

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A. C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Medición de la procesividad de la cinesina-1
DmK401 mediante videomicroscopía**

Tesis que presenta

Bióloga Mónica Buendía Padilla

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

San Luis Potosí, S.L.P., enero de 2016



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **“Medición de la procesividad de la cinesina-1 DmK401 mediante videomicroscopía”** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mónica Buendía Padilla** y aprobada el quince de diciembre del dos mil quince por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Director de la tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biofísica y Pinzas Ópticas de la División de Materiales Avanzados y en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 299211



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 141 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de enero del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mónica Buendía Padilla

sobre la Tesis intitulada:

Medición de la procesividad de la cinesina-1 DmK401 mediante videomicroscopía

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

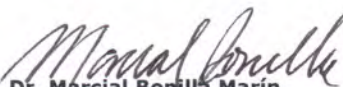
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:24 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de enero de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



a mi familia con cariño

Mamá y Papá

*Carla, Daniel, mi Rodolfito, Fabiola, Xóchitl, mis Tías Claudia,
Gloria, Lupita, Margarita y Rosita, mis primas Alejandrina, Andrea,
Rebeca y Valeria, a mis sobrinitos y los que están en la pancita*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Gutiérrez Medina, por haberme aceptado en su laboratorio, el tiempo dedicado, así como, por las sugerencias para este escrito.

A mis compañeros del Laboratorio de Pinzas Ópticas: Gamaliel, Manuel, Miguel, Mónica Noemí, Noemí, Paola, así como también, a los veranitos Migue y Samperito. Gracias a todos ustedes por los momentos compartidos, por la ayuda, por los comentarios...

Gracias Dra. Mónica N. Jiménez García por compartir conmigo tu gusto por la cinesina, por el apoyo en el análisis de datos y por tus sugerencias para este escrito.

Gracias Paola García Beltrán por enseñarme la purificación de proteínas.

A Noemí Hernández por instruirme en el uso de la pinza óptica, así como las sugerencias a lo largo de este trabajo.

A mi comité tutorial: el Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, el Dr. J. Sergio Casas Flores y el Dr. Samuel Lara González, por haber leído este escrito así como por sus comentarios.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello por haberme permitido el acceso al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por prestarme el equipo del laboratorio. Gracias al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, especialmente al Biól. Salvador Ambríz Granados, la Sra. Rosita y a mi compañero Aarón Ávalos por el apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Lina Riego Ruiz por su amable asesoría para los trámites de titulación.

Al Laboratorio de Nuevos Materiales por permitirme utilizar el baño ultrasónico. Blanquita, Claudia y Silvia por alegrarme los días, simplemente geniales.

Gracias Ana Karenina, Irma, Pao, Sol por hacer de mi estancia en San Luis bastante divertida, por estar conmigo en todo momento.

A todo el personal del IPICYT por sus atenciones, especialmente a los vigilantes Alejandro Téllez, Bernardo, Gerardo Galván, José Manuel Hernández, Plácido Hernández, Bernardo y Gerardo; a la sra. Teresita por las atenciones durante el tiempo que nos ayudó en el lab; a Laurita E. Sánchez por las requisiciones; a Sandra G. Torres; a Gloria López.

Finalmente a mi familia, que siempre está a mi lado.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Microtúbulos: Estructura de los filamentos esenciales para la cinesina	2
1.2 Cinesina: Estructura del motor molecular más pequeño	5
1.3 Dinámica de la cinesina: Estudios de molécula única	7
1.3.1 Pinzas ópticas: Estudio de la dinámica de la cinesina con luz láser	7
1.3.2 Procesividad y ciclo mecanoquímico de la cinesina	14
1.4 Transporte de un cargamento por más de una molécula de cinesina	16
2. Resultados y discusión	20
2.1 Purificación de la cinesina-1 DmK401	20
2.2 Número de moléculas de cinesina por microesfera mediante aproximación estadística	22
2.3 La procesividad de la cinesina-1 DmK401 es de 500 nm	29
2.4 Los cargamentos transportados por más de una molécula de cinesina-1 DmK401 recorren más de 8 μm	35
2.5 La velocidad de la cinesina-1 DmK401 es de $650 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	37
3. Materiales y métodos	43
3.1 Expresión y purificación de la cinesina-1 recombinante DmK401	43
3.2 Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
3.3 Recubrimiento de esferas con anticuerpo 5xHis biotinilado	45
3.4 Recubrimiento de las esferas-anticuerpo con cinesina	45
3.5 Funcionalización de vidrios con poli-L-lisina	47
3.6 Polimerización y estabilización de MTs	49
3.7 Preparación de cámaras de flujo para ensayos de motilidad	49
3.8 Videos y análisis de trayectorias	51
4. Referencias	52
5. Anexos	56
5.1 Trabajo adicional: Condiciones preliminares para estudiar el transporte efectuado por la cinesina en una red de MTs	57
5.1.1 Microtúbulos en microcámaras de flujo de 20 μm de alto: el reto de fluir	57

5.1.2 Microtúbulos en microcámaras de flujo de 8 μm de alto	60
5.1.3 El transporte dirigido dentro de una red de MTs no es común. Microcámaras de flujo de 8 μm de alto	68
5.2 Preparación de reactivos de uso común	71
5.3 Referencias de Anexos	73

Lista de tablas

- | | |
|--|----|
| 1. Fracción de esferas con movimiento dirigido en función de la concentración relativa de cinesina | 28 |
| 2. Recubrimiento de las esferas-anticuerpo con cinesina | 46 |

Lista de figuras

1. Estructura de los MTs	4
2. Estructura de la cinesina-1	6
3. Estructura cristalina de un dímero de cinesina trunca	6
4. Dibujo de una pinza óptica	9
5. Mecanismo de desplazamiento de una molécula de cinesina sobre un MT	10
6. Representación de un ensayo de motilidad de la cinesina con pinzas ópticas	12
7. Transporte de un cargamento por dos moléculas de cinesina	18
8. Gel SDS-PAGE de las fracciones de elución de la cinesina-1 DmK401	21
9. MTs observados con microscopía de campo claro más procesamiento de imágenes	23
10. Movimiento dirigido de una esfera atrapada con pinzas ópticas	25
11. Fracción de esferas con movimiento dirigido, p_m , en función de la concentración relativa de cinesina	27
12. Decaimiento exponencial de las longitudes de corrida de moléculas individuales de cinesina DmK401	32
13. Probabilidad acumulada de las longitudes de corrida de moléculas individuales de cinesina DmK401	32
14. Histograma de las longitudes de corrida de una o más moléculas de cinesina-1 DmK401	36
15. Probabilidad acumulada de las longitudes de corrida cuando hay más de una molécula de cinesina DmK401 por esfera	36
16. La unión de las moléculas de cinesina en la superficie de una esfera es aleatoria	38
17. Velocidades de los cargamentos transportados por una o más	

moléculas de cinesina-1	38
18. Distancias recorridas por los cargamentos cuando son transportados por una o dos moléculas de cinesina-1 DmK401	40
19. Fotos del procedimiento de purificación de la cinesina	44
20. Preparación de las diluciones seriadas de cinesina	46
21. Tratamiento de los cubreobjetos con el limpiador de plasma	48
22. Fotos de la preparación de una muestra en una cámara de flujo	50

Anexos

IS1. Dibujo de los elementos que permiten la unión esfera-cinesina y tratamiento de la superficie para un ensayo de motilidad	56
IS2. MTs en cámaras de flujo de 20 μm de alto	59
IS3. Preparación de una red de MTs con esferas-cinesina para fluir en microcámaras en un solo paso	61
IS4. Representación de una red de MTs en la que ocurre difusión y transporte dirigido de las esferas por el motor cinesina	61
IS5. Representación de la distribución de los MTs a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto	63
IS6. Distribución de los MTs a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto	63
IS7. Representación de la distribución de MTs y esferas a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto	64
IS8. Distribución de los MTs y las esferas a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto	64
IS9. Red de MTs con esferas-cinesina en un microcámara de 8 μm de alto sin poli-L-lisina	66
IS10. Red de MTs con esferas-cinesina en un microcámara de 8 μm de alto	67
IS11. Movimiento de las esferas dentro de una red de MTs	67
IS12. Arreglo para la visualización de muestras en microcámaras hechas a partir de 2 cubreobjetos	70
IS13. Comparación de la superficie de un portaobjetos con la de un cubreobjetos	70

Abreviaturas

≈	Aproximadamente
aa	Aminoácidos
ATP	Nucleótido adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
Fig.	Figura
F	Fuerza
h	Horas
kDa	Kilodaltons
μm	Micrómetros
min	Minutos
MTs	Microtúbulos
nm	Nanómetros
pN	Piconewtons
s	Segundos
t.a.	Temperatura ambiente

Glosario

Cámara de flujo (Fig. 22). Espacio en el que se hace y/o coloca la muestra para su observación en el microscopio. Una cámara se construye con un cubreobjetos y un portaobjetos unidos mediante dos pedazos de cinta doble cara separados ≈ 2 mm entre sí. La separación entre los pedazos de cinta determina el ancho de la cámara, la separación entre los dos vidrios por el grueso de la cinta determina la altura de la cámara y el largo de la cámara es el ancho del portaobjetos (2.5 cm). Una cámara tiene dos entradas, por una se introduce el volumen de líquido (entra por capilaridad) y por el otro extremo se retira, por lo que debido al recambio hay un flujo. Nunca se deja secar.

Carga. Fuerza externa que se opone al movimiento del motor biológico. En este caso se refiere a la fuerza que la pinza óptica ejerce sobre la esfera atrapada, a la cual está unida el motor. La fuerza de la pinza es contraria en dirección a la fuerza ejercida por el motor, por lo que, para avanzar, la cinesina tiene que ejercer una fuerza de igual o mayor magnitud a la de la pinza.

Cargamento. Cualquier organelo o complejo molecular transportado por al menos una molécula de cinesina. Ejemplos de cargamentos celulares son el endosoma y el lisosoma. El diámetro de un endosoma temprano es ≈ 200 nm [6], el de un lisosoma es ≈ 600 nm [5].

In vitro, es común utilizar esferas de poliestireno individuales (cientos de nm de diámetro) como cargamentos, a los cuales, debido a su tamaño, también las referiremos como microesferas.

Corrida (Figs. 9B, 10). Evento en que la cinesina reconoce un MT y transporta su cargamento desplazándose a pasos sobre éste. Termina cuando la cinesina se disocia completamente del MT. Es un evento de transporte dirigido. La corrida puede ser sin o con una carga (cargamento sujetado con pinzas ópticas).

Dieléctrico. Material aislante (no conductor) que contiene moléculas polares, las cuales tienen orientaciones aleatorias en ausencia de un campo eléctrico. Al aplicar un campo eléctrico (en el caso de la pinza óptica, el campo eléctrico asociado a la luz) las moléculas cambian su orientación, las cargas iguales se orientan hacia la misma dirección formándose un dipolo conformado de dipolos individuales. Un ejemplo de este material es el poliestireno que constituye las microesferas que empleamos en este trabajo.

Ensayo de motilidad con pinzas ópticas. Es una técnica de molécula única que permite conocer ciertas características acerca de la dinámica de las proteínas motoras. Es necesario tener: MTs o filamentos de actina unidos a un cubreobjetos, microesferas recubiertas con una o más moléculas motoras y unas pinzas ópticas para manipular las esferas y, según sea el caso, hacer mediciones.

Fuerza de paro. Fuerza máxima que un motor molecular puede ejercer. Para la cinesina es de $\approx 5-7$ pN

Longitud de corrida. Distancia (μm) recorrida por un motor molecular en una corrida.

Motor molecular. Proteína o complejo de proteínas que convierten la energía liberada de ciclos repetidos de hidrólisis de ATP o gradientes de iones en energía mecánica. Existen motores moleculares lineales y rotatorios.

La cinesina, dineína y miosina se consideran motores lineales porque se mueven en pasos discretos en una dimensión (nm), a lo largo de los MTs y filamentos de actina (requieren de ATP). En cambio, los motores F_1 y F_0 que conforman a la ATP sintasa son ejemplos de motores que rotan en pasos discretos (grados), estos están conectados mediante un estator, por lo que si F_1 rota F_0 también lo hará, y viceversa. El movimiento de rotación de la ATP sintasa es impulsado por un gradiente de H^+ (rotación de 30° del dominio F_0 anclado a membrana) o por la energía liberada por la hidrólisis del ATP

(rotación de 120° del dominio F_1 soluble) para girar en dirección contraria [44, 45].

Pinza óptica (o trampa óptica). Haz de luz láser altamente enfocado (por un objetivo de microscopio de alta apertura numérica, ≥ 1) que puede atrapar micropartículas de material dieléctrico.

Procesividad mecánica. Distancia media recorrida por un motor molecular por encuentro con un MT, refleja el número de pasos efectuados por el motor. Nosotros la referiremos simplemente como procesividad.

Resumen

Medición de la procesividad de la cinesina-1 DmK401 mediante videomicroscopía

La cinesina-1 es una proteína motora que une cargamentos (organelos o complejos moleculares) y los transporta a pasos hacia el extremo más de los microtúbulos, en un proceso que implica ciclos sucesivos de hidrólisis del nucleótido adenosina trifosfato. Una vez que la cinesina tiene un encuentro con un microtúbulo efectúa, en promedio, 100 pasos de 8 nm antes de disociarse por completo. Esta propiedad es conocida como procesividad, y es de ≈ 800 nm para una única molécula de cinesina-1, *in vitro*. Sin embargo, debido a que en las células los cargamentos son transportados por grupos de una a siete proteínas motoras, es importante estudiar el transporte efectuado por más de un motor.

El objetivo del presente trabajo es determinar la procesividad *in vitro* de la cinesina-1 DmK401 cuando hay una o más de una molécula de cinesina transportando el mismo cargamento, mediante el seguimiento del cargamento por videomicroscopía. Como cargamento utilizamos microesferas de poliestireno que incubamos con dos diferentes diluciones de cinesina; así obtenemos de manera controlada una o más de una molécula motora por esfera. Para conocer la procesividad de la cinesina atrapamos esferas individuales con una pinza óptica, las colocamos sobre un microtúbulo y esperamos a que se presente movimiento dirigido. Inmediatamente después del inicio del transporte dirigido obturamos la pinza óptica, permitiendo que el motor se desplace libremente sobre el microtúbulo. Cada uno de estos eventos se registró en un video. Los videos se analizaron en computadora mediante un programa escrito en el software LabVIEW que, mediante el seguimiento automatizado de la posición de la esfera, nos proporcionó la distancia recorrida por la cinesina.

La procesividad de una molécula de cinesina-1 DmK401 medida en este trabajo es de 500 nm, la velocidad de $650 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$. Además, observamos que cuando un cargamento tenía más de una cinesina ocurrían eventos en que las distancias recorridas eran $\geq 7 \mu\text{m}$. Conocer esta propiedad es esencial, porque nos permitirá determinar cómo se modifica la longitud de avance cuando la cinesina transporte su cargamento en un contexto más complejo y cercano al celular como, por ejemplo, dentro de una red tridimensional de microtúbulos.

Palabras clave: cinesina, molécula única, motor molecular, microtúbulos, longitud de corrida.

Abstract

Measuring the processivity of kinesin-1 DmK401 using video microscopy

Kinesin-1 is a motor protein that binds and transports cargoes (organelle or molecular complexes) by stepping on microtubules towards the plus end. This process requires successive cycles of adenosine triphosphate hydrolysis. Kinesin takes, on the average, 100 steps of 8 nm per encounter with a microtubule. This property is called processivity and its value is 800 nm for a single kinesin-1 molecule, *in vitro*. However, because in cells cargoes are transported by groups of proteins (ranging from one to seven), it is important to investigate transport by more than one motor.

Our goal is to determine kinesin-1 DmK401 processivity *in vitro*, when one or more than one motor molecule transports the same cargo, by tracking cargoes using video microscopy. As cargo we used polystyrene microbeads that we incubated with two different kinesin dilutions. To measure processivity, we trap individual beads with optical tweezers and bring them in contact with a microtubule, after which we wait for the bead to show directed motion. Immediately after directed movement begins we shutter the laser beam, allowing for free motor stepping on the microtubule without load. Each event was registered in a video. Videos were analyzed with a LabVIEW program that automatically follows the bead position, from where we determine the distance traveled by kinesin.

The measured processivity of single DmK401 molecules is 500 nm, the velocity is $650 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$. When a bead had more than one kinesin molecule we noted cargoes reach distances $\geq 7 \text{ }\mu\text{m}$. Our measurements of DmK401 processivity are essential for us because we want to study cargo transport in a more complex environment, as, for example, in a three-dimensional microtubule network.

Key words: kinesin, single molecule, molecular motor, microtubules, run length

1. Introducción

Dentro de las células eucariotas existe un conjunto de proteínas que forma una red tridimensional altamente dinámica conocida como citoesqueleto. El citoesqueleto organiza el contenido celular, conecta a la célula con su medio extracelular y genera las fuerzas que le permiten a la célula moverse y cambiar de forma [1]. El citoesqueleto está constituido por: filamentos de actina, filamentos intermedios, microtúbulos (MTs) y filamentos de septinas, además de proteínas accesorias asociadas a ellos. De estos cuatro elementos, los filamentos de actina y los MTs constituyen vías por las cuales motores moleculares (proteínas que convierten la energía de ciclos repetidos de hidrólisis de ATP en movimiento) pueden transportar organelos y complejos moleculares (cargamentos) a determinados compartimentos celulares [1, 2].

Existen tres tipos de motores que llevan a cabo el transporte dirigido de cargamentos, estos son: cinesina, dineína y miosina. Tanto la cinesina como la dineína requieren de los MTs para activar su función, mientras que la miosina necesita de los filamentos de actina. Uno de los intereses del Laboratorio de Biofísica y Pinzas Ópticas del IPICYT es el transporte por la cinesina-1 (de aquí en adelante referida simplemente como cinesina) *in vitro*, de la cual se conocen ciertas características en cuanto a estructura y a la dinámica de una única molécula de cinesina transportando un cargamento. Sin embargo, se sabe que en las células los cargamentos son transportados por varias (de una a siete) moléculas motoras, tanto del mismo como de diferente tipo [3, 4]. Específicamente para la cinesina, Shubeita *et al.* (2008) determinaron que el número de moléculas que transportan las gotas lipídicas en embriones de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es de una a dos. Por ello, es importante estudiar el transporte efectuado por más de un motor de cinesina.

En este trabajo nos enfocamos en medir la distancia media recorrida por una o más de una molécula motora de cinesina transportando el mismo cargamento

(microesferas de poliestireno). Conocer esta característica de la cinesina-1 DmK401 (del acrónimo 401 aa de *D. melanogaster kinesin*) es esencial para, posteriormente, determinar cómo la longitud de avance es afectada cuando la cinesina se encuentra en un ambiente más cercano al interior de las células. Uno de estos escenarios es el transporte dentro de una red tridimensional de MTs, donde los propios MTs pueden constituir obstáculos o rutas alternas para las proteínas motoras [5, 6].

En las siguientes secciones se hará una revisión de los elementos necesarios para llevar a cabo nuestros estudios: los MTs y la cinesina, las metodologías asociadas a los ensayos a nivel de molécula única que llevamos a cabo en nuestro laboratorio, así como el trabajo previo de otros laboratorios en el área de transporte debido a más de un motor molecular.

1.1 Microtúbulos: Estructura de los filamentos esenciales para la cinesina

Los microtúbulos (MTs) son estructuras tubulares huecas de ≈ 25 nm de diámetro, que se forman mediante la polimerización de heterodímeros de tubulina- $\alpha\beta$ (Fig. 1). La estructura de las tubulinas α y β son muy parecidas, comparten el 40% de identidad en secuencia de aminoácidos. Cada monómero de tubulina une un nucleótido de guanina (GTP o GDP); sin embargo, la guanina (GTP) unida a la tubulina- α queda protegida por la tubulina- β y no es intercambiable ni es hidrolizada como ocurre con el GTP de la tubulina- β [7].

El monómero de tubulina se puede dividir en tres dominios funcionales: el dominio amino terminal (N-terminal) contiene la región de unión a una guanina, el dominio intermedio de la subunidad β contiene el sitio de unión a un compuesto (taxol) comúnmente utilizado para estabilizar MTs, y el dominio carboxilo terminal (C-terminal) que se encuentra en la superficie de la molécula. Los últimos residuos C-terminales corresponden a la parte hipervariable de la secuencia. Cada

heterodímero de tubulina- $\alpha\beta$ mide $\approx 4.6 \times 8 \times 6.5$ nm de ancho, alto y profundo, respectivamente [7].

Cuando una tubulina- $\alpha\beta$ se añade a un MT en crecimiento, la tubulina- α queda alineada con la tubulina- β del heterodímero previamente unido formando protofilamentos (Fig. 1). En general, los MTs están formados por 13 protofilamentos. De esta manera, un extremo del MT termina en tubulinas- α (extremo menos, -), mientras que el otro extremo termina en tubulinas- β (extremo más, +), es en ese sentido en que se considera que los MTs tienen polaridad intrínseca [8]. En las células, los extremos - de los MTs están anclados al centrosoma o al lado trans del aparato de Golgi [9]. El centrosoma consiste en un par de centriolos (estructuras basadas en MTs) rodeados de proteínas pericentriolares. Entre las proteínas pericentriolares se encuentra la tubulina- γ que nuclea la polimerización formando anillos que actúan como moldes para la formación de un MT [8].

La polaridad estructural de los MTs conlleva a la polaridad en su dinámica; esta propiedad es evidente *in vitro*. Los MTs se pueden preparar en el laboratorio a partir de tan solo tubulina- $\alpha\beta$, cuya concentración en el tubo de reacción debe ser mayor a la concentración crítica ($0.03 \mu\text{M}$), lo que favorece la polimerización de los heterodímeros a 37°C . Los MTs formados *in vitro* tienen ambos extremos expuestos, por lo que es posible observar su polaridad mediante su dinámica: el extremo + crece más rápido que el extremo - [8, 10].

La posibilidad de preparar MTs en el laboratorio ha sido una ventaja para el estudio de los motores asociados a MTs. Los MTs tienen que ser estabilizados contra su despolimerización con el compuesto taxol. El taxol se une a la tubulina- β del lado del lumen del MT. De acuerdo a Alushin *et al.* (2014), cuando el GTP de la tubulina- β es hidrolizado hay un rearrreglo de la tubulina- α que genera una tensión que desestabiliza al MT, por lo que el efecto principal del taxol es restaurar la estructura del MT al estado en el que el GTP no ha sido hidrolizado.

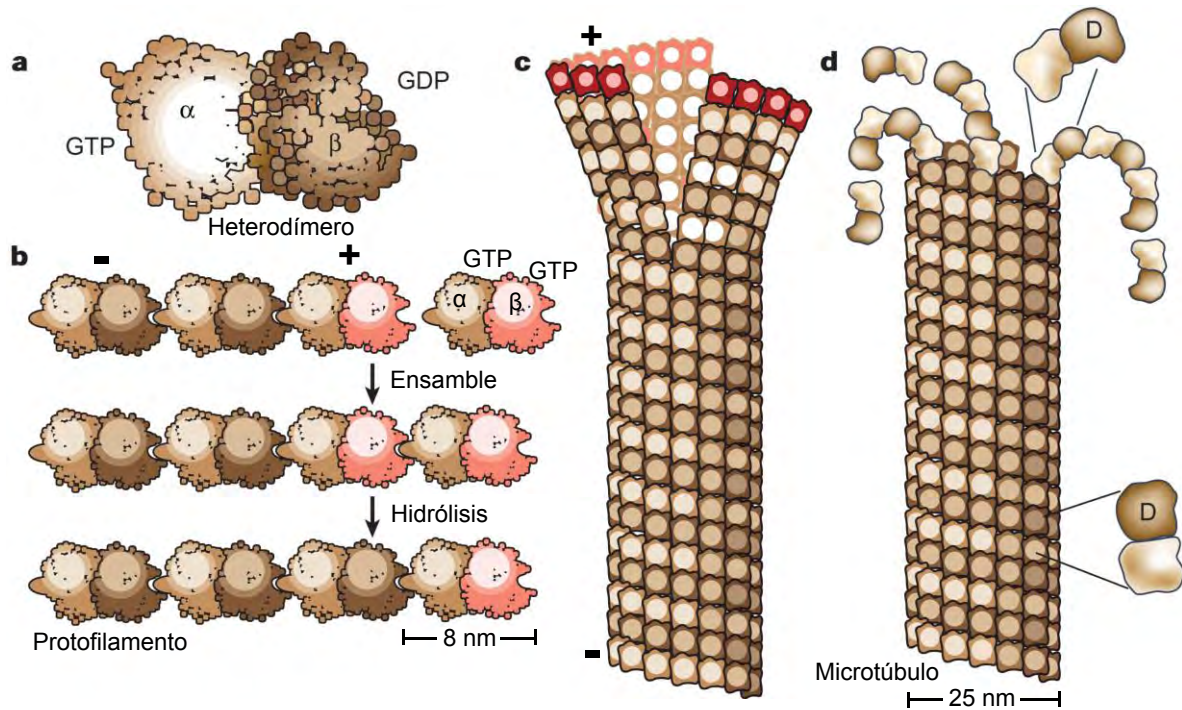


Fig. 1. Estructura de los MTs. a: Un heterodímero de tubulina- $\alpha\beta$. Cada subunidad del heterodímero puede unir una molécula de GTP, el GTP de la subunidad α queda confinado entre ambas subunidades. Sólo el GTP de la subunidad β es hidrolizado. b: Unión de un heterodímero de tubulina- $\alpha\beta$ al extremo de un protofilamento. La subunidad α del heterodímero recientemente añadido propicia la hidrólisis del GTP de la subunidad β del heterodímero adyacente. c: Un MT en crecimiento forma una hoja de protofilamentos que se va cerrando como cremallera. El MT tiene un casquete de GTP conformado como mínimo por un anillo de tubulinas- β del extremo más. En rosa: subunidad β con GTP. d: MT conformado por heterodímeros con el GTP de la tubulina- β hidrolizado. Al despolimerizarse el extremo de un MT, los protofilamentos se curvan al exterior. D: ADP. El heterodímero con GTP tiene una conformación recta que embona con la pared recta del MT, la hidrólisis del GTP induce el encorvamiento del dímero, esta tensión provoca la despolimerización. Imagen modificada de la referencia [8].

Respecto a su mecánica, los MTs son estructuras rígidas, su longitud de persistencia (medida de la flexibilidad de un filamento) es tan grande (≈ 5 mm) que pueden permanecer casi lineales abarcando la longitud de las células, aunque es conocido que bajo fuerzas compresivas forman “bucles” [1]. Tanto la longitud de los MTs como su distribución permiten el transporte de largo alcance de los cargamentos celulares por el motor cinesina.

1.2 Cinesina: Estructura del motor molecular más pequeño

La cinesina-1, cinesina convencional o KIF5 (Fig. 2), es una proteína motora que facilita el transporte unidireccional de cargamentos intracelulares a lo largo de los MTs. La cinesina consiste de un homodímero cuyas cadenas polipeptídicas (cadena pesada: ≈ 110 - 120 kDa de peso molecular, ≈ 1000 aa de extensión) se entrelazan entre sí formando una hélice superenrollada larga (≈ 70 nm) y flexible (tallo) que conecta los dos dominios C-terminales que unen el cargamento (cola) con los dos dominios motores N-terminales idénticos (cabezas) [12, 13]. Cada cabeza (≈ 330 aa) se comunica con el tallo mediante una estructura denominada cuello. El cuello consiste de dos partes: un “cuello conector” de ≈ 15 aa que puede interactuar con el núcleo catalítico y un “cuello superenrollado” de ≈ 30 aa (Fig. 3) [14]. Cada dominio motor tiene un sitio de unión a MTs y otro de unión a un nucleótido de adenosina (ATP o ADP), este dominio es la parte más conservada en la superfamilia de la cinesina [15].

La cinesina se ha encontrado presente en todos los eucariontes a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que utiliza la miosina para la mayor parte del transporte celular. A cada dominio cola de la cinesina se le puede unir una cadena ligera (≈ 60 - 70 kDa), aquí la excepción son los hongos filamentosos en los que la cinesina funciona como homodímero [12, 13, 16]. El transporte por cinesina de ciertos cargamentos es independiente de la cadena ligera, un ejemplo bien conocido es el de las mitocondrias de *D. melanogaster* que reclutan al homodímero mediante proteínas adaptadoras como Miro-Milton [17].

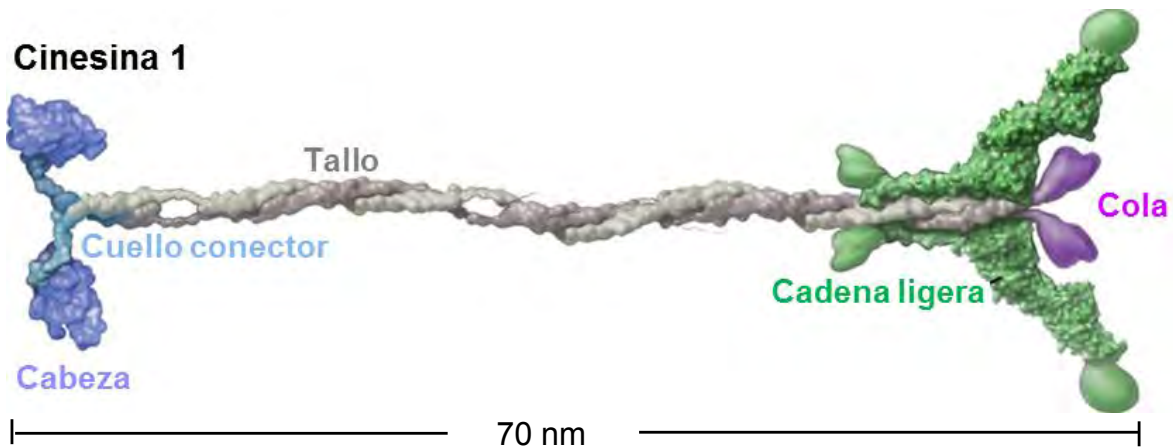


Fig. 2. Estructura de la cinesina 1. La cinesina es un homodímero (dos cadenas pesadas) al que se le pueden unir dos cadenas ligeras (verde). Cada cadena pesada tiene un dominio motor (azul) N-terminal, una hélice superenrollada larga (gris) conformada por dos hélices- α y un dominio cola (magenta) C-terminal. Imagen modificada de la referencia [13].

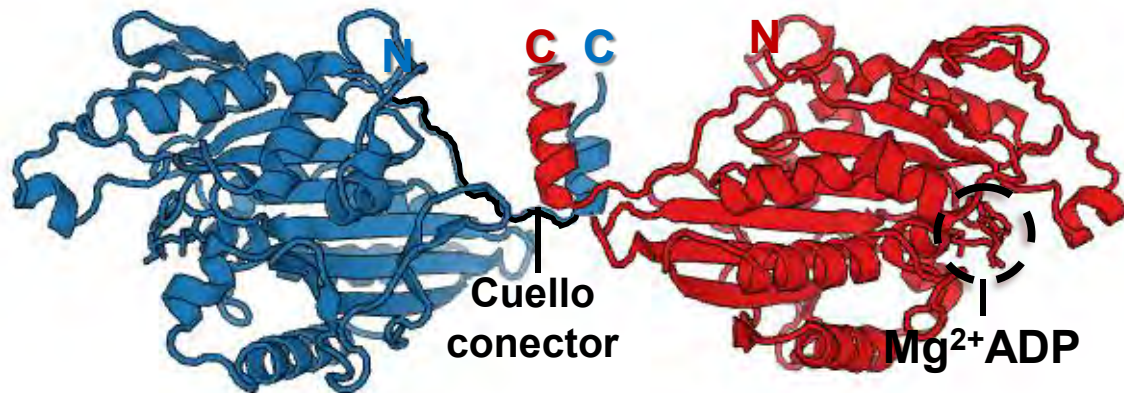


Fig. 3. Estructura cristalina de un dímero de cinesina trunca Resolución: 2.20 Å. Cinesina-1 de *D. melanogaster* con los primeros 381 aa N-terminales, que incluyen el dominio motor (región globular) y el cuello conector (región no estructurada, delineada en negro). Ambos dominios motores son idénticos, cada uno tiene un sitio de unión a MTs y a un nucleótido de adenosina (en este caso $Mg^{2+}ADP$). Tamaño de cada cabeza: $\approx 7 \times 4.5 \times 4.5$ nm. Imagen del Banco de Datos de Proteínas (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) [18].

En estudios de molécula única es común que se utilicen cinesinas truncas (Fig. 3), tal es el caso de la cinesina DmK401 que utilizamos en este trabajo y que será descrita en mayor detalle posteriormente.

1.3 Dinámica de la cinesina: Estudios de molécula única

Para conocer el mecanismo mediante el cual la cinesina se desplaza sobre los MTs, ha sido esencial estudiarla *in vitro* a nivel de molécula única. Los componentes biológicos mínimos para estudiar moléculas de cinesina individuales *in vitro* son: moléculas individuales de cinesina etiquetadas con una microesfera (cuyo diámetro generalmente varía de cientos de nm a 1 μm) o un fluoróforo, MTs y ATP. La etiqueta del motor es importante porque permite la medición de los movimientos de la proteína motora, en el caso de las microesferas también permiten la manipulación del motor. A continuación describiremos una herramienta ampliamente utilizada para lograr la manipulación del motor a través microesferas individuales, herramienta que en este trabajo utilizamos para sujetar una molécula de cinesina y acercarla a un MT.

1.3.1 Pinzas ópticas: Estudio de la dinámica de la cinesina con luz láser

Una de las principales ventajas del uso de microesferas de poliestireno como etiquetas para los motores biológicos, es su fácil identificación (por el tamaño y la cantidad de luz que dispersan) con microscopía de luz convencional. Otra ventaja es que cada esfera puede servir como cargamento para una o más moléculas motoras (Fig. IS1A), sin embargo, más importante es que estas esferas se pueden atrapar para acercarlas a un MT que desencadene el transporte de la esfera por la cinesina (ensayo de motilidad).

La manipulación de microesferas de poliestireno individuales es posible mediante un haz de luz láser altamente enfocado (por un objetivo de microscopio de alta apertura numérica, ≥ 1) conocido como pinza o trampa óptica (Fig. 4), cuyo aporte

más importante a la Biología Molecular es que permite medir las fuerzas ejercidas por moléculas individuales, así como desplazamientos, sin causar daño a las biomoléculas [19].

Para entender cómo funciona una pinza óptica es útil considerar que actúa como un resorte que obedece a la ley de Hooke (Fig. 4). Supongamos que un extremo del resorte permanece anclado a una pared mientras que el otro extremo tiene una esfera, a través de la cual podemos extenderlo o comprimirlo. Cuando no le aplicamos una fuerza al resorte ($F_{\text{externa}} = 0$), éste no ejerce una fuerza de restauración ($F_{\text{resorte}} = 0$) y su longitud no cambia ($x_{\text{esfera}} = 0$, la esfera permanece en una posición de equilibrio).

En cambio, cuando tomamos la esfera del resorte y lo extendemos ($F_{\text{externa}} > 0$) la longitud del resorte aumenta ($x_{\text{esfera}} > 0$) y el resorte ejerce una fuerza de restauración ($F_{\text{resorte}} < 0$) que lo regrese a su posición de equilibrio. La ley de Hooke $F_{\text{resorte}} = -k_{\text{resorte}} * x$ (en donde k es la rigidez de la pinza) establece que la fuerza ejercida por el resorte es proporcional a la distancia que ha sido extendido ($x_{\text{esfera}} > 0$) o comprimido ($x_{\text{esfera}} < 0$). Siguiendo la analogía de que una pinza óptica funciona como un resorte, la pinza puede atrapar esferas cercanas a ella porque “restaura su longitud”, y no existe ninguna fuerza externa contraria que lo impida (Fig. 4). En un par de párrafos retomaremos lo que ocurre cuando la esfera tiene al menos una molécula de cinesina en su superficie.

A través de las trampas ópticas, se determinó que cuando una esfera era transportada por una cinesina siempre era movida sobre los MTs a pasos de 8 nm (Fig. 5), lo que significa que la cinesina avanza a pasos de 8 nm [20]. El tamaño de paso de la cinesina es independiente de si se le aplica una fuerza (medición con pinzas ópticas) o no (medición con videomicroscopía); también, el paso de la cinesina es de 8 nm a diferentes concentraciones del ATP, por lo que es independiente de la concentración del nucleótido. Este tamaño de paso constante,

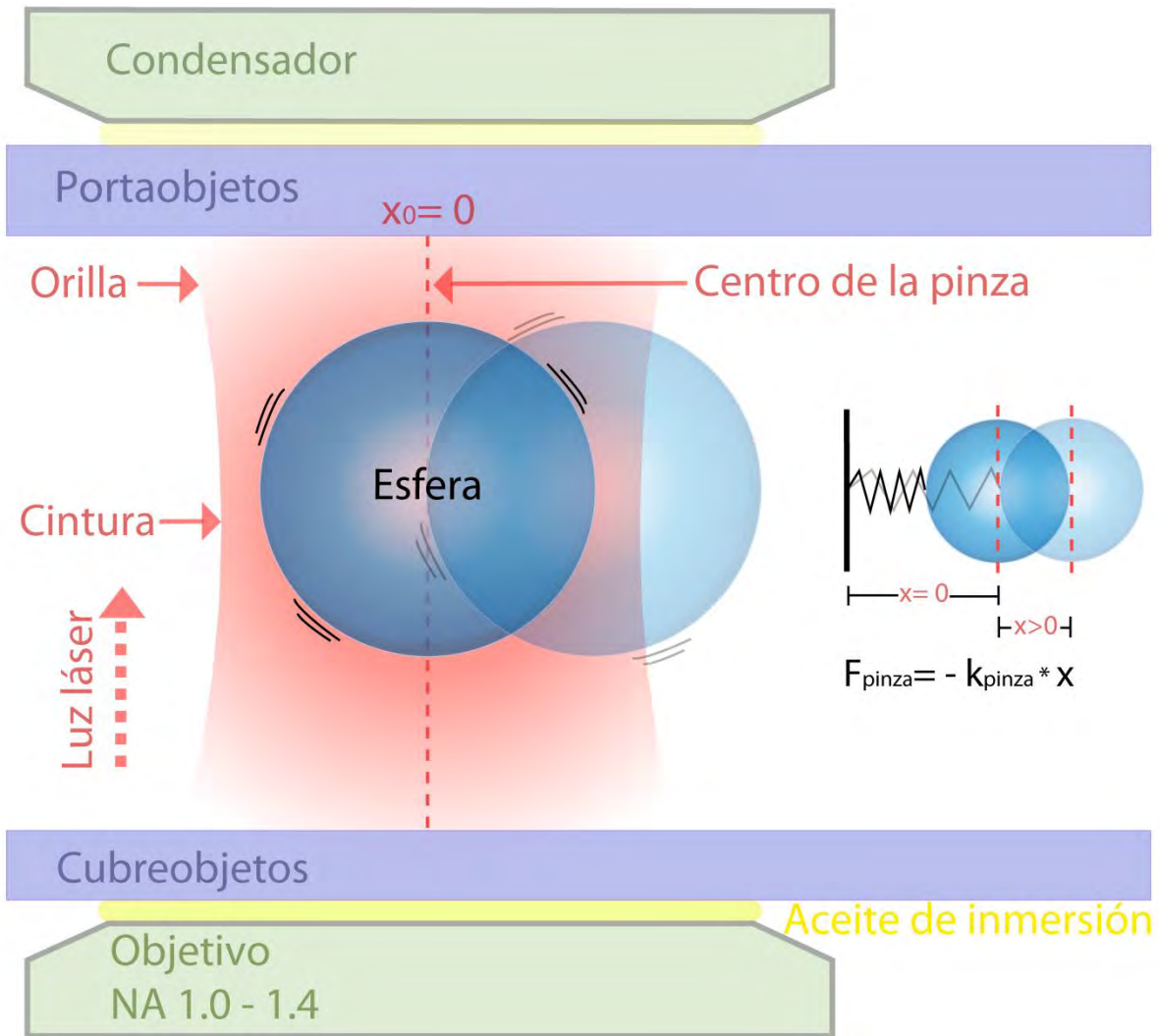


Fig. 4. Dibujo de una pinza óptica. Una pinza óptica consiste en un haz de luz láser (rojo) altamente enfocado por un objetivo de gran apertura numérica. Cuando una micropartícula dieléctrica (esfera de poliestireno) está cerca de la pinza, es atraída al centro de la cintura (región más angosta) del haz de luz láser (región más intensa), ésta es la posición de equilibrio $x_0=0$. La pinza óptica actúa como un resorte que obedece a la ley de Hooke. Si nosotros aplicamos una fuerza para extender o comprimir el resorte, la longitud del resorte aumenta ($x>0$) o disminuye ($x<0$), respectivamente. Al mismo tiempo que aplicamos fuerza para mantener al resorte extendido o comprimido, el resorte ejerce una fuerza de igual magnitud pero contraria en dirección. La ley de Hooke establece que la fuerza ejercida por el resorte es proporcional a la distancia que ha sido extendido ($F<0$) o comprimido ($F>0$). Esta ley es expresada como $F_{\text{resorte}} = -k_{\text{resorte}} * x$ donde F es la fuerza del resorte, k es la constante del resorte (o rigidez, proporcional a la intensidad de la luz) y x es la extensión del resorte. Entonces, $F_{\text{pinza}}(\text{pN}) = -k_{\text{pinza}}(\text{pN/nm}) * x(\text{nm})$. No a escala.

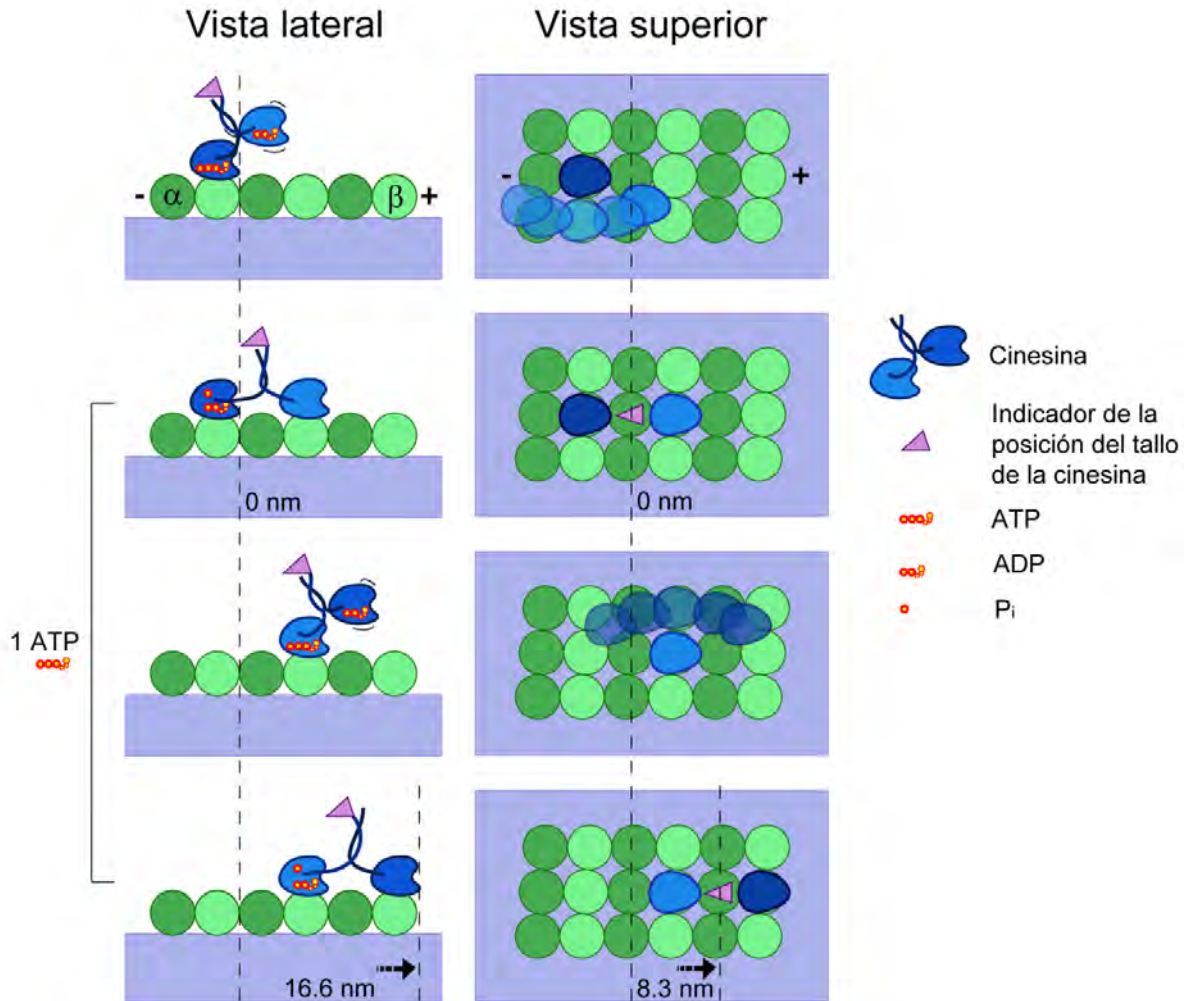


Fig. 5. Mecanismo de desplazamiento de una molécula de cinesina sobre un MT. En el modelo aceptado (llamado de “mano sobre mano asimétrico”), la cinesina se desplaza sobre el MT alternando sus dominios motores (de manera análoga a como camina un bípedo) a pasos de 16 nm. Sin embargo, se dice que la cinesina avanza a pasos de 8 nm porque el tallo (por tanto también el cargamento) avanza ≈ 8 nm. La bandera morada indica la posición y la orientación del tallo. Cada paso requiere la hidrólisis de una molécula de ATP. Cuando ambas cabezas están unidas al MT quedan separadas entre sí por ≈ 8 nm (distancia igual a la que mide un heterodímero de tubulina- $\alpha\beta$). Nota: La figura no está a escala. Basada en las referencias [21, 24].

refleja la existencia de sitios de unión para la cinesina igualmente espaciados en la superficie del MT.

Por otro lado, la concentración del ATP afecta la velocidad con la que el motor lleva a cabo el transporte dirigido [21], pues existe un acoplamiento del ciclo de hidrólisis del ATP con el ciclo mecánico para la producción de un paso. La cinesina requiere de una molécula de ATP por paso (Fig. 5). Es por esto que entre más cantidad de ATP en el medio, más rápida es la unión de un ATP al dominio motor entre cada paso y más veloz es el motor. En este sentido, la hidrólisis del ATP por la cinesina sigue una cinética de Michaelis-Menten, con una $K_M \approx 70 \mu\text{M}$ [22].

Como mencionamos, las pinzas ópticas pueden medir las fuerzas ejercidas por moléculas individuales, pero a la vez también aplican fuerza, la necesaria para mantener atrapada a una microesfera decorada con la proteína de interés (nótese que hablamos de dos fuerzas). Las fuerzas que una pinza óptica puede medir son realmente pequeñas (del orden de 10^{-12} N o pN), la fuerza de paro (fuerza máxima que una molécula motora puede ejercer) de una molécula de cinesina es de 5-7 pN (Fig. 6). La fuerza de la pinza óptica (contraria a la fuerza de la cinesina) afecta tanto la velocidad como la distancia recorrida por el motor sobre un MT: la cinesina recorre menos distancia cuando el movimiento de su cargamento es obstaculizado [23].

Retomando la analogía de que una pinza óptica funciona como un resorte, si la fuerza de restauración del resorte (pinza óptica) es de igual magnitud que la fuerza externa (de la cinesina) pero contraria en dirección ($-F_{\text{pinza}} = +F_{\text{cinesina}}$ o $+F_{\text{pinza}} = -F_{\text{cinesina}}$), a medida que una molécula de cinesina jala ($F_{\text{externa}} > 0$) su cargamento (esfera), lo van alejando de la posición de equilibrio “extendiendo así al resorte” ($x_{\text{esfera-cinesina}} > 0$), entre más lo “extiende” más fuerza ejerce la cinesina. La cinesina detiene su movimiento dirigido cuando alcanza 5-7 pN (Fig. 6). Esta fuerza se

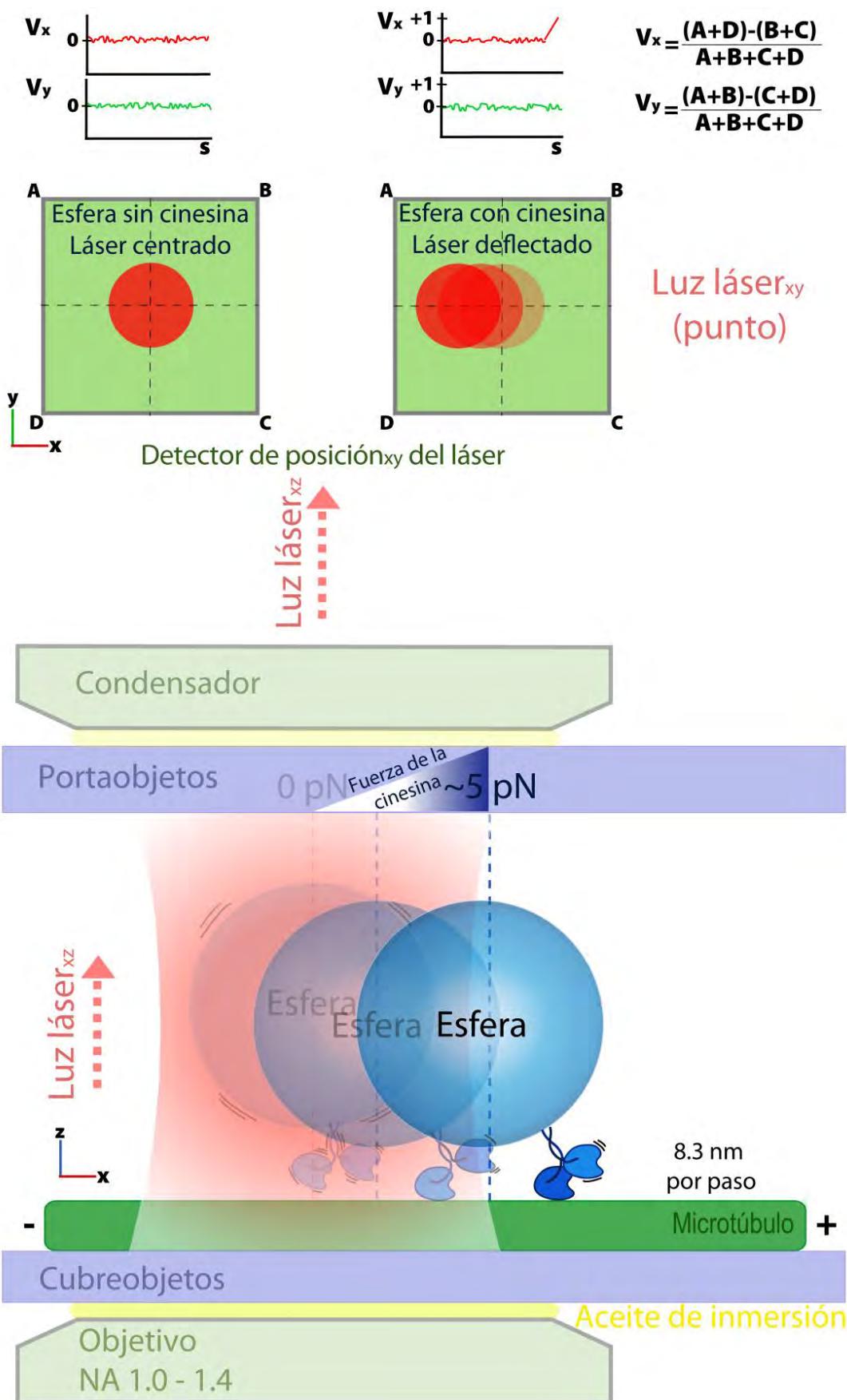


Fig. 6. Representación de un ensayo de motilidad de la cinesina con pinzas ópticas.

Conforme la cinesina jala a la esfera (cargamento) la aleja del centro de la pinza (definido como el eje de simetría del haz láser) y aumenta la fuerza que el motor tiene que ejercer para mantenerse y seguir avanzando, la fuerza de paro de la cinesina es de 5-7 pN. El movimiento de la esfera por la cinesina (movimiento dirigido) es distinguible con su observación al microscopio, no obstante, se confirma mediante la señal (cambio en el nivel de voltios) que proporciona un fotodetector de la posición del láser. Cuando una esfera permanece atrapada en el centro de la pinza (no tiene ninguna molécula motora o ésta no ha tenido contacto con el MT), el haz láser que atraviesa a la esfera emerge sin cambio de dirección e incide como un punto justo en el centro del área de un fotodetector (previamente centrado). Cuando el láser incide en el centro del fotodetector, éste da una señal de 0 voltios por $V_x = V_y = [(A+D)-(B+C)] / [A+B+C+D] = [(0.5-0.5) / (1)] = 0$ voltios. Cuando la esfera tiene al menos una molécula de cinesina el motor la jala hacia la orilla del láser, el cambio de posición de la esfera con respecto a su posición de equilibrio (centro de la pinza) cambia la dirección del haz láser, el cual incide en una posición diferente del centro del fotodetector con lo que V_x o $V_y \neq 0$. La dirección (x o y) en la que el láser es desviado por la esfera depende de si el MT está a lo largo del eje x o y. Cuando el MT está perfectamente alineado en el eje x (como en este dibujo), la cinesina cambia la posición de la esfera en el eje x, con lo que la posición del punto láser cambia en x, el nivel de voltios cambia en x ($V_x \neq 0$) pero no en y ($V_y = 0$). La señal del fotodetector puede ser positiva ($V_x > 0$) o negativa ($V_x < 0$) dependiendo de la dirección (tiene que ver con la polaridad del MT) hacia la cual es transportada la esfera y el láser es deflectado. La fig. 10B muestra un ejemplo de la señal dada por el fotodetector. El dibujo no está a escala.

puede determinar porque se conoce la k_{pinza} y x (distancia que la cinesina alejó a la esfera de la posición de equilibrio).

Otra herramienta ampliamente utilizada en el campo de la biofísica de moléculas individuales es la microscopía de fluorescencia. Al marcar sólo una cabeza del homodímero de la cinesina con un fluoróforo, Yildiz *et al.* (2004) demostraron que cuando una cinesina se desplaza sobre un MT cada cabeza avanza de manera alterna, a pasos de 16 nm, equivalentes a recorrer dos heterodímeros de tubulina-

$\alpha\beta$. Empero, se dice que la cinesina avanza 8 nm porque es la distancia que el tallo, y consecuentemente el cargamento, avanza (20) véase fig. 5.

Como podemos notar, para el estudio de la dinámica de la cinesina es necesario localizar el centro de la etiqueta acoplada al motor. Para ubicar el centro de una partícula o fluoróforo con gran precisión se requiere de la aplicación de algoritmos en la imagen de la etiqueta. Para lograr nuestro objetivo de medir la distancia recorrida por una o más moléculas de cinesina-1 DmK401 transportando la misma microesfera antes de disociarse por completo del MT (procesividad), nosotros capturamos un video por cada evento de transporte. Con la secuencia de imágenes obtenida por video, junto con la aplicación de algoritmos ubicamos el centro de la esfera a diferentes tiempos del transporte, con lo que pudimos obtener la distancia media recorrida por el motor DmK401.

Es importante mencionar que se sabe que la procesividad de la cinesina-1 es de $800 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ (que se traducen en 100 pasos de 8 nm acompañados de 100 ciclos de hidrólisis de ATP) [22], sin embargo, debido a las diferencias estructurales (existen combinaciones de cinesinas-1 truncas, completas, fusionadas a etiquetas, etc.) entre las distintas cinesinas-1 que existen como modelo, existen desviaciones en este número. Por esto, en este trabajo medimos la procesividad de la cinesina-1 DmK401.

1.3.2 Procesividad y ciclo mecanoquímico de la cinesina

El acoplamiento de los eventos químicos (respecto al ciclo de hidrólisis del ATP) y mecánicos (respecto a la producción de un paso) ocurridos durante el desplazamiento de la cinesina ha sido muy estudiado porque es clave para entender su procesividad. ¿Cómo es que la cinesina puede dar en promedio un ciento de pasos? si “no se acuerda” de cuantos pasos “ha dado”. De acuerdo a Telley *et al.* (2009) la probabilidad de que la cinesina se disocie por completo del MT en cada paso es constante e independiente del paso precedente, es de $\sim 1\%$

[26]. ¿Qué determina que la cinesina se disocie completamente del MT? Los detalles apenas empiezan a conocerse, lo que sí es claro es que la procesividad requiere que ambos dominios motores de la cinesina estén fuera de fase en el ciclo de la hidrólisis del ATP y permanezcan en diferentes estados estructurales, lo que aseguraría que en cualquier momento al menos una de las dos cabezas permanezca fuertemente unida al MT, evitando la disociación prematura del motor [21, 27, 28].

Aunque conocer el ciclo mecanoquímico no es el objetivo de este trabajo, brevemente podemos mencionar que cuando la cinesina no está unida a MT alguno cada cabeza tiene unido una molécula de ADP. Cuando una de las cabezas de la cinesina encuentra un MT libera su ADP, en tanto la cabeza libre lo retiene. La cabeza unida al MT une un ATP (Fig. 5), el cual hidroliza. Que tan rápido una cabeza une un ATP, y por tanto la velocidad de la cinesina, depende de la concentración de ATP en el medio [28]. La hidrólisis del ATP y la liberación del fosfato son eventos asociados a una reorientación del cuello conector de la cabeza unida al MT, que acerca a la cabeza libre al siguiente sitio de unión en el MT con la subsecuente liberación de ADP y la repetición del ciclo [21, 28].

Brevemente mencionaremos que, cuando la cinesina tiene una cabeza unida al MT, la cabeza libre fluctúa (difunde) en su posición (impuesta por la conformación del cuello conector de la cinesina). Estas fluctuaciones son “aprovechadas” por la cabeza libre para alcanzar el siguiente sitio de unión en el MT, por lo que los pasos de la cinesina no son tan directos (aunque sí facilitados por el cuello) e incluso el tiempo en que la cinesina da un paso no es constante [22, 23]. En el interior de las células, en el mundo nanométrico, las fluctuaciones térmicas importan para cómo se mueven las cosas y son más importantes entre menor sea el tamaño de la partícula [29, 30].

1.4 Transporte de un cargamento por más de una molécula de cinesina

Existen muchas preguntas acerca del transporte dirigido dentro de las células. Una manera de abordar el problema es aumentando de manera progresiva la complejidad *in vitro*. Ya conocemos algunas características *in vitro* del transporte por una molécula del motor molecular cinesina-1; ¿Qué tal si ahora vemos qué pasa cuando aumentamos el número de motores moleculares del mismo tipo?

Entre los estudios que han investigado el transporte por más de un motor está el del grupo de Steven Gross [31], en el que midieron la distancia recorrida por esferas transportadas por más de una molécula de cinesina (heterotetrámero) de bovino, mediante ensayos de motilidad y videomicroscopía. El número de motores por esfera lo determinaron en un sentido estadístico y midiendo la fuerza de paro del motor, pues de acuerdo a predicciones teóricas la fuerza es aditiva al número de motores moleculares [4]. Acorde a lo reportado para “una molécula de cinesina” la fuerza de paro que obtuvieron fue de ≈ 5 pN, en cambio, la principal fuerza de paro de lo que los autores llamaron “dos motores” fue de ≈ 9 pN (hubo eventos de 5 pN y >13 pN).

Para medir la distancia recorrida por cargamentos transportados por dos cinesinas, una vez que la esfera presentaba movimiento dirigido obturaban el láser permitiendo el libre movimiento de la cinesina con su cargamento (cinesina libre de carga). Con el análisis de los videos, obtuvieron que cuando la esfera era transportada por un motor, la esfera y por tanto la cinesina recorrían $1.46 \mu\text{m}$, pero cuando la esfera era transportada por aproximadamente dos motores hubo un cambio dramático, pues la esfera-cinesinas alcanzaba distancias $>8 \mu\text{m}$. Los autores de este estudio [31] propusieron que tales distancias ($>8 \mu\text{m}$) son posibles debido a que, por un lado, los dos motores unidos al cargamento trabajan en sucesión (un motor está activo mientras que el otro permanece inactivo, luego cambian de rol); por otro lado, ambos motores se disocian y reasocian repetidamente al MT, de manera que siempre hay al menos un motor que une el

cargamento al MT (Fig. 7A). No obstante, este modelo no explica la fuerza de 9 pN para dos motores actuando al mismo tiempo.

Otro estudio acerca del transporte de un mismo cargamento por dos moléculas de cinesina es el de Leduc *et al.* (2007), en el que, a diferencia del anterior, midieron el tamaño de paso cuando dos moléculas de cinesina estaban unidas al mismo cargamento mediante ensayos de deslizamiento de MTs (Fig 7B) con microscopía de fluorescencia de reflexión total interna (TIRF).

Para los ensayos de deslizamiento de MTs, los autores [32] unieron el tallo de moléculas de cinesina-GFP a un cubreobjetos mediante un anticuerpo dirigido contra la etiqueta 5xHis de la cinesina-GFP. Con esta configuración las cabezas de la cinesina quedan libres para “barrer” MTs previamente etiquetados con rodamina. Leduc *et al.* (2007) analizaron el movimiento de los MTs cuya fluorescencia roja se empalmaba con la fluorescencia verde de dos moléculas de cinesina, y determinaron que los MTs movidos por dos cinesinas eran desplazados a pasos de 4 nm (Fig. 7B), la mitad del tamaño de paso de una sola molécula de cinesina. El tamaño de paso de 4 nm por dos moléculas de cinesina descarta que los motores no se sincronizan (mismos movimientos al mismo tiempo), lo que no descarta que se coordinen (mismos movimientos pero fuera de fase).

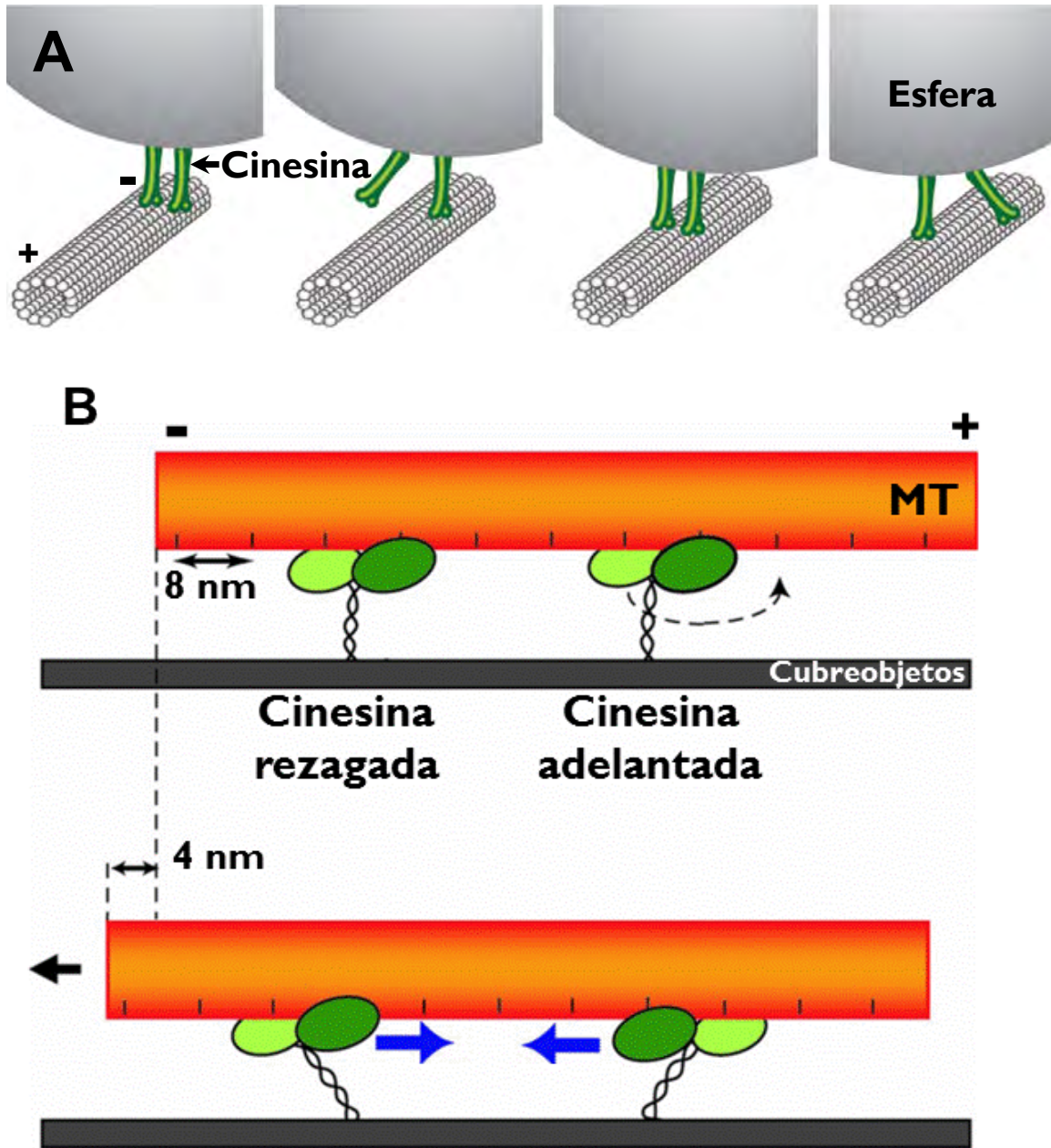


Fig. 7. Transporte de un cargamento por dos moléculas de cinesina. A: Vershinin *et al.* (2007) proponen que dos motores actúan secuencialmente en repetidas ocasiones. **B:** Leduc *et al.* (2007) mediante ensayos de deslizamiento de MTs por dos motores, encontraron que el MT era desplazado a pasos de 4 nm, la mitad del tamaño de paso de una molécula de cinesina.

Debido a que dentro de las células los cargamentos pueden ser transportados por una o más moléculas de cinesina [4], es necesario conocer cómo cambian la distancia y la velocidad de acuerdo al número de motores participando en el transporte. Nuestro objetivo es conocer la procesividad *in vitro* de una o más de una molécula de la cinesina-1 DmK401, mediante el seguimiento del cargamento por videomicroscopía. Una vez determinada la procesividad, podremos estudiar el transporte en un ambiente más cercano al que existe dentro de una célula, en una red tridimensional de MTs donde el transporte por difusión, por motores moleculares, así como la presencia de obstáculos se combinan [5, 6]. Con este propósito buscamos las condiciones para lograr tener una red de MTs con motores de cinesina DmK401 unidas a microesferas de poliestireno.

Para estudiar el transporte por uno o más motores de cinesina necesitamos: 1) expresar y purificar la cinesina recombinante DmK401, 2) encontrar a partir de qué dilución de cinesina hay, en promedio, una molécula de cinesina por esfera, 3) realizar ensayos de motilidad con dos concentraciones de cinesina, 4) obtener videos de esferas desplazadas sobre MTs por la cinesina y 5) analizar los videos para conocer la procesividad de la cinesina-1 DmK401.

2. Resultados y discusión

2.1 Purificación de la cinesina-1 DmK401

Para estudiar el transporte por cinesina es necesario asegurarnos de tener únicamente este tipo de motor asociado a MTs. La expresión de motores moleculares asociados al citoesqueleto en *Escherichia coli* es adecuada, ya que las bacterias no tienen motores moleculares conocidos de este tipo.

En nuestro caso usamos la cinesina de la mosca de la fruta, la cadena pesada de la cinesina-1 nativa de *Drosophila* tiene 975 aa (NCBI Reference Sequence: NP_476590.1). Nosotros utilizamos una versión trunca de *D. melanogaster* con los primeros 401 aa del extremo N-terminal (DmK401) que incluyen al dominio motor, una región que permite que la proteína forme homodímeros y una etiqueta 6xHis C-terminal. Anteriormente, en nuestro laboratorio ya se habían llevado a cabo ensayos con esta cinesina a partir de extracto total, confirmando que daba pasos de 8.2 nm (33), sin embargo, es deseable purificarla. La longitud estimada del tallo de esta cinesina trunca es de ≈ 10 nm, suponiendo una extensión de 0.15 nm por residuo y de acuerdo al número de aa del tallo, ≈ 67 aa [34].

El gel SDS-PAGE de la fig. 8 muestra una banda principal de ≈ 46 kDa (peso correspondiente al monómero de la cadena pesada de la cinesina-1 DmK401) en los carriles correspondientes a las fracciones de elución E1-E4 obtenidas mediante cromatografía de afinidad. Las eluciones 2 (E2) y 3 (E3) contienen más proteína de acuerdo a la intensidad de banda. Tenemos una proteína de ≈ 46 kDa que corresponde a la cinesina-1 DmK401. Una manera de verificar que sí es cinesina y que además es funcional es haciendo ensayos de motilidad de esferas-cinesina con pinzas ópticas; para ello se decidió trabajar con la elución E2.

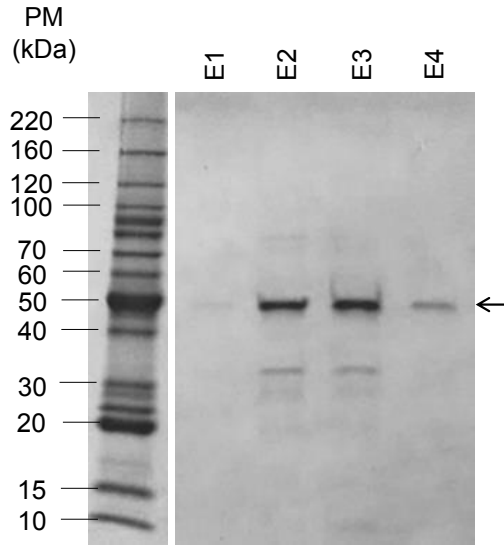


Fig. 8. Gel SDS-PAGE de las fracciones de elución de la cinesina-1 DmK401. PM: pesos moleculares. El gel muestra una banda de ≈ 46 kDa (peso correspondiente a la cadena pesada de la cinesina-1 DmK401) en los carriles de las eluciones E1-E4 (bandas señaladas por la flecha). Los ensayos de motilidad se hicieron con la elución 2 (E2).

2.2 Número de moléculas de cinesina por microesfera mediante aproximación estadística

Para un ensayo de motilidad con pinzas ópticas (Fig. 6) requerimos la proteína motora de interés unida a un cargamento (microesferas), así como los filamentos que la activan y sobre los cuales se desplaza (Fig. IS1). Este ensayo nos indica, entre otras cosas, si la proteína motora purificada es capaz de trasladarse sobre los MTs, lo cual se observa a través del movimiento de la esfera a la cual está unida. Además de indicarnos si la proteína purificada es funcional, este ensayo permite conocer en qué dilución (cuando se prueban varias) de la elución E2 tendríamos, en promedio, una sola molécula del motor por cargamento.

Cabe mencionar que una vez colocada sobre la platina del microscopio (Fig. IS12), la preparación se observa a través de un monitor comunicado a una cámara (el microscopio utilizado no tiene oculares). El microscopio (como la pinza óptica) es controlado por computadora (movimientos del orden de nm en los ejes xyz) y manualmente (movimientos del orden de μm o mm de la platina en xyz). Para este tipo de ensayos necesitamos ver en tiempo real los MTs adheridos al cubreobjetos.

Los MTs tienen un diámetro de ≈ 25 nm, por lo que su visualización mediante microscopía de luz convencional (campo claro) no es común (se emplean modalidades de microscopía tales como fluorescencia, para MTs marcados, o bien contraste por interferencia diferencial, DIC por sus siglas en inglés). Sin embargo, en el Laboratorio de Biofísica y Pinzas Ópticas del IPICYT se cuenta con una metodología de aumento de contraste basada en procesamiento digital de imágenes [33], en donde las imágenes del microscopio son procesadas en tiempo real por computadora. De este modo, se logra observar estos objetos más pequeños que el límite de resolución (≈ 200 nm_{xy}) de la microscopía de luz (Fig. 9A).

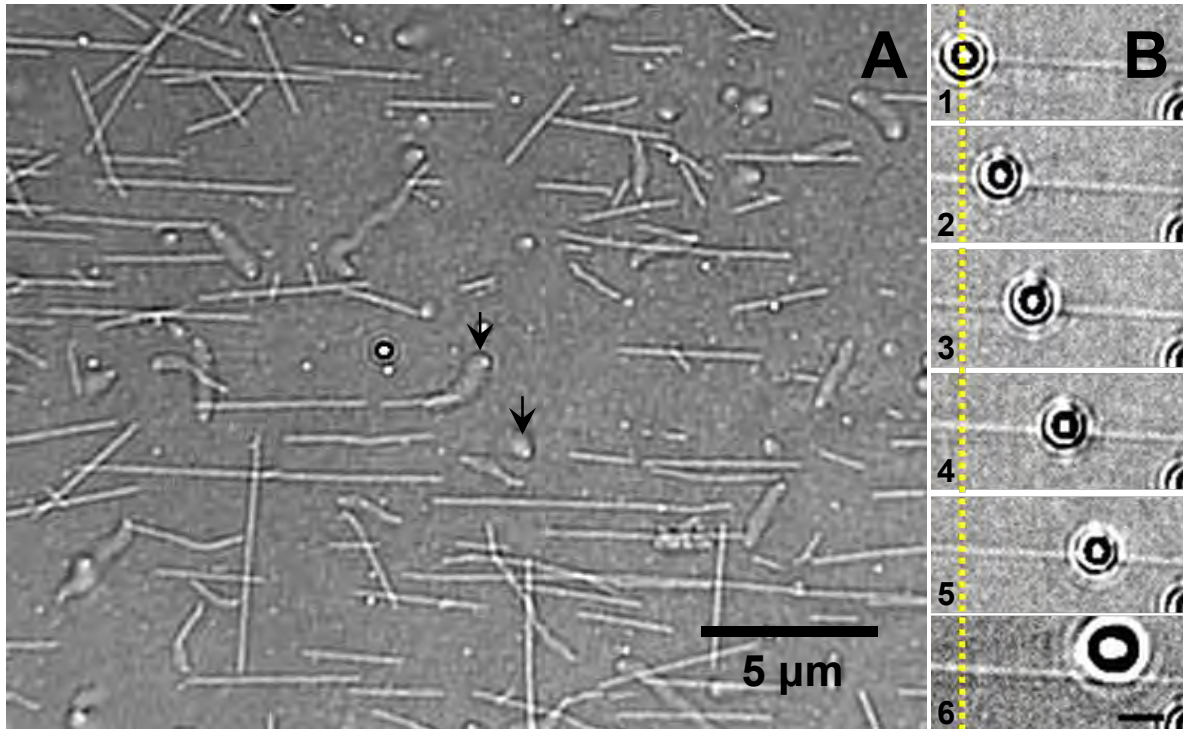


Fig. 9. MTs observados con microscopía de campo claro más procesamiento de imágenes. A: MTs sobre un cubreobjetos. Los MTs se observan como filamentos blancos de longitud variable. Algunos MTs están adheridos al vidrio por un extremo, al encontrarse libres tienen movimiento y se desenfocan (flechas), estos MTs se observan como pequeños puntos borrosos en su periferia asimétricamente. **B:** Secuencia de imágenes de un evento de transporte dirigido (corrida). Mediante pinzas ópticas (láser no visible) se colocó una esfera con cinesina sobre un MT, cuando inició el movimiento dirigido el láser se obturó. Las imágenes muestran cómo la esfera es movida paralela al MT. Nótese que el número y tamaño de los anillos de difracción de la esfera se mantienen constantes hasta que termina la corrida y la esfera difunde (imagen 6 de la secuencia). La línea amarilla indica la posición de inicio de la corrida. Concentración de ATP a saturación [ATP= 1 mM]. Barra 2 μm . Número de imágenes promediadas: 200 (A), 10 (B).

Para determinar a partir de qué dilución de la cinesina DmK401 purificada hay uno o más motores por esfera probamos 5 diluciones seriadas, en donde cada dilución fue de un factor de 3 veces más diluida con respecto a la dilución anterior. Éstas fueron 1:33,000; 1:99,000; 1:297,000; 1:891,000; 1:2,673,000. Cada dilución se incubó con igual cantidad de esferas de poliestireno (cargamento) de 0.44 μm de diámetro. Para conocer el porcentaje o fracción de esferas que presentaban movimiento dirigido (número de esferas que presentaron movimiento dirigido entre el total de esferas probadas) se atrapaba una esfera con las pinzas ópticas y se colocaba sobre un MT (Fig. 10). Se probaron de 20 a 30 esferas por dilución de cinesina, iniciando con la menos concentrada (1:2,673,000). El conteo de esferas tuvo una duración máxima de 2 h por dilución de cinesina, puesto que pasado este tiempo, a temperatura ambiente, la cinesina disminuye su actividad.

En este trabajo, la pinza óptica se utilizó únicamente para atrapar (en tres dimensiones) y acercar cada esfera a un MT y para asegurarnos que la esfera era movida por al menos un motor molecular (Fig.10), mas no para medir fuerzas. Cabe destacar que poder atrapar objetos es una ventaja importante porque a pesar de que hay muchas esferas en la muestra, es poco probable que una cinesina unida a una esfera encuentre un MT adherido al cubreobjetos por pura difusión (de la microesfera) en un tiempo aceptable, en un campo de visión.

Cada esfera atrapada fue colocada sobre un MT hasta 3 min para permitir que los dominios motores de la cinesina tuvieran un encuentro con el MT (a pesar de estar confinada tridimensionalmente, la esfera sigue rotando). El movimiento procesivo es distinguible visualmente (Fig. 10A), no obstante, una manera igual o más confiable de saber si el movimiento es causado por la actividad de la cinesina es observando, al mismo tiempo, la señal que nos da un detector de la posición del láser (Figs. 6, 10B). Esto porque a pesar de que la procesividad de la cinesina es, en general, alta (≈ 800 nm) hay eventos en que recorre un par de cientos de nm, por lo que estos eventos pueden llegar a confundirse con pequeños movimientos causados por aplastamiento de la esfera contra el MT.

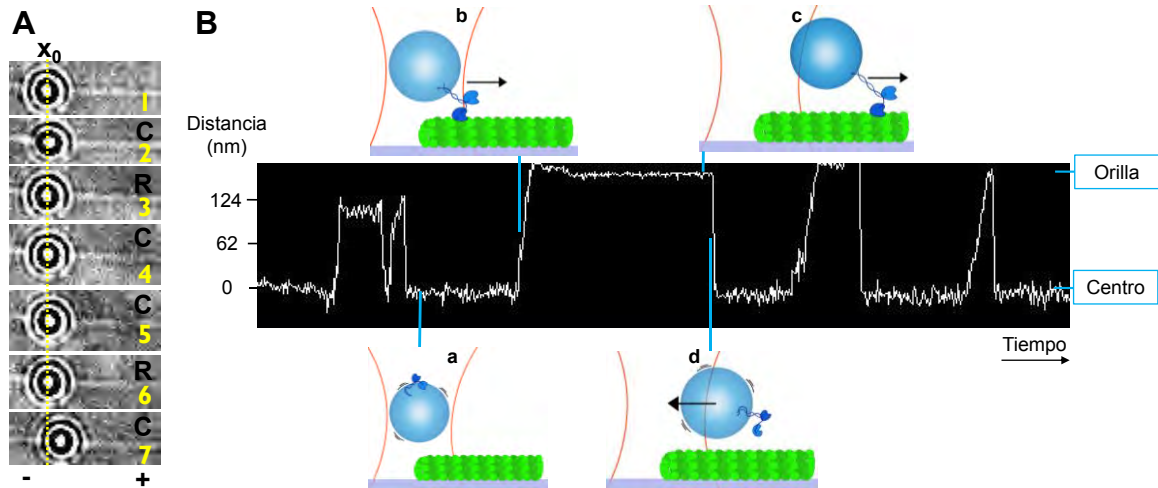


Fig. 10. Movimiento dirigido de una esfera atrapada con pinzas ópticas. **A:** Secuencia de imágenes de una esfera (con cinesina) atrapada con pinzas ópticas (láser no visible), que al ser colocada sobre un MT avanza (C) hacia el extremo más (+) hasta que es regresada (R) al centro de la pinza, empezando otra corrida en la posición inicial x_0 . En esta secuencia se observan 3 corridas; es notable lo poco obvio que puede llegar a ser el movimiento dirigido (avanza ≈ 2 pixeles equivalentes a 200 nm), cuando la distancia recorrida por la esfera es limitada por la fuerza con la que la pinza la atrapa (nótese la diferencia con la secuencia de la figura 9B, en la cual el láser fue obturado), por esto es conveniente ver la señal del detector. **B:** Registro del movimiento dirigido de una esfera y caricatura del movimiento dirigido de una esfera por una molécula de cinesina. Este es un ejemplo real de lo representado en el dibujo de la fig. 6, el fotodetector da una señal de voltios en el tiempo. Sin embargo, mediante una calibración podemos conocer la cantidad de voltios por nm. **a:** la esfera atrapada está confinada tridimensionalmente pero continúa rotando, el voltaje dado por el detector permanece constante. **b:** las cabezas de la cinesina contactan el MT y avanzan hacia el extremo más (+) jalando consigo a la esfera, el voltaje aumenta. **c:** la cinesina avanza hasta que ya no puede ejercer más fuerza y para. **d:** al disociarse la cinesina completamente del MT, la esfera es regresada a la posición inicial por la fuerza de la pinza, el voltaje regresa al nivel basal. En la señal dada por el detector de posición del láser se ven 5 corridas por una misma esfera atrapada. En la caricatura no se representa la deflexión del láser, que es la que causa los cambios en el voltaje. Concentración de ATP a saturación [ATP= 1 mM]. Pinza óptica: líneas curvas rojas. Esfera: círculo azul. MTs: verde.

El detector de posición recibe la luz láser que previamente pasó por la muestra y proporciona como señal de salida un voltaje (Figs. 6, 10B). El valor del voltaje dependerá de la posición del punto de luz sobre el detector [19], por lo que antes de empezar el ensayo debemos centrar el detector (con unos tornillos micrométricos) para que el voltaje sea 0. De esta manera, cuando una esfera está atrapada actúa como un microlente que deja pasar la luz que será recibida por el detector. En caso de que la esfera no tenga ninguna cinesina en su superficie, la esfera permanece atrapada en el centro del láser, no cambia de posición y el punto de luz sigue centrado sobre el detector por lo que no hay un cambio en el voltaje.

Cuando la esfera atrapada tiene al menos una molécula de cinesina, ésta la mueve hacia la orilla del láser (el cual es deflectado), la posición del punto de luz sobre el detector es diferente y el voltaje cambia. El detector da una señal con un registro característico del desplazamiento por motores moleculares sobre el MT y mediante una calibración (volts/nm) nosotros podemos saber cuántos nm fue movida la esfera. En la fig. 10B se muestra un ejemplo de la señal dada por el detector, se muestran cinco corridas en las que la cinesina al avanzar sobre el MT desarrolla una carga (véase Fig. 6), pues su cargamento está atrapado por la pinza. Entiéndase por corrida cada evento en que la cinesina-cargamento encuentra un MT, lo recorre y se disocia completamente de él (una misma esfera puede mostrar n corridas). La corrida de la fig. 9B es un ejemplo de corrida en ausencia de una carga o fuerza externa (láser obturado).

El resultado de los ensayos de motilidad con pinzas ópticas para 5 diluciones de cinesina (Fig. 11 y tabla 1), muestra que entre mayor es la concentración relativa de la proteína motora, mayor es el número de esferas que presentan movimiento dirigido. De acuerdo a Svoboda y Block (1993), si una molécula de cinesina es suficiente para mover una esfera, entonces la fracción de esferas con movimiento dirigido es igual a la probabilidad P (de Poisson) de que una esfera tenga unida una o más cinesinas: $P(x) = 1 - e^{-\lambda[x]}$, en donde $[x]$ es la concentración de cinesina y

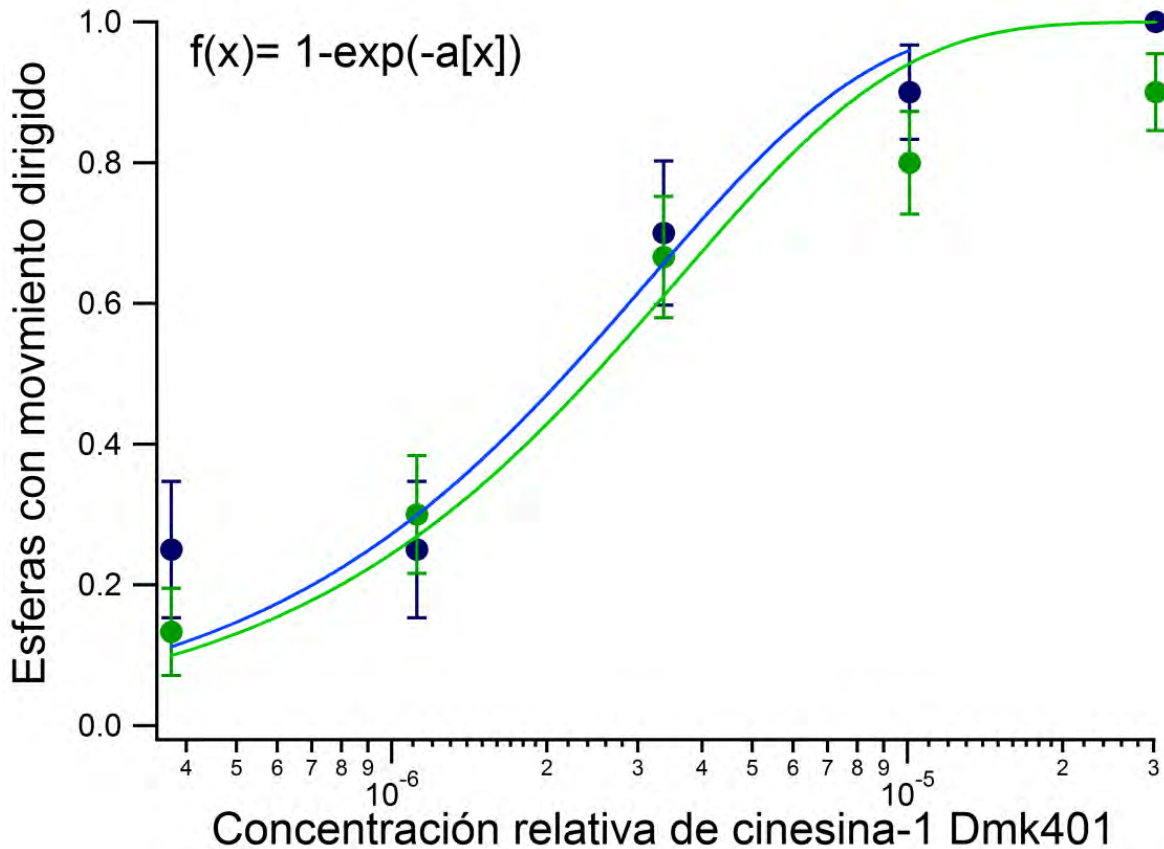


Fig. 11. Fracción de esferas con movimiento dirigido, p_m , en función de la concentración relativa de cinesina. El ajuste está dado por $1 - e^{-\lambda[x]}$, la probabilidad de Poisson de que una o más moléculas de cinesina estén unidas a una esfera. La fracción es el resultado del número esferas que presentaron movimiento dirigido entre el total de esferas probadas. Si las esferas no se incuban con cinesina, ninguna esfera tendrá motores unidos y la $P(0) = 1 - e^{-\lambda[0]} = 0$, por lo que ninguna esfera presenta movimiento dirigido. A medida que aumentamos la cantidad de cinesina aumenta la probabilidad de que una esfera presente movimiento dirigido. Se muestran los resultados de dos ensayos en las mismas condiciones pero independientes. Valores expresados como $p_m \pm (p_m[1 - p_m/n])^{1/2}$ y son el resultado de 20 (puntos azules, $n = 20$) ó 30 esferas probadas (puntos verdes, $n = 30$). $\chi^2 = 3.26$; χ^2 reducida = $\chi^2/3 = 1.09$ indica un buen ajuste a los datos.

Diluciones de cinesina en diferente notación		Fracción de esferas con movimiento dirigido		Esferas pegadas a la superficie	
		n= 20	n= 30	n= 20	n= 30
1:2,673,000	$3.74e^{-07}$	0.25 ± 0.10	0.13 ± 0.06	0	1
1:891,000	$1.12e^{-06}$	0.25 ± 0.10	0.30 ± 0.08	1	1
1:297,000	$3.37e^{-06}$	0.70 ± 0.10	0.67 ± 0.09	2	0
1:99,000	$1.01e^{-05}$	0.90 ± 0.07	0.80 ± 0.07	1	5
1:33,000	$3.03e^{-05}$	1.00 ± 0.00	0.90 ± 0.05	1	9

Tabla 1. Fracción de esferas con movimiento dirigido en función de la concentración relativa de cinesina. Resultados de dos ensayos con n= 20 y n= 30 (Fig. 11). Las esferas que se pegaron a la superficie de la cámara de flujo no se tomaron en cuenta para las curvas. Errores a partir de: $p_m \pm (p_m[1-p_m/n])^{1/2}$ p_m es la fracción de esferas con movimiento dirigido y n es el número de esferas probadas.

λ es un parámetro de ajuste.

Nuestros datos correspondientes a la fracción de esferas con movimiento dirigido en función de la concentración relativa de cinesina sí se ajustaron a la función de Poisson (Fig. 11), lo que indica que el movimiento de las esferas sí es causado por la actividad de al menos una molécula de cinesina.

En nuestro ensayo queremos conocer si, en promedio, una esfera tiene una cinesina o más de una cinesina. Esto lo podemos determinar mediante argumentos estadísticos, aunque no podemos decir exactamente cuántas cinesinas tiene una esfera en particular; es por ello que para medir la procesividad es necesario probar cientos de esferas. Para saber en qué diluciones de cinesina tenemos al menos una molécula motora por esfera, nos fijamos en la concentración relativa de la curva de la fig. 11 (tabla 1) a partir de la cual el porcentaje de esferas con movimiento dirigido fue igual al 50% (0.5 en fracción). Entonces, cuando $P(x) \leq 0.5$ la probabilidad de que una esfera tenga dos o más motores es baja <0.14 [20].

Es posible estimar el número promedio de motores por esfera (en una concentración relativa de cinesina dada) despejando λx de la función de Poisson. Cuando la mitad de las esferas presentan movimiento dirigido $P(x)=0.5$, entonces $1-e^{-\lambda x}=0.5$ despejando $\lambda x=0.69$, tendríamos en promedio 0.69 motores por esfera [35]. De las diluciones que probamos experimentalmente ninguna tuvo una $P(x) \approx 0.5$ pero de acuerdo a la curva (Fig. 11, tabla 1) una concentración relativa intermedia a 1:297,000 ($P(x)=0.7$) y 1:891,000 ($P(x)=0.25$) nos daría ese 0.5, lo cual efectivamente ocurrió cuando hicimos los ensayos de motilidad para medir la procesividad de una cinesina por esfera.

2.3 La procesividad de la cinesina-1 DmK401 es de 500 nm

Para medir la procesividad elegimos trabajar con dos concentraciones relativas de cinesina que correspondieran, en promedio, a uno (1:594,000) y más de un motor (1:198,000) por esfera. El procedimiento experimental para conocer la procesividad es el mismo que el explicado anteriormente, pero además implica la obturación del láser (Fig. 9B) y la toma de videos (6 cuadros por segundo) como se explica a continuación.

Cada esfera atrapada se colocó sobre un MT y se esperó hasta 3 min para saber si presentaba movimiento dirigido. Durante este tiempo movíamos a la esfera distancias pequeñas (decenas a cientos de nm) para centrarla bien sobre el MT y así facilitar el movimiento efectuado por la cinesina. Si la esfera no está bien centrada puede que no se observe el movimiento dirigido o se observen menos corridas por esfera (ejemplo de corridas: Fig. 10B), si después de insistir en un MT no veíamos movimiento dirigido cambiábamos la esfera a otro MT.

Una vez confirmado que la esfera sí tenía cinesina, se esperaba el momento adecuado para obturar digitalmente el láser, lo que automáticamente activaba la toma de video, hasta que el movimiento procesivo de la esfera evidentemente terminaba al disociarse del MT y difundir (cuadro 6 de la fig. 9B). Hubo algunas

ocasiones en que una misma esfera fue utilizada para tomar videos de cuantas corridas fue posible, esto se puede hacer porque la cinesina no tiene memoria de cuánto recorrió la corrida anterior (característica de un proceso de Poisson). No obstante, la mayoría de las veces, al terminar su corrida un poco distante de la pinza, la esfera difundió y rápidamente se alejó de la pinza.

Para confirmar que ambas diluciones tuvieran el porcentaje de esferas con movimiento dirigido por cinesina esperado y que los datos fueran reproducibles y confiables, conforme se fueron tomando los videos, se contó el número esferas con cinesina. Para la concentración relativa 1:594,000 efectivamente el 50% de las esferas presentó movimiento dirigido, para la concentración 1:198,000 fue el 86%. Es importante mencionar que esto va acorde con lo esperado, en la concentración 1:594,000 le corresponden en promedio 0.69 motores a cada esfera por lo que sustituyendo $\lambda[x]$ de $P(x) = 1 - e^{-\lambda[x]}$ tenemos que $P(x) = 1 - e^{-0.69} = 0.5$. En la concentración 1:198,000 le corresponden $0.69 \times 3 = 2.07$ motores por esfera (multiplicado por tres porque está 3 veces menos diluida, 3 veces más cinesina) por lo que sustituyendo $\lambda[x] = 2.07$ en la probabilidad de Poisson tenemos que $P(x) = 1 - e^{-2.07} = 0.87$.

En cada video teníamos la trayectoria de una esfera con movimiento dirigido. Obtuvimos 109 y 108 videos correspondientes a una y dos cinesinas por esfera, respectivamente. Inicialmente teníamos hasta 200 videos, pero varios los descartamos porque el cargamento recorrió menos de 200 nm. Cada trayectoria se analizó con un programa escrito en Labview (National Instruments). El programa hace el seguimiento de la esfera con movimiento dirigido en xy calculando el desplazamiento del centro de masas de la esfera, y proporciona la longitud de corrida (μm).

Por cada paso llevado a cabo por la cinesina, existe una probabilidad constante de que el motor se disocie completamente del MT. Tales procesos resultan en distribuciones de probabilidad con un decaimiento exponencial, por lo que para

observar este decaimiento los datos deben de agruparse y graficarse como un histograma [36]. Con las distancias calculadas por el programa, se hizo un histograma de las longitudes de corrida de los cargamentos con una molécula de cinesina (Fig. 12) que de acuerdo a lo esperado muestra un decaimiento exponencial [25, 37, 38]. Típicamente, la procesividad de la cinesina se obtiene ajustando el histograma de longitudes de corrida a la función del decaimiento exponencial $f(x) = f_0 * e^{(-x/Tau)}$.

No obstante, de acuerdo a Thorn *et al.* (2000) una mejor manera de determinar la procesividad es haciendo un ajuste a una distribución de probabilidad acumulada, $f(x) = 1 - e^{-(x-x_0)/t}$ de x_0 al infinito. La constante de decaimiento t es el único parámetro de ajuste y nos dice la longitud de corrida media de la distribución (procesividad). Este procedimiento ajusta los datos directamente, sin necesidad de agrupar los datos. x_0 es el límite inferior para las corridas incorporadas en el análisis y excluye las corridas más cortas.

Nuestros resultados indican que una molécula de cinesina-1 DmK401 recorre de 0.1 - 6 μm , no obstante, debido a que nuestro método de seguimiento de esferas tiene una precisión de un pixel (100 nm) y para asegurar que el movimiento fue causado por el motor, no consideramos las corridas menores de 200 nm (Fig. 12). Para obtener la procesividad de la cinesina-1 DmK401 nosotros ajustamos los datos a una distribución de probabilidad acumulada (Fig. 13). Para comparar, también ajustamos los datos a un decaimiento exponencial (Fig. 12).

El ajuste del histograma de longitudes de corrida (Fig. 12) a la función de decaimiento exponencial $f(x) = f_0 * e^{(-x/Tau)}$ indica que la procesividad (Tau) de una molécula de cinesina DmK401 es de 474 ± 17 nm. En cambio, el ajuste de los datos a una distribución de probabilidad acumulada $f(x) = 1 - e^{-(x-x_0)/t}$ indica que la procesividad (t) para una molécula de cinesina-1 DmK401 es de 503 ± 5 nm (Fig. 13).

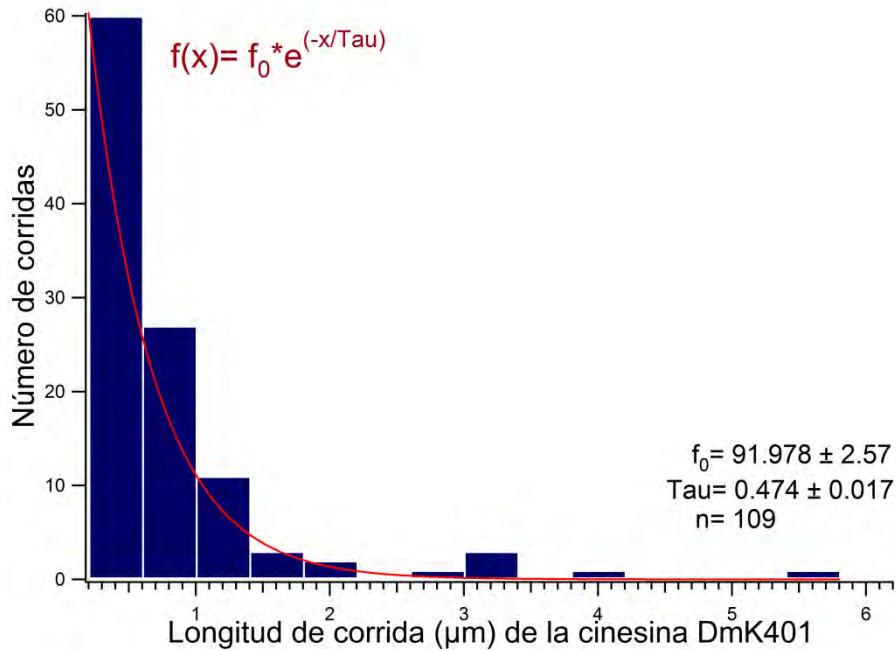


Fig. 12. Decaimiento exponencial de las longitudes de corrida de moléculas individuales de cinesina DmK401. El ajuste (línea roja) a una exponencial de decaimiento proporciona una procesividad de 474 nm. Promedio aritmético: 799 nm

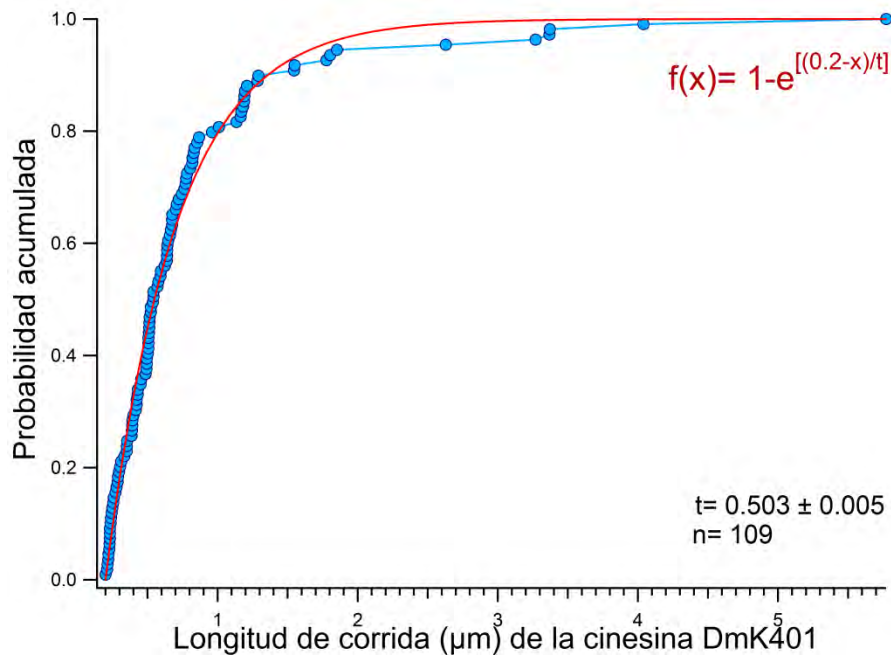


Fig. 13. Probabilidad acumulada de las longitudes de corrida de moléculas individuales de cinesina DmK401. El ajuste (línea roja) a la distribución de probabilidad acumulada proporciona una procesividad de 503 nm. Promedio aritmético: 799 nm

Como se puede notar, para hacer el ajuste a $f(x) = 1 - e^{-(x_0 - x)/t}$ tuvimos que graficar los mismos datos del histograma de la fig. 12 como una distribución de probabilidad acumulada (Fig. 13). Conway y Ross (2014) explican cómo graficar los datos como una distribución de probabilidad acumulada, procedimiento que a continuación describimos. Primero ordenamos los datos en orden ascendente, luego creamos una lista del 1 al N del número de mediciones tomadas, para normalizar la distribución cada número de la lista se dividió entre N (con lo que la corrida más larga obtiene la probabilidad de 1). Finalmente, graficamos las longitudes de corrida ordenadas en el eje x y la lista de 1/N a 1 en el eje y. De esta forma pudimos ajustar a una distribución de probabilidad acumulada $f(x) = 1 - e^{-(x_0 - x)/t}$. Debido a que en este trabajo únicamente tomamos en cuenta las corridas mayores a 200 nm, $x_0 = 0.2$

Nuestros resultados indican que la procesividad de una molécula de cinesina-1 DmK401 es de 503 ± 5 nm. Esta procesividad es menor a la que esperábamos, ≈ 0.8 - 1.2 μm para las cinesinas-1 en general. La procesividad reportada de la versión completa de la cadena pesada de la cinesina-1 de *D. melanogaster* es de 1.3 - 1.5 μm [39]. Existen variantes truncas de esta cinesina (DmK) cuya procesividad ya fue determinada. La DmK401 fusionada con una GFP monomérica más una etiqueta 6xHis tiene una longitud de corrida media de 1.2 μm [25]; la DmK de 559 aa fusionada con una eGFP más una etiqueta 6xHis recorre 1.2 μm por encuentro con un MT [28]; la procesividad de la DmK401 con una etiqueta 6xHis y 87 aa de la proteína portadora de la carboxilo biotina (BCCP) de *E. coli* (la unión esfera-cinesina no es por anticuerpo) es de 1.4 μm [40]. En estos cuatro estudios, los autores determinaron la procesividad ajustando una exponencial de decaimiento a un histograma como el de la fig. 12.

Detalles experimentales de los trabajos citados en el párrafo anterior comunes con los de esta Tesis son los siguientes: se utilizaron esferas del mismo diámetro (0.44 μm) y tubulina del mismo organismo (de bovino, Cytoskeleton), y la obturación del láser fue automatizada. Hesse *et al.* (2013) presentan un histograma en el que

≈50% de las longitudes de corrida son menores a 1 μm y la longitud máxima que reportaron fue de 4.9 μm , esto es parecido a los resultados que obtuvimos (Fig. 12). Sin embargo, ellos determinaron que la procesividad es de 1.4 μm , más del doble que la obtenida por nosotros (503 nm), aunque hay que considerar que esa DmK401 tiene 87 aa extra. Una diferencia que podría ser importante es que los autores de estos artículos incubaron la cinesina con las esferas durante 1 h [40] ó 3 h [28], a diferencia de nosotros que las incubamos durante 12 h, por lo que su cinesina estaba más “fresca” para los ensayos de motilidad.

Nosotros decidimos incubar la cinesina con las esferas durante 12 h a 4°C debido al tiempo que requieren este tipo de ensayos. Tan solo las diluciones de esferas con cinesina las preparamos en ≈2 h; para asegurar la unión de las moléculas de DmK401 a las esferas tendríamos que incubar ≈3 h; a esto añádase la preparación de las soluciones, para obtener la muestra en una cámara de flujo (véase materiales y métodos) lo que mínimo toma 30 min. Una muestra dura máximo 2 h, tiempo de vida de la cinesina a t.a. En el laboratorio, anteriormente se trabajó con la DmK401 incubándola con las esferas durante 12 h, en este trabajo se determinó que el tamaño de paso de esta cinesina es de 8.2 nm [33], lo que está acorde con lo reportado para las cinesinas en general.

Como puede notarse, la procesividad reportada para una molécula de DmK (variantes) obtenida mediante el ajuste a una exponencial de decaimiento es del doble (1.2-1.5 μm) a la aquí obtenida (0.5 μm). No obstante, en los artículos en que los autores obtienen la procesividad de la cinesina ajustando a una distribución de probabilidad acumulada, no obtienen valores tan altos. Algunos ejemplos son: Telley *et al.* (2009), quienes obtuvieron que la procesividad para una cinesina-1 trunca de rata (rKin430) fusionada con una eGFP más una etiqueta 6xHis es de 0.6 μm . Conway y Ross (2014) determinaron de la misma forma la procesividad de la cinesina-1 en 0.7-0.8 μm . Quizás la diferencia en los valores reportados para la procesividad se deba, en parte, al modo en que ésta es

determinada. Esto lo pudimos constatar ajustando los mismos datos a los dos tipos de distribuciones (Figs. 12, 13).

2.4 Los cargamentos transportados por más de una molécula de cinesina-1 DmK401 recorren más de 8 μm

El histograma de las longitudes de corrida de cargamentos con más de una molécula de cinesina (concentración relativa 1:198,000), en promedio, muestra por un lado un decaimiento exponencial, pero por el otro unas cuantas corridas mayores a 7 μm (Fig. 14). Sin tomar en cuenta estas longitudes extraordinarias, el intervalo de las longitudes observadas fue de 0.1 - 5 μm , el mismo que el obtenido para una molécula de cinesina (concentración relativa 1:594,000, fig. 12). Al hacer un ajuste de solo estos datos obtenemos una procesividad de 552 ± 26 nm (ajuste a un decaimiento exponencial, fig. 14) o 546 ± 6 nm (ajuste a una distribución de probabilidad acumulada, fig. 15A). Al ajustar todos los datos a una distribución de probabilidad acumulada la procesividad es de 636 ± 10 nm (Fig. 15B).

En este caso lo que nos importa son los eventos aislados, pues no se tiene una población homogénea. La estimación indica que tenemos, en promedio, dos moléculas de cinesina por esfera para la concentración 1:198,000, sin embargo, no necesariamente implica que éstas cooperen en el transporte. Debemos considerar que la unión de la cinesina a la esfera es resultado de un proceso aleatorio, por lo que nosotros no controlamos la disposición espacial de las moléculas de cinesina en la superficie (Fig. 16). Por lo tanto, podemos argumentar que aunque cada esfera tiene dos cinesinas en promedio, la mayoría de esferas fue movida por una sola cinesina, lo que explica los datos del decaimiento exponencial de la fig. 14. Sin embargo, entre todas las esferas de la muestra hubo algunas ($n= 8$) en las que los dos motores resultaron unidos lo suficientemente cerca uno de otro como para interactuar al mismo tiempo con el microtúbulo y cooperar, de algún modo, en el transporte del cargamento (barra >7 μm de la fig. 14).

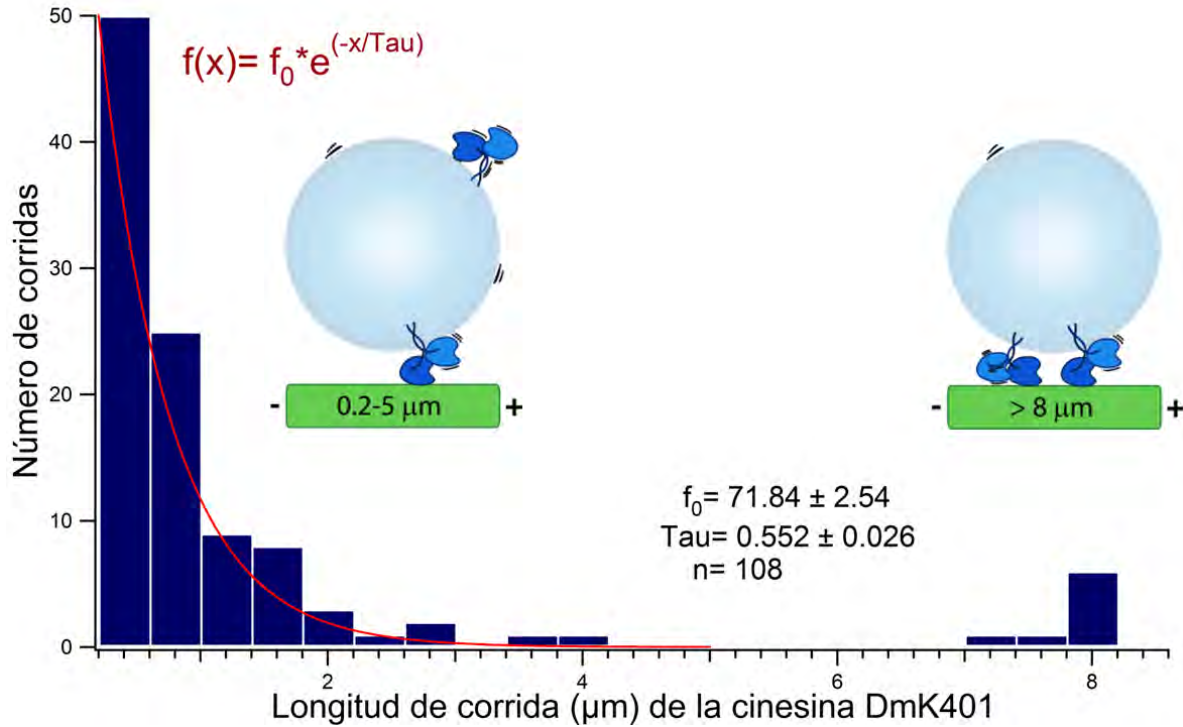


Fig. 14. Histograma de las longitudes de corrida de una o más moléculas de cinesina-1 DmK401 Concentración relativa de cinesina 1:198,000. Las corridas (8) mayores a 7 µm se agruparon en una barra, la cual no se incluyó en el ajuste. Estas corridas fueron de: 7.38, 7.78, 7.93, 7.99, 10.98, 11.74, 21.91, 25.56 µm.

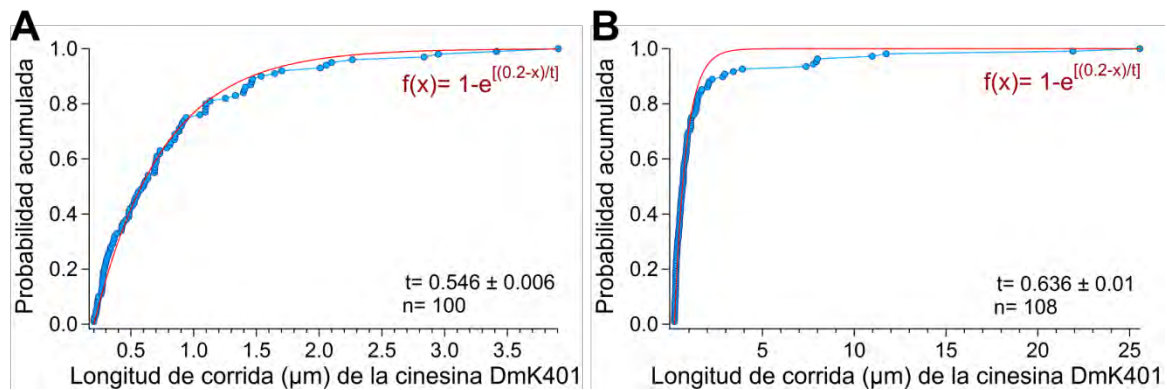


Fig. 15. Probabilidad acumulada de las longitudes de corrida cuando hay más de una molécula de cinesina DmK401 por esfera. Concentración de cinesina 1:198,000. **A:** Cuando solamente se toman en cuenta las corridas mayores a 0.2 µm pero menores a 4 µm, la procesividad es de 546 nm, parecida a la de una cinesina por cargamento, n= 100 **B:** La longitud de corrida corresponde a la constante de decaimiento, t= 636 nm. n= 108 corridas mayores a 0.2 µm.

2.5 La velocidad de la cinesina-1 DmK401 es de $650 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$

Con las distancias recorridas por el cargamento entre cada cuadro (6 cuadros por segundo), determinamos que la velocidad promedio de la cinesina DmK401 es de $600\text{-}650 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 17) para ambas diluciones de cinesina.

Al tomar en cuenta únicamente las velocidades de las corridas $>7 \mu\text{m}$, la velocidad promedio es ligeramente menor ($501 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$), sin embargo, los datos son escasos ($n=8$) como para comparar los promedios de las velocidades de las dos diluciones de cinesina. La velocidad obtenida en este trabajo para una molécula de cinesina DmK401 ($661 \pm 10 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$, fig. 17) en condiciones de saturación de ATP, concuerda con la velocidad reportada para la DmK401 fusionada con 87 aa de la proteína portadora de la carboxilo biotina (BCCP) de *E. coli* [40], que es de $671 \pm 21 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Existen algunos reportes que han estudiado a la cinesina exactamente igual a la que nosotros estudiamos (DmK401-6xHis), no obstante, la procesividad que reportan es bajo una carga (esfera atrapada con pinzas ópticas) por lo que la velocidad se reduce a $230 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ bajo una fuerza de -3.5 pN [41].

En resumen, nosotros encontramos que una molécula de cinesina DmK401 recorre 500 nm por encuentro con un MT (Fig. 18) y que lo hace a $650 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Previamente en nuestro laboratorio Hernández Candia *et al.* (2013) determinaron que la DmK401 da pasos de 8.2 nm , por lo que ahora podemos decir que la cinesina DmK401 da ± 61 pasos por encuentro difusional con un MT. Uno de nuestros objetivos es conocer la distancia recorrida por el cargamento cuando es transportado por dos moléculas de cinesina. Aunque pocos, observamos eventos en los que las esferas fueron transportadas por más de una molécula de cinesina (Figs. 14, 18), pues recorrieron distancias evidentemente más largas ($>7 \mu\text{m}$). Sin embargo, para estos eventos la velocidad no fue mayor, al contrario, disminuyó a $501 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Este cambio de la distancia recorrida por el cargamento cuando es transportado por 2 cinesinas concuerda con los resultados de Vershinin *et al.* (2007) (Figs. 7A, 14).

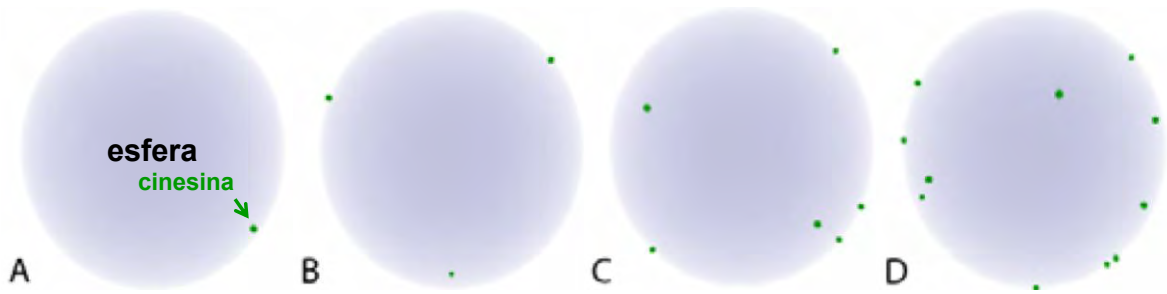


Fig. 16. La unión de las moléculas de cinesina en la superficie de una esfera es aleatoria. **A:** Representación de un motor por esfera. **B, C, D:** A medida que aumenta la concentración de cinesina hay más motores por esfera y la probabilidad de tener dos motores lo suficientemente cerca como para que cooperen en el transporte aumenta. Imagen de la referencia [31].

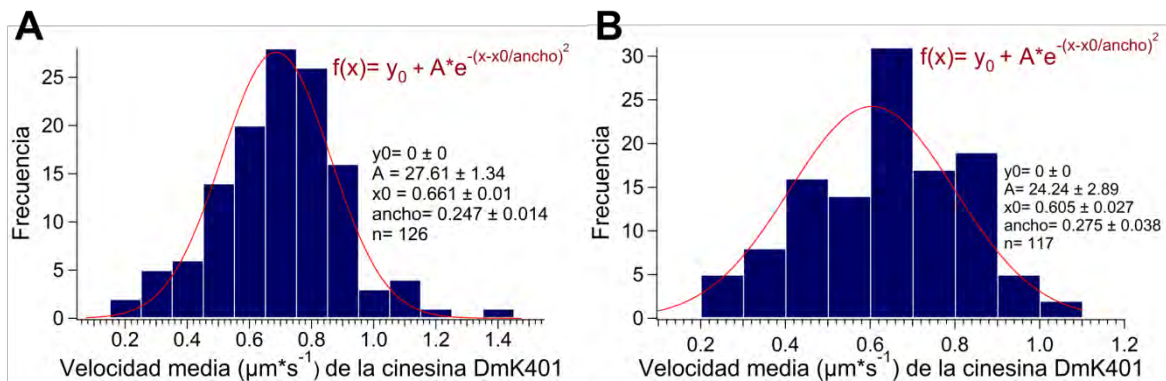


Figura 17. Velocidades de los cargamentos transportados por una o más moléculas de cinesina-1 DmK401. **A:** La velocidad media de una molécula de cinesina es $661 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ (Promedio aritmético= $650 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$). Los datos ($n = 126$ corridas) son resultado de dos ensayos independientes. **B:** Velocidades de cargamentos con dos moléculas de la cinesina-1 DmK401. La velocidad media es $605 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ (Promedio aritmético= $638 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$). Los datos ($n = 117$ corridas) son resultado de dos ensayos independientes.

En la concentración 1:198,000 de cinesina nosotros obtuvimos 2 moléculas de cinesina por esfera. No obstante, la población resultó heterogénea. Pocas esferas tuvieron dos cinesinas cercanas entre sí y en muchas esferas las 2 cinesinas quedaron alejadas entre sí. Una manera sencilla de aumentar el número de esferas con dos motores cercanos entre sí, es aumentando la concentración de cinesina. Si nosotros usamos la cinesina 1:198,000 ($5e^{-6}$) entonces debemos diluirla menos y esperar que la fracción de esferas que presentan movimiento dirigido sea ≥ 0.9 . No obstante, cuando hicimos las curvas de motilidad en función de la concentración relativa de cinesina (Fig. 11) observamos que entre más concentrada la cinesina (a partir de la dilución 1:99,000 ó e^{-5}) el movimiento dirigido de las esferas era menos fácil de evaluar, pues las esferas tendían a pegarse al vidrio o al MT (tabla 1) y, a veces, aún con las pinzas ópticas eran difícil de despegar, por esto escogimos las dos concentraciones relativas trabajadas.

Incluso si se observan los datos de las dos curvas (Fig. 11), salta a la vista que los puntos y las barras de error se separan a partir de la concentración 1:99,000 (e^{-5}), de manera que en una de las curvas (verde) en la concentración 1:33,000 ($3 \cdot e^{-5}$), aún con una $n=30$, no todas las esferas presentaron movimiento dirigido, a diferencia de la otra curva (azul) con una $n=20$. De hecho, a parte de las 30 esferas probadas hubo 9 que se pegaron a la superficie (tabla 1) y algunas de las que sí se movieron por cinesina se pegaron en algún momento. Esto a diferencia de la curva con $n=20$, ensayo en el que únicamente se pegó una esfera.

Por esto es conveniente considerar, a futuro, cambiar de agente bloqueador de la unión no específica de las proteínas a la superficie, de la cámara de flujo, a caseína- β o polietilenglicol (PEG) en vez de BSA [42, 43], pues puede afectar la motilidad. De acuerdo a Nicholas et al. (2014) la caseína- β (1 mg/mL) es más efectiva que la BSA (hasta 10 mg/mL), se disuelve mejor, y es más resistente a la desnaturalización o precipitación por DTT (comúnmente usado en las soluciones amortiguadoras para los ensayo de motilidad) puesto que no contiene cisteínas.

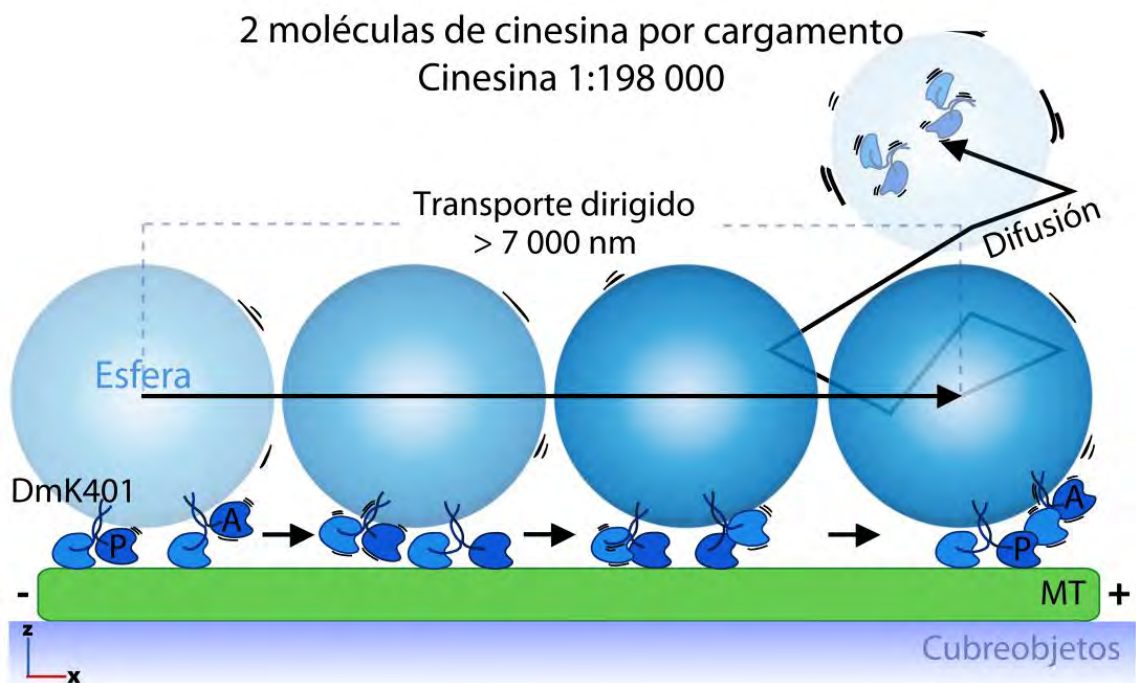
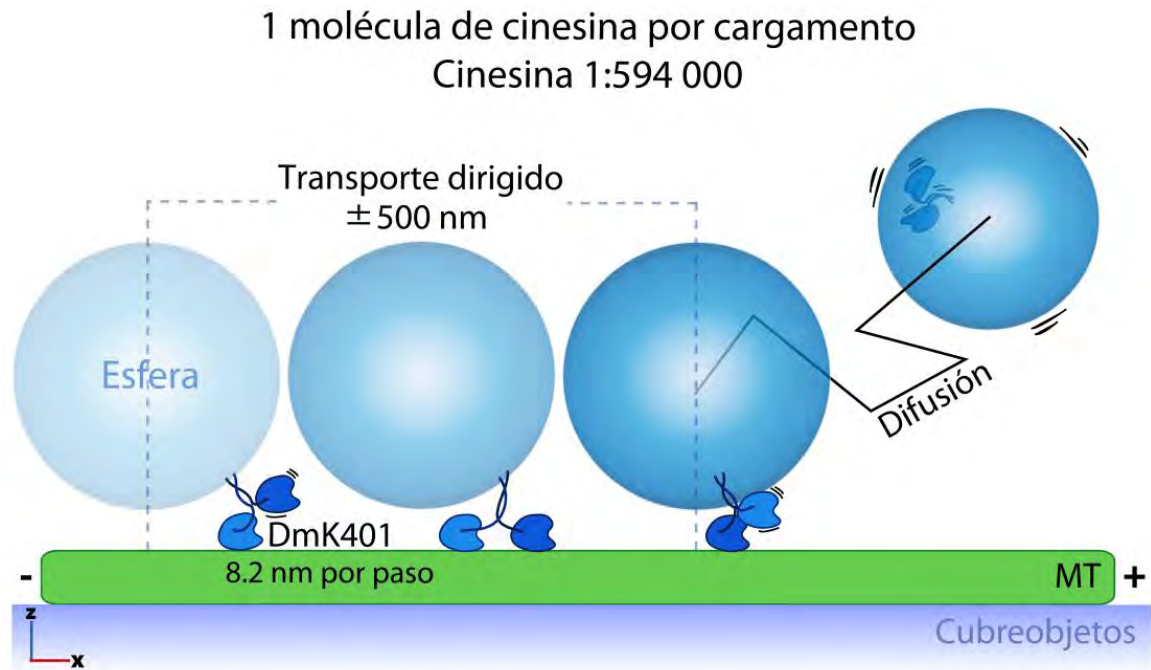


Figura 18. Distancias recorridas por los cargamentos cuando son transportados por una o dos moléculas de cinesina-1 DmK401. La distancia recorrida por una esfera transportada por una o dos moléculas de cinesina es distinta.

En lo que respecta al PEG, de acuerdo a Fordyce et al. (2007), es un repelente eficiente de proteínas que es comercializado en múltiples variedades, incluyendo PEG unido a grupos funcionales específicos [42].

Por otro lado, una forma de probar que una esfera es transportada por un motor en la concentración aquí usada (1:594,000) es midiendo la fuerza de paro. De esta manera, para una molécula de kinesina por esfera esperaríamos una fuerza de 5-7 pN, que es la fuerza de paro de la kinesina-1 DmK401 [35]. Para eventos de transporte por dos kinesinas esperaríamos una fuerza de paro mayor como la que Vershinin *et al.* (2007) obtuvo ≈ 9 pN. No obstante, Oaxaca (2013) reportó que no hubo diferencia entre la fuerza medida para una molécula de kinesina-1 DmK401 y la fuerza ejercida cuando hay ≈ 2.8 kinesinas por esfera.

Cabe mencionar que las fuerzas de paro fueron medidas en el Laboratorio de Biofísica y Pinzas Ópticas anteriormente con otro lote de kinesina DmK401, expresada y obtenida a partir de extracto total [35]. Por lo que especulando, si nosotros observamos algunos eventos de corridas muy largas cuando tenemos ≈ 2.1 kinesinas por esfera (Fig. 14) pero sabemos que la fuerza no cambia, entonces esto tiene sentido con el modelo de Vershinin *et al.* (2007) en el que las kinesinas transportando un mismo cargamento actúan secuencialmente (Fig. 7A), es decir, cuando una kinesina está activa la otra está inactiva (eso explicaría la fuerza de paro de 5 pN) aunque claramente a momentos ambas kinesinas están en contacto con el MT (lo que explica las corridas muy largas).

Como perspectiva, queda destacar que es deseable medir la fuerza de paro en la dilución de kinesina correspondiente (de acuerdo a las estimaciones) a dos motores por esfera, para confirmar el número de motores transportando el cargamento, así como también medir el tamaño de paso. Esto para el mismo stock de kinesina purificada.

En conclusión, nosotros determinamos que la procesividad *in vitro* de la cinesina-1 DmK401 es de 500 nm, pero cuando existen dos o más motores cooperando en el transporte del cargamento la procesividad puede ser significativamente mayor ($>7 \mu\text{m}$). También, concluimos que la velocidad de los cargamentos transportados por una molécula de cinesina DmK401 es de $650 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. Ahora que sabemos qué longitud de corrida esperar cuando tenemos, en promedio, una o más cinesinas por esfera es posible estudiar el transporte a un nivel de complejidad más cercano al que existe dentro de las células. Es decir, dentro de una red tridimensional de MTs con cargamentos con una o más moléculas de cinesina. Para ello, también, establecimos las condiciones necesarias para tener una red de MTs con los cargamentos-cinesina difundiendo (ver anexos). Para estudiar el transporte de los cargamentos dentro una red tridimensional de MTs a futuro, es necesario tener un programa que determine la posición xyz de al menos una esfera a la vez, que reconstruya la trayectoria y analice los datos para determinar los eventos de difusión, transporte dirigido o confinamiento dentro de una misma trayectoria.

3. Materiales y métodos

3.1 Expresión y purificación de la cinesina-1 recombinante DmK401

Las células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el gen de la cadena pesada de la cinesina-1 DmK401 se crecieron a 37°C en 5 mL de medio Luria Bertani (LB; triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L y NaCl 5g/L) suplementado con ampicilina, en agitación durante 16 h. Se transfirieron 2.5 mL del preinóculo a 250 mL de LB, el cultivo se mantuvo en agitación a 37°C hasta alcanzar una $O.D._{600}=0.6$ (5 h y 30 min aproximadamente). La expresión de la cinesina-1 se indujo con 250 μ L de IPTG 1M (concentración final de IPTG: 1 mM) durante 12 h a 18°C y 180 rpm. Pasado este tiempo, los 250 mL se centrifugaron a 4,300 rpm durante 10 min a 4°C y se retiró el sobrenadante.

La pastilla de células obtenida se resuspendió en 25 mL de buffer de lisis (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 200 mM, NaCl 50 mM, imidazol 2 mM, DTT 1 mM, ATP 20 μ M y un cuarto de pastilla de inhibidores de proteasas; pH 8) y se puso a rotar a 4°C. Una vez disuelta la pastilla de células se sonicó, 8 pulsos de 20 s con intermedios de 1 min (Fig. 19A). El extracto se centrifugó a 15,000 rpm durante 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Los ~25 mL de sobrenadante se pasaron 2 veces por una columna de esferas de agarosa Ni-NTA (30210, Qiagen; Fig. 19B) previamente equilibrada con buffer de lisis (sin inhibidores de proteasas). Por la columna primero se pasaron 10 mL de buffer de lisis, posteriormente 30 mL de buffer de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 250 mM, imidazol 40 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM y ATP 20 μ M; pH 6.7) y finalmente 9 mL de buffer de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 250 mM, imidazol 500 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM y ATP 20 μ M; pH 6.7). Cada mL eluido se colectó en un tubo de 2 mL al cual se le había añadido previamente 1 mL de glicerol (porcentaje final de glicerol: 50%). Los tubos se dejaron rotar durante 30 min para mezclar bien. Todo el procedimiento se hizo a 4°C. Finalmente, las eluciones se almacenaron a -20°C.

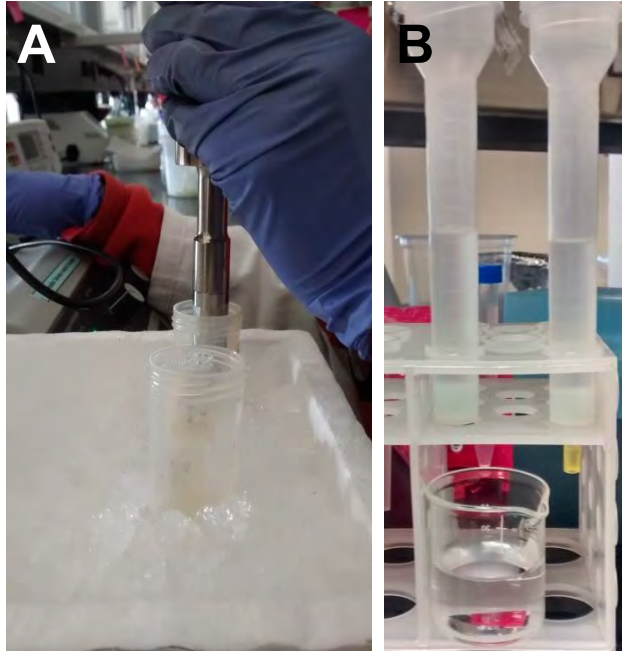


Fig. 19. Fotos del procedimiento de purificación de la cinesina. A: Lisis de las bacterias por sonicación. **B:** Dos columnas de esferas de agarosa Ni-NTA.

3.2 Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Buffer de carga (500 μ L): 475 μ L Buffer Laemmli 2x + 25 μ L β -mercaptoetanol

Preparación de muestras: 10 μ L muestra + 10 μ L buffer de carga

Las muestras se calentaron durante 10 min a 94.8°C. Las muestras se cargaron en gel de poliacrilamida y se corrieron a 100 mV durante 1 h.

3.3 Recubrimiento de esferas con anticuerpo 5xHis biotinilado

Las esferas utilizadas son de poliestireno, de 0.44 μ m de diámetro y están recubiertas de estreptavidina por el proveedor (1% w/v, SVP-05-10 Spherotech). Se diluyeron 10 μ L de esferas en 70 μ L de PEMBSA (1200 μ L PEM80, 300 μ L BSA 20mg/mL), se sonicaron en baño ultrasónico con abundante hielo durante 15 min, se añadieron 20 μ L de anticuerpo 5xHis biotinilado (200 μ g/mL IgG1, 34440 Qiagen) y se incubó durante 60 min, en rotación a temperatura ambiente (t.a). Se centrifugó a 13,000 rpm durante 4 min, se retiró el sobrenadante y se lavó con PEMBSA 5 veces. Las esferas se resuspendieron en 100 μ L de PEMBSA y se almacenaron a 4°C en rotación constante. Estas esferas tienen aproximadamente un tiempo de vida de 4 meses.

3.4 Recubrimiento de las esferas-anticuerpo con cinesina

Por un lado, se hizo una dilución 1:100 de las esferas recubiertas de anticuerpo en buffer de ensayo (4 μ L DTT 0.5 M, 200 μ L BSA 20 mg/mL, 20 μ L ATP 100 mM, 33 μ L AcK 3M en 1743 μ L PEM80) y se sonicó. Por otro lado, se hicieron diluciones seriadas de la cinesina-1 DmK401 purificada en buffer de ensayo con taxol (20 μ M). Las diluciones que ocupamos para hacer la curva de la fig. 11 son las siguientes 1:33,000; 1:99,000; 1:297,000; 1:891,000; 1:2,673,000. Las diluciones para videomicroscopía fueron 1:198,000 y 1:594,000. A manera de ejemplo, en la fig. 20 se muestra cómo se hacen las diluciones de cinesina. Posteriormente, se mezclaron 50 μ L de esferas 1:100 con 50 μ L de cinesina, esto se hizo para cada

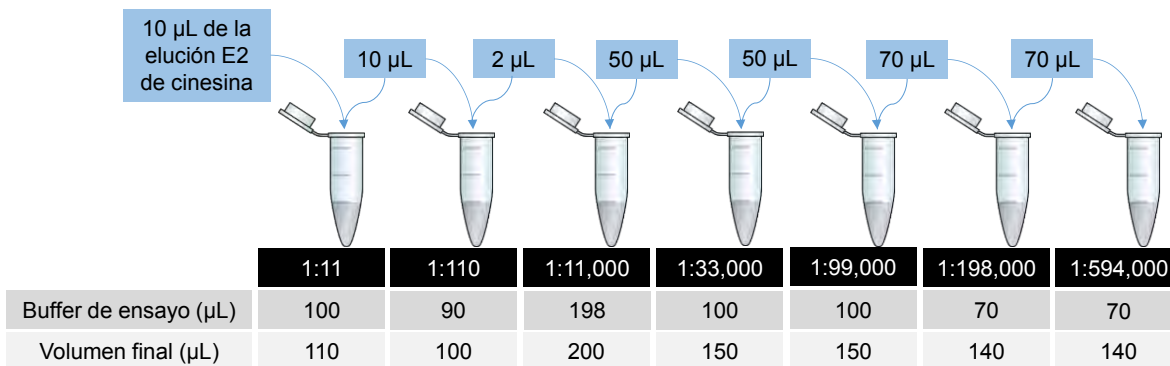


Fig. 20. Preparación de las diluciones seriadas de cinesina para los ensayos de videomicroscopía. Primero a cada tubo se le pone buffer de ensayo (cantidad respectiva indicada en la tabla). Posteriormente, al primer tubo se le añade la cinesina (cinesina purificada mantenida a -20°C con 50% de glicerol) y se resuspende hasta que ya no haya distinción entre ambas fases, agua y glicerol. Con una punta nueva, de este primer tubo se toma el volumen indicado para preparar el tubo siguiente, así sucesivamente. Nótese que el volumen final indicado no toma en cuenta la cantidad tomada para preparar la siguiente dilución. Todo se hace en hielo.

	1:198,000	1:594,000
Dilución de cinesina (µL)	50	50
Esferas-anticuerpo (µL)	50	50
Volumen final (µL)	100	100

Tabla 2. Recubrimiento de las esferas-anticuerpo con cinesina para los ensayos de videomicroscopía. Debido a que nos interesa tener esferas con una y dos cinesinas en promedio, utilizamos las diluciones 1:594,000 y 1:198,000, respectivamente.

dilución de cinesina (Tabla 2); las diluciones se incubaron a 4°C durante 12 h en rotación. La fig. IS1A muestra un dibujo de la disposición de los elementos necesarios para recubrir a la microesfera con la cinesina DmK401.

3.5 Funcionalización de vidrios con poli-L-lisina

Los cubreobjetos se metieron a un limpiador de plasma (PDC-001, Harrick Plasma) durante 5 min. El plasma remueve cualquier residuo contaminante orgánico (particularmente hidrocarburos) e induce la conversión de los grupos siloxano de la superficie en grupos silanol confiriendo a la superficie carácter hidrofílico (Fig. 21). De esta manera, si se coloca una gota de agua sobre un cubreobjetos tratado con plasma la gota se esparcirá (Fig. 21C), en cambio, si se coloca una gota en un cubreobjetos no tratado con plasma, la gota no se esparce (Fig. 21B). El limpiador de plasma funciona excitando a las moléculas en un gas de baja presión, el gas energizado emite radiación y forma un plasma que consiste de iones, electrones libres y especies radicales reactivas que bombardean las superficies contaminadas. Conforme los contaminantes se rompen, rápidamente se evaporan dejando la superficie limpia. Las mezclas de gas que se pueden utilizar pueden ser varias [43], incluyendo el aire ($\approx 78\%$ nitrógeno, $\approx 21\%$ oxígeno, $\approx 1\%$ argón, etc.) que es el que nosotros utilizamos, a una presión de 1 mTorr.

Posteriormente, los cubreobjetos se sumergieron en una solución de poli-L-lisina 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (0.1% w/v en agua, P8920-100ML, Sigma) en etanol grado HPLC (Fermont) durante 10 min y se metieron a una estufa a 55°C por 30 min. Se protegieron del polvo.

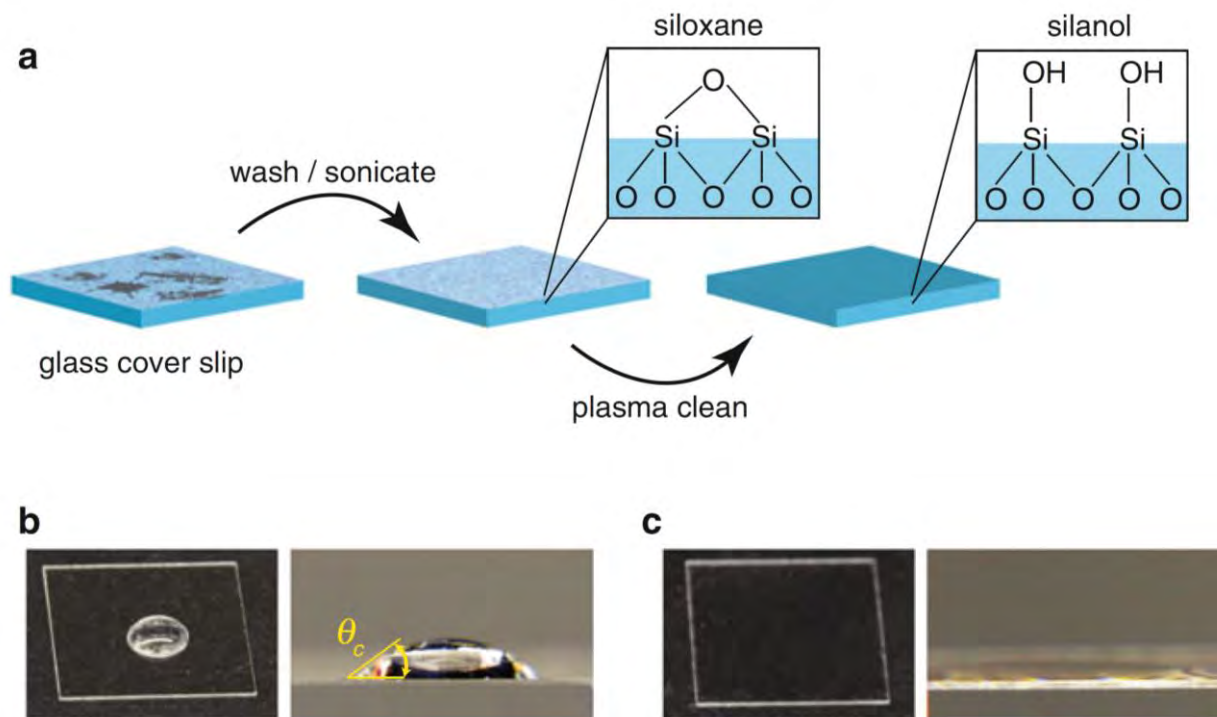


Fig. 21. Tratamiento de los cubreobjetos con el limpiador de plasma. a: Opcionalmente los cubreobjetos se sumergen en detergente alcalino y se sonicen en un baño ultrasónico. Luego el plasma remueve los contaminantes orgánicos y convierte los grupos siloxano en silanol, haciendo a la superficie hidrofílica; **b:** antes de limpiar con plasma, al depositar una gota de agua bidestilada ésta forma una esfera que al verse de lado forma un domo; **c:** después de limpiar con plasma, la gota se esparce uniformemente. Imagen tomada de la referencia [43].

3.6 Polimerización y estabilización de MTs

Los MTs se polimerizaron a partir de dímeros de tubulina- $\alpha\beta$ de cerebro bovino (TL238, Cytoskeleton). El PEM/GTP se hizo mezclando: 15.4 μL PEM104 + 2.0 μL GTP 10 Mm, mantener en hielo hasta su uso. Se preparó TUB mezclando: 15.2 μL PEM/GTP + 2.2 μL DMSO, se mezcló en mezclador de vórtice y añadió 4.8 μL de tubulina 10 mg/mL (TL238, Cytoskeleton). TUB se incubó a 37°C durante 30 min (durante este tiempo los MTs crecen). Mientras los MTs se formaban, se hizo buffer estabilizador STAB mezclando: 34.1 μL PEM80 + 5.0 μL GTP 10mM + 4.7 μL NaN_3 65 g/L + 1.2 μL taxol 10 mM + 5.0 μL DMSO (50 μL de volumen final). Después de 30 minutos de la incubación de TUB, los MTs se estabilizaron añadiendo 2 μL de STAB (no debe estar frío). Los MTs estabilizados se mantuvieron a t.a., hasta por un mes.

3.7 Preparación de cámaras de flujo para ensayos de motilidad.

Primero, se construye una cámara de flujo con un cubreobjetos con poli-L-lisina y un portaobjetos unidos mediante dos pedazos de cinta doble cara separados aproximadamente 2 mm (Fig. 22A), esta separación constituye un canal por el cual se fluyen las soluciones con los reactivos para preparar la muestra. Por un extremo del canal se va aplicando la solución (entra por capilaridad), mientras que por el otro extremo se va retirando con un papel filtro que absorbe la solución que ya pasó por el canal. La muestra nunca debe de secarse, por lo que se va intercambiando el contenido de la cámara poniendo y quitando al mismo tiempo.

Se fluyeron 20 μL de MTs 1:100 en PEMtax y la preparación se incubó 10 min en una cámara húmeda (Fig. 23B) a t.a. Los MTs no adheridos se lavaron con 50 μL de PEMtax e inmediatamente después la superficie del vidrio se bloqueó con 50 μL de BSA 10 mg/mL-taxol (Fig. IS1B), se incubó 10 min en la cámara húmeda. Se lavó con 100 μL de buffer de ensayo (4 μL DTT 0.5 M, 400 μL BSA 20 mg/mL, 20 μL ATP 100 mM, 32 μL AcK 3M en 1544 μL PEM80), se fluyeron 20 μL

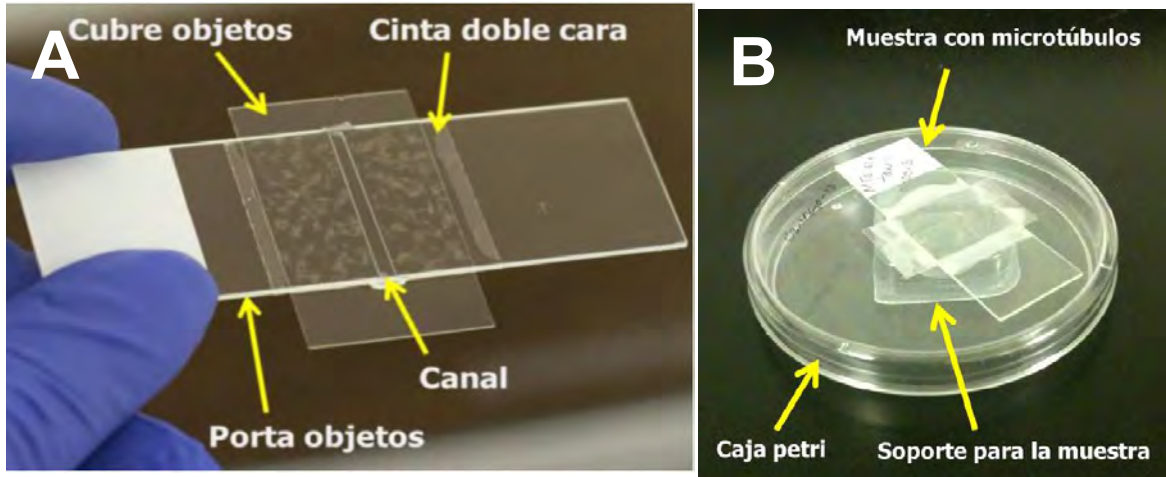


Fig. 22. Fotos de la preparación de una muestra en una cámara de flujo. A: Cámara de flujo (canal) construida a partir de un portaobjetos y un cubreobjetos unidos mediante cinta doble cara. **B:** Cámara húmeda que consiste de una caja Petri con agua destilada y un soporte, permite incubar una cámara de flujo para evitar que la muestra se seque. Imágenes de la referencia [35].

de una determinada dilución de esferas-cinesina (al momento se le añadió 1 μL de glucosa y 1 μL del sistema glucosa oxidasa-catalasa), la cámara de flujo se selló por ambos lados con VaLaP (mezcla de Vaselina, Lanolina y Parafina) y la muestra se montó en el microscopio.

3.8 Videos y análisis de trayectorias

Cada corrida se analizó con un programa escrito en Labview (National Instruments) por el Dr. Braulio Gutiérrez Medina y modificado por la Dra. Mónica Noemí Jiménez García. Para calcular la longitud de cada corrida, el término de ésta se determinó observando cada cuadro del video, de manera que una corrida termina con la última imagen de la esfera enfocada (las imágenes con la esfera desenfocada ya no se consideraban), véase la fig. 9B. Una vez determinado el intervalo de cuadros que representan un evento de transporte dirigido, los datos se diezmaron por un factor de dos, para disminuir la importancia del movimiento térmico en el cálculo de la longitud recorrida. Al diezmar por un factor de dos, estamos considerando la distancia que existe entre la posición de la esfera en el cuadro n y su posición en el cuadro $n+2$. Es decir, no consideramos la posición de cuadros intermedios ($n+1$ en este caso), así sucesivamente para los siguientes cuadros.

Posteriormente, con el programa obtuvimos la distancia euclidiana recorrida por la esfera. El programa determina la distancia en xy que hay entre el centroide de la esfera de un cuadro al siguiente $[(x_f-x_i)^2+(y_f-y_i)^2]^{1/2}$, calculando pares de distancias. Por ejemplo, en la fig. 9B se muestra una corrida de 5 cuadros, para calcular la distancia recorrida en este caso el programa calcula 4 distancias (cuadro $5 \rightarrow 4$, $4 \rightarrow 3$, $3 \rightarrow 2$, $2 \rightarrow 1$) para x y y con la fórmula $[(x_f-x_i)^2+(y_f-y_i)^2]^{1/2}$, finalmente hace la sumatoria dándonos la longitud de corrida.

Los resultados se graficaron y ajustaron con Igor Pro 6.03A. Las imágenes se editaron con Adobe Illustrator CS2 y Power Point.

4. Referencias

- [1]. Fletcher DA, Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nat Rev* 463(7280):485-492.
- [2]. Mostowy S, Cossart P (2012) Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(3):183-194.
- [3]. Holzbaur EL, Goldman YE (2010) Coordination of molecular motors: from in vitro assays to intracellular dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 22(1):4-13.
- [4]. Shubeita GT, et al. (2008) Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1 driven lipid droplets. *Cell* 135(6):1098-1107.
- [5]. Bálint S, Verdeny VI, Sandoval AA, and Lakadamyali M. Correlative live-cell and superresolution microscopy reveals cargo transport dynamics at microtubule intersections. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(9):3375-3380.
- [6]. Zajac AL, Goldman YE, Holzbaur ELF, Ostap EM (2013) Local cytoskeletal and organelle interactions impact molecular-motor-driven early endosomal trafficking. *Curr Biol* 23(13):1173-1180.
- [7]. Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998) Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391(6663):199-203.
- [8]. Howard J, Hyman AA (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422(6933):753-758.
- [9]. Efimov A, et al. (2007) Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* 12(6):917-930.
- [10]. Lodish H, et al. (2008) Molecular Cell Biology, 6th ed. (W. H. Freeman, N.Y.).
- [11]. Alushin GM, et al. (2014) High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157(5):1117-1129.
- [12]. Vale RD, Reese TS, Sheetz MP (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42(1):39-50.
- [13]. Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*

- 112(4):467-480.
- [14]. Tomishige M, Vale RD (2000) Controlling kinesin by reversible disulfide cross-linking: Identifying the motility-producing conformational change. *J Cell Biol* 151(5):1081–1092.
- [15]. Kozielski F, et al. (1997) The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule dependent motility. *Cell* 91(7):985-994.
- [16]. Egan MJ, McClintock MA, Reck-Peterson SL (2012) Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* 15(6):637-645.
- [17]. Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, Schwarz TL (2006) Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173(4):545-557.
- [18]. Kaan HYK, Hackney DD, Kozielski F (2011) The structure of the kinesin-1 motor-tail complex reveals the mechanism of autoinhibition. *Science* 333(6044):883–885.
- [19]. Hernández Candia CN (2011) Tesis de maestría. Construcción y caracterización de una pinza óptica para el estudio de moléculas individuales. UNAM México, pp 1-100.
- [20]. Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ, Block SM (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365(6448):721-727.
- [21]. Asbury CL (2005) Kinesin: World's tiniest biped. *Curr Opin Cell Biol* 17(1):89-97.
- [22]. Schnitzer MJ, Block SM (1997) Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* 388(6640):386-390.
- [23]. Svoboda K, Block SM (1994) Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* 77(5):773-784.
- [24]. Yildiz A, Tomishige M, Vale RD, Selvin PR (2004) Kinesin walks hand-over-hand. *Science* 303(5658):676–678.
- [25]. Telley IA, Bieling P, Surrey T (2009) Obstacles on the microtubule reduce the processivity of kinesin-1 in a minimal in vitro system and in cell extract. *Biophys J* 96(8):3341-3353.

- [26]. Hancock WO, Howard J (1999) Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(23):13147–13152.
- [27]. Hackney DD (1994) Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(15):6865–6869.
- [28]. Milic B, Andreasson JOL, Hancock WO, Block SM (2014) Kinesin processivity is gated by phosphate release. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(39):14136-14140.
- [29]. Prevo B, Peterman EJG (2015) Small steps and giant leaps. *ELife* 4:e08366.
- [30]. Nelson P (2003) Biological physics. Energy, information, life (W. H. Freeman, N.Y.).
- [31]. Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(1):87-92.
- [32]. Leduc C, Ruhnnow F, Howard J, Diez S (2007) Detection of fractional steps in cargo movement by the collective operation of kinesin-1 motors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(26):10847-10852.
- [33]. Hernández Candia CN, Tafoya Martínez S, Gutiérrez-Medina B (2013) A minimal optical trapping and imaging microscopy system. *PLoS One* 8(2):e57383
- [34]. Asbury CL, Fehr AN, Block SM (2003) Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism. *Science* 302(5653):2130-2134.
- [35]. Oaxaca CAR (2013) Tesis de maestría. Estudios de cooperatividad entre proteínas motoras y los efectos de estabilizar microtúbulos con glutaraldehído. IPICYT México, pp 1-93.
- [36]. Conway L, Ross JL (2014) Kinesin motor transport is altered by macromolecular crowding and transiently associated microtubule-associated proteins. arxiv.org 1-3.
- [37]. Thorn KS, Ubersax JA, Vale RD (2000) Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J Cell Biol* 151(5):1093-1100.

- [38]. Walter WJ, Beránek V, Fischermeier F, Diez S (2012) Tubulin acetylation alone does not affect kinesin-1 velocity and run length *in vitro*. *PLoS ONE* 7(8): e42218.
- [39]. Sigua R, Tripathy S, Anand P, Gross SP (2012) Isolation and purification of kinesin from *Drosophila* embryos. *J Vis Exp* (62):e3501.
- [40]. Hesse WR, et al. (2013) Modular aspects of kinesin force generation machinery. *Biophys J* 104(9):1969-1978.
- [41]. Fehr AN, Gutiérrez-Medina B, Asbury CL, Block SM (2009) On the origin of kinesin limping. *Biophys J* 97(6):1663-70.
- [42]. Fordyce PM, Valentine MT, Block SM (2007) Advances in surface-based assays for single molecules. *Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual*, eds Selvin PR, Ha T (CSHL Press, USA).
- [43]. Nicholas MP, Rao L, Gennerich A (2014) Covalent immobilization of microtubules on glass surfaces for molecular motor force measurements and other single-molecule assays. *Methods Mol Biol* 1136:137-169.
- [44]. Goodsell D (2005) ATP synthase. Molecule of the Month. Protein Data Bank.
- [45]. Junge W (1999) ATP synthase and other motor proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(9):4735-7.

5. Anexos



Fig. IS1. Dibujo de los elementos que permiten la unión esfera-cinesina y tratamiento de la superficie para un ensayo de motilidad. **A:** Una esfera de poliestireno (azul cielo) está recubierta de estreptavidinas (óvalos amarillos), éstas unen la biotina (círculos rojos) acoplada a cada anticuerpo (verde), el anticuerpo a su vez reconoce la etiqueta de 5xHis (amarillo) de la cinesina (azul oscuro). El cálculo de la longitud del tallo de la cinesina trunca DmK401 es de ≈ 10 nm, en tanto que la longitud del atado estreptavidina-biotina-anticuerpo es de ≈ 20 nm [34]. **B:** Los MTs (superficie con carga negativa) se adhieren al cubreobjetos por la interacción de su carga con la de la poli-L-lisina (carga positiva). La BSA actúa como agente bloqueador para que las esferas no se peguen al vidrio vía adsorción no específica [43]. Imágenes de la referencia [42].

5.1 Trabajo adicional: Condiciones preliminares para estudiar el transporte efectuado por la cinesina en una red de MTs

Ahora que conocemos las distancias que el cargamento es transportado por uno o más de un motor podemos estudiar el transporte por cinesina a un mayor nivel de complejidad *in vitro*, en un ambiente más parecido al que un motor con su cargamento halla dentro de una célula, el transporte dentro de una red tridimensional. Existen reportes de que en las células los cargamentos presentan estos tipos de movimiento: dirigido, difusivo y confinado [6].

El transporte de un cargamento esférico, como es una vesícula o una microesfera de poliestireno, dentro de una red es más complejo porque: el cargamento puede presentar más de un tipo de movimiento, los MTs pueden presentar movimiento o estar curvos, dependiendo de su densidad, los MTs representan obstáculos para el movimiento del cargamento (también depende del tamaño del cargamento) o de la misma cinesina (intersecciones de MTs), entre muchas otras posibilidades.

Para estudiar el transporte en una red de MTs, comenzamos a establecer las condiciones necesarias para lograr la red. En las siguientes páginas describimos el procedimiento, los resultados y los obstáculos a los que nos enfrentamos.

5.1.1 Microtúbulos en microcámaras de flujo de 20 μm de alto: el reto de fluir

Dentro de las células eucariotas, un cargamento puede ser transportado por difusión o por motores moleculares (transporte dirigido). La difusión puede considerarse un medio de transporte poco eficiente a diferencia del ejecutado por los motores biológicos, principalmente para los cargamentos de las células largas como las neuronas, porque es lento. Al decir que nos interesa conocer el transporte dentro de una red de MTs nos referimos a que queremos saber cuánto tiempo le lleva a un cargamento decorado con cinesina trasladarse de un punto a otro, así como también, el tipo de movimiento por el que se trasladó.

Para conocer el tiempo que le toma a una esfera recorrer cierta distancia (movimientos difusivos, activos o confinados) en un espacio tridimensional con MTs, inicialmente quisimos tener dos superficies cubiertas de MTs (Fig. IS2) lo suficientemente cercanas como para que la esfera explorara ambas en un tiempo razonable y pudiésemos observar transporte dirigido. Con este objetivo de tener cámaras de flujo de menor altitud (reducir la distancia z), reducimos la distancia entre el cubreobjetos y el portaobjetos utilizando cinta doble cara más delgada a la que comúnmente usamos (cinta gruesa de $\approx 100 \mu\text{m}$ de espesor) como cuando, por ejemplo, medimos la procesividad. Nosotros medimos lo alto de las cámaras a través de su observación en el microscopio, la altura resultó de $\approx 20 \mu\text{m}$.

Estas microcámaras las probamos fluyendo MTs y lavándolos con PEMTax (Fig. IS2). En primer lugar, observamos que debido a su menor altura se llenaban con menos volumen ($\approx 3 \mu\text{L}$ de solución) con respecto a las cámaras de cinta gruesa. En segundo lugar, fue muy difícil de fluir (intercambiar el volumen de la microcámara), entonces intentamos varios métodos para fluir en un menor tiempo, incluyendo la utilización de una punta de micropipeta conectada a una línea de vacío, papel filtro y cubreobjetos con un agujero en un extremo (salida de la microcámara).

De esto concluimos que, aunque sí fue posible obtener MTs adheridos a cubreobjetos y portaobjetos (Fig. IS3) el tiempo para fluir unos cientos de microlitros fue de hasta horas, por lo que fluir los reactivos en microcámaras tan pequeñas supone un reto por el tiempo que implica, además de que es imposible respetar los tiempos de incubación para la preparación de las muestras. Por esto se consideró la opción de preparar el ensayo de motilidad en un solo paso, de manera que no hubiera necesidad de fluir y con la ventaja que nos permitiría reducir el alto de la microcámara de flujo aún más.

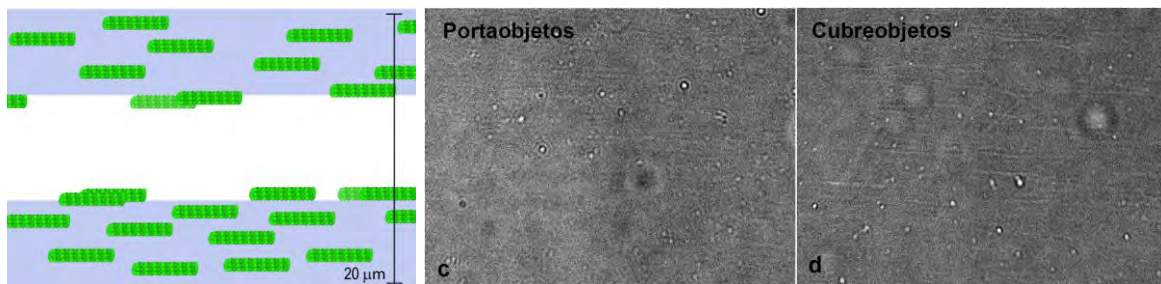


Fig. IS2. MTs en cámaras de flujo de 20 μm de alto. A: Dibujo del arreglo los MTs. Esta es una microcámara que mide $\sim 20 \mu\text{m}$ de alto (línea vertical, eje z), distancia que permitiría seguir el movimiento de las microesferas sin perderlas de vista. Portaobjetos y cubreobjetos: azul. MTs: verde. **B, C:** son la misma preparación y el mismo campo de visión. **B:** MTs unidos a un portaobjetos. **C:** MTs unidos a cubreobjetos. Ambas superficies se recubrieron con poli-L-lisina. Nótese que los MTs unidos al cubreobjetos son más. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de campo claro y procesamiento de imágenes. Número de imágenes promediadas: 10.

5.1.2 Microtúbulos en microcámaras de flujo de 8 μm de alto

Ya probamos fluir MTs en microcámaras de $\approx 20 \mu\text{m}$ de alto (Fig. IS2), no obstante, fluir es un reto y es deseable reducir aún más la altura de las microcámaras, para que cuando se haga el seguimiento de esferas en tres dimensiones éstas no se nos pierdan (en el eje z). De manera que una esfera (con cinesina) que se mueve libremente en el medio simplemente se va a desenfocar, lo que a su vez proporciona información de su posición en z, pues cuando una esfera se desenfoca la cantidad y el tamaño de sus anillos de difracción cambia (compárese la secuencia de imágenes de la fig. 9B), esto permitiría obtener las trayectorias.

Por ello, probamos construir microcámaras con una cinta doble cara aún más delgada que la utilizada para construir microcámaras de $20 \mu\text{m}$, preparar las muestras en un solo paso (Fig. IS3), poner cada muestra en una microcámara e inmediatamente sellarla. De esta manera, esperábamos tener verdaderas redes de MTs (Fig. IS4) puesto que nos evitaríamos los lavados de la microcámara y, por ende, conservaríamos a los MTs no pegados a la superficie.

El procedimiento para preparar las diluciones de cinesina fue el mismo que para los demás ensayos. Los MTs se añadieron a una dada dilución de esferas con cinesina a t.a. (Fig. IS3), se dieron pequeños golpecitos al tubo con el dedo y se pipeteó cuidadosamente con una punta de micropipeta de $200 \mu\text{l}$ (para evitar romper los MTs). Finalmente, se tomó $\approx 1 \mu\text{L}$ de muestra y depositó en el microcanal para que entrara por capilaridad, el microcanal se selló con VaLaP.

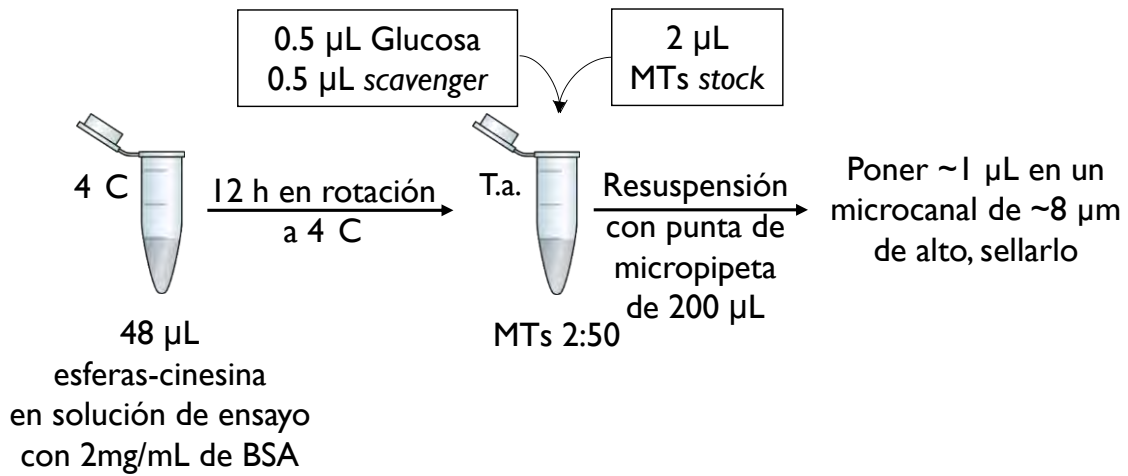


Fig. IS3. Preparación de una red de MTs con esferas-cinesina para fluir en microcámaras en un solo paso sin la necesidad de hacer lavados.

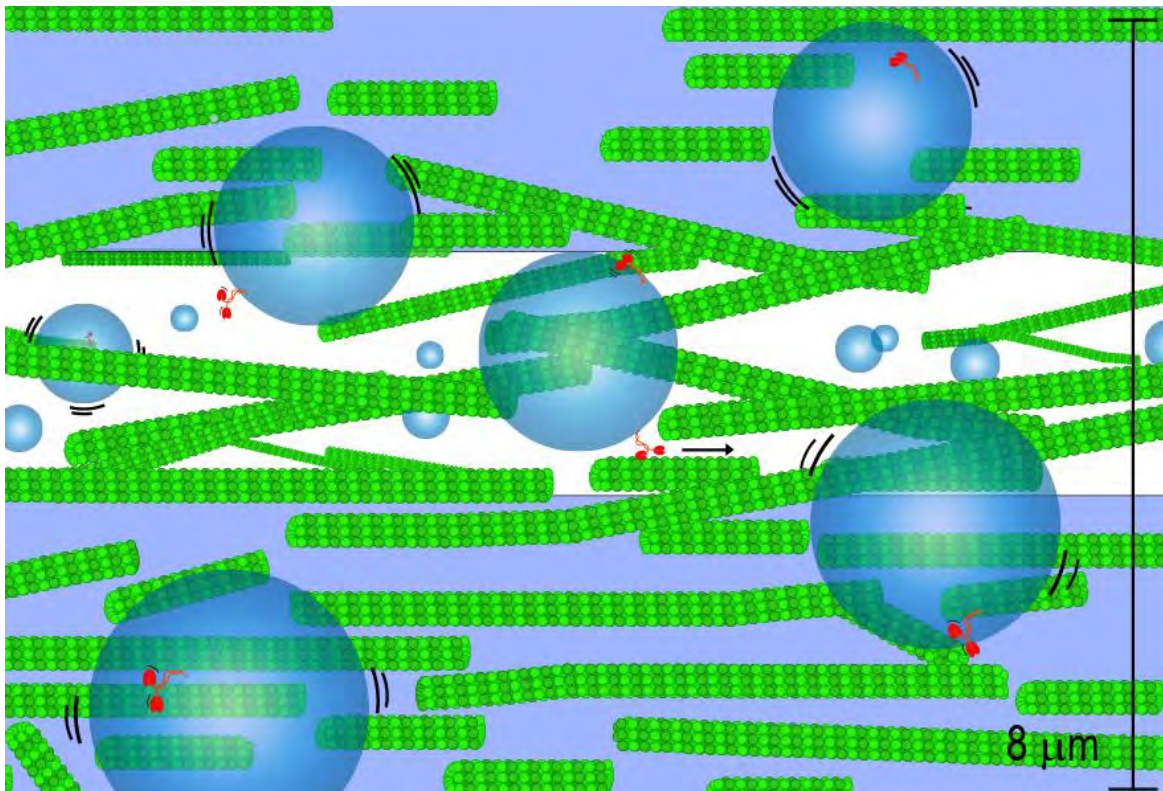


Fig. IS4. Representación de una red de MTs en la que ocurre difusión y transporte dirigido de las esferas por el motor cinesina.

No obstante, antes de hacer pruebas del transporte de esferas dentro de la red, queríamos saber cómo se verían los MTs sin lavar en estas nuevas cámaras. Cuando pusimos MTs 1:100 notamos que no llegaron ni a la mitad del largo del microcanal (Figs. IS5 y IS6), que es igual al ancho del portaobjetos (2.5 cm), lo que tampoco sucedió cuando los diluímos 1:300

A la par de la observación de la distribución de los MTs a lo largo de las microcámaras medimos las alturas de 4 de ellas. De cada microcámara tomamos varias mediciones (107) de la distancia entre del cubreobjetos y portaobjetos en varias posiciones a lo largo y ancho de la microcámara, pues la altura puede variar en las diferentes ubicaciones de la microcámara. La altura de las microcámaras construidas con cinta ultradelgada fue de $8.27 \pm 0.68 \mu\text{m}$. Las diferencias en la altura de la microcámara pueden deberse a: una diferencia en la presión aplicada (con un tubo de 0.6 mL) al pegar el cubreobjetos con el portaobjetos y a que el grosor de la cinta no sea uniforme.

Cuando añadimos esferas con cinesina a los MTs, algunos MTs sí llegaron al otro extremo del canal pero prácticamente todas las esferas se quedaron a la entrada, pegadas al cubreobjetos (Figs. IS7 y IS8). Esto evidencia una gran desventaja de preparar la muestra en un solo paso, pues aunque la solución tiene BSA (2 mg/mL) ni aumentando la concentración de este bloqueador (5 mg/mL) se evitó que las esferas se pegasen a la superficie. Es importante mencionar que la adhesión de las esferas al cubreobjetos se presentó aún con diluciones de cinesina bajas.

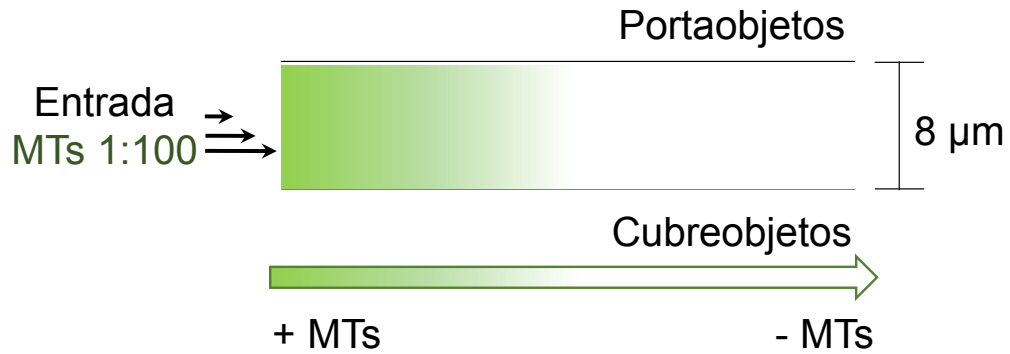


Fig. IS5. Representación de la distribución de los MTs a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto. Los MTs no llegaron ni a la mitad del largo del canal. MTs 1:100-1:300, BSA 2 mg/mL, poli-L-lisina 2 $\mu\text{L/mL}$.

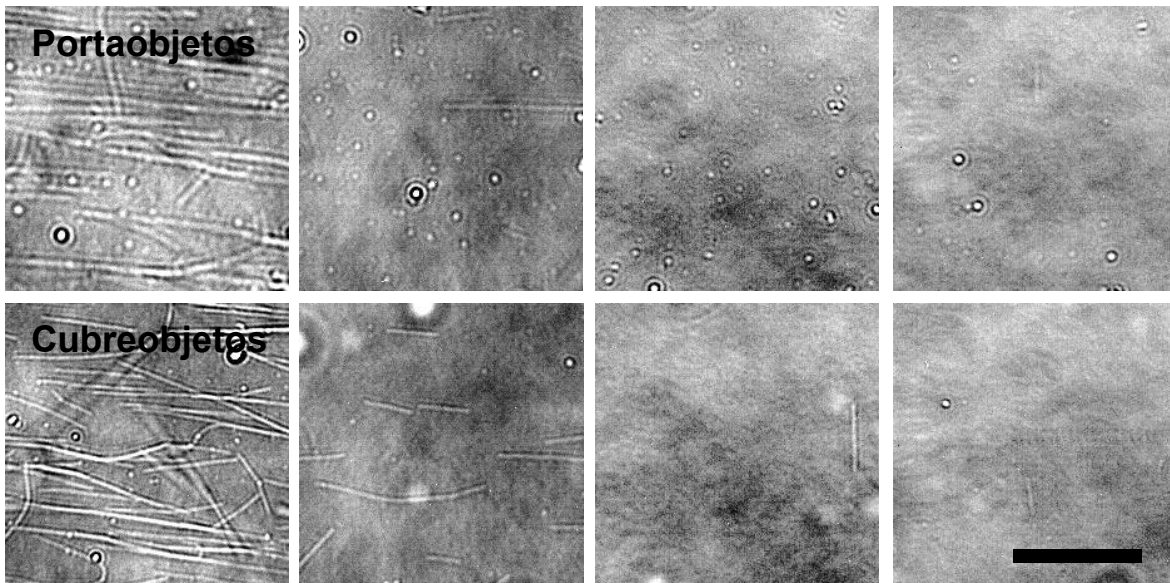


Fig. IS6. Distribución de los MTs a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto. Estas fotos se tomaron cada 6 mm a lo largo de la microcámara, que es de 2.5 cm (ancho del portaobjetos). Las dos imágenes de cada columna corresponden a la misma posición a lo largo del canal, la diferencia es que las de la fila superior muestran el portaobjetos y las inferiores el cubreobjetos. Los MTs no llegaron hasta el final del canal, lo mismo se observó en 6 microcámaras. Nótese que el portaobjetos está más sucio que el cubreobjetos y que las “basuras” se ven desenfocadas y más grandes en la imagen correspondiente del cubreobjetos. MTs 1:100, BSA 2 mg/mL, poli-L-lisina 2 $\mu\text{L/mL}$. Barra: 10 μm .

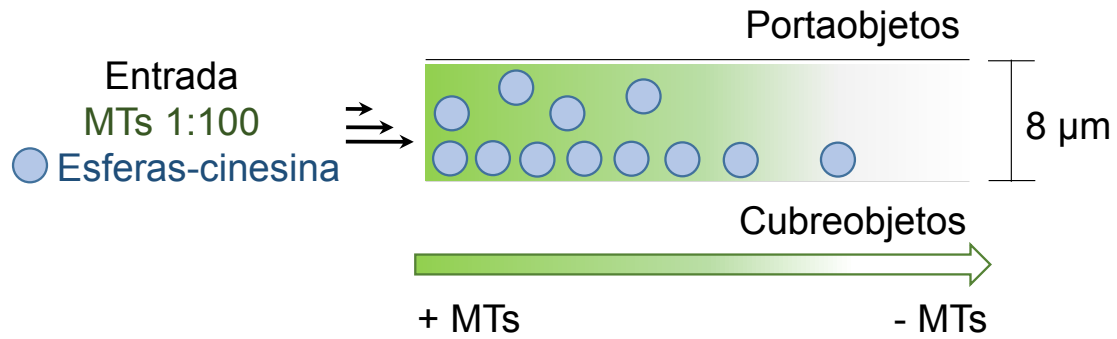


Fig. IS7. Representación de la distribución de MTs y esferas a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto. MTs 1:100, BSA 2 mg/mL, poli-L-lisina 2 $\mu\text{L/mL}$. Los MTs y las esferas no llegaron hasta el final del canal, muchas esferas se pegaron al cubreobjetos.

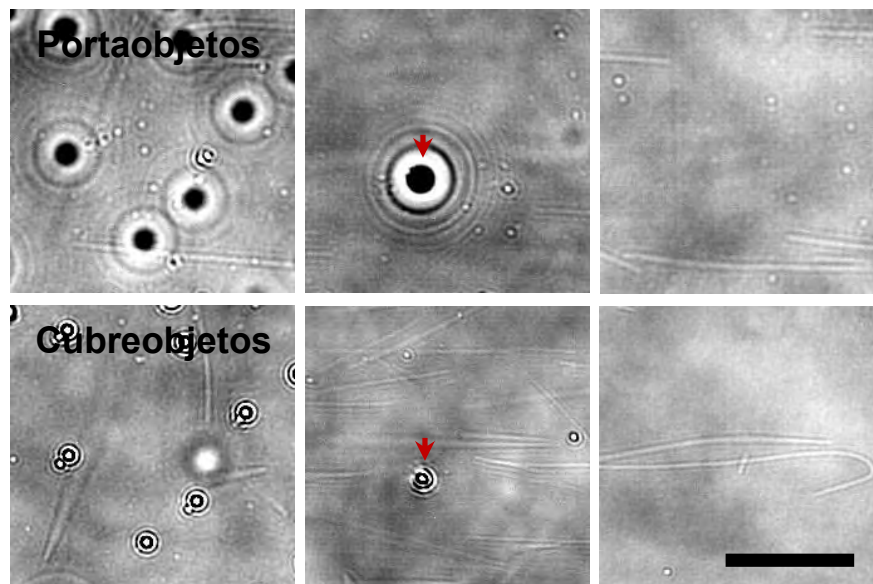


Fig. IS8. Distribución de los MTs y las esferas a lo largo de una microcámara de 8 μm de alto. Estas fotos se tomaron cada ≈ 6 mm a lo largo de la microcámara. Las dos imágenes de cada columna corresponden a la misma posición a lo largo del canal, la diferencia es que las de la fila superior muestran el portaobjetos y las inferiores el cubreobjetos. Los MTs llegaron hasta el final del canal pero las esferas no. Nótese que el portaobjetos está más sucio que el cubreobjetos pero que las esferas se adhieren principalmente al cubreobjetos. MTs 1:100, BSA 2 mg/mL, poli-L-lisina 2 $\mu\text{L/mL}$. Barra: 10 μm

Brevemente podemos comentar que, aumentamos la cantidad de esferas (también de cinesina para respetar la cantidad de motores por esfera) tres o cinco veces, aumentamos la cantidad de MTs y reducimos la concentración de poli-L-lisina a la mitad (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Esto permitió aumentar la posibilidad de tener esferas libres, tener algo más parecido a una red tridimensional y que esta red mantuviera a las esferas protegidas del contacto con ambas superficies cuando entraran por capilaridad a la microcámara.

La poli-L-lisina sí tiene efecto en la adhesión de los MTs, pues cuando los vidrios no se recubrieron con este polímero solamente se adhirieron los extremos de los filamentos (Fig. IS9), con lo que tenemos una red en movimiento (la poli-L-lisina no afectó la adhesión de las esferas). Sin embargo, debido a que el objetivo es hacer el seguimiento de las esferas, este movimiento no es conveniente. Esto porque si el MT en el que una esfera es transportada por la cinesina se mueve mucho, entonces al reconstruir la trayectoria de la esfera habrá una combinación del movimiento dirigido con el movimiento causado por el MT fluctuando en el medio, lo que complicará el análisis de la trayectoria y puede llevar a una mala interpretación del tipo de movimiento (difusión, dirigido o confinado). Por esto utilizamos una concentración de poli-L-lisina intermedia (Figs. IS10 y IS11), lo que además permitió que la cantidad de MTs a lo largo del canal fuera más constante.

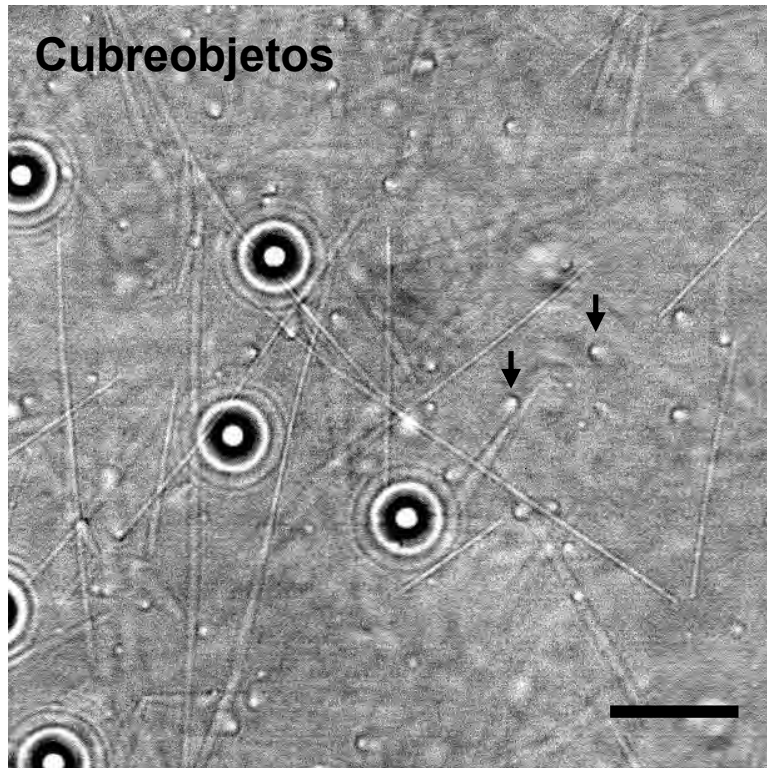


Fig. IS9. Red de MTs con esferas-cinesina en un microcámara de 8 μm de alto sin poli-L-lisina. MTs 1:25; BSA 2 mg/mL. Las flechas indican dos ejemplos de MTs adheridos al cubreobjetos por uno de sus extremos. Barra: 10 μm

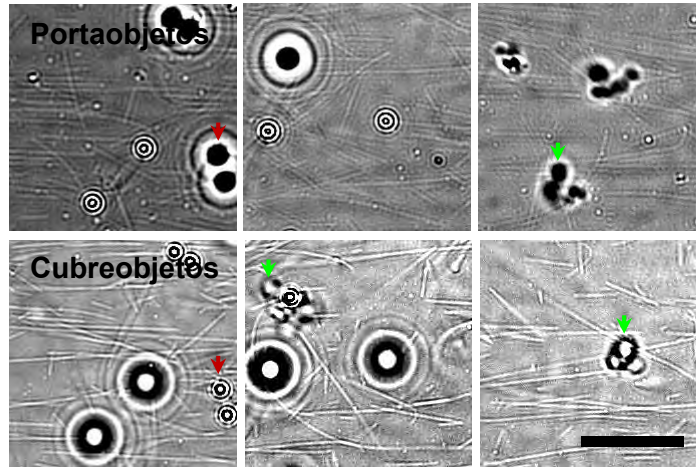


Fig. IS10. Red de MTs con esferas-cinesina en un microcámara de 8 μm de alto. MTs 1:25; BSA 2 mg/mL; poli-L-lisina 1 $\mu\text{L/mL}$. Flecha roja: esfera adherida al cubreobjetos. Aunque nos movamos en el eje z de la microcámara y enfoquemos la superficie del portaobjetos, no la perdemos de vista. Flecha verde: esferas en movimiento, cada flecha señala una esfera individual pero debido a que están difundiendo en la solución, cada esfera parece un aglomerado. Barra: 10 μm

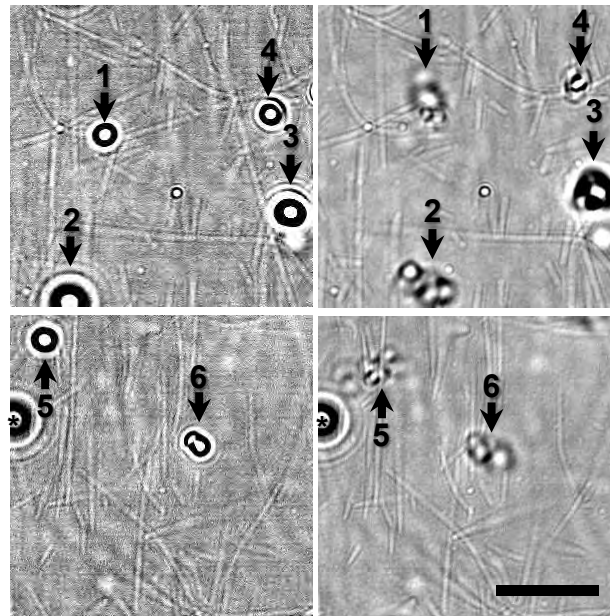


Fig. IS11. Movimiento de las esferas dentro de una red de MTs. Las flechas indican esferas individuales en movimiento difusivo. MTs 1:25; BSA 2 mg/mL; poli-L-lisina 1 $\mu\text{L/mL}$. Barra: 10 μm

5.1.3 El transporte dirigido dentro de una red de MTs no es común. Microcámaras de flujo de 8 μm de alto

Una vez que logramos tener esferas (con cinesina) inmersas dentro de una red de MTs (Figs. IS10 y IS11), observamos el movimiento de las esferas durante 2 h (tiempo de vida de la cinesina a t.a.) por microcámara, pasadas las 2 h aún teníamos esferas no pegadas a los vidrios. Durante este tiempo, elegimos una esfera con cinesina (probada con la pinza sobre un MT) y observamos su movimiento por 5 min. El tipo de movimiento de las esferas dominante fue la difusión, tan sólo ocurrieron ≈ 3 eventos de transporte dirigido por muestra (limitado al campo de visión, no podemos observar toda la muestra al mismo tiempo): unos los observábamos al enfocar la vista en una esfera dada, otros los encontrábamos espontáneamente dentro del campo de visión. También observamos esferas confinadas en la red.

El movimiento de una esfera por motores fue evidente a simple vista dentro de la red, sin embargo, hubo eventos que parecía que la esfera tocaba el MT y disminuía por un diminuto instante su movimiento por lo que hubo duda en cómo clasificar ese movimiento. Entre los pocos eventos de transporte dirigido logramos ver que cuando una esfera llegaba al final de un MT esta se quedaba ahí o se tardaba en disociar; también vimos como los propios MTs pueden ser obstáculos para el transporte, como cuando una esfera paró al encontrarse ante una intersección de MTs (esto también se observó cuando se hicieron los ensayos de motilidad con pinzas ópticas aunque estos eventos no se tomaron en cuenta para medir la procesividad). Es importante decir que estas observaciones son cualitativas, por cuestiones técnicas los eventos ocurridos dentro de la red no se registraron en video.

De esto podemos concluir que aun teniendo más de un motor de cinesina por esfera, es difícil observar eventos de transporte dirigido espontáneos (*in vitro*) dentro de una red tridimensional de MTs. Con respecto al tipo de movimiento de los cargamentos dentro de las células, Zajac *et al.* (2013) investigaron los tipos de

movimientos de los endosomas tempranos en células epiteliales de humano (Arpe-19), y observaron que únicamente el 2% presentó movimiento dirigido (por cualquiera de los tres motores lineales) siendo predominante el movimiento difusivo. Sin embargo, el transporte intracelular es complejo porque puede ser regulado por varios mecanismos.

Por último, es necesaria la disminución de “basuras” para tener imágenes más limpias. Por experiencia sabemos que las “basuras” las aportan entre el portaobjetos y la poli-L-lisina (adheridas), los MTs y la BSA (adheridas y flotantes). Una manera de disminuir las “basuras” es construir cada microcámara con dos cubreobjetos (Fig. IS12) para evitar el uso del portaobjetos, cuyas “basuras” desenfocadas ensucian el campo de visión (Fig. IS13).

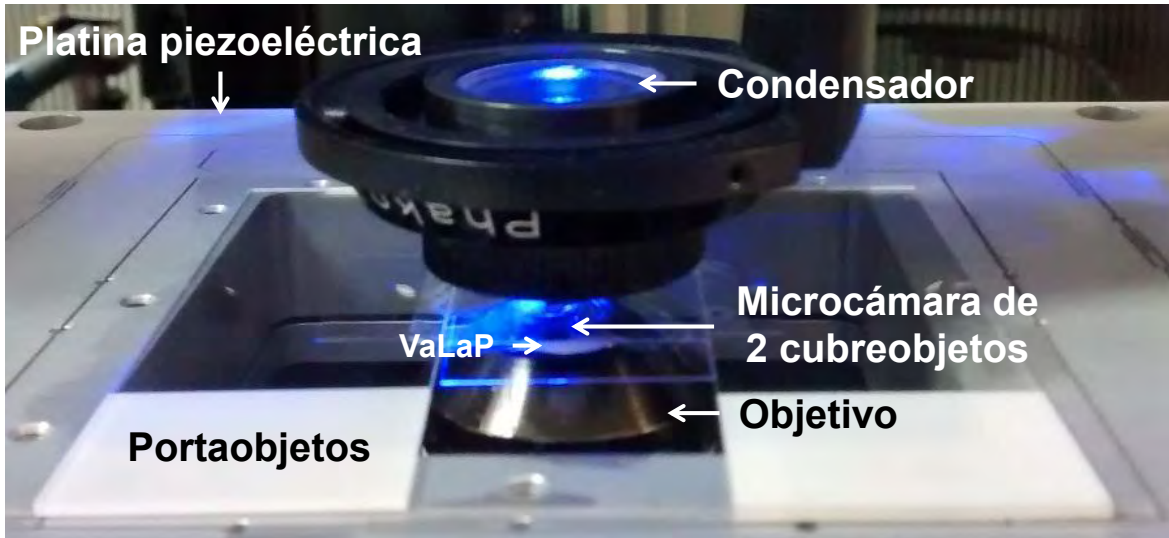


Fig. IS12. Arreglo para la visualización de muestras en microcámaras hechas a partir de 2 cubreobjetos. Los portaobjetos solamente se utilizaron como soporte para la microcámara. El VaLaP es una mezcla de Vaselina, Lanolina y Parafina con la que se sellan ambos extremos de las cámaras de flujo. La platina piezoeléctrica (gris plateado) es controlada por computadora.

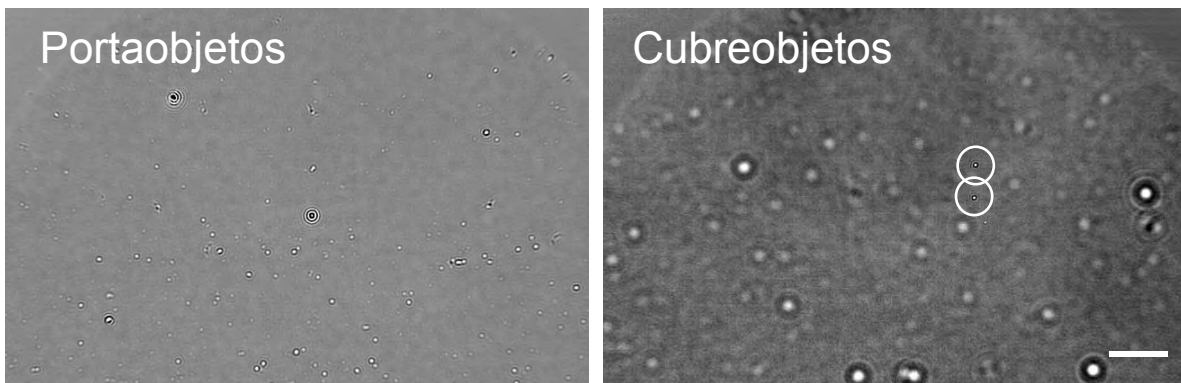


Fig. IS13. Comparación de la superficie de un portaobjetos con la de un cubreobjetos. Ambos vidrios se metieron al limpiador de plasma y con ellos se construyó una cámara de flujo a la que se le fluyó agua MilliQ (que por experiencia sabemos que siempre se ve muy limpia al microscopio) fresca. Es la regla que en la superficie del portaobjetos (esmerilados, Thomas) haya “basuras”, en tanto, el cubreobjetos se ve muy limpio. Los dos círculos indican las dos únicas “basuras” sobre el cubreobjetos dentro del campo de visión, el resto de “basuras” que se observan corresponden a las “basuras” del portaobjetos que se ven grandes porque están desenfocadas. Barra: 10 μm

5.2 Preparación de reactivos de uso común

- ATP (A8937-1G, Sigma) 100 mM. 619.39 g/mol, 6 mL

Pesar 371.634 g de ATP en un vaso de precipitados de 10 mL. Previamente tener el medidor de pH calibrado, KOH 1 M y 10 M y 6 mL de agua MilliQ. Colocar el vaso con el ATP pesado sobre una tapa de caja de Petri con hielo, añadir una mosca magnética. Rápidamente vaciar los 6 mL de agua, agitar con la mosca, sumergir el electrodo y añadir ≈8 gotas de KOH 10 M más ≈16 gotas de KOH 1 M de modo que el pH llegue a 6.9. Mantener en hielo, hacer alícuotas de ≈25 µL y guardar a -20°C

- BSA (Albúmina de suero bovino) fracción V (Calbiochem, 126609-5G) 20 mg/mL, 130 mL:

Pesar 2.6 g de BSA en un tubo de 15 mL. Poner 130 mL de PEM frío en un vaso de precipitados pequeño, poner en agitación con una mosca magnética, poco a poco añadir la BSA esparciéndola sobre toda la superficie (la BSA se agrega al tener contacto con el agua), lavar las paredes del tubo con la misma solución, esperar a que se disuelva bien (tapar el vaso con parafilm). Sonicar en un baño ultrasónico con abundante hielo durante 15 min. Filtrar la BSA con un tamaño de poro de 0.22 µm. Ultracentrifugar la solución a 15,000 rpm (rotor TLA-20) durante 70 min, 4°C. Retirar lentamente el tubo de la ultracentrífuga para evitar que el volumen se mezcle y ponerlo en hielo, cuidadosamente tomar la solución de la parte superior del volumen y hacer alícuotas de 2 mL, enumerar los tubos de acuerdo a como se fueron tomando las alícuotas. Observar al microscopio una muestra de cada alícuota. Mezclar las alícuotas limpias, hacer alícuotas de ≈300 µL y guardarlas a -20°C.

- DTT (ditiotreitól) 0.5 M, ~5 mL.

378 mg DTT (P.M. 154.25; Ultrapuro 15508-013, Invitrogen)
4,904 μ L AcK 10 mM (P1190 - 100G, Sigma Aldrich)
Hacer alícuotas de \approx 6 μ L en tubos de 0.2 mL, guardar a -20°C

- PEM, 400 mL.

9.6758 g PIPES 80 mM (P1851-100G, Sigma; PM: 302.37)
0.1169 g EDTA 1 mM
0.1523 g MgCl₂ 4 mM (208337-100G, Aldrich; PM: 95.21)
Disolver en \approx 350 mL de agua MilliQ fresca, en un vaso de precipitados con una mosca magnética. Inicialmente el pH es de \approx 3 y el PIPES precipita. Ajustar el pH a 6.9 con KOH 10 M (conforme el pH aumenta la solución se transparenta). Filtrar con un tamaño de poro de 0.22 μ m, hacer alícuotas del volumen deseado y guardar a 4°C

- Sistema glucosa oxidasa-catalasa o *scavenger*, 30 μ L.

Pesar 11.15 mg (192.75 u) de GIOx (G6125-10ku, Sigma) en un tubo de 0.6 mL, añadirle \approx 28 μ L de PEM frío, mezclar brevemente con el mezclador de vórtice (debido a la GIOx la solución se ve amarilla traslúcida). Finalmente, añadir 2 μ L (634.5 u) de catalasa (C3515-10MG, Sigma). Hacer alícuotas de \approx 5 μ L, guardar a -20°C

- Taxol (T7191-5MG, Sigma) 10 mM.

Al frasco nuevo de taxol (5 mg) se le añadieron 586 μ L de DMSO (D8418-50ML Sigma), se agitó con un mezclador de vórtice, se hicieron alícuotas de \approx 3 μ L en tubos de 0.2 mL y se guardaron a -20°C

- Tubulina de bovino (TL238, Cytoskeleton) 10 mg/mL.

Preparar PEM/GTP: 22.5 μ L de PEM más 2.5 μ L GTP 10 mM. Añadir el PEM/GTP a la tubulina (250 μ g), resuspender, lavar bien las paredes del tubo y hacer alícuotas de 5 μ L en tubos de 0.6 mL, hacer todo esto en hielo. Poner los tubos en nitrógeno líquido y guardarlos a -80°C.

- VaLaP.

El VaLaP es una mezcla de Vaselina, Lanolina y Parafina que sirve para sellar las cámaras de flujo. Pesar cantidades iguales de los tres compuestos, ponerlos en un frasco de vidrio pequeño y taparlo con papel aluminio. Bajo constante supervisión, calentar a baja temperatura (mezclar ocasionalmente) hasta que el líquido se vea homogéneo. Dejar enfriar hasta solidificar. Una forma de aplicarlo es “picar” el VaLaP con la punta de una pipeta Pasteur, calentar la punta acercándola a una lámpara de alcohol hasta derretir la cera y aplicar antes de que se enfríe.

5.3 Referencias de Anexos

Fordyce PM, Valentine MT, Block SM (2007) Advances in surface-based assays for single molecules. *Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual*, eds Selvin PR, Ha T (CSHL Press, USA).

Nicholas MP, Rao L, Gennerich A (2014) Covalent immobilization of microtubules on glass surfaces for molecular motor force measurements and other single-molecule assays. *Methods Mol Biol* 1136:137-169