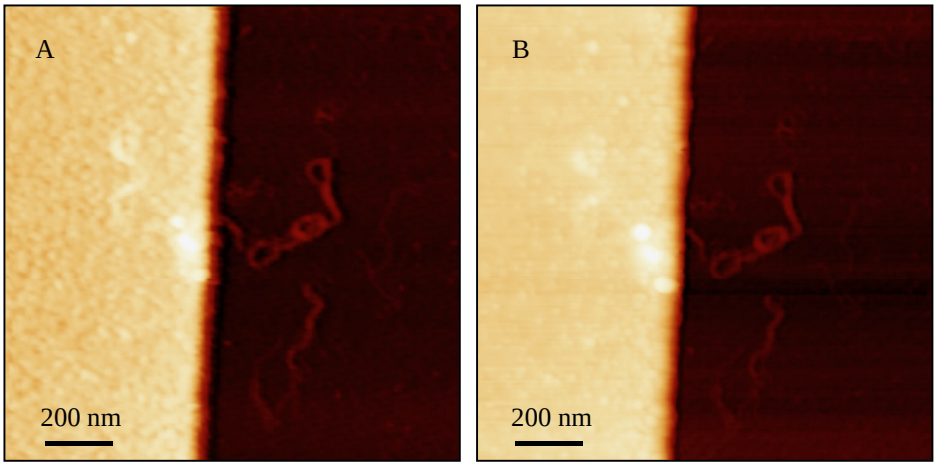


Figura 2.22. Experimento electrostático sobre M-ADN. La imagen de la izquierda se obtuvo aplicando 0 V entre punta y muestra. Las moléculas de M-ADN se observan parcialmente enterradas en el electrodo de oro. La imagen de la derecha se obtuvo aplicando un voltaje bias de 8 V. Como se puede observar, a pesar de que el oro pierde contraste debido a la interacción electrostática el M-ADN permanece inalterado.

Este resultado está por tanto en contradicción con los publicados por Aich et al. en los que defendían un comportamiento conductor de la molécula. En mi opinión asumir la posible condensación de la molécula en presencia de las condiciones de sales descritas puede explicar, por una parte la discrepancia de movilidades de las moléculas en un gel de agarosa (ver secciones precedentes), y por otra parte la conductividad. Al condensarse la molécula la distancia entre los fluoroforos: fluoresceina y rodamina se acorta enormemente lo que permite la transferencia de energía por FRET.

2.11. La conductividad del ADN: una visión en perspectiva

Posiblemente ahora, a finales del año 2002, sea posible relatar y describir la secuencia de acontecimientos relacionados con el fascinante tema de la conductividad del ADN. Debemos remontarnos casi 10 años, a 1993 o incluso antes. Por entonces, hacía ya 8 años que se inventó el STM y la técnica ya es accesible a varios laboratorios. Entre una de las aplicaciones inmediatas surge la visualización de moléculas biológicas y entre ellas el ADN. Sin embargo la visualización de las moléculas de ADN es extraordinariamente difícil debido a las pobres cualidades conductoras (Salmeron et al. 1990; Garcia et al. 1992; Dunlap et al. 1993). En ese mismo año, aparece publicado un trabajo en el que describen la fabricación

de un tipo de ADN, *M*-ADN, que intercala iones metálicos (Lee et al. 1993). Sin embargo, no se hace ninguna mención a las posibles características conductoras de esta nueva especie de ADN. Nos encontramos en 1994, estamos viviendo el *boom* de las microscopías de campo cercano en biología, especialmente con ADN. Se consiguen resolver complejos ADN-proteína, se siguen procesos biológicos en tiempo real etc... y también se consiguen ver moléculas de ADN con el microscopio de efecto túnel (Guckenberger et al. 1994). En este trabajo se dice explícitamente que es posible obtener imágenes de materiales aislantes como el ADN mediante la corriente túnel que se produce a través de la capa de agua absorbida en la superficie. Hasta entonces, no hay ninguna evidencia de que el ADN posee propiedades conductoras y por tanto no es interesante desde el punto de vista de aplicación tecnológica. Por otra parte, han pasado varios años desde el descubrimiento de los nanotubos (Iijima. 1991) y éstos son ya accesibles a un buen número de laboratorios en todo el mundo. A partir de 1995 se observa un crecimiento espectacular en cuanto al número de resultados usando nanotubos de carbono y se va forjando la idea de que la nueva era tecnológica debe emplear conductores y materiales de escala nanométrica como los nanotubos o quizás, el ADN. Pero como el ADN era aislante los trabajos se orientaron hacia el uso del mismo como molde para construir hilos conductores, como los que se describen en 1998 (Braun et al. 1998). Entonces se produce un acontecimiento que marcará la investigación en esta línea durante los años siguientes: la publicación el 1 de abril de 1999 en *Nature* del trabajo de Fink y Schonenberger (Fink & Schonenberger. 1999). Curiosamente sólo 18 días más tarde la revista *Journal of Molecular Biology* recibe un trabajo en el que se proclama el carácter conductor del *M*-ADN, 6 años más tarde de su invención. A partir de este momento una gran cantidad de investigadores comienzan a trabajar en el tema de la conductividad del ADN. La ganancia puede ser mucha si resulta que hemos estado equivocados durante años y la molécula biológica por excelencia es también el conductor molecular del futuro.

En nuestro laboratorio tardamos 2 semanas en darnos cuenta de que el ADN adsorbido en una superficie aislante no conducía. A partir de ese momento ha sido una lucha constante por defender nuestras ideas, a pesar de que fueran en contra de la tendencia del mercado. Mandamos un *comment* al artículo de Fink y Schonenberger de *Nature* pero éste fue rechazado aludiendo desinterés por el tema. También intentamos publicar nuestros resultados por dos veces en *Applied Physics Letters*. Esta vez el argumento fue que si el ADN no era conductor, éste no tenía

aplicación física. Ciertamente, pero ¿en ciencia debe prevalecer lo conveniente o por el contrario la realidad científica, aunque ésta no sea la más apropiada del momento? La situación era tremendamente frustrante ya que seguían apareciendo trabajos que defendían las propiedades eléctricas del ADN, en este caso semiconductoras, en revistas de alto nivel como *Nature* (Porath et al. 2000) o incluso en *Applied Physics Letters*, donde se nos había rechazado anteriormente (Cai et al. 2000). Afortunadamente, a raíz de la colaboración con el grupo del Prof. J.M. Soler conseguimos publicar en diciembre de 2000 en *Physical Review Letters* nuestros resultados. Sin embargo la publicación de este trabajo no cambió demasiado el espíritu de la comunidad científica y se siguieron publicando trabajos en contradicción con los nuestros como el firmado por Kasumov et al en *Science* en enero de 2001 (Kasumov et al. 2001) en el que se presentaba al ADN como superconductor, el de Rakitin et al en abril del mismo año (Rakitin et al. 2001) u otros (Watanabe et al. 2001; Yoo et al. 2001). Es importante señalar que simultáneamente a la publicación de todos estos trabajos aparecieron estudios teóricos que proponían diferentes mecanismos de conducción a lo largo de pocas bases. (Ratner. 1999; Conwell & Rakhmanova. 2000; Giese et al. 2001; Li & Yan. 2001) aunque también mostraban que a largas escalas ésta decaía rápidamente. No era, como se puede uno imaginar el mejor ambiente para decir que el ADN era un aislante extraordinario. Sin embargo, la falta reproducibilidad de muchos de los resultados y la falta de experimentos claros y concluyentes que demostraran de manera inequívoca las posibilidades tecnológicas hizo que la tendencia anterior se fuera invirtiendo y que empezara a calar en la comunidad científica la idea de que el ADN no era tan buen conductor como parecía. A esto también ayudo que el grupo del Prof. C. Dekker, que había defendido un comportamiento semiconductor en un principio, ahora dijera que el ADN era aislante (Storm et al. 2001). Ajenos al espíritu sensacionalista de muchos de los resultados seguimos realizando experimentos, en este caso electrostáticos, para evitar la presencia de los contactos y decidimos mandar nuestros resultados a la prestigiosa revista *Proceedings of the National Academy of Science* en noviembre de 2001 donde serían publicados en Junio de 2002 (Gómez-Navarro et al. 2002b)[10].

[10] Al igual que en la vida, la suerte juega un papel esencial en ciencia. Durante el tiempo de evaluación de nuestro artículo en PNAS apareció uno muy similar pero en una revista de mucho menor índice de impacto. Afortunadamente, el proceso de evaluación de nuestro trabajo no se vio afectado y finalmente fue publicado el 25 de Junio de 2002.

A pesar de las recientes evidencias que niegan cualquier tipo de conductividad del ADN, durante el año 2002 se han seguido publicado trabajos en los que se habla de conducción en fragmentos cortos de ADN como por ejemplo el último trabajo del grupo del Prof. Kawai (Lee et al. 2002), aunque también trabajos recientes que verifican nuestros resultados (Zhang et al. 2002).

Afirmar que el tema de la conductividad está zanjado a estas alturas es posiblemente prematuro. La historia nos ha demostrado que sólo se puede estudiar desde cierta perspectiva y distancia en el tiempo. Quizás dentro de 10 años nuestro artículo se cite como el que mató cualquier expectativa de un dispositivo molecular con ADN.

2.12. Resumen

En este capítulo se ha mostrado que la microscopía de fuerzas permite el estudio de las propiedades eléctricas de moléculas individuales adsorbidas sobre un substrato aislante mediante dos técnicas: 1) realizando un contacto entre la punta y la molécula y tomando una curva de corriente frente a voltaje y 2) a partir de la interacción electrostática entre la punta y la molécula y por tanto sin contacto entre ambas.

La técnica del contacto se empleó sobre moléculas de ADN de secuencia aleatoria (λ-ADN) y de secuencia Poly(dG)·Poly(dC) adsorbidas sobre una amplia variedad de substratos: mica, oxido de silicio, vidrio y zafiro y empleando varios tipos de metales como electrodos: oro, plata, carbono y estaño. Los resultados mostraron que las moléculas de ADN no presentan un comportamiento de conductor molecular ya que no se midió corriente por encima del nivel de ruido (1 pA) al aplicar hasta 12 V.

La técnica en la que no hay contacto físico entre la punta y la molécula se aplicó a muestras de nanotubos y ADN co-adsorbidas en la misma superficie. Estos experimentos nos permitieron comparar de manera directa las características conductoras de estos dos hilos moleculares. Los resultados mostraron que mientras los nanotubos de carbono presentan características compatibles con las de un conductor molecular las moléculas de ADN presentan

un comportamiento aislante con una resistividad del orden de la del substrato en el que se encuentran adsorbidas: $10^{12}\ \Omega\cdot$cm.

Con el fin de estudiar nuevos hilos moleculares basados en ADN se desarrolló la producción de un nuevo tipo de ADN que incorpora iones metálicos (*M*-ADN). El protocolo de fabricación muestra que el ADN en forma β cambia a *M*-ADN en las siguientes condiciones:

- Para el Ni-*M*-ADN, usando una concentración de 12 mM $NiCl_2$ y pH por encima de 8.6.
- Para el Co-*M*-ADN, usando una concentración de 1.2 mM $CoCl_2$ y pH por encima de 8.3.
- El proceso de producción de *M*-ADN es reversible al añadir EDTA.

El experimento en el que se marcaron radiactivamente las moléculas de ADN modificado demostró que éstas no consiguen entrar en un gel de agarosa al 0.7%.

Las imágenes de AFM de *M*-ADN nos muestran que las moléculas modificadas con metales sufren un fenómeno de condensación mediante el cual la longitud se reduce en un factor 5 y la altura de las moléculas aumenta en casi un orden de magnitud. La condensación de las moléculas de ADN explica que no entren en la matriz del gel de agarosa y permite dar una explicación a los resultados de conductividad mostrados por otros autores.

Los experimentos de conductividad realizados sobre moléculas de *M*-ADN mostraron unos resultados idénticos a los obtenidos sobre moléculas de ADN: el *M*-ADN no presenta un comportamiento eléctrico compatible con el de un conductor molecular.

3. Caracterización estructural de biomoléculas: los filamentos apareados helicoidales de la enfermedad de Alzheimer

3.1. Introducción

Este capítulo trata sobre la resolución del AFM y cómo podemos aplicar esta resolución a caracterizar estructuralmente moléculas biológicas individuales. Por esta razón he decidido comenzar el capitulo desarrollando el concepto de resolución en microscopía de fuerzas. Como veremos este concepto es difícil de definir y depende de varios factores. Como ejemplo práctico aplico la técnica a unas estructuras denominadas Filamentos Apareados Helicoidales o PHFs (Paired Helical Filaments) que están relacionadas con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Estas estructuras están formadas mayoritariamente por una proteína llamada tau. La proteína tau, que desempeña otras funciones vitales, polimeriza de forma anómala generando estas estructuras aberrantes sin que por el momento se

conozcan ni las razones ni los mecanismos por los que esta polimerización se produce. El estudio de los mecanismos que gobiernan la agregación de tau en forma de filamentos es de gran interés, tanto para la comprensión del fenómeno patológico neurodegenerativo, como para la búsqueda de inhibidores de este proceso que pudieran utilizarse como tratamientos de prevención o terapéuticos

La aproximación al problema se puede realizar de dos formas. Por un lado se puede caracterizar la molécula PHF, que proviene de enfermos que desarrollaron la enfermedad y por otro se pueden caracterizar las estructuras generadas *in vitro* a partir de la proteína mayoritaria de esos filamentos. En este capítulo muestro resultados relativos a ambas aproximaciones.

El estudio se ha realizado mayoritariamente en aire ambiente aunque también se presentan importantes resultados obtenidos recientemente en medio líquido. Así mismo, se han empleado dos tipos de sondas de radios de curvatura y forma distinta con el fin de aumentar la resolución. Finalmente, se proponen dos modelos para la estructura de la molécula biológica estudiada y se comparan con los resultados experimentales obtenidos.

El trabajo expuesto en este capítulo se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Jesús Ávila y del Dr. Esteban Montejo de Garcini ambos investigadores del Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. Estos grupos poseen un reconocido prestigio en el estudio de enfermedades neurodegenerativas y en particular de la enfermedad de Alzheimer (Ripoll et al. 1985; Nieto et al. 1988; Harrington et al. 1991).

3.2. Resolución del AFM

Una de las características esenciales de cualquier microscopía es su resolución. La microscopía de fuerzas se diferencia frente a otras técnicas microscópicas porque obtiene una imagen tridimensional de la superficie de la muestra. Por esta razón debemos distinguir entre resolución *vertical* y resolución *lateral*, magnitudes que no siempre se comportan de manera independiente.

3.2.1. Resolución vertical

La resolución vertical está limitada, esencialmente, por dos fuentes de ruido. Por un lado está limitada por la sensibilidad del sistema de detección. Actualmente, éste no es el principal factor limitante ya que el diseño de las cabezas de AFM (camino óptico del láser, fotodiodo, etc...) y la electrónica empleada logran un nivel de ruido inferior a 0.1 Å (0.001 Å en STM). El principal factor limitante en la resolución vertical de un AFM es el ruido térmico de la micropalanca. Su valor es (Butt & Jaschke. 1995):

$$\Delta z = \sqrt{\frac{4k_B T}{3K}} = \frac{0.074}{\sqrt{K}}\,\text{nm} \qquad (3\text{-}1)$$

siendo k_B = 1.38x10^{-23} J/K la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y K la constante de fuerza de la micropalanca en N/m. Con constantes típicas de las micropalancas de 0.01-1 N/m la amplitud del ruido térmico a temperatura ambiente es de 7-0.7 Å. Para micropalancas con factores de calidad altos, la mayor parte de este ruido se centra en una región espectral alrededor a la frecuencia de resonancia de la micropalanca.

3.2.2. Resolución lateral

La resolución lateral del AFM no es una magnitud fácil de definir. La imagen de un objeto infinitamente afilado corresponde a la superficie de la punta invertida tal y como se muestra en la Fig.3.1 A. Consecuentemente, la imagen AFM de dos objetos infinitamente afilados no es la suma sino la unión de las contribuciones de cada uno de los objetos por separado (Fig.3.1 B). Por tanto la formación de una imagen AFM no es un proceso lineal como ocurre en los microscopios tradicionales, y la resolución espacial no es una propiedad inherente del microscopio sino que depende del contexto en el cual el objeto está situado.

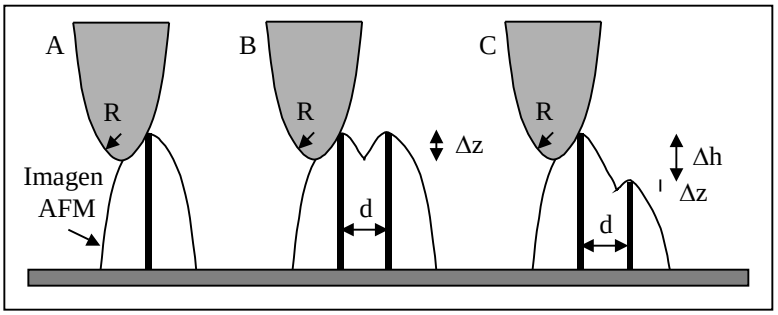


Figura 3.1. Representación esquemática del proceso de formación de la imagen con un AFM.

La resolución lateral de las microscopías de campo cercano viene dada por la interacción existente entre la punta y la muestra. El rango o alcance de la interacción *(ξ)* nos define el área que interviene en la formación de la imagen y por tanto la resolución lateral. El rango de la interacción depende de tres factores: del radio de la punta *(R)*, de la distancia punta-muestra *(D)* y de la longitud de decaimiento de la interacción ($\lambda = 1/\kappa$). Estas tres magnitudes se interrelacionan de la siguiente forma (Rohrer. 1994):

$$\xi = \sqrt{(R + D)/\kappa} \tag{3-2}$$

De la ecuación anterior se deduce que la mayor resolución se obtiene minimizando tres parámetros: el tamaño de la sonda, la distancia de interacción y la longitud de decaimiento. Por ejemplo, la corriente túnel cambia en un factor 10 cuando la distancia punta-muestra cambia en 1 Å *(λ~Å)*. Esto significa que la corriente está localizada en dimensiones atómicas *(R~Å)* y que por tanto la distancia punta-muestra es también de este orden. Los microscopios de efecto túnel poseen, en consecuencia, resolución atómica *(ξ~Å)*. Este razonamiento se puede extrapolar a la situación que tenemos en microscopía de fuerzas. Sin embargo la versatilidad del microscopio de fuerzas para trabajar en modos de contacto y no-contacto y en diferentes ambientes (UHV, aire ambiente y líquido) hace que no sea tan sencillo definir el concepto de resolución como lo es para el microscopio de efecto túnel ya que para cada modo y cada entorno la interacción predominante suele ser distinta.

3.2.2.1. Modo contacto

En régimen repulsivo la interacción presente es debida a la repulsión entre las nubes electrónicas de la punta y de la muestra y se puede asumir de tipo exponencial, $V \approx e^{-z/\lambda}$, con lo que si $\kappa = -(dF/dz)/F$ se obtiene $\lambda = 1/\kappa$ [1]. Esta interacción aumenta rápidamente con la distancia cambiando en un factor >10 por cada Å[2]. En este caso el factor limitante es el radio de la punta. Mediante este

[1] En medio líquido la longitud de decaimiento de la interacción se denomina longitud de Debye (λ_D) y depende de la concentración y valencia iónica del electrolito. Expresiones para la interacción presente en medio líquido y para λ_D se dan en la sección 1.4: ecuaciones 1-4 y 1-5. A condiciones fisiológicas λ_D varía entre 0.1 y 100 nm.

[2] Esta interacción debida al apantallamiento de los núcleos por los electrones refleja muy bien la resolución de un AFM trabajando en no contacto en UHV.

método es posible obtener resolución atómica en medio líquido sobre muestras cristalinas (Ohnesorge & Binnig. 1993) y medir la periodicidad atómica en aire ambiente sobre cristales de oro o grafito.

El efecto del radio de la punta *(R)* provoca que objetos de dimensiones menores, $R_{mol}<R$, aparezcan de mayor tamaño. Este fenómeno, denominado *dilación*, hay que tenerlo muy en cuenta cuando visualizamos moléculas biológicas con el AFM, ya que éstas tienen dimensiones típicas de pocos nm mientras que el radio de la punta es, típicamente, un orden de magnitud mayor.

Para una molécula individual de altura, $H=2R_{mol}$, menor que el radio efectivo de la punta, R, (Fig.3.2) ($R_{mol}<R$), la anchura que presenta una imagen AFM a media altura se puede calcular según:

$$S = \sqrt{4HR + H^2} \approx 2\sqrt{R_{mol} \cdot R} \tag{3-3}$$

siendo R el radio efectivo de la punta y S el ancho que presenta la imagen AFM del objeto a media altura (Margeat et al. 1998). Por ejemplo, cuando visualizamos moléculas de ADN, cuyo diámetro es 2 nm, las imágenes de AFM obtenidas con una punta de radio 20 nm muestran las moléculas con un ancho de 9 nm. Análogamente, a partir de la Ec.3-3 es posible deducir el radio de la punta empleada si se conocen las dimensiones del objeto que se visualiza.

$$R = \frac{S^2 - H^2}{4H} \tag{3-4}$$

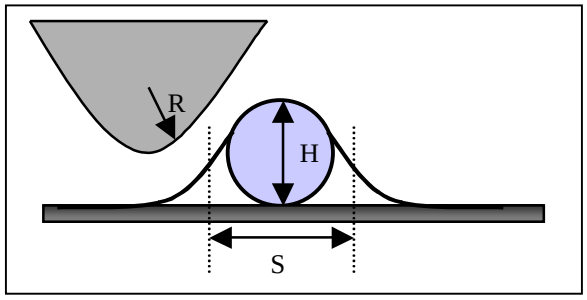


Figura 3.2. Representación esquemática del proceso de imagen de un objeto de diámetro H usando una punta de radio R (H<R). La anchura a media altura que se obtiene en la imagen AFM es S.

El radio efectivo de la punta también se puede calcular usando el modelo de Hertz (Ec.1-13). Según este modelo el radio efectivo depende de la fuerza normal aplicada y de las propiedades mecánicas de la punta y de la muestra. Esto tiene importantes implicaciones. Por un lado se alcanzará mayor resolución en muestras

duras que en blandas, y por otro lado, ya que las fuerzas aplicadas son mucho mayores en aire ambiente que en líquido, la resolución alcanzada sobre muestras blandas en contacto será superior en medio líquido que en aire ambiente (Tabla 3-I).

Otra característica esencial del método de contacto es la presencia de fuerzas de fricción. Estas fuerzas son especialmente dañinas sobre muestras formadas por moléculas individuales débilmente ancladas al substrato. Esto no ocurre cuando tenemos conjuntos ordenados o cristales de proteína, donde las moléculas se apoyan unas con otras y las fuerzas laterales no las desplazan. En este caso es posible conseguir resoluciones laterales por debajo del nm ajustando la concentración y fuerza iónica del tampón (Müller et al. 1999). Para definir la resolución en este tipo de muestras podemos usar el diagrama de la Fig.3.1 C. Podemos definir la resolución lateral como la separación mínima, d, entre dos objetos infinitamente finos, tal que la altura Δz es mayor que el ruido instrumental (resolución vertical). Este es un ejemplo en el que vemos que la resolución lateral y la vertical están íntimamente relacionadas.

Como se muestra en la Fig.3.1 C la distancia mínima detectable, d, depende no sólo de las dimensiones de la punta, R, y de la sensibilidad del microscopio, Δz, sino también de la altura relativa de los objetos, Δh. Para una punta parabólica, d vale:

$$d = \sqrt{2R}\left(\sqrt{\Delta z} + \sqrt{\Delta z + \Delta h}\right) \qquad (3\text{-}5)$$

para $d > \sqrt{2R\Delta h}$ (Bustamante & Keller. 1995). Esta expresión es valida para objetos indeformables y predice que la resolución aumenta cuando los objetos son de similar altura ($\Delta h \rightarrow 0$). La alta resolución obtenida sobre cristales de proteína se achaca a la presencia de pequeños defectos nanométricos en la superficie de la punta macroscópica, lo que minimiza el valor efectivo del radio de la punta.

Si la molécula que se quiere visualizar tiene una altura mucho mayor que el radio de la punta, $h>R$, entonces la magnitud relevante en la resolución espacial es el ángulo de apertura de la punta, α, tal y como se puede comprobar en la Fig.3.3.

Mediante argumentos puramente geométricos se deduce que:

$$S = w + h \cdot \tan(\alpha) \qquad (3\text{-}6)$$

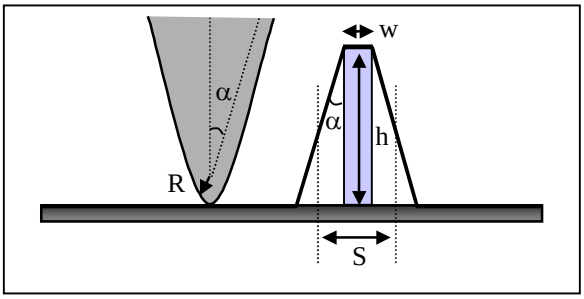


Figura 3.3. Representación esquemática del proceso de imagen de un objeto de dimensiones h x w usando una punta de radio R y ángulo de apertura α,, tal que h>R. La anchura a media altura que se obtiene en la imagen AFM es S.

3.2.2.2. Modos dinámicos y de no contacto

En los modos dinámicos la posición media de la punta se encuentra a distancias típicas de nm o decenas de nm. En este rango las interacciones predominantes (vdW, electrostática, magnética...) siguen una ley del tipo: $F = 1/z^n$. Con lo que:

$$\kappa = -\frac{dF/dz}{F} = \frac{n}{z} \;\Rightarrow\; \lambda = \frac{z}{n} \tag{3-7}$$

Para la interacción de van der Walls (Ec.1-3) la longitud de decaimiento vale $\lambda = z/2$. Un resultado análogo se deduce para las interacciones electrostática y magnética. De la ecuación 3-7 y 3-2 se deduce que la resolución lateral será mayor cuanto menor sea r (distancia punta-muestra) y mayor sea n (el orden de la interacción).

En aire ambiente, la presencia de las fuerzas capilares obliga a usar grandes amplitudes de oscilación (decenas de nm) y a mantener la micropalanca a distancias similares de la superficie de la muestra con la consiguiente pérdida de resolución. En medio líquido es posible operar los modos dinámicos con bajas amplitudes y pequeñas distancias punta-muestra con lo que se obtiene una mayor resolución en medio líquido que en aire ambiente (Möller et al. 1999) (Tabla 3-I). En UHV la interacción capilar no existe y esto permite acercar la punta a distancias por debajo del nm. El rango de la interacción es mucho menor que en aire ambiente y es posible obtener imágenes con resolución atómica real sobre muestras aislantes (Giessibl. 1995; Sugawara et al. 1995)

En principio JM combina aspectos de los modos dinámicos y del modo de contacto y, ya que la magnitud de control es la fuerza normal presente en contacto se debería poder conseguir resoluciones laterales comparables a las del modo contacto. Sin embargo hasta la fecha no hemos conseguido obtener una

resolución lateral comparable a la que se obtiene en modo contacto debido al poco tiempo que llevamos empleando este modo de medida para estudiar moléculas biológicas individuales en medio líquido.

Para estudiar moléculas biológicas nos restringimos al aire ambiente o al medio líquido. En la Tabla 3-I, presento un resumen sobre la resolución lateral alcanzada por el AFM sobre material biológico.

	Tipo Muestra	Ambiente	Modo medida	Resolución	Referencia
Material biológico	**Moléculas Individuales** (ADN, proteínas polímeros)	Aire	Contacto	15-20 nm	(1)
			DAFM	5-15 nm	(2)
		Líquido	Contacto	4-8 nm	(1)
			JM	10-15 nm	(3)
			DAFM	10-15 nm	(4)
	Cristales Proteínas (HPI, Porin OmpF Memb.púrpura)	Aire	No hay datos disponibles		
		Líquido	Contacto	0.6 nm	(5)
			DAFM	1.1 nm	(6)

(1) Hansma H.G. et al. Science 256, 1180 (1992)
(2) Wong S.S. et al. Appl. Phys. Lett. 73, 3465 (1998)
(3) Moreno-Herrero F. et al. Appl. Phys. Lett. 81, 2629 (2002)
(4) Viani, M.B. et al. Nat. Str. Biol. 7 (8) 644 (2000)
(5) Müller, D.J. et al. Biophys. J. 76, 1101 (1999)
(6) Möller, C. et al. Biophys. J. 77, 1150 (1999)

Tabla 3-I. Tabla que resume la resolución lateral típica obtenida con un microscopio de fuerzas sobre material biológico.

En general la máxima resolución se consigue usando el modo de contacto, siempre que estemos en el régimen de repulsión electrónica de los átomos de punta y muestra y siempre que la altura relativa entre moléculas sea pequeña. Esto ocurre cuando se visualizan cristales de proteína. En este caso es posible conseguir resoluciones laterales por debajo del nm (Müller et al. 1999). Usando DAFM es posible también conseguir resoluciones laterales del orden del nm sobre muestras cristalinas (Möller et al. 1999). Estas resoluciones laterales tan elevadas son posibles porque la interacción presumiblemente se lleva a cabo a través de una pequeña protuberancia de tamaño nanométrico dentro de la punta nanoscópica de decenas de nm (Müller et al. 1999).

Cuando se intenta visualizar moléculas individuales de pocos nm de altura no es conveniente utilizar el modo de contacto debido a las fuerzas laterales inducidas por el movimiento de la punta. Mediante técnicas bioquímicas es posible fijar las moléculas a la superficie de una manera más firme pero esto no evita que la parte superior de la molécula se mueva al realizar el barrido, con la consiguiente pérdida de resolución. Esta es la razón por la que las imágenes de contacto de las moléculas de ADN mostradas en la Fig.1.22 no presentan una buena calidad. Para visualizar moléculas individuales se emplean modos que minimizan las fuerzas laterales como el DAFM o el JM. En este caso la punta se encuentra, en promedio, a varios nm de la superficie de la muestra. Cuando se emplea DAFM, pequeñas protuberancias de la punta nanoscópica no afectan a la interacción y podemos considerar la punta como una esfera de radio de decenas de nm. La resolución lateral que se alcanza sobre moléculas individuales es típicamente de 10-15 nm. Es posible mejorar la resolución lateral usando nanotubos de carbono como sondas, en estas condiciones se pueden conseguir resoluciones laterales de 5 nm (Wong et al. 1998). No es este el caso habitual, ya que este tipo de sondas son difíciles de conseguir y su fabricación es complicada y cara.

Las imágenes que muestro en este capítulo obtenidas en aire ambiente se adquirieron en modo DAFM usando dos tipos de puntas con radios nominales de 15 y 5 nm y ángulos de apertura 35° y 20° respectivamente. Las imágenes obtenidas en medio líquido se adquirieron usando JM. Pero antes de mostrar los resultados es obligado hacer una pequeña introducción a la molécula que queremos estudiar.

3.3. La enfermedad de Alzheimer y los filamentos apareados helicoidales

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa que causa demencia progresiva. Afecta principalmente a las personas mayores de 65 años. Alrededor del 20% de las personas con edades comprendidas entre los 80-85 años la padecen y es la cuarta causa de mortalidad del mundo desarrollado. Aunque existe una forma determinada de Alzheimer de aparición temprana y que está asociada a razones genéticas (sólo un 1% de los casos totales), para la restante mayoría de los casos (Alzheimer esporádico) no se conocen los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad. Lo que sí se sabe es su patología, es decir sus síntomas y consecuencias. Esta enfermedad causa la

destrucción de las neuronas en zonas como el hipocampo lo que se traduce en trastornos en la memoria y en la coordinación de movimientos.

La Fig.3.4 muestra una imagen de microscopía óptica con tinción de plata de un corte del tejido de un cerebro afectado por la enfermedad de Alzheimer. Las lesiones características que se observan son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares.

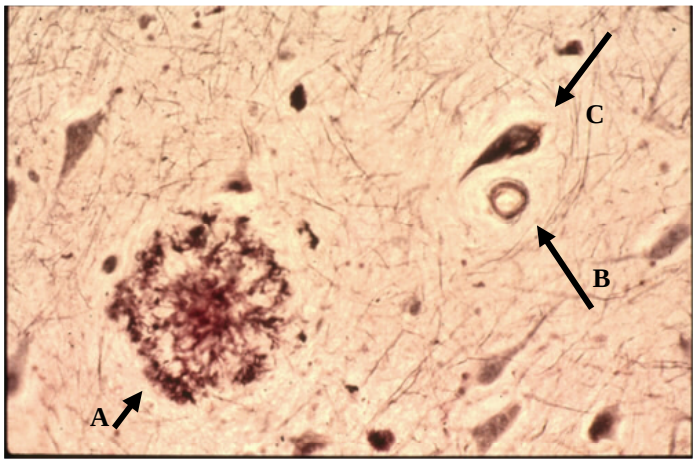


Figura 3.4. Imagen de microscopía óptica con tinción de plata de un corte de tejido de cerebro afectado por la enfermedad de Alzheimer.

Las placas seniles (Fig.3.4 A) están distribuidas difusamente en áreas del cerebro cortical o subcortical. Están formadas por acumulaciones del péptido β-amiloide que procede del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide. Esta proteína se procesa de manera anormal en los enfermos y polimeriza con ella misma formando fibras de amiloide que tienen unos 2 nm de diámetro. Se desconoce por qué ocurre esto, pero sí se sabe que las placas seniles también aparecen con la vejez, aunque en menor cantidad, sin que se manifieste la patología. A veces se producen depósitos de esta proteína en los vasos sanguíneos del cerebro como se puede ver en la Fig.3.4 B. La continua acumulación de esta proteína en los vasos sanguíneos del cerebro provoca una obstrucción de los mismos que pueden dar lugar a derrames cerebrales que pueden provocar la muerte. Existen estudios con microscopía de fuerzas sobre la polimerización de los filamentos de β-amiloide (Blackley et al. 2000).

La otra marca histológica de la enfermedad son los ovillos neurofibrilares o NTFs (Neurofibrillary Tangles) (Fig.3.4 C). Se forman intracelularmente para luego quedar como NTFs extracelulares al morir la neurona. El número de ellos es proporcional al grado de demencia (Arriagada et al. 1992). Los NTFs están constituidos por la acumulación de unos filamentos de morfología característica, por la que reciben el nombre de filamentos apareados helicoidales o PHFs (Paired Helical Filaments). Además también aparecen, aunque en menor proporción, filamentos rectos o SF (Straight Filaments).

La Fig.3.5 muestra el aspecto de estos filamentos visualizados con microscopía electrónica con sombreado metálico. Estudios de microscopía electrónica revelan que estos filamentos muestran una variación en grosor de 8 a 20 nm, con una periodicidad de 65-80 nm (Crowther & Wischik. 1985; Crowther. 1991). Por el contrario, los filamentos rectos poseen una anchura de ~15 nm sin mostrar variaciones en grosor.

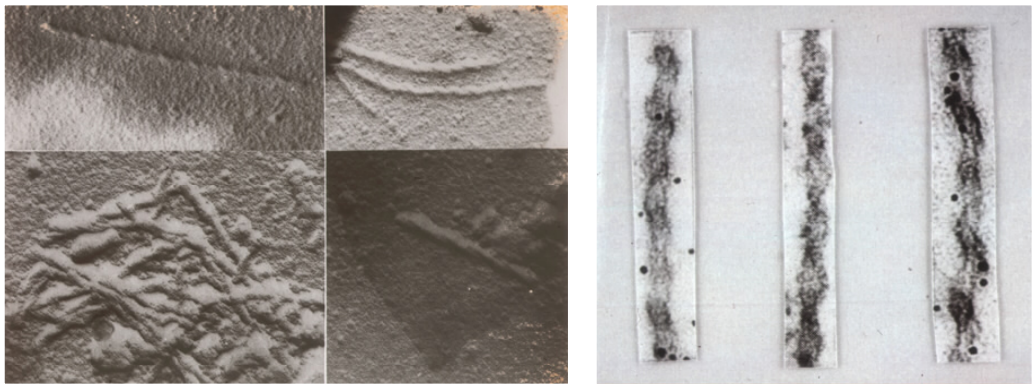


Figura 3.5. Imagenes de microscopía electrónica con sombreado metálico que muestran el componente principal de los NTFs: los PHFs.

La proteína tau, anormalmente fosforilada, es el componente principal de los PHFs. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos. Este nombre se asignó a un conjunto de bandas que aparecían en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, de entre todas las proteínas asociadas a microtúbulos. Este tipo de acumulaciones filamentosas de la proteína tau también aparecen en otros procesos neurodegenerativos como son: las demencias frontotemporales asociadas al cromosoma 17, la degeneración corticobasal; la enfermedad de Pick y la parálisis supranuclear progresiva con lo

que a todo este conjunto de enfermedades se las ha agrupado con el nombre de Tauopatías.

En las secciones siguientes mostraré los resultados experimentales obtenidos mediante microscopía de fuerzas sobre los PHFs en aire ambiente y en medio líquido. Describiré los modelos estructurales empleados y los compararé con los resultados experimentales. Terminaré el capítulo con los resultados obtenidos sobre filamentos creados *in vitro* en el laboratorio.

3.4. Caracterización por AFM de los PHFs en aire ambiente

En esta sección mostraré los resultados obtenidos con AFM sobre PHFs medidos en aire ambiente. Se han empleado dos substratos: mica (Aname Cat#71850) y grafito pirolítico o HOPG (Highly Oriented Pyrolitic Graphite) (NT-MDT HOPG-ZYH), dos tipos de puntas y todas las imágenes han sido obtenidas usando el modo de medida DAFM en el régimen de no contacto (Sección 1.3.2).

3.4.1. Puntas estándar

Las muestras de PHFs para microscopía de fuerzas se prepararon tal y como se describe en (Moreno-Herrero et al. 2001): 4 μl de la solución de PHFs se depositaron sobre un disco de mica recién exfoliado. Se deja adsorber durante 1 min. y se lava con agua desionizada para eliminar cualquier resto de sal o molécula no adherida a la superficie. Finalmente se seca con nitrógeno seco. La principal diferencia de este protocolo de preparación comparado con el del ADN descrito en la sección 2.3.1 es que la propia carga del PHF permite la adsorción a la mica, por tanto no es necesario añadir ningún tipo de ión divalente extra.

En la Fig.3.6 se muestra una serie de imágenes de moléculas individuales de PHFs preparadas según el protocolo descrito en el parágrafo anterior. En este caso se emplearon micropalancas con puntas de radio estándar de 15-20 nm, ángulo de apertura de 35°, constante de fuerza 0.75 N/m y frecuencia de resonancia ~75 kHz (Olympus Optical Co, LTD).

Los PHFs aparecen como estructuras de morfología helicoidal con giro a izquierdas[3]. En las imágenes se pueden observar otros restos procedentes de la purificación de estas estructuras. La mayoría de los filamentos presentan helicidad aunque una pequeña fracción aparecen como filamentos planos (ver flechas en Fig.3.6 B).

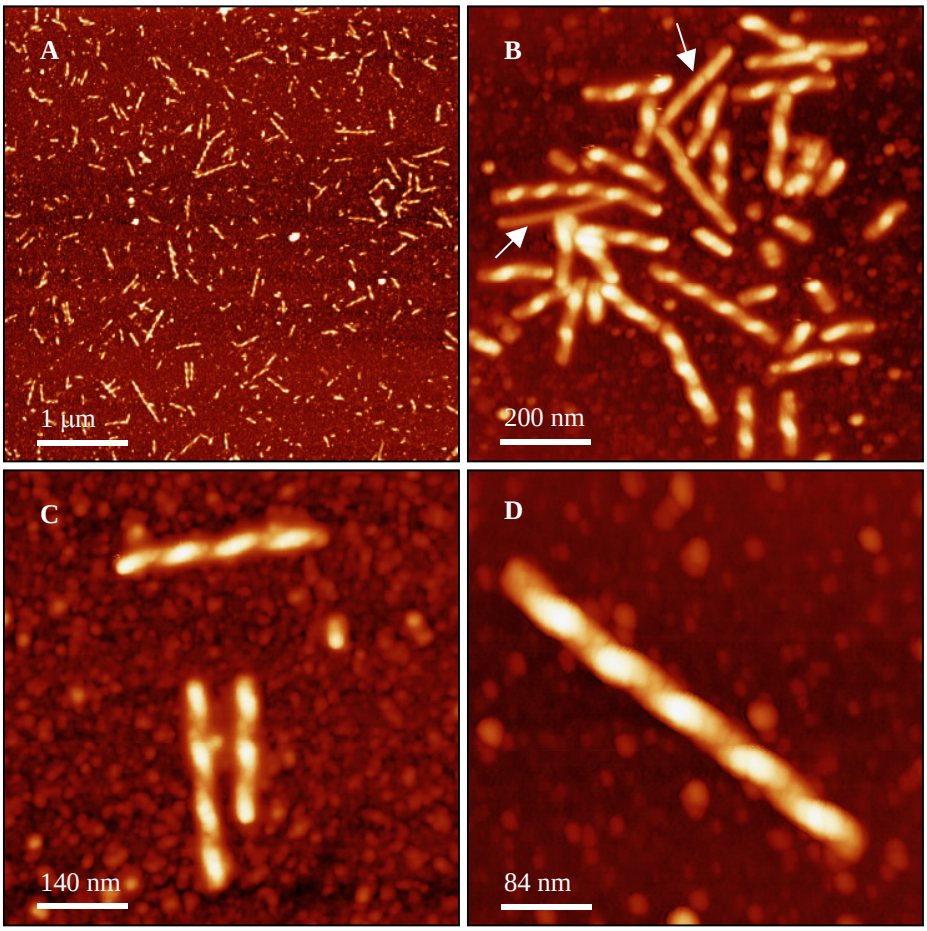


Figura 3.6. Imágenes de microscopía de fuerzas de PHFs adsorbidos sobre mica obtenidas usando una punta de radio estándar de 15-20 nm y ángulo de apertura de 35°.

Las dimensiones de los PHFs, tanto adsorbidos sobre mica como sobre HOPG, se muestran en las figuras 3.7 y 3.8 respectivamente. Las moléculas presentan una periodicidad axial variable de 65-80 nm. Esta dispersión es, muy

[3] En cualquier microscopía donde la imagen se obtiene como fruto del barrido de una sonda, se debe poner especial cuidado para que la quiralidad de las imágenes no sea fruto de un artificio instrumental o informático.

probablemente, debida al proceso de deshidratación ya que las medidas están tomadas en aire ambiente. La altura de las moléculas es de ~16 nm para los máximos y ~10 nm para el mínimo local situado entre dos máximos para las imágenes de mica y de ~18 nm y ~12 nm respectivamente para las imágenes de HOPG.

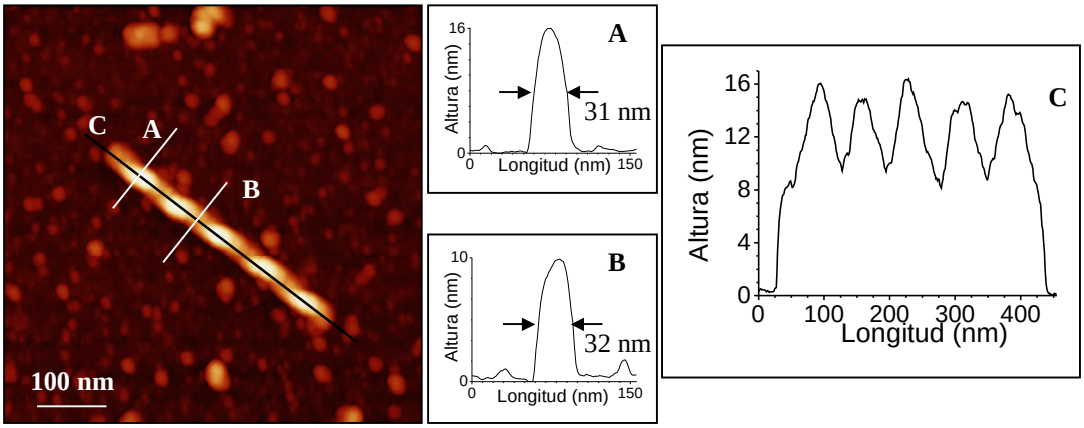


Figura 3.7. Dimensiones de los PHFs adsorbidos sobre mica. Los datos fueron medidos con una punta estándar de 15-20 nm.

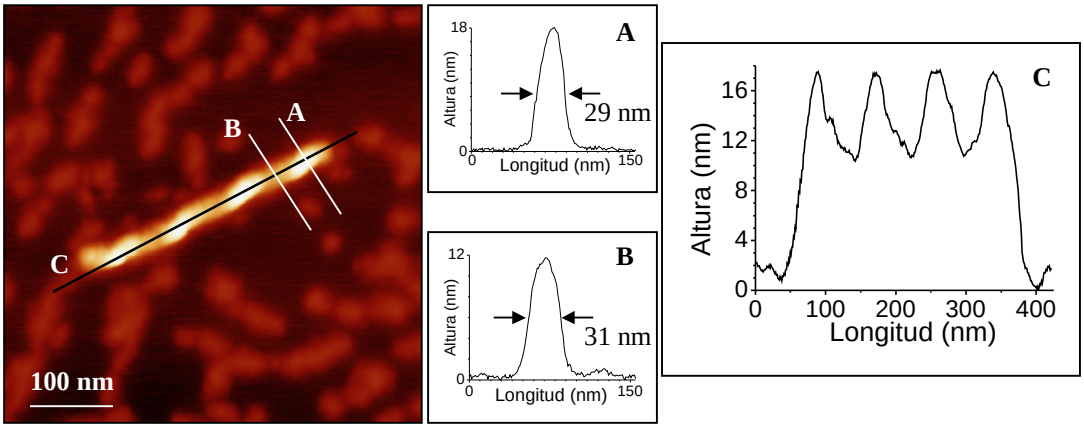


Figura 3.8. Dimensiones de los PHFs adsorbidos sobre HOPG. Los datos fueron medidos con una punta estándar de 15-20 nm.

En general las dimensiones de los filamentos son mayores cuando se encuentran adsorbidos sobre HOPG. Sin embargo, la preparación de las muestras sobre grafito es mucho más complicada ya que las moléculas de PHF se adhieren muy débilmente a la superficie y son eliminadas durante el proceso de lavado. Posiblemente, la adsorción de los PHFs sobre mica se produce gracias a la carga

superficial que ésta tiene y es, precisamente, la interacción electrostática la que los comprime contra la superficie. Ya que el grafito no presenta carga superficial, la adsorción es mucho más improbable pero a cambio, la interacción molécula-superficie es más débil con lo cual los PHFs se encuentran menos comprimidos contra la superficie.

El ancho que las moléculas presentan en la parte de máximos es de 31 nm (Fig.3.7 A) y de 29 nm (Fig.3.8 A) y en la parte de mínimos de 32 nm (Fig.3.7 B) y de 31 nm (Fig.3.8 B).

Un estudio más detallado de las imágenes, independientemente del substrato empleado, revela un patrón en forma de bandas con una periodicidad de entre 8-12 nm dentro de la estructura helicoidal. Estos datos parecen indicar que la estructura de los PHFs se sustenta en otra que se repite periódicamente. De hecho una de las estrategias empleada por la naturaleza para conseguir una estructura helicoidal consiste en la repetición de una unidad de forma que hay un pequeño desajuste entre esta unidad y la que le sigue. Esta subestructura se ve claramente en la Fig.3.9.

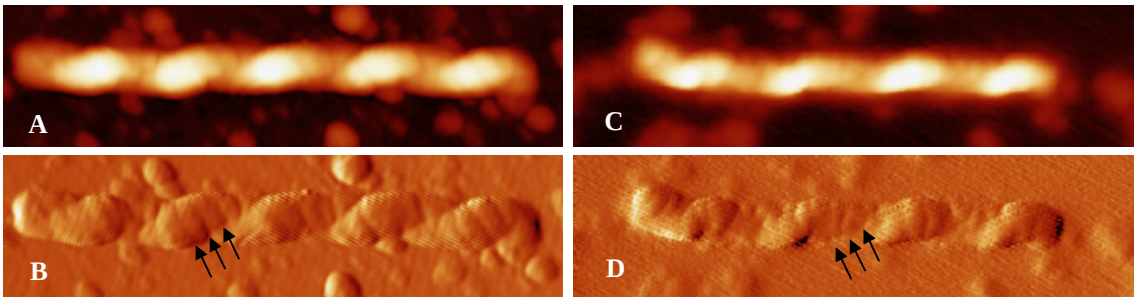


Figura 3.9. Imágenes de AFM de alta resolución que muestran un patrón en forma de bandas perpendiculares al eje de la hélice con una periodicidad de 8-12 nm. (A) es la imagen tomada sobre mica y (B) es la imagen derivada. En (C) se muestra un PHF sobre HOPG y en (D) la derivada correspondiente.

Las imágenes de fase tomadas simultáneamente con la topografía revelan detalles interesantes de la superficie de estos polímeros. En general, aparecen estructuras granulares de tamaño variable. Aparentemente, las imágenes de fase presentan una mayor resolución lateral. La interpretación de estas imágenes no es sencilla ya que por un lado existe una influencia de la topografía y por otro lado todavía no está claro qué tipo de información proporcionan estas imágenes. En la Fig.3.10 se muestra la imagen de alta resolución de topografía de un PHF (A y D)

junto con su imagen de derivada (B y E) y los datos de fase registrados simultáneamente con la topografía (C y F). La zona de contraste oscuro que rodea el núcleo de la fibra en las imágenes de fase se puede correlacionar con el contraste producido por la *cubierta difusa* que poseen los PHFs. Este contraste aparece claramente en imágenes de microscopía electrónica. Esta cubierta está descrita por otros autores como una cubierta que rodea al núcleo central de los PHFs formada por las colas de las moléculas de tau completas (Crowther. 1991; Wischik et al. 1997). De confirmarse este punto las imágenes de fase nos proporcionarían información relevante. El efecto de la cubierta difusa también es visible en las imágenes de topografía, aunque el contraste que presenta es mucho menos marcado.

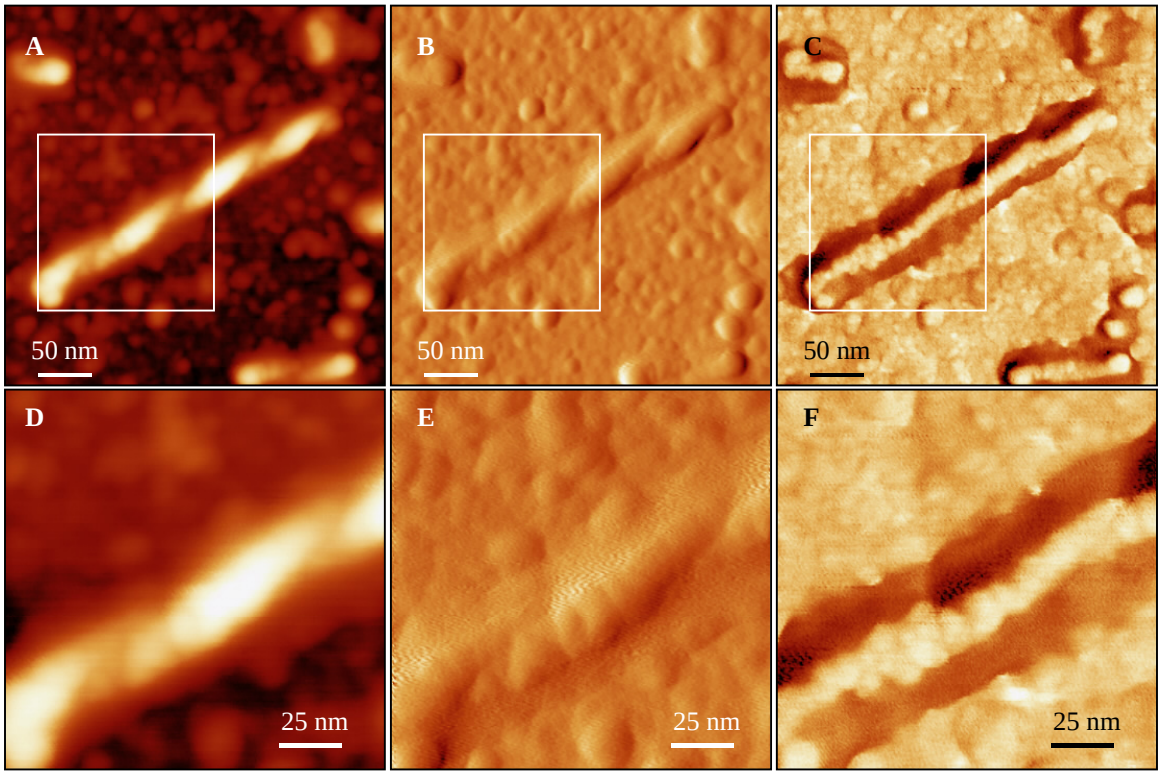


Figura 3.10. A, imagen de alta resolución (1.36 nm por punto) de la topografía de un PHF adsorbido sobre mica. Un detalle se muestra en (D) (0.58 nm por punto). Las correspondientes derivadas se muestran en (B) y (E). Los datos de fase registrados simultáneamente con la topografía aparecen en (C) y (F). Las imágenes de fase muestran una estructura granular de tamaño variable rodeada de una banda de contraste negativo que atribuimos a la cubierta difusa de los PHFs descrita por otros autores.

3.4.2. Puntas ultra-finas

Tal y como se mostró en la sección 3.2.2, la resolución lateral depende, en gran medida, de las dimensiones de la punta. Por este motivo decidimos utilizar micropalancas con puntas de radio de curvatura menor que las empleadas hasta este momento y con un ángulo de apertura también menor (UltraSharpSiliconTips, Nanosensors). Este tipo de puntas presentan un radio de curvatura igual o menor que 5 nm, un ángulo de apertura de 20°, una constante de fuerza de 10 N/m, una frecuencia de resonancia de 120 kHz y están hechas de silicio frente al nitruro de silicio de las puntas de radio estándar. El material del que están hechas las puntas es importante por su dureza. El silicio es mucho más blando y frágil que el nitruro de silicio con lo cual el manejo de las puntas de radio ultra-fino es extremadamente complicado ya que cualquier golpe con la superficie modifica de forma irreversible el estado de la punta.

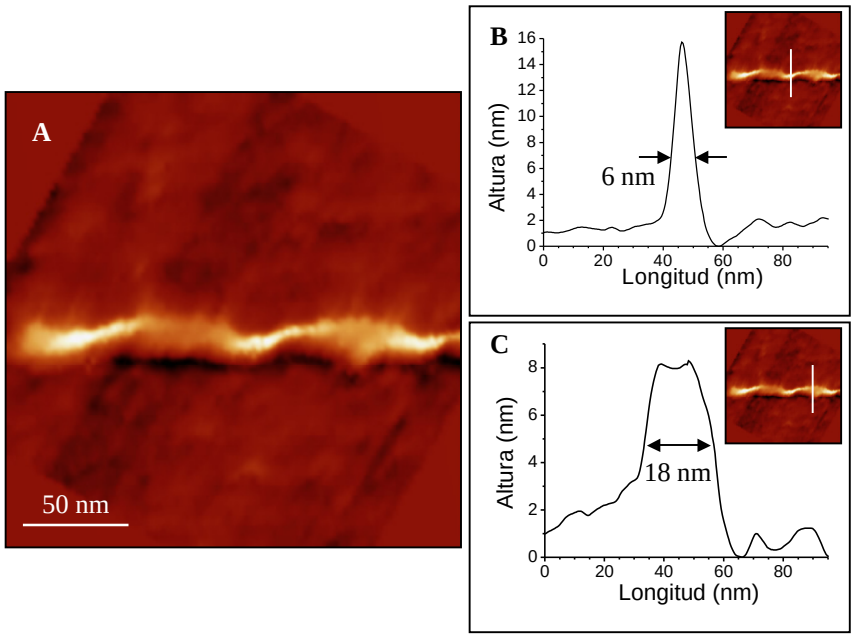


Figura 3.11. Imagen de topografía obtenida usando una punta de radio de curvatura igual o menor a 5 nm (A). En B y C se muestran los perfiles obtenidos en la parte alta y media del PHF. La anchura medida a media altura en la parte alta es de tan sólo 6 nm mientras que se obtienen 18 en el perfil C. Este resultado nos muestra que el efecto de la dilación se minimiza usando este tipo de puntas.

En la Fig.3.11 se muestran los resultados correspondientes a la caracterización de los PHFs usando este tipo de puntas. Una vez más se obtiene

una estructura helicoidal tal y como aparecía en las figuras anteriores como elemento básico del polímero. La imagen de la Fig.3.11 A muestra el PHF como una cinta fina enrollada con una periodicidad similar a la obtenida con las puntas de radio estándar (~75 nm). El pequeño radio de la punta y el hecho de que el ángulo de apertura sea mucho menor minimiza el efecto de la dilación. En particular, mientras el ancho medido a media altura en los perfiles era prácticamente idéntico en los experimentos mostrados en las Figs.3.7 y 3.8, en las imágenes de la Fig.3.11 los perfiles muestran anchos muy distintos cuando se obtienen en la parte superior o en la parte inferior (Fig.3.11 B y Fig.3.11 C). Nótese que, ya que la parte comprendida entre dos máximos se encuentra suspendida en el aire o débilmente adherida al substrato, esta parte de la imagen aparece más borrosa debido al movimiento del polímero producido por la punta. Un análisis más cuidadoso de los perfiles nos muestra dos picos en el perfil obtenido en la parte baja (Fig.3.11 C) sugiriendo que la cinta puede estar formada por dos cadenas.

Un hecho interesante es que en estas imágenes no se observan las bandas presentes en las imágenes obtenidas con las puntas de radio estándar. Creemos que esto es debido a que estas puntas están realmente tocando la superficie del PHF modificando su estructura. De hecho la baja altura medida en las zonas comprendidas entre los máximos avala esta hipótesis. Posiblemente el régimen de contacto o no contacto de los modos dinámicos se ve seriamente afectado por las dimensiones del radio de la punta de la micropalanca. Las imágenes obtenidas con las puntas de radio estándar se obtuvieron en modo de no contacto con lo cual el bandeo que se observa es fruto de la deformación producida por fuerzas electrostáticas o por fuerzas de vdW y no por la propia punta (ver discusión en sección 3.6).

Hasta este punto se han presentado los resultados correspondientes a la caracterización de los PHFs en aire ambiente. Sin embargo, tal y como se demostró en el Cap. 1 con los experimentos realizados sobre ADN, el medio en el cual se adquieren las imágenes puede tener una influencia determinante sobre la estructura de las biomoléculas. Por esta razón decidimos visualizar estos polímeros en medio líquido.

3.5. Caracterización por AFM de los PHFs en medio líquido

Las imágenes de los PHFs en medio líquido fueron obtenidas usando JM. Con este método de medida es posible obtener información sobre la adhesión de la punta con la muestra. Empleamos micropalancas de baja constante de fuerza (0.02 N/m) y radio de curvatura estándar (~10 nm). Las imágenes de las moléculas fueron obtenidas en tampón PBS (Sigma P-3813), aplicando una fuerza máxima de ~150 pN.

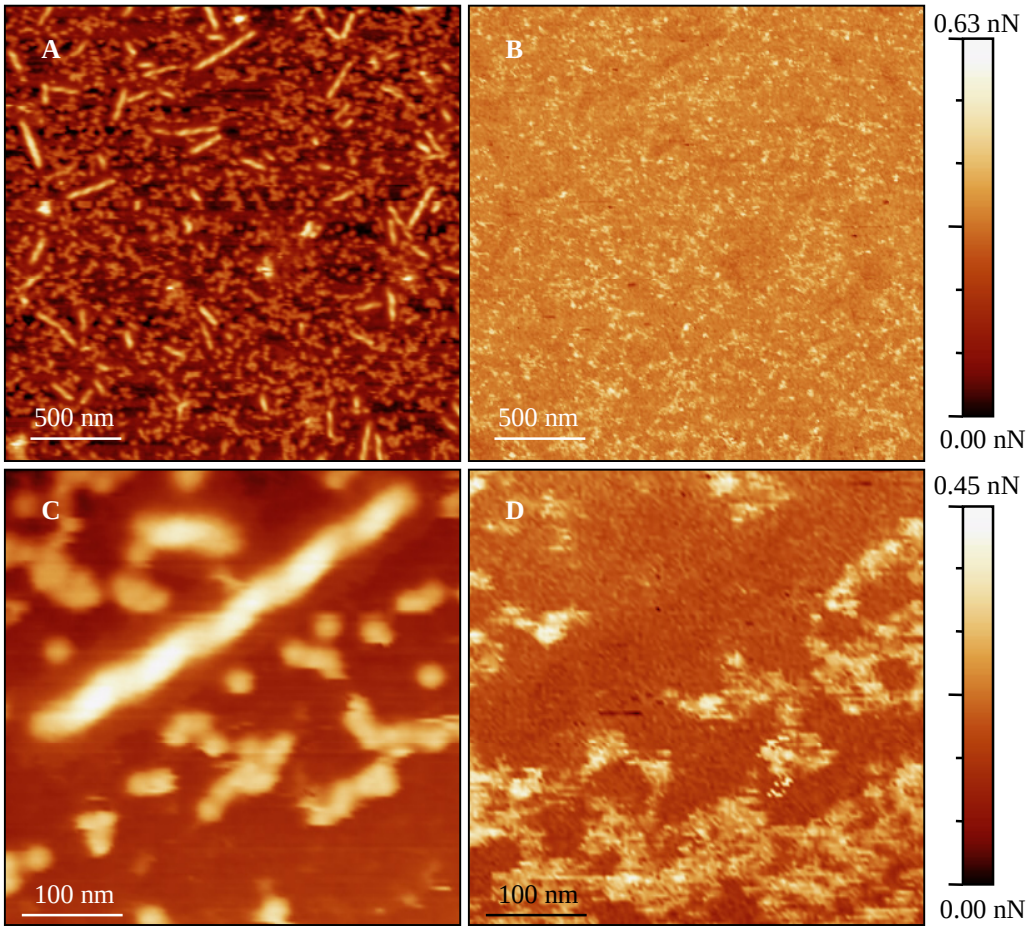


Figura 3.12. Imágenes de AFM obtenidas usando JM de PHFs en tampón PBS. Las imágenes fueron adquiridas aplicando una fuerza máxima de 150 pN. En la figura se muestran dos imágenes de topografía (A y C) junto con sus correspondientes imágenes de adhesión (B y D). Como se puede ver la adhesión es mínima sobre la superficie de las moléculas.

En la Fig.3.12 se muestran varias imágenes de AFM obtenidas en PBS, junto con sus correspondientes imágenes de adhesión. La imagen de baja resolución obtenida en medio líquido (Fig.3.12 A) es muy similar a la obtenida en aire ambiente (Fig.3.6 A): los PHFs aparecen como estructuras de morfología helicoidal con giro a izquierdas. La periodicidad de la hélice, al igual que ocurría en aire ambiente, presenta dispersión de una molécula a otra y se encuentra comprendida entre 65 y 80 nm. Sin embargo mientras en aire ambiente el valor medio se encuentra más próximo a 75 nm en medio líquido la periodicidad media es más cercana a 70 nm. Es decir en medio líquido la estructura del PHF aparece más compacta.

Las imágenes de adhesión obtenidas en JM muestran que ésta es prácticamente nula sobre la superficie de las moléculas. Este resultado es muy similar a los obtenidos sobre ADN y sobre el bacteriófago ϕ29 (Fig.1.26). Es importante notar que incluso sobre pequeños fragmentos de PHFs la adhesión sigue siendo nula. Únicamente sobre otros objetos[4] presentes en la preparación se miden adhesiones de hasta 0.5 nN. En este sentido las imágenes de adhesión nos sirven para diferenciar distintas clases de materiales.

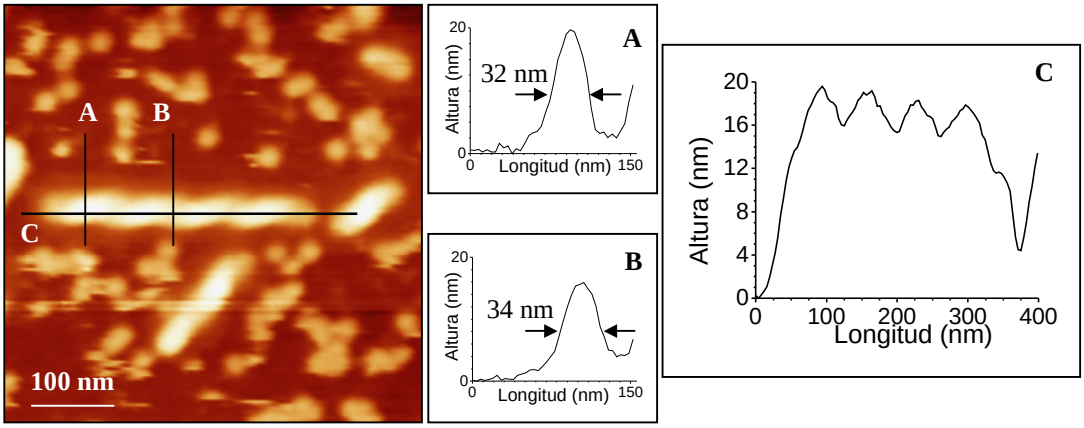


Figura 3.13. Dimensiones de los PHFs adsorbidos sobre mica cuando se miden en tampón PBS. La imagen fue obtenida en JM usando una punta de radio estándar y aplicando una fuerza máxima de 150 pN.

Un análisis cuidadoso de las dimensiones de los PHFs cuando se miden en medio líquido (Fig.3.13) nos revela importantes diferencias con respecto a las dimensiones obtenidas en aire ambiente (Fig.3.7, 3.8 y 3.11). En primer lugar la

[4] Posiblemente partículas de ferritina, presentes en el proceso de purificación y de difícil eliminación.

altura de las moléculas tanto en la parte superior como en las zonas inferiores es mayor cuando se mide en medio líquido que cuando se mide en aire ambiente. En aire ambiente la altura medida variaba, dependiendo del substrato empleado y del tipo de punta, entre 16 y 18 nm para las partes de altura máxima y entre 8 y 12 nm para las zonas de altura mínima. En medio líquido las alturas son de ~20 nm para las zonas de máximos y de ~15 nm para las zonas de mínimos. No sólo las alturas absolutas cambian sino también la relación entre máximos y mínimos. El cociente $H_{máx}/H_{mín}$ medio de las moléculas observadas en aire ambiente está en torno a 1.7 mientras que este número en medio líquido es 1.25. Estos resultados nos indican que, muy probablemente, la estructura tridimensional que tiene el PHF en medio fisiológico se mantiene cuando se mide la topografía usando JM en PBS. Si la estructura de la molécula es la de una cinta enrollada entonces las partes comprendidas entre dos máximos no llegarían a tocar la superficie de la mica, lo que explicaría la diferencia de alturas relativa medida en medio líquido. Probablemente en las muestras preparadas en aire ambiente la parte de la cinta que se encuentra suspendida entre dos máximos no es capaz de mantenerse en el aire y colapsa contra la superficie debido a la interacción electrostática, a las fuerzas capilares y a las fuerzas de van der Waals.

Las dimensiones laterales medidas en medio líquido en la parte superior (Fig.3.13 A) y en la parte inferior (Fig.3.13 B) son muy similares a las encontradas en los datos obtenidos al aire y valen 32 y 34 nm respectivamente.

En las imágenes obtenidas en medio fisiológico se observa claramente la presencia de la cubierta difusa que ya se comentó en el apartado anterior. Esta cubierta aparece como un halo que rodea las moléculas de PHF (Fig.3.13 y Fig.3.12 C). Las imágenes de adhesión (Fig.3.12 D) no presentan ningún contraste sobre esta región de la molécula de PHF.

El estudio de estas moléculas en medio líquido abre la posibilidad de estudiar sus propiedades elásticas en su estado natural. La Fig.3.14 nos muestra dos curvas de fuerza frente a distancia medidas sobre un PHF (X) y sobre la mica (Y). La pendiente de ambas curvas es muy distinta: 0.020 N/m sobre el sustrato y 0.011 N/m sobre la molécula. Estos datos demuestran que la estructura de los PHFs es muy blanda lo cual corrobora la hipótesis mencionada anteriormente de que la estructura se deforma al adsorberse sobre el sustrato en aire ambiente. Esta característica de las moléculas biológicas ya se comprobó anteriormente con

el ADN, dónde veíamos cómo el efecto de la presión ejercida por la punta sobre la molécula modificaba su altura (sección 1.5.2.1).

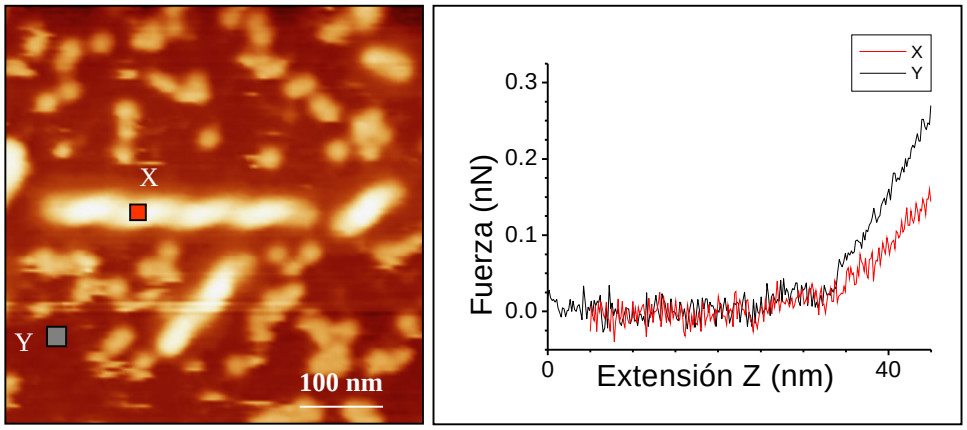


Figura 3.14. Curvas de fuerza frente a distancia realizadas sobre un PHF (X) y sobre la mica (Y). Las pendientes medidas son de 0.020 N/m para la curva de fuerza frente a distancia tomada sobre la mica y de 0.011 N/m para la realizada sobre la molécula. La diferencia de pendientes nos muestra que los PHFs son estructuras muy blandas.

3.6. Análisis de resultados, modelos y simulaciones

Los resultados mostrados presentan a la molécula PHF como una estructura helicoidal con giro a izquierdas con una periodicidad en torno a 75 nm de acuerdo con trabajos previos (Crowther & Wischik. 1985; Wischik et al. 1985; Crowther. 1991; Appelt & Balin. 1993; Pollanen et al. 1994; Pollanen et al. 1997; Wischik et al. 1997). En este punto, las medidas presentadas, tanto en aire como en medio líquido, están de acuerdo.

Las dimensiones de esta estructura helicoidal son menores cuando se miden en aire ambiente si se las compara con las medidas en medio líquido. Las dimensiones medidas en medio líquido coinciden con los datos de la literatura (Crowther & Wischik. 1985; Wischik et al. 1985; Crowther. 1991; Wischik et al. 1997). Crowther y Wischik describen la molécula de PHF, a partir de medidas de microscopía electrónica, como estructuras cuyas dimensiones transversales varían entre 8 y 20 nm. Ya que nuestras medidas obtenidas en líquido son coincidentes con éstas, tomaremos como guía estos valores a la hora de elaborar los modelos. Una vez descritos los modelos veremos si éstos son compatibles con las medidas realizadas en aire ambiente.

3.6.1. Modelos de trabajo

Una de las formas de modelizar una estructura helicoidal es repetir una figura bidimensional de dimensiones H x W (H>W) rotándola a lo largo de la dirección Z (Fig.3.15). Por ejemplo, si lo que se repite es una línea recta de longitud H entonces se obtiene una cinta helicoidal de espesor nulo. Es importante notar que, idealmente, una cinta enrollada se apoya sobre una superficie únicamente por los puntos donde el eje transversal es perpendicular al substrato y se mantiene suspendida en el aire en el resto de puntos. La distancia máxima de la cinta a la superficie se consigue en la zona central comprendida entre estos dos puntos de apoyo.

En el caso de que esta estructura sea como la que se muestra en la Fig.3.15 A (línea recta de dimensiones H x W) entonces se obtiene una cita de espesor W y altura H, medida en los puntos de apoyo con el substrato (eje transversal de la cinta perpendicular al plano del substrato), como la que aparece en la Fig.3.15 C. Si consideramos una cinta fina, la altura mínima de la molécula sería ($H/2+W/2 \approx H/2$ ya que $W<<H$). Este tipo de modelo puede explicar los resultados obtenidos en aire ambiente ya que un perfil longitudinal realizado sobre la imagen de Fig.3.15 C sería muy similar a los mostrados en las Fig.3.7, 3.8 y 3.11. El modelo de cinta fina no puede explicar los resultados obtenidos en medio líquido. Para explicar estos resultados la cinta debería ser relativamente gruesa, tal que $W \sim H/2$. Entonces el punto de mínima altura sería $\sim 3/4 \cdot H$ (Fig.3.13). Lamentablemente, una cinta gruesa estaría en conflicto con los resultados medidos en aire ambiente y en particular con las imágenes obtenidas con las puntas ultra-finas (Fig.3.11).

El otro modelo propuesto es uno de los modelos más ampliamente aceptados sobre la estructura de los PHFs y consiste en dos subunidades con forma de C donde cada una de ellas contiene 3 dominios (modelo Wischik-Crowther) (Crowther & Wischik. 1985; Wischik et al. 1985; Crowther. 1991; Wischik et al. 1997). Esta estructura es similar a la mostrada en la parte B de la Fig.3.15. Al rotar esta estructura se genera un filamento como el de la Fig.3.15 D, tal que la altura en el punto en el que el eje transversal es paralelo a la superficie del substrato es $\sim 3/4 \cdot H$, resultado que coincide con los perfiles experimentales obtenidos en medio líquido.

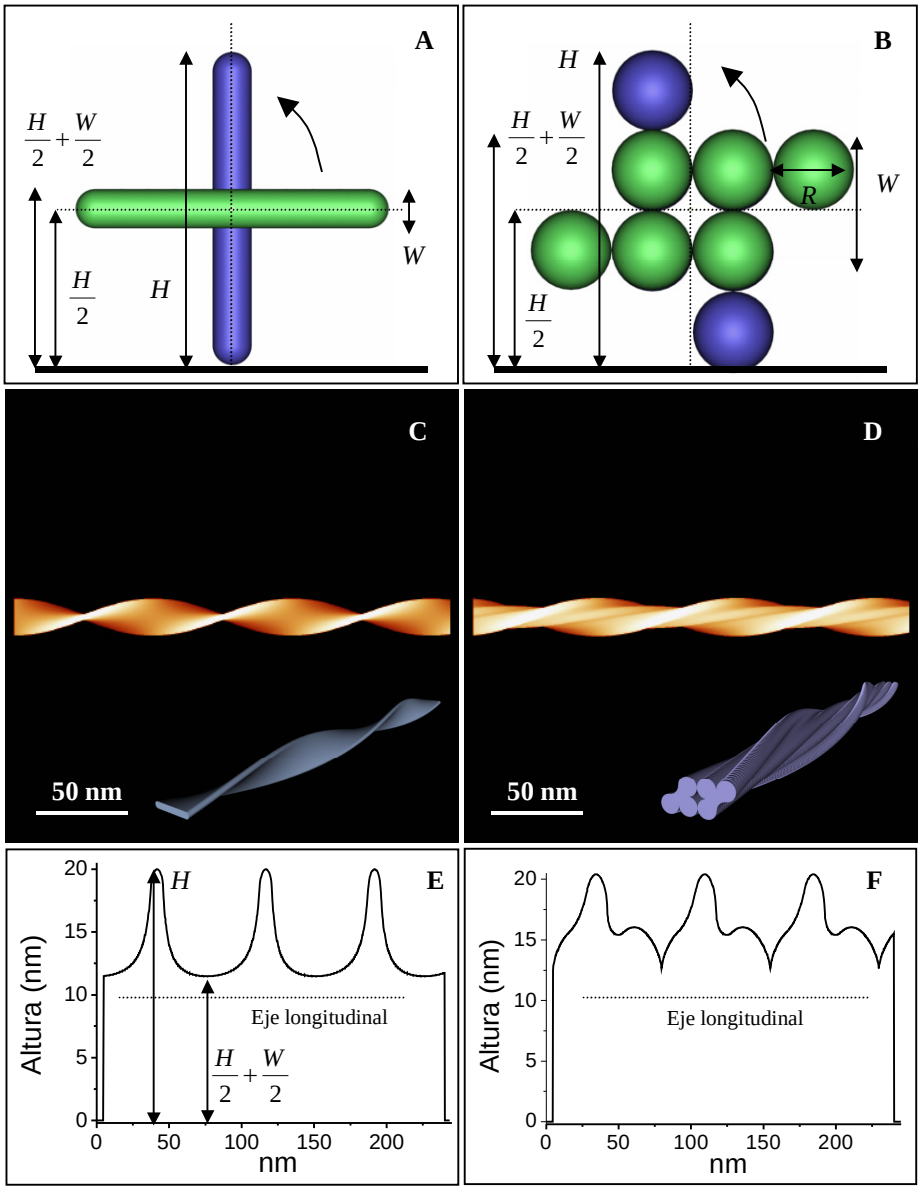


Figura 3.15. Modelos utilizados para simular la estructura de los PHFs. Una manera de generar una estructura helicoidal es repetir una figura bidimensional (A, B) a lo largo del eje Z a medida que se va rotando. Si se emplea la representada en A se obtiene una cinta de espesor W y altura H (medida cuando el eje transversal de la cinta es perpendicular al plano del substrato), como la que se muestra en C. Si por el contrario se utiliza el modelo B (modelo Wischik-Crowther) se obtiene una estructura más complicada exactamente igual a la mostrada en D. Los perfiles longitudinales de las estructuras creadas aparecen en E y F. Los parámetros usados en la simulación de A fueron: H=20 nm, W=3 nm y en B fueron: H=20 nm, W=10 nm, R=5 nm. Las simulaciones tienen una resolución de 0.24 nm/píxel.

Los modelos de la Fig.3.15 muestran dos estructuras que no sufren ninguna deformación. Esta es la situación que, presumiblemente, ocurre en medio líquido. Sin embargo sabemos que en aire ambiente las muestras biológicas sufren dos procesos: deshidratación y deformación. Esto se traduce en:

a) Pérdida de volumen. Este aspecto se ve claramente al medir las alturas máximas de la molécula. Medidas realizadas sobre preparaciones de microscopía electrónica describen los PHFs como estructuras de espesor variable entre 8 y 20 nm. Las alturas de estos polímeros medidas con AFM en aire ambiente se encuentran alrededor de 16 nm, es decir un 20% menores.

b) Deformación de la estructura debida a las fuerzas electrostáticas, fuerzas capilares y de vdW, principalmente. Esta deformación es especialmente relevante en los puntos comprendidos entre los puntos de anclaje al substrato. El resultado es que estas regiones se sienten atraídas hacia la superficie y por tanto la altura medida en estas zonas es siempre menor que la que debiera ser. Nótese que este efecto no debe cambiar substancialmente la periodicidad del polímero siempre que se produzca la deshidratación y deformación una vez adsorbida la molécula a la superficie, lo cual parece razonable. Este resultado se confirma experimentalmente ya que la periodicidad de la hélice coincide tanto en las medidas obtenidas en aire ambiente como en medio líquido.

Los dos factores antes mencionados debemos aplicarlos a nuestro modelo para considerar las medidas en aire ambiente (Fig.3.16). El efecto de la deshidratación se traduce en una reducción de las dimensiones de la molécula (H x W)$\rightarrow$(H' x W') y el efecto de la deformación en un hundimiento de la parte comprendida entre los máximos.

Parece razonable pensar que este hundimiento será mayor cuanto más próximos estemos a la zona central comprendida entre dos máximos. Una forma sencilla de simular esta deformación consiste en restar a la estructura sin deformar una función $|\Delta z \cdot \sin(\omega \cdot x + \varphi)|$ donde Δz es la amplitud de la deformación, ω es la frecuencia de la molécula ($\omega = 2\pi/T$) con T =2·75 nm. La fase, φ, debemos ajustarla de forma que la deformación sea nula en los puntos de apoyo y máxima en el punto medio. La Fig.3.16 muestra los dos aspectos considerados para modular una molécula de PHF deshidratada y deformada.

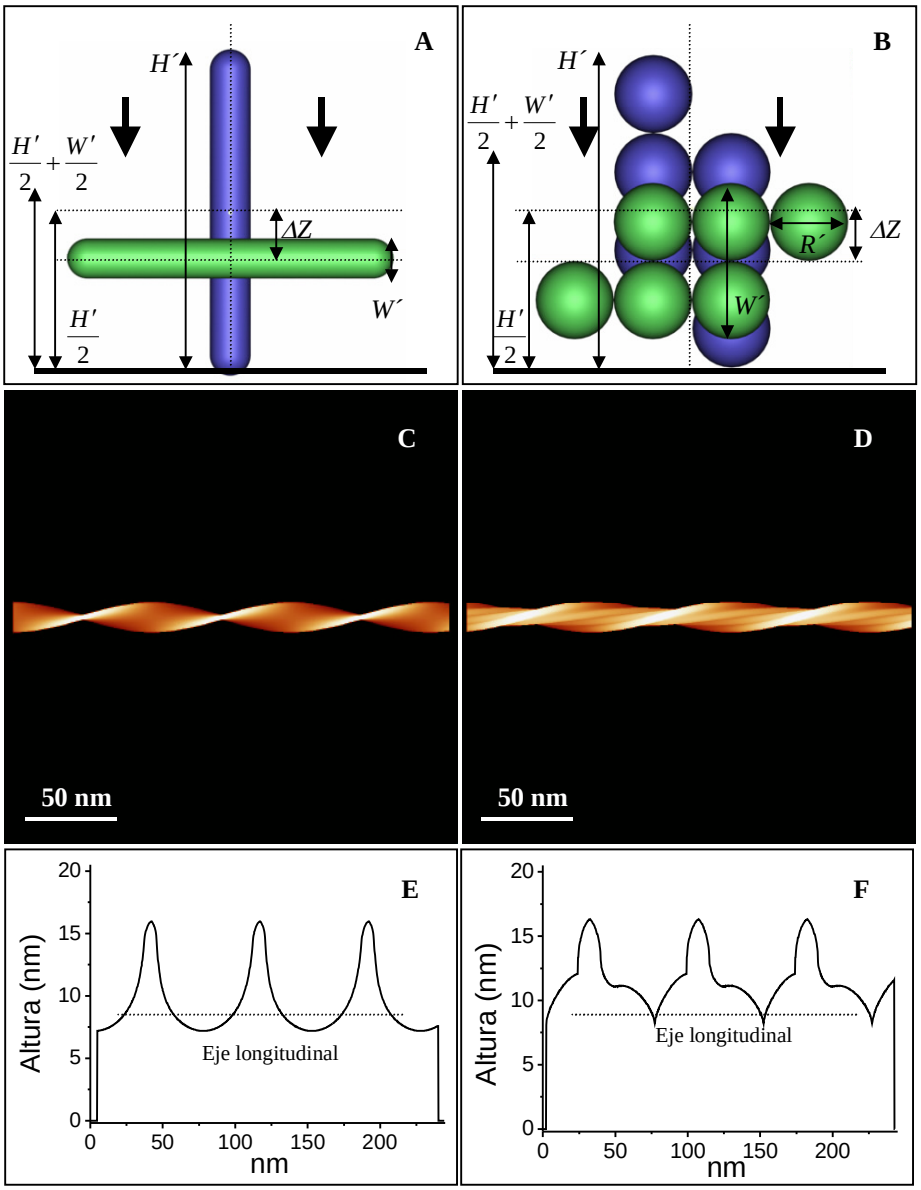


Figura 3.16. Modelos utilizados para simular las moléculas de PHFs en aire ambiente. A los modelos presentados en la Fig.3.15 se les aplica el efecto de la deshidratación y de la deformación. El efecto de la deshidratación se simula aplicando una reducción en las dimensiones de la fibra, es decir (H x W)→(H´ x W´). El efecto de la deformación (flechas gruesas) debida a las fuerzas electrostáticas o a las fuerzas de vdW se simula restando a la estructura sin deformar la función $\left|\Delta Z \cdot \sin(\omega \cdot x + \varphi)\right|$ *donde ΔZ es la amplitud de la deformación, ω es la frecuencia de la molécula (2π/T) con T=2·75 nm y φ una fase que debemos ajustarla de forma que la deformación sea nula en los puntos de apoyo y máxima en el punto medio. Los parámetros usados en la simulación de A fueron: H=16 nm, W=2.4 nm y en B fueron: H=16 nm, W=8 nm, R=4 nm. En ambas ΔZ=2 nm. Las simulaciones tienen una resolución de 0.24 nm/píxel.*

Las simulaciones mostradas en la Fig.3.16 A y C descartan el uso de un modelo basado en una cinta fina ya que, en este caso la altura medida en el punto comprendido entre máximos estaría por debajo de $H/2$, lo que no se observa experimentalmente. Una cinta gruesa sería compatible con los resultados obtenidos en medio ambiente con las puntas estándar, siempre que se considere una importante deformación, pero fallaría al explicar la estructura fina que se mide en las imágenes obtenidas con las puntas ultra-finas. La ventaja del modelo presentado en B en comparación con el de la parte A es que la estructura de B sigue siendo relativamente fina en los extremos lo que la hace compatible con los resultados medidos con las puntas ultra-finas.

Tal y como se mencionó al principio de esta sección debemos considerar las dimensiones medidas en medio líquido como guía a la hora de dar números a las diferentes variables (H y W) de los modelos. Así pues, los modelos de la Fig.3.15 son compatibles con los datos experimentales siempre que W~10 nm y H~20 nm, con lo que para el caso del modelo de la Fig.3.15 B el tamaño de cada uno de los dominios es de ~5 nm. Estas dimensiones suponen que la altura de la molécula medida entre dos máximos es de ~15 nm, resultado que está de acuerdo con los resultados obtenidos en medio líquido (Fig.3.13).

3.6.2. Simulaciones

Es posible simular el paso de la punta sobre este tipo de estructuras y comparar las imágenes obtenidas con las experimentales. El fenómeno de dilación esta presente en el AFM siempre que el tamaño de las moléculas sea comparable al de la sonda. Las simulaciones presentadas a continuación consideran a la punta como un paraboloide de ecuación:

$$z = C_x \cdot x^2 + C_y \cdot y^2 \qquad C_x = \frac{1}{2 \cdot R_x} \qquad C_y = \frac{1}{2 \cdot R_y} \tag{3-8}$$

siendo R_x y R_y los radios correspondientes en la dirección x e y. Las simulaciones de dilación de la punta con la molécula están basadas en la idea descrita por Villarrubia (Villarrubia. 1996) cuya descripción detallada se hace en el Anexo 3-A.

En las secciones siguientes presentaré las simulaciones del paso de una punta de AFM de distintos radios de curvatura (puntas estándar y puntas ultra-

finas) sobre los modelos propuestos en medio líquido (Fig.3.15) y sobre los modelos propuestos para aire ambiente (Fig.3.16).

3.6.2.1. Modelo cinta gruesa en líquido

En la Fig.3.17 se muestran los resultados de considerar el modelo de la cinta de dimensiones, *H:* 20 nm y *W:* 10 nm. En (A) aparece la imagen de la cinta, en (B) se muestra la imagen generada al pasar una punta de parámetros R_x=R_y=8 nm y en (C) se muestra la imagen experimental.

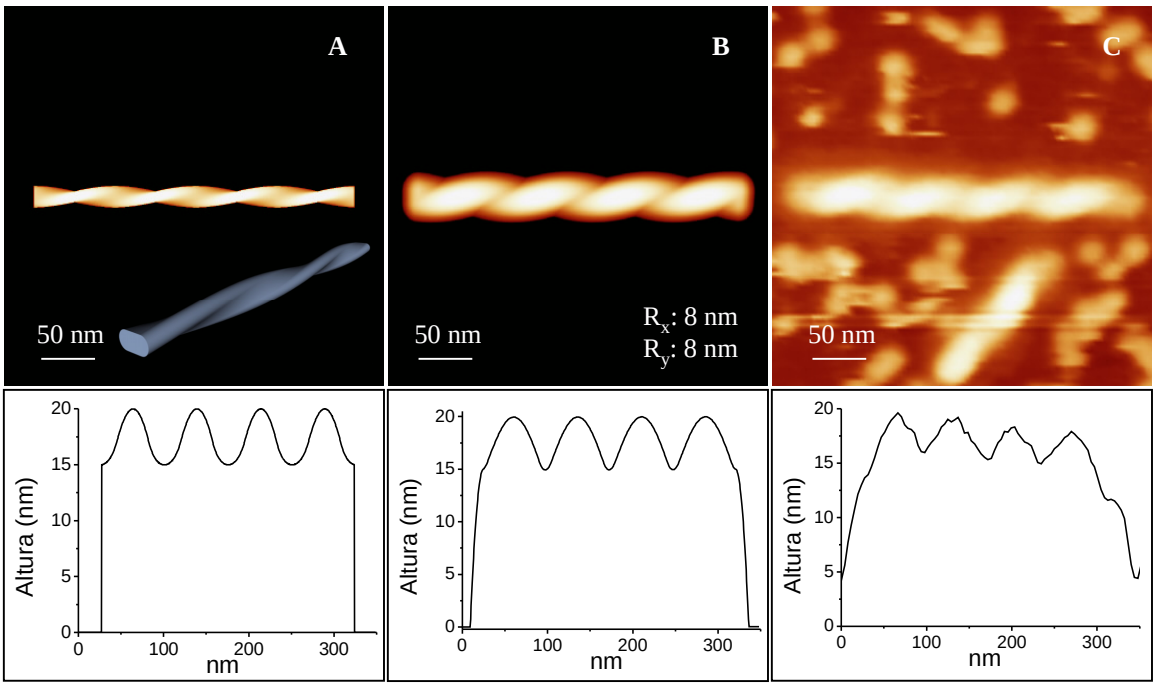


Figura 3.17. Simulación del paso de una punta de parámetros R_x: 8 nm y R_y: 8 nm por una cinta de dimensiones W: 10 nm y H: 20 nm (A). La imagen simulada (B) se puede comparar con la obtenida experimentalmente en medio líquido (C). Los perfiles longitudinales de las tres imágenes se muestran en la parte inferior.

A primera vista el acuerdo entre la imagen simulada y la experimental es bastante bueno. Hay que notar, sin embargo, que la resolución lateral de la imagen experimental no es demasiado alta (3.9 nm/punto) mientras que las simulaciones tienen una resolución de 0.68 nm/punto. Esto significa que detalles de menos de 3.9 nm de la estructura real no pueden ser vistos en la imagen experimental. Por tanto podemos concluir que a este nivel de detalle el modelo propuesto de la cinta

gruesa es compatible, pero no debemos descartar modelos que tengan detalles por debajo de este umbral de resolución. En este sentido se deben realizar nuevas medidas intentando mejorar la resolución espacial en dos direcciones: por un lado tomando imágenes con más puntos y por otro lado, optimizando las condiciones experimentales, y en particular la composición del tampón.

3.6.2.2. Modelo cinta gruesa en aire ambiente

A la hora de extrapolar este tipo de simulaciones a los resultados obtenidos en aire ambiente se debe poner especial cuidado ya que hay que tener en cuenta la deshidratación y la deformación. La deshidratación se traduce en una pérdida de volumen, o sea que de una altura máxima de 20 nm en líquido se pasa a unos 16 nm en aire ambiente. Nótese que estas medidas están tomadas en los puntos de apoyo de la molécula con el substrato con lo que la deformación es menor. Si consideramos que la pérdida en volumen es tal que la altura disminuye en un ~20%, la nueva cinta tendrá unas dimensiones de 16 nm x 8 nm[5]. La deformación (parámetro ΔZ) la ajustaremos en función de los resultados experimentales.

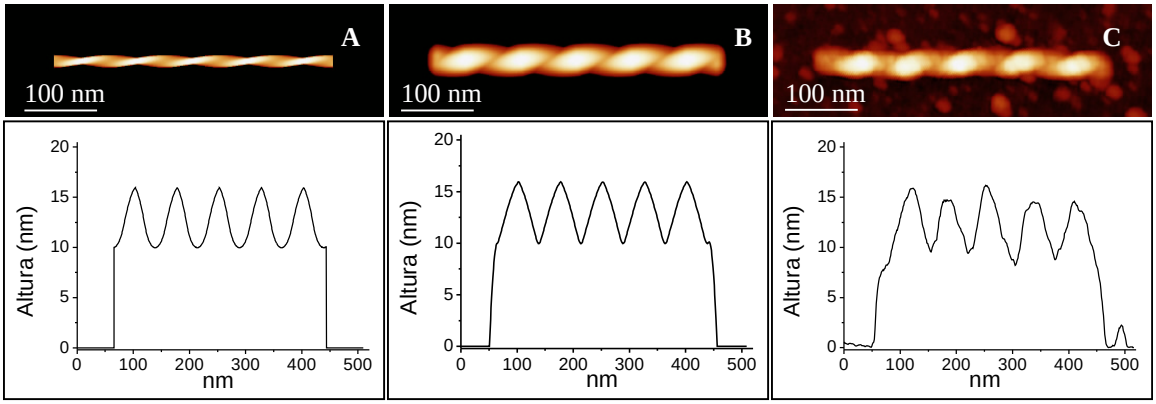


Figura 3.18. Simulación usando una cinta gruesa deshidratada (H:16 nm y W:8 nm) y deformada (ΔZ:2 nm) (A). La imagen simulada usando puntas de radio estándar(R_x=R_y=10) se muestra en (B) y la experimental en (C).

Podemos simular el paso de la punta del AFM sobre el modelo de la cinta gruesa deshidratada y deformada. Esta cinta se muestra en la Fig.3.18 A y sus dimensiones se pueden comprobar con el perfil que aparece justo debajo de la

[5] Nótese que se ha aplicado una *deshidratación* isótropa.

imagen. La imagen simulada se muestra en la parte B y la imagen experimental en C.

En lo que se refiere a los perfiles, la imagen simulada coincide bastante bien con la experimental. Sin embargo, el aspecto general de la imagen experimental es ligeramente distinto al aspecto de la imagen simulada. Mientras la simulación muestra una estructura bastante compacta la imagen experimental muestra una estructura deformada en la que se identifican, principalmente, dos niveles de alturas dentro de la molécula, uno que se asocia a los puntos de apoyo con el substrato y otro nivel asociado a las regiones comprendidas entre estos puntos. Muy posiblemente la fuerte interacción con el substrato está tirando de esta región con lo que deforma su estructura. En efecto, la subestructura visible en las medidas realizadas al aire (Fig.3.9) posiblemente se debe a la rotura de las zonas de interacción entre los diferentes dominios o subunidades de la proteína tau. La proteína se asocia con ella misma de una forma compacta en el medio líquido pero pierde esta estructura compacta en aire ambiente.

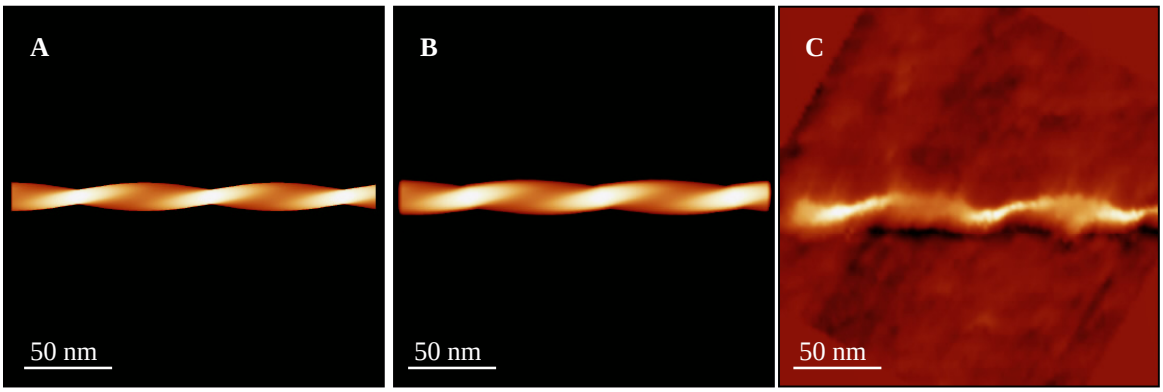


Figura 3.19. Simulación usando una cinta gruesa deshidratada (H:16 nm y W:8 nm) y deformada (ΔZ:4 nm) (A). La imagen simulada usando puntas de radio ultra-fino (R_x=R_y=0.5) se muestra en B y la experimental en C

Podemos repetir la simulación con las puntas de radio ultra-fino. Las imágenes correspondientes a este experimento se muestran en la Fig.3.19. En este caso el acuerdo entre la imagen experimental y la simulada no es excesivamente bueno, debido principalmente al grosor de la cinta empleada. Una de las razones por las que la molécula de la imagen experimental presenta un espesor tan pequeño puede ser debido al contacto de la punta con el PHF. Se sabe que el empleo de este tipo de puntas conlleva en muchos casos contacto con

la superficie con lo que se estaría añadiendo una deformación adicional, que podría traducirse en la medida de un grosor menor en los perfiles tomados en la zona de máximos. Además, la altura medida sobre esta molécula en la zona de mínimos es de tan sólo 8 nm (ver perfil Fig.3.11 C), valor muy inferior al medido con las puntas de radio estándar que, presumiblemente, no tocan la superficie. Adicionalmente, debemos tener en cuenta que la resolución de esta imagen experimental no es óptima (1.9 nm/punto).

El modelo basado en una cinta gruesa proporciona buenos resultados en lo que se refiere a las dimensiones de los PHFs ($H_{máx}$ y $H_{mín}$) medidos tanto en aire como en medio líquido. Asimismo, la forma general de la molécula se reproduce bastante bien en las simulaciones llevadas a cabo en medio líquido, pero falla al simular las imágenes obtenidas en aire ambiente. A juzgar por las imágenes el principal problema es que el grosor que la cinta posee en los extremos no es compatible con las medidas experimentales obtenidas, principalmente, con la punta de radio ultra-fino.

3.6.2.3. Modelo Wischik-Crowther en líquido

El modelo propuesto por Wischik y Crowther es, sin duda, más complejo que el modelo de la cinta gruesa (Fig.3.15 B). En este modelo la fibra está compuesta de pequeños dominios de 5 nm, con lo que tenemos hendiduras de 2.5 nm entre las fronteras de los dominios. Como ya hemos visto este número está en el umbral de la resolución lateral instrumental de las imágenes experimentales obtenidas en medio líquido.

En la Fig.3.20 A se muestra la imagen del modelo empleado, en (B) aparece la simulación del paso de una punta de parámetros R_x=R_y=8 nm que se puede comparar con la imagen experimental (parte C de la Fig.3.20).

La comparación de la imagen simulada con la experimental nos revela que en este caso imágenes de alta resolución debieran resolver la estructura interna de la fibra tal y como aparece en la simulación. En particular la simulación muestra unas marcas características (ver flechas) que también se aprecian en los datos experimentales. Estos detalles no aparecen en los perfiles correspondientes al modelo de la cinta gruesa (Fig.3.17). De manera similar los perfiles transversales de la simulación del modelo Wischik-Crowther se muestran en la Fig.3.21. En

concreto se obtienen tres tipos distintos, con una, dos y tres protuberancias que se identifican con los dominios de las subunidades. Estos perfiles están simulados a alta resolución (0.68 nm/punto).

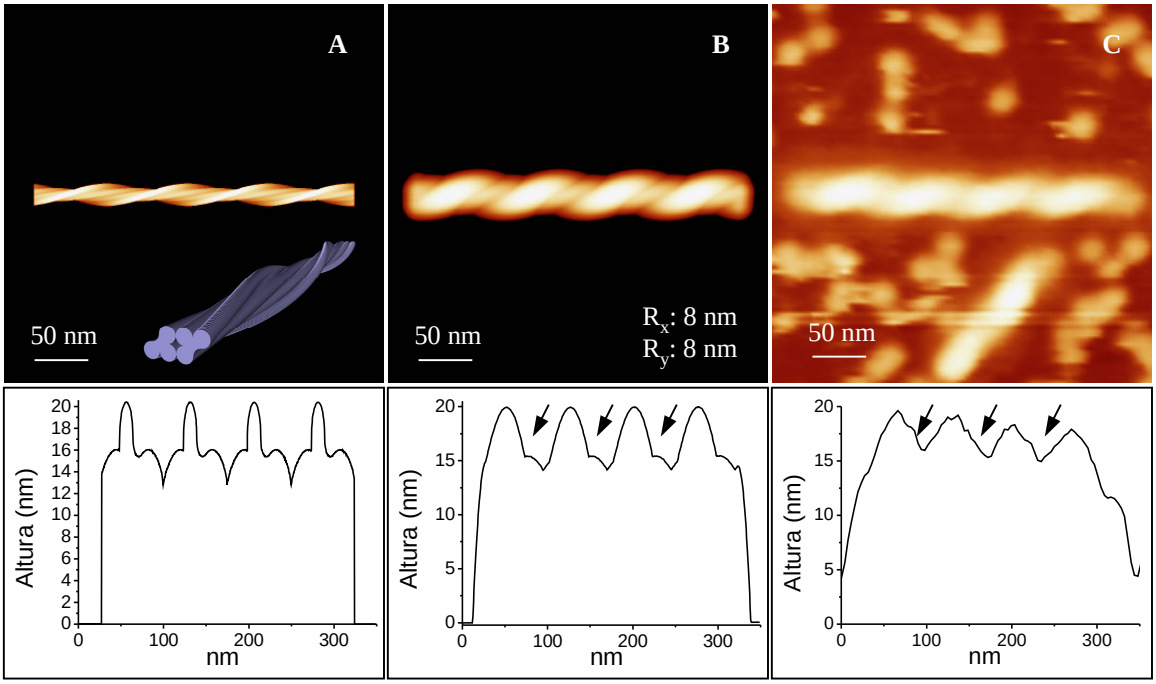


Figura 3.20. Simulación del paso de una punta de parámetros R_x: 8 nm y R_y: 8 nm por el modelo Wischik-Crowther de dimensiones W: 10 nm y H: 20 nm, R: 5 nm (A). La imagen simulada (B) se puede comparar con la obtenida experimentalmente en medio líquido (C). Los perfiles longitudinales de las tres imágenes aparecen en la parte inferior. Las flechas indican unas marcas características que aparecen tanto en la imagen simulada como en la experimental.

Un análisis cuidadoso de los perfiles experimentales nos muestra que en algunos casos también aparecen perfiles que se asemejan a los simulados (Fig.3.22). En particular a aquellos en los que aparece una pequeña hendidura en la parte central (Fig.3.22 B), aspecto éste visto en las imágenes obtenidas al aire con las puntas finas (Fig.3.11 C) y en otros trabajos publicados (Pollanen et al. 1997) . Sin embargo la baja resolución de las imágenes nos obliga a ser cautos a la hora de confirmar de manera rotunda este modelo.

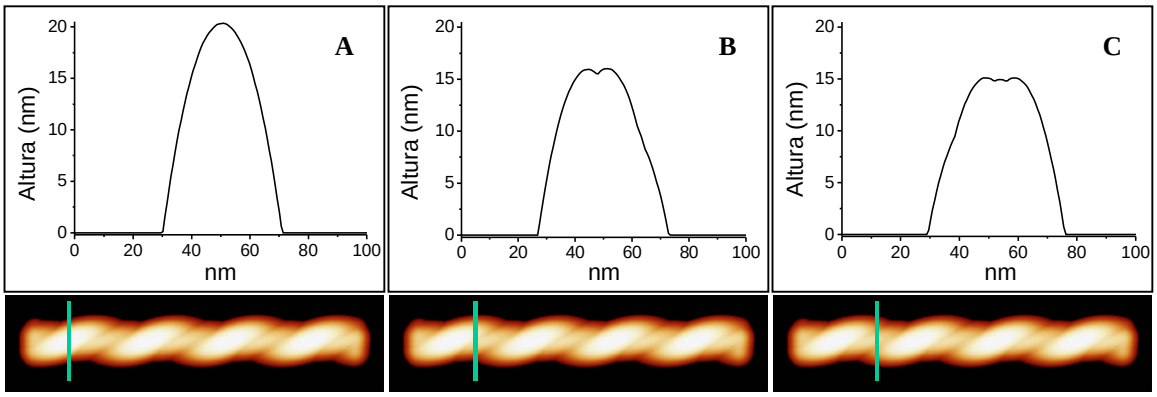


Figura 3.21. Perfiles característicos de la simulación del paso de una punta de parámetros R_x: 8 nm y R_y: 8 nm sobre el modelo de Wischik-Crowther. En este caso se detectan tres perfiles característicos con una (A), dos (B) y hasta tres (C) protuberancias. (resolución lateral: 0.68 nm/punto).

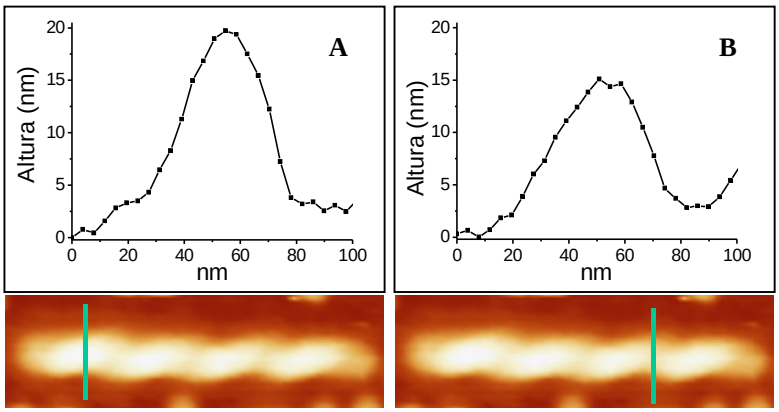


Figura 3.22. Algunos perfiles experimentales obtenidos en medio líquido sobre un PHF son similares a los obtenidos de la simulación (Resolución lateral:3.9 nm/punto)

3.6.2.4. Modelo Wischik-Crowther en aire ambiente

De manera similar a como se hizo con el modelo de la cinta gruesa podemos modificar el modelo de Wischik-Crowther para las simulaciones de las imágenes obtenidas en aire ambiente. Las dimensiones de la molécula deshidratada son *H*:16 nm y *W*:8 nm.

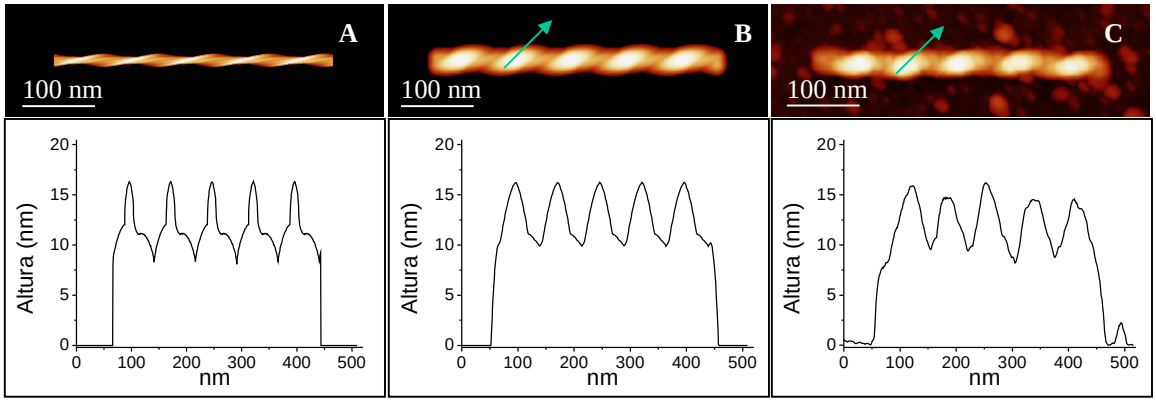


Figura 3.23. Simulación usando el modelo de Wischik-Crowther de dimensiones H:16 nm y W:8 nm al que se le ha aplicado una deformación (ΔZ:2 nm) (A). La imagen simulada usando puntas de radio estándar, R_x=R_y=10, se muestra en (B) y la experimental en (C).

En la Fig.3.23 se muestran las simulaciones correspondientes a las puntas de radio estándar. Como podemos comprobar la simulación y el experimento tienen un acuerdo bastante bueno, no sólo en las magnitudes *macroscópicas* (alturas) sino también en los detalles y en particular en la orientación del giro (ver flecha en B). Como vemos tanto en aire ambiente como en líquido este modelo presenta características compatibles con los datos obtenidos experimentalmente.

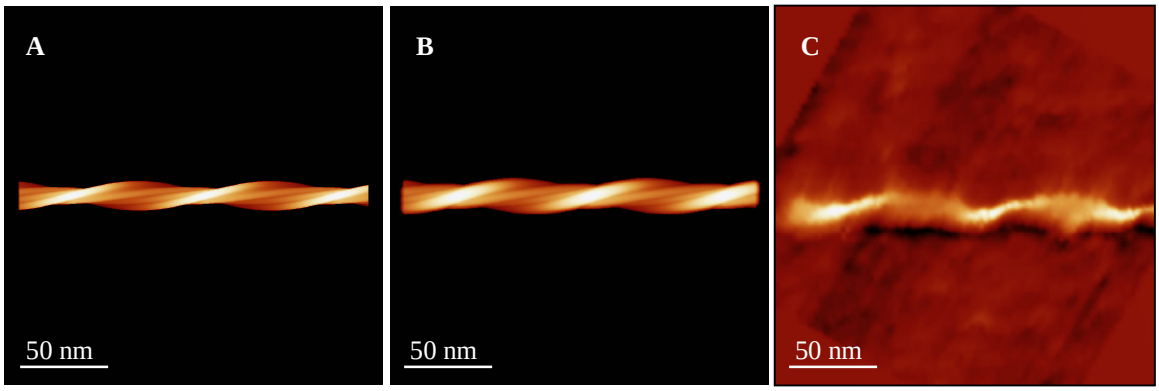


Figura 3.24. Simulación usando el modelo de Wischik-Crowther para aire ambiente, H:16 nm y W:8 nm, con una deformación ΔZ:4 nm, (A). La imagen simulada usando puntas de radio ultra-fino (R_x=R_y=0.5) se muestra en (B) y la experimental en (C).

La simulación para la imagen obtenida con la punta de radio ultra-fino se muestra en la Fig.3.24. En este caso la imagen simulada y la experimental coinciden bastante bien a no ser por los detalles interiores que aparecen en la

simulación que no se ven en la imagen experimental. Este modelo se caracteriza por ser ancho en la parte central y fino en los bordes, aspecto que favorece la comparación con la imagen experimental que presenta al PHF como una cinta de pequeño espesor.

En general, las simulaciones usando el modelo de Wischik-Crowther dan un acuerdo bastante bueno con las imágenes experimentales. Las magnitudes correspondientes a $H_{máx}$ y $H_{mín}$ coinciden nuevamente tanto en el modelo propuesto para líquido como en el modelo modificado empleado en aire ambiente. Este modelo reproduce de una manera muy buena el sentido del giro de la hélice y también el pequeño espesor de la fibra medida al aire gracias a que la molécula según este modelo es relativamente fina en los bordes. El principal problema que se encuentra en las imágenes experimentales es la ausencia de los detalles interiores que muestra la simulación, aunque levemente se intuyen en algunos perfiles medidos en medio líquido. Esto se puede explicar de dos formas: o bien no tenemos resolución suficiente para ver estos detalles o bien, simplemente, no los vemos porque no están. Respecto a la primera razón, bien es cierto que las imágenes tienen una resolución típica de 2 nm/punto, que está en el umbral de resolución para ver estas estructuras tan pequeñas. En este punto es conveniente trabajar más. Respecto a la segunda razón, el modelo empleado supone la existencia de grandes hendiduras entre dominios (de 2.5 nm de profundidad) que posiblemente no sean tan grandes. Si reducimos la profundidad de estas hendiduras tal y como se muestra en la Fig.3.25, las imágenes simuladas no presentarían estos detalles y el acuerdo con las experimentales sería mejor.

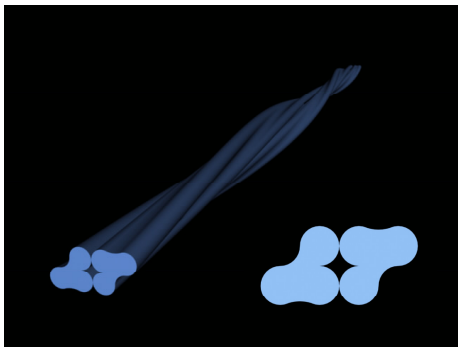


Figura 3.25. Modelo Wischik-Crowther en el que se ha reducido las hendiduras entre dominios para adaptarse a los datos experimentales en que la estructura interior debida a estas hendiduras no es visible.

3.6.2.5. Conclusiones

Elaborar un modelo que explique las medidas experimentales obtenidas en los diferentes ambientes y con distintos tipos de puntas no es sencillo. Las imágenes obtenidas en medio líquido, que presumiblemente nos muestran la molécula tal y como es cuando se encuentra biológicamente activa, nos indican que estamos ante una estructura que es helicoidal y que es relativamente gruesa en la parte central. Este dato nos lleva a considerar dos tipos de modelos: uno basado en una cinta y otro basado en el acople de dos cintas donde se distinguen regiones o distintos dominios. Las dimensiones de ambos modelos se ajustan a partir de las imágenes experimentales obtenidas en medio líquido. La posterior evaluación de estos modelos con las imágenes obtenidas en aire ambiente nos obliga a aplicar ciertas modificaciones sobre los mismos. En aire las moléculas biológicas sufren básicamente dos procesos: deshidratación y deformación. Simular la deshidratación es relativamente sencillo pues simplemente podemos reducir las dimensiones de la molécula. Simular la deformación no lo es tanto y en este caso se deben aplicar modificaciones según el criterio razonable de cada uno. Para el caso de una cinta helicoidal que se apoya sobre el substrato en ciertos puntos parece razonable pensar que la mayor deformación ocurre precisamente entre los puntos de apoyo.

Una vez establecidos los modelos tanto para medio líquido como para aire ambiente procedimos a la simulación de las imágenes que un AFM obtendría sobre estas estructuras usando los dos tipos de puntas empleadas. En líneas generales ambos modelos reproducen bastante bien la estructura general medida de los PHFs. Tanto en aire como en medio líquido las alturas en la parte de máximos como en la parte de mínimos se consiguen. Sin embargo, ambos modelos se diferencian en los pequeños detalles y principalmente con las medidas obtenidas en aire ambiente. La principal diferencia entre los dos modelos empleados es que uno es fino en la zona donde los PHFs se apoyan sobre el substrato y el otro no. Esta diferencia hace que nos inclinemos más por el modelo de Wischik-Crowther que por el de una cinta gruesa. Por otra parte, con la resolución lateral de las imágenes experimentales no se distinguen los detalles correspondientes a las fronteras de dominio que se observan en las simulaciones en el modelo de Wischik-Crowther. Ya que el tamaño del dominio y de su frontera es una magnitud que podemos ajustar, no es este aspecto un grave problema ya que posiblemente estas hendiduras sean tan pequeñas que no las vemos con nuestra

resolución experimental. En esta línea es importante notar que lo verdaderamente relevante son las imágenes experimentales y que estos modelos se sustentan en las mismas y en su resolución. Imágenes experimentales de mayor resolución obligarían, posiblemente, a readaptar los modelos propuestos en este capítulo.

Otra conclusión relevante es la importancia que tiene la obtención de imágenes de moléculas biológicas en medio nativo siempre que se quiera estudiar su estructura. En este contexto debemos tener en cuenta que prácticamente todas las imágenes de los PHFs disponibles en la literatura están obtenidas con microscopía electrónica que opera en condiciones de alto vacío y por tanto las moléculas biológicas no se encuentran en su medio fisiológico. Esto significa que la elaboración de modelos que expliquen las imágenes en aire ambiente no tienen porque coincidir con las imágenes obtenidas en medio líquido, cuando es precisamente en este medio en el que la molécula presenta su estructura natural.

3.7. Experimentos con filamentos fabricados *in vitro*

Como ya sabemos la presencia de PHFs en los cerebros de pacientes está íntimamente relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Una aproximación hacia la búsqueda de un tratamiento de prevención o terapéutico de esta enfermedad es la caracterización de estas estructuras y estudiar cómo diferentes tratamientos pueden alterar su estructura o simplemente evitar que se produzcan estos filamentos. Esta aproximación, *top to down* es la tratada en los apartados precedentes. Otra aproximación que podríamos denominar desde *down to top* consiste en el estudio de los mecanismos que gobiernan la agregación de tau, componente esencial de los PHFs, en forma de filamentos. Si somos capaces de crear PHFs a partir de tau de manera artificial en el laboratorio, posiblemente también seamos capaces de podremos elaborar fármacos para inhibir su producción. Esta segunda aproximación es la que trato en este apartado. En este campo el AFM es una herramienta poderosa ya que permite la caracterización estructural con precisión nanométrica de los filamentos fabricados *in vitro* y compararlos con la estructura de los PHFs.

3.7.1. La proteína tau

La proteína tau fue descubierta casi simultáneamente en Estados Unidos y en Europa alrededor del año 1975 (Weingarten et al. 1975; Fellows et al. 1977). Proviene de un único gen que contiene por lo menos 16 exones. La transcripción o no de estas secuencias de ADN da lugar a las diferentes isoformas de tau, que son 6. Las isoformas de tau tienen alrededor de 450 aminoácidos.

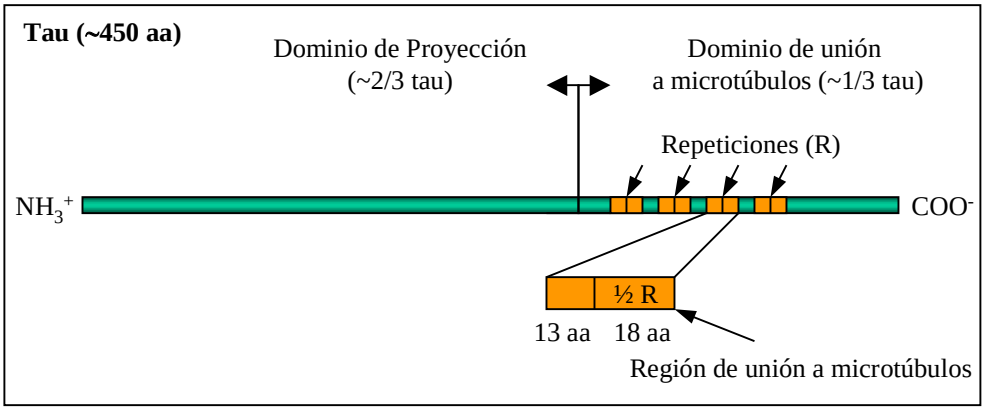


Figura 3.26. Esquema que muestra los diferentes dominios de la proteína tau. En primer plano se muestra la media repetición empleada en los experimentos realizados sobre filamentos fabricados in vitro.

Las isoformas de tau se dividen en dos grandes dominios, uno que contiene el extremo amino terminal y ~2/3 de la molécula (dominio de proyección), y el dominio de unión a los microtúbulos que contiene el extremo carboxilo terminal (~1/3 de la molécula). El dominio de unión a microtúbulos contiene 3 o 4 secuencias de 31 o 32 residuos, similares pero no idénticas, que se repiten. Cada una de estas repeticiones (R) se puede dividir en 2 partes, una compuesta de 18 residuos que contiene la región mínima con capacidad de unirse a tubulina, y otra parte mucho menos conservada de 13 o 14 residuos. En la Fig.3.26 se muestra un esquema de la proteína tau donde aparece con 4 repeticiones.

3.7.2. Filamentos in vitro formados por ½ R de tau

Los primeros experimentos realizados con tau recombinante emplearon una pequeña parte de la proteína tau. En concreto se utilizó la parte de la tercera repetición que está formada por tan sólo 18 aminoácidos, que se asocia a la región de unión a microtúbulos (ver esquema Fig.3.26). El polipéptido empleado se

fabricó artificialmente, con las ventajas que esto supone: grandes cantidades y gran pureza. Este pequeño polipéptido es capaz de asociarse con otros idénticos a él y polimerizar en forma de filamentos. Las imágenes de AFM de estas estructuras se muestra en la Fig.3.27.

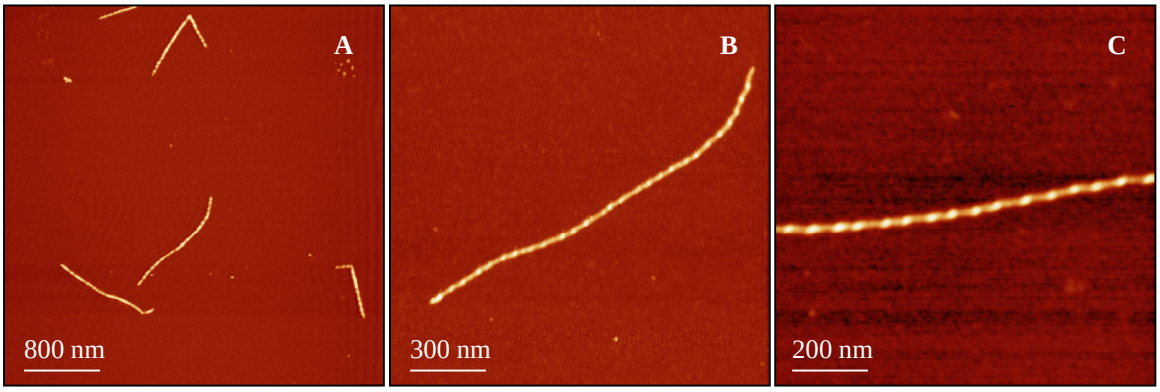


Figura 3.27. Imágenes de AFM de filamentos fabricados in vitro a partir de la parte de la 3ª repetición de las secuencias de unión a microtúbulos.

Los filamentos fabricados *in vitro* presentan morfología helicoidal con giro a izquierdas aunque mucho menos marcada que los PHFs. Un aspecto relevante es que estos filamentos no presentan la cubierta difusa que estaba presente en los PHFs y que era visible en las imágenes de microscopía de fuerzas. Este resultado está de acuerdo con el modelo que asume que es la parte de las repeticiones la que se auto-ensambla mientras que las colas de los extremos amino y carboxilo terminal quedan expuestas al exterior recubriendo el núcleo del PHF. Ya que los filamentos fabricados *in vitro* carecen de estas colas las imágenes no muestran la cubierta difusa.

Las dimensiones de los filamentos *in vitro* presentan una altura típica de 6.8 nm en la parte superior y de 4.2 nm en la parte inferior con anchos a mitad de altura de 22 y 23 nm respectivamente (Fig.3.28 A y B). La periodicidad de estos filamentos se muestra y se compara con la de los PHFs a través de un histograma (Fig.3.29).

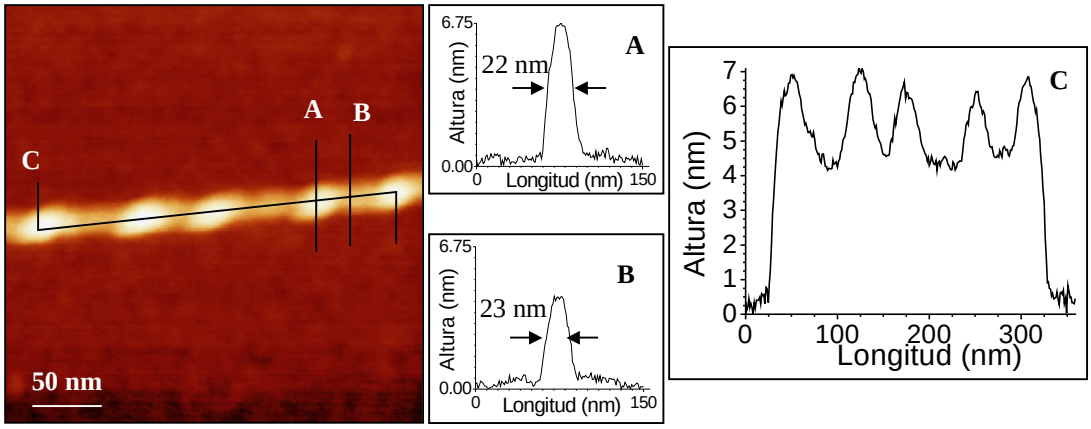


Figura 3.28. Dimensiones de los filamentos fabricados in-vitro con 1/2R de tau medidas usando una punta estándar de 15-20 nm de radio de curvatura.

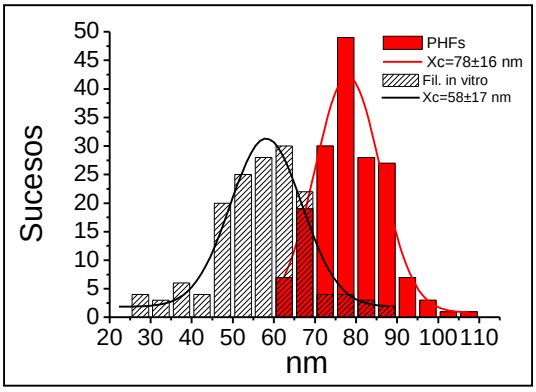


Figura 3.29. Histograma que muestra las periodicidades de los filamentos fabricados in-vitro con ½ R y de los PHFs.

En primer lugar el resultado que llama más la atención son las dimensiones de estos filamentos. ¿Cómo es posible que una fracción tan pequeña de la proteína tau de tan sólo 18 aminoácidos (aa) genere filamentos que difieren en un factor ~2.5 con las dimensiones de los PHFs que están generados con moléculas de tau completas (~450 aa)? Sin duda la respuesta no es sencilla. Lo que demuestran estas imágenes es que la región de tau empleada juega un papel fundamental en la estructura del filamento y en su helicidad. La periodicidad media que presentan los filamentos *in vitro* es de 58 nm, valor también cercano a la periodicidad media de los PHFs. Por otra parte, las imágenes de microscopía no muestran ninguna subestructura comparable con la obtenida sobre los PHFs. Los perfiles medidos en la parte inferior de la estructura muestran un perfil plano (Fig.3.28 B). Estos datos parecen indicar que este fragmento de tau es muy importante a la hora generar la estructura general del filamento pero que falta algo

más para darle el volumen necesario para conseguir las dimensiones y la periodicidad de los PHFs. Estos datos están de acuerdo con los modelos que consideran que el núcleo del PHF está formado por las repeticiones y que los extremos amino y carboxilo de tau no participan en la estructura. Posiblemente la subestructura descrita en secciones precedentes es inducida por las regiones de interacción de las repeticiones. Ya que en estos experimentos se ha empleado una fracción de una de ellas, no se advierte ninguna subestructura.

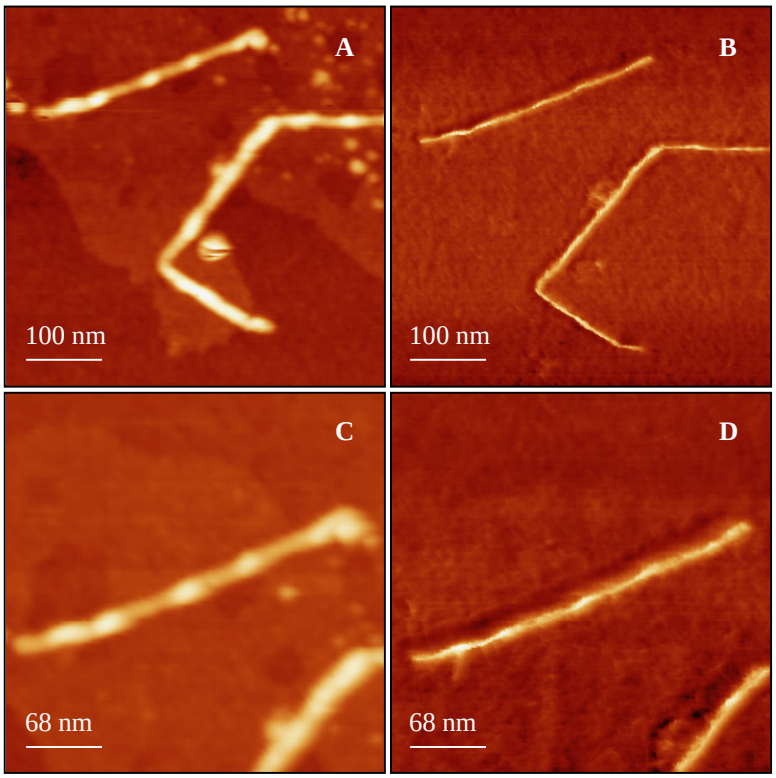


Figura 3.30. Imágenes de filamentos generados in vitro a partir de ½ R obtenidas con AFM usando una punta de radio ultra-fino (B y D) así como con una punta de radio estándar (A y C).

En la Fig.3.30 se muestra una serie de imágenes obtenidas usando una punta de radio ultra-fino. Estas imágenes muestran que es posible usar estas sondas en régimen atractivo o de no contacto y que en este caso la resolución que se obtiene es similar a la obtenida con las puntas de radio estándar (Fig.3.30 A y C) y en régimen repulsivo o de contacto y en este caso la resolución que se obtiene es mayor (Fig.3.30 B y D). Sin embargo, las imágenes no proporcionan información adicional a la descrita en las Figs.3.27 y 3.28. Estos resultados refuerzan la hipótesis del contacto sugerida en el análisis de las imágenes obtenidas con las

puntas de radio ultra-fino sobre los PHFs. La presencia de contacto puede llegar a deformar la estructura de estos polímeros, ya que como se ha comprobado en medio líquido son estructuras muy blandas.

3.7.3. Filamentos in vitro formados por tau completo

Recientemente, hemos realizado medidas sobre filamentos generados in vitro usando la proteína tau completa. Lamentablemente el proceso de purificación de esta proteína es un proceso extremadamente delicado del que depende la generación de buenos filamentos. Hasta la fecha, las medidas obtenidas nos muestran que la mayoría de las estructuras encontradas aparecen sin helicidad muy similares a los PHFs rectos. Algunas de las estas moléculas se muestran en la Fig.3.31. La altura de estos filamentos tiene un valor medio de 4.5±0.5 nm. Debemos recordar que la altura de los PHFs sin helicidad era de 11±1 nm.

Se ha demostrado que la presencia de heparina es un factor que ayuda a la polimerización y que su cantidad afecta a la helicidad. Este puede ser uno de los factores que justifiquen la presencia de filamentos rectos. Otra razón puede ser la presencia de múltiples isoformas de tau que generan este tipo de estructuras. De cualquier modo, todavía queda mucho trabajo por hacer en este campo.

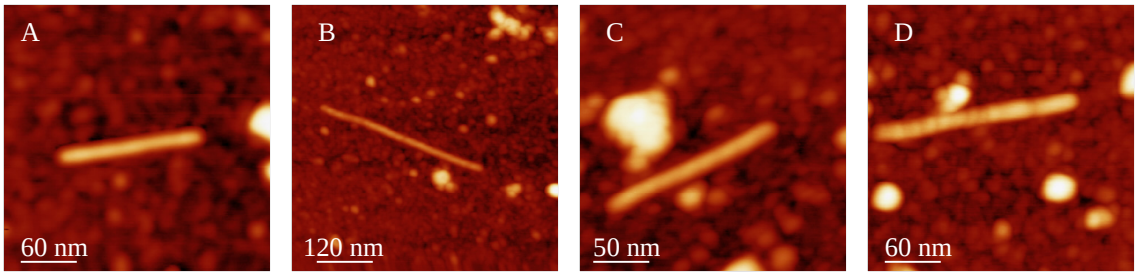


Figura 3.31. Imágenes de filamentos generados in vitro usando la proteína tau completa.

3.8. Resumen

La resolución de un microscopio de fuerzas debe distinguir entre resolución vertical, que viene limitada por el ruido térmico de la micropalanca (7-0.7 Å), y resolución lateral. Esta última es mucho más complicada de definir debido al carácter no lineal que tiene el proceso de formación de imagen en un AFM. La resolución lateral depende del radio de la punta; de la distancia punta-muestra y de

la longitud de decaimiento de la interacción. El método que alcanza la máxima resolución es el modo de contacto, con el que es posible obtener resolución lateral sub-nanométrica. Sobre muestras biológicas se alcanza esta resolución solamente sobre conjuntos ordenados de moléculas como cristales de proteínas dónde los efectos destructivos de las fuerzas laterales son menores. Sobre moléculas individuales se deben emplear modos que minimizan las fuerzas laterales como el DAFM y el JM. La resolución lateral que se alcanza en estas condiciones es de 10-15 nm.

La enfermedad de Alzheimer es una patología neurodegenerativa que causa demencia progresiva. Una de las marcas histológicas de la enfermedad son los ovillos neurofibrilares cuyo componente principal son los filamentos apareados helicoidales. Estas estructuras están compuestas por una proteína llamada tau.

Se han caracterizado estos filamentos en aire ambiente y en medio líquido usando dos tipos de sondas, de radio estándar y de radio ultra-fino y sobre dos tipos de substratos: mica y grafito. Los resultados de AFM muestran que los PHFs son estructuras de morfología helicoidal con giro a izquierdas con una periodicidad de ~75 nm y cuyas dimensiones difieren dependiendo del medio en el que se realizan las medidas. En aire ambiente las alturas medias correspondientes a los máximos y mínimos son 16 y 10 nm respectivamente mientras que en medio líquido estos valores son 20 y 15 nm. En aire ambiente se advierte una subestructura que se achaca a los procesos de deshidratación y deformación que sufren estas estructuras en este medio. En medio líquido la estructura tridimensional de los PHFs se preserva cuando se observan usando el modo JM. Las imágenes obtenidas con AFM resuelven la cubierta difusa que rodea los PHFs y que se atribuye a ambos extremos, amino y carboxilo terminal, de la proteína tau.

Se han puesto a prueba dos modelos que intentan explicar la estructura de los PHFs: uno basado en una cinta gruesa y otro formado por dos dominios con tres subunidades cada uno dispuestas en forma de C (modelo Wischik-Crowther). Estos dos modelos se han modificado para simular las condiciones presentes en aire ambiente. Las dimensiones de los modelos se ajustaron a partir de las medidas obtenidas en medio líquido.

Una vez establecidos los modelos de trabajo se han realizado simulaciones que intentan reproducir el proceso de medida usado con un AFM. Estas

simulaciones se han realizado tanto para las imágenes obtenidas en aire ambiente como para las obtenidas en medio líquido y usando los dos modelos propuestos. Los resultados muestran que el modelo de Wischik-Crowther se adapta mejor a los resultados experimentales, pero éstos no llegan a resolver con claridad la presencia de las subunidades.

Se han presentado también importantes resultados obtenidos con filamentos fabricados *in vitro* a partir de un pequeño fragmento de 18 aa de la proteína tau y a partir de la proteína tau completa. Las imágenes de microscopía de fuerzas nos muestran que el fragmento de ½ R empleado juega un papel fundamental en la estructura del PHF pero que posiblemente el núcleo central del polímero está formado por una fracción mayor de tau. Los experimentos preliminares realizados usando la proteína tau completa muestran filamentos sin helicidad, posiblemente debido a la presencia de numerosas isoformas de tau en el proceso de purificación.

Anexo al capítulo 3

3-A. Algoritmo de la dilación

El proceso de la dilación empleado en este capítulo está basado en la idea propuesta por Villarubia (Villarrubia. 1996) que viene descrita en la Fig.3-A-1.

Por claridad nos restringimos a dos dimensiones. La ecuación de la punta (Ec. 3-8) se reduce a $p(x) = C_x \cdot x^2$ y si usamos el mismo origen de coordenadas para los dos objetos $p(x) = C_x \cdot (x - x_0)^2$. El objeto que queremos visualizar tiene como ecuación de superficie:

$$f(x) = \begin{cases} b & -a \le x \le a \\ 0 & -a > x \qquad a < x \end{cases} \tag{3-A-1}$$

El algoritmo consiste en tomar como altura z_0 del punto x_0 el valor máximo de la suma de la punta invertida y la superficie del objeto (*Máx(-p(x)+f(x))*).

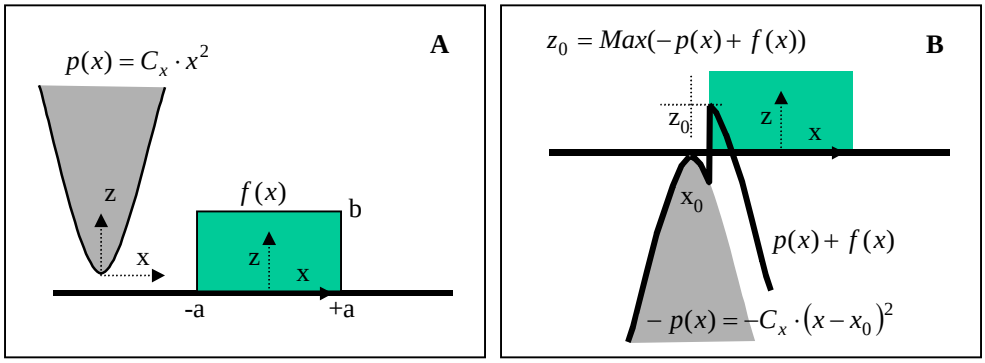


Figura 3-A-1. Proceso de dilación de una punta, p(x), sobre un objeto, f(x) (parte A). El algoritmo consiste en tomar como altura Z_0 del punto x_0 el valor máximo de la suma de –p(x) y f(x) (parte B).

La extensión a tres dimensiones es inmediata: la altura z_0 del punto (x_0,y_0) se obtiene del máximo (*Máx(-p(x,y)+f(x,y))*) siendo *p(x,y)* y *f(x,y)* las ecuaciones de la punta y del objeto en tres dimensiones respectivamente.

4. Interacciones entre biomoléculas

4.1. Introducción.

Desde el punto de vista de los avances recientes en física, siempre es sorprendente ver el desarrollo tan espectacular que se ha producido en los últimos años en bioquímica y biología molecular. Las bases de la física moderna se desarrollaron durante la primera mitad del siglo XX, hace ya mas de 50 años. Posiblemente el último gran descubrimiento fue el del transistor en 1947 por Bardeen, Shockley y Brattain en los Laboratorios Bell que supuso el inicio de todo el desarrollo tecnológico actual. Unos años más tarde se publicaba un modelo de la estructura del ADN que a lo largo de los años ha sido confirmado (Watson & Crick. 1953). Sin embargo, no sería hasta los años 70, con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, cuando la biología molecular inicia su despegue más espectacular. Prácticamente todo lo que se sabe en biología molecular, y ciertamente es mucho, se ha descubierto en los últimos 30 años. La bioquímica o biología molecular es, sin duda, la disciplina de la segunda mitad del siglo XX. Una descripción de los conceptos básicos de la biología molecular se resume en el Anexo A.

En la actualidad, ya se conoce el genoma de numerosos organismos entre los que se incluye el genoma humano. La era genómica en la cual se han

desarrollado poderosas técnicas de secuenciación esta tocando a su fin. Comienza ahora una nueva época en la que los científicos deberán comprender la funcionalidad de los miles de millones de genes descifrados, es decir averiguar qué es lo que hace cada uno (qué proteína codifica) y cómo funciona (cómo se regula su expresión). La regulación de la expresión génica es, por tanto, un campo de investigación tremendamente activo y muy complejo (ver Anexo A.4). Desde un punto de vista simplista, los genes se regulan a través de ciertas proteínas llamadas *factores transcripcionales*. Estas proteínas interaccionan con ciertas regiones del ADN e inducen la expresión o la represión del gen. A estas regiones se les denomina *regiones reguladoras*. Comienza una nueva era, la era proteómica, protagonizada por las interacciones entre proteínas y ADN y entre distintos tipos de proteínas. En este contexto las técnicas de manipulación y manejo de moléculas individuales como el AFM pueden desarrollar un papel esencial.

En este capítulo estudio las posibilidades del microscopio de fuerzas para caracterizar las interacciones entre factores transcripcionales y ADN y entre proteínas. En el capítulo anterior vimos que la atmósfera en la que se tomaban las medidas era importante a la hora de caracterizar estructuralmente una biomolécula. Ahora, no queremos estudiar su estructura sino medir el lugar donde interaccionan ADN y proteínas. En este contexto, para averiguar la posición en la que interaccionan estas biomoléculas no es necesario medir en medio líquido. La reacción bioquímica se realiza en el medio biológico apropiado para luego adsorber los complejos ADN-proteína sobre una superficie y tomar una imagen en aire ambiente usando el modo DAFM. Si el proceso de adsorción es rápido, como presumimos, la imagen AFM es similar a una fotografía tomada del líquido donde se lleva a cabo la reacción.

La parte bioquímica se desarrolló mayoritariamente en colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. F. Moreno del Dep. de bioquímica y biología molecular de la Universidad de Oviedo.

4.2. Identificación de secuencias reguladoras con el microscopio de fuerzas

Un modelo simplista de la molécula de ADN podría ser un hilo unidimensional en el que se colocan de manera secuencial las diferentes bases de tal forma que

el tamaño de cada base es constante y mide 3.4 Å (Mathews et al. 2000). Esto significa que con sólo medir la distancia desde uno de los extremos del hilo podemos saber sobre qué base estamos situados, siempre que la secuencia se conozca *a priori*. En la actualidad, existen técnicas de secuenciación que permiten determinar la disposición de las bases de una cadena de ADN desconocida con gran precisión. Por ello, sólo debemos preocuparnos de poder medir la distancia desde el extremo con la máxima precisión posible. Una manera de medir distancias en una molécula de ADN consiste en ajustar una línea poligonal sobre la imagen de la molécula (Fig.4.1). En este caso la distancia medida fue de 238±10 nm. Si tenemos en cuenta que el tamaño de los fragmentos de ADN utilizados era de 676 pb entonces obtenemos una relación de 0.35±0.02 nm/pb. Este método de medir distancias será el que emplearemos para localizar las secuencias involucradas en complejos ADN-proteína. Nótese la baja altura de la molécula si ésta se compara con el valor nominal (2 nm) deducido del modelo de Watson y Crick (Watson & Crick. 1953)[1].

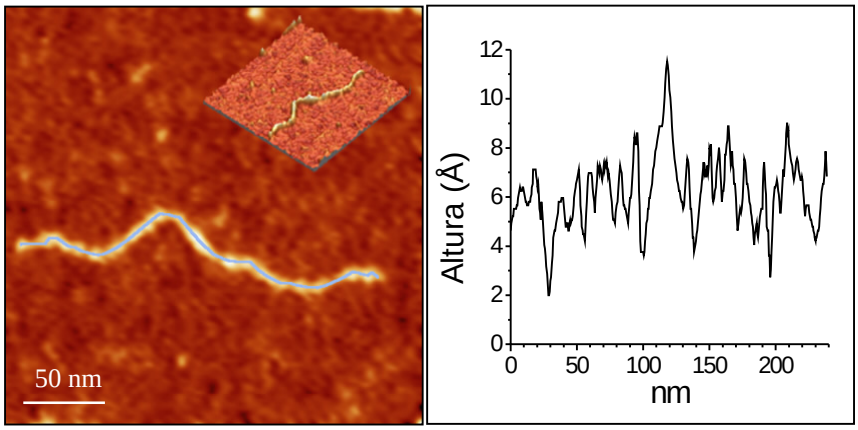
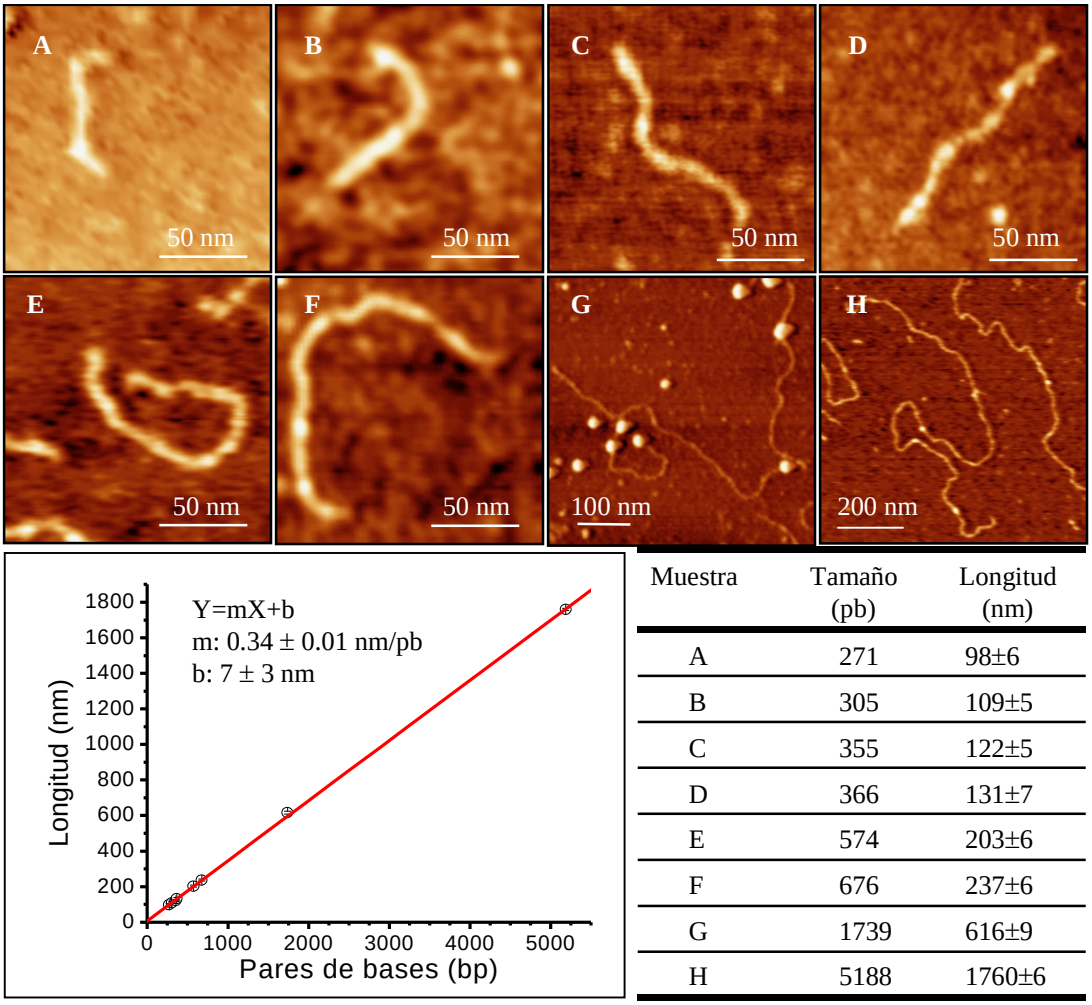


Figura 4.1. Medidas de distancias con el AFM. El método utilizado para medir distancias dentro de una cadena de ADN consiste en trazar una línea poligonal sobre su superficie y medir su longitud.

Ya que las medidas las vamos a realizar en aire ambiente debemos asegurarnos que los protocolos de preparación de muestras descritos en la sección 2.3.1 no introducen ninguna distorsión en el tamaño de las moléculas de ADN adsorbido. Para comprobar que así era se prepararon una serie de moléculas de ADN de distinta longitud que abarcaban un amplio rango de tamaños (271-

[1] Un análisis cuidadoso de las alturas de las moléculas de ADN medidas con AFM se hace en el Apto. 1.5.2.1

5188 pb). En concreto fueron empleados 8 tipos distintos de ADN de secuencia conocida. Estas moléculas se obtuvieron a partir de fragmentos mayores cortándolos con enzimas de restricción (ver Anexo A.5) o bien mediante PCR (ver Anexo A.9) y comprobados a través de una electroforesis en gel de agarosa (ver Anexo A.6).



Muestra	Tamaño (pb)	Longitud (nm)
A	271	98±6
B	305	109±5
C	355	122±5
D	366	131±7
E	574	203±6
F	676	237±6
G	1739	616±9
H	5188	1760±6

Figura 4.2. Moléculas de ADN de distintos tamaños, sobre las que se ha medido la longitud y se ha representado frente al tamaño de las moléculas (pb). La relación es lineal y tiene por pendiente 0.34±0.01 nm/pb.

En la Fig.4.2 se muestran las imágenes de AFM de las distintas moléculas. Las medidas de las distancias se realizaron usando el método descrito en la Fig.4.1. La longitud de las moléculas presenta un comportamiento lineal con el

número de pares de bases de cada una con una pendiente que vale 0.34±0.01 nm/pb (Fig.4.2 B) (Moreno-Herrero et al. 1999), valor que coincide con la distancia entre dos bases (Watson & Crick. 1953; Mathews et al. 2000). También vemos que el ajuste lineal pasa por el origen con una indeterminación de tan sólo 8 pb que corresponde a un tamaño de 2.5 nm. Este experimento confirma, en primer lugar, que el proceso de preparación de muestras empleado es adecuado y, en segundo lugar, que podemos usar el microscopio de fuerzas para medir distancias sobre moléculas de ADN sobre un espectro de tamaños muy amplio con una gran precisión.

Una vez visto que podemos medir distancias con gran precisión lo que haremos será ver dónde interaccionan ciertas proteínas con el ADN. En definitiva lo que queremos es localizar regiones importantes de ADN que regulan el funcionamiento del gen a través de la interacción con proteínas.

4.3. Interacción ADN-proteína

En la actualidad se conocen muchos factores transcripcionales, así como sus secuencias de unión a ADN. Este es el caso de la proteína Pho4, por ejemplo, de la que se sabe que enlaza a secuencias del tipo CACGTK[2]. En el genoma de numerosos organismos aparecen secuencias coincidentes con las de unión de distintos factores transcripcionales. Sin embargo, la gran mayoría de las predicciones de interacción no han sido todavía confirmadas. Las técnicas bioquímicas tradicionales para estos estudios — ensayos de retraso de la movilidad electroforética; deleciones seriadas de promotores o ensayos de DNAsa I footprinting — presentan numerosos problemas a la hora de tratar grandes fragmentos de DNA y son tremendamente ineficaces para abordar el análisis sistemático de todos los promotores de un genoma. Ya que mediante el AFM somos capaces de medir y localizar puntos sobre una cadena de ADN con una precisión de decenas de pares de bases, veamos si podemos usar esta técnica para localizar complejos ADN-proteína y ver si el AFM puede ser una técnica complementaria a las técnicas bioquímicas tradicionales.

[2] Ver el código de nucleótidos de una letra en la sección Abreviaturas.

En esta sección muestro los resultados de AFM del estudio de la interacción de las proteínas Pho4, Mig1 y Med8 con fragmentos grandes de promotores de los genes *PHO5*, *HXK2* y *SUC2* respectivamente.

4.3.1. El sistema control Pho4-PHO5

Para comprobar la validez de la idea de usar el microscopio de fuerzas para visualizar complejos ADN-proteína usamos como control el sistema Pho4-*PHO5*. La proteína Pho4 es un factor transcripcional involucrado en el metabolismo del fosfato y la represión de la glucosa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

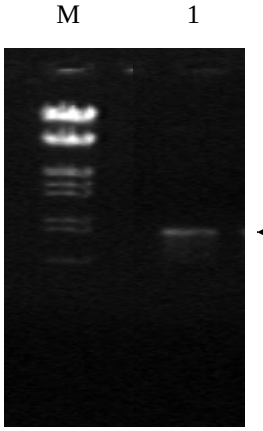


Figura 4.3. Amplificación mediante PCR del fragmento de ADN utilizado para los estudios de interacción de la proteína Pho4 y el promotor del gen PHO5.

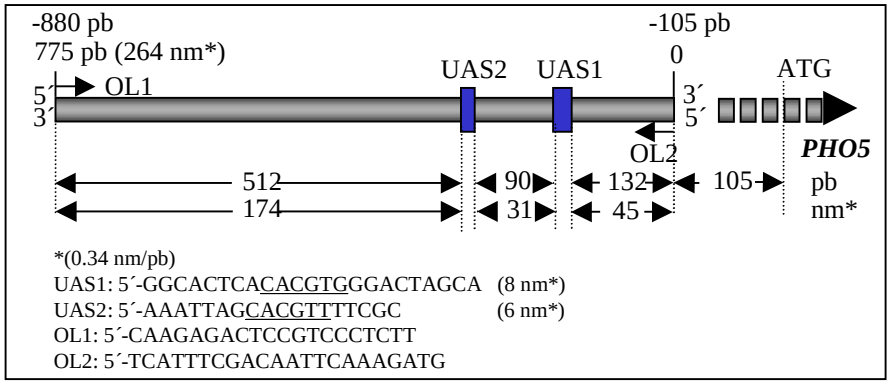


Figura 4.4. Esquema del fragmento del promotor del gen PHO5 utilizado para los experimentos control de interacciones ADN-proteína visualizadas con el microscopio de fuerzas.

El fragmento de ADN utilizado es una parte del promotor del gen *PHO5* que se fabricó mediante PCR usando los oligonucleótidos OL1 y OL2. En la Fig.4.3 se

muestra el producto de la PCR. Una única banda de 775 pb es visible en la fotografía del gel de agarosa. El esquema de este fragmento se muestra en la Fig.4.4. Este fragmento de ADN contiene dos regiones reguladoras UAS1 y UAS2 (secuencia activadora anterior o Upstream Activating Sequence) situadas a 132 pb y 245 pb desde uno de los extremos del fragmento del promotor.

La proteína Pho4 enlaza con secuencias del tipo CACGTK presentes en las dos regiones UAS que se muestran en la Fig.4.4. La proteína se obtuvo mediante expresión heteróloga. Este método funciona de la siguiente manera: en primer lugar se subclona el gen que codifica la proteína que se quiere purificar a un vector de expresión que contiene una secuencia que codifica para 6 Histidinas en el extremo amino terminal. Este ADN modificado se introduce en *E. coli* de forma que la propia maquinaria de la bacteria produce la proteína de interés con una cola de 6xHis. Una vez producida la proteína en la célula se inicia el proceso de purificación de la proteína de la bacteria mediante cromatografía de afinidad con columnas de Ni inmovilizado. El níquel es un elemento que se une a la Histidina. La técnica empleada en este proceso de purificación es hacer pasar el extracto proteico de la bacteria por esta columna de forma que la proteína que contiene la cola de 6xHis, que es la proteína que se quiere purificar, se quedará pegada a la columna. Luego se lava la columna para eliminar cualquier otra proteína no unida covalentemente al quelato de níquel y finalmente se eluyen las proteínas pegadas usando un tampón de imidazol.

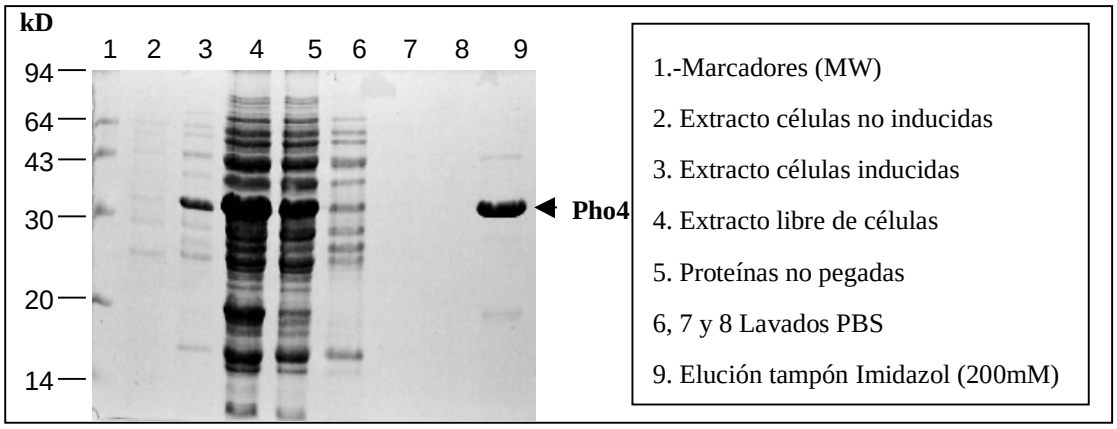


Figura 4.5. Electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes de las diferentes fracciones del proceso de purificación de la proteína Pho4 de S. cerevisiae.

El proceso de purificación de Pho4 mediante este procedimiento se muestra en la Fig.4.5. En la primera calle se muestran los marcadores de peso molecular. En la calle 2 aparece un extracto proteico de la bacteria sin transformar, es decir sin el vector de expresión. La calle 3 nos muestra el extracto proteico de las células transformadas e inducidas con IPTG (en las que se ha introducido el vector de expresión) y como es de esperar aparece una banda más oscura que nos muestra la movilidad de la proteína Pho4 en la electroforesis. Las calles siguientes, 4-8, nos muestran distintos pasos en el lavado de la columna y finalmente la calle 9 nos muestra el contenido del tubo en el que se ha eluído el contenido de la columna con el tampón de imidazol. Aparece de forma clara una única banda de masa molecular ~30 kDa que se identificó como la proteína Pho4.

Para estudiar la interacción de la proteína Pho4 con el promotor del gen *PHO5* con AFM, en primer lugar debemos ajustar la concentración de moléculas de ADN cuando se adsorben sobre mica. Mediante diluciones seriadas de la solución de ADN es posible conseguir que aparezcan una concentración de entre 5 y 10 moléculas de ADN por μm^2. A continuación se realiza la reacción de enlace entre el ADN y la proteína. La reacción se realizó en 50 mM Heppes (pH 7.5), 1 mM dithiothreitol, 80 mM NaCl e incluye el fragmento de ADN y la proteína a estudiar. La relación molécula de ADN/proteína se ajustó a 5/1 manteniendo la concentración de las moléculas de ADN libre al valor que se mencionó anteriormente (5-10 moléculas/μm^2). Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, 3 μl de la solución se mezclan con 1 μl de 110 mM $MgCl_2$ para facilitar que las moléculas se adhieran a la mica a través de los iones de magnesio. Los 4 μl finales se depositan sobre un disco de mica recién exfoliado y se aclaran con abundante agua destilada y desionizada y se secan con nitrógeno seco o con aire.

Los resultados de este experimento se muestran en la Fig.4.6. En la parte A podemos ver un campo general donde se observan distintos complejos. Se han encontrado tres tipos de complejos similares a los mostrados en la Fig.4.6 B, C y D. A partir de estos datos podemos medir la distancia desde un extremo de la molécula de ADN hasta la posición en la que aparece la proteína y representar los datos en forma de histograma (Fig.4.6).

Desde el punto de vista del microscopio de fuerzas ambos extremos del ADN son idénticos. Por esta razón el diseño del promotor se hizo de tal manera que las regiones de interacción se localizaran asimétricamente respecto del eje central de

la molécula. De esta forma lo que hacemos es medir la distancia más corta entre las proteínas y el extremo de la molécula de ADN. Notar que en la Fig.4.6 tenemos datos que se encuentran por encima de $L/2$, siendo L la longitud de la molécula, esto es debido a que a veces más de una proteína aparece asociada al ADN. Obviamente alguna de las dos esta interactuando de manera no específica. Este tipo de experimentos conllevan un error experimental asociado a la medida de complejos inespecíficos.

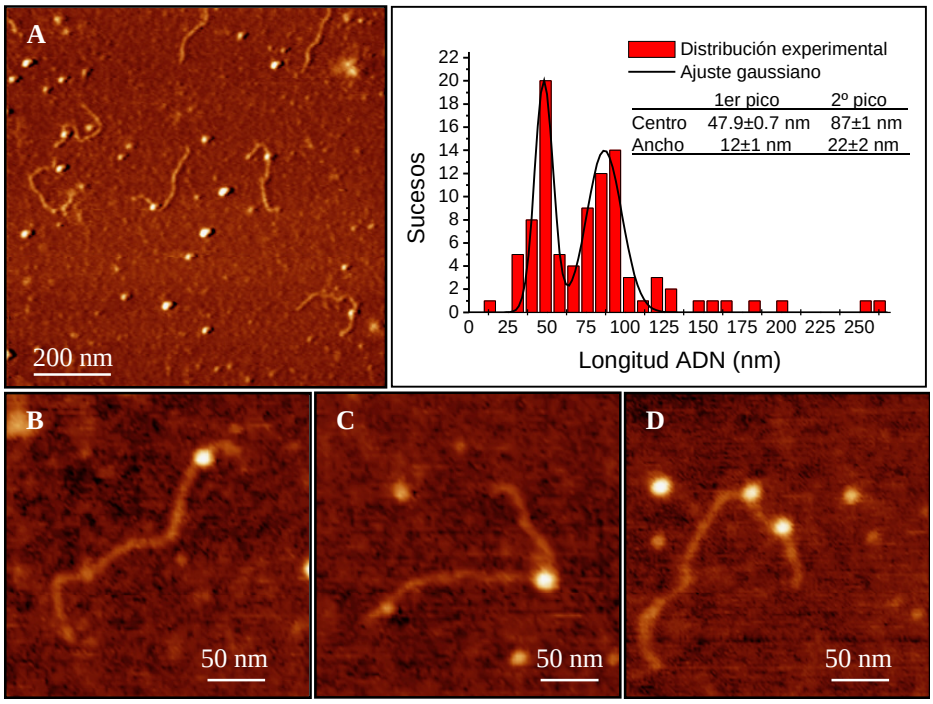


Figura 4.6. Imágenes de AFM que muestran la interacción entre la proteína Pho4 y un fragmento del promotor del gen PHO5. La parte A muestra un campo general en el que varios complejos son visibles. Las partes B, C y D muestran los tres tipos de complejos encontrados. El análisis estadístico de las posiciones de los complejos encontrados nos muestra una distribución bimodal centrada en dos posiciones que son compatibles con las regiones reguladoras del promotor.

Los resultados del análisis estadístico (mas de 100 complejos) muestran una distribución bimodal con dos puntos de máxima probabilidad situados a 48±1 nm y 87±1 nm desde uno de los extremos de la molécula de ADN. Si comparamos estos valores con las posiciones en las que aparecen las secuencias de unión de Pho4 en el fragmento de ADN empleado (Fig.4.4) vemos que estas dos posiciones están directamente relacionadas con la proteína Pho4 interaccionando con las secuencias UAS1 y UAS2 presentes en el fragmento de ADN empleado. Las

anchuras de los picos a media altura son 12 nm (~35 bp) y 22 nm (65 bp) respectivamente.

Establecer cuál es la resolución en el posicionamiento de las proteínas no es sencillo en este tipo de experimentos. Por un lado tenemos el límite dado por el tamaño de la proteína. Este tamaño es ~3 nm. Esto significa que, aún cuando todos los complejos sean específicos, la proteína puede colocarse sobre la región reguladora con una indeterminación de ±3 nm. Sin embargo, ya que las puntas empleadas tienen radios de curvatura mayores (10-20 nm) siempre tendremos un fenómeno de dilación en esta magnitud. Por otra parte, la presencia de interacciones inespecíficas de las proteínas con el ADN también introducen un ruido adicional. Todos estos factores están incluidos de alguna manera en la gráfica del histograma. Por tanto podemos tomar como indeterminación la anchura del ajuste gaussiano para cada uno de los picos. Vemos que estos valores están comprendidos entre 10 y 20 nm, valores que coinciden con los radios de curvatura de las puntas empleadas.

A partir de los resultados obtenidos sobre el sistema control Pho4-*PHO5* nos propusimos utilizar la técnica del AFM para identificar secuencias reguladoras o probar interacciones entre ADN y proteínas en las que no había evidencia bioquímica de su interacción.

4.3.2. El sistema Mig1-*HXK2*

La glucosa regula el uso del carbono en *S. cerevisiae*, principalmente, inhibiendo la trascripción de numerosos genes. Este mecanismo, llamado represión por glucosa, asegura el uso preferencial de la glucosa frente a otras fuentes de carbono alternativas. Todavía no se conoce con exactitud el mecanismo molecular de la represión de la glucosa aunque ya se han identificado varios genes involucrados en él. Uno de esto genes es *MIG1* que codifica para la proteína Mig1. Mig1 se une al motivo WWWWWN(G/C)(C/T)GGGG. Si realizamos una búsqueda de esta secuencia en el genoma de la levadura encontramos que alrededor de 340 promotores de distintos genes poseen esta secuencia una o varias veces. Sin embargo, hasta la fecha sólo se ha encontrado que sea funcional en la regulación de 10 genes. Uno de los genes que contiene la secuencia consenso de unión de Mig1 en su promotor es el gen *HXK2*, que codifica para la enzima hexoquinasa 2 de *S. cerevisiae*. El promotor de este gen presenta la secuencia consenso de unión

de Mig1 por dos veces, aunque nunca se ha demostrado que la proteína se una a estas secuencias.

Un esquema del fragmento del promotor empleado en los experimentos de interacción se muestra en la Fig.4.7. Este fragmento del promotor de *HXK2* se fabricó mediante PCR, tal y como se ha indicado anteriormente para el promotor *PHO5*, usando los oligonucleótidos OL3 y OL4 como cebadores. El fragmento de ADN sintetizado tiene una longitud de 570 pb y presenta dos secuencias consenso de unión de Mig1 situadas a 133 pb y 162 pb desde uno de los extremos de la molécula de ADN. La separación entre las dos zonas de interacción es de tan sólo 22 pb (7 nm).

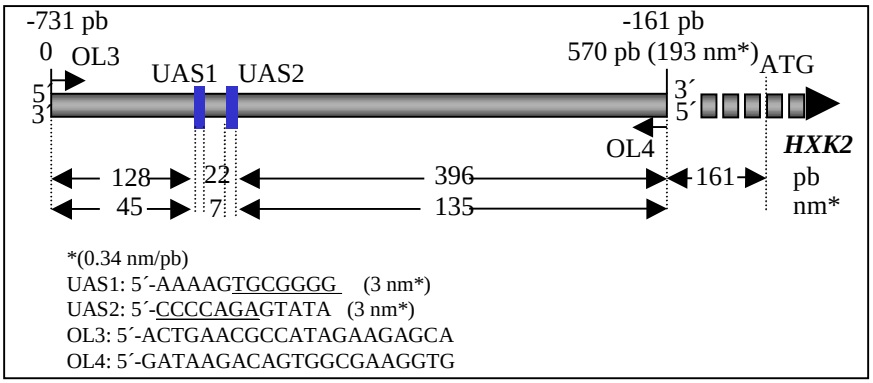


Figura 4.7. Esquema del fragmento del promotor del gen HXK2 empleado para estudiar la interacción con la proteína Mig1.

Para obtener la proteína lo que se hizo fue expresar el gen *MIG1* de *S. cerevisiae* en *E. coli* como una proteína de fusión con GST (Glutation-S-Transferasa). De esta manera se elimina cualquier tipo de contaminación con otras proteínas de levadura.

Una de las maneras de analizar una interacción ADN-proteína es mediante un ensayo de retraso en una electroforesis en condiciones nativas. La idea consiste en hacer correr por dos calles distintas la cadena de ADN que se quiere estudiar y por la otra calle la proteína junto con el ADN. Si la proteína interacciona con el ADN entonces el complejo tendrá una masa y carga distinta a la de la cadena de ADN libre de interacción y por consiguiente tendrá una movilidad electroforética distinta. La fotografía mostrada en la Fig.4.8 es la de un gel de poliacrylamida en condiciones nativas donde se ha realizado el ensayo de retraso

de Mig1. En este caso se empleó un pequeño fragmento (10-20 pb) de ADN marcado radiactivamente (^{32}P MIG1$_{HXK2}$) que contiene la secuencia de unión de Mig1 y se le hizo reaccionar con la proteína de fusión GST-Mig1. El ADN sin proteína se hizo correr por la calle 1 como control y junto con la proteína GST-Mig1 por las calles 2, 3 y 4 en competición con el ADN sin marcar (calle 3) y ADN inespecífico de timo de ternera (calle 4). En la calle 5 la proteína usada fue sólo GST.

Como podemos ver en la Fig.4.8 aparecen dos bandas, una en la calle 2 (ADN y GST-Mig1) y otra en la calle 4 (ADN y GST-Mig1 y ADN$_{inespecífico}$) lo que nos indica que la proteína de fusión GST-Mig1 interacciona con el ADN utilizado y que esta interacción es específica.

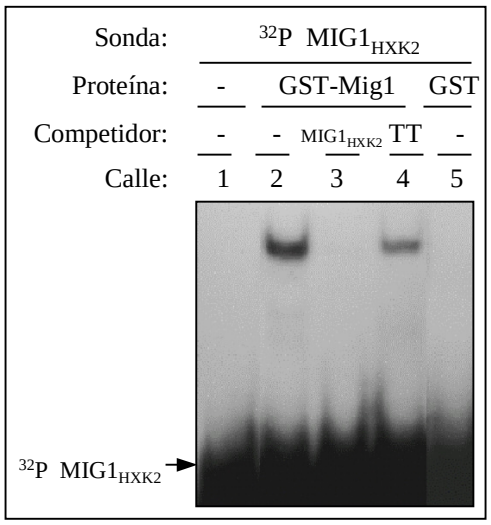


Figura 4.8. Ensayo de retraso en un gel de poliacrylamida en condiciones nativas de los complejos formados con la sonda radiactiva (^{32}P MIG1$_{HXK2}$). Los elementos de la reacción para las diferentes calles fueron: calle 1: ADN; calle 2: ADN y GST-Mig1; calle 3: ADN, GST-Mig1 y ADN (sin marcar); calle 4: ADN, GST-Mig1 y ADN (inespecífico de timo de ternera, TT) y calle 5: ADN y GST.

La principal limitación de este método es que te obliga a emplear pequeños fragmentos de ADN (10-20 pb) para poder tener sensibilidad en la medida. La otra desventaja o ventaja, según se mire, es que el estudio es estadístico y por tanto se obtiene un resultado promedio en el que participan miles o millones de moléculas. La microscopía de fuerzas nos permite realizar un estudio a moléculas individuales y el empleo de grandes fragmentos de ADN (cientos de pb). El experimento de interacción analizado con el AFM entre la proteína de fusión GST-Mig1 y el fragmento del promotor del gen HXK2 se muestra en la Fig.4.9. En la parte A se muestra un campo típico con tres complejos ADN-proteína. Un análisis cuidadoso de las posiciones en las que la proteína interacciona con el ADN nos muestra que tenemos tres casos distintos: el primero con Mig1 interaccionando con el primer

sitio de unión (Fig.4.9 B) (complejo tipo I), el segundo con Mig1 interaccionando con el segundo elemento regulador (Fig.4.9 C) (complejo tipo II) y el tercer caso con la proteína interaccionando con ambos sitios simultáneamente (Fig.4.9 C). El estudio estadístico de las posiciones de los complejos nos muestra que las probabilidades más altas corresponden a los intervalos centrados en 42±3 nm y 55±3 nm medidos desde un extremo de la molécula de ADN. Estas posiciones están de acuerdo con la situación de los secuencias de interacción de Mig1p presentes en el promotor (Fig.4.7). Los complejos del tipo I y II aparecen con igual probabilidad mientras que el tercer caso con la proteína interactuando simultáneamente con los dos elementos reguladores es mucho mas improbable. De 117 complejos estudiados sólo 4 eran de este tercer tipo. En este experimento se midió un elevado número de complejos no específicos probablemente debido a algún tipo de contaminación presente en la purificación de la proteína. De hecho la purificación de Pho4 (Fig.4.5) presentó un rendimiento mucho mayor que la purificación de Mig1.

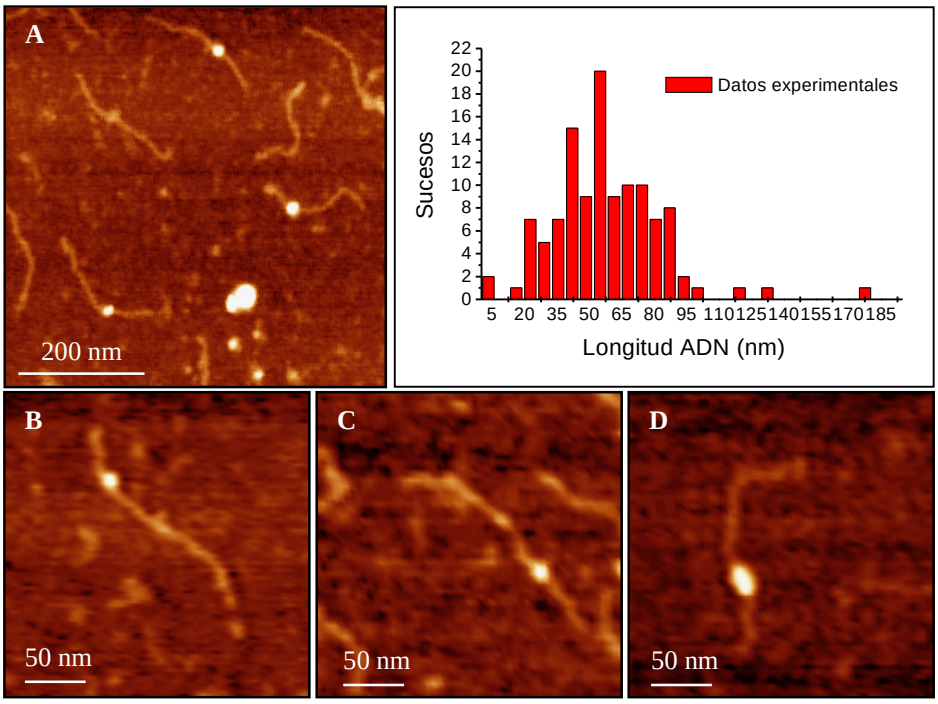


Figura 4.9. Interacción de la proteína Mig1 con un fragmento de 570 pb del promotor del gen HXK2. La parte A muestra un campo general en el que varios complejos son visibles. Las partes B, C y D muestran los tres tipos de complejos encontrados. El análisis estadístico de las posiciones de los complejos nos muestra que las bandas más probables son compatibles con la proteína interactuando con las regiones reguladoras del promotor.

El proceso de interacción ADN-proteína en condiciones fisiológicas es un proceso dinámico. Esto significa que los complejos se están formando y disociando constantemente. Cuando adsorbemos la muestra para su visualización con AFM lo que hacemos es plasmar en 2 dimensiones lo que ocurre en 3. El AFM en este sentido no tiene ningún poder de selección con lo cual cualquier impureza también será adsorbida y visible al AFM. Esto conlleva tener que emplear concentraciones bajas de los componentes de la reacción (ADN y proteínas) e impide, por ejemplo, incrementar la concentración de proteína para aumentar el número de complejos. La falta de selectividad del AFM supone, también, el empleo de muestras muy puras de cada componente ya que una pequeña contaminación tiene el mismo aspecto que la molécula de proteína que estamos estudiando.

4.3.3. El sistema Med8-*SUC2*

Med8 es una proteína mediadora que interacciona con el dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa II. Recientemente se han publicado resultados que indican que Med8 puede jugar un papel importante en la ruta de represión por glucosa del gen *SUC2* y en la expresión del gen *HXK2* ya que se ha demostrado mediante un ensayo de retraso de la movilidad electroforética que la proteína de fusión GST-Med8 se une a un oligonucleótido de 34 pb que contiene la secuencia consenso (A/C)(A/G)GAAAT. (Chaves et al. 1999). Esta secuencia de 7 pb se localiza en la región UAS del promotor de *SUC2* y en la región DRS (secuencia de represión posterior o Downstream Repressing Sequence) del gen *HXK2*. Para confirmar que la proteína está interaccionando exclusivamente con este motivo de 7 pb decidimos visualizar con AFM esta interacción usando un fragmento del promotor del gen *SUC2* y un trozo del gen *HXK2* (Moreno-Herrero et al. 2001).

El esquema del fragmento del promotor del gen *SUC2* empleado en los experimentos de interacción se muestra en la Fig.4.10. Este fragmento de ADN se fabricó mediante PCR usando los oligonucleótidos artificiales OL5 y OL6 y tiene una longitud de 305 pb. El fragmento presenta dos secuencias consenso de unión de Med8 situadas a sólo 38 y 57 pb desde uno de los extremos de la molécula de ADN. La separación entre las dos zonas de interacción es de tan sólo 12 pb (4 nm).

El experimento de interacción de la proteína de fusión GST-Med8 con el fragmento del promotor de *SUC2* se muestra en la Fig.4.11. El estudio detallado de

las imágenes nos muestra dos tipos de poblaciones. Una de ellas nos muestra la proteína cubriendo la parte final de la molécula de ADN (Fig.4.11 B). Teniendo en cuenta que el diámetro de la proteína de fusión medida de las imágenes de AFM es de 14 nm, estos resultados experimentales son compatibles con la proteína interaccionando con la región UAS1 del promotor. El otro tipo de complejos que encontramos nos muestran a la proteína situada ligeramente en el interior de la molécula de ADN de tal forma que una pequeña porción de ADN es visible (Fig.4.11 C). La posición media a la que encontramos el máximo de la proteína en los complejos de este tipo es de 17 nm medidos desde el extremo de ADN más próximo. Este valor equivale a ~50 pb, en buen acuerdo con la situación en la que la proteína interacciona con la región UAS2 del promotor.

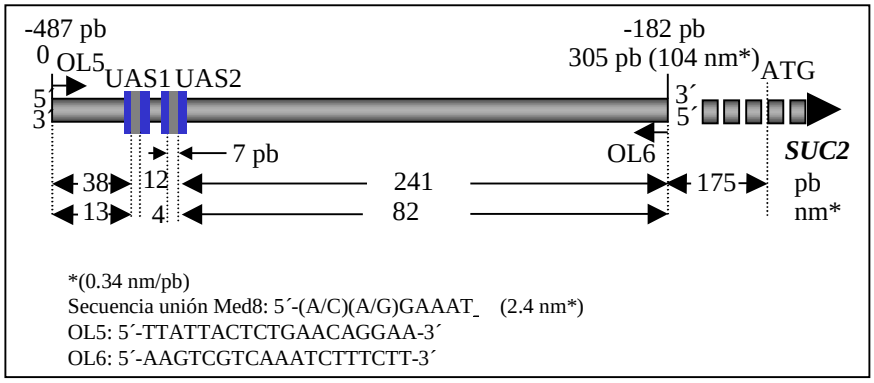


Figura 4.10. Esquema del fragmento del promotor del gen SUC2 empleado para estudiar la interacción de Med8 con dicho promotor. El fragmento de ADN fabricado por PCR contiene dos veces la secuencia consenso de unión de Med8.

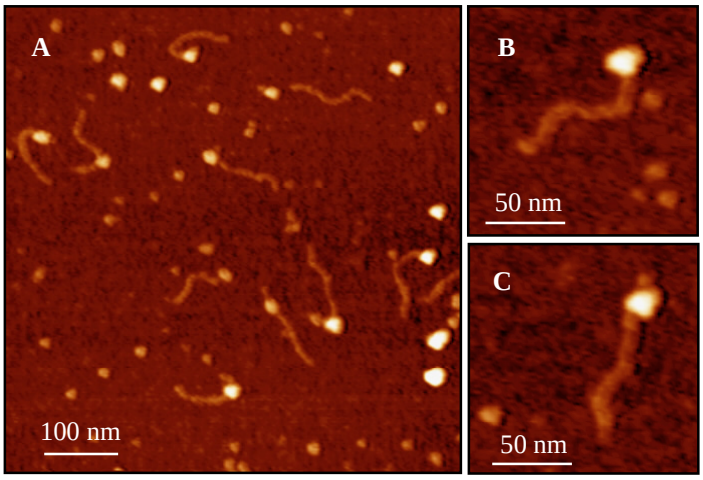


Figura 4.11. Interacción de la proteína Med8 con las secuencias de unión presentes en el promotor del gen SUC2. En A se muestra un campo donde varios complejos son visibles y en B y C dos detalles de los complejos típicos encontrados.

4.3.4. El sistema Med8-*HXK2*

Un trabajo complementario al realizado con *SUC2* lo realizamos con el gen *HXK2*. En este caso la secuencia consenso de unión de Med8 se encuentra en dos regiones situadas por debajo de la secuencia ATG que marca el comienzo del gen, estas dos regiones se denominan DRS. El fragmento empleado se fabricó de manera similar a como se fabricaron los otros fragmentos de ADN empleados. Un esquema del trozo de ADN empleado se muestra en la Fig.4.12. En este caso la molécula de ADN tiene una longitud de 676 pb y contiene dos regiones reguladoras con dos secuencias consenso de unión de Med8 situadas a 105 pb y 201 pb desde uno de los extremos. Los oligonucleótidos OL7 y OL8 se escogieron de manera que las secuencias de unión se colocaran de manera asimétrica respecto del centro de la molécula con el fin de identificar el extremo de la molécula de ADN midiendo la posición de los complejos con el AFM.

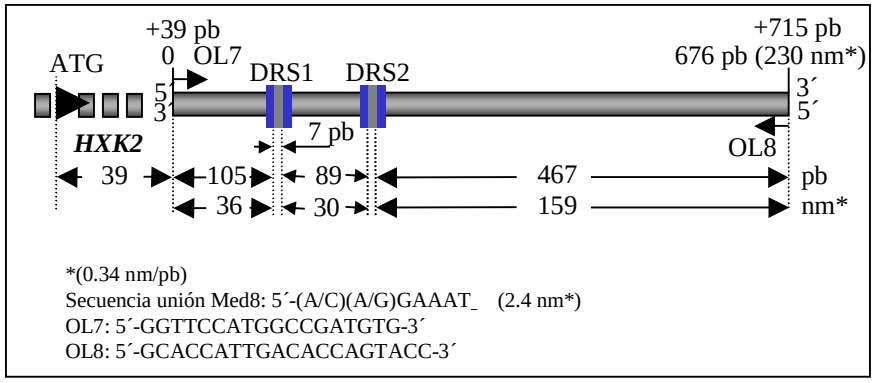


Figura 4.12. Esquema del fragmento de ADN empleado en los estudios de la interacción del promotor del gen HXK2 con Med8. El fragmento de ADN producido por PCR contiene dos veces la secuencia consenso de unión de Med8 y estas dos regiones se encuentran separadas por 89 pb.

El experimento de interacción se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.3.1. Las imágenes de AFM se muestran en la Fig.4.13. Un campo con varios complejos se muestra en la parte A mientras que en B y en C se ilustran los dos tipos de complejos encontrados (tipo I y II respectivamente). La posición media de la proteína de los complejos del tipo I es de 113 pb medidos desde el extremo más cercano de la molécula de ADN y la posición de la proteína en los complejos del tipo II es de 182 pb. Teniendo en cuenta el error experimental, que típicamente viene dado por el radio de la punta (10 nm~34 pb) vemos que estos dos tipos de

complejos son consistentes con la proteína interaccionando con la DRS1 y DRS2 respectivamente.

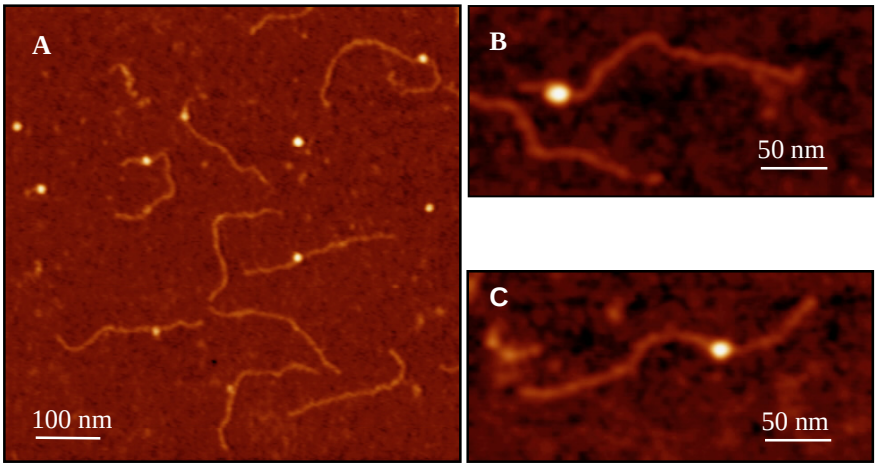


Figura 4.13. Imágenes de AFM que muestran la interacción de Med8 con el promotor del gen HXK2. En A se muestra un campo grande con varios complejos y en B y C dos detalles de los complejos típicos encontrados.

Los resultados experimentales mostrados en la sección 4.3.3 y 4.3.4 confirman de una manera clara que la proteína Med8 se une a elementos reguladores que controlan la expresión de los genes *SUC2* y *HXK2* y que la proteína se une a través de secuencias que contienen un motivo de 7 pb con la secuencia (A/C)(A/G)GAAAT. Otra conclusión significativa es que, en ambos casos, solamente uno de los dos potenciales sitios de unión es ocupado y que no importa la distancia que los separa. Además la afinidad de la proteína por cualquiera de los dos sitios es muy similar.

4.4. Estudio de interacciones ADN-proteína con el AFM

En la sección anterior se han mostrado las posibilidades del AFM a la hora de caracterizar las posiciones de interacción de una proteína en una determinada región de ADN. Primeramente, se ha estudiado el sistema modelo Pho4-*PHO5* y a continuación se ha aplicado la técnica al estudio de sistemas donde no se había demostrado previamente la interacción de Mig1 y Med8 en fragmentos grandes de ADN.

A partir de los resultados experimentales obtenidos podemos decir que el estudio de interacciones ADN-proteína del tipo mostrado depende de tres factores:

a) El rendimiento de la reacción. Es decir el número de complejos que tenemos formados frente al número de proteínas o moléculas de ADN libres. Si este número es muy bajo, el AFM no es una buena técnica ya que las imágenes mostrarían la mayoría de las moléculas libres de interacción. Tendríamos entonces que incrementar la concentración de proteína frente a la de ADN y en este caso un elevado número de moléculas de proteína cubriría la superficie y no podríamos discernir moléculas individuales. Este factor se puede alterar buscando los parámetros óptimos, concentraciones de sales y pH, de la reacción de interacción.

b) La pureza de las muestras. La purificación de los dos ingredientes esenciales — ADN y proteína — es muy importante. Se deben emplear muestras muy puras ya que de lo contrario tendríamos una gran cantidad de interacciones inespecíficas que enmascararían la medida real.

c) El rendimiento de la adsorción. Este factor también es importante ya que se debe buscar un compromiso entre moléculas en el volumen y número de moléculas que se van a adsorber. Este factor se puede modificar cambiando la concentración de sales y pH del tampón de adsorción.

El ajuste de los tres parámetros es determinante a la hora de abordar un problema de interacción con el AFM. Cada experimento es diferente y no significa que unas condiciones experimentales que funcionan en uno lo hagan de manera igual en otro. Sin embargo, a pesar de los problemas que puede suponer el ajuste de estos parámetros óptimos, la microscopía de fuerzas se presenta como una técnica alternativa a la hora de *mapear* interacciones de proteínas en un promotor. La resolución alcanzada con el AFM no es tan elevada como la que se consigue mediante técnicas bioquímicas como la mostrada en la Fig.4.8 donde se puede evaluar la interacción con una precisión de 1 base. Sin embargo, la microscopía de fuerzas presenta alguna ventajas esenciales:

1. Es una técnica visual. El usuario ve directamente la posición en la que interaccionan las moléculas.

2. Es una técnica que detecta moléculas individuales. Lo que supone el estudio de una única interacción, es decir extraer sucesos individuales del comportamiento promedio.
3. Es una técnica que permite *mapear* interacciones en un promotor completo. La longitud de la cadena de ADN no es una limitación como ocurre con otras técnicas bioquímicas. Con un solo experimento es posible identificar diferentes interacciones proteína-ADN con una precisión de ~10 nm (~34 pb).

4.5. Interacción proteína-proteína

Muchas estructuras presentes en la célula están formadas por complejos de proteínas. Ya hemos visto por ejemplo, en el capítulo anterior como los PHFs están formados principalmente por la proteína tau. Otro ejemplo pueden ser los microtúbulos. El componente esencial de los microtúbulos es una proteína llamada tubulina que está formada por dos dominios, α y β, que interaccionan, primero entre si formando heterodímeros y luego entre ellos dando lugar a una estructura cilíndrica compuesta de 13 columnas paralelas llamadas protofilamentos. Al final, pequeñas estructuras como son los heterodímeros de tubulina (~8 nm) dan lugar a grandes estructuras (microtúbulo de 24 nm de diámetro).

No solamente las proteínas interaccionan entre si por motivos estructurales. Muchas veces la presencia de varias proteínas es necesaria para llevar a cabo un proceso. Existen multitud de ejemplos que ilustran este hecho. Por ejemplo en la replicación intervienen: la topoisomerasa, que desenrolla la cadena de ADN; la helicasa y la primasa que separan las dos hebras; proteínas que se unen a ADN de cadena simple para estabilizar la hebra de ADN; un dímero de la ADN polimerasa de replicación; la ADN polimerasa I y la ADN ligasa. La acción conjunta de todas estas proteínas posibilita el proceso de la replicación. Este es solamente un ejemplo más que sirve para mostrar que la interacción entre proteínas es un problema de gran importancia en bioquímica y biología molecular.

En la sección siguiente estudiaremos la interacción de la proteína Med8 con ella misma. Ya hemos visto que Med8 interacciona con el ADN cuando aparecen secuencias del tipo (A/C)(A/G)GAAAT. Veremos como la microscopía de fuerzas

puede ayudarnos para ver si la interacción con el ADN es llevada a cado por proteínas simples o conjuntos de ellas.

4.5.1. El sistema Med8-Med8

Como ya se comentó anteriormente Med8, además de ser una proteína mediadora que interacciona con el dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa II, también desempeña un papel importante en la ruta de represión por glucosa en *S. cerevisiae*. También se ha demostrado que la interacción con estos genes reguladores se lleva a cabo muchas veces interaccionando con otra proteína llamada hexoquinasa 2 (Hxk2) (de la Cera et al. 2002). Como un trabajo complementario a la interacción entre dos proteínas distintas hemos analizado la interacción de Med8 consigo misma a la hora de interactuar con el gen *HXT1*.

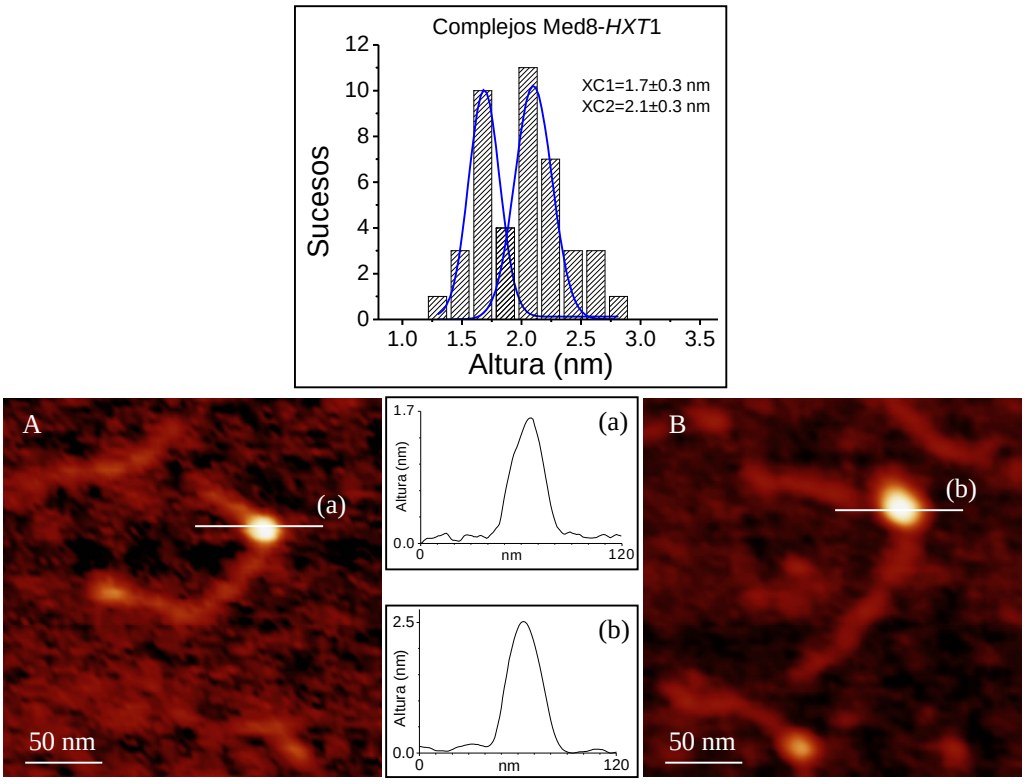


Figura 4.14. Experimento de interacción de la proteína Med8 con el promotor del gen HXT1. La proteína se sitúa a una distancia media del extremo de 170 pb e interacciona como monómero (A) o como homodímero (B) a juzgar por la distribución estadística de alturas que se mide.

Para este experimento empleamos un fragmento de ADN de 538 pb del promotor del gen *HXT1* que contiene la secuencia consenso de unión de Med8 situada a 174 pb de uno de los extremos de la molécula de ADN empleada. Las imágenes de AFM muestran la mayoría de las proteínas libres de toda interacción con el ADN, aunque algunas de ellas aparecen unidas al ADN en lo que consideramos un complejo Med8-*HXT1*. Los experimentos de AFM muestran que la proteína cubre una región de las moléculas de ADN centrada en la posición 170 pb de uno de los extremos, lo que prueba que la interacción es específica.

La altura de los complejos medida con AFM nos muestra una distribución bimodal con las alturas más probables centradas en las posiciones 1.7±0.3 nm y 2.1±0.3 nm (Fig.4.14). Este resultado sugiere que la proteína Med8 interacciona con el promotor del gen *HXT1* como monómero o como homodímero. En la Fig.4.14 se muestran dos imágenes típicas de un complejo compuesto por un monómero (A) y de un complejo formado por un homodímero (B) con sus correspondientes perfiles.

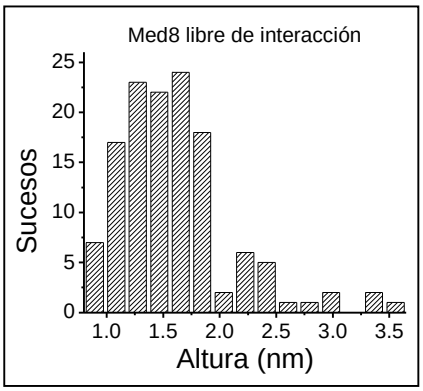


Figura 4.15. Distribución de alturas de la proteína Med8 cuando se encuentra libre de todo complejo

Para saber si esta proteína se encuentra formando monómeros o homodímeros cuando se encuentra libre en solución realizamos un estudio similar al mostrado en la Fig.4.14 pero sin ADN. En este caso obtuvimos una distribución de alturas que iban desde 1.0 nm hasta 1.9 nm con dos alturas más probables situadas en 1.3±0.3 nm y 1.6±0.3 nm (Fig.4.15). Estos resultados son compatibles con los correspondientes a la interacción Med8-*HXT1*. Nótese que la altura de la proteína cuando interacciona con el ADN no es la suma de la proteína libre mas la altura típica del ADN medida al aire (0.8 nm). Este resultado indica que cuando la proteína interacciona con el ADN lo hace de forma que lo *abraza* y presumiblemente la molécula de ADN queda atrapada en la parte central de la

proteína. Otro detalle interesante es que la distribución de alturas de las proteínas es mucho más difusa cuando éstas se encuentran libres en solución (Fig.4.15) que cuando interaccionan con el ADN (Fig.4.14).

Un modelo simple puede considerar la proteína Med8 como una esfera de radio R=1.7±0.3 nm cuyo volumen será $V = (4/3)\cdot\pi\cdot R^3$. Cuando la proteína homodimeriza, el volumen de este complejo valdrá $V' = 2\cdot V$ resultando que el nuevo radio, R', vale 2.14 nm valor compatible con el medido. Nótese que aunque la deshidratación está presente en las medidas realizadas al aire, ésta afecta al monómero y al homodímero por igual con lo que la proporción entre radios permanece constante y el argumento antes esgrimido sigue siendo válido.

En definitiva, mediante este experimento se ha demostrado que la microscopía de fuerzas puede proporcionar información muy valiosa, no sólo a la hora de localizar complejos, sino también a la hora de averiguar si estas interacciones se realizan como monómero o como homodímero.

4.6. La microscopía de fuerzas como una herramienta para la biología molecular

El tamaño típico de las biomoléculas es de pocos nm. Estos tamaños son inaccesibles a técnicas ópticas ya que la resolución última de un microscopio óptico viene dada por la longitud de onda de la luz que ilumina la muestra y que está en el rango del visible (~300 nm). Por otra parte, técnicas de mayor poder de resolución como la microscopía electrónica no permiten obtener una imagen tridimensional ni estudiar procesos *in vivo*. La resolución típica de la microscopía de fuerzas está en el rango de los tamaños de las moléculas biológicas. Por una parte no sólo permite obtener una imagen tridimensional de la muestra, lo que supone la medida de volúmenes, y estudiar procesos *in vivo*, sino que además permite el estudio de moléculas individuales, pero ¿por qué queremos estudiar moléculas individuales?

Los estudios sobre moléculas individuales revelan nuevos niveles de información. Por ejemplo trabajos de AFM que estudiaban la interacción de la ARN polimerasa con el ADN demostraron que la enzima dobla la molécula de ADN cuando se acopla con ella (Rees et al. 1993). Este tipo de información no es accesible

mediante técnicas bioquímicas tradicionales. Las técnicas bioquímicas tradicionales suponen llevar a cabo experimentos sobre un gran número de moléculas al mismo tiempo. Esto implica la detección de un comportamiento promedio y una dinámica lenta. Todas las moléculas de una misma clase son tratadas como si se comportaran de la misma forma y como si su comportamiento medio dictara su función biológica. Comprender y explicar la actividad enzimática individual es el corazón de lo que podría llamarse *bioquímica de moléculas individuales* o single molecule biochemistry.

En este capítulo hemos estudiado dos aplicaciones de la microscopía de fuerzas a la hora de caracterizar interacciones entre biomoléculas. Hemos estudiado, en primer lugar, la interacción entre ADN y proteínas y en segundo lugar, la interacción entre proteínas y la interacción de estos complejos con el ADN. Estos dos trabajos nos han proporcionado información valiosa que sólo sería accesible mediante técnicas bioquímicas de manera indirecta. La microscopía de fuerzas nos permite identificar rápidamente los lugares de interacción de una proteína en una molécula de ADN y a su vez medir su tamaño, de forma que podemos distinguir entre interacciones de moléculas individuales o conjuntos de moléculas.

4.7. Resumen

La microscopía de fuerzas es una técnica que permite resolución nanométrica sobre muestras biológicas. Este es el rango típico de tamaños de las moléculas de ADN y de las proteínas, con lo cual el AFM permite distinguir moléculas individuales de este tipo adsorbidas sobre una superficie plana.

El estudio de interacciones entre ADN y proteínas y entre proteínas es un problema central en bioquímica y en biología molecular. Las técnicas bioquímicas tradicionales para realizar este tipo de estudios — ensayos de retraso de la movilidad electroforética; delecciones seriadas de los promotores y ensayos de ADNsa I footprinting — son técnicas que presentan numerosos problemas cuando se quiere analizar grandes fragmentos de ADN y son altamente ineficaces para abordar el análisis sistemático de todos los promotores de un genoma.

El AFM permite identificar interacciones de proteínas en promotores completos (moléculas de ADN de cientos de pb) y por tanto identificar secuencias reguladoras en un solo experimento. Esta afirmación se sustenta en los resultados mostrados de interacción de la proteína Pho4 con el promotor del gen *PHO5* y los sistemas Mig1-*HXK2*; Med8-*SUC2*; Med8-*HXK2*.

La resolución en el posicionamiento de los complejos ADN-proteína viene dada por el radio de la punta que vale ~10 nm o ~34 pb. Esta resolución supone que el AFM podría emplearse como una primera técnica para identificar regiones interesantes de interacción para posteriormente usar técnicas bioquímicas para estudiar con una precisión de 1 base las interacciones. Este procedimiento permitiría eliminar las regiones que no tienen actividad en el promotor ahorrando mucho tiempo.

El carácter tridimensional del AFM nos permite medir alturas con una gran precisión y a partir de ellas deducir el volumen de diversas estructuras. Esta cualidad nos permite medir si la interacción de una proteína con el ADN se lleva a cabo mediante una molécula individual (monómero) o mediante un conjunto de proteínas (dímero, trímero, etc...). En este contexto hemos visto que la proteína Med8 interacciona con el ADN como monómero o como homodímero en igual proporción.

Las dos aplicaciones de la microscopía de fuerzas en la caracterización de interacciones entre biomoléculas presentadas en este capítulo muestran al AFM como una técnica visual, sencilla y rápida que puede proporcionar información complementaria a la accesible con técnicas bioquímicas tradicionales.

ANEXOS

A. Breves nociones de biología molecular y técnicas básicas de manipulación de ADN

A.1. Introducción

Este anexo pretende proporcionar información bioquímica básica necesaria para poder comprender esta tesis en su totalidad. Si ya tiene nociones de bioquímica lo mejor es que se ahorre el trabajo de leerlo, si no, desde aquí le animo a que lea este anexo. He pretendido una explicación amena y sencilla que permita a cualquier persona, no familiarizada con la bioquímica, poder comprender cómo funcionan los elementos básicos de la vida.

En primer lugar describo de manera general las moléculas biológicas empleadas en esta tesis: el ADN y las proteínas. A continuación me centro en tres tipos concretos que tienen mas o menos protagonismo en este trabajo: los factores transcripcionales, las enzimas de restricción y las ligasas. Todas estas moléculas son básicas para entender las técnicas de manipulación del ADN que muestro en la parte final de este anexo. Explicaré la técnica de la electroforesis — como técnica básica de visualización de biomoléculas — y la compararé con la microscopía de fuerzas. Para terminar el capítulo muestro parte del trabajo

realizado en una estancia en la Universidad de California en Berkeley, a modo de ejemplo práctico donde uso muchos de los elementos descritos en este anexo: enzimas de restricción; ligasas; técnicas de electroforesis y PCR (Polymerase Chain Reaction) etc... El trabajo se realizó bajo la supervisión del Prof. Carlos Bustamante.

Ciertamente los contenidos de este anexo son mínimos y de ningún modo debe pretender la sustitución de ningún libro básico de bioquímica. Algunos buenos libros de bioquímica que he empleado son:

Mathews C. K., van Holde K. E. y Ahern K. G., "Biochemistry", 3ª Edición, Adisson Wesley Longman, New York, 2000.

Devlin, T.M. "Biochemistry with clinical correlation", 5ª Edición. Wiley – Liss, New York, 2002.

Stryer, L., Berg, J.M. y Tymoczko, J.L. "Biochemistry". 5ª Edición. W. H. Freeman, Hampshire, UK. 2002.

Nelson D.L. and Cox, M.M. Lehninger, "Principles of Biochemistry". 3ª Edición. Worth Publishers. New York. 2000.

A.2. Ácidos nucleicos

Hay dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN). Ambos son cadenas poliméricas en las que las distintas unidades monómeros se conectan mediante enlaces covalentes. La estructura de los monómeros de ARN y de ADN se muestran en la siguiente figura:

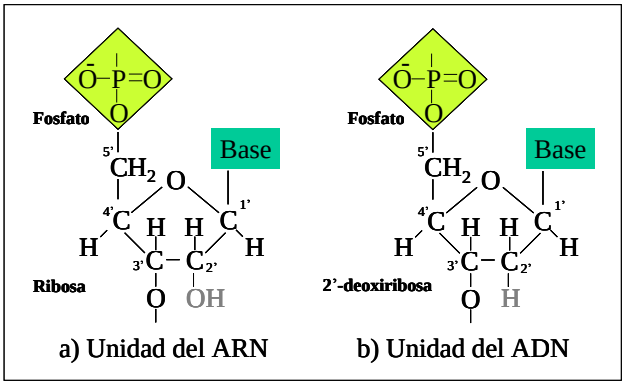


Figura A.1. Estructuras químicas del ácido ribonucleico (ARN) y del ácido desoxirribonucleico (ADN).

En ambos casos el monómero está formado por un azúcar de 5 carbonos, una ribosa en el ARN y una 2´-desoxirribosa para el ADN. Los átomos de carbono del azúcar se designan con primas (1´, 2´, etc) para distinguirlos de los átomos de las bases. La única diferencia entre ambos azúcares se encuentra en el grupo hidroxilo 2´ presente en la ribosa en el ARN que es sustituido por un hidrógeno en el ADN. La conexión entre los diferentes monómeros se realiza mediante un enlace fosfodiester entre el residuo fosfato pegado al grupo hidroxilo del carbono 5´ de una de las unidades con el grupo hidroxilo 3´ de la unidad siguiente (Fig.A.2). El grupo fosfato es un ácido fuerte. Ésta es la razón por la cual al ADN y al ARN se les llama ácidos nucleicos. Cada monómero en el ADN o en el ARN aporta una carga negativa a pH fisiológico.

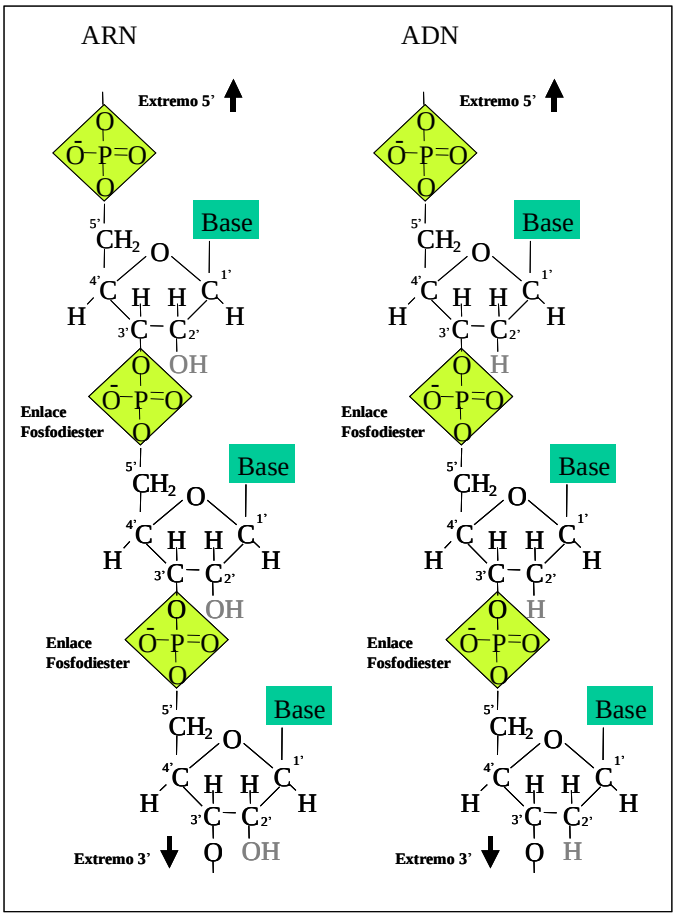


Figura A.2. Polímero de nucleótidos en donde se indica el enlace fosfodiester entre nucleótidos contiguos.

La cadena de azucares constituye el esqueleto de la molécula. La importancia de los ácidos nucleicos en el almacenamiento y la transmisión de información se deriva de su condición de heteropolímeros. Cada monómero lleva

asociada una base heterocíclica siempre ligada al carbono 1´ del azúcar. Hay dos tipos de bases llamadas purinas y pirimidinas. El ADN tiene dos purinas, adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidinas, timina (T) y citosina (C). El ARN tiene las mismas excepto que uracilo (U) sustituye a la timina.

El ADN y el ARN pueden ser considerados como polímeros hechos de cuatro tipos de monómeros. A cada uno de estos monómeros se les llama nucleótidos, por ello habitualmente al ADN y al ARN se les denomina polinucleótidos. Cuando se trata de pequeños polímeros, de sólo unos pocos residuos hablamos de oligonucleótidos.

Un examen más detallado de la Fig.A.2 revela dos importantes características de todos los polinucleótidos:

Un polinucleótido tiene un sentido o direccionalidad. El enlace fosfodiester se realiza entre el carbono 3´ de un monómero y el carbono 5´ del otro. Por tanto ambos extremos de la cadena de ADN son distinguibles. Habitualmente el extremo 5´ tiene un grupo fosfato y el extremo 3´ un grupo hidroxilo.

Un polinucleótido tiene individualidad dada por su secuencia de bases, ésta es la secuencia de nucleótidos. A esta secuencia se le denomina estructura primaria del ácido nucleico.

La notación habitual para dar la secuencia de bases sobreentiende que se dan en el orden 5´$\rightarrow$3´. Por ejemplo para dar la secuencia de un polinucleótido de bases A, C, T, T, C, G se daría pACTTCG, para indicar que empieza en un grupo fosfato y que el sentido es 5´$\rightarrow$3´ o simplemente ACTTCG.

Notar que la información genética se almacena en la estructura primaria del ADN. Un gen es simplemente una secuencia particular de ADN que codifica información en un lenguaje de cuatro letras en el cual cada letra es una de las bases.

A.2.1. Estructura tridimensional del ADN: el modelo de Watson-Crick

En 1953 los investigadores Watson y Crick elaboraron un modelo para la estructura tridimensional a partir de las imágenes obtenidas por R. Franklin de

patrones de difracción de rayos X de fibras húmedas de ADN (Watson & Crick. 1953). El modelo consiste en una estructura helicoidal formada por dos hebras de ADN en la que hay 10 residuos por giro. La gran intuición de Watson y Crick fue que la doble hélice era estable a través de puentes de hidrógeno entre las bases de las hebras opuestas solamente si éstas se aparean de una manera particular A-T y G-C (Fig.A.3). De esta forma la distancia entre los carbonos 1´ de las desoxirribosas se mantiene constante y vale 1.08 nm. Esto significa que el diámetro de la molécula del ADN es constante y vale 2 nm. En el modelo de Watson-Crick, el esqueleto hidrofílico fosfato-ribosa se encuentra en la parte exterior mientras que las bases se disponen en la parte interior. La distancia entre bases es de 0.34 nm. Además, el modelo también muestra que aunque las bases se encuentran en el interior éstas se aproximan a través de dos profundas hendiduras helicoidales. El modelo propuesto decía que las cadenas de ADN corrían en sentidos opuestos y que el sentido de la molécula es una hélice que gira según la regla de la mano derecha.

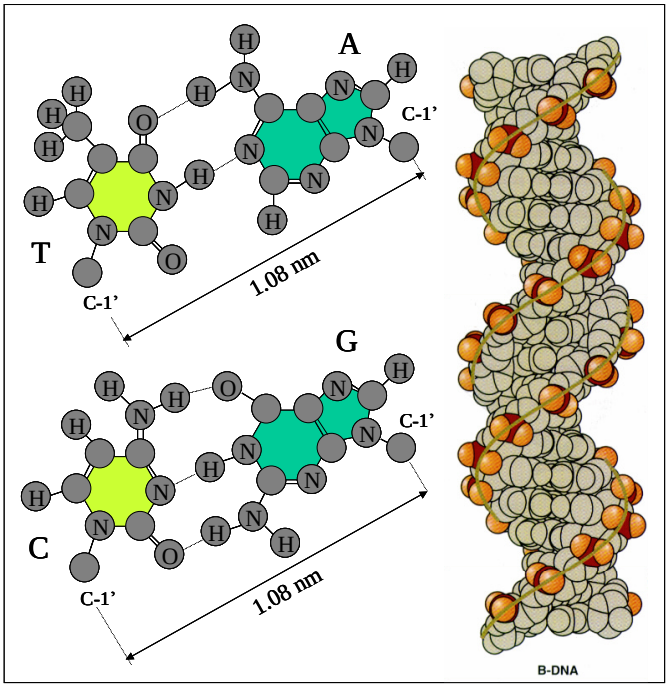


Figura A.3. Modelo propuesto por Watson y Crick sobre el apareamiento de las bases y la molécula de ADN.

El modelo de Watson-Crick supuso importantes implicaciones en biología molecular. Ya que A siempre empareja con T y C con G, esto significa que las cadenas son complementarias y que a partir de una sola hebra se puede generar la molécula completa. Esta observación no escapó a los investigadores que obtuvieron el premio Nobel en 1962: "*It has not escaped our notice that the specific pairing*

we have postulated immediately suggest a possible copying mechanism for the genetic material" (Watson & Crick. 1953).

En la actualidad el modelo de Watson-Crick sigue vigente y sólo se han hecho pequeñas modificaciones al mismo. La disponibilidad de mejores datos han demostrado, por ejemplo que las bases no se colocan exactamente de manera perpendicular al eje de la molécula y que la disposición de azucares es ligeramente distinta. También se ha visto que la estructura descrita por Watson-Crick (estructura en forma β) no es única, sino que bajo ciertas condiciones el ADN puede tener una estructura en forma A o en forma Z (Mathews et al. 2000).

A.2.2. Funciones biológicas de los ácidos nucleicos

El papel fundamental de los ácidos nucleicos es el almacenamiento y la transmisión de la información genética. Cada organismo lleva en cada una de sus células al menos una copia de toda su información genética que necesita dicho organismo. A esto se le denomina genoma. El tamaño del genoma varía enormemente entre organismos. Por ejemplo el genoma de un virus puede ser de sólo unos pocos miles de bases, mientras que el genoma humano contiene alrededor de $2x10^9$ pb de ADN distribuidas en 23 cromosomas. El genoma de la bacteria *E. coli* tiene un tamaño de 4.693.221 pb. El de la levadura de 12.147.777 pb distribuido en 16 cromosomas, etc...

Sólo una fracción del genoma de cada organismo es susceptible de ser trascrito o leído a través de la síntesis de ARN o de proteínas. A estos fragmentos del genoma se les llama genes. Las funciones biológicas de los ácidos nucleicos son principalmente tres: replicación, transcripción y traducción.

A.2.2.1. Replicación: de ADN a ADN

La replicación es la copia de ambas hebras de ADN para producir dos cadenas de ADN idénticas. La idea está descrita en la Fig.A.4. Este proceso es altamente fiable pues aproximadamente se comete un error solamente en una de cada 10^8 bases. A estos errores se les llama mutaciones y es lo que ha permitido la diversidad biológica de la que disfrutamos.

El proceso de la replicación es llevado a cabo por un conjunto de enzimas y proteínas auxiliares de las cuales la principal es la ADN polimerasa.

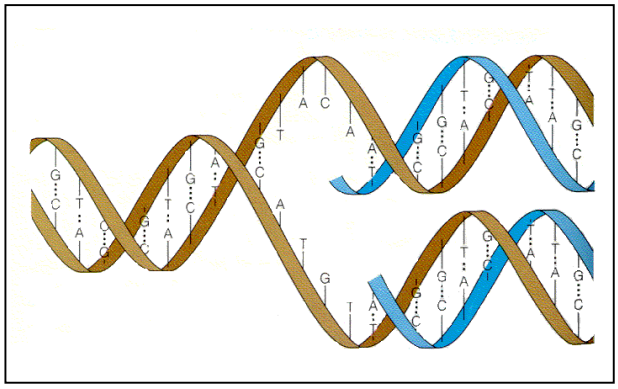


Figura A.4. Esquema que muestra la replicación o la copia de una molécula de ADN a otra molécula idéntica.

A.2.2.2. Transcripción: de ADN a ARN

La expresión de la información genética siempre requiere un primer paso: la trascripción. La transcripción es la copia de una cadena de ADN a su complementaria de ARN. Este proceso está descrito en la Fig.A.5.

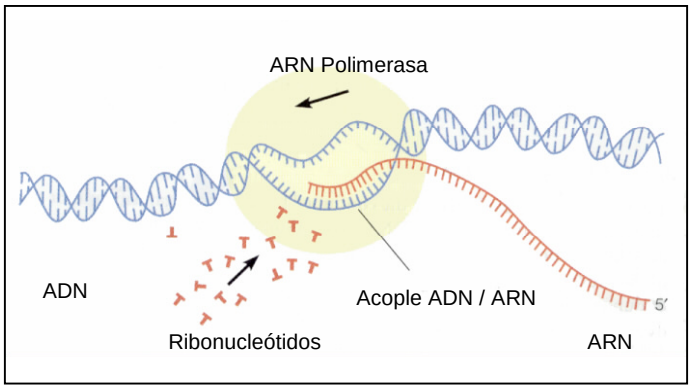


Figura A.5. Esquema que muestra el funcionamiento de la transcripción.

El proceso de la transcripción es llevado a cabo por un conjunto de enzimas y proteínas auxiliares de las cuales la principal es la ARN polimerasa. Notar que ya que el ARN tiene U en lugar de T, el U emparejará con las A del molde de ADN.

A.2.2.3. Traducción: de ARN a proteína

En la traducción una cadena de mARN (ARN mensajero) dicta la secuencia de una proteína. Como veremos las proteínas están compuestas por 20 monómeros distintos llamados aminoácidos. Esto significa que no hay una relación 1 a 1 entre la secuencia de nucleótidos del ADN y la de aminoácidos de una proteína. De hecho, la secuencia lineal de bases es leída en bloques de tres nucleótidos o codón, cada uno de los cuales se corresponde con un aminoácido

distinto. El conjunto de reglas que especifica qué codón corresponde a cada aminoácido se le denomina código genético y está descrito en la tabla A-I.

Primera posición	Segunda posición: U	Segunda posición: C	Segunda posición: A	Segunda posición: G	Tercera posición
U	UUU, UUC: Phe	UCU, UCC, UCA, UCG: Ser	UAU, UAC: Tyr	UGU, UGC: Cys	U C A G
	UUA, UUG: Leu		UAA: Stop	UGA: Stop	
			UAG: Stop	UGG: Trp	
C	CUU, CUC, CUA, CUG: Leu	CCU, CCC, CCA, CCG: Pro	CAU, CAC: His	CGU, CGC, CGA, CGG: Arg	U C A G
			CAA, CAG: Gln		
A	AUU, AUC, AUA: Ile	ACU, ACC, ACA, ACG: Thr	AAU, AAC: Asn	AGU, AGC: Ser	U C A G
	AUG: Met/Start		AAA, AAG: Lys	AGA, AGG: Arg	
G	GUU, GUC, GUA, GUG: Val	GCU, GCC, GCA, GCG: Ala	GAU, GAC: Asp	GGU, GGC, GGA, GGG: Thr	U C A G
			GAA, GAG: Glu		

Tabla A-I. El código genético.

El primer aminoácido en la proteínas eucarióticas es siempre Metionina (Met). Éste proviene de una secuencia de mARN que es AUG que a su vez proviene de la secuencia complementaria ATG de ADN. Por tanto el inicio de un gen viene marcado por una secuencia característica que es ATG. A la región que se encuentra por encima de este triplete se le denomina promotor del gen y tiene importancia porque regulará la expresión o represión del mismo (ver Apto. A.4).

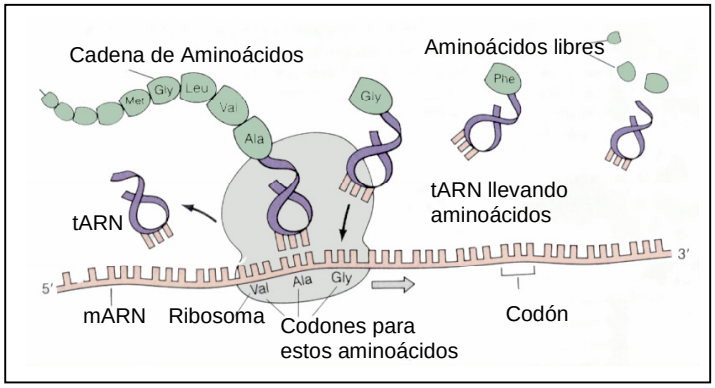


Figura A.6. Esquema que muestra el mecanismo de la traducción.

La maquinaria de producción de proteínas incluye un tipo especial de ARN que participa como intermediario llamado tARN, enzimas especiales y ribosomas,

que son complejos de ARN-proteína donde tiene lugar el ensamblaje de proteínas. Un esquema simple de la traducción aparece en la Fig.A.6.

Las proteínas son las moléculas de mayor estructura y funcionalidad de la célula. Lo que es y lo que hace una célula depende de las proteínas que contiene. Se podría hacer la analogía de la célula como si fuera una fábrica. Las proteínas son la maquinaria de trabajo. Los planos de esta maquinaria están almacenados en un almacén central (el ADN en el núcleo de la célula). Copias de algunos planos (mARNs) se mandan fuera cuando se necesita una maquinaria de proteína nueva o distintos repuestos. Además tenemos ARNs especializados como son el tARN.

A.3. Proteínas

Las proteínas juegan una enorme variedad de papeles. Algunas se encargan del transporte y almacenamiento de algunas moléculas; otras se encargan de dar consistencia estructural a la célula o a tejidos. La contracción de un músculo, la respuesta inmunitaria o la coagulación de la sangre son procesos que están mediados por proteínas. Quizás las proteínas más importantes son las enzimas. Éstos son los catalizadores que promueven la gran variedad de reacciones que dirigen las rutas metabólicas esenciales. En cada tipo de célula de un organismo hay varios miles de este tipo de proteínas. Las proteínas son moléculas extraordinariamente complejas.

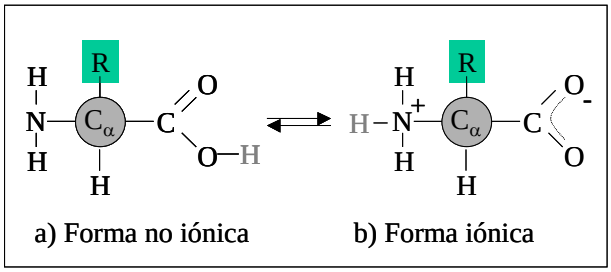


Figura A.7. Esquema de un aminoácido. Los aminoácidos se caracterizan por un grupo amino, un grupo carboxilo, un hidrógeno en el carbono α y una cadena lateral R que le confiere sus propiedades únicas.

Todas las proteínas son polímeros de unas unidades monómeros llamadas α-aminoácidos. Éstos se caracterizan por tener un grupo amino, un grupo carboxilo, un hidrógeno en el carbono α y una cadena lateral R que le da sus propiedades únicas (Fig.A.7). Bajo condiciones fisiológicas los aminoácidos existen en su forma iónica en la cual el grupo carboxilo ha perdido un protón y el

grupo amino lo gana. Nótese que la carga negativa del grupo carboxilo se deslocaliza entre los dos átomos de oxigeno.

Hay 20 aminoácidos distintos que forman parte de las proteínas. Sus nombres y sus abreviaturas se encuentran en la tabla A-II.

Nombre	Abreviatura	Nombre	Abreviatura
Alanina	A, Ala	Leucina	L, Leu
Arginina	R, Arg	Lisina	K, Lys
Asparragina	N, Asn	Metionina	M, Met
Ácido Aspártico	D, Asp	Fenilalanina	F, Phe
Cisteina	C, Cys	Prolina	P, Pro
Glutamina	Q, Gln	Serina	S, Ser
Ácido Glutámico	E, Glu	Treonina	T, Thr
Glicina	G, Gly	Triptófano	W, Trp
Histidina	H, His	Tirosina	Y, Tyr
Isoleucina	I, Ile	Valina	V, Val

Tabla A-II. Nombre y abreviaturas de los aminoácidos de las proteínas.

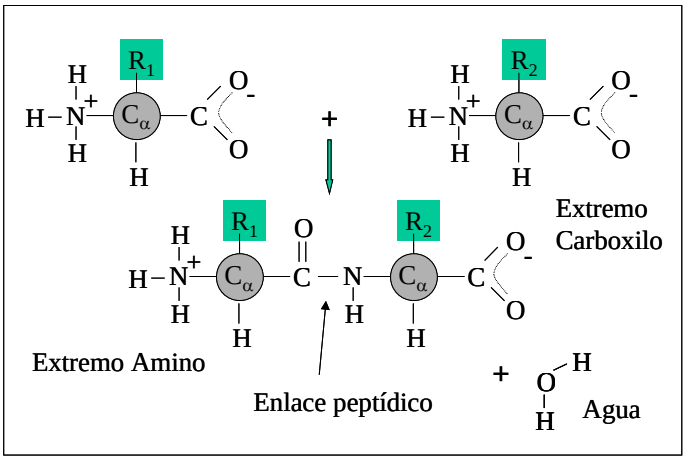


Figura A.8. Esquema que muestra la formación del enlace peptídico.

Los aminoácidos se unen covalentemente entre ellos a través de la formación de un enlace entre el grupo α-carboxilo de uno de ellos y el grupo α-amino del siguiente. A este enlace se le conoce con el nombre de enlace peptídico y a los productos formados por este enlace con el nombre de péptidos (ver Fig.A.8). A las

cadenas que contienen unos pocos péptidos se les llama oligopéptidos mientras que si las cadenas son largas polipéptidos. Un aspecto importante es que siempre se mantiene un extremo amino terminal (grupo amino NH_3^+) y un extremo carboxilo terminal (COO^-) que le confiere un sentido.

Las proteínas no son sólo polipéptidos con una secuencia definida. Al igual que ocurría con los ácidos nucleicos a esta secuencia se la conoce con el nombre de estructura primaria. Por convención los aminoácidos de la estructura primaria se enumeran siempre desde el extremo amino terminal. El tamaño de las proteínas y por extensión de los genes que las codifican es muy diverso. Por ejemplo la mioglobina humana (una proteína que transporta y almacena oxigeno) tiene 153 aminoácidos (el gen tendrá, por consiguiente, 459 pb). Ésta es una proteína relativamente pequeña. Algunas proteínas llegan a tener varios miles de aminoácidos.

A.3.1. Estructura tridimensional de las proteínas

Hasta ahora hemos visto la estructura primaria de las proteínas. Sin embargo, la mayoría de las proteínas tienen una organización estructural mucho más compleja. Es precisamente esta estructura tridimensional la que le permite desempeñar su función biológica.

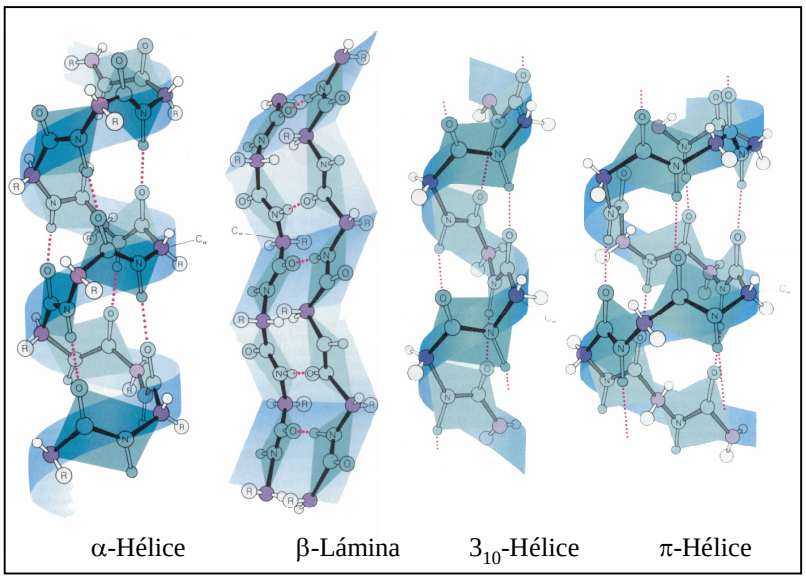


Figura A.9. Modelos de estructura secundaria de proteínas. De izquierda a derecha: α-hélices, láminas-β, hélices 3_{10} y π-hélices

En los años 50, la aplicación de la difracción de rayos X en cristales de proteína permitió descubrir las estructuras internas de las proteínas. La estructura secundaria de las proteínas se refiere a la organización tridimensional local de un grupo de péptidos. De entre las diversas estructuras secundarias posibles para polipéptidos, las más habituales son las α-hélices, las láminas-β, las hélices 3_{10} y las π-hélices. Un esquema de estas estructuras se incluye en la Fig.A.9. La estructura terciaria se refiere a la organización global de la proteína. La estructura cuaternaria ser refiere a como se relacionan las diferentes subunidades que constituyen una proteína oligomérica (Fig.A.10).

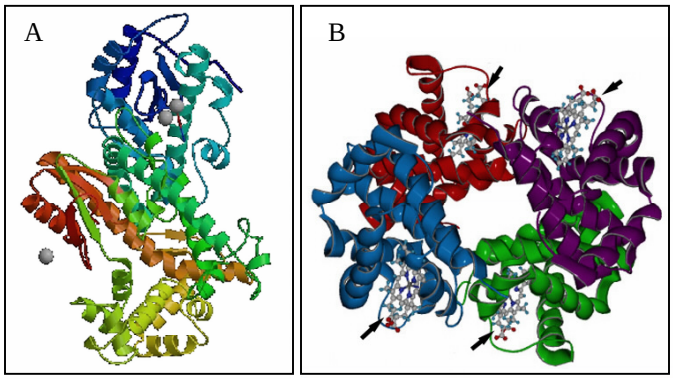


Figura A.10. Estructura terciaria del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (A) y estructura cuaternaria de la hemoglobina donde se muestran las cuatro subunidades y los grupos hemo (flechas) (B).

A continuación describiré algunos tipos de proteínas que realizan tareas muy específicas como son los factores transcripcionales, las enzimas de restricción, las ligasas y las polimerasas. La razón por la que he escogido éstas es porque de alguna manera se han empleado en el trascurso de esta tesis y comprender cómo funcionan ayuda a entender la manera en la que se han realizado los experimentos y fabricado las muestras. También hablaré de dos técnicas tremendamente usadas en cualquier laboratorio de biología molecular como es la PCR para fabricar fragmentos de ADN y la electroforesis para visualizarlos.

A.4. Factores transcripcionales (el *on/off* de la transcripción)

¿Qué origina que un proceso tan complejo como la transcripción se ponga en marcha? Ésta pregunta, no tiene una respuesta sencilla y en la actualidad gran parte de la investigación que se realiza va en el camino de comprender qué hace que un proceso biológico se active. Desde un punto de vista simplista la

trascripción es regulada a través de ciertas proteínas llamadas factores transcripcionales. Mediante la unión de estas proteínas a elementos específicos de ADN se señala que el proceso debe realizarse o no. Las regiones a las que los factores transcripcionales se unen se denominan regiones reguladoras, se encuentran habitualmente en el promotor del gen (secuencia situada por delante del ATG, que marca el comienzo del gen) y tienen habitualmente un tamaño de 8-20 pb. Si el factor transcripcional promueve la expresión del gen se le denomina activador y la secuencia reguladora en consecuencia se la llama UAS (Upstream Activating Sequence); mientras que si lo reprime se le llama represor y la secuencia reguladora URS (Upstream Repressing Sequence). Un esquema sencillo que muestra los diferentes elementos del gen y la regulación génica se muestra en la Fig.A.11.

La identificación de factores transcripcionales es esencial en biología molecular. En la actualidad existen varias técnicas para identificarlos. En el transcurso de esta tesis se ha empleado la microscopía de fuerzas como una técnica alternativa que en numerosos casos puede competir con las técnicas bioquímicas tradicionales (ver capítulo 4).

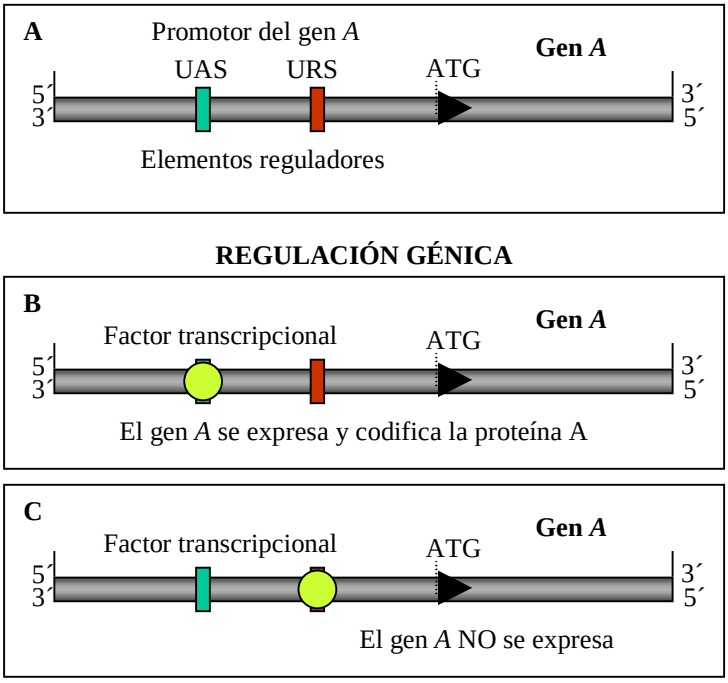


Figura A.11. Esquema simplista que muestra los diferentes elementos en un gen (parte A) y los mecanismos por los cuales la trascripción es regulada (partes B y C).

A.5. Enzimas de restricción y ligasas (tijeras y pegamento)

Las endonucleasas de restricción se caracterizan por cortar una cadena de ADN cuando encuentran una secuencia específica. En la actualidad varios cientos de enzimas de este tipo han sido aislados. Entre los diferentes tipos de enzimas de restricción los más utilizados son los llamados del tipo II por su gran valor en investigación. La mayoría son homodímeros con subunidades de entre 30 o 40 kDa[1] dónde un ion divalente — generalmente Mg^{2+} o Mn^{2+} — es necesario para que la enzima realice el corte y no ATP como ocurre con otro tipo de enzimas. La manera en que estas enzimas cortan se resume en la Fig.A.12. Básicamente, este tipo de enzimas rompen el enlace fosfodiester entre bases de manera simétrica. Dependiendo del lugar de corte, estas enzimas pueden dejar un trozo de cadena simple de ADN en el estremo 5´ (por ejemplo *Bam*HI), en el extremo 3´ (por ejemplo *Pst*I) o extremos romos (*Sma*I).

Enzima	Secuencia		
*Bam*HI	5’ G↓GATC C 3’ 3’ C CTAG↑G 5’	⇨	5’ G-OH 3’ 3’ CCTAG-P 5’
*Pst*I	5’ C TGCA↓G 3’ 3’ G↑ACGT C 5’	⇨	5’ CTGCA-OH 3’ 3’ G-P 5’
*Sma*I	5’ CCC↓GGG 3’ 3’ GGG↑CCC 5’	⇨	5’ CCC-OH 3’ 3’ GGG-P 5’

Figura A.12. Esquema que muestra tres enzimas de restricción que cortan el ADN de tres maneras distintas. Los dos primeros generan una cadena simple de ADN con 4 bases, en el primer caso en el extremo 5´ y en el segundo en el extremo 3´. El tercer enzima genera extremos romos.

La tarea complementaria a la realizada por las enzimas de restricción la realizan las ligasas. La ADN ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiester entre los extremos 5´ y 3´ del ADN. Los extremos deben poseer un grupo hidroxilo en el extremo 3´ y un grupo fosfato en el 5´. La ADN ligasa fue descubierta en 1967. En la actualidad se conocen varios tipos de ligasas en función del cofactor que emplean y dependiendo de si son capaces de ligar extremos romos o no.

[1] 1 Dalton (Da) o unidad de masa atómica es $1.6605402 \times 10^{-27}$ kg. 1 Da = 1 g/mol o 1 g = N_A·Da. N_A es el número de Avogadro que vale $6.023x10^{23}$.

A.6. Electroforesis en gel de agarosa

La palabra electroforesis hace referencia a la migración de moléculas cargadas que se encuentran dentro de una solución cuando se aplica un campo eléctrico. La velocidad de las moléculas depende de dos factores. Por un lado depende de la fuerza electrostática aplicada sobre las mismas que es $q \cdot E$ siendo E el campo eléctrico y q la carga y por otro lado de la fuerza de fricción, $\mu \cdot v$, siendo v la velocidad de las partículas y μ el coeficiente de fricción que depende del tamaño y de la forma de las partículas.

Cuando se aplica un campo eléctrico las moléculas alcanzarán una velocidad constante cuando se igualen las fuerzas de empuje y las de fricción. Es decir:

$$\mu \cdot v = q \cdot E \tag{A-1}$$

Podemos definir la movilidad electroforética (η) como la velocidad por unidad de campo eléctrico con lo cual:

$$\eta = \frac{v}{E} = \frac{q}{\mu} = \frac{Ze}{\mu} \tag{A-2}$$

donde la carga se ha puesto como múltiplos de la carga del electrón (e). Por tanto la movilidad depende de la carga y de las dimensiones de la molécula. Ya que iones y macro-iones difieren en ambos aspectos, su comportamiento bajo un campo eléctrico proporciona un poderoso método de separarlos.

Hay varios tipos de electroforesis dependiendo del soporte físico que utilizan, papel o gel, y del material del que está hecho este soporte. Dentro de los geles los más comunes son los hechos de poliacrilamida, un polímero soluble en agua, y de agarosa, un polisacárido. Yo me centraré en los geles de agarosa. La agarosa es un polisacárido que se disuelve normalmente en una solución tamponante (Tris-Acetato-EDTA (TAE)[2], por ejemplo) y que es líquida a alta temperatura (alrededor de 100 °C) y sólida a temperatura ambiente. Una vez disuelto la agarosa a alta temperatura, la solución líquida se vierte sobre un molde y se deja enfriar. Cuando

[2] Otros tampones para electroforesis son por ejemplo TBE (Tris-Borate-EDTA)

se ha enfriado se retira el molde y el gel se coloca en la cubeta que llenaremos con la misma solución tamponante con la que se ha hecho el gel (TAE) (ver Fig.A.13). La solución de ADN que introducimos en los pocillos, dejados por el molde, contiene glicerol y un colorante[3]. El glicerol se utiliza para hacer más densa la solución y que ésta no se salga del pocillo. El colorante es una molécula que migra a una velocidad conocida y que, por tanto, se usa para seguir la evolución del experimento. En este momento conectamos el voltaje y las moléculas migran. En el caso del ADN, que es negativo a pH normal, migrará hacia el ánodo o electrodo positivo. Generalmente, el colorante migra más rápidamente que la molécula de ADN por tanto con desconectar el sistema antes de que el colorante se salga del gel conseguimos que no se nos escapen las moléculas de ADN.

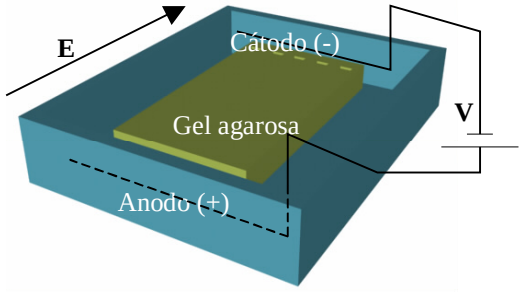


Figura A.13. Esquema que muestra una electroforesis en un gel de agarosa.

Una vez acabado el experimento el gel se tiñe normalmente con Bromuro de Etidio[4]. Esta molécula se intercala al ADN y es fluorescente cuando se la ilumina con luz ultravioleta. Este procedimiento nos permite conocer dónde se encuentran las moléculas de ADN. Un procedimiento alternativo consiste en añadir Bromuro de Etidio al gel en el momento de su fabricación. De esta forma no es necesario realizar el teñido final.

En la Fig.A.14 se muestra un esquema para explicar el procedimiento por el cual podemos visualizar moléculas de ADN que hemos separado mediante una

[3] Los colorantes más utilizados son el Bromophenol Azul que se mueve a una velocidad igual a la de una molécula de ADN de cadena doble de 300 pb y el CianoXilenol que se mueve a la misma velocidad que una molécula de ADN de 4 kpb (en una agarosa de 0.5-1.4%).

[4] El bromuro de etidio es una molécula que contiene un grupo plano que se intercala entre las bases del ADN. La posición fija de esta molécula y la proximidad a las bases hace que el rendimiento de su fluorescencia sea mucho mayor cuando se intercala en el ADN que cuando está libre en solución. La luz ultravioleta a 254 nm es adsorbida por el ADN y transmitida al colorante; la radiación a 302 nm y 366 nm es adsorbida por el colorante mismo. En ambos casos, la energía es re-emitida a 590 nm en el rango del naranja del visible.

electroforesis (parte izda. de la figura). La parte de la derecha nos muestra una fotografía tomada de un gel en la que vemos que sólo tenemos una especie de ADN y que tiene un tamaño de 8500 pb. Como se puede ver lo normal es hacer correr en una de las calles un conjunto de moléculas de dimensiones conocidas (marcadores) que nos permiten medir, por comparación, el tamaño de las moléculas que queremos analizar.

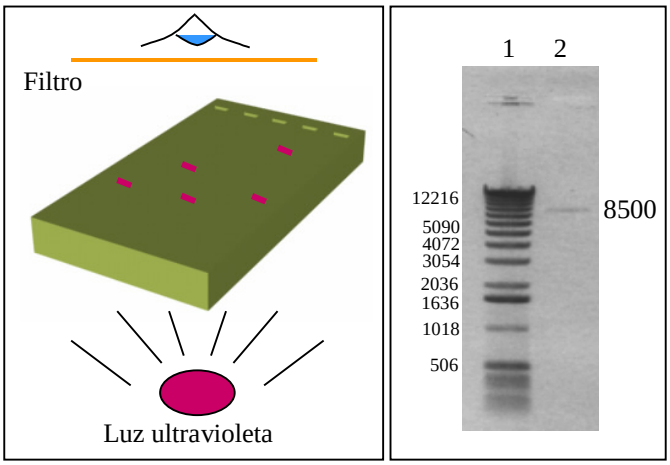


Figura A.14. Parte izquierda: esquema que muestra el procedimiento para visualizar moléculas de ADN. Las moléculas han intercalado Bromuro de Etidio con lo cual emiten en el visible cuando se las ilumina con luz ultravioleta. Parte derecha: experimento real que nos muestra que sólo tenemos un tipo de ADN y que además es de un tamaño de 8500 pb.

Para moléculas largas como los ácidos nucleicos, que tienen una carga por residuo (ver Apto. A.2), la carga es proporcional a su longitud. Para este tipo de moléculas la movilidad relativa es aproximadamente lineal con el logaritmo del peso molecular de la molécula.

A.7. Ejemplo práctico. Linearización de plásmidos

Para la realización de este experimento he empleado el plásmido pUC18 (Sigma-D-4154). El pUC18 es una cadena circular de ADN de 2686 pb que se obtiene comercialmente. Este plásmido posee una región llamada de clonación única donde se localizan varias secuencias de corte de diferentes enzimas de restricción. El experimento consiste en visualizar, mediante SFM y usando la técnica de la electroforesis, las moléculas de ADN antes de ser cortadas y

después de ser cortadas. El la Fig.A.15 podemos ver las moléculas de pUC18 antes de ser cortadas.

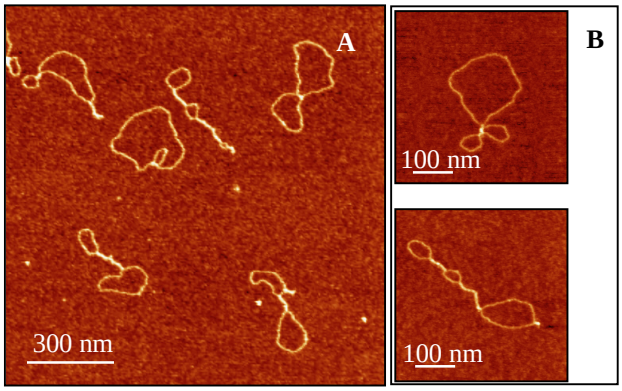


Figura A.15. Imagen AFM del plásmido pUC18. Las moléculas son circulares y se encuentran superenrolladas. El tamaño de las moléculas es 2686 pb.

Las moléculas que se han empleado son moléculas circulares, esto significa que no tienen extremos 5´ o 3´ libres. Las moléculas de ADN no aparecen como círculos abiertos sino que aparecen en una estructura más compacta. Esto se debe a que se encuentran superenrolladas, lo que significa que la doble hélice se cruza sobre sí misma varias veces. A la estructura superenrollada del ADN se la llama habitualmente estructura terciaria. Normalmente el enrollamiento es a izquierdas aunque también es posible superenrollar el ADN a derechas.

La enzima de restricción que emplearemos es *Bam*HI (Sigma R-0260). Normalmente el tampón en el que se lleva a cabo la reacción es suministrado con la enzima. En las especificaciones de la enzima nos indica la cantidad del mismo que hay que utilizar para llevar a cabo la digestión. Habitualmente se añade un exceso de la enzima (por ejemplo 20 veces) para asegurarnos la digestión completa. La reacción de digestión de ADN lleva ~1 h a 37°C. Una vez cortado el ADN se puede o bien inactivar la enzima manteniéndolo a una temperatura elevada[5] (típicamente 65°C) durante 20 min., o bien purificar el ADN mediante una extracción fenol-cloroformo seguida de una precipitación con etanol. Mediante este proceso separamos el ADN de las enzimas u otros contaminantes. El ADN podemos resuspenderlo en agua u en otro tampón. Para comprobar el fruto de la reacción de digestión y de purificación podemos realizar una electroforesis. En la Fig.A.16 se muestra la fotografía tomada del gel de agarosa en el que se ha realizado este experimento.

[5] Notar que ciertos enzimas no pueden ser inactivados por temperatura

En la calle M de la Fig.A.16 se muestran los marcadores de longitudes del ADN. En la calle 1 se muestra el producto sin cortar. Nótese que aparecen dos bandas bien definidas cuyas longitudes, comparándolas con la calle de los marcadores, no se corresponden con la longitud nominal del ADN empleado (2686 pb). Esto es debido a que tenemos dos especies del ADN, una superenrollada que avanza mucho mas rápido que el ADN lineal debido a su forma compacta y una circular que se retrasa respecto a la banda del ADN lineal. Con este experimento también vemos que la electroforesis en gel de agarosa también nos permite distinguir entre estas dos especies del ADN. En la calle 2 de la Fig.A.16 se muestra el producto de la digestión del ADN con la enzima *Bam*HI. En este caso las dos bandas que veíamos en la calle 1 se convierten en una única que se encuentra a la altura correcta de 2686 pb.

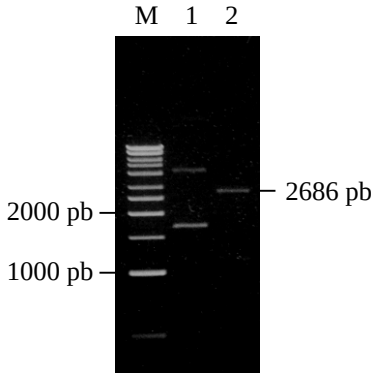


Figura A.16. Gel de agarosa que muestra el pUC18 antes de ser cortado (calle 1) y después (calle 2). Nótese que aparecen dos bandas en la calle 1. Esto es debido a la co-existencia de dos especies del ADN: relajada y superenrollada.

Como técnica alternativa a la electroforesis podemos usar el microscopio de fuerzas para visualizar los fragmentos de ADN linearizados. En la Fig.A.17 se muestra el resultado de este experimento.

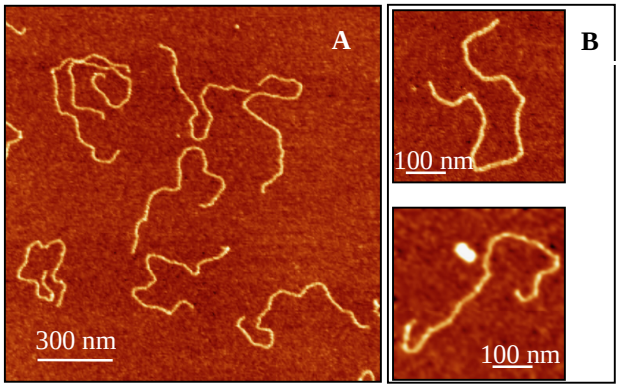


Figura A.17. Imagen de AFM que muestra los fragmentos de ADN linearizados (parte A). En la parte B se muestran dos imágenes de dos moléculas Nótese que todos los fragmentos tienen la misma longitud y que por tanto constituyen un excelente material para la calibración de los tubos piezoeléctricos. La longitud de las moléculas es 914 nm.

Un aspecto importante de este experimento es que tras el corte todas las moléculas de ADN son exactamente iguales y de la misma longitud. Podemos aprovechar esta cualidad de nuestra muestra para usarla como muestra patrón para calibrar los tubos piezoeléctricos. Notar que este método asume que la calibración en las direcciones X e Y del barrido es la misma. Esto es un aspecto habitual en las calibraciones de piezotubos para SFM. La utilidad de este tipo de muestras para calibración puede ser muy grande ya que en la actualidad prácticamente no existen muestras patrón para SFM que nos permitan esta precisión (1 base = 0.34 nm) (ver Anexo B sobre la calibración de los piezotubos para AFM).

A.8. ADN Polimerasa (un motor molecular)

La primera ADN polimerasa (ADN polimerasa I) fue descubierta a mediados de los años 50 por Arthur Kornberg que obtuvo el premio Nóbel en 1959. Sin embargo, no fue hasta 1993 cuando se consiguió la estructura atómica de la enzima acoplada con una cadena de ADN (Beese et al. 1993). En la actualidad se conocen 5 tipos distintos de ADN polimerasas para células bacterianas. La ADN polimerasa I (de *E. coli*) consiste en una única cadena polipeptídica de 105 kDa. Posee tres tipos distintos de actividades (ver Fig.A.18):

a) Polimerización. La enzima construye ADN de cadena doble a partir de ADN de cadena simple. La enzima requiere un molde y un cebador con un extremo 3´-OH accesible.

b) 3´ Exonucleólisis. La enzima es capaz de degradar ADN de cadena simple a partir del extremo 3´-OH.

c) 5´-Exonucleólisis. La enzima degrada ADN de cadena doble a partir del extremo 5´-P, por tanto transforma ADN de cadena doble en ADN de cadena simple.

La actividad nucleolítica desde el extremo 3´ le permite realizar una labor de *proofreading* con la que incrementa enormemente la fidelidad de la enzima. Las ADN polimerasas son bastante distintas entre si a pesar de que realizan tareas más o menos similares. Por ejemplo hay polimerasas que trabajan a velocidades de hasta 20 nucleótidos/s mientras otras lo hacen a velocidades de

1000 nucleótidos/s. No todas poseen todas las actividades catalíticas antes mencionadas. Por ejemplo la ADNpol III no posee ni actividad 3´Exo ni 5´Exo incrementando enormemente la velocidad pero también incorporando muchos errores. La procesividad (numero de bases que catalizan antes de desprenderse de la cadena de ADN) es también muy distinta dependiendo de la polimerasa en cuestión. Mientras la ADNpol I tiene una procesividad de 3-200 nucleótidos la ADNpol III tiene una procesividad de más de 500.000. Semejantes motores moleculares no abundan en la célula y tipicamente encontramos del orden de 10 para la la ADNpol III y de 400 de ADNpol I.

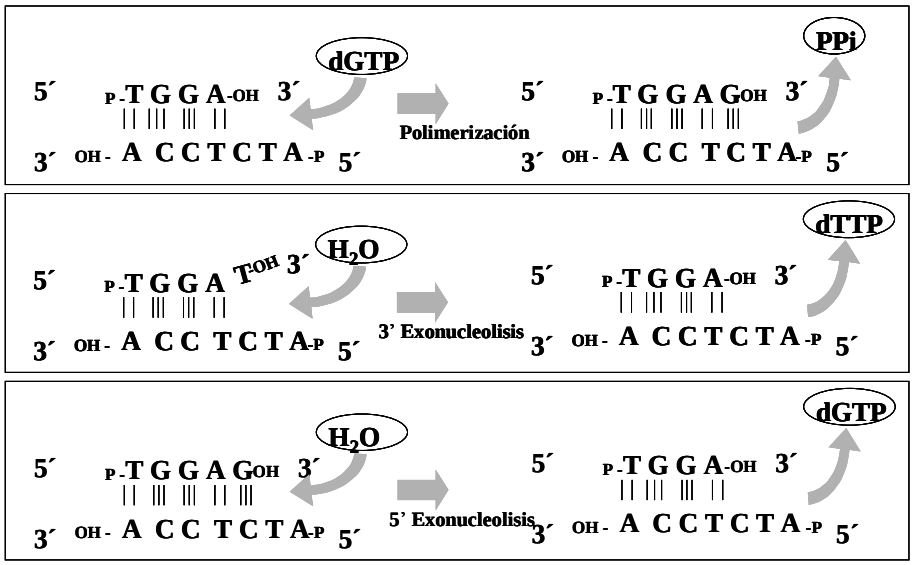


Figura A.18. Esquema que muestra las distintas actividades de la ADN polimerasa I.

La estructura de la ADN polimerasa se asemeja a la de una mano abierta. Posee una zona semejante a la palma de la mano donde se coloca la molécula de ADN y unas extremidades en forma de dedos que se cierran sobre el ADN. Se ha asociado el movimiento de los dedos a la incorporación de un nucleótido aunque en la actualidad aún se desconoce con exactitud el mecanismo de polimerización. La ADN polimerasa está dentro de un grupo de moléculas llamadas motores moleculares que transforman energía química en mecánica.

A.9. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La clonación génica, a través de técnicas de ADN recombinante, revolucionó la biología a mediados de los años 70, ya que permitía al investigador aislar y

amplificar genes individuales para el análisis de su secuencia, la expresión o la regulación. El clonaje requería células vivas en las que se introducían las moléculas de ADN que se quería amplificar y se empleaba la maquinaria celular para realizar el trabajo. En 1987 se introduce la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) y provoca una segunda revolución. La PCR permite amplificar pequeñísimas partes de ADN in vitro, esto es sin usar células vivas. Esta técnica ha facilitado el análisis de genes de eucariotas por que evita el tedioso trabajo de clonar ADN a partir de grandes genomas.

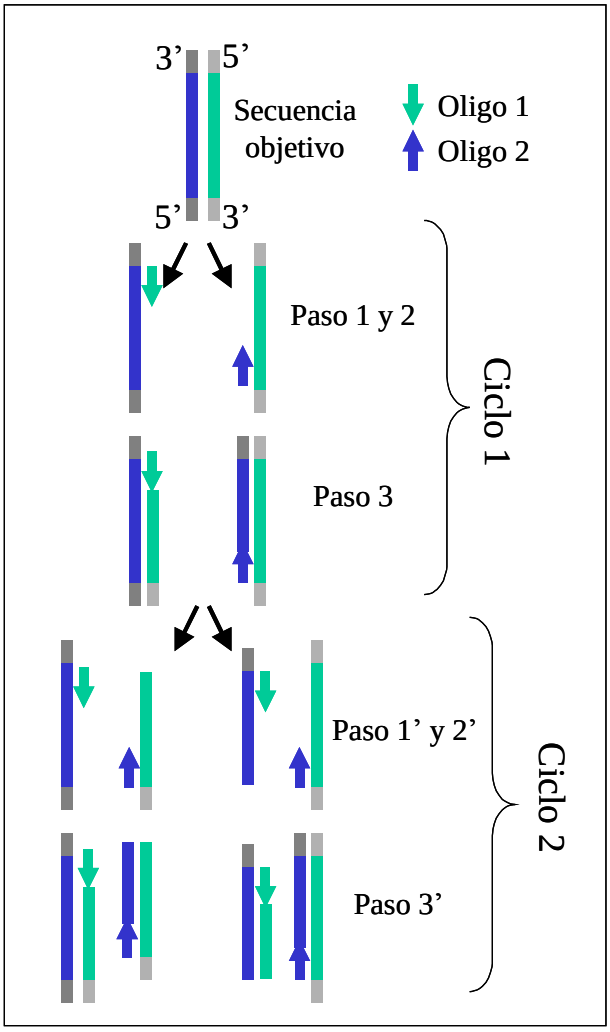


Figura A.19. Dos ciclos de la PCR. El segmento indicado con los colores • y • se quiere amplificar usando los cebadores (oligonucleotidos) indicados con flechas en la dirección 5'→3'. Cada ciclo consta de tres pasos. El paso 1 consiste en separar las dos hebras del ADN calentando la muestra; en el paso 2 se pegan los cebadores bajando la temperatura y en el paso 3 se activa la polimerasa que construye la hebra complementaria a partir de una mezcla de los cuatro desoxirribo-nucleótidos presentes en la reacción.

La PCR requiere conocer las secuencias que rodean la región que se quiere amplificar. Requiere también la fabricación de oligonucleotidos cuya secuencia sea complementaria a estas regiones frontera y que sirven como cebadores para la reacción que lleva a cabo la ADN polimerasa. En la reacción se deben incluir,

obviamente, los desoxiribonucleotidos que van a ser los *ladrillos* que va a utilizar la polimerasa para construir la molécula. La técnica de la PCR es posible gracias a una polimerasa especial que es estable a altas temperaturas. Esta enzima se llama *Taq* Polimerasa y se encuentra en una bacteria que vive en aguas termales. La posibilidad de activar o desactivar su actividad biológica con la temperatura dio lugar a la idea de la PCR, que funciona mediante ciclos térmicos.

Un esquema que muestra las bases de esta técnica se ilustra en la Fig.A.19. En primer lugar se separan las dos hebras de la cadena de ADN que se quiere amplificar (92°C durante 40 s). A continuación se baja la temperatura (55°C durante 40 s) para que los cebadores se unan a las hebras de ADN (paso 1 y 2). Finalmente se sube la temperatura a 75°C y se mantienen durante 90 s. Esta es la temperatura en la que la enzima está activo y realiza la polimerización de la cadena de ADN a partir del cebador (paso 3). Entonces un segundo ciclo comienza con la desnaturalizacion, unión del cebador y polimerización. Habitualmente estos ciclos se repiten por 30 veces usando un dispositivo que controla la temperatura y el tiempo (termociclador). El número de copias de una cadena de ADN que se obtienen por esta técnica es 2^{n-1} (siendo n el número de ciclos): 2^{29} copias significan muchas moléculas!

A.10. Ejemplo práctico. Fabricación de muestras de ADN para realizar ensayos enzimáticos y experimentos con pinzas ópticas

He decidido incluir en esta sección todo el protocolo de fabricación de las muestras que preparé durante mi estancia en el laboratorio del Prof. Carlos Bustamante en la Universidad de California en Berkeley ya que creo que constituye un buen ejemplo en el que se tratan todos los temas de manipulación de ADN vistos en este capítulo. También incluyo al final de esta sección diferentes resultados experimentales que obtuve durante el transcurso de mi estancia.

El experimento que nos proponíamos consistía en seguir la actividad de un enzima, la ADN polimerasa, en tiempo real sobre una molécula individual de ADN. La técnica que empleamos para realizar este tipo de experimentos fue las pinzas ópticas.

Las pinzas ópticas es una de las herramientas más poderosas para estudiar propiedades mecánicas de moléculas individuales. La técnica está basada en la presión de radiación, un término que se refiere a las fuerzas que sufre la materia por adsorción, *scattering*, emisión o re-radiación de luz. La presión de radiación permite mantener objetos de manera estable en el foco de un haz láser focalizado. Todas las fuerzas ópticas surgen del cambio de momento de la luz láser debido a la interacción con un pequeño medio dieléctrico. La técnica permite atrapar objetos dieléctricos (esferas de plástico de entre 0.5-5 μm de diámetro) y medir fuerzas en el rango típico de 0.2-200 pN. La manera de manipular moléculas individuales es unir una de estas esferas microscópicas las moléculas nanoscópicas que se quieren estudiar. La técnica no es nueva. Los primeros experimentos se realizaron sobre objetos relativamente grandes como bacterias, celulas o levaduras hace ya más de 10 años (Ashkin & Dziedzic. 1987; Kuo & Sheetz. 1992). Sin embargo, a medida que la técnica se hizo más sofisticada, fue posible manipular moléculas individuales (Svoboda et al. 1993; Yin et al. 1995).

Ya que no es mi intención realizar una descripción exhaustiva de la técnica de las pinzas ópticas, volvamos a los experimentos que nos ocupan. El estudio de reacciones enzimáticas por parte de la ADN polimerasa mediante pinzas ópticas requiere que la muestra de ADN tenga una serie de características:

- El extremo 3´ de la molécula de ADN debe estar accesible al enzima ya que hemos visto que la ADN polimerasa trabaja a partir de este extremo (sección A.8).

- Los extremos de la molécula de ADN deben ser modificados apropiadamente para unir la molécula a dos pequeñas esferas de plástico, que a su vez atraparemos con las pinzas ópticas.

La estrategia empleada para la fabricación de estas muestras se ilustra en la Fig.A.20. La molécula está formada por tres partes. La zona central y dos asas que están constituidas por ADN modificado y que nos permiten unir la molécula de ADN a las dos esferitas de plástico. Cada una de las partes se fabrica por separado y finalmente se unen usando ADN ligasa. En los siguientes apartados explicaré cómo fabricar cada una de estas partes.

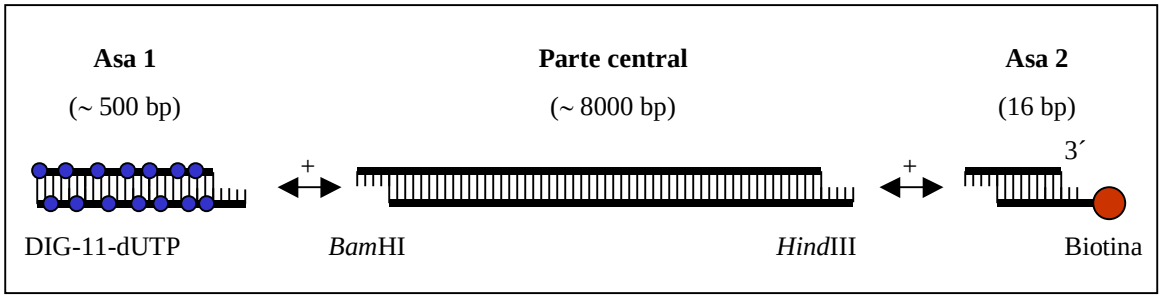


Figura A.20. Esquema que muestra la estrategia seguida para la fabricación de muestras de ADN para estudiar procesos enzimáticos en tiempo real usando pinzas ópticas.

A.10.1. Fabricación del Asa 1

Para fabricar el Asa 1 en primer lugar debemos fabricar un fragmento de ADN mediante PCR de ~900 pb de forma que contenga una única secuencia de corte de *Bam*HI u otro enzima de restricción en su interior y que esta secuencia esté situada hacia la zona central del fragmento. Este fragmento lo fabricaremos mediante PCR usando un desoxinucleótido especial llamado DIG-11-dUTP[6]. Esta molécula reemplaza dTTP de manera aleatoria cuando se usa en una proporción de 35% DIG-11-dUTP y 65% dTTP en una PCR. El motivo de usar este tipo de molécula es que al existir anticuerpos anti-DIG podemos tapizar una de las esferitas con este anticuerpo y por tanto pegarla al ADN modificado.

Para la fabricación del Asa 1 amplificamos un fragmento de 982 pb que contiene la secuencia de corte de *Bam*HI situada hacia la zona central de forma que tras el corte se obtienen dos fragmentos de 381 y 601 pb. La elección de las secuencias de los cebadores (OL1 y OL2) para hacer una PCR no es un aspecto trivial, ya que al ser moléculas de ADN de cadena simple pueden unirse entre ellas o formar *loops* internos que impidan que se unan a la cadena de ADN molde que se quiere amplificar. Existen en la actualidad multitud de aplicaciones informáticas de dominio público que permiten calcular las energías libres de asociación entre moléculas y escoger las secuencias de los oligonucleótidos más apropiadas.

Vamos a realizar dos PCRs para comprobar si hemos fabricado el ADN modificado correctamente. Una de ellas usando desoxinucleótidos normales (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y otra usando DIG-11-dUTP. Las concentraciones

[6] Digoxigenin-11-2´-deoxy-uridine-5´-triphosphate, álcali-labile (Roche Labs)

típicas que se emplean en la reacción son ~20 ng de pUC19, los oligonucleótidos OL1 y OL2 (0.4 μM), la mezcla de desoxinucleótidos (dTTP (.4 mM), dCTP (.4 mM), dGTP (.4 mM) y dATP (.4 mM)), 5 Unidades de la enzima TaqDNApol y el tampón de PCR que contiene 3 mM $MgCl_2$. Todo ello en un volumen final típico de 50 μl. Para la PCR con DIG-11-dUTP la mezcla de desoxinucleótidos es (dTTP (.26 mM), DIG-11-dUTP (.14 mM), dCTP (.4 mM), dGTP (.4 mM) y dATP (.4 mM)). El programa de tiempos seguido para realizar estas PCRs fue el mismo que el indicado en la sección anterior.

Una vez terminadas las dos PCRs se debe purificar el ADN para separarlo del resto de elementos de la reacción, a continuación lo cortamos con la enzima de restricción *Bam*HI y finalmente lo visualizamos en una electroforesis en gel de agarosa. La fotografía del gel del experimento completo se muestra en la Fig.A.21.

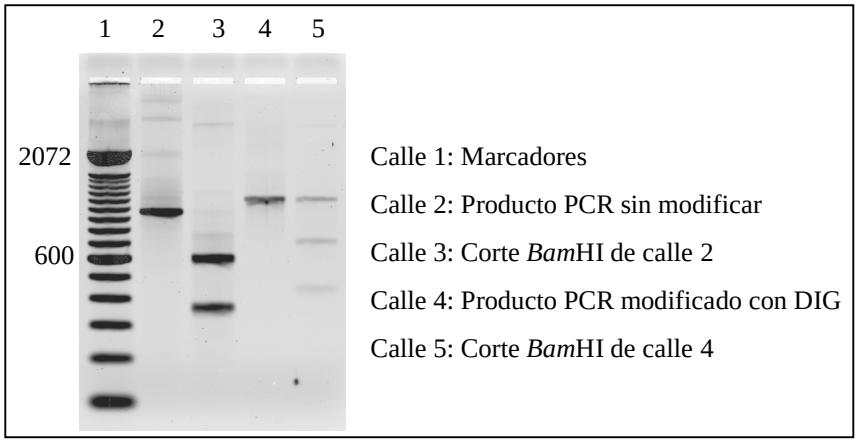


Figura A.21. PCR que muestra la fabricación del Asa 1. La calle 2 muestra el producto PCR sin modificar y la calle 4 el producto PCR modificado con DIG. Como se puede comprobar se produce un pequeño retraso del fragmento de ADN modificado. Las calles 3 y 5 muestran los resultados del corte con BamHI de las calles 2 y 4 respectivamente. Nótese que una parte del producto PCR de la calle 5 no se puede cortar, presumiblemente porque en la secuencia de corte se ha incorporado una molécula DIG y la enzima no reconoce el sitio.

Como se puede observar en la calle 2 aparece una única banda de tamaño 982 pb lo que nos demuestra que todo el proceso de PCR ha sido correcto. Al cortar este fragmento con la enzima *Bam*HI aparecen dos bandas (calle 3) de tamaños 381 y 601 pb. El fragmento fabricado usando DIG-11-dUTP aparece en la calle 4 y se puede ver que, aunque tiene el mismo tamaño, sufre un pequeño retraso respecto del fragmento sin modificar debido a la incorporación de esta

molécula. Al cortarlo con la enzima *Bam*HI aparecen tres bandas. Dos que se asocian al producto del corte y una al ADN sin cortar. Esto es debido a que se ha incorporado una molécula DIG en el lugar de una de las bases de la secuencia de corte de la enzima de restricción y por tanto la enzima no reconoce el sitio.

Los dos fragmentos de ADN modificado con DIG y cortados constituyen el Asa1.

A.10.2. Fabricación del Asa 2

El segundo asa está formado por dos oligonucleótidos (OL1 y OL2) de tal forma que uno de ellos tiene incorporado una molécula de biotina en el extremo 5´:

OL3 5´-P-AGCTATCAGGCTTA-3´
OL4: 5´-Biotina-CGTAAGCCTGTA-3´

Los dos oligonucleótidos se asocian dejando 4 bases de ADN de cadena simple en el otro extremo y cuya secuencia coincide con la de corte de la enzima de restricción *Hind*III y un extremo 3´ libre para que actúe la ADN polimerasa. Esto se puede comprobar en el esquema de la Fig.A.22.

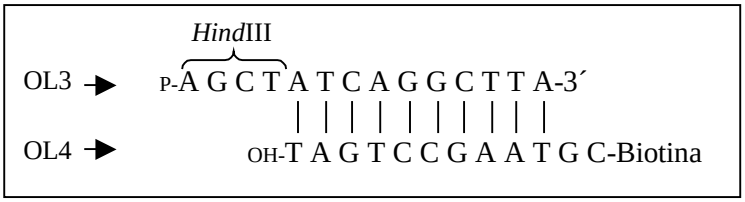


Figura A.22. Esquema del Asa 2 que posee una secuencia HindIII.

A.10.3. Fabricación de la parte central

La parte central de la molécula de ADN empleada para estos experimentos está formada por un plásmido de ~8000 pb que posee una única región *Bam*HI y una única región *Hind*III. De este forma mediante dos cortes selectivos con las citadas enzimas de restricción obtenemos un fragmento lineal de ~8000 pb que tiene dos extremos de cadena simple con secuencias complementarias a las que poseen las asas fabricadas anteriormente. Sólo tendremos que ligar los tres extremos usando T4 DNA ligasa para obtener la molécula final.

El corte con las enzimas se debe hacer de manera secuencial. Primero se corta el plásmido con uno de ellos, luego se purifica el resultado de la reacción, a continuación se corta con el otro y finalmente se vuelve a purificar el producto.

La ligación también se debe hacer de manera secuencial. Primero con los oligonucleótidos biotinilados y finalmente con el Asa 1. El resultado final es una molécula de ~8500 pb que tiene en uno de los extremos muchas moléculas DIG y en otro una molécula de biotina en el extremo 5´.

A.10.4. Experimentos con las pinzas ópticas

Como ya hemos visto las pinzas ópticas permiten atrapar partículas dieléctricas y medir fuerzas en el rango de los pN. Una de las aplicaciones inmediatas es el estudio de propiedades elásticas de moléculas como el ADN. Para ello se deben modificar los extremos de la molécula de manera similar a como se ha descrito en el punto anterior y funcionalizar la superficie de las esferas de plástico de manera apropiada.

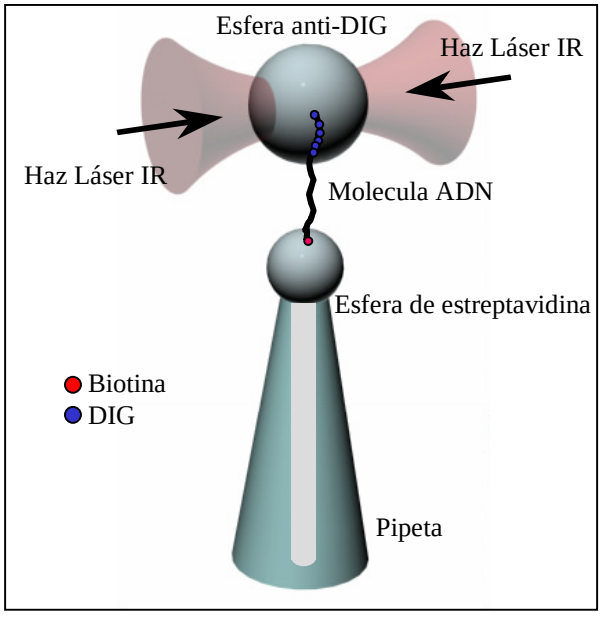


Figura A.23. Esquema que muestra el montaje experimental utilizado para estudiar reacciones enzimáticas en tiempo real sobre una molécula individual de ADN con pinzas ópticas. La molécula preparada según el protocolo anterior se une por un lado a una esfera tapizada con anticuerpos anti-DIG mediante el enlace covalente DIG-anti-DIG y por otro lado con una esfera recubierta con estreptavidina mediante el enlace biotina-estrepavidina. La esfera anti-DIG se atrapa en el haz láser infrarrojo mientras que la otra esfera se fija a una micropipeta. El diámetro de las esferas es de 3 y 2.2 μm respectivamente.

Para usar las moléculas que hemos preparado siguiendo el protocolo de la sección anterior debemos funcionalizar la superficie de las esferas de plástico con anticuerpos anti-DIG por un lado y con la proteína estreptavidina por otro. De esta forma es posible mantener una única molécula de ADN entre dos esferitas de

plástico. El esquema para la realización de los experimentos con las pinzas ópticas se muestra en la Fig.A.23.

Como ya hemos dicho las pinzas ópticas nos permiten realizar curvas de fuerza frente a distancia y a partir de ella deducir las propiedades mecánicas de una molécula. Este tipo de curvas se han realizado sobre el ADN y el resultado que se obtiene se muestra en la Fig.A.24.

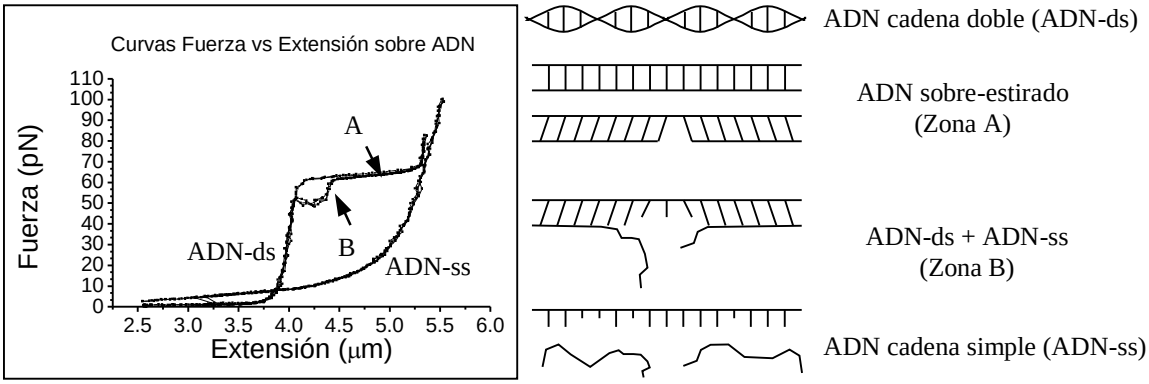


Figura A.24. Curvas de fuerza frente a distancia sobre una molécula de ADN. La curva correspondiente a ADN de cadena doble (ADN-ds) es muy diferente a la de ADN de cadena simple (ADN-ss). Esta diferencia que supone extensiones muy distintas para una misma fuerza permite estudiar procesos enzimáticos que transformen ADN en cadena simple a partir de ADN de cadena doble y viceversa.

El primer hecho relevante que se advierte en las curvas de fuerza frente a distancia realizadas sobre ADN es que el comportamiento mecánico del ADN de cadena doble (ADN-ds) es muy distinto del comportamiento del ADN de cadena simple (ADN-ss). Las moléculas de ADN empleadas en este experimento poseen una longitud de ~4 μm (medida en forma β (0.34 nm/pb)). Al comienzo del experimento la molécula de ADN se encuentra enrollada y prácticamente la fuerza que se ejerce sobre la misma es nula hasta que entramos en un régimen en el que la fuerza aumenta rápidamente. La longitud de la molécula de ADN en forma β se alcanza aproximadamente para una fuerza de 40 pN. A partir de ~65 pN entramos en un régimen en el que prácticamente la fuerza no aumenta pero la longitud de la molécula aumenta muchísimo (zona A). Posiblemente en esta región lo que ocurre es que la molécula de ADN se desenrolla perdiendo la característica de doble hélice. Cuando este proceso finaliza, las dos hebras pueden separarse y el sistema se comporta como si tuviésemos dos muelles actuando en paralelo. Si en este punto disminuimos la fuerza podemos ver que el proceso es reversible y

recuperamos la curva de fuerza frente a distancia del ADN-ds. Se produce, sin embargo un proceso de histéresis que se achaca a la coexistencia de ambas especies (ADN-ds y ADN-ss, zona B). Eventualmente puede ocurrir que una de las hebras se desprenda completamente de su complementaria y obtengamos una molécula de ADN de cadena simple (ADN-ss). Como se puede observar el comportamiento mecánico de este tipo de molécula es muy distinto al de las moléculas de ADN de cadena doble.

La distancia entre los extremos de la molécula de ADN-ss y de ADN-ds es muy distinta para una misma fuerza. Ya que la enzima ADN polimerasa, posee precisamente las actividades de transformar ADN-ds a ADN-ss (actividad de exonucleólisis) y de ADN-ss a ADN-ds (actividad de polimerización), podemos utilizar la medida de la distancia entre los extremos de la molécula de ADN para seguir estos procesos enzimáticos en tiempo real. Estos son los experimentos que se muestran en las Fig.A.25 y A.26.

En la Fig.A.25 se muestra el experimento de exonucleólisis de la enzima T7 ADN polimerasa. El experimento consiste en mantener la fuerza constante con un sistema de realimentación y hacer fluir la enzima. Si mantenemos esa fuerza por encima de 40 pN lo que se observa es que la distancia entre los extremos de la molécula de ADN aumenta. La gráfica que nos muestra la distancia entre los extremos de la molécula frente al tiempo se muestra en la parte B. Podemos calcular los ritmos a los que esto se produce haciendo la derivada de la curva (C) y representar estadísticamente estas velocidades (D). Los resultados experimentales muestran que a altas tensiones se inicia un proceso de exonucleolísis a un ritmo muy superior al que tiene lugar en ausencia de fuerza. Este experimento sugiere la presencia de una actividad exonucleolítica inducida por fuerza de hasta 100 b/s frente al ritmo exo presente en volumen que es 0.2 b/s.

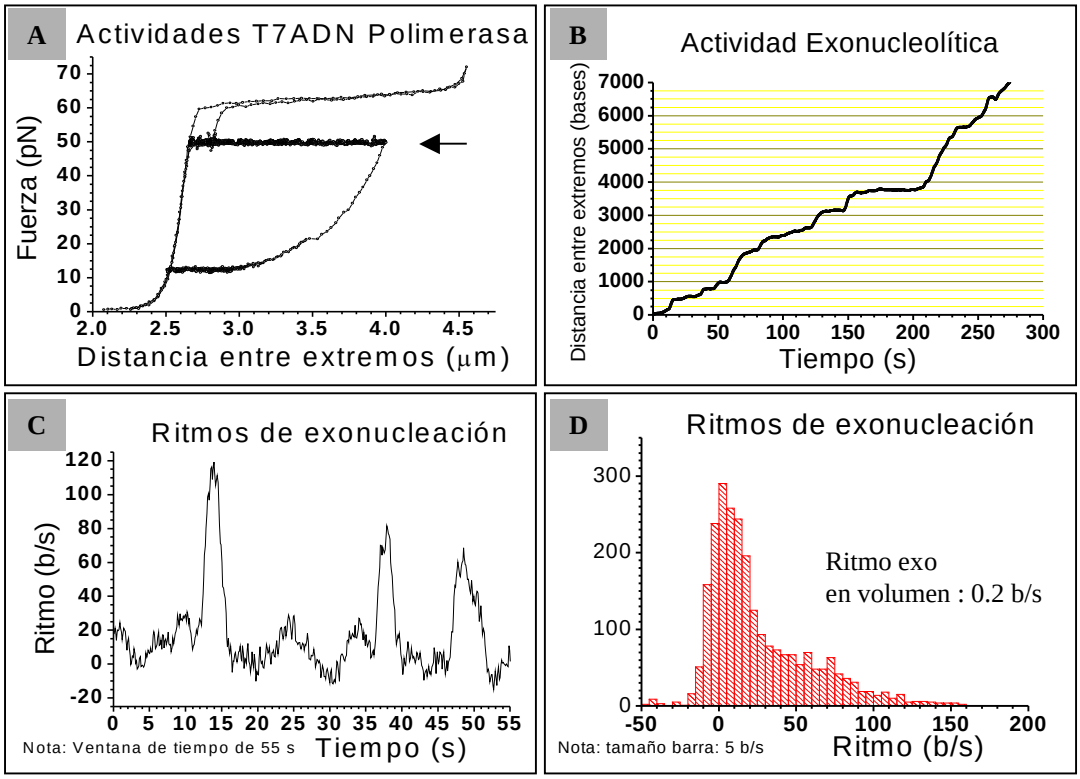


Figura A.25. Actividad de exonucleolisis de la enzima T7 ADN polimerasa. En (A) se muestra la curva de fuerza frente a distancia de la molécula de ADN utilizada. La actividad exonucleolítica se advierte porque la distancia entre los extremos de la molécula de ADN aumenta para una fuerza constante (B). Los ritmos a los que se produce el proceso se muestran en (C) y la estadística en (D).

El experimento correspondiente a la actividad de polimerización de la enzima T7 ADN polimerasa se muestra en la Fig.A.26. Si tenemos una molécula de ADN que presenta una parte de cadena doble y otra de cadena simple, es posible seguir la actividad de polimerización de la enzima a baja tensión. Esto se observa porque la distancia entre los extremos de la molécula disminuye mientras la tensión permanece constante (Fig.A.26 B). En este caso este proceso es muy rápido ya que la enzima es capaz de polimerizar 6000 bases en sólo 40 s. Se pueden calcular los ritmos a los que ocurre este proceso (Fig.A.26 C y D) y se observa que se alcanzan velocidades de hasta 300 b/s. En este caso los valores medidos están de acuerdo con los valores descritos en la literatura para volumen.

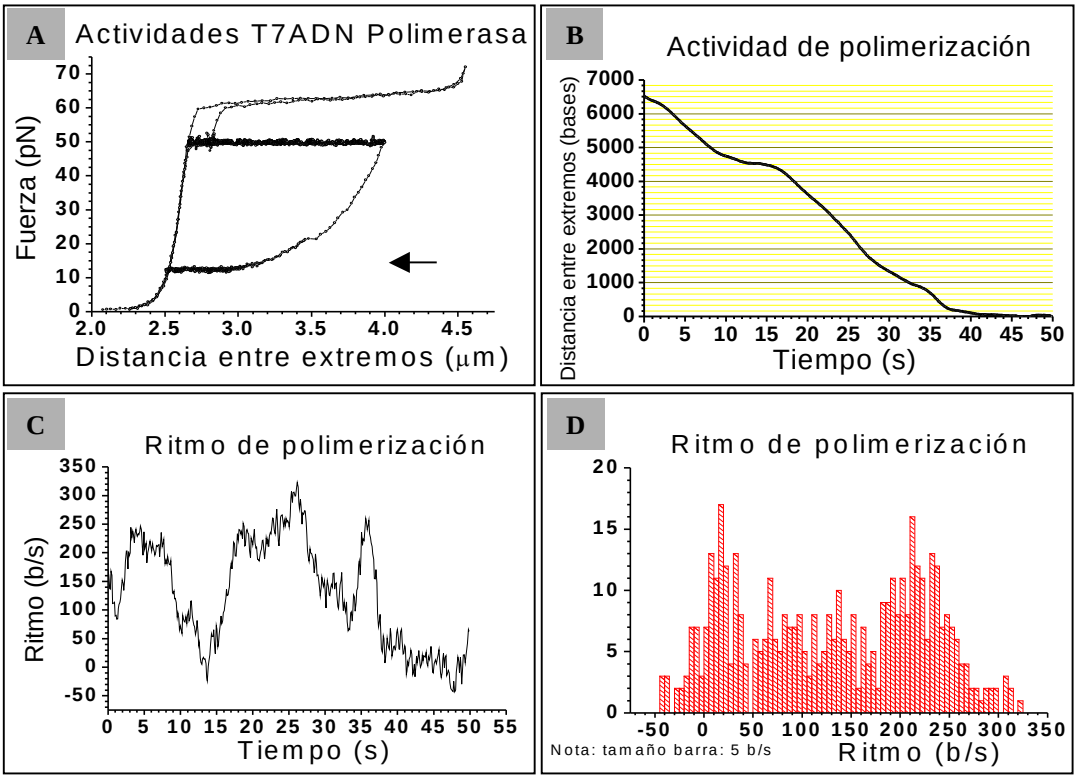


Figura A.26. Actividad de polimerización de la enzima T7 ADN polimerasa. En (A) se muestra la curva de fuerza frente a distancia de la molécula de ADN utilizada. La actividad de polimerización se produce cuando la distancia entre los extremos de la molécula de ADN disminuye para una fuerza constante (B). Los ritmos a los que se produce el proceso se muestran en (C) y la estadística en (D).

En resumen, en este último apartado he intentado mostrar, mediante los experimentos realizados en Berkeley, diferentes conceptos descritos en este Anexo. En primer lugar he presentado todo el protocolo de preparación de las muestras de ADN para realizar experimentos en los que es posible seguir la actividad de un enzima modificador del ADN en tiempo real. En segundo lugar he descrito los experimentos que nos muestran las actividades de exonucleólisis y polimerización de la enzima T7 ADN polimerasa. Estos experimentos están basados en las propiedades mecánicas del ADN tanto de cadena simple como de cadena doble. No he pretendido realizar una descripción detallada de la técnica de las pinzas ópticas ni entrar en detalle en los resultados. Mi objetivo era ilustrar otra técnica que estudia moléculas individuales y que permite obtener información relevante que no es accesible mediante técnicas bioquímicas tradicionales de volumen, como es la actividad de ciertas enzimas en función de la fuerza.

B. Calibración del microscopio de fuerzas

B.1. Calibración del AFM para visualizar moléculas individuales

Tal y como se explicó en el capítulo 1, el microscopio de fuerzas realiza el movimiento de barrido de la muestra mediante un tubo piezoeléctrico. Un material piezoeléctrico es un tipo de material que cambia sus dimensiones cuando se le aplica una diferencia de potencial entre dos de sus extremos. El comportamiento de un piezoeléctrico al aplicarle una diferencia de potencial es un tema tremendamente complejo y está fuera del objetivo de este apartado. De manera general, cuando el voltaje aplicado no es muy grande, el tubo piezoeléctrico cambia sus dimensiones de forma lineal con el voltaje. Por tanto calibrar el piezo que realiza el barrido consiste en ajustar las constantes voltaje/distancia en X, Y y Z. Tendremos por consiguiente una calibración vertical (Z) y una calibración lateral (XY).

La forma habitual de ajustar estas constantes es obtener una imagen de una estructura de dimensiones conocida y a partir de las dimensiones medidas ajustar la constante voltaje/distancia para que imagen y la estructura teórica coincidan. Ya

que los experimentos mostrados en esta tesis están hechos sobre moléculas individuales de pocos nm de tamaño debemos emplear una muestra de patrón de dimensiones similares. Para calibrar el eje Z se emplean normalmente muestras cristalinas de oro o grafito en las que la altura entre planos es conocida. Para calibrar el eje X e Y empleamos muestras de ADN de tamaño conocido.

B.1.1. Calibración Z

La calibración en el eje vertical se realizó utilizando grafito pirolítico. Esta muestra presenta superficies planas y escalones monoatómicos fácilmente medibles con un AFM. La altura teórica obtenida a partir de los modelos atómicos de un escalón de grafito es ~7 Å pero muy a menudo aparecen escalones de altura mitad a la teórica.

En la Fig. B-1 A se muestra una imagen de AFM de dos planos de grafito. Si realizamos un histograma de alturas vemos que la diferencia de alturas entre estos dos planos de grafito es 3.5 Å. Mediante este tipo de histogramas podemos medir también la dispersión o ruido en Z que es del orden del ancho a media altura de cualquiera de los dos picos. En este caso este número vale 0.6 Å. Ésta es por tanto la amplitud del ruido con la que se adquirió esta imagen. La calibración del piezo en el eje vertical se realiza ajustando la constante voltaje/distancia para que la distancia entre los máximos sea de 3.5 Å. (Fig. B-1).

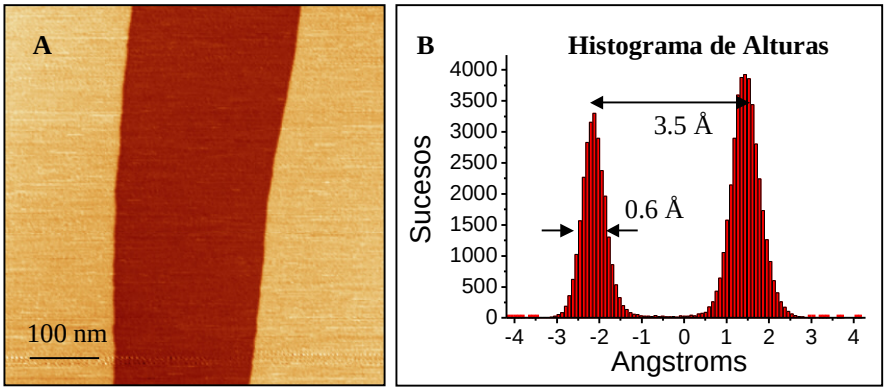


Figura B-1. Imagen de AFM de una superficie de grafito pirolítico (A) obtenida en aire ambiente en DAFM. En la imagen se muestran dos planos de grafito cuya diferencia de alturas es 3.5 Å, coincidente con la mitad de la altura del escalón de la estructura del grafito, tal y como se muestra en el histograma de alturas presentado en B.

B.1.2. Calibración XY

Para calibrar en X y en Y se emplearon moléculas de ADN de tamaño conocido. La molécula de ADN es una molécula ideal para realizar la calibración lateral del microscopio de fuerzas ya que se puede ajustar su tamaño desde pocos nm hasta miles de ellos. En este caso empleamos el plásmido pUC18 que es una cadena circular de 2686 pb. Esta molécula se puede cortar por un único sitio usando la enzima de restricción *Bam*HI de tal forma que se obtienen fragmentos lineales de 2686 pb o 914 nm (0.34 nm/pb) (Fig. B.2 B). La longitud de contorno se puede medir manualmente de manera similar a como se hizo en el Cap. 4 (Fig. B.2 C). También se puede realizar la medida de la longitud de las moléculas de ADN midiendo el perímetro de estas moléculas de forma automática (Fig. B.2 A). En este caso debemos tener en cuenta que la longitud de la molécula es la mitad del perímetro. Nótese que este método asume que la calibración en las direcciones X e Y es la misma. Experimentalmente hemos visto que esta aproximación es legítima ya que un cambio en 90° en el sentido del barrido no cambia el tamaño de las moléculas.

De manera análoga a cómo se hizo con la calibración en Z, una vez conocido el tamaño de la estructura que se está visualizando lo que se hace es ajustar el parámetro voltaje/distancia del piezo en X e Y hasta que la longitud experimental de las moléculas coincida con la teórica.

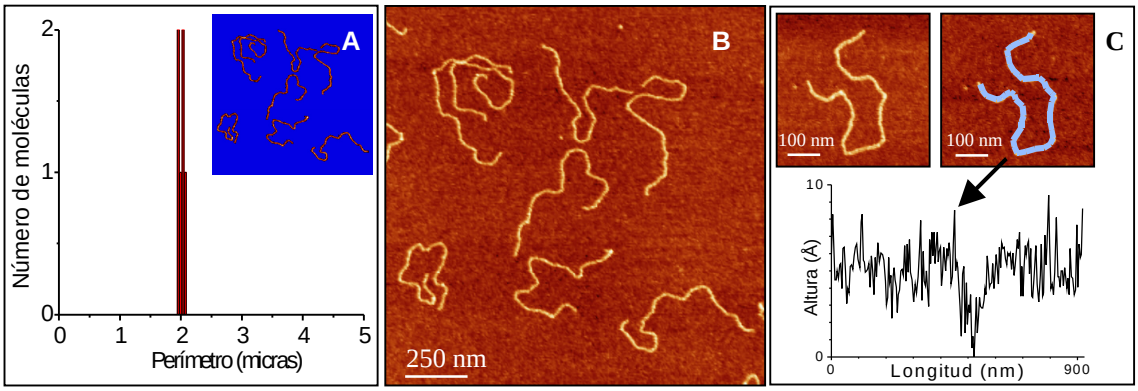


Figura B.2. Imagen de AFM de moléculas de ADN de tamaño conocido e idéntico entre ellas (B). La muestra es el plásmido pUC18 linearizado con la enzima BamHI. Los fragmentos de ADN tienen todos una longitud de 2686 pb o 914 nm. La medida de la longitud de estas moléculas se puede hacer manualmente (C) o automáticamente midiendo el perímetro (A). Este tipo de muestra se puede emplear para calibrar las dimensiones laterales del movimiento de barrido del piezoeléctrico.

Conclusiones

1.- El método de medida más apropiado para obtener imágenes de moléculas biológicas individuales en aire ambiente es el método dinámico de modulación en amplitud (DAFM) ya que es posible operar el microscopio de forma que no haya contacto entre la punta y la muestra.

a) Otros métodos alternativos como son el modo de contacto o el JM presentan daño irreversible sobre muestras como el ADN cuando se emplean en aire ambiente.

2.- Jumping Mode es un método no invasivo apropiado para visualizar moléculas biológicas individuales en medio líquido ya que este método permite controlar la máxima fuerza que se ejerce sobre las muestras y minimiza el daño ocasionado por las fuerzas laterales.

a) JM permite obtener imágenes aplicando una fuerza normal máxima de ~100 pN, valor éste considerado como umbral para producir daño irreversible sobre el material biológico.

b) La altura nominal de la molécula de ADN sólo se alcanza en medio líquido usando JM y aplicando una fuerza máxima de ~100 pN. Esta altura depende de la fuerza normal que se aplica sobre la biomolécula siendo menor cuanto mayor es la fuerza aplicada.

c) La altura nominal de moléculas biológicas de mayores dimensiones como el bacteriófago ϕ29 se obtiene también usando JM.

3.- JM permite obtener información adicional no accesible con otros métodos de medida como la fuerza de adhesión presente en medio líquido, magnitud relevante para estudiar interacciones entre moléculas.

4.- Experimentos de contacto y electrostáticos sin contacto realizados sobre moléculas de ADN de secuencia aleatoria (λ-ADN) y de secuencia conocida Poly(dG)·Poly(dC) adsorbidas sobre diferentes substratos dieléctricos demuestran que el ADN se comporta como una molécula aislante de resistividades similares a la del substrato sobre el que están depositadas: $10^{12}\ \Omega$·cm.

5.- Los protocolos desarrollados para fabricar moléculas de ADN modificadas con los iones metálicos divalentes Ni^{2+} y Co^{2+} (*M*-ADN) producen un fenómeno de condensación mediante el cual la longitud del ADN se reduce en un factor 5 y la altura de las moléculas aumenta en casi un orden de magnitud. La condensación de las moléculas de ADN explica que no entren en la matriz del gel de agarosa y permite dar una explicación a los resultados de conductividad mostrados por otros autores.

6.- Los experimentos de conductividad realizados sobre moléculas de ADN modificadas con metales demuestran que el *M*-ADN se comporta como una molécula dieléctrica.

7.- Los experimentos realizados con el AFM orientados a la caracterización estructural de los PHFs nos muestran que estos polímeros tienen morfología helicoidal con giro a izquierdas y con una periodicidad de ~75 nm.

8.- La estructura de los PHFs es compatible con la propuesta por Wischik-Crowther de forma que la estructura del filamento tiene unas dimensiones de 20 x 10 nm. Los resultados experimentales sustentan este modelo, aunque no hay

evidencia clara de que se resuelva los detalles de la subestructura dada por las fronteras entre dominios.

9.- Los experimentos realizados sobre polímeros generados *in vitro* nos muestran que el fragmento de la proteína tau de tan sólo 18 aminoácidos empleado juega un papel relevante en la estructura de los PHFs, ya que estos polímeros reproducen de manera general la morfología de los PHFs

10.- El AFM permite localizar complejos de ADN y proteínas en promotores completos, por lo que es posible identificar secuencias reguladoras en un solo experimento.

a) Se ha demostrado que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* las proteínas Pho4, Mig1 y Med8 interaccionan respectivamente con los promotores de los genes *PHO5*; *HXK2* y *SUC2*.

11.- La resolución del AFM en el posicionamiento de los complejos ADN-proteína viene dada por el radio de la punta (~10 nm o ~34 pb) y por otros factores como las interacciones inespecíficas.

12.- La microscopía de fuerzas se presenta como una técnica alternativa, a la hora de identificar secuencias reguladoras, a las técnicas bioquímicas tradicionales en términos de sencillez, velocidad y coste.

13.- La posibilidad de medir alturas de las moléculas permite deducir si las proteínas interaccionan de forma individual (monómeros) o mediante interacciones entre ellas (dímeros, trímeros, etc...)

a) La proteína Med8 interacciona con el ADN como monómero o como homodímero a probabilidades similares.

En definitiva, esta tesis es un ejemplo de aplicación de técnicas físicas, como es el microscopio de fuerzas atómicas, al estudio de sistemas de moléculas biológicas individuales y una demostración de que se puede obtener información relevante de sus propiedades físicas, estructurales y bioquímicas.

Publicaciones

Artículos aceptados:

1 Moreno-Herrero, F.,Herrero, P.,Colchero, J.,Baro, A. M. & Moreno, F. (1999). *Analysis by atomic force microscopy of Med8 binding to cis-acting regulatory elements of the SUC2 and HXK2 genes of saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters 459(3), 427-32.

2 Moreno-Herrero, F.,de Pablo, P. J.,Colchero, J.,Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2000). *The role of shear forces in scanning force microscopy: a comparison between the jumping mode and tapping mode*. Surface Science 453, 152-158.

3 de Pablo, P. J.,Moreno-Herrero, F.,Colchero, J.,Gomez Herrero, J.,Herrero, P.,Baro, A. M.,Ordejon, P.,Soler, J. M. & Artacho, E. (2000). *Absence of dc-conductivity in lambda-DNA*. Physical Review Letters 85(23), 4992-5.

4 Moreno-Herrero, F.,Herrero, P.,Colchero, J.,Baro, A. M. & Moreno, F. (2001). *Imaging and mapping protein-binding sites on DNA regulatory regions with atomic force microscopy*. Biochemical and Biophysical Research Communications 280(1), 151-7.

5 Moreno-Herrero, F.,Valpuesta, J. M.,Perez, M.,Colchero, J.,Baro, A. M.,Avila, J. & Montejo de Garcini, E. (2001). *Characterization by atomic force microscopy and cryoelectron microscopy of tau polymers assembled in Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer Disease 3, 443-451.

6 Gómez-Navarro, C.,de Pablo, P. J.,Moreno-Herrero, F.,Horcas, I.,Fernandez-Sánchez, R.,Colchero, J.,Gómez-Herrero, J. & Baro, A. M. (2002). *Using scanning force microscopy 3D modes to study the dielectric response of adsorbed DNA molecules*. Nanotechnology 13, 1-4.

7 Gómez-Navarro, C.,Moreno-Herrero, F.,de Pablo, P. J.,Colchero, J.,Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2002). *Contactless experiments on individual DNA molecules show no evidence for molecular wire behaviour*. Proceedings of the National Academy of Science, USA 99(13), 8484-8487.

8 de la Cera, T.,Herrero, P.,Moreno-Herrero, F.,Chaves, R. S. & Moreno, F. (2002). *Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: Implication in the glucose signalling pathway of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Molecular Biology 319, 703-714.

9 Moreno-Herrero, F.,de Pablo, P. J.,Fernández-Sánchez, R.,Colchero, J.,Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2002). *Scanning Force Microscopy Jumping and Tapping modes in liquids*. Applied Physics Letters 81, 2620-2623.

10 Moreno-Herrero, F.,de Pablo, P. J.,Álvarez, M.,Colchero, J.,Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2003). *Jumping Mode Scanning Force Microscopy: a suitable technique for imaging DNA in liquids*. Applied Surface Science.

11 Moreno-Herrero, F., Colchero, J., and Baro, A. M. (2003) *DNA height in Scanning Force Microscopy*. Ultramicroscopy.

12 Moreno-Herrero, F.,Herrero, P.,Moreno, F.,Colchero, J.,Gómez-Navarro, C.,Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2003) *Topographic characterization and electrostatic response of M-DNA studied by Atomic Force Microscopy*. Nanotechnology 14(2), 128-133.

Artículos en preparación:

1 Moreno-Herrero, F.,Colchero, J.,Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. *Jumping Mode Scanning Force Microscopy: a tool for precise force control and high-resolution imaging in liquids*.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Arturo, director de este trabajo, por la confianza depositada en mi y por la libertad que me ha dado para poder trabajar en este campo prácticamente desconocido. Gracias por mantener el equilibrio en el laboratorio y por luchar por todos. En segundo lugar quiero agradecer a mis padres por todo su apoyo, ayuda y ánimo durante todo este periodo. Tener la ciencia en casa es un privilegio y hace que las tareas sean más sencillas.

Gracias a Jaime y a Julio, motores de la parte de fuerzas del laboratorio, por estar al pie del cañón todos los días y todas las horas. Gracias por la ilusión puesta en todos los proyectos y por hacer que el laboratorio esté donde está. Sin vosotros no habría ni la mitad de este trabajo. También mencionar a Chema. Gracias a todos, por predicar con el ejemplo y demostrar que una tesis no se saca trabajando sólo 10 horas diarias.

Tengo que agradecer muy especialmente a mi generación de doctorandos, Pedro, Oscar y Adriana, de los cuales ya sólo quedo yo. Gracias a todos por aceptar al extranjero venido de tierras astures, por demostrarme la capacidad de trabajo del ser humano y por vuestra amistad. Pedrito, mantente gruñón pero no olvides lo importante: la amistad. Mención especial al “Ojcar” y la “Adrianita”, que puedo decir que ellos no sepan. Sé que su amistad es para siempre. Gracias

Oscar por ser un compañero de piso excelente, por escucharme en todo momento y aceptar mis caprichos y cositas. Gracias amigo. También agradecer a la nueva generación, Iván, Cristina y Nicoleta por su amistad. Aunque muy distinta a la anterior también con un gran corazón. A ellos y a los nuevos estudiantes, Carolina y Juan, les deseo mucha suerte. Al equipo informático presente, Rafa, Nacho, Pablo y Michel, y a todos aquellos que han aportado su línea de código al monstruo. Gracias a todos ellos por hacer que el microscopio haga maravillas aunque a veces juremos en arameo cuando se cuelga el programa. Y a todos aquellos que han pasado por el laboratorio y que han contribuido al prestigio y medios de los que nos beneficiamos todos, Mónica, Nacho, Agustina y en especial a Javi. Sabes que te considero un doctorando más.

Es justo recordar y agradecer también a todos aquellos que han pasado más o menos tiempo entre nosotros y nos han ayudado a llevar esto mucho mejor: Celia, Eva, Garth, Mar, Jordi, Iván 2 y Mariola. Gracias por introducir frescura en la atmósfera del labo.

A los técnicos del departamento, y en especial a Santiago, gracias por hacer de los pequeños encargos una dedicación y un trabajo cuidadoso y bien hecho. Gracias a la familia de Nanotec. Sois un grupo con una calidad humana fuera de lo normal. Con vosotros los problemas se solucionan en el día. Muchas gracias, Elsa, por enseñarnos como llevar el orden y el rigor al caos de las finanzas. Si no estuvieras tú, estábamos todos en carabanchel! Y en general gracias a toda la gente del departamento, especialmente a los estudiantes. Gracias por contribuir dando el callo, día a día, a la reputación de este departamento.

También tengo unas palabras para mi familia adoptiva allá en las Américas. Gracias al profesor Carlos Bustamante por permitirme trabajar en su grupo en Berkeley durante 8 meses. Allí aprendí la mayoría de la bioquímica que sé y cómo funciona un laboratorio de alto nivel. Gracias a todo el grupo por acogerme y en especial a Brian por trabajar codo con codo conmigo. Eres una persona excepcional. Gracias a Nancy, Ryan y Erol por vuestra comprensión y amistad ¡Sois los mejores del Bustamante Lab!

Tengo que agradecer también a todos los grupos de investigación con los que he tenido el privilegio de colaborar: el grupo de Margarita Salas, el grupo de Jose Soler, Emilio Artacho y Pablo Ordejón. Un agradecimiento muy especial al

grupo de Jesús Ávila y al de Esteban Montejo y a sus estudiantes Raquel y Mar. Trabajar con grupos excelentes hace que el trabajo sea sencillo.

Gracias a la Comunidad de Madrid por la concesión de la beca predoctoral, aunque un poco miseria para la vida en Madrid, que me ha dado de comer durante estos más de cuatro años.

Finalmente, gracias a la familia que ha hecho más llevadera mi estancia en Madrid: la yayita, mis tíos madrileños y mis tíos y primas/o de Galapagar. Las paellitas de los domingos al aire libre no tienen precio.

Gracias a todos por todo.

Índice de Figuras

1.1. Componentes básicos de un microscopio de fuerzas 24
1.2. Fotografía del microscopio empleado en esta tesis 26
1.3. Potencial de interacción punta-muestra en aire ambiente 27
1.4. Modo clásico de contacto 28
1.5. Fuerzas laterales 29
1.6. Modo dinámico de no contacto (DAFM) 31
1.7. Parámetros de operación de DAFM 32
1.8. Modo Jumping Mode (JM) en aire ambiente 35
1.9. Comparativa de JM y DAFM 37
1.10. Efecto fuerza lateral sobre una molécula de ADN 39
1.11. Potencial de interacción punta-muestra en medio líquido 43
1.12. Estructura de la celda líquida y modos de medida en líquido 44
1.13. Espectro de frecuencias de DAFM acústico en líquido 45
1.14. Parámetros de operación de DAFM acústico 46

1.15. Imagen de HOPG en aire ambiente 46
1.16. Imagen de vidrio obtenida con DAFM electrostático 47
1.17. Parámetros de operación de DAFM magnético (M-DAFM) 50
1.18. Imagen de ADN obtenida con M-DAFM en líquido 51
1.19. El modo JM en medio líquido 52
1.20. Imagen de ADN obtenida con JM en líquido 55
1.21. Modelo de comprensión de ADN por una punta de AFM 55
1.22. Imágenes de ADN obtenidas con JM y contacto en líquido 56
1.23. Imagen de microscopía electrónica del bacteriófago ϕ29 58
1.24. Imágenes del ϕ29 obtenidas con DAFM en aire ambiente 59
1.25. Imagen del ϕ29 obtenida con JM en medio líquido 60
1.26. Mapas de adhesión sobre ADN y sobre el ϕ29 en líquido 64
2.1. Imágenes de ADN sobre mica preparadas con $MgCl_2$ 71
2.2. Imágenes de ADN sobre mica, vidrio y zafiro 72
2.3. Esquema de la evaporación de las muestras 73
2.4. Muestra empleada para medir conductividad en ADN 74
2.5. Escalón de oro y moléculas de poly(dG)-poly(dC) sobre mica 75
2.6. Muestras con electrodos de distintos metales 77
2.7. Esquema de los experimentos sin contacto 78
2.8. Experimento control sobre nanotubos de carbono 80
2.9. Experimento electrostático sobre poly(dG)-poly(dC) 82
2.10. ADN y nanotubos co-adsorbidos sobre distintos substratos 83
2.11. Experimento electrostático sobre ADN y nanotubos 83
2.12. Modelo de *M*-ADN 87
2.13. Concentración de Ni necesaria para fabricar *M*-ADN 89
2.14. Concentración de Co necesaria para fabricar *M*-ADN 89
2.15. Influencia del pH para fabricar Ni-*M*-ADN 90

2.16. Influencia del pH para fabricar Co-*M*-ADN 91
2.17. Reversibilidad de la reacción de producción de *M*-ADN 92
2.18. Experimento radioactivo para localizar el *M*-ADN 93
2.19. Resultado del experimento radioactivo 94
2.20. Imágenes de *M*-ADN sobre mica 95
2.21. Altura del *M*-ADN 96
2.22. Experimento electrostático sobre *M*-ADN 98
3.1. Proceso de formación de una imagen con AFM 105
3.2. Efecto de la dilación de la punta de un AFM 107
3.3. Efecto del ángulo de apertura de la punta de un AFM 109
3.4. Imagen de microscopía óptica de un tejido de cerebro 112
3.5. Imágenes de microscopía electrónica de los PHFs 113
3.6. Imágenes de AFM de los PHFs usando punta de radio estándar 115
3.7. Dimensiones de los PHFs adsorbidos sobre mica 116
3.8. Dimensiones de los PHFs adsorbidos sobre HOPG 116
3.9. Subestructura de los PHFs 117
3.10. Imágenes de fase de los PHFs 118
3.11. Imágenes de AFM de los PHFs usando punta de radio ultra-fino 119
3.12. Imágenes de los PHFs obtenidas en JM en medio líquido 121
3.13. Dimensiones de los PHFs en medio líquido 121
3.14. Propiedades mecánicas de los PHFs 124
3.15. Modelos de trabajo para medio líquido 126
3.16. Modelos de trabajo para aire ambiente 128
3.17. Modelo cinta gruesa en líquido con puntas de radio estándar 130
3.18. Modelo cinta gruesa en aire ambiente con puntas estándar 131
3.19. Modelo cinta gruesa en aire ambiente con puntas ultra-finas 132
3.20. Modelo Wischik-Crowther en líquido 134

3.21. Perfiles de las simulaciones del modelo Wischik-Crowther 135
3.22. Perfiles experimentales de PHF en medio líquido 135
3.23. Modelo Wischik-Crowther en aire ambiente con punta estándar 136
3.24. Modelo Wischik-Crowther en aire ambiente con punta ultra-fina 136
3.25. Modelo Wischik-Crowther modificado 137
3.26. Esquema de la proteína tau 140
3.27. Imágenes AFM de los filamentos *in vitro* de ½ R 141
3.28. Dimensiones de los filamentos *in vitro* de ½ R 142
3.29. Histograma periodicidades de los filamentos *in vitro* y de los PHFs 142
3.30. Imágenes de filamentos *in vitro* usando puntas ultra-finas 143
3.31. Imágenes AFM de los filamentos *in vitro* de tau completo 144
4.1. Medida de distancias con el AFM 151
4.2. Imágenes AFM de moléculas de ADN de distintos tamaños 152
4.3. Amplificación mediante PCR del fragmento de *PHO5* 154
4.4. Esquema del promotor del gen *PHO5* 154
4.5. Purificación de la proteína Pho4 155
4.6. Experimentos de interacción de Pho4 y *PHO5* 157
4.7. Esquema del promotor del gen *HXK2* (experimentos con Pho4) 159
4.8. Ensayo de retraso de Mig1 y *HXK2* 160
4.9. Experimentos de interacción de Mig1 y *HXK2* 161
4.10. Esquema del promotor del gen *SUC2* 163
4.11. Experimentos de interacción de Med8 y *SUC2* 163
4.12. Esquema del promotor del gen *HXK2* (experimentos con Med8) 164
4.13. Experimentos de interacción de Med8 y *HXK2* 164
4.14. Experimentos de interacción de Med8 y *HXT1* 168
4.15. Histograma de alturas de Med8 libre 169
A.1. Estructuras de los monómeros del ADN y del ARN 176

A.2. Estructuras del ADN y del ARN 177
A.3. Modelo de Watson y Crick 179
A.4. Replicación 181
A.5. Transcripción 181
A.6. Traducción 182
A.7. Esquema de un aminoácido 183
A.8. Enlace peptídico 184
A.9. Estructura secundaria de las proteínas 185
A.10. Estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas 186
A.11. Esquema de un gen y factores transcripcionales 187
A.12. Diferentes cortes de un enzima de transcripción 188
A.13. Electroforesis en gel de agarosa 190
A.14. Visualización de moléculas de ADN en un gel de agarosa 191
A.15. Imágenes de AFM del plásmido pUC18 192
A.16. Electroforesis del pUC18 193
A.17. Imágenes de AFM del plásmido pUC18 linearizado con *Bam*HI 193
A.18. Actividades de la ADN polimerasa I 195
A.19. Funcionamiento de la PCR 196
A.20. Muestra de ADN usada en los experimentos de las pinzas ópticas 199
A.21. Fabricación del Asa 1 200
A.22. Esquema del Asa 2 201
A.23. Montaje experimental de las pinzas ópticas 202
A.24. Curvas de fuerza frente a distancia sobre una molécula de ADN 203
A.25. Actividad exonucleolítica del enzima T7 ADN polimerasa 205
A.26. Actividad de polimerización del enzima T7 ADN polimerasa 206
B.1. Imagen de AFM de un escalón monoatómico de grafito 208
B.2. Imagen de AFM del pUC18 linearizado con *Bam*HI 209

Índice de tablas

1-I.	Parámetros experimentales de JM y DAFM en aire ambiente	38
1-II.	Parámetros experimentales de JM y DAFM en medio líquido	61
3-I.	Resolución del AFM sobre material biológico	110
A-I.	Código genético	182
A-II.	Nombre y abreviaturas de los aminoácidos	184

Referencias

American institute of physics handbook. Third ed. edit, McGraw-Hill, New York.

Aich, P., Labiuk, S. L., Tari, L. W., Delbaere, L. J., Roesler, W. J., Falk, K. J., Steer, R. P. & Lee, J. S. (1999). *M-DNA: A complex between divalent metal ions and DNA which behaves as a molecular wire*. J Mol Biol 294(2), 477-85.

Molecular Biology of the Cell 3rd. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994)., Garland Publishing, New York.

Anderson, D. L., Hickman, D. D. & Reilly, B. E. (1966). *Structure of Bacillus subtilis bacteriophage phi 29 and the length of phi 29 deoxyribonucleic acid*. J Bacteriol 91(5), 2081-9.

Anselmetti, D., Lüthi, R., Meyer, E., Richmond, T., Dreier, M., Frommer, J. E. & Güntherodt, H.-J. (1994). *Attractive-mode imaging of biological materials with dynamic force microscopy*. Nanotechnology 5, 87.

Appelt, D. M. & Balin, B. J. (1993). *Analisys of paired helical filaments (PHFs) found in Alzheimer´s disease using freeze-drying/rotary shadowing*. J. Struct. Biol. 111, 85-95.

Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. (1992). *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer´s disease*. Neurology 42, 631-639.

Solid State Physics, International edition. Ashcroft, N. W. & Mermin, N. D. (1976)., Saunders College Publishing.

Ashkin, A. & Dziedzic, J. M. (1987). *Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*. Science 235, 1517-1520.

Baro, A. M., Miranda, R., Alaman, J., Garcia, N., Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Carrascosa, J. L. (1985). *Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy*. Nature 315(6016), 253-4.

Beese, L. S., Derbyshire, V. & Steitz, T. A. (1993). *Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA*. Science 260(5106), 352-5.

Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G. & Salas, M. (1989). *A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases*. Cell 59(1), 219-28.

Binnig, G. & Rohrer, H. (1982). *Scanning Tunneling Microscopy*. Helv. Phys. Acta. 55, 726-735.

Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. (1986). *Atomic force microscope*. Phys. Rev. Lett. 56(9), 930-933.

Blackley, H. K. L., Sanders, G. H. W., Davies, M. C., Roberts, C. J., Tendler, S. J. B. & Wilkinson, M. J. (2000). *In-situ atomic force microscopy study of B-amyloid fibrillization*. J. Mol. Biol. 298, 833-840.

Bockrath, M., Markovic, N., Shepard, A., Tinkham, M., Gurevich, L., Kouwenhoven, L. P., Wu, M. W. & Sohn, L. L. (2002). *Scanned conductance microscopy of carbon nanontubes and lambda-DNA*. Nano letters 2(3), 187-190.

Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U. & Ben-Yoseph, G. (1998). *DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire*. Nature 391(6669), 775-8.

Bustamante, C., Vesenka, J., Tang, C. L., Rees, W., Guthold, M. & Keller, R. (1992). *Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy*. Biochemistry 31(1), 22-6.

Bustamante, C., Keller, D. & Guoliang, Y. (1993). *Scanning force microscopy of nuclear acids and nucleoprotein assemblies*. Current Opinion in Structural Biology 3, 363-372.

Bustamante, C., Erie, D. A. & Keller, D. (1994). *Biochemical and structural applications of scanning force microscopy*. Curr. Opin. Struct. Biol. 4, 750-760.

Bustamante, C. & Keller, D. (1995). *Scanning force microscopy in biology*. Physics Today 48, 32-38.

Bustamante, C., Rivetti, C. & Keller, D. J. (1997). *Scanning force microscopy under aqueous solutions*. Curr. Opin. Struct. Biol. 7(5), 709-16.

Butt, H.-J. & Jaschke, M. (1995). *Calculation of thermal noise in atomic force microscopy*. Nanotechnology 6, 1-7.

Cai, L., Tabata, H. & Kaway, T. (2000). *Self-assembled DNA networks and their electrical conductivity*. Applied Physics Letters 77(19), 3105-3106.

Carrascosa, J. L., Mendez, E., Corral, J., Rubio, V., Ramirez, G., Viñuela, E. & Salas, M. (1981). *Structural organization of Bacillus subtilis phage phi29*. Virology 111, 401-413.

Carrascosa, J. L., Vinuela, E., Garcia, N. & Santisteban, A. (1982). *Structure of the head-tail connector of bacteriophage phi 29*. J. Mol. Biol. 154(2), 311-24.

Chaves, R. S., Herrero, P. & Moreno, F. (1999). *Med8, a Subunit of the Mediator CTD Complex of RNA Polymerase II, Directly Binds to Regulatory Elements of SUC2 and HXK2 Genes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 254, 345-350.

Topics in fluorescence spectroscopy. Resonance energy transfer. Cheung, H. C. (1991). (Lakowicz, J. R., Ed.), Plenum press., New York.

Conwell, E. M. & Rakhmanova, S. V. (2000). *Polarons in DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A 97(9), 4556-60.

Crowther, R. A. & Wischik, C. M. (1985). *Image reconstruction of the Alzheimer paired helical filament*. EMBO J. 4, 3661-3665.

Crowther, R. A. (1991). *Straight and paired helical filaments in Alzheimer´s disease have a common structural unit*. Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 2288-2292.

Estudio de procesos dinámicos a nivel atómico en los sistemas Pb/Si(111) y Sn/Si(111) mediante microscopía de efecto túnel de temperatura variable. Custance, O. (2002). pHD Thesis, Universidad Autónoma de Madrid.

Datta, S., Tian, W., Hong, S., Reifenberger, R., Henderson, J. I. & Kubiack, C. P. (1997). *Current-voltage characteristics of self-assembled monolayers by scanning tunneling microscopy*. Physical Review Letters 79(13), 2530-2533.

de la Cera, T., Herrero, P., Moreno-Herrero, F., Chaves, R. S. & Moreno, F. (2002). *Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: Implication in the glucose signalling pathway of Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 319, 703-714.

de Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baro, A. M. (1998). *Jumping mode scanning force microscopy*. Appl. Phys. Lett. 73(22), 3300-3302.

de Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baro, A. M., Schaefer, D. M., Howell, S., Walsh, B. & Reifenberger, R. (1999). *Adhesion maps using scanning force microscopy techniques*. J. Adhesion 71, 339-356.

Propiedades de transporte de sistemas mesoscópicos medidas con Microscopía de Fuerzas. de Pablo, P. J. (2000). pHD Thesis, Universidad Autonoma de Madrid.

de Pablo, P. J., Colchero, J., Luna, M., Gomez Herrero, J. & Baro, A. M. (2000a). *Tip-sample interaction in tapping-mode scanning force microscopy*. Phys. rev. B 61(20), 14179-14183.

de Pablo, P. J., Martinez, M. T., Colchero, J., Gomez Herrero, J., Maser, W. K., Benito, A. M., Muñoz, E. & Baro, A. M. (2000b). *Mechanical and electrical properties of nonosized contacs on single-walled carbon nonotubes*. Advanced Materials 12, 573-576.

de Pablo, P. J., Moreno-Herrero, F., Colchero, J., Gomez Herrero, J., Herrero, P., Baro, A. M., Ordejon, P., Soler, J. M. & Artacho, E. (2000c). *Absence of dc-conductivity in lambda-DNA*. Phys. Rev. Lett. 85(23), 4992-5.

de Pablo, P. J., Gómez-Navarro, C., Gil, A., Colchero, J., Martinez, M. T., Benito, A. M., Maser, W. K., Gómez-Herrero, J. & Baro, A. M. (2001). *Visualization of single-walled carbon nanotubes electrical networks by scanning force microscopy*. Appl. Phys. Lett. 79, 2979-2981.

de Pablo, P. J., Gómez-Navarro, C., Colchero, J., Serena, P. A., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2002). *Nonlinear resistance versus lenght in single-walled carbon nanotubes*. Phys. Rev. Lett. 88(3), 36804-36808.

Derjaguin, B. V. & Landau, L. (1941). Acta Physicochim. URSS 14, 633.

Digital Instruments, Santa Barbara, California. www.di.com.

Dreier, M., Anselmetti, D., Richmond, T., Dammer, U. & Guntherodt, H.-J. (1994). *Dynamic mode atomic force microscopy in liquids*. J. Appl. Phys. 76, 5095-5098.

Dunlap, D. D., Garcia, R., Schabtach, E. & Bustamante, C. (1993). *Masking generates contiguous segments of metal-coated and bare DNA for scanning tunneling microscope imaging*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7652-7655.

Dürig, U., Züger, O. & Stalder, A. (1992). *Interaction Force Detection in Scanning Probe Microscopy: Methods and Applications*. J. Appl. Phys. 72, 1778-1798.

Fellows, A., Francon, J., Lennon, A. M. & Nuñez, J. (1977). *Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors*. Eur. J. Biochem. 78, 167-174.

Fink, H. W. & Schonenberger, C. (1999). *Electrical conduction through DNA molecules*. Nature 398(6726), 407-10.

Garcia, R., Yuqiu, J., Schabtach, E. & Bustamante, C. (1992). *Deposition and imaging of metal-coated biomolecules with the STM*. Ultramicroscopy 42-44, 1250-1254.

García, R. & Pérez, R. (2002). *Dynamic atomic force microscopy methods*. Surf. Sci. Rep. 47, 197-301.

Giese, B., Amaudrut, J., Kohler, A. K., Spormann, M. & Wessely, S. (2001). *Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling*. Nature 412(6844), 318-20.

Giessibl, F. J. (1995). *Atomic resolution of the silicon(111)-7x7 surface by atomic force microscopy*. Science 267, 68-71.

Estudio de la interacción punta-muestra en la microscopía de fuerzas y su aplicación para la visualización de procesos de adsorpción en superficies. Gil, A. (2001). pHD Thesis, Universidad Autonoma de Madrid.

Gil, A., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2001). *Different stages of water adsorption studied by dynamic SFM and Jumping Mode*. Applied Phys. A 72.

Gómez-Navarro, C., de Pablo, P. J., Moreno-Herrero, F., Horcas, I., Fernandez-Sánchez, R., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baro, A. M. (2002a). *Using scanning force microscopy 3D modes to study the dielectric response of adsorbed DNA molecules*. Nanotechnology 13, 1-4.

Gómez-Navarro, C., Moreno-Herrero, F., de Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2002b). *Contactless experiments on individual DNA molecules show no evidence for molecular wire behaviour*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(13), 8484-8487.

Gromiha, M. M., Munteanu, M. G., Gabrielian, A. & Pongor, S. (1996). *Anisotropic bending models of DNA*. J. Biol. Phys. 22, 227-243.

Guckenberger, R., Heim, M., Cevc, G., Knapp, H. F., Wiegrabe, W. & Hillebrand, A. (1994). *Scanning tunneling microscopy of insulators and biological specimens based on lateral conductivity of ultrathin water films*. Science 266(5190), 1538-40.

Han, W., Lindsay, S. M. & Jing, T. (1996). *A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids*. Appl. Phys. Lett. 69((26)), 4111-4113.

Hansma, H. G., Sinsheimer, R. L., Li, M. Q. & Hansma, P. K. (1992). *Atomic force microscopy of single- and double-stranded DNA*. Nucl. Acids. Res. 20(14), 3585-90.

Hansma, H. G., Revenko, I., Kim, K. & Laney, D. E. (1996). *Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single- stranded and triple-stranded nucleic acids*. Nucleic Acids Res 24(4), 713-20.

Hansma, P. K., Cleveland, J. P., Radmacher, M., Walters, D. A., Hillner, P. E., Bezanilla, M., Fritz, M., Vie, D., Hansma, H. G., Prater, C. B., Massie, J., Fukunaga, L., Gurley, J. & Elings, V. (1994). *Tapping mode atomic force microscopy in liquids*. Appl. Phys. Lett. 64, 1738-1740.

Hao, H. W., Baro, A. M. & Saenz, J. J. (1991). J. Vac. Sci. Technol. B 9, 1323.

Harrington, C. R., Mukaetova-Ladinska, E. B., Hills, R., Edwards, P. C., Montejo de Garcini, E., Novak, M. & Wischik, C. M. (1991). *Measurement of distinct immunochemical presentations of tau protein in Alzheimer disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88(13), 5842-5846.

Hegner, M., Wagner, P. & Semenza, G. (1993). *Immobilizing DNA on gold via thiol modification for atomic force microscopy imaging in buffer solutions*. FEBS Lett 336(3), 452-6.

Hegner, M., Dreier, M., Wagner, P., Semenza, G. & Güntherodt, H.-J. (1995). *Modified DNA immobilized on bioreactive self-assembled monolayer on gold for dynamic force microscopy imaging in aqueous buffer solution*. J. Vac. Sci. Technol. B 14(2), 1418-1421.

Hertz, H. & Reine, J. (1882). *Über die berührung fester elasticher Körper*. Angew. Math. 92, 156-171.

Howard, J., Hudspeth, A. J. & Vale, R. D. (1989). *Movement of microtubules by single kinesin molecules*. Nature 342(6246), 154-8.

Hu, J., Xiao, X. D. & Salmeron, M. (1995). *Scanning polarization force microscopy: A technique for imaging liquids and weakly adsorbed layers*. Appl. Phys. Lett. 67(476-478).

Iijima, S. (1991). *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature 354, 51.

Intermolecular and Surface Forces. Israelachvili, J. (1991)., Academic Press, London.

Cell Membranes and cytoskeleton. Handbook in biological physics. Janmey, P. (1995)., Elsevier Science.

Kasumov, A. Y., Kociak, M., Gueron, S., Reulet, B., Volkov, V. T., Klinov, D. V. & Bouchiat, H. (2001). *Proximity-induced superconductivity in DNA*. Science 291(5502), 280-2.

Kim, Y., Eom, S. H., Wang, J., Lee, D. S., Suh, S. W. & Steitz, T. A. (1995). *Cristal structure of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Nature 382, 278-281.

Kitamura, S. & Iwatsuki, M. (1995). *Observation of 7× 7 Reconstructed Structure on the Silicon (111) surface using Ultrahigh Vacuum Noncontact Atomic Force Microscopy*. Jpn. J. Appl. Phys. 34, L145-L148.

Kuo, S. C. & Sheetz, M. P. (1992). *Optical tweezers in cell biology*. Trends in cell biology 2, 116-118.

Launay, d. (1956). Solid State Phys 2, 220.

Lee, H.-Y., Tanaka, H., Otsuka, Y., Yoo, K.-H., Lee, J. O. & Kawai, T. (2002). *Control of electrical conduction in DNA using oxygen hole doping*. Appl. Phys. Lett. 80(9), 1670-1672.

Lee, J. S., Latimer, L. J. & Reid, R. S. (1993). *A cooperative conformational change in duplex DNA induced by Zn2+ and other divalent metal ions*. Biochem Cell Biol 71(3-4), 162-8.

Li, X. Q. & Yan, Y. (2001). *Electrical transport through individual DNA molecules*. Appl. Phys. Lett. 79(14), 2190-2192.

Estudio de la interfase sólido-líquido-gas y de la fricción mediante el desarrollo de métodos dinámicos de operación en la microscopía de fuerzas. Luna, M. (1998). pHD Thesis, Universidad Autonoma de Madrid.

Luna, M., Colchero, J. & Baro, A. M. (1998). *Intermittent Contact Scanning Force Microscopy: the role of liquid necks*. Applied Physics Letters 72(26), 3461-3463.

Lyubchenko, Y., Shlyakhtenko, L., Harrington, R., Oden, P. & Lindsay, S. (1993). *Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90(6), 2137-40.

Lyubchenko, Y. L., Gall, A. A., Shlyakhtenko, L. S., Harrington, R. E., Jacobs, B. L., Oden, P. I. & Lindsay, S. M. (1992). *Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA*. J Biomol Struct Dyn 10(3), 589-606.

Lyubchenko, Y. L., Shlyakhtenko, L. S., Aki, T. & Adhya, S. (1997). *Atomic force microscopic demonstration of DNA looping by GalR and HU*. Nucleic Acids Res 25(4), 873-6.

Maeda, Y., Matsumoto, T. & Kaway, T. (1999). *Observation of single- and double-stranded DNA using non-contact atomic force microscopy*. Appl. Surf. Sci. 140, 400-405.

Maksym, G. N., Fabry, B., Butler, J. P., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Laporte, J. D. & Fredberg, J. J. (2000). *Mechanical properties of cultured human airway smooth muscle cells from 0.05 to 0.4 Hz*. J Appl Physiol 89(4), 1619-32.

Margeat, E., Le Grimellec, C. & Royer, C. A. (1998). *Visualization of trp repressor and its complexes with DNA by atomic force microscopy*. Biophys J 75(6), 2712-20.

Classical dynamics of particles and systems. Marion, J. B. & Thornton, S. T. (1995). 4th edition edit, Saunders College Publishing, New York.

Marsh, T. C., Vesenka, J. & Henderson, E. (1995). *A new DNA nanostructure, the G-wire, imaged by scanning probe microscopy*. Nucleic Acids Res 23(4), 696-700.

Martin, Y., Williams, C. C. & Wickramasinghe, H. K. (1987). *Atomic force microscopy mapping and profiling on a sub 100-A scale*. J. Appl. Phys. 61, 4723-4729.

Biochemistry. Mathews, C. K., van Holde, K. E. & Ahern, K. G. (2000)., Addison Wesley Longman, New York.

Mert, J., Marti, O. & Mlynek, J. (1993). *Regulation of a microcantilever response by force feedback*. Appl. Phys. Lett. 62(10), 2344-2346.

Mintmire, J. W., Dunla, B. I. & White, C. T. (1992). *Are fullerene tubules metallic?* Phys. Rev. Lett. 68, 631-634.

Möller, C., Allen, M., Elings, V., Engel, A. & Müller, D. J. (1999). *Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces*. Biophys. J. 77, 1150-1158.

Moreno-Herrero, F., Herrero, P., Colchero, J., Baro, A. M. & Moreno, F. (1999). *Analysis by atomic force microscopy of Med8 binding to cis-acting regulatory elements of the SUC2 and HXK2 genes of saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 459(3), 427-32.

Moreno-Herrero, F., de Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2000). *The role of shear forces in scanning force microscopy: a comparison between the jumping mode and tapping mode*. Surf. Sci. 453, 152-158.

Moreno-Herrero, F., Herrero, P., Colchero, J., Baro, A. M. & Moreno, F. (2001). *Imaging and mapping protein-binding sites on DNA regulatory regions with atomic force microscopy*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280(1), 151-7.

Moreno-Herrero, F., Colchero, J. & Baro, A. M. (2002a). *DNA height in Scanning Force Microscopy*. Ultramicroscopy.

Moreno-Herrero, F., de Pablo, P. J., Álvarez, M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2002b). *Jumping Mode Scanning Force Microscopy: a suitable technique for imaging DNA in liquids*. Appl. Surf. Sci.

Moreno-Herrero, F., de Pablo, P. J., Fernández-Sánchez, R., Colchero, J., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2002c). *Scanning Force Microscopy Jumping and Tapping modes in liquids*. Appl. Phys. Lett. 81, 2620-2623.

Moreno-Herrero, F., Herrero, P., Moreno, F., Colchero, J., Gómez-Navarro, C., Gómez-Herrero, J. & Baró, A. M. (2003). *Topographic characterization and electrostatic response of M-DNA studied by Atomic Force Microscopy*. Nanotechnology.

Muller, D. J., Schabert, F. A., Büldt, G. & Engel, A. (1995). *Imaging purple membranes in aqueous solutions at subnanometer resolution by atomic force microscopy*. Biophys. J. 68, 1681-1686.

Muller, D. J., Engel, A., Carrascosa, J. L. & Velez, M. (1997). *The bacteriophage phi29 head-tail connector imaged at high resolution with the atomic force microscope in buffer solution*. Embo J 16(10), 2547-53.

Müller, D. J., Fontiadis, D., Scheuring, S., Müller, S. A. & Engel, A. (1999). *Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope*. Biophys. J. 76, 1101-1111.

Muster, J., Kim, G. T., Krstic, V., Park, J. G., Park, Y. W., Roth, S. & Burghard, M. (2000). *Electrical transport through individual vanadium pentoxide nanowires*. Adv. Mat. 12(6).

Nieto, A., Correas, I., Montejo de Garcini, E. & Avila, J. (1988). *A modified form of microtubule-associated tau protein is the main component of paired helical filaments*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 154, 660-667.

Nony, L., Boisgard, R. & Aimé, J. P. (1999). *Nonlinear dynamical properties of an oscillating tip-cantilever system in the tapping mode*. J. Chem. Phys. 111(4), 1615-1627.

Ohnesorge, F. & Binnig, G. (1993). *True atomic resolution by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces*. Science 260, 1451.

Pascual, J. I., Méndez, J., Gómez-Herrero, J., Baró, A. M., Garcia, N. & Binh, V. T. (1993). *Quantum contact in gold nanostructures by scanning tunneling microscopy*. Phys. Rev. Lett. 72, 1129.

Propiedades electronicas de sistemas nanométricos. Pascual, J. I. (1998). pHD Thesis, Universidad Autónoma de Madrid.

Persson, B. N. J. (1987). Chem. Phys. Lett. 141, 366.

Pohl, D. W. (1990). *Scanning near-field optical microscopy*. In *Advances in optical and electron microscopy* (Sheppard, C. J. R. & Mulvey, T., eds.), Vol. 12. Academic Press, London.

Pollanen, M. S., Markiewicz, P., Bergeron, C. & Goh, M. C. (1994). *Twisted ribbon structure of paired helical filaments revealed by atomic force microscopy*. Am. J. Pathol. 144(5), 869-73.

Pollanen, M. S., Markiewicz, P. & Goh, M. C. (1997). *Paired helical filaments are twisted ribbons composed of two parallel and aligned components: image reconstruction and modeling of filament structure using atomic force microscopy*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 56(1), 79-85.

Porath, D., Bezryadin, A., de Vries, S. & Dekker, C. (2000). *Direct measurement of electrical transport through DNA molecules*. Nature 403(6770), 635-8.

Putman, A. J., van der Werf, K. O., de Grooth, B., van Hulst, N. F. & Greve, J. (1994). *Tapping mode atomic force microscopy in liquid*. Applied Physics Letters 72, 2454-2456.

Rakitin, A., Aich, P., Papadopoulos, C., Kobzar, Y., Vedeneev, A. S., Lee, J. S. & Xu, J. M. (2001). *Metallic conduction through engineered DNA: DNA nanoelectronic building blocks*. Phys Rev Lett 86(16), 3670-3.

Ratner, M. (1999). *Electronic motion in DNA*. Nature 397(6719), 480-1.

Rayne, J. A. & Chandrasekhar, B. S. (1961). *Elastic Constants of Iron from 4.2 to 300°K*. Phys. Rev. 122, 1714.

Rebecca, H. L., Altreuter, D. H. & Gentile, F. T. (1995). *Transport characterization of hydrogel matrices for cell encapsulation*. Biotechnology and Bioengineering 50(4), 365-373.

Rees, W. A., Keller, R. W., Vesenka, J. P., Yang, G. & Bustamante, C. (1993). *Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy*. Science 260(5114), 1646-9.

Fundamentos de la teoría electromagnética. Reitz, J. R., Milford, F. J. & Christy, R. W. (1986)., Addison-Wesley Iberoamericana.

Ripoll, P., Pimpinelli, S., Valdivia, M. M. & Avila, J. (1985). *A cell division mutant of Drosophila with a functionally abnormal spindle*. Cell 41(3), 907-12.

Rosa-Zeise, A., Weilandt, E., Hild, S. & Marti, O. (1997). *The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation*. Meas. Sci. Technol. 8, 1333.

Rohrer, H. (1994). *Scanning tunneling microscopy: a surface tool and beyond*. Surf. Sci. 299, 956-964.

Rosei, F., Schunack, M., Jiang, P., Gourdon, A., Laegsgaard, E., Stensgaard, I., Joachim, C. & Besenbacher, F. (2002). *Organic molecules acting as templates on metal surfaces*. Science 296(5566), 328-31.

Salmeron, M., Beebe, T., Odriozola, J., Wilson, T., Ogletree, D. F. & Siekhaus, W. (1990). *Imaging of biomolecules with the scanning force microscope: problems and prospects*. J. Vac. Sci. Technol. A 8, 635.

San Paulo, A. & Garcia, R. (2000). *High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes*. Biophys. J. 78(3), 1599-605.

Dinámica de la Microscopía de Fuerzas con modulación de amplitud: descripción teórica e implicaciones experimentales. San Paulo, A. (2002). pHD Thesis, Universidad Autonoma de Madrid.

Schoenenberger, C. & Alvarado, S. F. (1990). *Observation of single charge carriers by force microscopy*. Phys. Rev. Lett. 65, 3162-3164.

Serrano, M., Salas, M. & Hermoso, J. M. (1990). *A novel nucleoprotein complex at a replication origin*. Science 248(4958), 1012-6.

Shaiu, W. L., Larson, D. D., Vesenka, J. & Henderson, E. (1993). *Atomic force microscopy of oriented linear DNA molecules labeled with 5nm gold spheres*. Nucleic Acids Res 21(1), 99-103.

Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., Anderson, D. L. & Bustamante, C. (2001). *The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force*. Nature 413(6857), 748-52.

Storm, A. J., van Noort, J., de Vries, S. & Dekker, C. (2001). *Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm lenght scale*. Applied Physics Letters 79(23), 3881-3883.

Sugawara, Y., Ohta, M., Veyana, H. & Morita, S. (1995). *Defect motion on an InP(110) surface observed with noncontact atomic force microscopy*. Science 210, 1646.

Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J. & Block, S. M. (1993). *Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry*. Nature 365, 721-727.

Tamayo, J., Humphris, A. D. L., Owen, R. J. & Miles, M. J. (2001). *High-Q Dynamic Force Microscopy in Liquids and its application to linving cells*. Biophys. J. 81, 526-537.

Terris, B. D., Stern, J. E., Rugar, D. & Mamin, H. J. (1989). *Contact electrification using force microscopy*. Phys Rev Lett 63, 2669-72.

Thomson, N. H., Kasas, S., Smith, B., Hansma, H. G. & Hansma, P. K. (1996). *Reversible binding of DNA to mica for AFM imaging*. Langmuir 12, 5905-5908.

Thundat, T., Zheng, X.-Y., Chen, G. Y. & Warmack, R. J. (1993). *Role of relative humidity in atomic force microscopy imaging*. Surf. Sci. 294, L939-43.

Umemura, K., Ishikawa, M. & Kuroda, R. (2001). *Controlled immobilization of dna molecules using chemical modification of mica surfaces for atomic force microscopy: characterization in air*. Anal Biochem 290(2), 232-7.

van der Werf, K. O., Putman, C. A. J., Grooth, B. G. & Greve, J. (1994). *Adhesion force imaging in air and liquid by adhesion mode atomic force microscopy*. Appl. Phys. Lett. 65, 1195.

Theory of the stability of lyophobic colloids. Verwey, E. J. W. & Overbeek, J. T. G. (1948)., Elsevier Publishing Company, New York.

Vesenka, J., Manne, S., Yang, G., Bustamante, C. J. & Henderson, E. (1993). *Humidity effects on atomic force microscopy of gold-labeled DNA on mica*. Scann. Microsc. 7(3), 781-8.

Veyana, H., Ohta, M., Sugawara, Y. & Morita, S. (1995). *Atomically Resolved InP(110) Surface Observed with Noncontact Ultrahigh Vacuum Atomic Force Microscope*. Jpn. J. Appl. Phys. 34, L1086-L1088.

Viani, M. B., Schffer, T. E., Chand, A., Rief, M., Gaub, H. E. & Hansma, P. K. (1999). *Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules*. J. Appl. Phys. 84(4), 2258-62.

Viani, M. B., Pietrasanta, L. I., Thompson, J. B., Chand, A., Gebeshuber, I. C., Kindt, J. H., Richter, M., Hansma, H. G. & Hansma, P. K. (2000). *Probing protein-protein interactions in real time*. Nat. Struct. Biol. 7(8), 644-7.

Villarrubia, J. S. (1996). *Scanned probe microscope tip characterization without calibrated characterizers*. J. Vac. Sci. Technol. B 14(2), 1518-1521.

Viñuela, E. & Salas, M. *Bacteriophage phi29*. Reflections on biochemistry, 293-300.

Campos electromagnéticos. Wangsness, R. K. (1999)., Limusa, S.A., Mexico, D.F.

Watanabe, H., Manabe, C., Shigematsu, T., Shimotani, K. & Shimizu, M. (2001). *Single molecule DNA device measured with triple-probe atomic force microscopy*. Appl. Phys. Lett. 79(14), 2190-2192.

Watson, J. D. & Crick, F. H. C. (1953). *Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature 171, 737-738.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. & Kirschmer, M. W. (1975). *A protein factor essential for microtubule assembly*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1858-1862.

Wischik, C. M., Crowther, R. A., Stewart, M. & Roth, M. (1985). *Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer´s disease*. J. Cell. Biol. 100, 1905-1912.

Wischik, C. M., Lai, R. Y. K. & Harrington, C. R. (1997). *Modeling prion-like processing of tau protein inAlzheimer´s disease for pharmaceutical development*. Brain Microtubule Associated, J.Avila, R. Brandt and K,S. Kosic, eds, Harwood Academic Publ GmbH, Switzerland(185-241).

Wong, S. S., Wolley, A. T., Odom, T. W., Huang, J.-L., Kim, P., Venezov, D. V. & Lieber, C. M. (1998). *Single-walled carbon nanotube probes for high-resolution nanostructure imaging*. Appl. Phys. Lett. 73(23), 3465-3467.

Wu, H. W., Kuhn, T. & Moy, V. T. (1998). *Mechanical properties of 1929 cell measured by atomic force microscopy: effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking*. Scanning 20, 389-397.

Wuite, G. J., Smith, S. B., Young, M., Keller, D. & Bustamante, C. (2000). *Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity*. Nature 404(6773), 103-6.

Yang, J. & Shao, Z. (1993). *Effect of probe force on the resolution of atomic force microscopy of DNA*. Ultramicroscopy 50, 157-170.

Ye, J. Y., Umemura, K., Ishikawa, M. & Kuroda, R. (2000). *Atomic force microscopy of DNA molecules stretched by spin-coating technique*. Anal. Biochem. 281(1), 21-5.

Yin, H., Wang, D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S. M. & Gelles, J. (1995). *Transcription against an applied force*. Science 270, 1653-1657.

Yoo, K.-H., Ha, D. H., Lee, J.-O., Park, J. W., Kim, J., Kim, J. J., Lee, H.-Y., Kawai, T. & Yong Choi, H. (2001). *Electrical conduccion through Poly(dA)-Poly(dT) and Poly(dG)-Poly(dC) DNA molecules*. Phys, Rev. Lett. 87(19), 198102-6.

Zhang, Y., Austin, R. H., Kraeft, J., Cox, E. C. & Ong, N. P. (2002). *Insulating behabior of lambda-DNA on the micron scale*. Phys. Rev. Lett. 89(19), 198102-198106.

Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K. & Elings, V. B. (1993). *Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy*. Surf. Sci. Lett. 290, L688-692.

Abreviaturas

ADN o DNA	Deoxiribonucleic Acid o ácido desoxirribonucleico
AFM	Atomic Force Microscopy o microscopio de fuerzas atómicas
ARN o RNA	Ribonucleic acid o ácido ribonucleico
DAFM	Dynamic Atomic Force Microscopy
DDL	Debye Double Layer o capa doble de Debye
DRS	Downstream Repressing Sequence o secuencia represora posterior
DSP	Digital Signal Processor
EDDL	Electrostatic Debye Double Layer
FV	Force Volume
GST	Glutation-S-Transferasa
HOPG	Highly Oriented Pyrolitic Graphite o grafito pirolítico
JM	Jumping Mode o método del salto
M-DAFM	Magnetic Dynamic Atomic Force Microscopy

NC-DAFM	Non-contact Dynamic Atomic Force Microscopy o método dinámico de no contacto
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTFs	Neurofibrilary Tangles u ovillos neurofibrilares
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFM	Pulsed Force Mode
PHFs	Paired Helical Filaments o filamentos apareados helicoidales
SFM	Scanning Force Microscopy
UAS	Upstream Activating Sequence o secuencia activadora anterior
UHV	Ultra High Vacuum o ultra alto vacío
vdW	van der Waals

Código de nucleótidos de una letra

Guanina	G	G
Adenina	A	A
Timina	T	T
Citosina	C	C
Purina	G o A	R
Pirimidina	T o C	Y
Amino	A o C	M
Keto	G o T	K
Strong (3H bonds)	G o C	S
Weak (2H bonds)	A o T	W
No G	A o C o T	H
No A	G o T o C	B
No T	G o C o A	V
No C	G o A o T	D
Cualquiera	G o Co T o A	N
Desconocida	?	X

Basado en Nomenclature Commitee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Molecular Biology and Evolution 3:99-108 (1986)

Imagen de portada: imágenes obtenidas con el microscopio de fuerzas de moléculas de ADN (arriba-izda.); el bacteriófago ϕ29 (arriba-dcha.); los filamentos apareados helicoidales de la enfermedad de Alzheimer junto con distintos modelos estructurales (abajo-izda.) y de interacciones ADN-proteína (abajo-dcha.)