

Ficha técnica

Pinzas ópticas y su aplicación en biología (Optical Tweezers applied to biology)

Por Natalia Wilke

wilke@fcq.unc.edu.ar

Doctora en Ciencias Químicas. Profesora Adjunta, FCQ-UNC

Investigadora Adjunta, CIQUIBIC-CONICET. Departamento de Química Biológica, FCQ-UNC.

Resumen:

La técnica de pinzas ópticas (también llamadas trampas ópticas o láser) combinadas con técnicas de seguimiento de partícula única permiten manipular objetos en la escala nanométrica y determinar fuerzas del orden del piconewton. Dado que los sistemas biológicos se organizan con esa precisión espacial mediante fuerzas de interacción de dicho orden de magnitud, la metodología permite interrumpir o imitar procesos biológicos y así comprender los mecanismos y los principios que los rigen.

La trampa se genera en un punto en el espacio en el que un haz láser es enfocado, debido a la interacción de la radiación electromagnética con la partícula a atrapar. Diferentes diseños experimentales han aportado valiosa información relacionada con el funcionamiento y la energética de procesos realizados por motores moleculares, el plegamiento de diversas macromoléculas así como la plasticidad de la membrana celular.

Aquí se resumirán los fundamentos y montajes de la técnica y sus posibles aplicaciones en biología.

Abstract:

Optical tweezers together with single particle tracking permit to manipulate objects with a nanometer precision, and determining forces in the order of the piconewton. Since the distances involved in the organization of biological systems are nanometric, and the organization is governed by interaction strengths in the order of the piconewton, the methodology have been widely used in the study of biological processes.

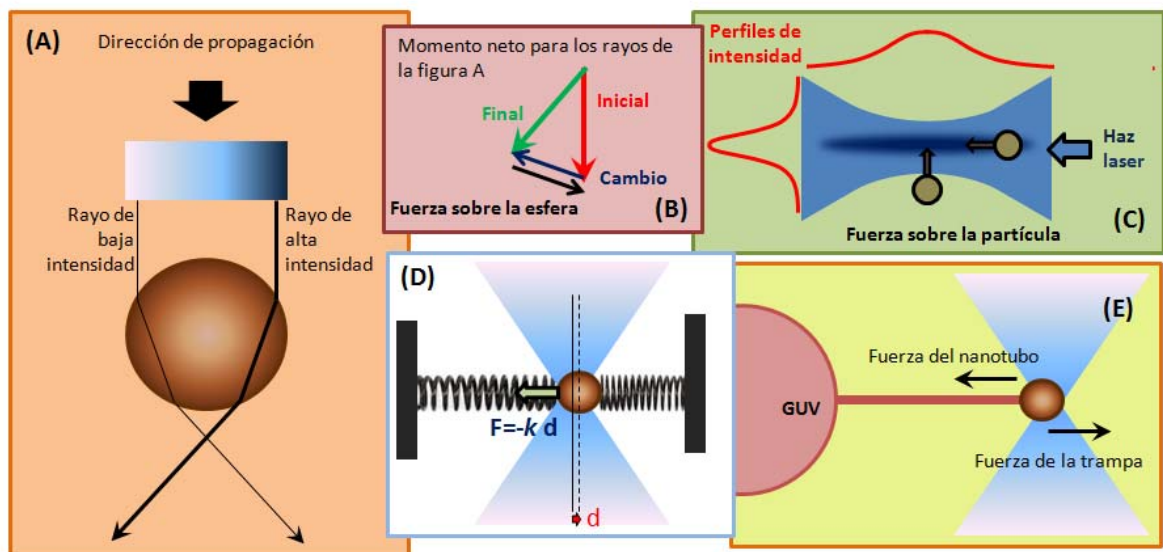
The trap is generated as a consequence of the interaction of the trapped particle with a highly focused laser beam. Valuable information regarding the mechanisms and energetics related with molecular machines has been obtained using different experimental approaches. Also, this methodology has shed light on the folding of macromolecules, cell membrane rheology, among other important aspects of cellular function.

Here, the fundamentals and setup of the technique are briefly commented, and applications in the biological field are described.

Palabras clave

Trampas ópticas, plegamiento de macromoléculas, reología de biomembranas, motores moleculares.

Resumen gráfico



El desarrollo de la técnica de manipulación óptica comenzó en 1986, con los trabajos pioneros de Ashkin [1,2]. En la actualidad, es una técnica muy difundida en diversas áreas de investigación ya que permite la manipulación micro o nanométrica (dependiendo del montaje) de objetos sin dañar la muestra [3]. En particular, el uso de trampas (o pinzas) ópticas ha permitido realizar grandes avances en el área de la biología celular [4]: utilizando pinzas ópticas se han investigado por ejemplo el movimiento, la mitosis, la exocitosis y las propiedades mecánicas de la célula [5,6]. Además, ha sido posible estudiar en detalle la estructuración del DNA, mRNA y proteínas, el proceso de replicación y la actividad de diversos motores moleculares [7].

En esta ficha técnica se describirá brevemente el fundamento del funcionamiento de las pinzas ópticas, los puntos principales a tener en cuenta al montar dicha técnica y sus posibles aplicaciones en biología.

Fundamentos de la técnica

Nos enfocaremos en trampas ópticas formadas por la interacción de radiación electromagnética con una partícula dieléctrica esférica, la cual podría absorber, dispersar, refractar y/o reflejar luz. Si la micro-esfera es elegida adecuadamente, es posible minimizar la reflexión y la absorción y por tanto, despreciar estos procesos. El proceso de dispersión dará lugar a la fuerza conocida como "fuerza de dispersión" (F_d), la cual apunta hacia la dirección de propagación del haz y es proporcional a su intensidad. F_d actúa acelerando la micro-esfera, por lo que una buena trampa óptica requiere que F_d sea baja. La trampa es generada gracias a la llamada "fuerza de gradiente" (F_{grad}), la cual apunta hacia el punto de máxima intensidad del haz (siempre y cuando el índice de refracción de la partícula sea mayor al del medio) y aumenta con el gradiente de intensidad. Esta fuerza puede explicarse utilizando rayos ópticos (fig. A): consideremos una esfera de mayor tamaño a la longitud de onda de la radiación y que no refleje ni absorba luz. La refracción de un haz de luz cuya intensidad varíe en el plano transversal genera un cambio de momento que debe ser balanceado por un cambio de momento en la esfera, lo cual produce la fuerza de gradiente (fig. B). Por tanto, un haz con un perfil de intensidad gausseano atraparía la partícula en el centro (punto de máxima intensidad). Para lograr atrapar a la partícula también en el eje de propagación, es necesario generar un gradiente de intensidad en éste eje,

haciendo converger el haz en un punto en el espacio (fig. C). Con esta geometría se logra una trampa estable en la que cualquier movimiento arbitrario desde su centro genera una fuerza restaurativa. La posición de fuerza cero es un punto cercano al foco.

Para partículas de tamaño similar o menor a la longitud de onda, la aproximación de rayos ópticos no es válida y se han aplicado otros modelos que también llevan a la conclusión de que para generar una trampa estable es necesario que $F_{grad} \gg F_d$ [8].

Para mayores detalles se recomienda las siguientes referencias: [2], un trabajo muy ameno en el que Ashkin cuenta su historia, [3]: un libro dedicado a pinzas ópticas y sus aplicaciones, [4,9], trabajos en donde se resume la técnica y sus aplicaciones en biología y [10], del 2003, aunque tenga sus años, es una buena fuente de bibliografía.

Montaje de la técnica

Si bien existen equipos comerciales, la mayoría de los laboratorios de investigación desarrollan su propio equipo, a un costo significativamente menor. Es muy común acoplar la pinza óptica a un microscopio de fluorescencia, de forma tal de poder utilizar el sistema de detección y los soportes que el estativo proporciona. El desafío a enfrentar es que la trampa no interfiera con el uso normal del microscopio y sea lo más versátil posible, de forma de que pueda ser adaptado para su uso en diferente tipo de experimentos. En la fig. 1 se muestra un ejemplo y en las siguientes referencias se detallan montajes de diversas geometrías: [11-14].

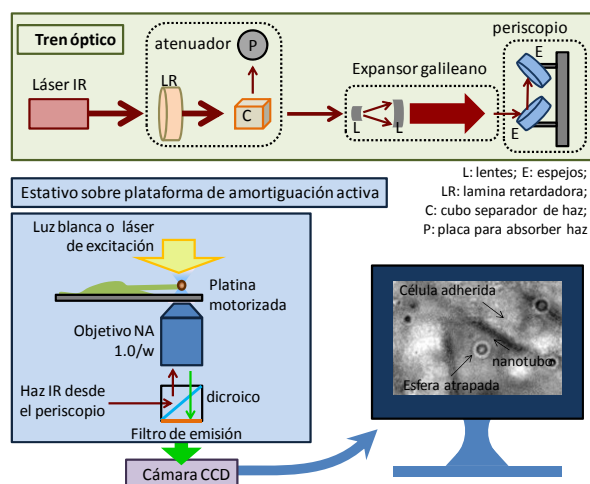


Figura 1. Montaje de una trampa óptica acoplada a un microscopio de fluorescencia invertido

El gradiente de intensidad de luz se logra utilizando un haz láser enfocado con un objetivo, el cual debe tener una apertura numérica de 1 o mayor. La observación puede realizarse por medio de una cámara CCD acoplada al microscopio, preferentemente con buena resolución espacial y temporal. Para el movimiento de la trampa respecto del espécimen es posible mover el haz láser (utilizando espejos en montajes móviles) o mover la muestra (reemplazando la platina del estativo por una platina de movimiento automatizado).

El láser a utilizar debe elegirse de acuerdo al experimento a realizar. En general se utilizan lasers infrarrojos (IR), ya que las muestras biológicas presentan un mínimo de absorción en esta región del espectro electromagnético [12]. Al minimizar la absorción de luz por parte de la muestra se minimizan las posibilidades de dañarla así como también se minimizan los efectos radiométricos (debidos a gradientes de temperatura). Además, el uso de luz IR no interfiere en el empleo de los fluoróforos normalmente utilizados en microscopía de fluorescencia ya que los mismos no absorben ni emiten en estas longitudes de onda.

El potencial que sufre la partícula en la trampa es aproximado como armónico, las fuerzas son proporcionales al desplazamiento de la esfera respecto del punto de fuerza cero. Si se conoce la constante de proporcionalidad (llamada rigidez de la trampa, "k"), es posible calcular la fuerza que soporta la esfera atrapada al desplazarse una distancia d (fig. D). Para ello es necesario calibrar la trampa, lo que puede hacerse utilizando métodos activos o pasivos [15]. Los métodos pasivos requieren determinar la posición de la partícula a altas frecuencias y por tanto, el seguimiento de la posición de la esfera debe hacerse con un montaje adicional ya que la cámara CCD no es suficientemente rápida (ver descripciones del montaje de detección en las referencias [4,9,12,14,16]). Los métodos activos consisten en comparar la fuerza de la trampa con la fuerza viscosa, debido al movimiento de la esfera en el medio (generalmente acuoso).

Las pinzas ópticas pueden ser utilizadas en diversos experimentos, cada uno de ellos requerirá un montaje especial. En la próxima sección se describirán algunos de ellos.

Aplicaciones en sistemas biológicos

En la mayoría de sus aplicaciones, el uso de trampas ópticas implica atrapar una micro-esfera, la que a su vez se encuentra adherida al sistema bajo

estudio. Las esferas utilizadas son de poliestireno o de sílice y también se pueden adquirir recubiertas con ácido carboxílico, grupos aminos o diferentes proteínas como estreptavidina, proteína G, etc. Por otro lado, la derivatización deseada puede realizarse en el laboratorio siguiendo el protocolo adecuado.

Para estudiar el plegamiento de macromoléculas, los extremos de la molécula se unen a dos esferas derivatizadas con "manijas" de ADN, cuyas propiedades mecánicas han sido extensamente estudiadas [17]. Estas manijas permiten distanciar la molécula bajo estudio de las micro-esferas y de esta forma minimizar el efecto de su presencia en los resultados experimentales. Los experimentos usuales consisten en estirar la molécula aumentando la distancia entre esferas a velocidad constante (una posibilidad es atrapar una de las esferas en la trampa y mover la otra agarrándola con una micropipeta de vidrio) y determinar la fuerza ejercida por la molécula. Así se obtienen curvas de Fuerza-extensión de donde es posible obtener los parámetros cinéticos y termodinámicos del proceso de plegamiento [18]. Estas curvas representan la trayectoria de un proceso que involucra una molécula única, por lo que permiten probar teorías de fluctuaciones válidas en el límite de baja disipación [19-22].

En cuanto al estudio de motores moleculares, se han utilizado diversos diseños experimentales que han permitido, por ejemplo, comprender en detalle el movimiento de quinesinas sobre microtubulos, entre otros [23].

Las pinzas ópticas también han sido aplicadas en el estudio de las propiedades mecánicas de diversos modelos de biomembranas así como de membranas celulares *in vivo*. Como modelos se han utilizado monocapas de surfactantes en la interface agua-aire (*Langmuir monolayers*, LM) y vesículas unilamelares gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles*, GUVs).

Para el estudio de LM, las pinzas deben acoplarse a una balanza de Langmuir, mientras que las LM se preparan agregando micro-esferas de poliestireno o de sílice, las cuales quedan atrapadas en la interface [24]. El uso de pinzas ópticas ha permitido conocer la viscosidad en diferentes LM [25] y la interacción lateral entre dominios lipídicos presentes en sistemas con coexistencia de fases [26] así como la tensión de línea de dichos dominios [27].

Utilizando pinzas ópticas en GUVs es posible estudiar la energética de deformación de la membrana fuera del plano. El experimento usual consiste en generar una GUV con un bajo

porcentaje de un lípido que tenga unida una molécula de biotina en su grupo polar e inmovilizarla con una micropipeta de vidrio. Posteriormente, una micro-esfera recubierta con estreptavidina y atrapada con la pinza es acercada e interacciona con la GUV y luego es alejada, generando un tubo de membrana de diámetro nanométrico (fig. E). La curva de fuerza-extensión correspondiente a la generación del nanotubo muestra que este es un proceso activado. Luego del máximo, el nanotubo puede prolongarse a fuerza constante, cuyo valor depende de los parámetros reológicos que caracterizan la membrana [28]. Los resultados experimentales utilizando GUVs como sistemas modelo muestran un buen acuerdo con la teoría [29,30].

En estudios de membrana celular *in vivo* se debe tener en cuenta que la interpretación de los resultados es más compleja debido a la gran cantidad de especies químicas que componen la membrana celular y a la presencia de la matriz extracelular y del citoesqueleto que provee sitios de anclaje a las moléculas de la membrana, siendo por tanto un sistema altamente fluctuante tanto espacial como temporalmente. A diferencia de lo encontrado en GUVs de composiciones conocidas, en membrana de célula de mamífero la fuerza necesaria para generar nanotubos es un parámetro de gran dispersión, presenta una ancha distribución de valores, entre 10 y 50 pN [31]. Cuando se altera la interacción entre la membrana y el citoesqueleto, la distribución se estrecha y se corre a valores más bajos (entre 10 y 30 pN) ya que en estos experimentos no se muestrean las regiones que se encuentran interaccionando fuertemente con el citoesqueleto [31].

Las pinzas ópticas han sido aplicadas también para estudiar el movimiento de especies insertas en la membrana celular ya que posibilitan explorar regiones que un experimento pasivo exploraría con muy baja probabilidad. Estos experimentos se realizan uniendo una nano o micro-esfera a la molécula de interés. Por ejemplo, se ha estudiado el movimiento del receptor de transferrina, que se encuentra inserto en la membrana y puede ser marcado con esferas cubiertas por transferrina [32]. Las esferas actúan como "manija", al ser atrapadas por la pinza permiten mover la molécula a lo largo de la superficie celular, mientras se registra la fuerza necesaria para el movimiento en diferentes regiones.

En resumen, se ha dado una serie de ejemplos de aplicaciones de pinzas ópticas junto

con la bibliografía relacionada. Sin embargo, esta es una muy breve descripción y es mucho lo hasta ahora explorado, así como también lo que hay por investigar utilizando trampas ópticas.

Agradecimientos

El equipo de pinzas ópticas del Dpto. de Química Biológica se ha montado gracias al apoyo del CIQUIBIC, al aporte financiero de SeCyT-UNC, FONCyT y CONICET, la fundación Fullbright y del Sistema Nacional de Microscopía. Agradezco especialmente al Dr. Maggio por su apoyo incondicional y a los Dres. Bustamante y Fischer.

Bibliografía

- [1] A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, Steven C., Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, *Optics Letters* 11 (1986) pp. 288-290.
- [2] A. Ashkin, History of Optical Trapping and Manipulation of Small-Neutral Particle, Atoms, and Molecules, *IEEE JOURNAL ON SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS* 6 (2000) pp. 841-855.
- [3] *Methods in Cell Biology*, 1997. Sheetz, M.P. (Ed) Elsevier.
- [4] K. Svoboda and S.M. Block, Biological applications of optical forces, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23 (1994) pp. 247-85.
- [5] K. Dholakia, P. Reece, M. Gu, Optical micromanipulation, *Chem Soc. Rev.* 37 (2008) pp. 42-55.
- [6] P. Pascoal, D. Kosanic, M. Gjoni, H. Vogel, Membrane nanotubes drawn by optical tweezers transmit electrical signals between mammalian cells over long distances, *Lab Chip.* 10 (2010) pp. 2235-2241.
- [7] S. Hormeno and J.R. Arias-Gonzalez, Exploring mechanochemical processes in the cell with optical tweezers, *Biol Cell* 98 (2006) pp. 679-695.
- [8] A. Salandrino, S. Farfad, D.N. Christodoulides, Generalized mie theory of optical forces, *J. Opt. Soc. Am. B* 29 (2012) pp. 855-866.
- [9] J.R. Moffitt, Y.R. Chemla, S.B. Smith, C. Bustamante, Recent advances in optical tweezers, *Annu. Rev Biochem.* 77 (2008) pp. 205-228.
- [10] M.J. Lang and S.M. Block, Resource Letter: LBOT-1: Laser-based optical tweezers, *Am. J. Phys* 71 (2003) pp. 201-215.
- [11] W.M. Lee, P.J. Reece, R.F. Marchington, N.K. Metzger, K. Dholakia, Construction and calibration of an optical trap on a fluorescence optical microscope, *Nat. Protoc.* 2 (2007) pp. 3226-3238.

- [12]K.C. Neuman and S.M. Block, Optical trapping, *Rev. Sci Instrum.* 75 (2004) pp. 2787-2809.
- [13]S.P. Smith, S.R. Bhalotra, A.L. Brody, B. Brown, E.K. Boyla, M. Prentiss, Inexpensive optical tweezers for undergraduate laboratories, *Am. J. Phys.* 67 (1998) pp. 26-35.
- [14]S.B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum, *Methods Enzymol.* 361 (2003) pp. 134-162.
- [15]J. Baek and Y. Lee, Trap stiffness in optical tweezers, *Asian Symposium for Precision Engineering and Nanotechnology* (2007) p.-1.
- [16]J.R. Moffitt, Y.R. Chemla, D. Izhaky, C. Bustamante, Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) pp. 9006-11.
- [17]C. Bustamante, Z. Bryant, S.B. Smith, Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics, *Nature* 421 (2003) pp. 423-427.
- [18]M. Manosas and F. Ritort, Thermodynamic and kinetic aspects of RNA pulling experiments, *Biophys J.* 88 (2005) pp. 3224-3242.
- [19]D. Collin, F. Ritort, C. Jarzynski, S.B. Smith, I. Tinoco, Jr., C. Bustamante, Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies, *Nature.* 437 (2005) pp. 231-234.
- [20]E.H. Trepagnier, C. Jarzynski, F. Ritort, G.E. Crooks, C.J. Bustamante, J. Liphardt, Experimental test of Hatano and Sasa's nonequilibrium steady-state equality, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) pp. 15038-41.
- [21]C. Bustamante, J. Liphardt, Ritort F., The nonequilibrium thermodynamics of small systems, *Physics Today* (2005) pp. 43-48.
- [22]J. Liphardt, S. Dumont, S.B. Smith, I. Tinoco, Jr., C. Bustamante, Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski's equality, *Science* 296 (2002) pp. 1832-1835.
- [23]F.M. Fazal and S.M. Block, Optical tweezers study life under tension, *Nat. Photonics.* 5 (2011) pp. 318-321.
- [24]S. Wurlitzer, C. Lutz, M. Liley, C. Duschl, Th.M. Fischer, Micromanipulation of Langmuir-Monolayers with Optical Tweezers, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) pp. 182-187.
- [25]P. Steffen, P. Heinig, S. Wurlitzer, Z. Khattari, Th.M. Fischer, The translational and rotational drag on Langmuir monolayer domains, *J Chem Phys* 115 (2001) pp. 994-997.
- [26]S. Wurlitzer, H. schmiedel, Th.M. Fischer, Electrophoretic Relaxation Dynamics of Domains in Langmuir Monolayers, *Langmuir* 18 (2002) pp. 4393-4400.
- [27]S. Wurlitzer, Steffen P., T.M. Fischer, Line tension of Langmuir monolayer phase boundaries determined with optical tweezers, *J Chem Phys* 112 (2000) pp. 5915-5918.
- [28]I. Derenyi, G. Koster, M.M. van Duijn, A. Czovek, M. Dogterm, J. Prost, Membrane Nanotubes, in: H.Linke and A.Mansson (Eds.), *Controlled Nanoscale Motion*, 2007, pp. 141-159.
- [29]A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, B. Goud, Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules, *EMBO J* 24 (2005) pp. 1537-1545.
- [30]D. Cuvelier, I. Derenyi, P. Bassereau, P. Nassoy, Coalescence of membrane tethers: experiments, theory, and applications, *Biophys J.* 88 (2005) pp. 2714-2726.
- [31]M. Sun, J.S. Graham, B. Hegedus, F. Marga, Y. Zhang, G. Forgacs, M. Grandbois, Multiple membrane tethers probed by atomic force microscopy, *Biophys J.* 89 (2005) pp. 4320-4329.
- [32]Y. Sako and A. Kusumi, Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether, *J. Cell Biol* 129 (1995) pp. 1559-1574.