

Nanobiología 1

**Adriana Chaurra, PhD
Universidad del Valle.
Cali, Colombia.**

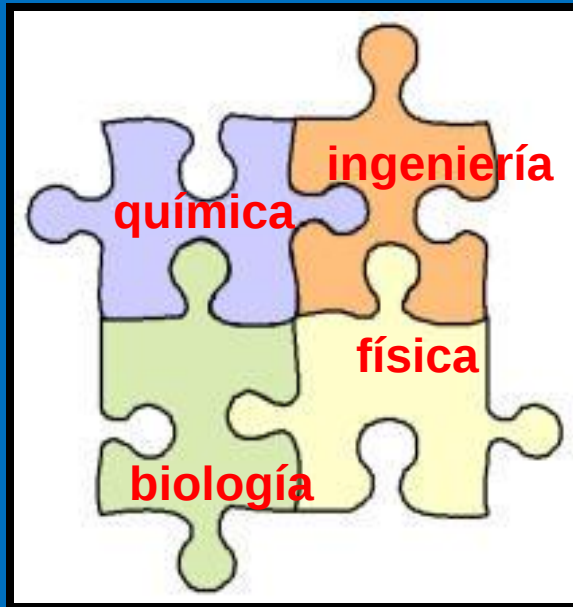
Nanociencia, 2010 10-19

Nanobiología 1

- **Nanoindustrias celulares:**
 - I. **ensamble de ADN.**
 - II. **ensamble de proteínas.**
 - III. **Enzimas: nanomaquinarias de bajo consumo de energía.**
- **ATP como fuente biológica universal de energía.**
- **Motores moleculares: alto consumo de energía.**
- **Fluctuaciones en la expresión genética.**
- **Fluctuaciones en la división genética.**

Conexión Nano/Bio

Nanotecnología cubre un amplio espectro de ciencias, las cuales aplicadas a un nivel de nanoescala que permiten la fabricación y manipulación de materiales y dispositivos a partir del ordenamiento de átomos y moléculas.



Nanoescala

1 nanómetro = 10^{-9} metros

Objetos al nivel de átomos y moléculas

Biología y nanoprocesos

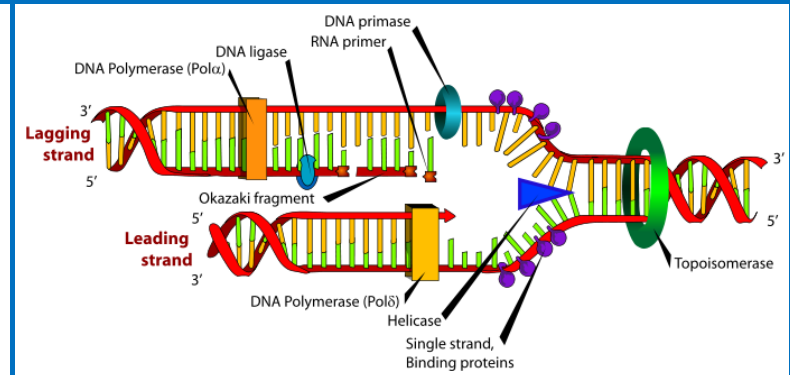
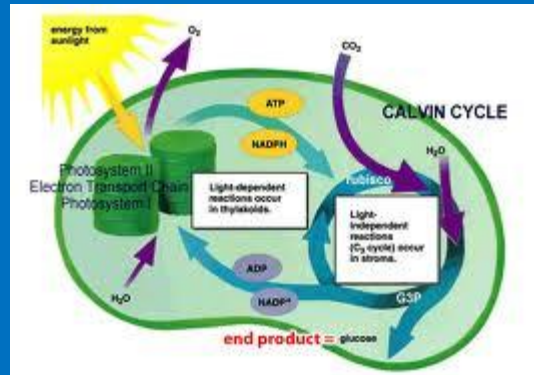


En el mundo biológico, los procesos de construcción de estructuras parten de entidades simples para obtener sistemas mas complicados. Proceso de ensamble llamado de abajo hacia arriba.

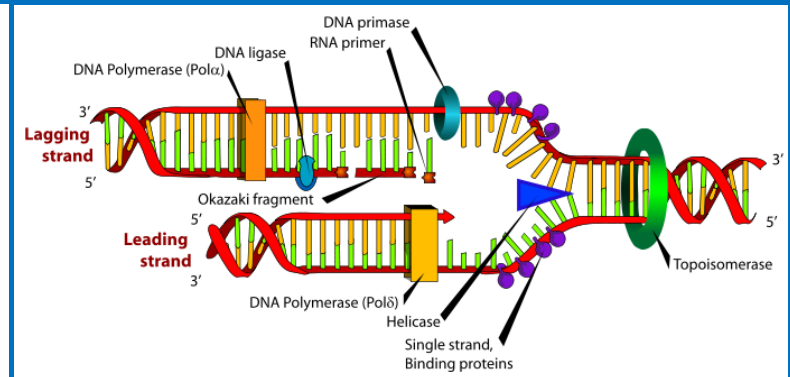
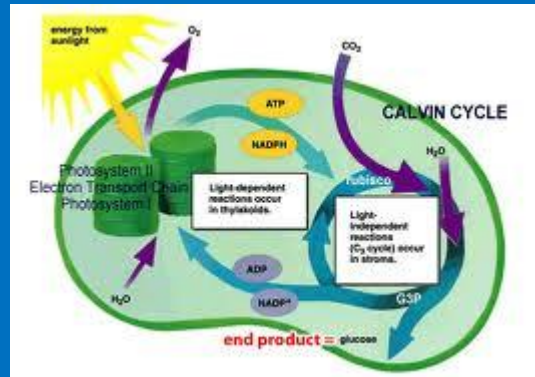
Biología y nanoprocesos

Los procesos biológicos ensamblan estructuras complicadas partiendo de átomos y moléculas simples.

Todos estos procesos biológicos ocurren al nivel de nanoescala



Biología y nanoprocesos

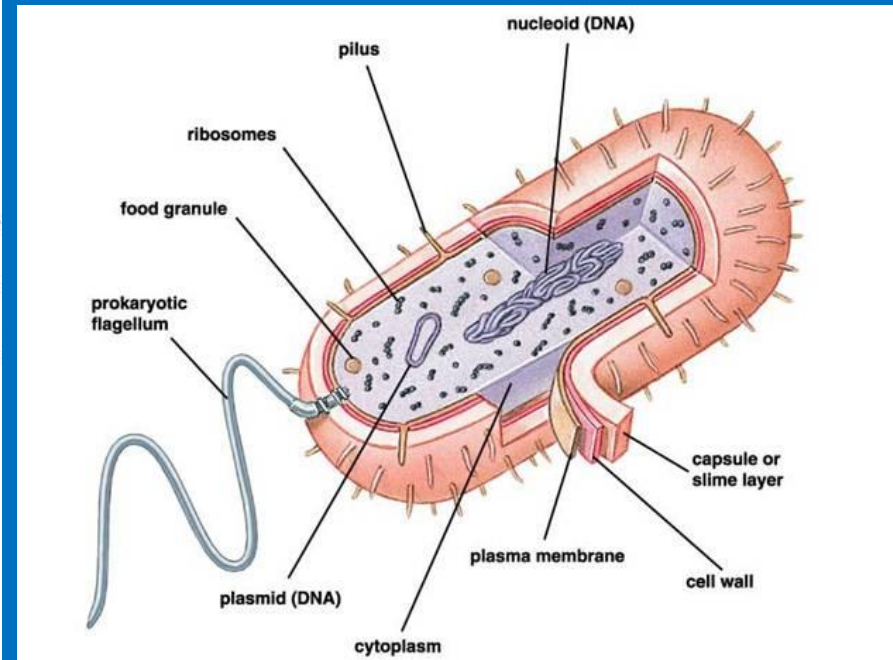
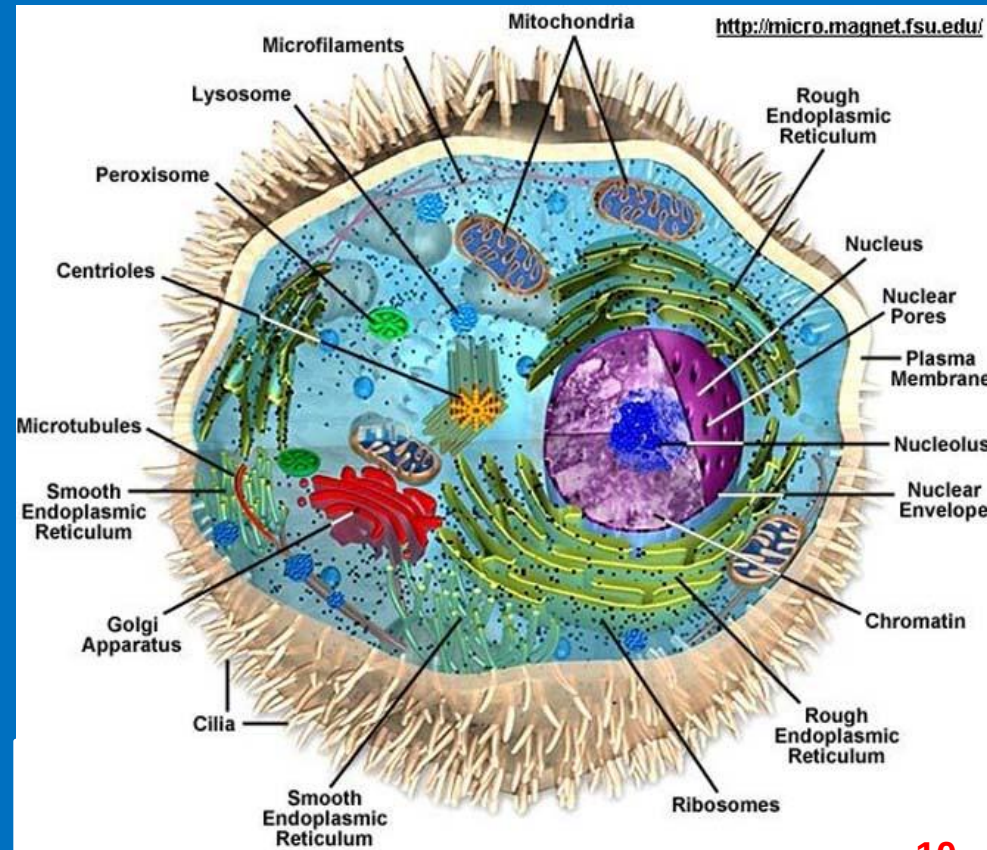


Algunos laboratorios tratan de imitar procesos biológicos, a estas técnicas se les llaman procesos biomiméticos

Células

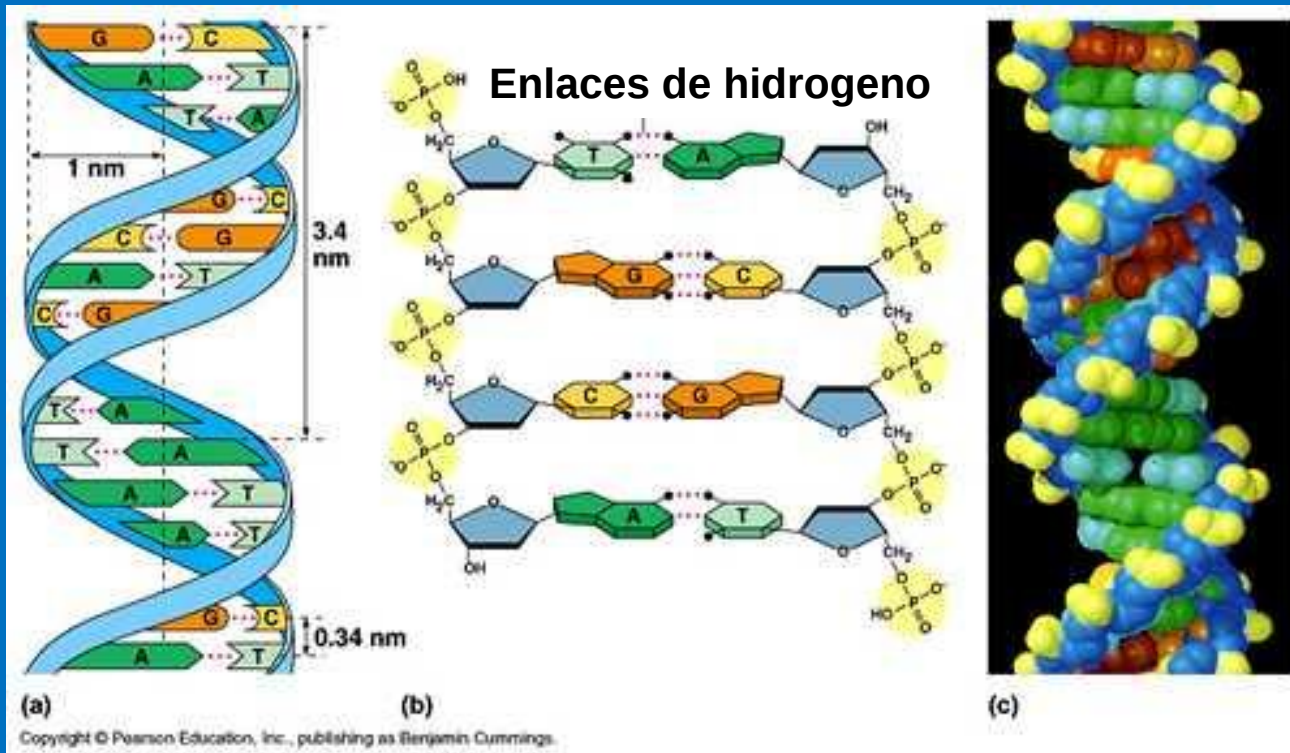
Eucariotica

Procariotica

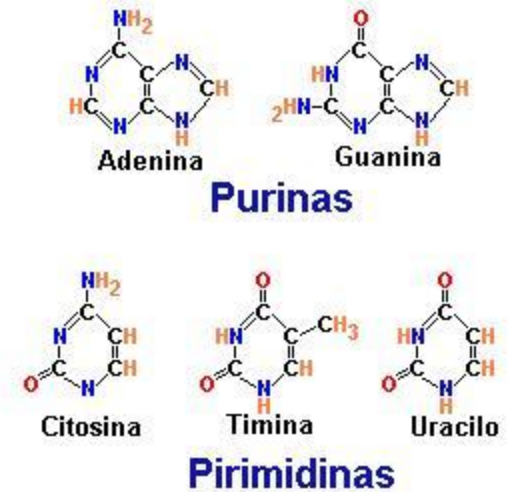
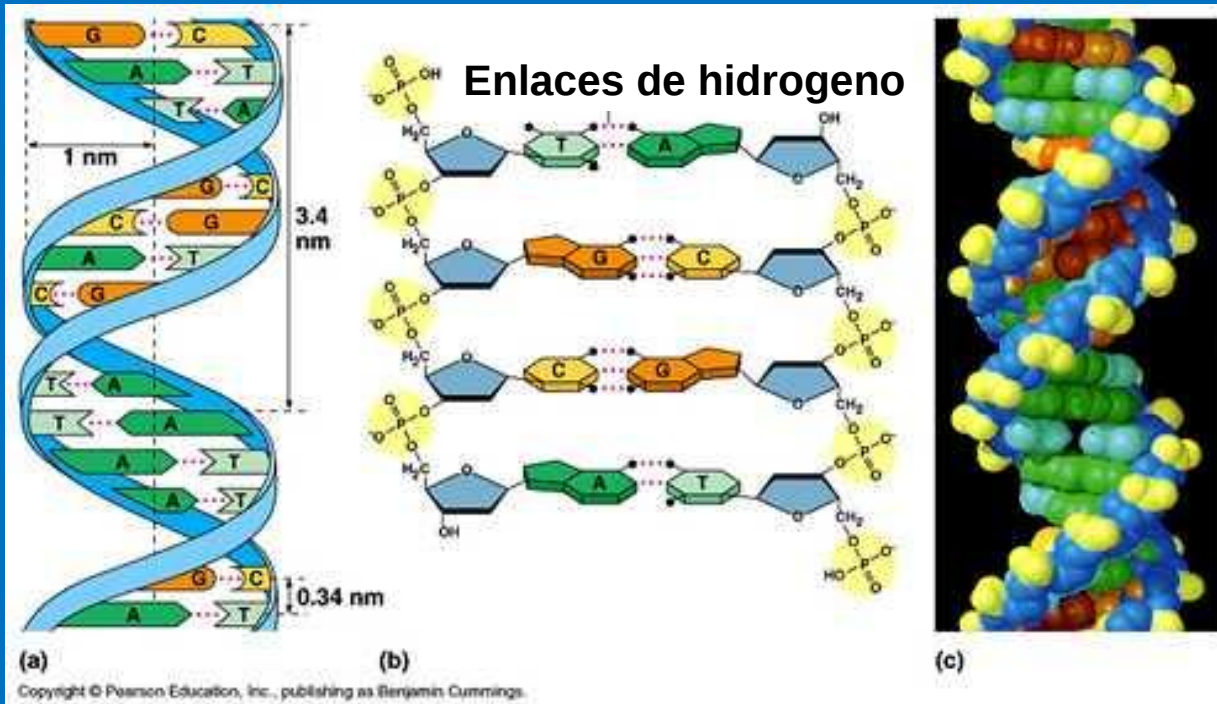


10 µm célula
3 µm núcleo

“Nanoindustrias” celulares: Replicación de ADN



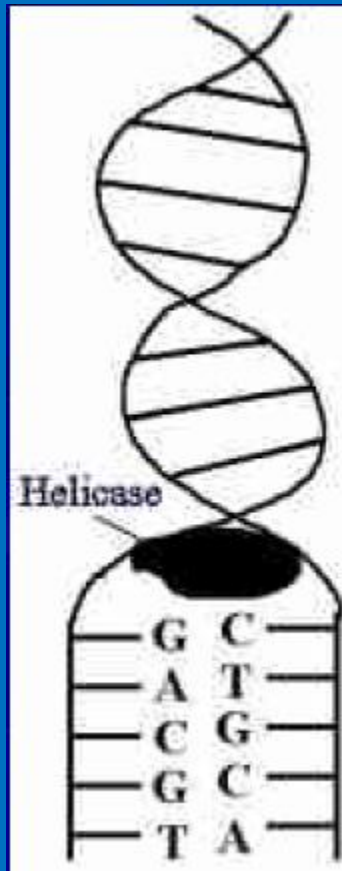
“Nanoindustrias” celulares: Replicación de ADN



Replicación de ADN

Paso a paso

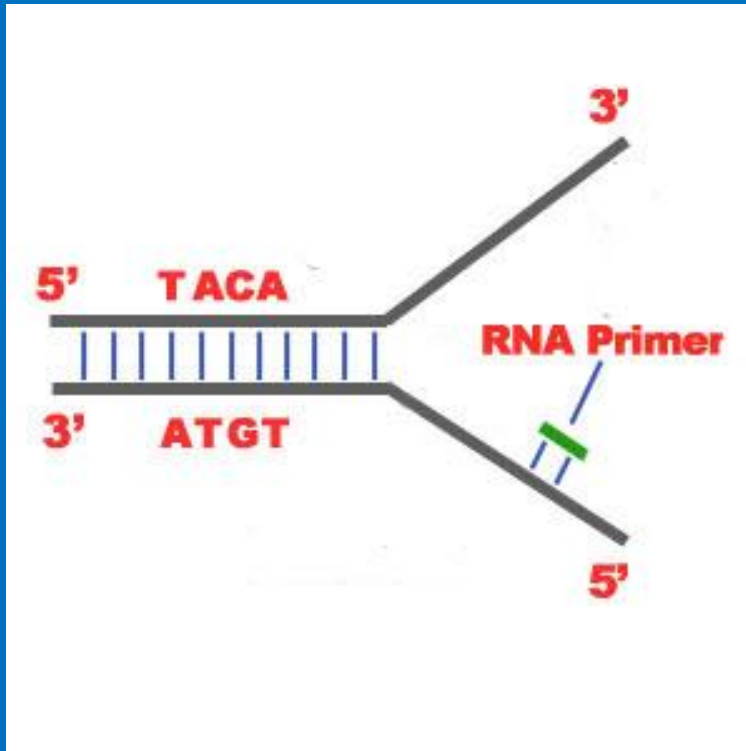
1. ADN helicasa (asa) para rompimiento:
rompe enlaces de hidrogeno debiles



Replicación de ADN

Paso a paso

2. Iniciación: enlace de ARN primasa
atrae bases complementarias de acuerdo con la base
presente en la cadena de ADN



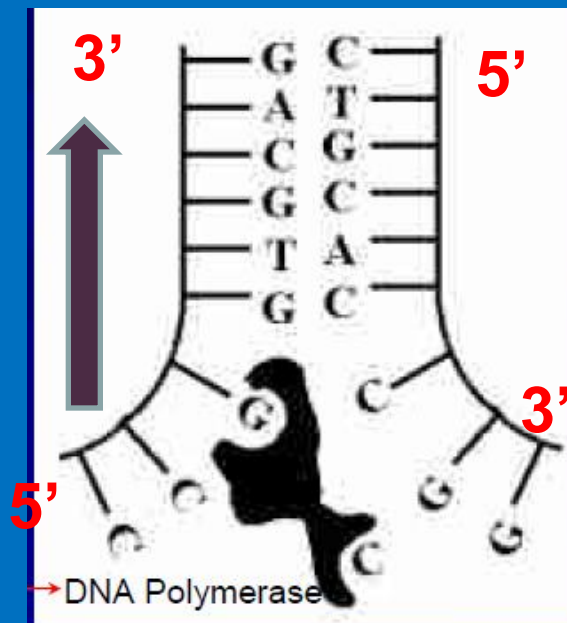
Replicación de ADN

Paso a paso

2.Elongacion:

Este proceso es diferente para cada una de las cadenas de ADN. En la cadena molde que va en la dirección 5'-3' de da de manera continua. ADN polimerasa puede leer la secuencia continuamente.

Replicación continua
“Leading strand”



Replicación continua
“Leading strand”

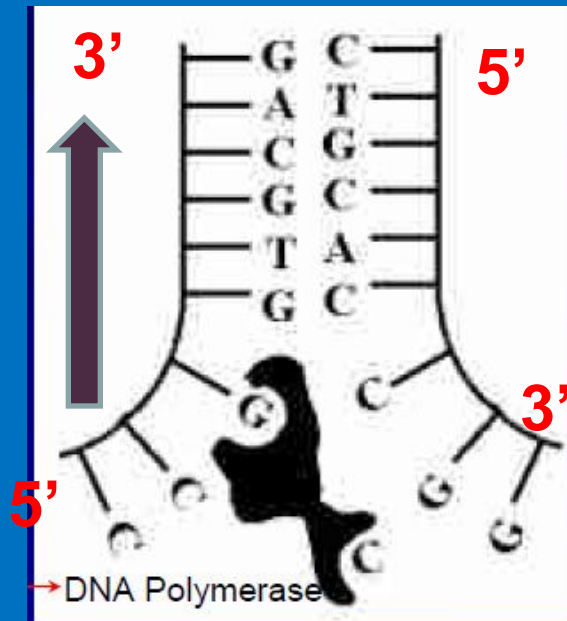
Replicación de ADN

Paso a paso

2.Elongacion:

ADN polimerasa atrae bases nitrogenadas y las enlaza de acuerdo a la secuencia presente en la cadena molde.

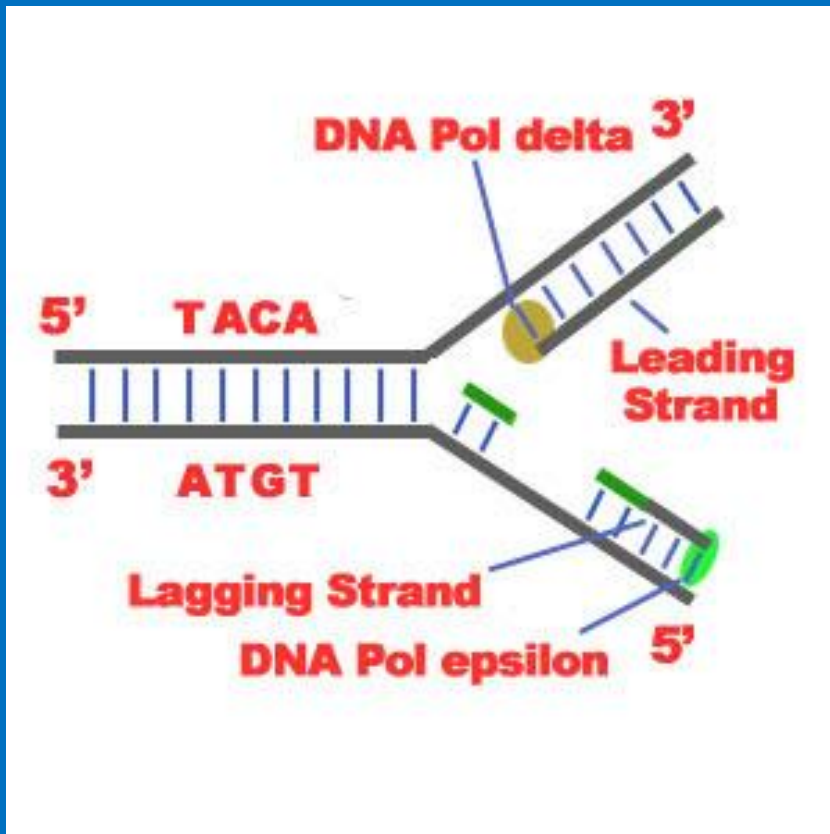
Replicación continua
se forma una nueva
cadena llamada
“Leading strand”



Replicación de ADN

Paso a paso

b) Elongación de formación de la cadena “lagging strand”

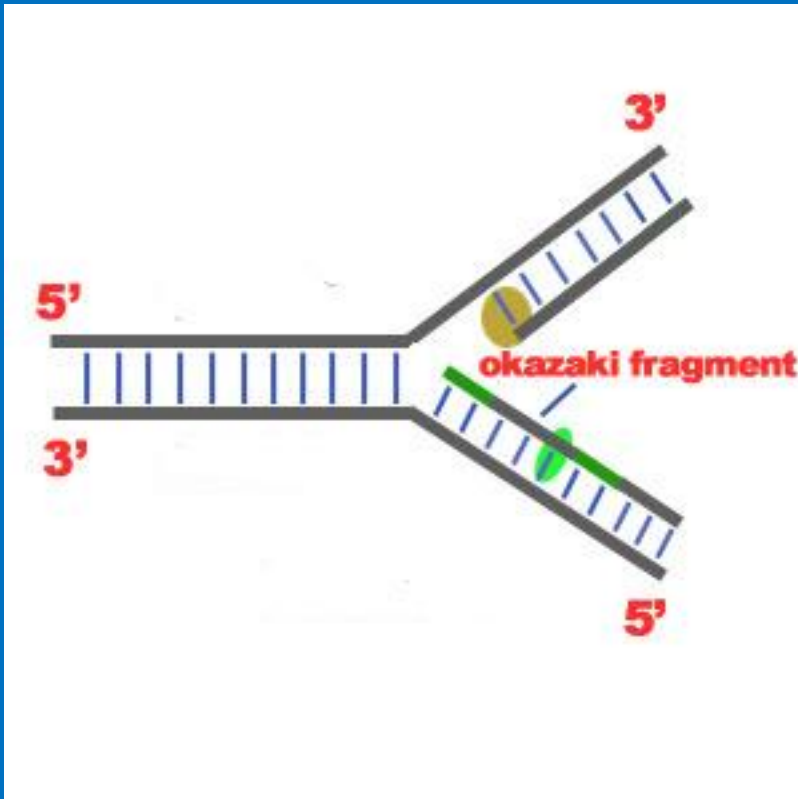


Este segmento no puede ser leído directamente por la ADN polimerasa. Aquí participa una nueva enzima llamada RNA polimerasa. Enlaza bases nitrogenadas complementarias para formar pequeños segmentos de ARN, llamados segmentos “fragmentos Okazaki”.

Replicación de ADN

Paso a paso

b) Elongación de formación de la cadena “lagging strand”



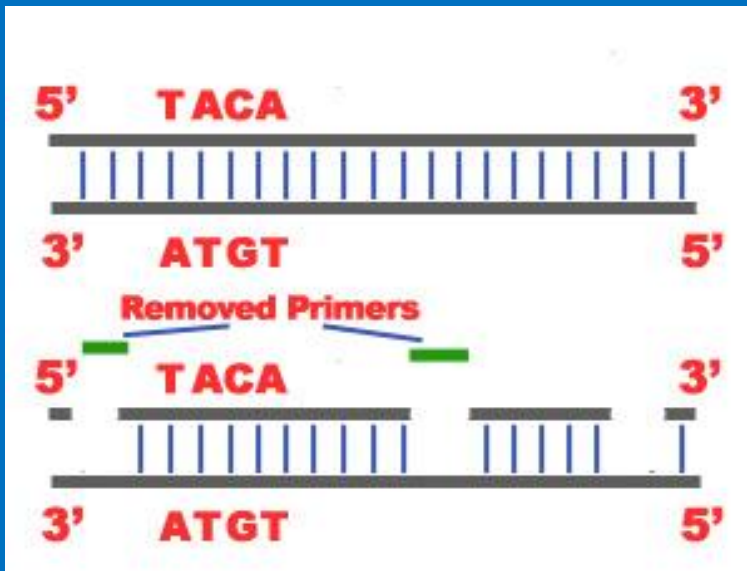
La ADN polimerasa continua la elongación de los segmentos “fragmentos Okazaki”.

Pero quedan algunos aberturas entre los segmentos de OK y el ADN que se forma de la elongación.

Replicación de ADN

Paso a paso

4. En la cadena “lagging strand” la enzima ADN Pol I exonucleasa lee los fragmentos y elimina todos los segmentos de ARN.

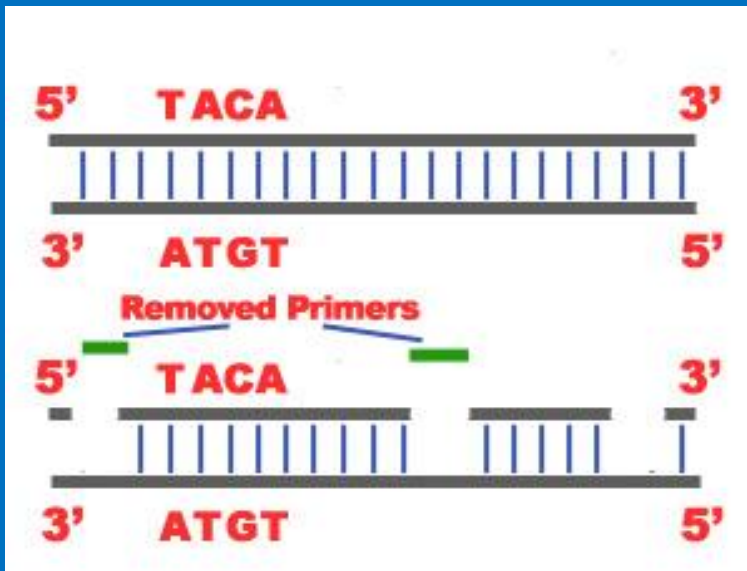


Las aberturas en la cadena son cerrados mediante la acción de ADN polimerasa. Y la ADN ligasa enlaza fosfatos a los huecos que quedan.

Replicación de ADN

Paso a paso

5. Terminación: La ultima porción de ADN original que contenía la secuencia de complementaria de ARN no puede ser leída por la ADN.

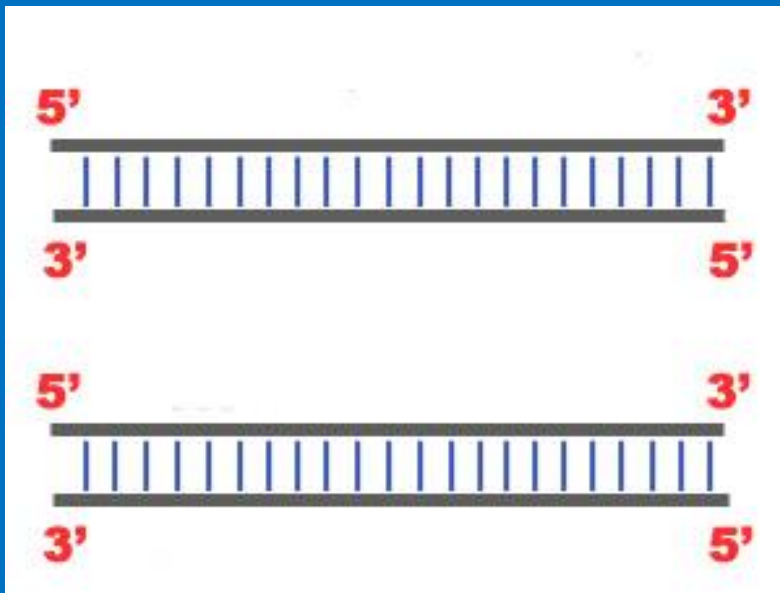


Esta ultima parte no se replica. La cadena original de ADN contiene secuencias de bases repetidas en esta ultima parte y son llamadas telomeros.

Replicación de ADN

Paso a paso

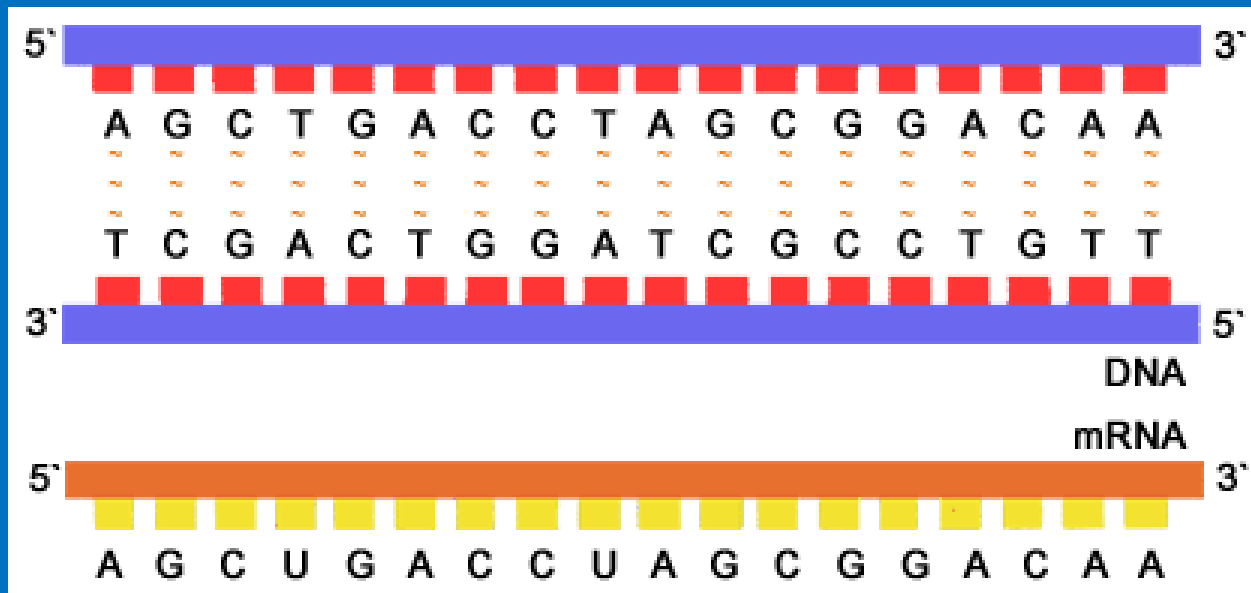
6. Reparación: La replicación no se completa asta que no se haga el control de calidad. Enzimas llamadas nucleasas remueven las bases que estén ocupando posiciones erróneas.



Transcripción de ADN a ARN

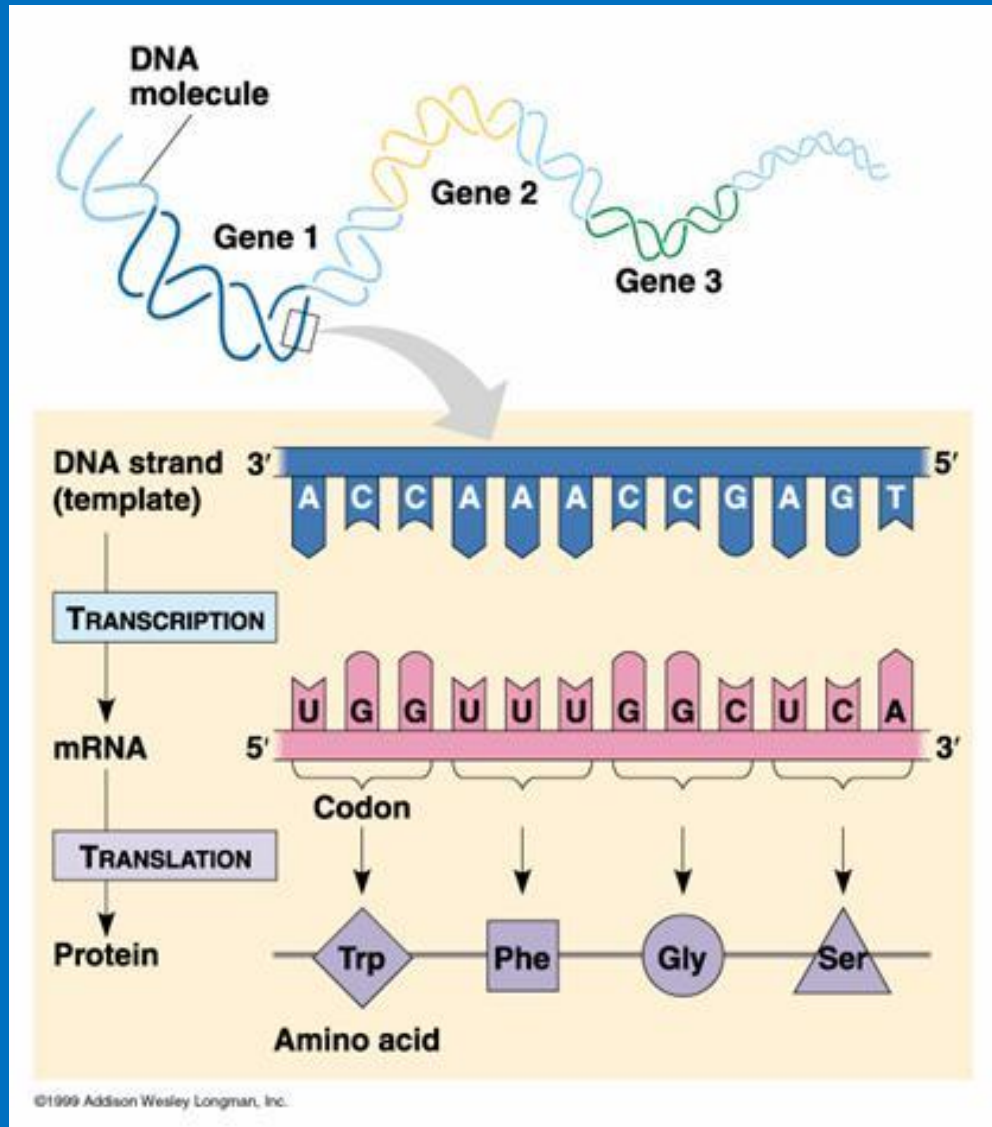
El ADN se diferencia del ARN en que la base nitrogenada Timina es reemplazada por Uracilo.

También en que para la síntesis de proteínas solo se necesita una cadena de ARN llamado mensajero. mRNA existe naturalmente en las células en la forma de cadena individual.



Traducción de ARN a proteínas

Después de que el ARN se ha formado es transportado a través de los poros nucleares a el retículo endoplasmático donde los ribosomas traducen esta secuencia en proteínas.



Codificación de las proteínas a partir de los codones

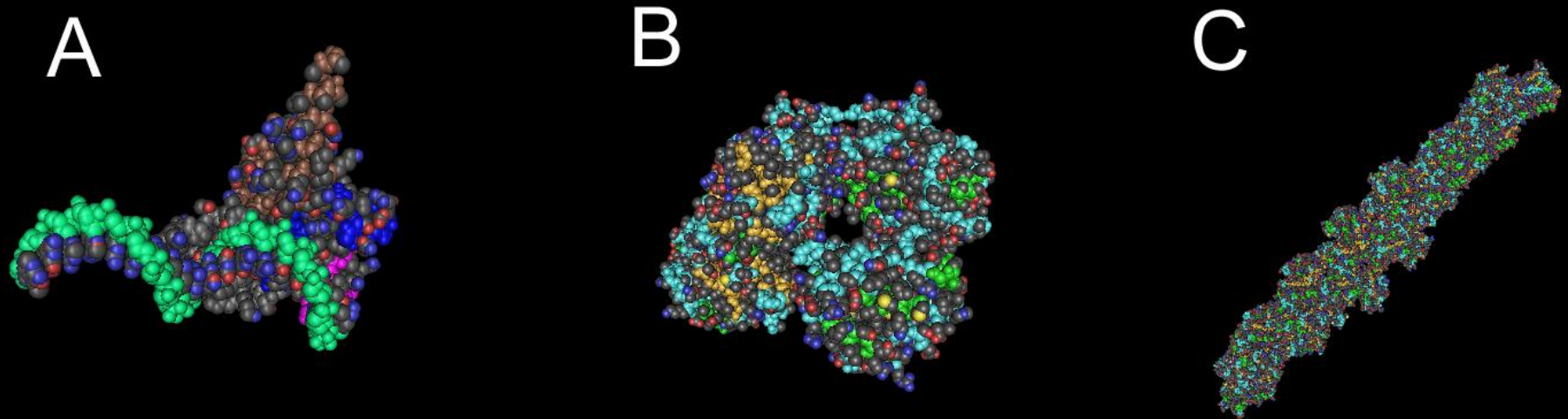
	U	C	A	G	
U	UUU Fenilalanina UUC UUA Leucina UUG	UCU Serina UCC UCA UCG	UAU Tirosina UAC UAA Stop UAG	UGU Cisteína UGC UGA Stop UGG Triptófano	U C A G
C	CUU Leucina CUC CUA CUG	CCU Prolina CCC CCA CCG	CAU Histidina CAC CAA Glutamina CAG	CGU Arginina CGC CGA CGG	U C A G
A	AUU Isoleucina AUC AUA AUG Metionina	ACU Treonina ACC ACA ACG	AAU Asparagina AAC AAA Lisina AAG	AGU Serina AGC AGA Arginina AGG	U C A G
G	GUU Valina GUC GUA GUG	GCU Alanina GCC GCA GCG	GAU Ácido Aspartico GAC GAA Ácido Glutámico GAG	GGU Glicina GGC GGA GGG	U C A G

Varios codones codifican el mismo aminoácido

Existen codones de parada y de inicio, algunas veces estos son específicos para cada especie.

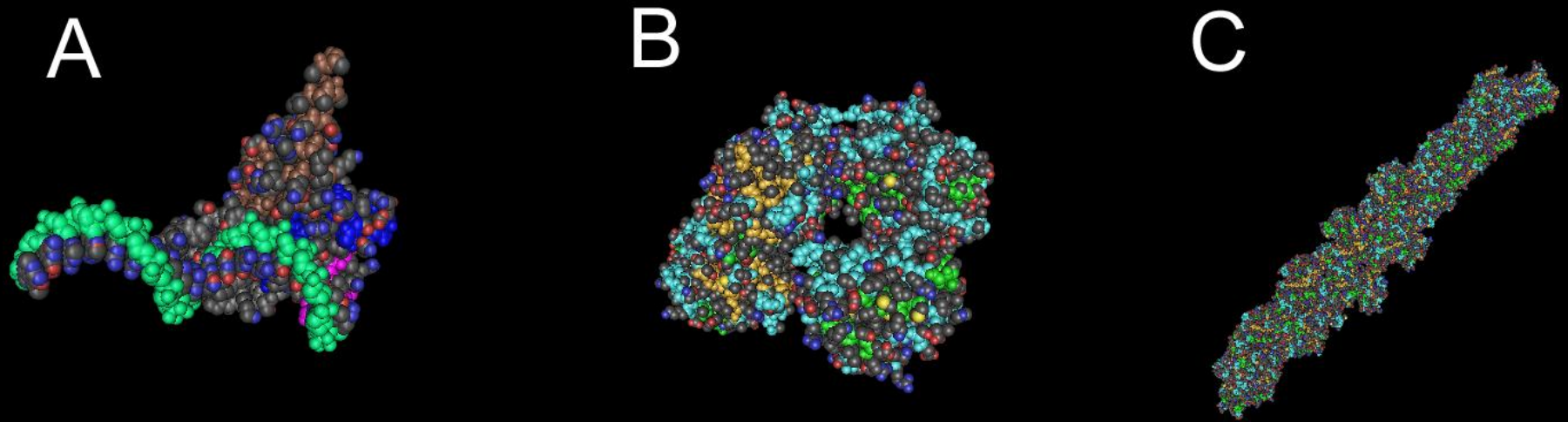
En RNA , la cual es la plantilla para síntesis de proteínas: Timina se reemplaza por uracilo

“Nanoindustrias” celulares: Ensamble de Proteínas



Proteínas son constituyentes fundamentales de las células importantes en procesos de comunicación, respuesta inmune ante la presencia de patógenos, adhesión celular y ciclos celulares.

“Nanoindustrias” celulares: Ensamble de Proteínas

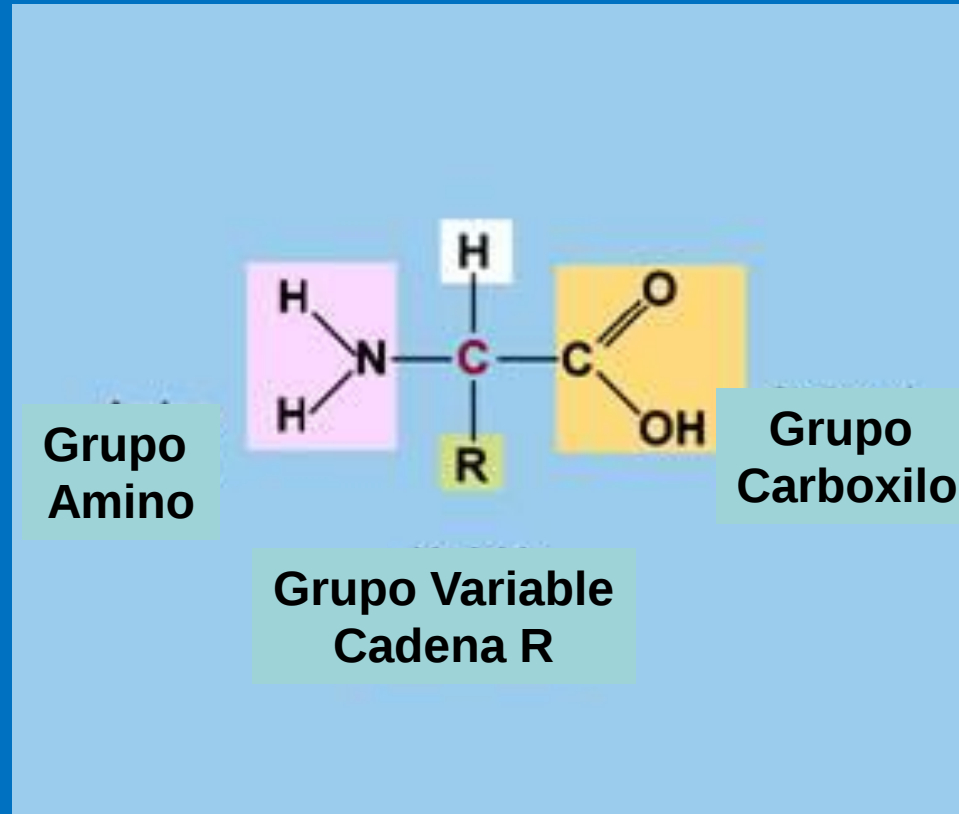


(A) Factor de transcripción de ADN.

(B) Dímero formado por unidades de kinasa (otra proteína) la cual enlaza grupos fosfato en sitios específicos de otras proteínas .

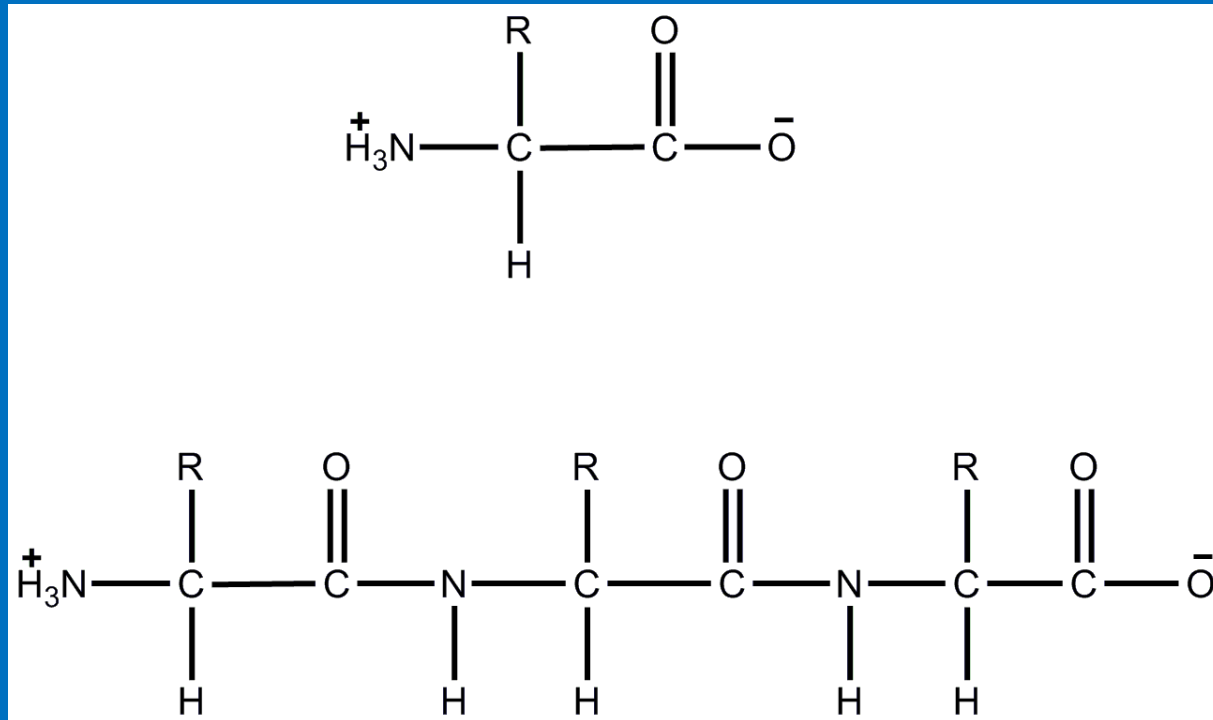
(C) Ensamble de varias unidades de proteínas, Actin.

Proteínas: componentes básicos



Estructura general de los aminoácidos

Proteínas: estructura general

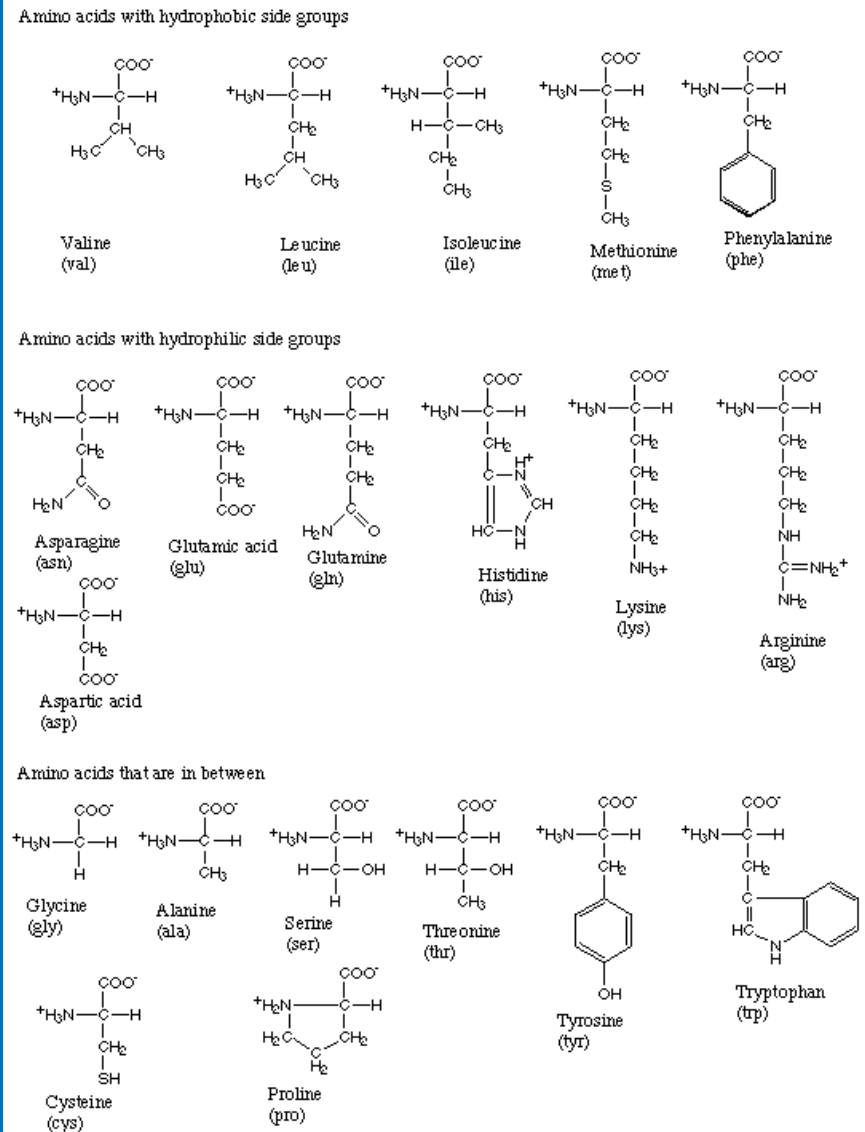


Amino acid (arriba) and la estructura primaria de una proteína (esqueleto de un polipéptido, abajo).

Proteínas: componentes básicos

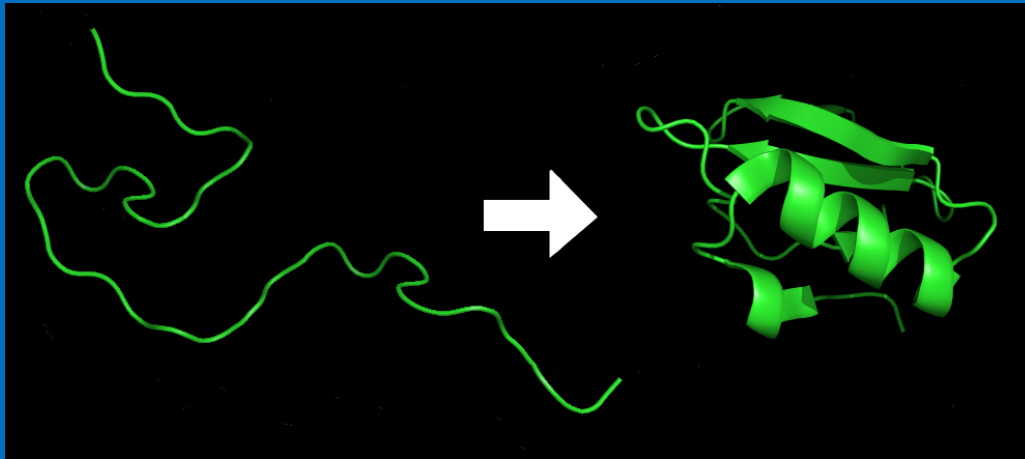
Todas las proteínas se forman a partir de la combinación de 20 aminoácidos.

El comportamiento químico y estructura 3D depende de su composición.

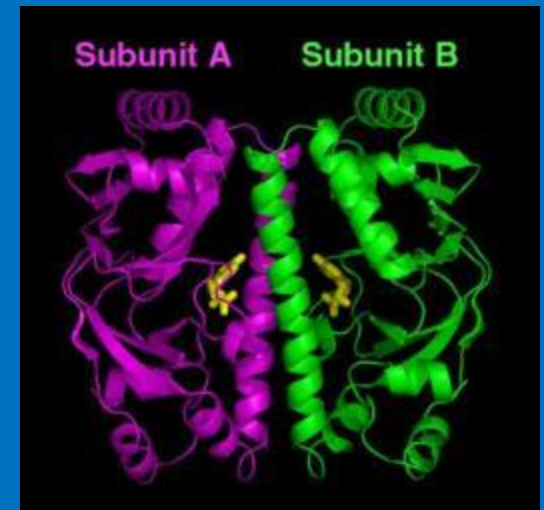


Proteínas: estructuras

Estructura secundaria



Estructura terciaria



Cyclic AMP receptor protein (CRP) encontrada en *Mycobacterium tuberculosis*

Gallagher, D. T.; Smith, N.; Kim, S-K; Robinson, H.; Reddy, P.T.; *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 284 (13), 8228-32.

**Cual es la relación entre ADN
y las proteínas?**

Codificación de las proteínas a partir de los codones

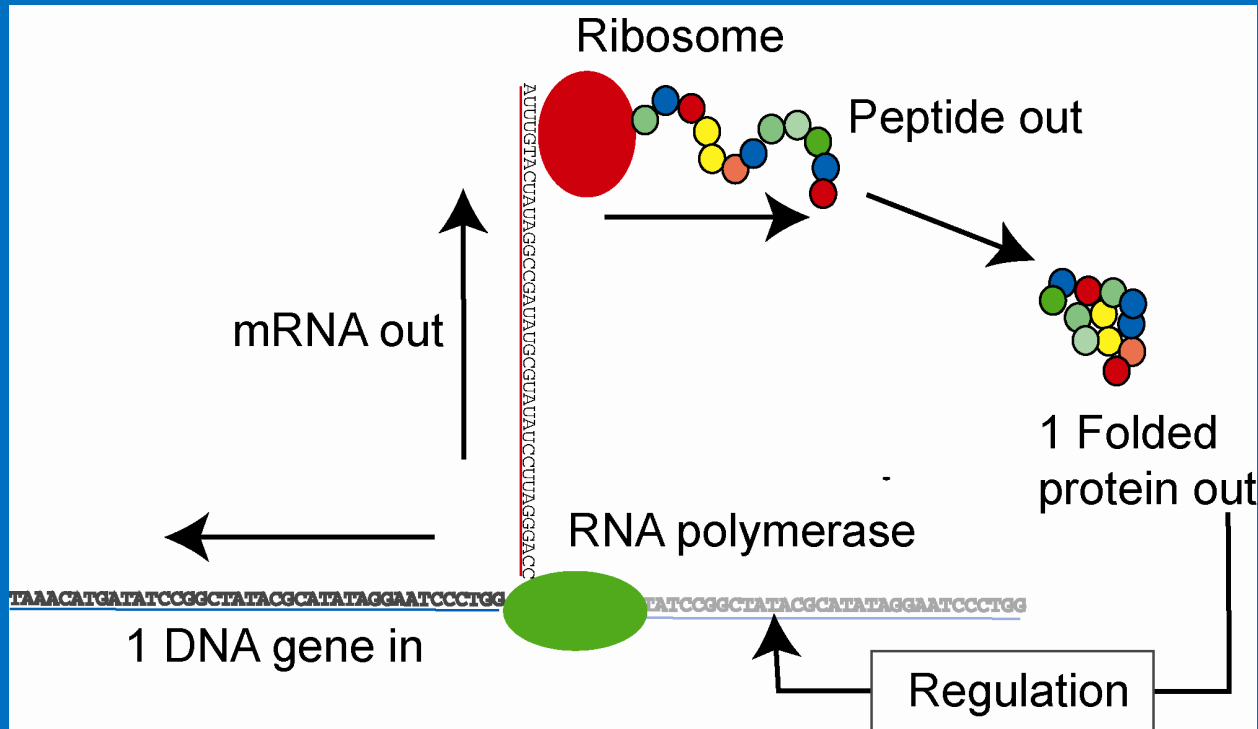
	U	C	A	G	
U	UUU Fenilalanina UUC UUA Leucina UUG	UCU Serina UCC UCA UCG	UAU Tirosina UAC UAA Stop UAG	UGU Cisteína UGC UGA Stop UGG Triptófano	U C A G
C	CUU Leucina CUC CUA CUG	CCU Prolina CCC CCA CCG	CAU Histidina CAC CAA Glutamina CAG	CGU Arginina CGC CGA CGG	U C A G
A	AUU Isoleucina AUC AUA AUG Metionina	ACU Treonina ACC ACA ACG	AAU Asparagina AAC AAA Lisina AAG	AGU Serina AGC AGA Arginina AGG	U C A G
G	GUU Valina GUC GUA GUG	GCU Alanina GCC GCA GCG	GAU Ácido Aspartico GAC GAA Ácido Glutámico GAG	GGU Glicina GGC GGA GGG	U C A G

Varios codones codifican el mismo aminoácido

Existen codones de parada y de inicio, algunas veces estos son específicos para cada especie.

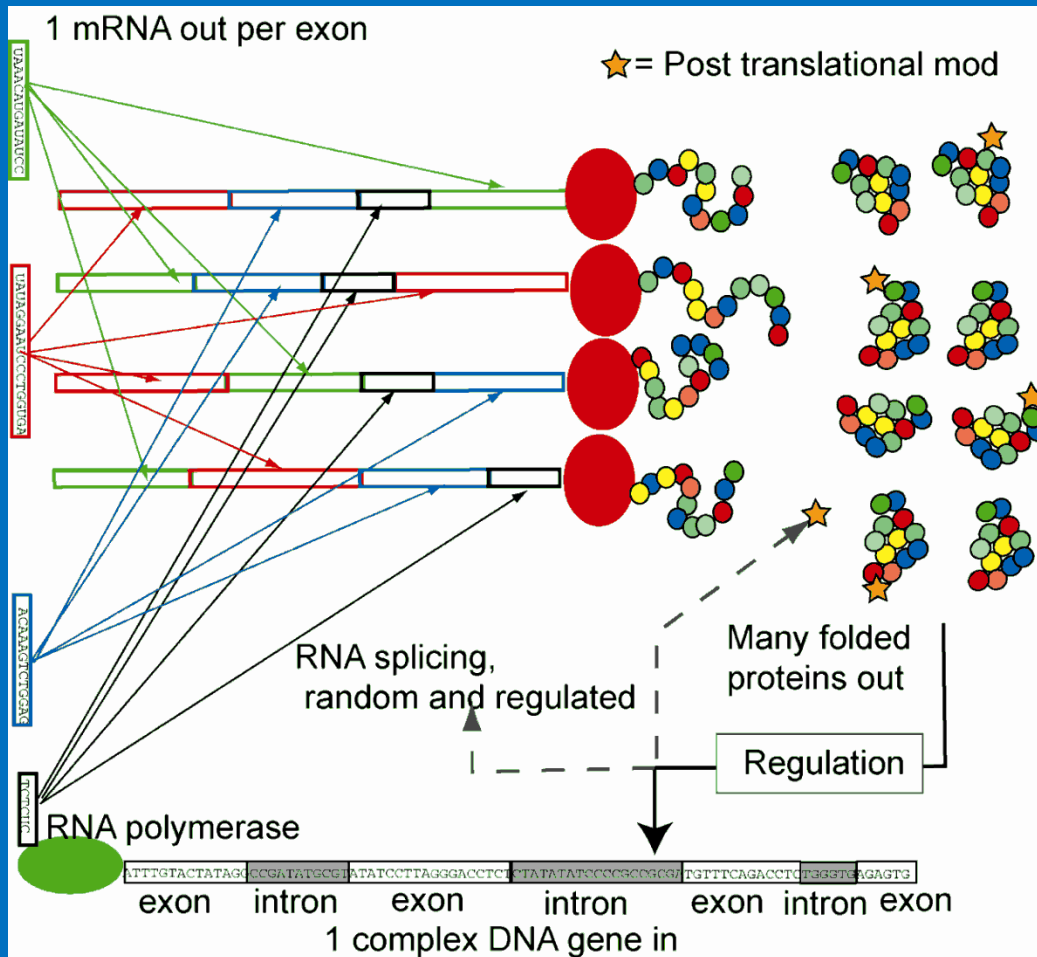
En RNA , la cual es la plantilla para síntesis de proteínas: Timina se reemplaza por uracilo

Ensamble de proteínas



Uso de ARN como plantilla

Origen de diversidad de proteínas



Intrones y exones, secuencias de bases en el código genético que están involucrados en la producción de proteínas. La secuencia de **bases del ADN** en los exones son convertidos **mARN** y eventualmente codifican amino ácidos en las proteínas. Los intrones son secuencias de bases de ADN que se encuentran entre los exones pero que no son convertidos a ARN.

Abreviación de nombres

Amino acidos	Codigo de tres letras	Codigo de una sola letra
glycina	Gly	G
alanina	Ala	A
valina	Val	V
leucina	Leu	L
isoleucina	Ile	I
methionina	Met	M
fenilalanina	Phe	F
tryptofan	Trp	W
prolina	Pro	P

Abreviación de nombres

serina	Ser	S
threonina	Thr	T
cisteina	Cys	C
tirosina	Tyr	Y
asparagina	Asn	N
glutamina	Gln	Q
Acido aspartico	Asp	D
Acido glutamico	Glu	E
Arginina	Ar	R
Histidina	His	H
Lisina	Lys	K

Ejemplo:

Reemplazar T por U

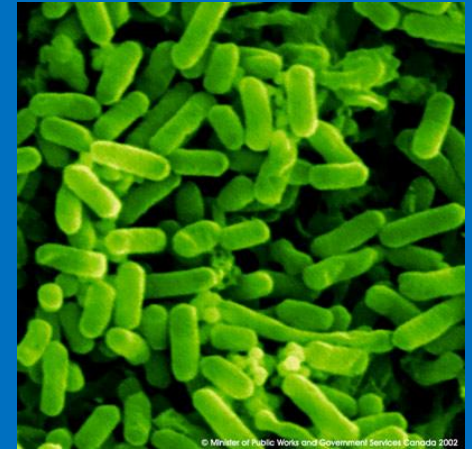
TGC AGA ATG AAG GGT GAT TTA TGT GAT TTG CAT
CAC TTT TGG TGG GTA AAT TTA TGC AAC GCA
TTT GCG TCAT GGT GAT GGT ATC ACG AAA AAA
TGT TAA ACC CTT CGG TAA AGT GTC TTT TTG
CTT CTG ACT AAA CCG ATT CAC AGA GGA GTT GT
ATA TGT CCA AGT CTG ATG TTT TTC ATC TCG GCCT
CAC TAA AAA CGA TTT ACA AGG GGC TAC GCT TGC
CAT CGT CCC TGG

C R M L G D L C D L H

Ejemplo

Uridine Phosphorylase

Escherichia coli str. K-12



```
1  mksdvfhlg  ltkndlqgat  laivpgdpdr  vekiaalmdk  pvklashref  
   ttwraeldgk
```

```
61  pvivcstgig  gpstsiavee  laqlgirtfl  rigttgaiqp  hinvgdvlvt  
   tasvrldgas
```

```
121  lhfaplefpa  vadflectal  veaaksigat  thvgvtassd  tfypggqeryd  
   tysgrvvrhf
```

```
181  kgsmeewqam  gvmnyemesa  tlltmcasqg  lragmvagvi  vnrtqqeipn  
   aetmkqtesh
```

```
241  avkivveaar  rll
```

Propiedades mecánicas de Proteínas

- Densidad:

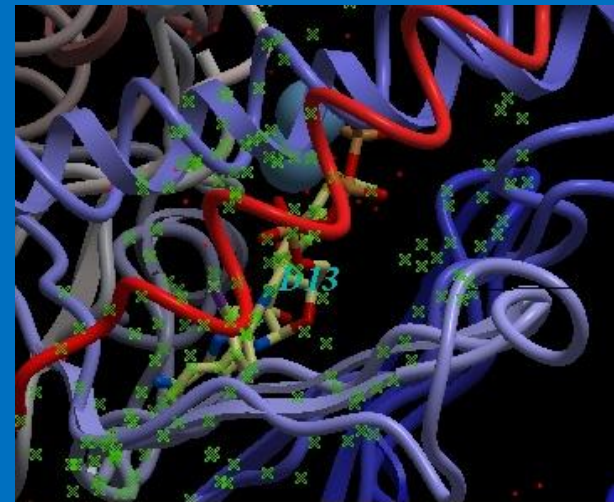
Relacionada con volumen y peso molecular de las macromoléculas. Se asume $\sim 1.4 \text{ g/cm}^3$

Densidad de empaquetamiento promedio tan alta como la de un sólido cristalino pero existen algunas cavidades.

Asumiendo $PM = 100 \text{ kDa}$

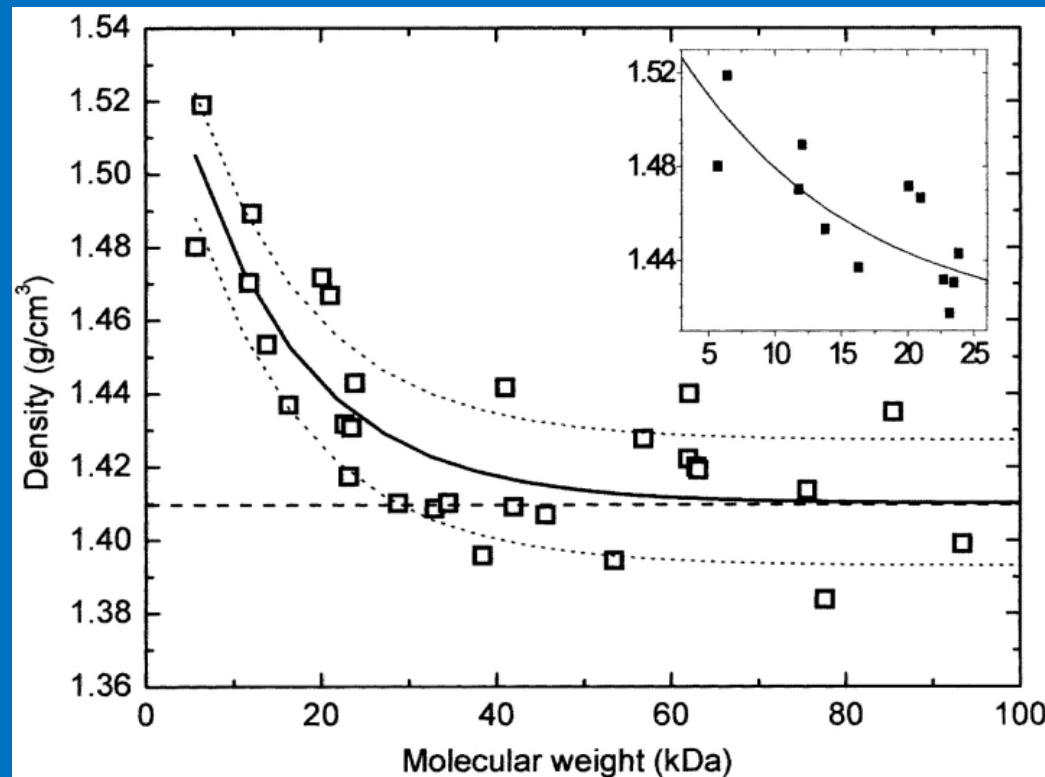
$$r = \sqrt[3]{\frac{3PM}{4\pi \cdot 822}}$$

$$r \sim 3 \text{ nm}$$



Propiedades mecánicas de Proteínas

Dependencia de la densidad de las proteínas con el peso molecular



Propiedades mecánicas de Proteínas

- Rigidez:

Resistencia de un cuerpo elástico a deformarse cuando se aplica una fuerza.

$$\frac{F}{A} = E \frac{\delta \ell}{\ell}$$

E = Modulo de Young

Proteína	E (Gpa)	Funcion
Actin	2	Esqueleto celular
Tubulin	2	Vías de Transporte en células
Seda	5	Tela de araña
Abductin	0.004	Ligamento muscular
Elastin	0.002	Musculo suave y ligamentos

Propiedades mecánicas de Proteínas

- Difusión:

Si PM 100 KDa y radio ~3 nm. El coeficiente de fricción en agua será

$$\gamma = 6\pi r\eta$$

Ley de Stokes

η = viscosidad del fluido 1×10^{-3} Pa s

$$\gamma = 56 \times 10^{-12} \text{ Ns/m}$$

k = constante de Boltzmann

$$D = \mu k_B T$$

$$\mu = (6\pi a\eta)^{-1}$$

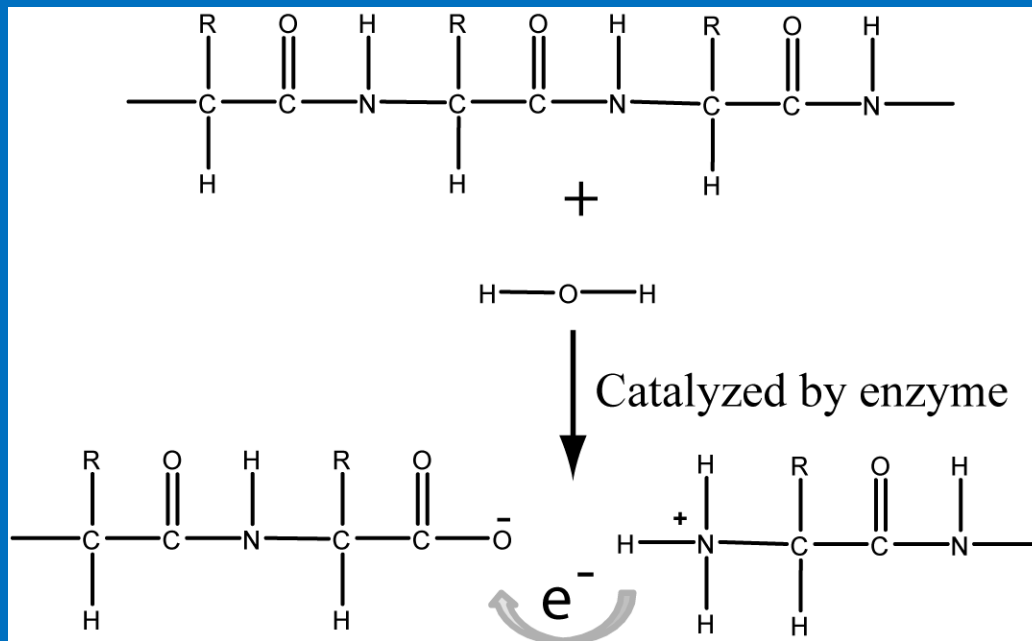
$D = 73 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ 100KDa proteina

$D = 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ proteinas pequenas

Enzimas: nanomaquinarias de bajo consumo energético

Catalizadores biológicos.

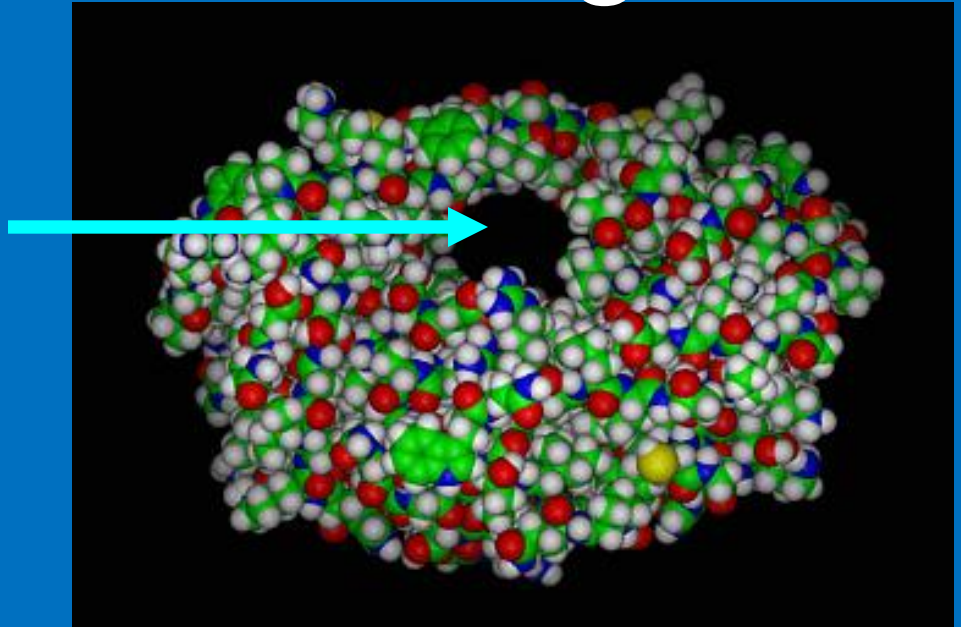
Ejemplo: Proteasas hidrolizan enlaces peptídicos.



- Tiempo de vida de un enlace peptídico en agua, 300 a 600 años
- Velocidad máxima de rompimiento de un enlace es 1 ms^{-1} (concentraciones altas)

Enzimas: nanomaquinarias de bajo consumo energético

- Que hacen?
- Proveen “sitio activo” donde moléculas de reactivo permanecen en contacto. Ejemplo: agua + cadena peptídica.

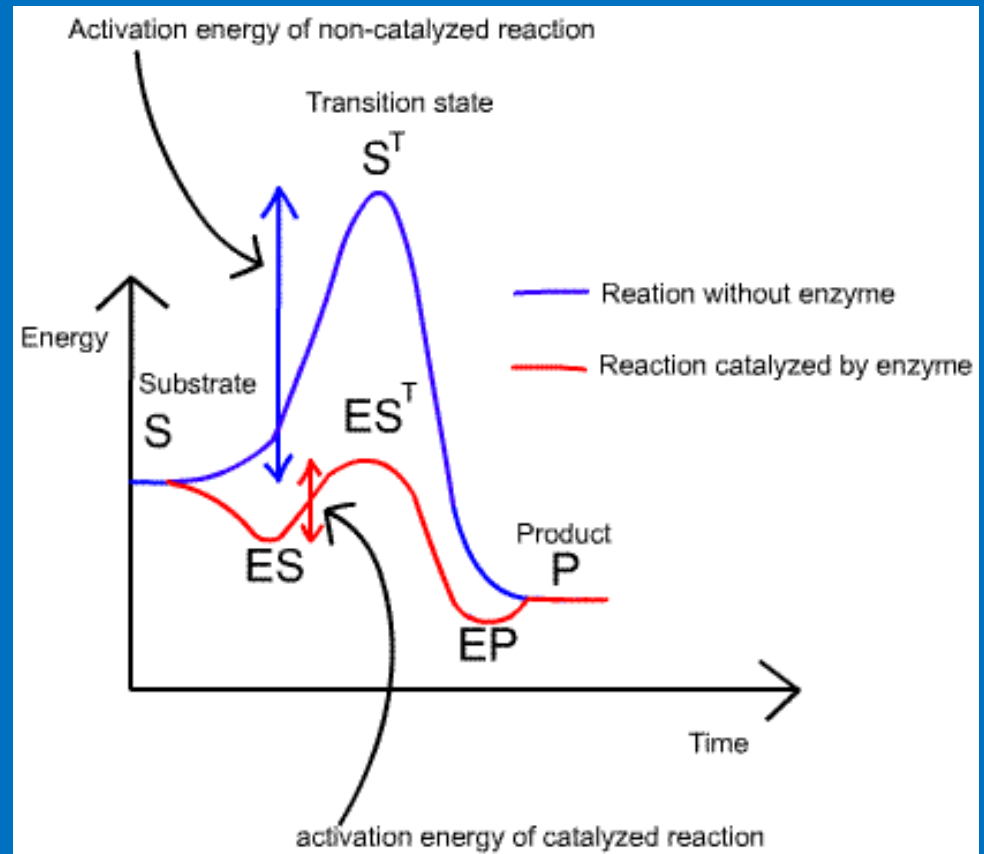


- Trabaja sobre sitios substratos específicos

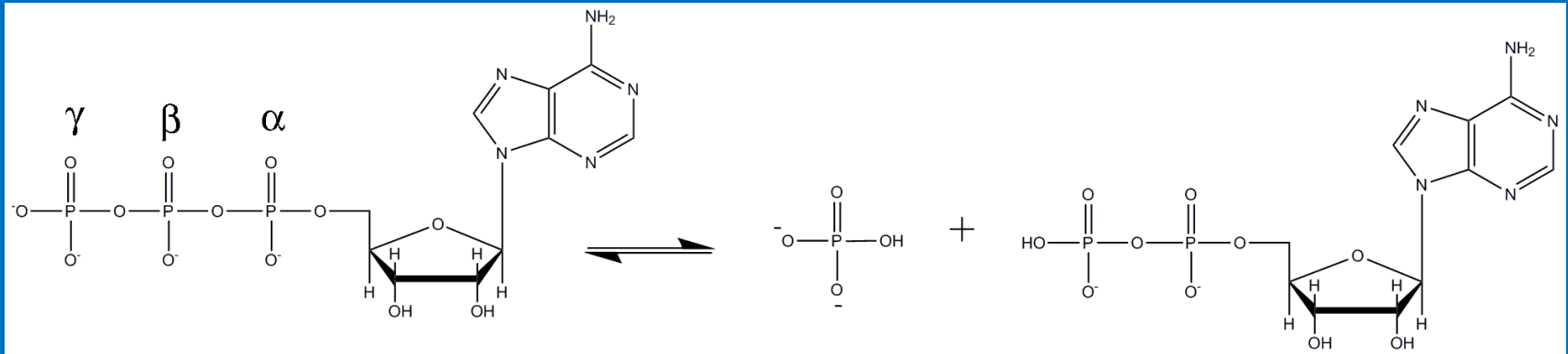
Ejemplo: Proteasas rompen enlaces peptídicos, la proteasa HIV rompe únicamente los enlaces peptídicos de poli-proteína recién sintetizada en la células que contienen el virus HIV.

Enzimas: que hacen?

- Actúan como “super solventes” facilitando la formación del estado de transición de la reacción y acelerando la reacción.
- Optimizan las propiedades mecánicas y polarización alrededor de sitio activo.



Combustible de las nanomaquinarias: ATP fuente de energía celular



Hidrolisis de ATP

$$K_{eq} = \frac{[ADP][P_i]}{[ATP]} = 4.9 \times 10^5 \longrightarrow$$

12 kcal/mol

20 KT a 300K

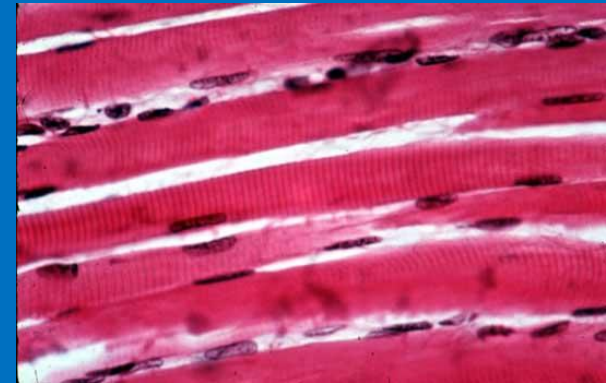
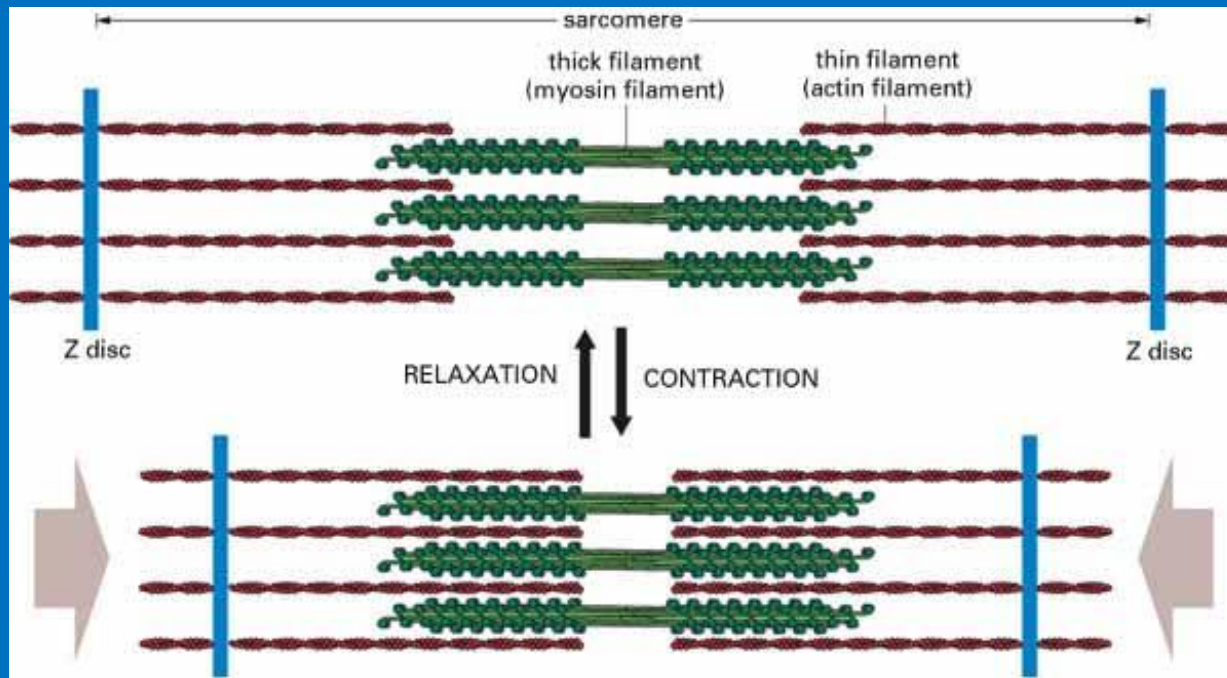
0.52 eV/ molecula

8.3 x 10⁻²⁰ J/ molecula

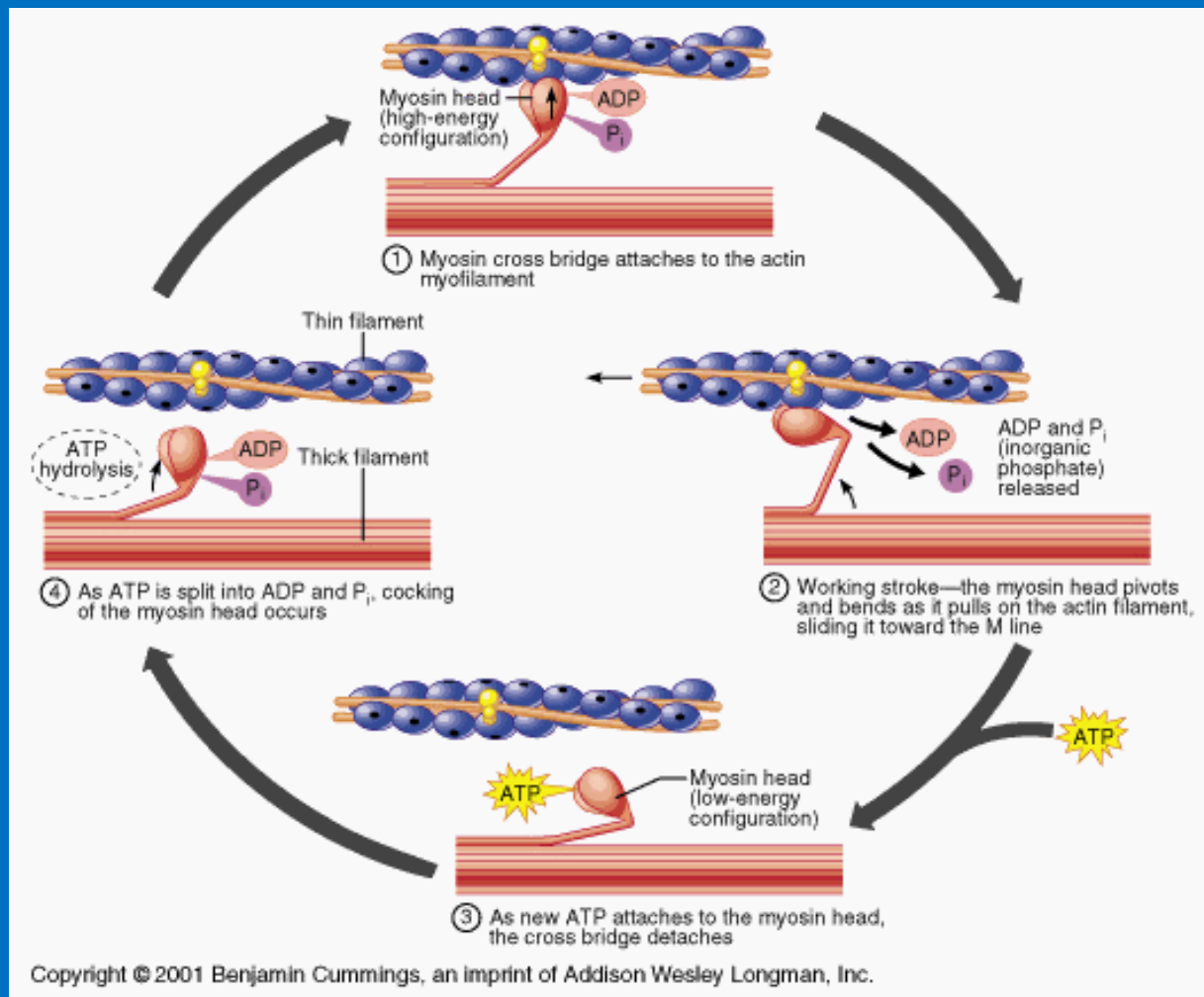
82 pN.nm

Motores moleculares: alto consumo de energía

Procesos de contracción y relajación muscular son el resultado de la interacción entre myosin y actin (proteínas), la energía necesaria es suministrada por la hidrólisis de ATP.



Motores moleculares: contracción muscular.



Motores moleculares: alto consumo de energía

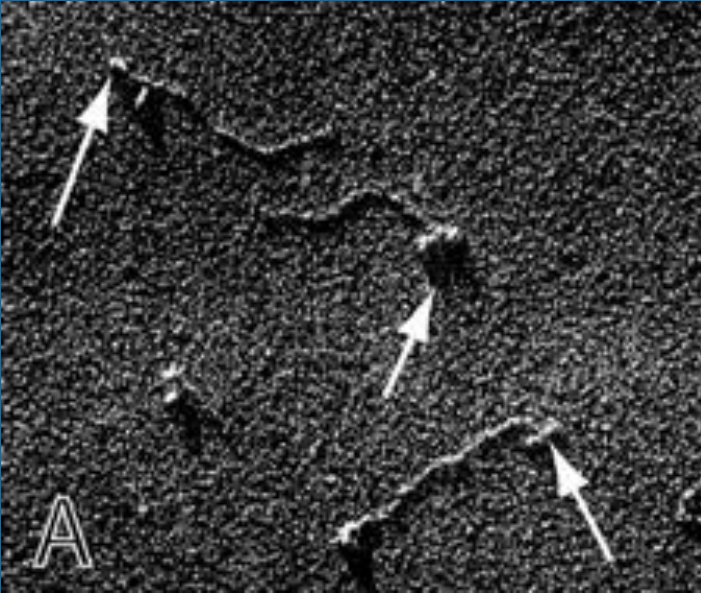


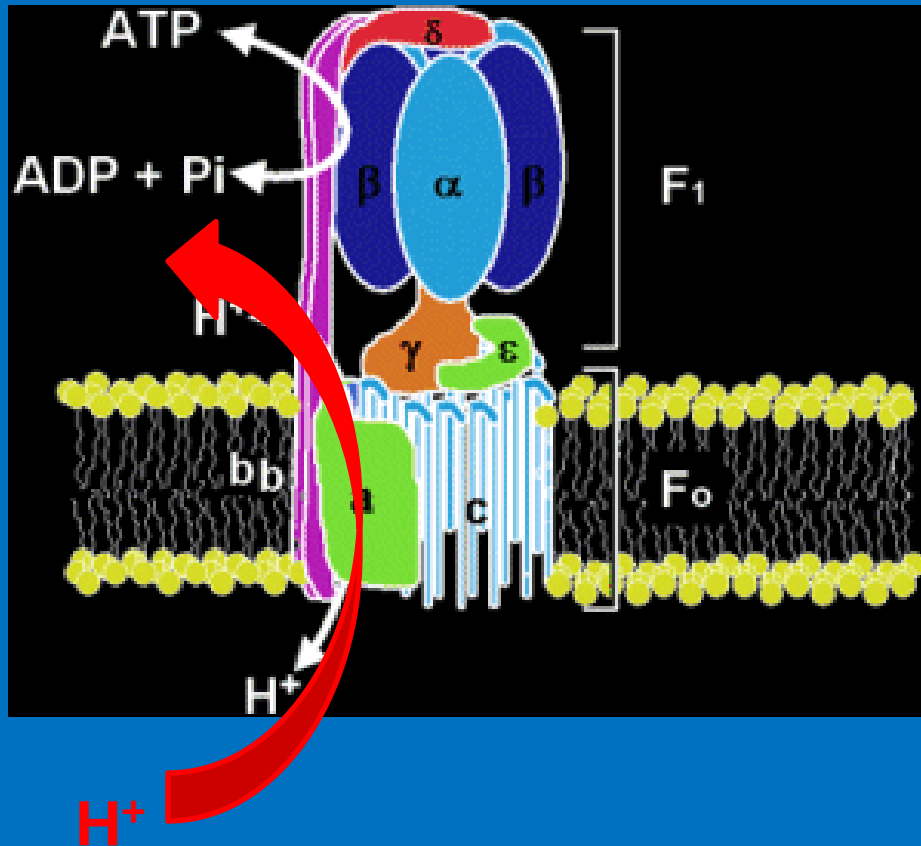
Imagen de moléculas de miosin obtenidas en un microscopio de barrido electrónico.

1 molécula de ATP = ~ 5 nm

~ 5 nm = amplificado ~ 36 nm

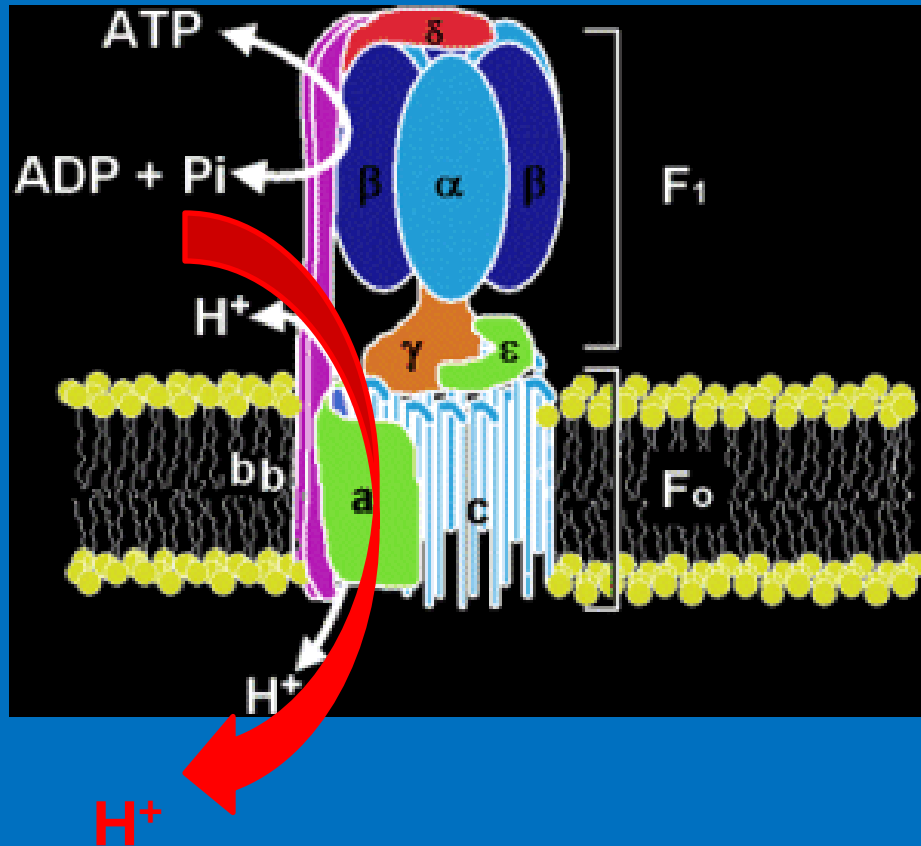
1 molécula de ATP = 1.5 pN

Motor de Rotación: ATP Sintasa



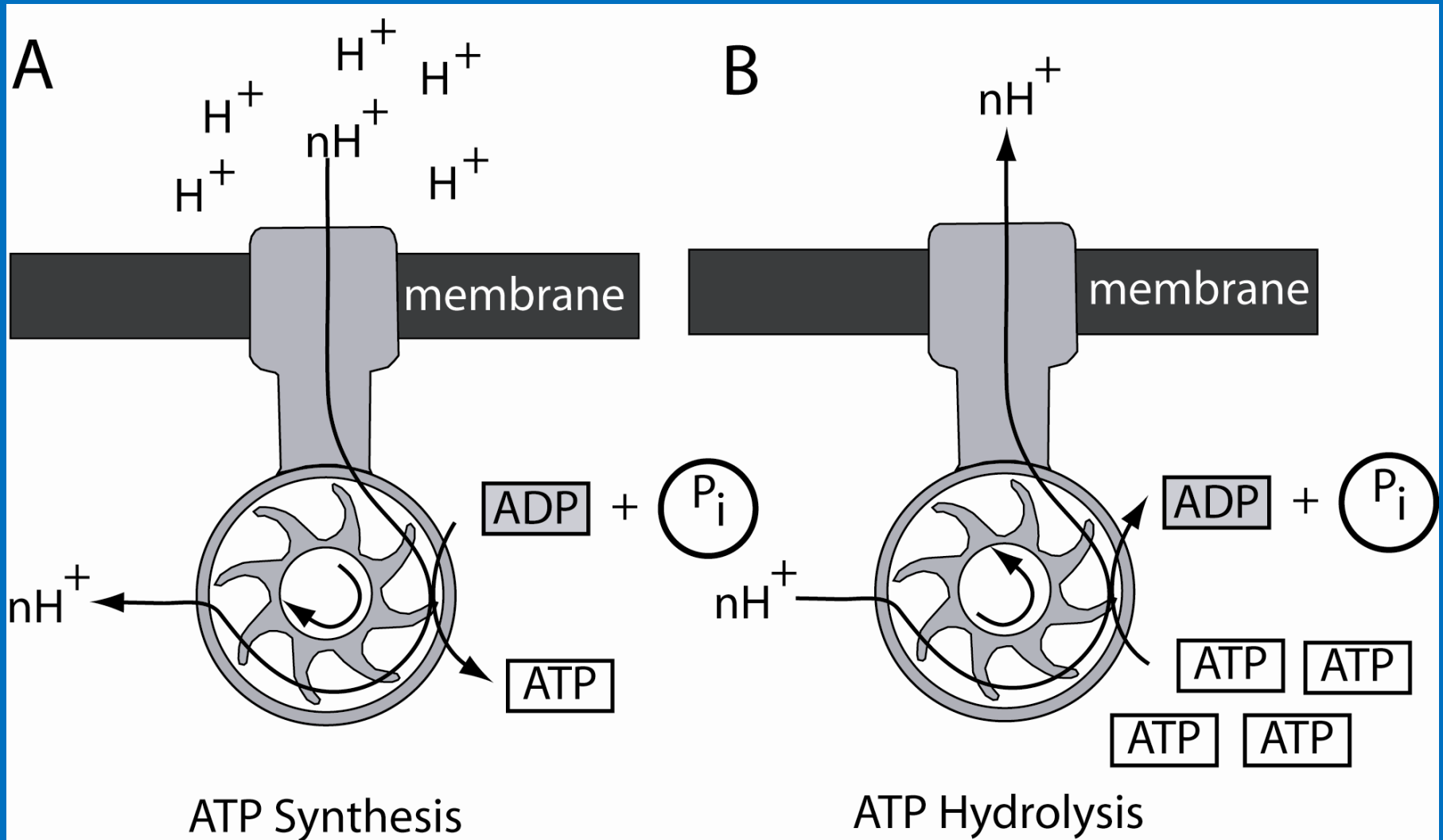
- Gradiente de protones generado a través de la membrana hace migrar los protones a través de la membrana hacia el interior, impulsa la rotación de F₁ generando la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i

Motor de Rotación: ATP Sintasa

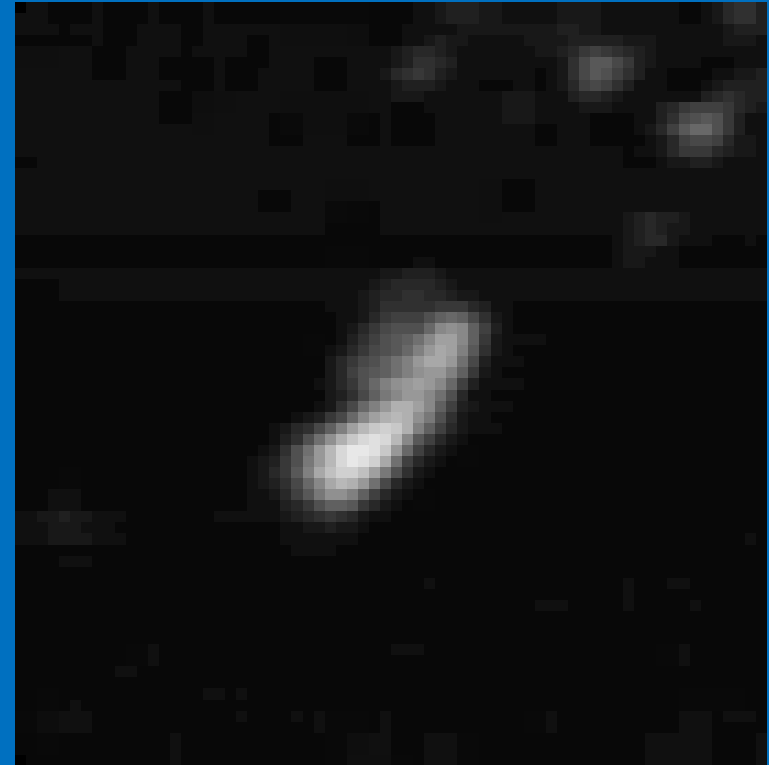
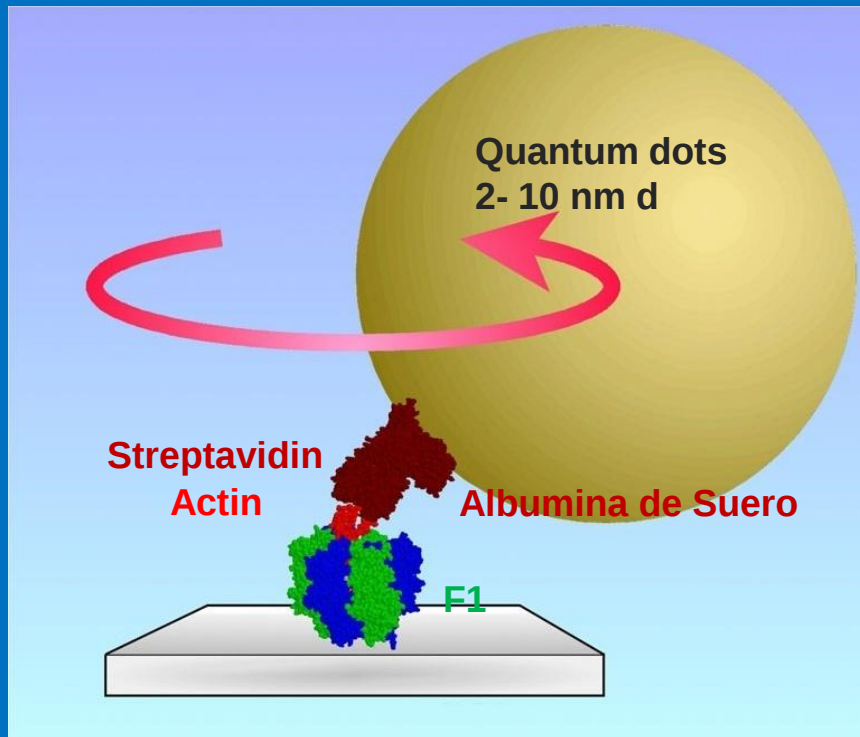


- Concentraciones altas de ATP hacen girar el motor molecular en dirección contraria lo cual implica hidrólisis de ATP mas energía.

Dos funciones de ATP sintasa



ATP Sintasa en acción

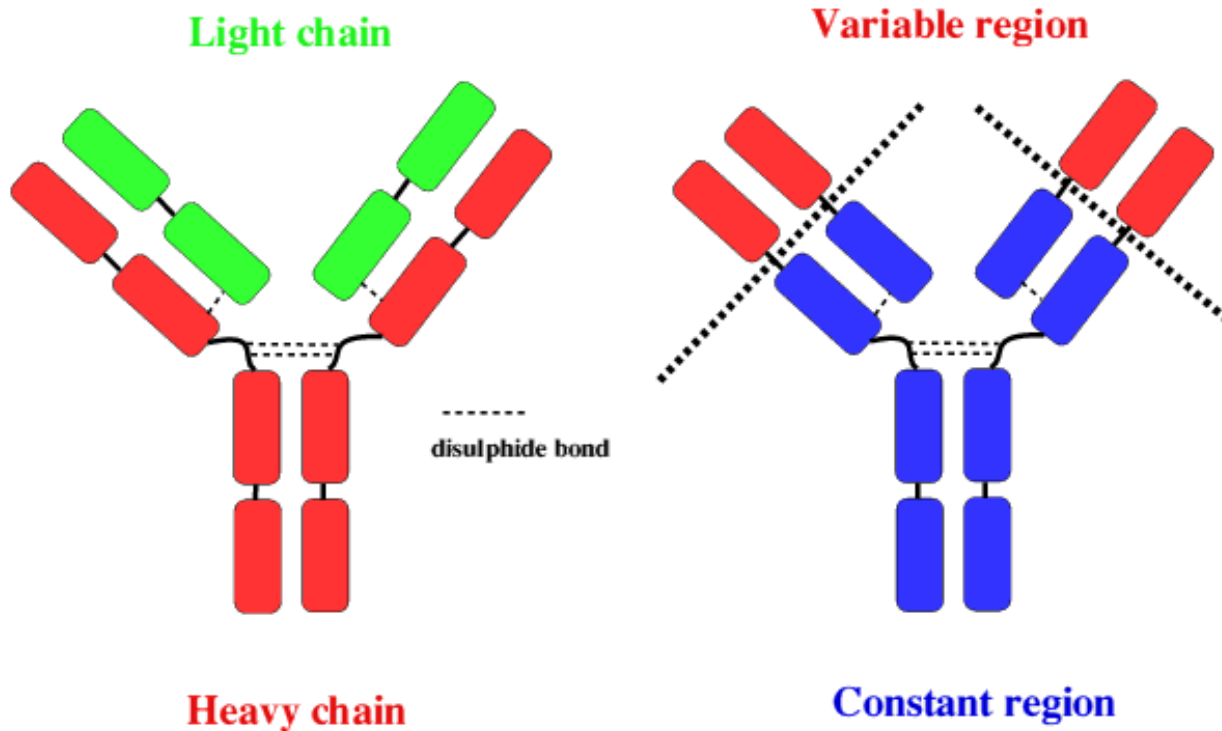


Noji, H.; Yasuda, R.; Yoshida, M. ; Kinosita, K. Jr. *Nature* **1997** 386, 299-302 .

Lindsay, S. M. Nanobiology en *Introduction to Nanoscience* Oxford University Press Inc., New York, 2010 p 361

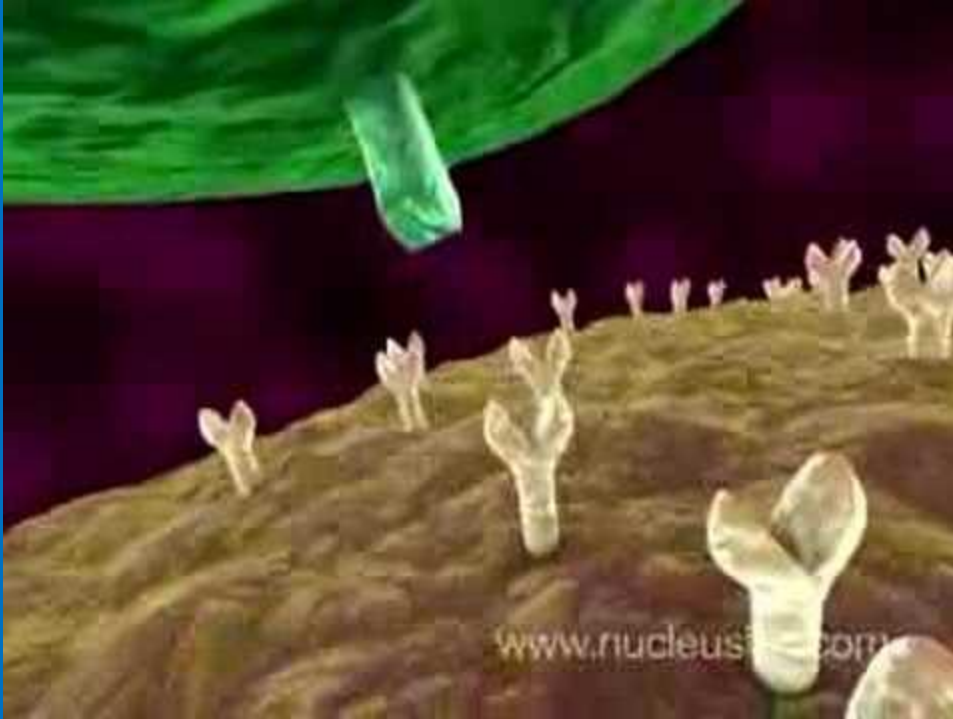
Estructura de Anticuerpos

Basic structure of an Antibody



$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab][Ag]} \quad Ab = \text{Antibody}, Ag = \text{Antigen}$$

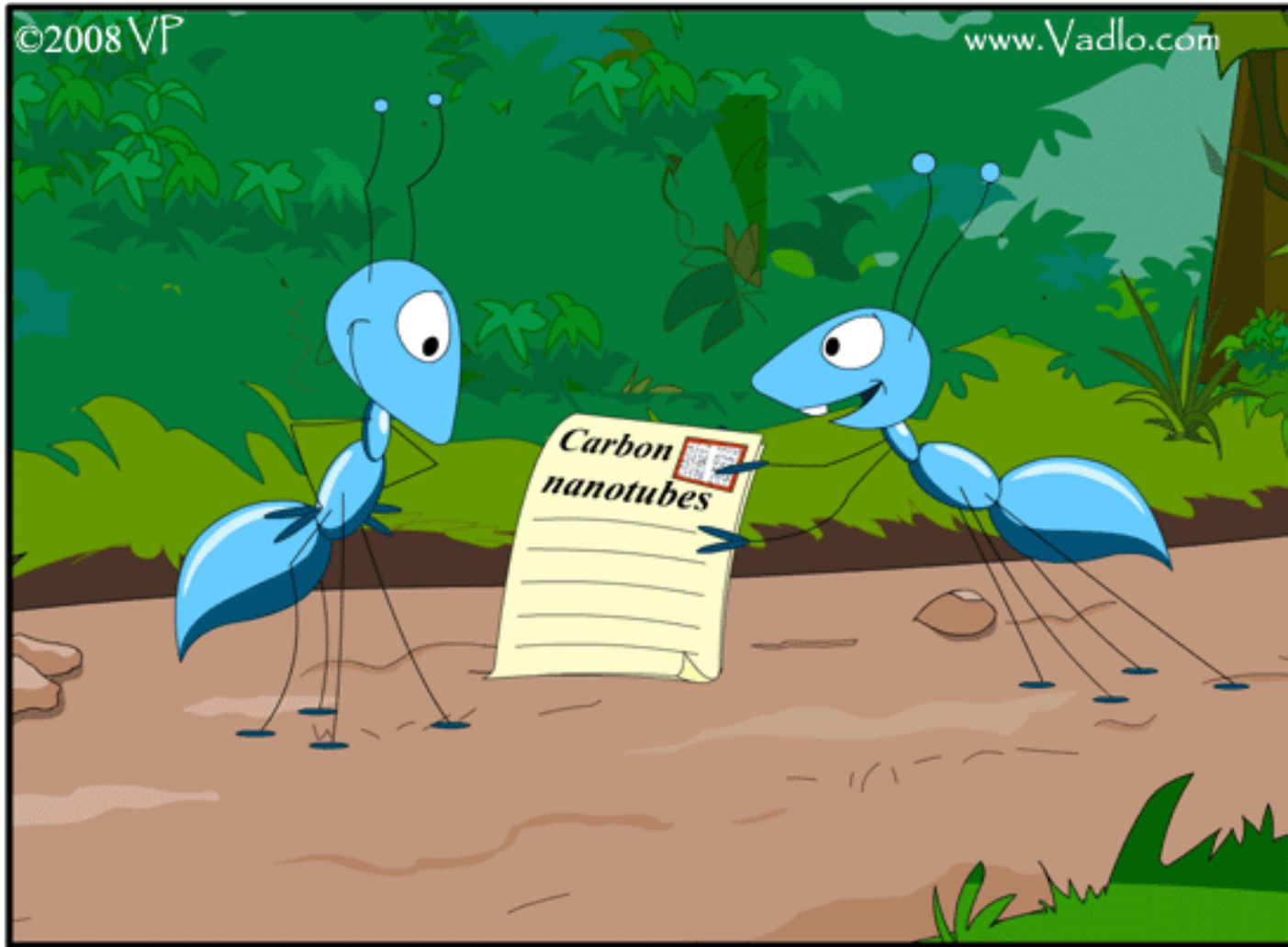
Reconocimiento de patógenos



Los anticuerpos son proteínas producidas en las células para luchar contra agentes patógenos. Los anticuerpos reconocen ciertas proteínas presentes en las superficies de los patógenos y se enlazan a ellas.

Interacción.

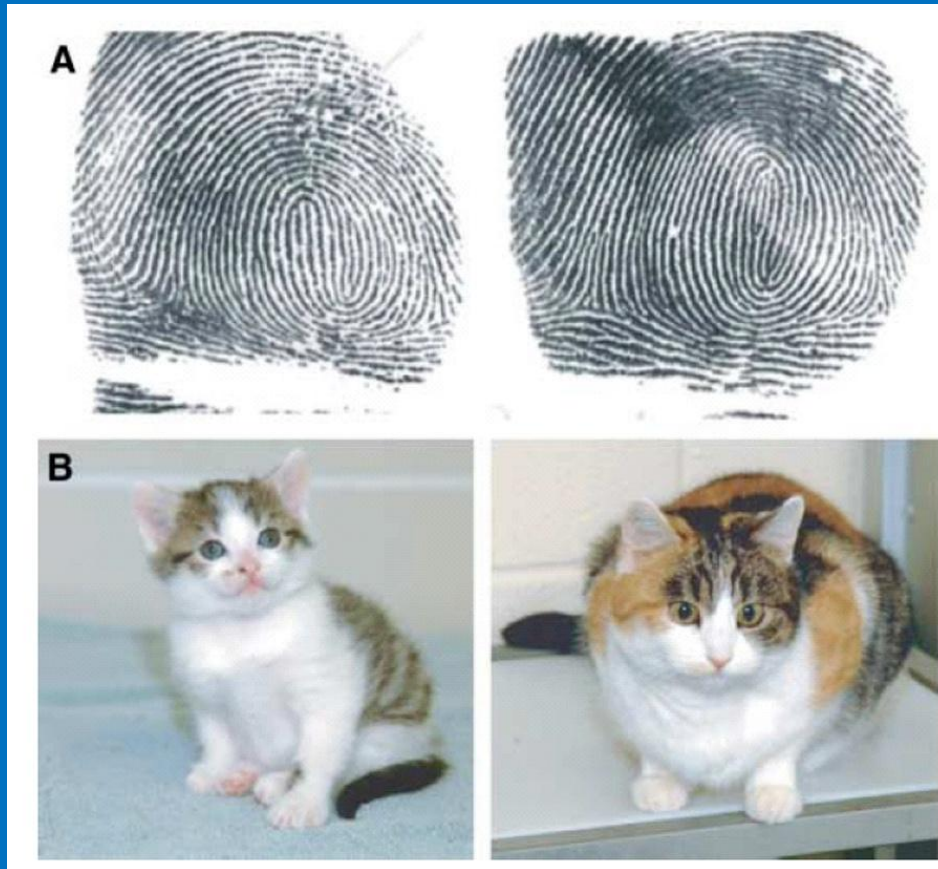
Anticuerpo-Antígeno



Con la invención de los nanotubos ahora finalmente, podremos tomar Coca Cola con pitillos.

Fluctuaciones en la expresion de genes.

Fluctuaciones: el mismo genoma, diferente genotipo

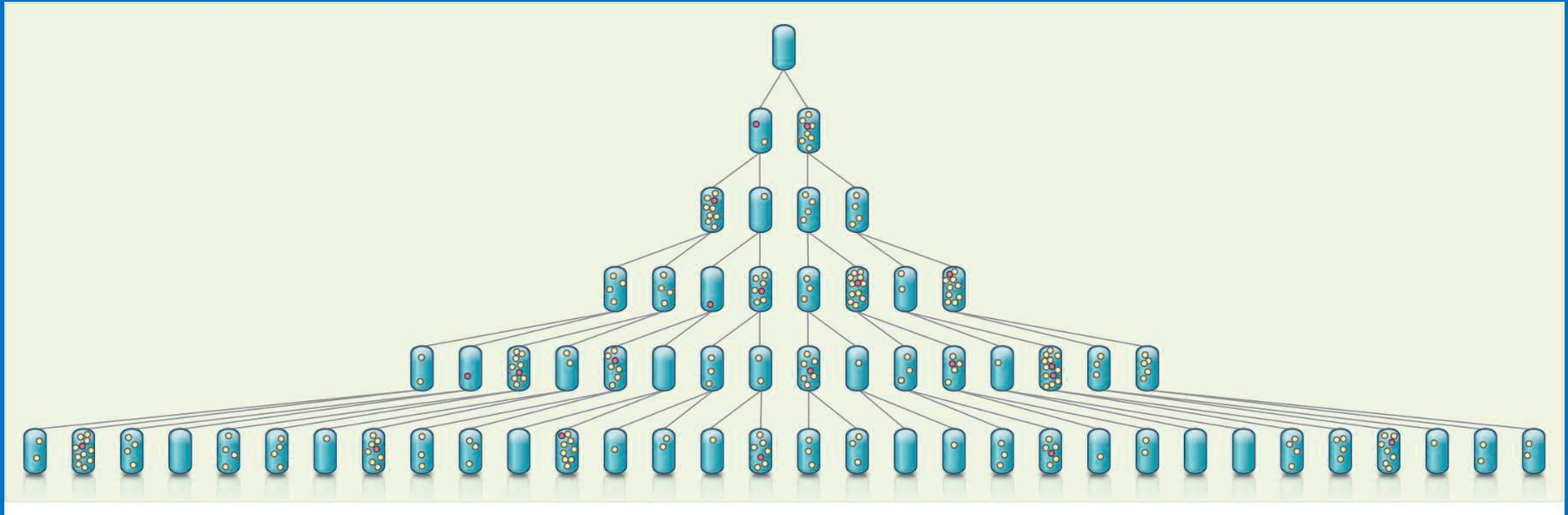


Huellas digitales de gemelos

Raser, J.M. and E.K. O'Shea, Science, 2005, **309**: 2010-2013.

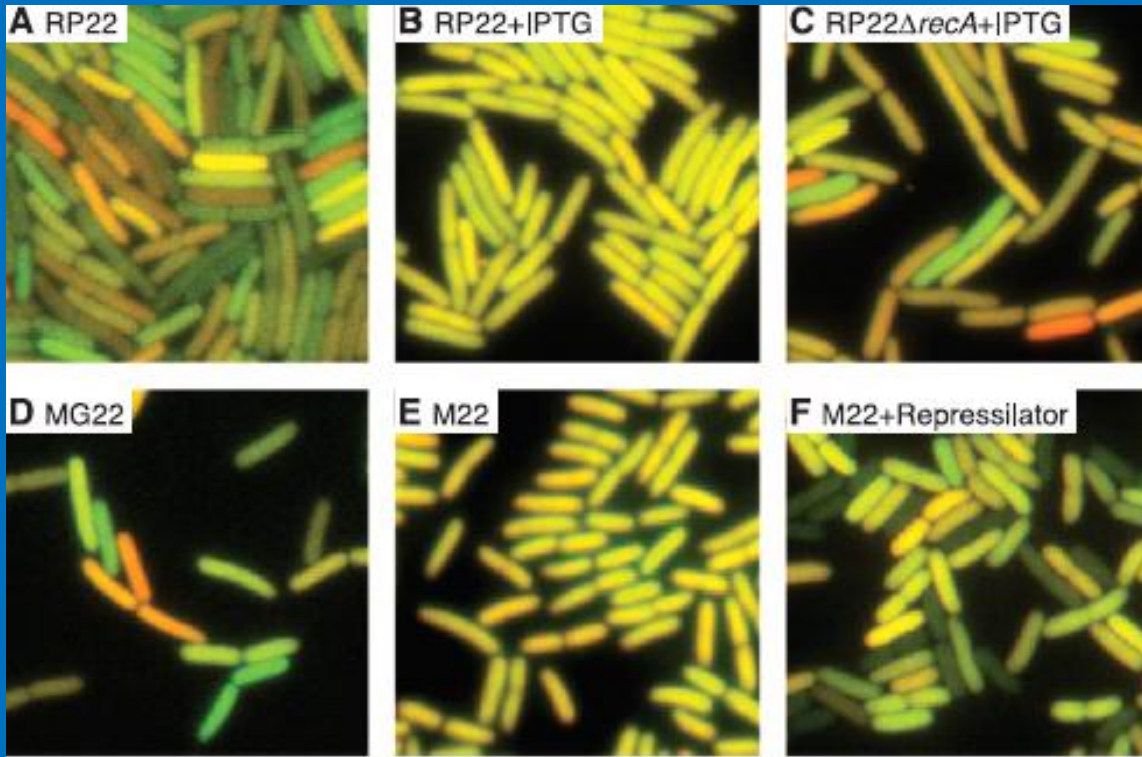
Gato clonado y su madre.

Expresión genética vs estadística



Variaciones en expresión genética en células conteniendo el mismo material genético

Expresión genética vs estadística



Genes codificando proteína fluorescente verde y violeta se dividen en varios genes en *E. Coli*. los dos genes se leen a la misma velocidad en ambas direcciones al rededor del genoma circular.

Expresión genética equitativa resulta en fluorescencia amarilla.

Numero pequeño de copias resulta en diferentes colores.

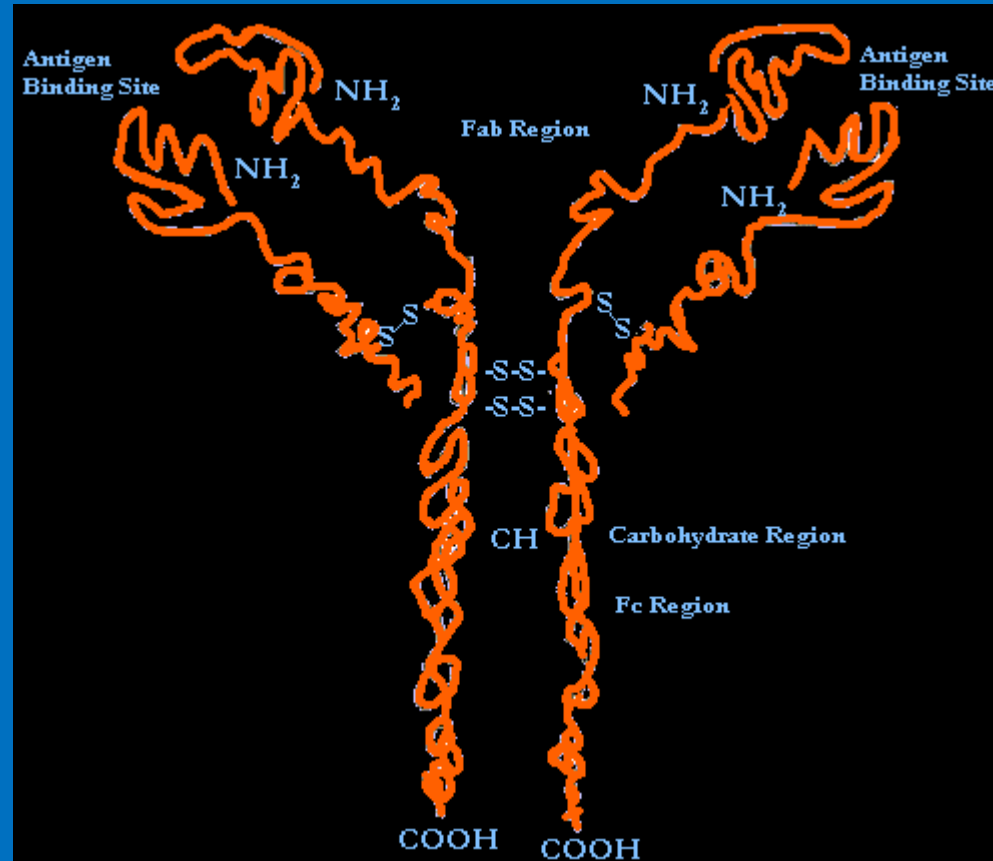
División al azar: Anticuerpos y el sistema inmune

- El sistema inmune detecta invasores previamente detectados. La vacunación le confiere “memoria” al sistema.
- Los anticuerpos son los primeros sensores del sistema de detección del sistema inmune.

División al azar: Anticuerpos y el sistema inmune

- Los anticuerpos tienen secuencias sensoras “aleatorias” en sus regiones variables y las “regiones de enlace” se encuentran repartidas en forma aleatoria debido al mecanismo de “repartición” de los exones durante el ensamble de los anticuerpos.
- El anticuerpo que presenta un evento de enlace positivo con el antígeno desencadena una cascada de señales en la células haciendo que estas sean clonadas rápidamente

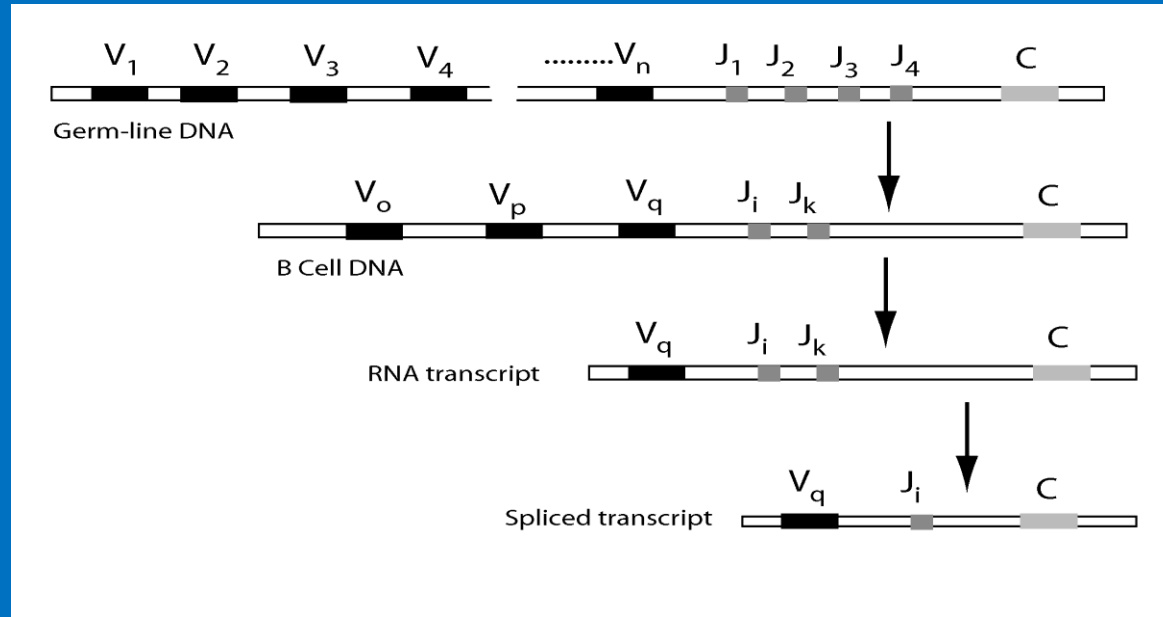
Estructura de Anticuerpos



$$K_A = \frac{[\text{Ab-Ag}]}{[\text{Ab}][\text{Ag}]}$$

Ab=Antibody, Ag=Antigen

Ensamble de anticuerpos



- Anticuerpos poseen secuencias sensoras “aleatorias” en sus regiones variables y las “regiones de enlace” se encuentran repartidas en forma aleatoria debido al mecanismo de “repartición” de los exones durante el ensamble de los anticuerpos.

Reconocimiento de patógenos en macrófagos

