



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UN MODELO DINÁMICO DEL TRANSPORTE DE
CINESINA SOBRE MICROTÚBULOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:

ALVARO HERNÁN CREVENNA ESCOBAR

ASESOR: DR. JOSÉ LUIS MATEOS TRIGOS

MÉXICO D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A la mujer que no sólo me dio la vida,
sino también me enseñó a vivirla,
a Laura Escobar.

A las otras dos mujeres que han estado conmigo,
y compartido no sólo un techo
sino que hacen toda una familia,
a Rebeca y Julia.

A los doce biomédicos de la Luz,
con quien compartí 5 años de carrera y de vida,
y ahora comparto sueños e ilusiones.

Agradezco enormemente a mi asesor José Luis Mateos Trigos, quien se sentó conmigo desde el principio a trabajar arduamente. Me explicó y desentrañó a mis ojos desde las Leyes de Newton hasta la ciencia de frontera.

También agradezco a Germinal Cocho, Jaime Lagunez, Marco José, y Armando Gómez Puyou, por los valiosos comentarios y sugerencias que tuvieron hacia este trabajo. Además les agradezco que lo hayan hecho en un espacio de tiempo tan reducido.

Así mismo, muchas gracias a todos aquellos que han contribuido a mi formación, no sólo académica sino como persona: Tonatiuh, Inti, el Negro, Manolo, Dante, el Gato, Ericka, Juan Pablo, Salatiel, Aimeé, Velia, Germi, José Luis y Anaf.

A los que faltan en esta lista, que por memoria y por descuido no están, también, gracias.

INTRODUCCIÓN

...lo cual no quiere decir que la actividad científica no realice, ella misma, altos valores: la entrega a la verdad, la autenticidad, la liberación de la razón. Pero el conocimiento de esos valores no es parte de la ciencia, sino justamente de la sabiduría.

La decisión de consagrarse a la investigación de la verdad no tiene carácter científico, es producto de la sabiduría.

Luis Villoro, "Crear, Saber, Conocer".

Los últimos 10 años han sido de grandes avances, tanto en la física de los sistemas complejos, como en la parte experimental de los llamados motores moleculares. Surgidos los famosos "ratchets" originalmente como un ejemplo de la termodinámica por Feynmann, han desembocado en una rama autónoma de la física. Por otro lado, a partir del descubrimiento de la Cinesina, proteína transportadora de vesículas y cromosomas, la biología celular ha dado pasos enormes hacia el entendimiento de estos pequeños motores. La convergencia de ambas áreas para el esclarecimiento del funcionamiento de este tipo de proteínas, ha sido lento y ha llevado, por un lado a proponer modelos poco realistas; y por otro a desechar cualquier modelo como posible explicación del mundo biológico, que no contenga la gran complejidad del mundo natural. Este trabajo es un pequeño esfuerzo hacia la unión, de los modelos físicos, y el rol biológico de estos motores moleculares. Aunque con sus limitaciones el modelo aquí presentado capta algunas características, al mismo tiempo que revela que hace falta una intensa labor para llegar al menos a una explicación satisfactoria.

CAPÍTULO UNO. MOTORES MOLECULARES

Nos movemos, es un hecho. Desde hace ya varios milenios el hombre se ha preguntado por el origen del movimiento. Poco a poco el conocimiento se ha ido ampliando y cada vez entendemos y explicamos mejor el movimiento. Desde los griegos y la teoría de Ptolomeo para los movimientos celestes, hasta la descripción del movimiento generado por pequeñas moléculas en el interior celular, la concepción del origen y mantenimiento del movimiento ha cambiado profundamente más de una vez. En años recientes, el interés en el movimiento de lo biológico ha crecido enormemente a causa de estudios que han dado a conocer que mucho del comportamiento y arquitectura celular dependen del transporte direccionado de macromoléculas, membranas, o cromosomas dentro del citoplasma. Desde el surgimiento de la microscopía moderna nuestra visión del interior celular se ha transformado radicalmente, de un relativo ambiente estático a uno repleto de componentes móviles e interactuantes. Un transporte ineficiente a causa de trastornos puede ocasionar múltiples alteraciones. Y como todo proceso biológico, eventualmente tiene lugar a nivel molecular. Mutaciones en tres distintas miosinas (la VI, VII, XV) resultan en sordera (97-101), la pérdida de la miosina V en defectos inmunológicos y de pigmentación (102), y mutaciones en la cinesina II conlleva a situs inversus, i.e. localización inadecuada de los órganos internos (103,104).

Los movimientos musculares así como de las pequeñas cargas intracelulares, son llevados a cabo por motores moleculares que se mueven unidireccionalmente sobre polímeros proteicos, ya sea de actina o microtúbulos. En este capítulo se discutirá de manera general a los motores moleculares, y las posibles interacciones entre cinesinas y microtúbulos; dejando a la cinesina para el capítulo siguiente.

Actualmente un motor molecular se define genéricamente como una proteína que usa energía en la forma de adenosín trifosfato (ATP) para generar movimiento a lo largo de vías filamentosas o polímeros proteicos. La vía, ya sea actina o microtúbulos, es un polímero helicoidal que tiene una polaridad intrínseca. Históricamente, los dominios motores son conocidos como cabezas (basados en los análisis bioquímicos iniciales de la miosina músculo-

esquelética de conejo II), y éstas están unidas a una gran variedad de "colas" C-terminales o N-terminales a través de una región "cuello". Las colas dictan si la proteína motora es un dímero o un monómero y se presume que tienen un rol esencial en dirigir la localización dentro de la célula (1,2).

Para el entendimiento de cómo operan los motores moleculares se requieren conceptos mecánicos como fuerza, elasticidad, amortiguamiento, y trabajo. Aunque estos conceptos pueden ser encontrados en los libros de texto de nivel superior de física (e.g., Serway, 1997; Feynmann, 1987) hay un problema. Estos textos tratan principalmente con sistemas macroscópicos como bolas de billar y balas de cañón, cuyos movimientos son cualitativamente distintos de las altamente amortiguadas y dirigidas por difusión, moléculas aisladas. Puede parecer obvio cómo calentando un gas se crea presión en un pistón, pero ¿cómo una proteína genera fuerza? La falta de textos sobre mecánica de sistemas pequeños está en fuerte contraste con la situación para neurobiólogos. Hay varios excelentes libros que explican los conceptos eléctricos como voltaje, resistencia, y capacitancia, y cómo se aplican éstos a las células y membranas (170-173).

El problema es aún más serio cuando queremos ver en la interacción entre la mecánica y la química. La electroquímica es un campo maduro, y excelentes tratamientos de la ecuación de Nernst y similares pueden ser encontrados en libros de Físico-química. Esto provee de un marco teórico sólido para el entendimiento de las bombas iónicas, canales iónicos, e incluso el transporte electrónico. Pero la "mecanoquímica" no es mencionada en los textos de físico-química: La Biomecánica no tiene fundamento molecular. Un intento de continuar con el comienzo de ese camino, es este trabajo.

Sin importar el hecho de que las proteínas motoras han sido el foco de un intenso estudio por casi la mitad de un siglo, una de las más importantes preguntas sigue sin haberse resuelto, es cómo la energía química en forma de ATP es convertida a movimiento. La cual puede ser extendida: ¿Cuál es la secuencia de los cambios estructurales que producen el desplazamiento neto? ¿Cómo se conecta esa secuencia con la hidrólisis del ATP? ¿Cómo los cambios conformacionales proteicos hacen trabajo mecánico? ¿Existe un mecanismo general que pueda describir en términos sencillos las distintas caminatas? ¿Cuál es el rol de las fluctuaciones térmicas en la generación de fuerza? A lo largo de este trabajo iré delimitando las características esenciales que se requieren a mi juicio para describir de manera general la caminata de cinesina sobre los microtúbulos. Desde la revisión de la estructura tridimensional de la proteína hasta

cuales han sido las distintas aproximaciones al problema del transporte en potenciales asimétricos.

Existen hasta ahora tres clases conocidas generales diferentes de proteínas motoras que se mueven a lo largo de vías, ya sean de actina o microtúbulos –las miosinas que se mueven sobre filamentos de actina (2) y las kinesinas y dineínas que se mueven sobre microtúbulos (1). Las dineínas están relativamente más conservadas que las miosinas o las kinesinas, existen sólo dos tipos: citoplásmicas y axonémicas (3,4). En contraste, análisis filogenéticos de las kinesinas y miosinas conocidas, usando su respectivo dominio motor, han revelado que hay al menos 15 clases diferentes de miosinas y al menos 13 clases distintas de kinesinas (1,2). La convención aceptada es asignar a cada clase un numeral romano basado en el orden de su descubrimiento (e.g. miosina I, kinesina I, etc.).

Una diferencia fundamental entre motores moleculares es la estructura tridimensional o plan corporal de cada una. Con una sólo excepción, las miosinas tienen el dominio motor en la parte N-terminal de la proteína (96). Mientras que las kinesinas tienen el dominio motor pudiendo estar en tres posiciones distintas, N-terminal, C-terminal o en el centro de la molécula (1), véase figura 1-1.

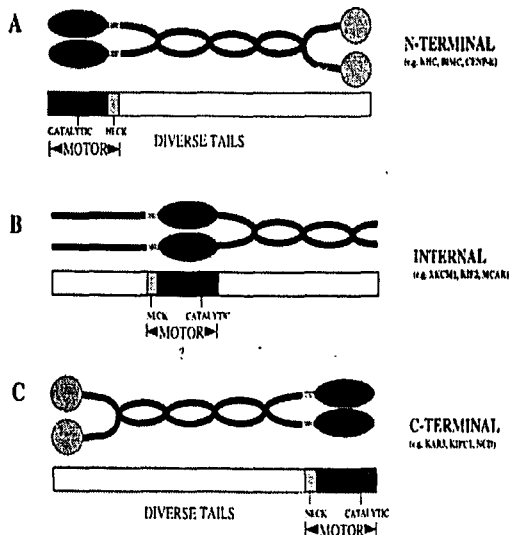


Figura 1-1 Taxonomía de kinesinas.

Otra diferencia es el carácter de la cola terminal en ambas proteínas. La región cola de un miosina puede ser comprendida dentro una amplia gama de dominios de otras proteínas, como homólogo-*src* 3 (SH3), el dominio que activa la GTPasa para la proteína G pequeña rho, el dominio de homología a plekstrina (PH), el dominio de homología a talina, etc.

Un avance excitante durante la década pasada fue el reconocimiento de que existen variadas interacciones entre los sistemas de transporte celular basados en actina o en microtúbulos. Estos sorprendentes resultados provienen de una elegante observación de Kusnetsov et al. (105) en los cuales vesículas que se mueven sobre microtúbulos pueden cambiar y moverse sobre filamentos de actina. Experimentos más recientes han mostrado que la miosina VI puede unir una proteína que interactúa con microtúbulos CLIP-170 (106), y que la miosina V se puede unir directamente a la kinesina I (107). En adición a esto, se ha probado con melanóforos de *Xenopus*, que fueron capaces de moverse a lo largo de filamentos de actina, así como de microtúbulos (ambos in vitro); y han sido implicadas en este movimiento la kinesina II, la dineína citoplásmica y la miosina V(108,109).

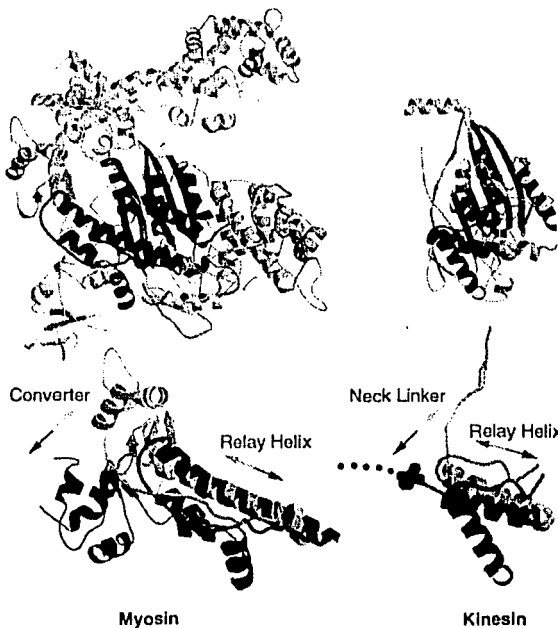
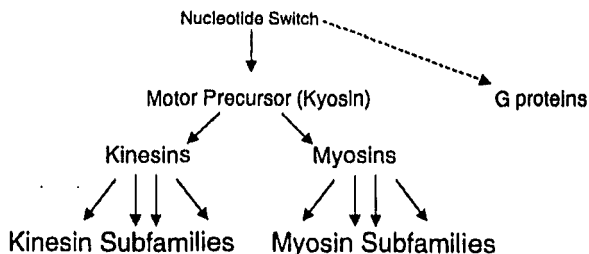


Figura 1-2 Comparación entre la estructura del dominio motor de la miosina y la kinesina.

La estructura cristalográfica de la cinesina reveló una similitud asombrosa con la miosina (figura 1-2), y el sobrelapamiento estructural apuntó directamente a una conservación de secuencias (12,49). Esto sugiere que la miosina y la cinesina se originaron de un ancestro común, el cual a su vez puede ser rastreado aún más lejos en la evolución a un predecesor proteico que también dio lugar a la superfamilia de proteínas G (114). La figura 1-3 muestra una posible evolución de los motores moleculares. Una mejor y más profunda visión de la función de los motores moleculares y de su evolución ha provenido de los recientes esfuerzos de secuenciación, los cuales han descubierto un gran número de genes de miosinas y cinesinas (>50 de cada una en el genoma de mamíferos).

Evolution of Motor Proteins



Examples of Kinesin Subfamilies

	<u>Direction</u>	<u>Processivity</u>	<u>Biological Activities</u>
Conventional (Dimer)	Plus End	Yes	Membrane Transport
Ncd (Dimer)	Minus End	No	Meiotic/Mitotic Spindle Function

Examples of Myosin Subfamilies

	<u>Direction</u>	<u>Processivity</u>	<u>Biological Activities</u>
Myosin I (Monomer)	Barbed End	No	Cell Motility/Membrane Functions
Myosin II (Dimer)	Barbed End	No	Muscle Contraction/Cytokinesis
Myosin V (Dimer)	Barbed End	Yes	Membrane/mRNA Transport
Myosin VI (Dimer)	Pointed End	Unknown	Membrane Transport

Figura 1-3 Evolución de las proteínas motoras.

1.1 Microtúbulos.

Los microtúbulos son polímeros largos, rígidos, que se extienden a través de todo el citoplasma y organizan la localización de los organelos membranosos y de otros componentes celulares (Figuras 1-4, 1-5 y 1-6). Están formados por moléculas de tubulina, la cual a su vez es un heterodímero de dos subunidades, la α -tubulina y la β -tubulina. Cada subunidad de monómero de tubulina es un elipsoide compacto de dimensiones 460 x 400 x 650 nm (alto, ancho y

profundo, respectivamente). Los filamentos α y β son muy similares, siendo el dímero de 460 x 800 x 650 nm (48).

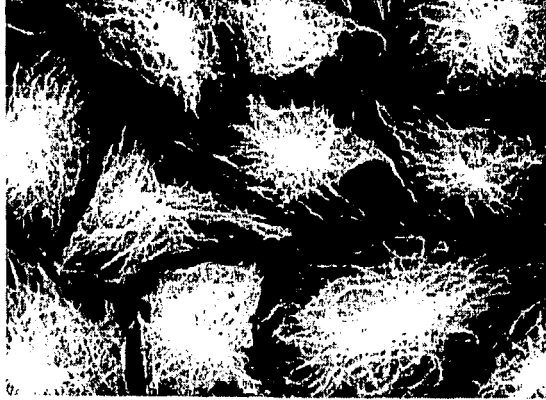


Figura 1-4 Distribución de los microtúbulos dentro de las células.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Están virtualmente presente en todas las células eucariotes. Un microtúbulo puede ser considerado como una estructura cilíndrica, en la cual los heterodímeros de tubulina están empaquetados alrededor de un núcleo central. La estructura está construida de 13 protofilamentos lineales, cada uno compuesto de una alternancia de subunidades α - y β -tubulina y agrupadas en forma paralela para formar un cilindro. Dado que los 13 protofilamentos están alineados en paralelo con la misma polaridad, el microtúbulo entero es una estructura polar, y es posible distinguir un extremo "más" (que crece rápido) y uno "menos" (que crece lento) (figura 1-5(b)).

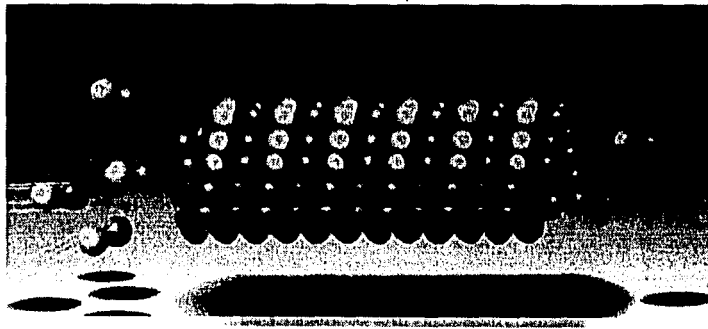
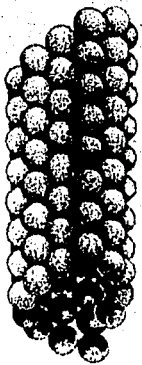


Figura 1-5 (a) Un microtúbulo; y (b) Simulación de elongación de un microtúbulo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

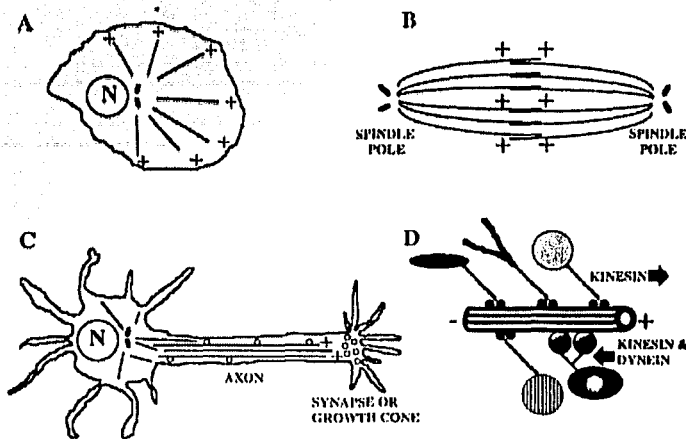


Figura 1-6 Arreglo de los microtúbulos dentro de distintos tipos celulares (A e.g., fibroblasto y C neurona), disposición dentro de una célula (B) y motores asociados a ellos (D).

La vida media de un microtúbulo es de aproximadamente 10 minutos, mientras que la vida promedio de una molécula de tubulina, entre su síntesis y su degradación proteolítica, es más de 20 horas. Por lo que, una molécula de tubulina participará a lo largo de su vida en la formación y desmantelamiento de varios microtúbulos. Éstos presentan lo que se ha llamado inestabilidad dinámica, que son transiciones de períodos prolongados de polimerización y despolimerización. Para esto se requiere una gran cantidad de energía, que proviene de la hidrólisis de guanósil trifosfato (GTP). El GTP se une a la subunidad β , y cuando una molécula se adiciona al extremo del microtúbulo, esta molécula de GTP se hidroliza. Lo que ocasiona que se debiliten los enlaces entre las subunidades, y se induzca la despolimerización. La inestabilidad dinámica se debe a que hay un retraso de la hidrólisis del GTP después de su ensamblaje. Cuando un microtúbulo crece muy rápido, se van adicionando las moléculas de tubulina al polímero, más rápido de lo que se puede llevar a cabo la hidrólisis del GTP. Esto ocasiona que se forme una especie como de gorra de GTP, lo que ocasiona que más moléculas con GTP se unan, por lo que este extremo tiene a crecer rápido.

Los microtúbulos están generalmente organizados con un patrón estereotípico con respecto a su polaridad intrínseca. En la situación más simple, el extremo menos de los microtúbulos está anclado a los centrosomas o a los polos del huso acromático. Los centrosomas protegen al extremo menos y continuamente participan en la formación de nuevos microtúbulos,

los cuales crecen en direcciones al azar. Cualquier microtúbulo que se encuentre una estructura que estabilice su extremo más, será selectivamente retenido, mientras los otros se depolimerizarán. Los extremos más generalmente radian centrifugalmente al citoplasma, se extienden a la parte central del huso para unirse a los cromosomas, o se extienden a los axones. La mayoría de las células animales están polarizadas, sin embargo, el ensamblaje y desensamblaje de moléculas de tubulina está controlado espacialmente, así los microtúbulos se pueden extender hacia regiones específicas de la célula (figura 1-6). Las subunidades de tubulina que han sido selectivamente estabilizadas son modificadas por acetilación y detirosinación. Estas alteraciones marcan el microtúbulo como "maduro" y provee los sitios para la unión específica de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), las cuales lo estabilizan contra la depolimerización. Esta organización estereotípica de microtúbulos, en combinación con direcciones definidas de generación de movimiento por cada motor dependiente de microtúbulos, limita y en algunos casos definen las funciones (5,7).

1.2 Miosina.

La miosina es largamente conocida por ser un componente crucial en la contracción muscular. Fue la primera proteína motora en ser descubierta (5) y su estudio data desde 1864, y ha servido como modelo para el entendimiento de la movilidad por décadas.

Todas las proteínas motoras de filamentos de actina identificados a la fecha pertenecen a la familia de las miosinas. Fueron originalmente aisladas tomando como base su habilidad para hidrolizar ATP en ADP y Pi cuando se les estimulaba uniéndolas a filamentos de actina, y este permanece aún como un criterio bioquímico útil para su identificación. Es posible observar la actividad motora de las miosinas directamente adsorbiéndolas en un cubreobjetos de vidrio: cuando los filamentos de actina son adicionados conjuntamente con ATP, los filamentos se pueden observar con un microscopio de fluorescencia deslizarse sobre la superficie cubierta de miosinas. La miosina muscular pertenece a la subfamilia de miosinas-II, las cuales tienen todas dos cabezas y una cola larga, como bastón: cada cabeza tiene la actividad motora y de hidrólisis de ATP. Una miosina-II está compuesta de dos cadenas pesadas idénticas, cada una de las cuales está compuesta a su vez por un par de cadenas ligeras. La porción NH₂-terminal de la cadena pesada forma el dominio motor de la cabeza, mientras que el resto COOH-terminal de la cadena forma una α -hélice extendida. Dos cadenas pesadas se asocian enrollando sus dos α -hélices en

con delgados filamentos de actina en el sarcómero, formando la unidad básica de contracción del músculo. Aproximaciones clásicas de biología celular han implicado a la miosina II, por ejemplo, en citocinesis y otros tipos de cambios de forma celular y movimiento. Experimentos con antisentidos y experimentos de knockout génicos en los '80s dieron la prueba genética de que la miosina II es esencial para la citocinesis y el cambio en la forma celular durante el desarrollo de *Dictyostelium*, pero revelaron, sorprendentemente, que las células podían aún migrar sobre superficies en su ausencia (6).

A diferencia de los microtúbulos como se vio anteriormente, los filamentos de actina sobre los cuales actúa la miosina no tienen un arreglo determinado, sino más bien se encuentran de una manera azarosa a través de todo el cortex, con excepción de aquellos que están en contacto con la membrana plasmática (93,94). Todas las miosinas conocidas hasta hace unos años solamente se movían en dirección del extremo más del filamento de actina (95). Ensayos de movilidad in vitro revelaron que la miosina-VI, de hecho, viaja en sentido opuesto hacia el extremo menos de los filamentos de actina (110). Es la única clase de miosina con un injerto en el dominio convertidor, pero ratones a los cuales les falte este gen no sobreviven (97,111).

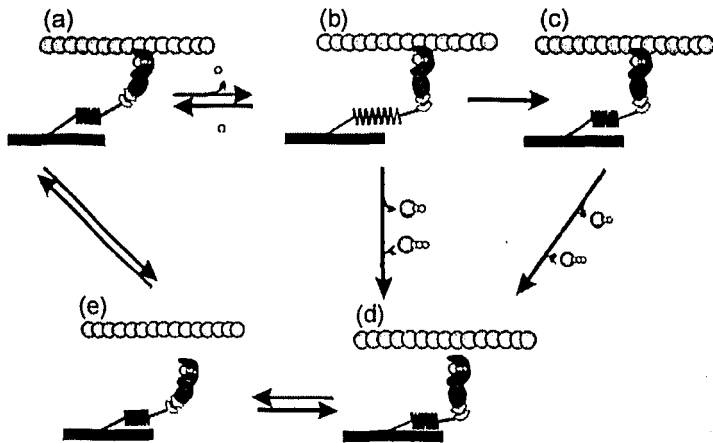


Figura 1-8 Ciclo mecanoquímico de la miosina.

El mecanismo de transducción de energía química derivada de la hidrólisis de ATP para la producción de fuerza y movimiento por la miosina no es entendida del todo (figura 1-8). La

Integración de diferentes aproximaciones ha permitido el establecimiento de un ciclo mecanoquímico de ATPasa de la miosina activado por la actina. De acuerdo a esta hipótesis, la miosina existe en dos estados mientras está fuertemente unida a la actina: uno previo al choque de energía en la región globular, y uno posterior a él. Dado que la miosina está anclada a un filamento grueso por su cola α -helicoidal, la transición del estado pre-choque al post-choque da lugar a un desplazamiento de ≈ 10 nm del filamento de actina relativo al de miosina. El paso 1 involucra la unión de ATP en la dominio globular de la cabeza, el cual resulta suficiente como para generar un cambio conformacional que causa una rápida disociación de la miosina de la actina. El paso 2 es la hidrólisis del ATP en ADP y Pi, los cuales permanecen fuertemente unidos a la miosina. Este complejo ADP · Pi · miosina está en equilibrio rápido con el complejo ADP · Pi · miosina · actina, pero ésta es una interacción de baja afinidad. Este paso es seguido por una transición lenta (paso 3) a una forma activada, donde el complejo miosina · actina es de alta afinidad. El tiempo total del ciclo (t_c) está limitado por el paso 3, y es determinado por cuanto rápido se pasa del estado de baja afinidad al de alta. Esta conversión dispara la liberación del Pi (paso 4), el cual a su vez dispara un cambio conformacional grande (paso 5), el cual da origen al paso en movimiento de 10 nm. Este cambio conformacional hace posible la disociación del ADP. La combinación de los pasos 4 y 5 es referido como el "tiempo que está fuertemente unido" (t_u), dado que la miosina está fuertemente unida a la actina en estos pasos. En el caso de la miosina músculo-esquelética, el t_u es de 2 ms aproximadamente. La disociación del ADP permite la asociación rápida de ATP, donde el ciclo empieza de nuevo (6). Ninguna miosina tiene un motor amino-terminal. Sin embargo, muchas de las miosinas (e.g. clases III, IX y XV) tienen extensiones amino-terminales (2,111,112). Por lo que se puede apreciar en la estructura tridimensional de la miosina-II, los extremos amino y carboxi de centro motor están cercanamente localizados (113). En esta posición, las extensiones amino-terminales específicas de cada clase podrían unirse al convertidor y re-direccionar el movimiento. Alternativamente, adoptando una visión más radical, clases de miosinas con extensiones amino-terminales podrían usar estas regiones como cuellos modificados para redirigir el movimiento de la palanca del brazo.

1.3 Dineína.

Existen dos clases principales de dineínas, las citoplásmicas y las ciliares. Unas involucradas en el transporte de organelos y la mitosis, y las otras son las proteínas motoras en cilios y flagelos.

(1) La dineína citoplásmica (figura 1-8) es un miembro de la superfamilia de las dineínas. Es un complejo multisubunidad masivo (1.2 MD) compuesto de dos cadenas pesadas (≈ 530 kD), tres cadenas intermedias (74 kD), y cuatro cadenas intermediarias ligeras (≈ 55 kD), y se mueve a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo menos. La cadena pesada de la dineína citoplásmica consiste de 4644 aminoácidos en la rata y 4029 en *Dictyostelium* y en la levadura, y contiene un bolso o hueco que une fosfato (asas-P) en la región central. Por la comparación de la estructura primaria de la dineína citoplásmica con la axoplásmica, se predice que la región central y el carboxilo (COOH)-terminal van a formar dominios globulares que interaccionen con los microtúbulos y tengan actividad motora, y que el extremo amino (NH₂)-terminal sea donde se une la carga.

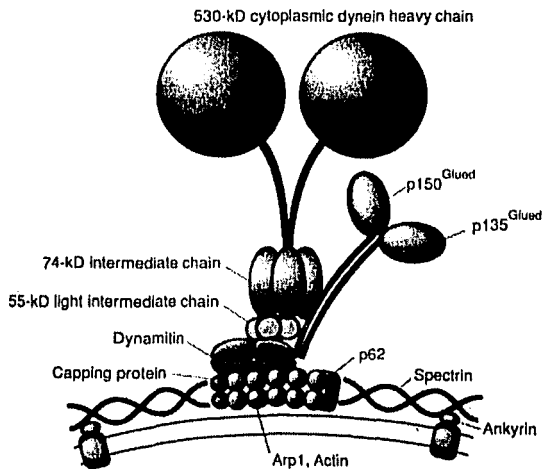


Figura 1-8 Complejo de la dineína, bajo el que funciona el transporte basado en esta proteína.

Además de las cadenas intermedias e intermedias ligeras, la dineína citoplásmica se encuentra asociada con un complejo proteico, dinactina. La dinactina contiene 10 subunidades: p150^{Glued}, p135^{Glued} (una variante específica de cerebro de p150^{Glued}), p62, dinamitina (p50), proteína 1 relacionada a actina (Arp), actina, subunidad α y β de la proteína que pone una gorra a la actina (actin-capping protein α and β subunit), p27 y p24, con una estequiometría de 1:1:1:4:9:1:1:1:1:1. El heterodímero p150^{Glued}-p135^{Glued} forma una proyección del lado del brazo del filamento corto Arp1-actina (37 nm de largo) y dos cabezas pequeñas globulares las cuales

contienen el sitio de unión al microtúbulo. La región NH₂-terminal de p150^{Glued} forma un lado del brazo que interacciona con la cadena intermedia de 74 kD. La dinamitina probablemente une a p150^{Glued} con el filamento corto de Arp1-actina, el cual posiblemente une a la dineína citoplásmica con su carga a través de p150^{Glued}. Así, la dineína citoplásmica, especialmente su cadena intermedia de 74 kD, está probablemente unido a su carga a través del complejo p150^{Glued}-Arp1-actina, y la unión de p150^{Glued} con Arp1 es mediado por dinamitina. Interesantemente, p150^{Glued} puede unirse por sí sólo a los microtúbulos.

El papel que tiene la dineína citoplásmica se ha estudiado a través de análisis inmunocitoquímicos, ensayos de movilidad in vitro, inyección con anticuerpos, y con fraccionamiento subcelular. Todo esto ha sugerido que es un motor de transporte retrógrado de organelos membranosos en axones, como lo es la distribución de endosomas tardíos y lisosomas, la localización centrosomal del Complejo de Golgi, el transporte vesicular de endosomas tempranos a tardíos, el transporte apical de membranas derivadas de Golgi en células epiteliales del intestino, y el movimiento de fagosomas. La inhibición de la actividad de la dinactina a través de la sobrexpresión de dinamitina resulta en la dispersión del Complejo de Golgi, la redistribución de endosomas tempranos y tardíos hacia la periferia celular, y la supresión del transporte del compartimento intermedio del RE a Golgi.

En el presente, muchas cadenas pesadas de dineína han sido identificadas- al menos dos (CyDn y DLP4) en rata, dos (DHC1A y DHC1B) en erizo de mar, y tres (DHC1, DHC2, DHC3) en células HeLa. La cadena pesada de la dineína convencional (CyDn), DHC1A y DHC1 son homólogas y miembros de las familias de la dineína citoplásmica; DLP4, DHC1B y DHC2 son también homólogas entre sí. DHC2 está localizada predominantemente en el Aparato de Golgi, donde la DHC3 está asociada con una estructura todavía no identificada pero que puede ser un representante del transporte intermedio.

Los microtúbulos de un axonema están asociados con numerosas proteínas (5), las cuales se proyectan en posiciones regulares a lo largo del microtúbulo. Algunas sirven como uniones cruzadas que mantienen a los microtúbulos juntos. Otras generan la fuerza que produce el movimiento de doblado, mientras que otras forman un sistema activado mecánicamente de reposicionamiento que controla el movimiento para producir la forma de onda. La más importante de estas proteínas accesorias es la dineína ciliar, cuyas cabezas interactúan con microtúbulos adyacentes para generar la fuerza de deslizamiento entre los microtúbulos. Dado que hay

múltiples contactos entre los dobletes de los microtúbulos adyacentes, lo que sería un movimiento de deslizamiento entre microtúbulos libre, es convertido a un movimiento de doblado en el cilio,

Como la dineína citoplásmica, la dineína ciliar tiene un dominio motor, el cual hidroliza ATP para moverse a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo menos, y una región cola la cual une la carga, la cual en este caso es un microtúbulo adyacente. La dineína ciliar es considerablemente más larga que la dineína citoplásmica, tanto en sus cadenas pesadas y en el número y complejidad de sus cadenas polipeptídicas. En el flagelo del alga verde unicelular *Chlamydomonas*, por ejemplo, la dineína está compuesta de 2 o 3 cadenas pesadas (hay múltiples formas de dineína en el flagelo) y 10 o más polipéptidos pequeños. Nótese que la cola de la dineína ciliar se une solamente al túbulo A y no al B. La resultante asimetría en el arreglo de las moléculas de dineína es requerida para prevenir una inútil batalla entre microtúbulos vecinos.

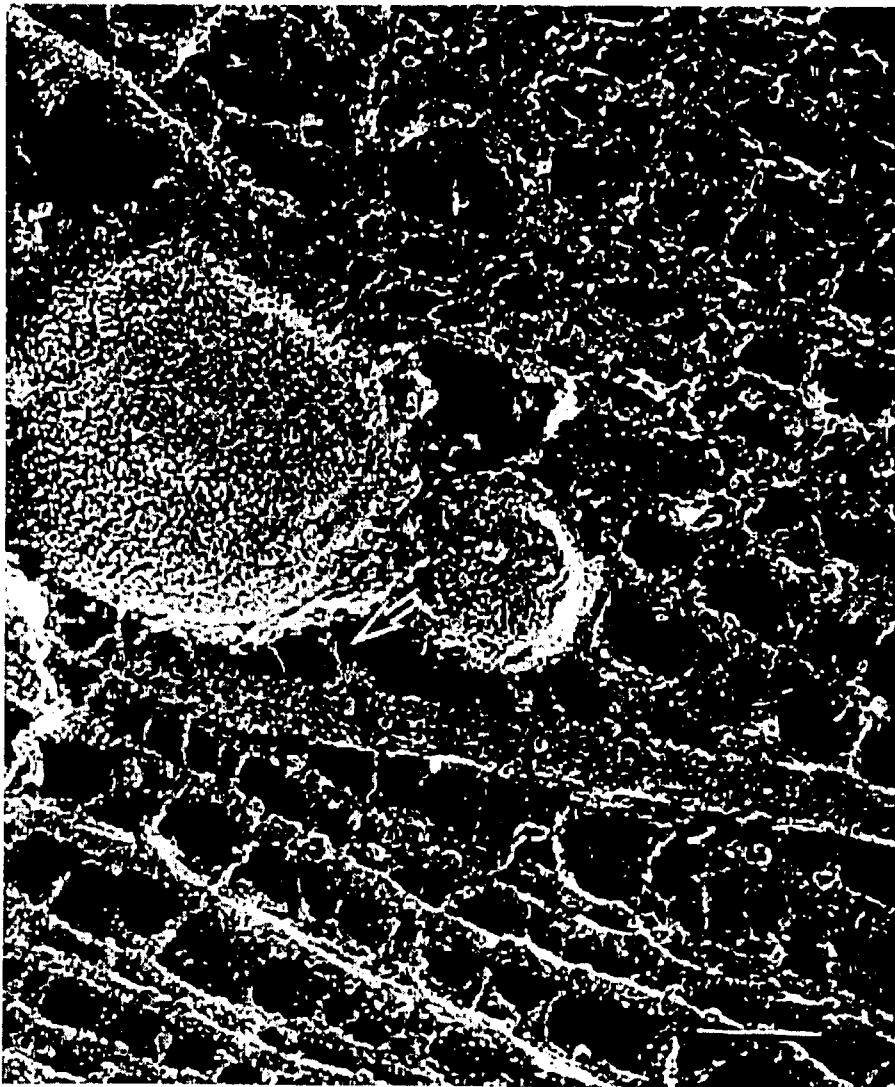


Figura 2-1 Se muestra una cinesina cargando una vesícula en una microfotografía (Pecha).

TESIS CON
FACILIDAD DE ORIGEN

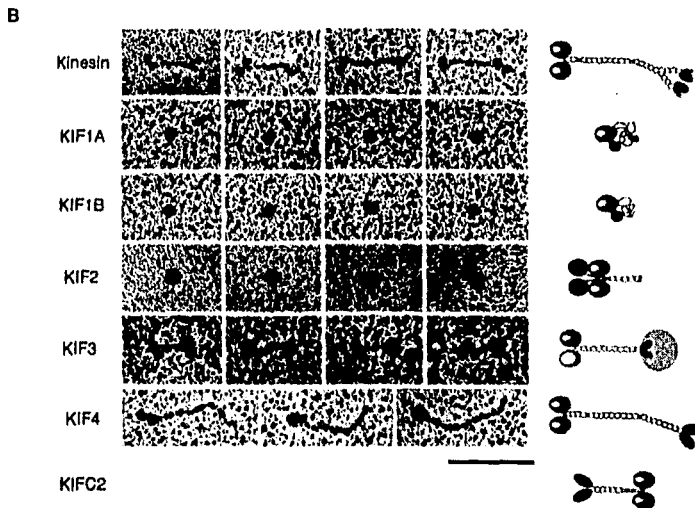
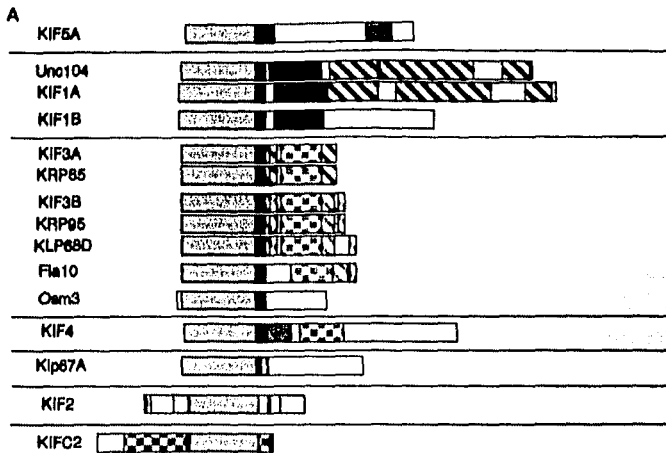
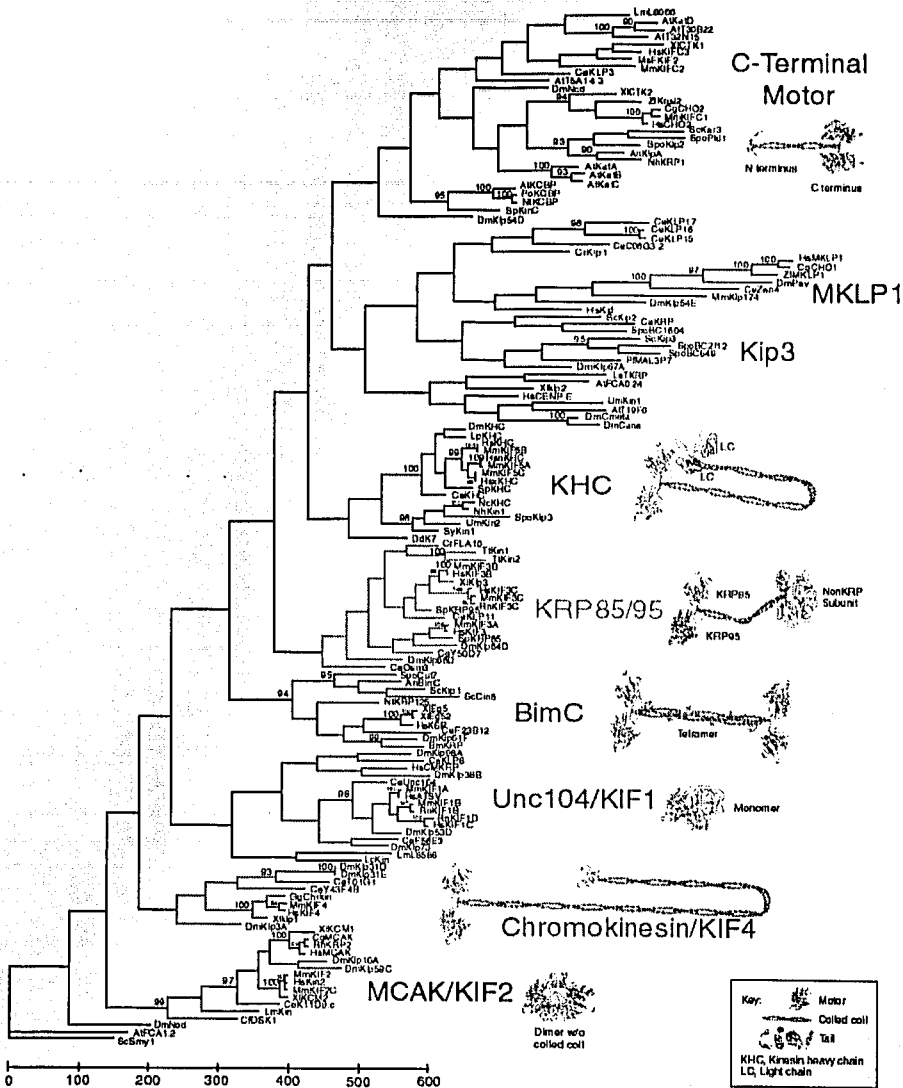


Figura 2-3 Taxonomía, y micrograffas de la familia de las cinesinas. (a) Comparación de la cinesina convencional con otras cinesinas; (b) Micrograffas y estructura propuesta.

A lo largo de esta tesis llamaré cinesinas "más" a aquellas que se mueven en dirección al extremo más de los microtúbulos, y "menos" a aquellas que lo hacen en dirección opuesta. Cinesinas "más" podrían mover a los cromosomas lejos de los polos del huso y vesículas hacia la superficie celular en células no-polarizadas, así como material hacia los botones sinápticos en los

axones. Las cinesinas “menos” podrían en principio mover cromosomas hacia los polos del huso, vesículas hacia los centrosomas (centro celular), y podrían tal vez tener un rol en el transporte axonal retrógrado (7).



A. J. Kim & S. A. Endow July 2000

Figura 2-4 Árbol filogenético de la cinesina.

2.1 Función

Dado que se descubrió la kinesina en sistemas *in vitro* de transporte de organelos en el axoplasma de calamar, se supuso que todas las kinesinas tendrían roles en el movimiento de un cargamento unido fuertemente, como por ejemplo, lo son vesículas, organelos, o cromosomas. Los últimos diez años de trabajo, sin embargo, han revelado una muy amplia variedad de funciones:

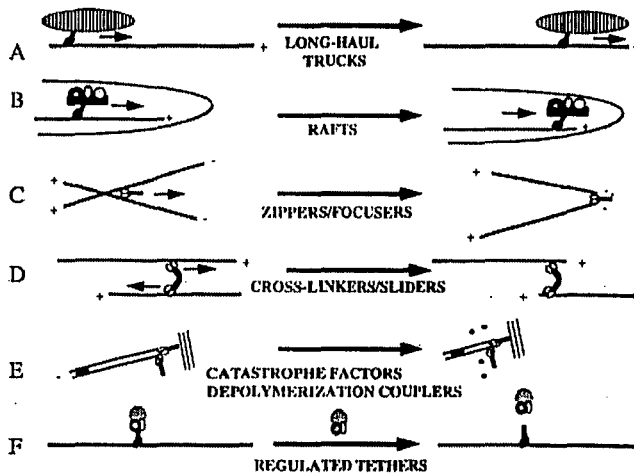


Figura 2-5 Funciones de la kinesina (Véase texto).

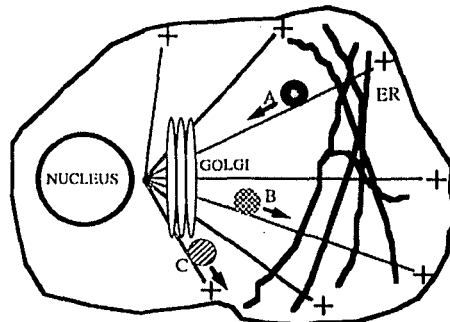


Figura 2-6 Tipos de transporte por kinesina. A, de retículo endoplásmico al aparato de Golgi; B, del aparato de Golgi al retículo; y C, de Golgi a membrana citoplásmica.

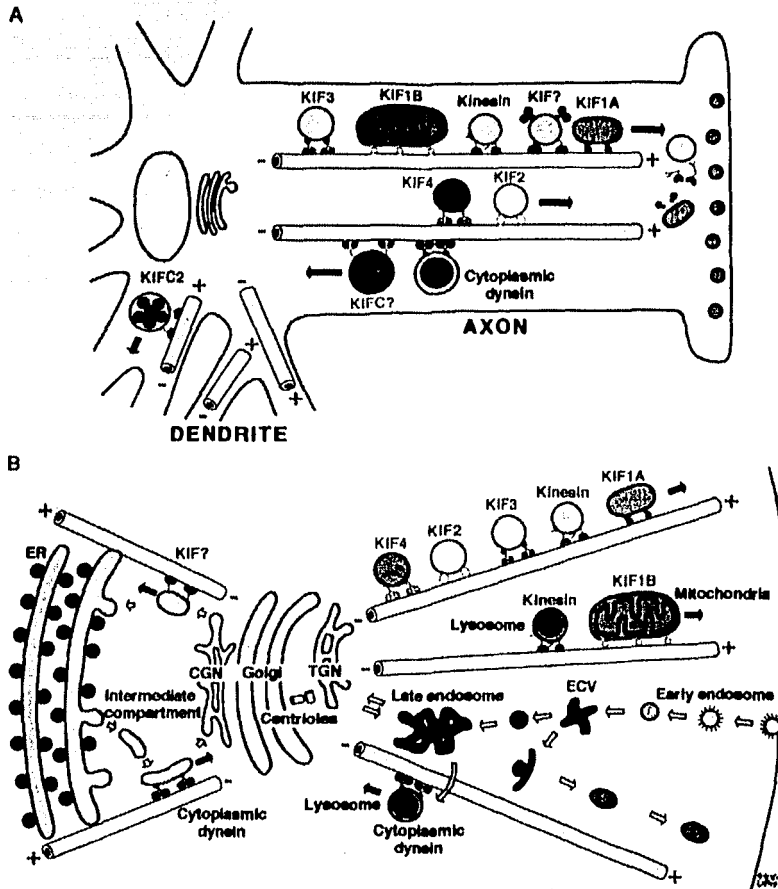


Figura 2-7 Diferentes funciones de las cinesinas y dineina.

2.1.1 Cargamento asociado fuertemente (fig. 2-5A).

La mejor evidencia y conocimiento de este rol lo han proporcionado los lisosomas, melanosomas, precursores de vesículas sinápticas, y cromosomas, donde estudios de localización y función han convergido (7). Se sabe poco de la identidad y no se entiende bien el papel que juegan en la ruta secretora o en el movimiento mitocondrial. Se sabe por ejemplo que la cinesina I tiene un rol importante en el movimiento centrífugo y la localización de los lisosomas lejos del

centro celular; en este mismo sentido la dineína genera movimiento centrípeto de los lisosomas. Existe excelente evidencia bioquímica y funcional de que melanóforos de *Xenopus* utilizan motores de cinesina II para llevar a cabo movimiento radial en melanosomas sobre microtúbulos (7).

El movimiento de vesículas sinápticas, sirve para el acarreo de neurotransmisores a los botones presinápticos, que son liberados cuando llegan los estímulos apropiados. La asociación de cinesinas con este fenómeno emergió gracias a los análisis de mutantes *unc-104* de *C. elegans* y posteriormente de la KIF1A en ratón. En los cuales, al faltar *unc-104* desarrollaban defectos neuromusculares, acumulaban vesículas en el cuerpo neuronal, y exhibían un déficit de vesículas sinápticas en las terminales neuronales presinápticas (13). El homólogo de *unc-104* es KIF1A, el cual parece en su estado natural ser monomérico, y se sugiere que ésta es una característica que define a la familia. Análisis de KIF1A muestran resultados muy parecidos a los de *unc-104* (14).

Muchos miembros de la familia de las cinesinas están involucradas con el movimiento de cromosomas durante la mitosis y la meiosis, así como en la construcción y mantenimiento del aparato del huso acromático. Tenemos por un lado a las cromocinesinas, denominadas así por su localización a lo largo de los brazos del cromosoma durante la mitosis o la meiosis. Estas proteínas incluyen miembros de la familia KIF4, nod y KLP38B de *Drosophila*, y Kid humana. (15-19). Estas proteínas han sido sugeridas como las responsables de empujar a los brazos de los cromosomas lejos de los polos. Por otro lado tenemos a la proteína similar a la cinesina, llamada proteína-E centromérica (CENP-E), la cual une al cinetocoro durante toda la mitosis y microtúbulos de la zona media del huso durante los estadios tardíos de la mitosis (20,21).

La organización de los microtúbulos y de los organelos de la ruta secretora en los más simples tipos celulares fibroblásticos sugieren tres tipos básicos de movimientos que las cinesinas más pueden estar controlando: (a) movimiento del aparato de Golgi al retículo endoplásmico (ER) en una ruta recicladora, aunque falta trabajo para el completo entendimiento del rol de las cinesinas; (b) movimiento hacia el aparato de Golgi, aunque no existe ninguna evidencia que apoye esta proposición; y (c) movimiento del aparato de Golgi a la membrana plasmática u otros destinos celulares, como ha sido demostrado para *Neurospora* (22). Lo que no es claro es que clases de vesículas son movidas por qué cinesinas, y bajo qué circunstancias.

Al menos tres cinesinas de tres familias distintas (KIF1B, KLP67A, y KIF5B) podrían estar involucradas con el movimiento de mitocondrias, el cual es necesario en la mitosis, en

interfase, y en axones neuronales maduros (23-25). Aunque la evidencia no es concluyente y hace falta mayor estudio.

2.1.2 Movimientos de carga ligera asociada a membranas y de proteínas solubles (fig 2-5B).

Aunque el paradigma intelectualmente más sencillo del movimiento por cinesina es la fuerte asociación del motor con un organelo o vesícula, trabajo reciente en células flageladas de *Chlamidomonas* y de otros organismos ha dejado ver otro mecanismo distribuido ampliamente en potencia. El conocimiento de que a lo largo del flagelo es donde se lleva a cabo el transporte de proteínas de membrana y componentes estructurales solubles desde sitios de síntesis en el centro celular hasta los sitios de ensamblaje (en la punta del flagelo), se ha unido con estudios de movimientos de la membrana flagelar a nivel de superficie y de partículas. Que ha dado lugar a una serie de estudios y análisis de estos procesos, los cuales han desembocado en evidencia de un modelo en el cual la cinesina II maneja el transporte de cargas ligeras del soma celular a la punta del flagelo (26), figura 2-8. Estas cargas ligeras son visibles en el microscopio electrónico como estructuras aplanadas de ~40-50 nm de grueso y de 200-300 nm de largo. Estas cargas parecen estar formadas por partículas electrodensas más pequeñas (27). Además, parecen moverse a lo largo del doblete microtubular flagelar externo y por debajo de la membrana, en un proceso llamado transporte intraflagelar (27).

La principal evidencia que soporta este modelo proviene de: (a) la correlación entre el cese de transporte intraflagelar, la desaparición de cargas ligeras en el flagelo, falla de transporte de componentes de dineína a la punta flagelar, y la pérdida de estructura flagelar en los mutantes *fla10* (26-28); (b) análisis de secuencias, que revelaron que el gen *fla10* codifica para la familia KRP85 (cinesina II); (c) análisis bioquímicos demostraron que las proteínas de estas cargas ligeras y la proteína FLA10 se encontraban en el flagelo, y que pequeñas cantidades de FLA10 y componentes de los brazos de dineínas están asociados con complejos de cargas ligeras (26,29). Sin embargo la asociación entre las cargas y los motores moleculares parecen ser muy débiles (26,29). Esta observación sugiere la posibilidad que éstas son interacciones de baja afinidad, lo que tendría una implicación en el control de las velocidades y regulación del movimiento de cargamentos.

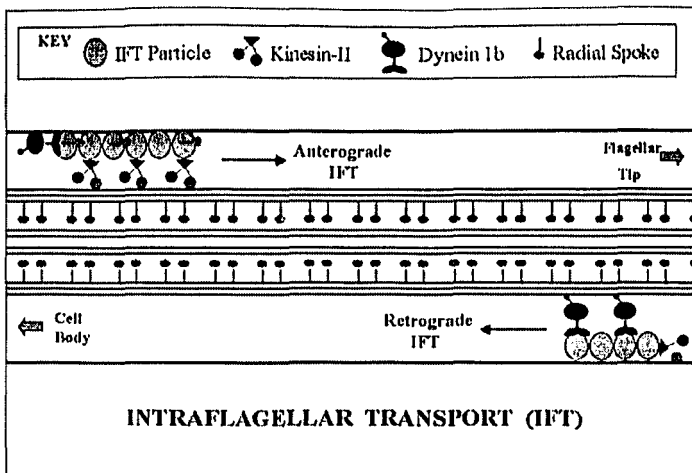


Figura 2-8 Transporte activo intraflagelar, mediado por cinesinas y dineínas.

Pistas que indican que el movimiento de proteínas solubles por cinesina II no es una situación única ha resultado de estudios recientes que usan vimentina marcada con la proteína verde fluorescente (GFP) (30,31). Este trabajo reveló que pequeños puntos de vimentina marcada con GFP pueden ser vistos activamente moviéndose en fibroblastos. Estos puntos se tiñen con anticuerpos contra KHC, y la habilidad de formarse la red de vimentina es inhibida con estos anticuerpos (30). Esto podría sugerir que la cinesina I pudiese estar moviendo constituyentes citoplasmáticos solubles. Conjuntamente con el trabajo de la cinesina II, estos datos sugieren que el movimiento de componentes citoplasmáticos celulares, en ausencia de un transportador dependiente de membrana, son más comunes de lo que originalmente se pensó.

2.1.3 Organización y Control de la dinámica de Microtúbulos (fig 2-5C, D, E).

En cuanto la célula entra a la mitosis debe ensamblarse un huso bipolar en el cual se van a segregar los cromosomas. Este huso bipolar debe entonces elongarse durante la anafase B, cuando la distancia entre los polos del huso aumenta. Muchos tipos de cinesinas parecen tener un rol en estos procesos en virtud de sus actividades de deslizamiento y unión cruzada de microtúbulos.

El primer evento de la mitosis donde la unión cruzada de microtúbulos parece ser importante es durante la profase, cuando los centrosomas se duplican y se separan para formar los polos del huso. Tanto la separación como la continuación de la bipolaridad del huso, el cual se basa en el mantenimiento de la separación, parecen estar basados en el manejo de la cinesina de la unión cruzada y deslizamiento antiparalelo de microtúbulos, nucleados a partir de cada centrosoma. Hay considerable cantidad de evidencia por análisis genéticos, disminución de anticuerpos, e inyección de anticuerpos de que esta función de unión cruzada y deslizamiento es mediada en gran parte por la familia de cinesinas más BimC, tales como, BimC, CIN8, cut7, Eg5, KIP1, KLP61F, y KSP (32-37).

Se piensa que los miembros de la familia BimC, llevan a cabo estas funciones ensamblándose como tetrámeros. Podrían también contribuir al deslizamiento antiparalelo que separa los polos del huso en la fase B de la anafase (33).

Existe un proceso que se genera en los microtúbulos, y es cuando poco a poco se van juntando los microtúbulos como si fuera un cremayera que se va cerrando. Este proceso es conocido en la literatura especializada, como "zippering". Fue primeramente sugerido para dinefina, pero parece también ser mediado por cinesinas. En ciertas circunstancias, por ejemplo en la meiosis femenina de muchas especies, los polos del huso son contruidos en ausencia de centrosomas. En tales situaciones miembros de las familias C-terminales parecen tener un rol prominente. En células de plantas y animales, hay cierta evidencia que le da soporte al zippering microtubular y a la función formadora de los polos del huso. En este contexto el gen *ncd* es expresado somáticamente en *Drosophila* (38), sin embargo los defectos sólo han sido vistos durante el desarrollo temprano de embriones (39). Por lo que es posible que la actividad de zippering de *ncd* es particularmente importante en la meiosis femenina por la ausencia de centrosomas, pero es redundante durante la mitosis en las cuales existen otras actividades formadoras de centrosomas.

Quizás el hallazgo más sorprendente con respecto a la función de las cinesinas halla sido que pueden tener actividades no motoras, mediadas por el dominio catalítico. Estas actividades pueden ser de dos tipos, potencialmente relacionados: (a) control directo de la dinámica microtubular mediante la inducción de factores de catástrofe, y (b) acoplándose a los finales que se están depolimerizando, para generar movimiento independiente de ATP.

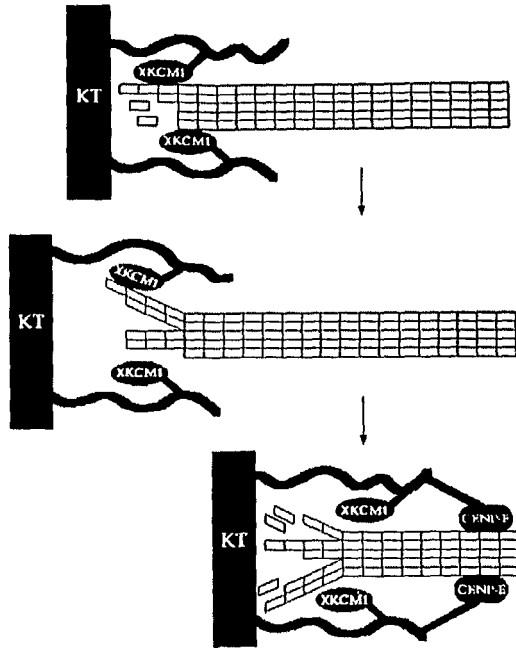


Figura 2-9 Rol de la XKCM1 en la dinámica microtubular.

- A) El rol de las cinesinas en el control de la dinámica microtubular es más claramente observado en estudios de la familia KIF2 (40). Estudios bioquímicos recientes han mostrado que dos miembros de esta familia en *Xenopus*, XKCM1 (figura 2-9) y XKIF2, pueden unirse a ambas terminaciones de los microtúbulos y no mostrar una actividad de proteína motora. En estas terminaciones, XKCM1 y XKIF2 inducen disociación del protofilamento y promueven el desensamblaje del microtúbulo (41). La presencia de cinesinas en el cinetocoro que pueden desestabilizar microtúbulos (42,43), es a primera vista sorprendente por que la unión al cinetocoro parece depender de una estabilización selectiva de microtúbulos unidos relativa a los microtúbulos no unidos a cromosomas. El movimiento en la anafase de jalar a los cromosomas, sin embargo, requiere depolimerización microtubular. Por lo tanto, la actividad depolimerizante microtubular mediada por los cinetocoros, puede estar altamente regulada y tener un rol importante en el acoplamiento de la estabilidad de microtúbulos y el comportamiento cromosómico.

B) La sugerencia de que las cinesinas pueden acoplar la depolimerización microtubular al movimiento, vino de estudios que muestran que la KHC, o quimeras de KHC y *ncd*, pueden mantener unidas cuentas a los extremos despolimerizantes en una reacción independiente de ATP (44). Curiosamente la polaridad de la actividad de la KHC es en algún sentido revertida en esta situación, dado que un motor más genera movimiento al extremo menos del microtúbulo, gracias al acoplamiento entre éstos.

2.1.4 Señalización y otras funciones no convencionales (fig. 2-5F).

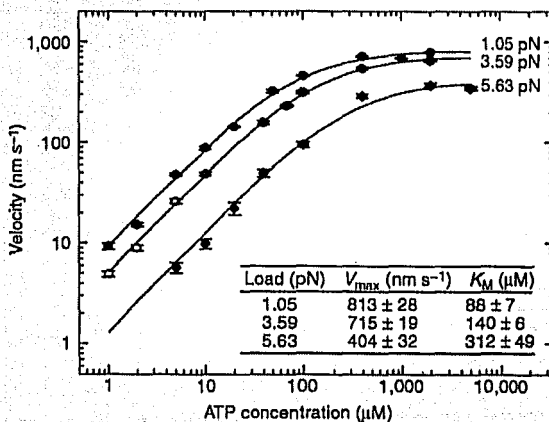
Dos ejemplos recientes de funciones inusuales:

- i) El primero es gracias al gen *SMY1* en *S. cerevisiae*. El producto de este gen, SMY1 podría funcionar sobre actina en vez de sobre los microtúbulos, podría interactuar con miosinas, o podría tener una función no relacionada con la unión del citoesqueleto (45).
- ii) Costal2 en *Drosophila*, parece tener una suerte similar. Este pariente distante de las cinesinas fue identificado como el producto de un gen implicado en la vía de señalización de hedgehog en el desarrollo embrionario. Costal2 parece tener una actividad de unión a microtúbulos, y es hallada en un gran complejo con una proteína cinasa codificada por el gen *fused* y con un factor de transcripción codificado por el gen *Ci*. Se ha sugerido que la función de costal2 es capturar el factor de transcripción Ci con los microtúbulos, y liberarlo cuando un estímulo adecuado llega a la célula por la vía de señalización de hedgehog (46,47).

2.2 Velocidad.

Una pregunta intrigante es como las velocidades *in vitro* de las cinesinas, las cuales van desde los 0.03 a 2.5 $\mu\text{m/s}$ (12) son predictivas de las tasas de movimiento de cargas dentro de las células, que pueden variar de 0.002 a 5 $\mu\text{m/s}$ (58). Estas velocidades son comúnmente usadas para saber cuando una cinesina es una candidata para algún movimiento *in vivo*. De hecho, la velocidad intrínseca de un motor *in vitro* es un indicador pobre de que velocidad puede generar en

un contexto *in vivo*. Para que el movimiento de una carga *in vivo* tenga la misma velocidad que la velocidad intrínseca de la proteína motora en sí, deben de satisfacerse muchas condiciones: (a) El motor debe de ser altamente procesivo y tener una tasa alta del estado fuertemente unido (t_s), con respecto al tiempo completo del ciclo enzimático (t_c), i.e. t_s/t_c debe ser cercano a uno (6); (b) los motores que estén transportando una carga, deben pasar el 100% de su recorrido a lo largo del microtúbulo; (c) la carga debe pasar el 100% de su tiempo asociada a su motor; (d) la resistencia o arrastre debido al movimiento de la carga, e.g. la generada por la polimerización de microtúbulos o por las tasas limitantes de despolimerización, deben ser despreciables. La regulación de cualquiera de estos pasos, pueden generar cualquier velocidad necesitada *in vivo*, a partir de proteínas motores con la misma velocidad intrínseca. Así, cinesinas rápidas ($1\mu\text{m/s}$) pueden generar velocidades tan pequeñas como el movimiento de cromosomas ($1\mu\text{m/min}$) o transporte axonal lento ($7\mu\text{m/h}$). Por lo que este sistema puede generar virtualmente todas las velocidades requeridas, regulando estas pocas condiciones (7).



2-10 Velocidad vs concentración de ATP, a la cual se le aplican diferentes magnitudes de fuerza.

Los primeros estudios que se hicieron para medir la velocidad de la cinesina, fueron ensayos *in vitro* (69), mientras que en los últimos años se tienen mediciones tanto *in vivo* como *in vitro* (174). La figura 2-10 muestra una gráfica de velocidad versus concentración de ATP, a diferentes fuerzas aplicadas (69).

2.3 Estructura.

La cinesina prototípica es un tetrámero, que consiste de dos cadenas pesadas (conocidas como KHC, excepto en vertebrados donde se llaman KIF5) y dos cadenas ligeras (KLC) (8). Las cadenas pesadas contienen una cabeza, la unidad motora que une ATP y microtúbulos, y un bastón que pega la carga. El bastón adopta principalmente una conformación de α -hélice y puede dimerizar formando un "coiled coil". Nuestra imagen actual de la estructura de la cinesina y sus interacciones con los microtúbulos se deriva fundamentalmente de tres fuentes de información: 1) cristalografía con rayos X de la cinesina en estado monomérico y dímérico; 2) microscopía electrónica y reconstrucción de imágenes de microtúbulos decorados con cinesinas; y 3) información adicional por estudios de bioquímica, genética, así como otras fuentes. Existen a la fecha varias estructuras cristalográficas de cinesinas, incluyendo dos de cinesinas que van al extremo menos.

Las estructuras cristalográficas de los centros catalíticos de diferentes proteínas motoras – como las cinesinas "más" convencionales (49,50), las "menos", ncd (51) y KAR5 (52), y la miosina (49)- han revelado una muy alta similitud (figura 2-11). Existen estructuras que han ayudado aún más en el entendimiento de los límites entre los dominios estructurales y los funcionales (53,54).

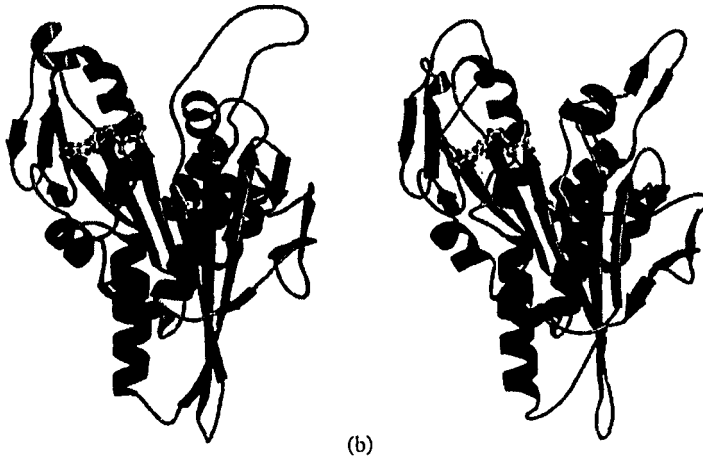


Figura 2-11, (a) Estructura del dominio motor de la cinesina; (b) Dominio motor de ncd.

El centro catalítico de la cinesina en un dominio globular compacto en todos los estudios cristalográficos (49-54). Por esto, el centro catalítico es definido como el dominio globular conservado entre la hebra $\beta 1$ en el amino-terminal, y por la hélice $\alpha\beta$ en el carboxilo-terminal.

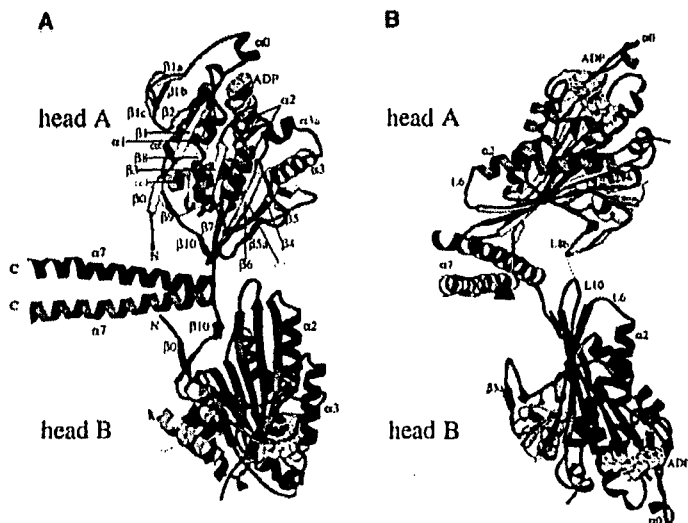


Figura 2-12 (A) Estructura del dominio motor de la cinesina, y parte del cuello; (B) Rotación de 65° de la imagen con respecto al eje vertical sobre la hoja. La punta de flecha indica el inicio de la unión de los dos cuellos.

Adyacente al centro catalítico se encuentra una región pequeña que se ha denominado como el "cuello" (56). Alineamientos múltiples de diferentes cinesinas han mostrado que, en contraste con la región catalítica, el cuello no es conservado entre las diferentes cinesinas, pero es especialmente conservado dentro de ciertas clases de cinesinas (12,55). En cinesinas C (en las cuales la *ncd* es la mejor estudiada), el cuello incluye 13 aminoácidos conservados, que están en el extremo amino con respecto al centro (12,54,55). En las cinesinas N (donde se encuentra la convencional), el cuello se encuentra en el extremo carboxilo, y consiste de dos partes: la primera incluye 10 residuos (llamado el "conector del cuello"), que están altamente y específicamente conservados entre las cinesinas más; la segunda parte (llamada la "espiral enrollada" del cuello), es formada por una parte adicional de 20-30 residuos que son selectivamente conservados entre las diferentes subclases de cinesinas N (12,55).

Recientes estudios cristalográficos han revelado que el cuello de las cinesinas adopta varias estructuras tridimensionales diferentes (53,54), consistentes con su conservación de secuencia. El término "dominio motor" es usado para referir la unidad funcional coordinada del centro catalítico y el cuello (55). Afuera del dominio motor, la mayoría de las cinesinas tienen un "tallo" α -helicoidal y una "cola" globular, los cuales pueden mediar oligomerización y unión de la carga, respectivamente, y que pueden estar involucrados en la regulación del motor (7,57-60).

El dímero de la cinesina es asimétrico (figura 2-12), con sus dos cabezas bien separadas y rotadas cerca de 120° (53). En contraste el dímero de ncd tiene simetría de reflexión con respecto a la espiral enrollada, con los centros catalíticos colocados mucho más cerca uno de otro comparado con la cinesina (54). Los centros catalíticos de la cinesina pueden poseer gran flexibilidad, dado que datos de rayos-X y de dispersión de neutrones indican que la separación de los centros dentro del dímero cuando tienen unido ADP puede variar en solución (61,62). Si embargo, la mayor diferencia entre los dímeros de ncd y de cinesina encontrada en cristalografía es conservada en solución (61). La larga separación y flexibilidad del centro de la cinesina, comparado con ncd, podría estar asociada con la habilidad de la cinesina (63-69) pero no de ncd (70,71), de exhibir procesividad (la habilidad de dar múltiples pasos a lo largo del microtúbulo antes de disociarse). De acuerdo a las estructuras cristalográficas, la cabeza no unida de la cinesina apunta hacia el extremo más y la cabeza libre de ncd apunta hacia el extremo menos (54). Esto indica que la diferencia en simetrías en los dímeros de ncd y de cinesina, ayuda a localizar las cabezas libres en dirección a su movimiento. Este posicionamiento dirigido de las cabezas ha sido propuesto como contribuyente al movimiento en direcciones opuestas (54,72,73), y esto se logra gracias a las regiones del cuello (54).

El cuello de la cinesina consiste de dos hebras- β cortas, llamadas la "unión del cuello" (fig. 2-12), seguidas por una hélice de espiral enrollada, llamada "la espiral enrollada del cuello", todas conectadas a través de lazos (53). En contraste, el cuello de ncd es enteramente una hélice y forma una espiral enrollada paralela (54). Una similitud asombrosa entre los cuellos de ncd y cinesina es que, sin tomar en cuenta sus localizaciones, las secuencias y estructuras, interaccionan con los mismos elementos en el centro catalítico (principalmente la parte carboxilo-terminal de la hélice α -1 y el lazo L13) (54). Estos contactos entre el centro y el cuello están localizados cerca del lazo L12 que se une principalmente al microtúbulo y de la hélice α -4 o "switch II", que se predijo (51,74) y luego se demostró (75), que estaba involucrada en la comunicación entre los sitios de unión en la cinesina al nucleótido o a los microtúbulos. La

similitud de los contactos centro-cuello entre cinesina y ncd explican el funcionamiento coordinado de los centros y los cuellos en las quimeras de ncd-cinesina (76,77). La primera de esas quimeras (76) consiste del centro catalítico de ncd unido al cuello y al tallo de una cinesina convencional. Sorprendentemente, el híbrido resultante se movía al extremo más del microtúbulo. La segunda (77) consistía del centro catalítico de la cinesina unido al cuello y al tallo de ncd, lo que resultó en movimiento al extremo menos. De acuerdo a la hipótesis actual, el centro catalítico de la cinesina funciona como un convertidor modular alostérico (54,55). Convierte información de los estados de unión de nucleótido o al microtúbulo de manera similar (a través de α -1 y L13) al cuello de la cinesina o de ncd. Sin embargo, los cuellos, como resultado de sus arquitecturas diferentes, responden y transmiten un cambio conformacional inducido por un nucleótido, de manera distinta a cada una de las cabezas, posibilitando el movimiento en direcciones opuestas a lo largo del microtúbulo (54,55). Estos estudios en conjunto apuntan a que los cuellos de la cinesina y de ncd pueden producir diferentes "golpes de fuerza", que contribuyen al mecanismo de direccionalidades opuestas (54,55,78). En particular, análisis recientes mutacionales de cinesina y ncd (54,78) han revelado que su actividad específica puede ser desacoplada de la hidrólisis de ATP, mutando residuos conservados en el cuello o en la interfase cuello-centro. Se ha propuesto por lo tanto que la dinámica inducida por el nucleótido en la interfase puede inducir transiciones conformacionales en el cuello, lo que generaría la fuerza para el movimiento (54,55,78). Para la cinesina se ha hipotetizado que la interfase cuello-centro podría estar "abriendo" y "cerrando" (como una cremallera) durante el ciclo de la hidrólisis del ATP, generando movimiento hacia el extremo más del microtúbulo (55,78). Para ncd, se ha sugerido que los cambios inducidos por nucleótidos en la misma interfase pueden resultar en la pérdida de la conformación α -helicoidal del cuello (54). Esta transición conformacional se espera que produzca una fuerza dirigida hacia el extremo menos (54). Se piensa que las acciones opuestas de los cuellos en las cabezas unidas a microtúbulos son posteriormente amplificadas aún más por las cabezas que no están unidas, las cuales están posicionadas con la dirección apropiada en los dos motores (54). Recientemente, el movimiento predicho dependiente de nucleótido del conector del cuello de la cinesina ha sido visualizado y medido directamente usando una combinación de resonancia paramagnética electrónica (EPR), transferencia de energía resonante fluorescente (FRET), microscopía crioelectrónica y cinéticas de estado pre-estable (79). En este estudio, un cambio conformacional grande (>1 nm) fue detectado en el conector del cuello cuando la cinesina estaba unida al microtúbulo y al ATP, y fue revertido cuando el fosfato- γ fue liberado después de la hidrólisis. El mismo estudio mostró que el cambio conformacional detectado en el conector del cuello está en correspondencia con los resultados de las cinéticas de las dos mutantes (Gly234Ala

y Glu236Ala; ambas mutaciones están en la región "switch II"), las cuales revelaron un evento de isomerización inducido por la unión del nucleótido (79).

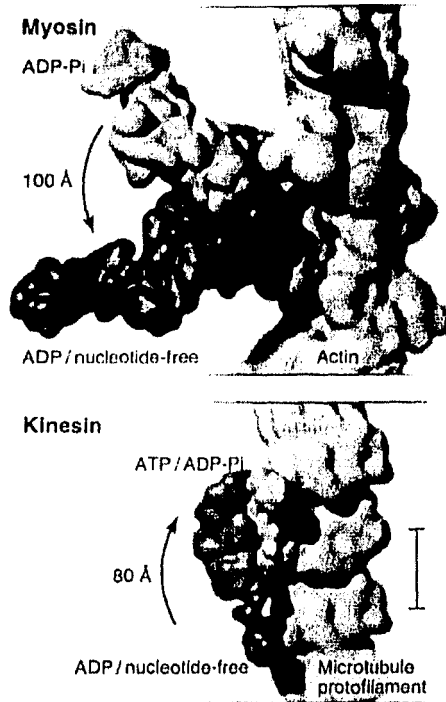


Figura 2-13 Cambio conformacional por la hidrólisis de ATP en miosina y kinesina.

Dada la orientación de la cabeza unida al microtúbulo (i.e. la punta se encuentra apuntando hacia el extremo más (72,79)). El ATP induce un cerrado como si fuera una cremallera, del conector del cuello con una cabeza, lo que posiciona la otra cabeza hacia el extremo más (fig. 2-13). Como se ha mostrado anteriormente (80), la otra cabeza se puede entonces pegar a la subunidad de tubulina que sigue, gracias a que su conector del cuello está "abierto". Una vez que las dos cabezas están unidas, el intercambio de ADP/ATP en la cabeza delantera dispara el cierre nuevamente del conector del cuello. Esto podría ayudar en la disociación de la cabeza trasera (81), y así moverla hacia el próximo sitio de unión. Aunque los promotores de este modelo creen que el movimiento del conector del cuello es el que dispara el paso del motor, no desechan totalmente el posible rol de la espiral enrollada del cuello o las interacciones cabeza-cabeza en este proceso (82-84).

Un modelo alternativo sugiere un desenrollamiento y reformación de la espiral enrollada del cuello como mecanismo principal. Esto posibilita el movimiento procesivo, así como entre sitios de unión adyacentes en el microtúbulo (82-84). Evidencia directa para este modelo es aún requerida. Un análisis mutacional reciente ha mostrado que el completo remplazamiento de la espiral enrollada del cuello de la cinesina por un péptido que forme una espiral enrollada altamente estable, no reduce substancialmente la procesividad del motor (80).

La secuencia del cuello, la cual es típica en la cinesina convencional, y ha sido postulada como la que permite el desenrollamiento de la espiral enrollada (91,92), no se encuentra presente en *ncd*, lo que podría provocar que *ncd* no sea capaz físicamente de cubrir esa distancia entre subunidades β .

2.4 Interacciones con microtúbulos (fig. 2-14).

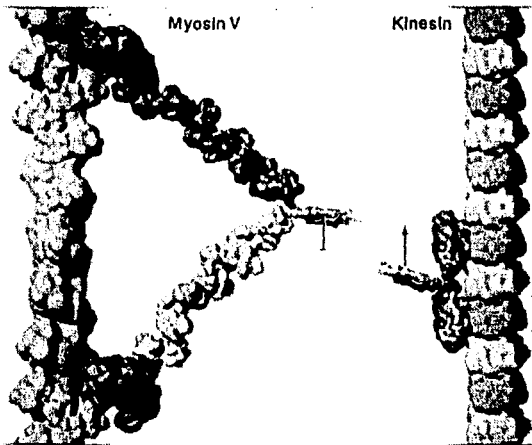


Figura 2-14 Interacción de la cinesina y miosina con el microtúbulo, y la actina respectivamente.

En el microtúbulo se aprecian las subunidades α y β . Las β son un poco más oscuras.

Para cinesinas monoméricas existe un acuerdo general en que la estequiometría es de una cabeza por dímero de tubulina. Es interesante hacer notar que la interacción principal es con la subunidad β (85,86), mientras que el contacto con la subunidad α contribuye muy poco a esta interacción (87,88). Esta estequiometría comprobó ser muy similar para las cinesinas diméricas

(89). La interacción se cree puede estar en alguna medida mediada gracias a que la superficie externa del microtúbulo está cargada negativamente (89). Se ha visto por varios métodos (ligación química cruzada, ensayos de unión, microscopía electrónica de transmisión, reconstrucción de imágenes, y por dispersión de rayos-X), que existe una alternancia de subunidades α de alta y baja densidad aparente, lo que crea una periodicidad de 16 nm. Formalmente esta distribución de las cabezas de las cinesinas sería consistente con un modelo de caminata para explicar la movilidad (90), donde las cabezas deben dar pasos de 16 nm a lo largo del protofilamento, generando un movimiento del centro de masa de 8 nm, como ha sido observado por experimentos de trampas de luz (65).

2.5 Procesividad.

La procesividad de los motores moleculares, es la propiedad de dar múltiples pasos a lo largo del filamento antes de disociarse. La cinesina es altamente procesiva que puede tomar cientos de pasos antes de caer del microtúbulo (115), mientras que la proteína ncd no es procesiva y no puede dar ni dos pasos sucesivos (71,116-118). Los motores que operan en largos ensamblajes que generan movimiento rápido (e.g. miosina muscular) deben permanecer sólo una fracción de su ciclo mecánico unido al filamento, y así ser no procesivos, mientras que los motores que operan solos o en números pequeños para transportar organelos (e.g. cinesina) deben ser procesivos (119).

Las propiedades que permiten a un motor ser procesivo, en el caso de la cinesina, trabajo reciente de diferentes grupos dan soporte un modelo (63) en el cual las dos cabezas se mueven de manera coordinada como mano-sobre-mano. Un aspecto crucial de esta coordinación fue recientemente demostrada, llámesele el desprendimiento de una cabeza es contingente del desprendimiento de la otra (81-121). Para la cinesina convencional y para la de *Neurospora*, la unión de la cabeza que está libre al microtúbulo acelera la ATPasa y las tasas de desprendimiento de la cabeza unida por un factor de 10 o más (120,121). La base física de esta coordinación entre las cabezas se piensa que es una fuerza intramolecular generada en la unión de la cabeza delantera, sin embargo, evidencia directa de esto es aún faltante.

Una predicción clave del modelo de mano-sobre-mano es que las dos cabeza de cinesina se pueden unir simultáneamente al microtúbulo. Esto ha sido demostrado por crio-microscopía

electrónica (84,122); así como por evidencia mecánica (123). Estos estudios además demuestran que la unión de dos cabezas simultáneo predomina en presencia de AMP-PNP (un análogo del ATP pero no hidrolizable), mientras que la unión de una cabeza se presenta en ausencia de nucleótido.

Un mecanismo nuevo de procesividad parece operar en el motor relacionado a la cinesina de una cabeza, KIF1A. Trabajo reciente sorprendente indica que KIF1A es procesiva: en promedio, cada encuentro de KIF1A con el microtúbulo resulta en el desplazamiento neto de cerca de 1 μm hacia el extremo más (126). Como la cinesina dimérica, la cinesina monomérica KIF1A usa dos motivos que unen tubulina para mantener su asociación con el microtúbulo, pero a diferencia de la cinesina que tiene un motivo por cabeza, KIF1A tiene dos diferentes motivos en una sola cabeza. Uno de estos motivos está conservado a lo largo de todas las proteínas relacionadas con la cinesina, pero el segundo motivo no lo está. El segundo motivo es una asa rica en lisinas (el "asa K") que interacciona con el carboxi-término rico en glutamato de la tubulina (124-126), y la delección o mutación de esta asa resulta en la pérdida o reducción de la procesividad (124,125). Adicionalmente, un motor no-procesivo puede ser convertido en uno procesivo extendiendo el asa-K del monómero de la cinesina convencional con seis lisinas (125). El movimiento de KIF1A difiere ampliamente en cuanto a velocidad se refiere de la cinesina convencional. Lo cual sugiere que la difusión a lo largo del microtúbulo juega un papel importante en movilidad (125,126). En este sentido es significativa la diferencia ya que KIF1A hidroliza varias moléculas de ATP por un paso de 8 nm, en contraste con cinesina convencional de una molécula hidrolizada. Queda todavía por ser determinado si el mecanismo basado en difusión de KIF1A puede aún así trabajar en contra de los altos pesos esperados cuando el motor es sometido al movimiento de organelos a través de un citoplasma atestado de componentes.

2.6 Ciclo mecanoquímico (fig. 2-15).

Sea o no un motor molecular una proteína procesiva, los sitios de unión a los filamentos deben alternar al menos entre dos estados mecánicos (pegado y despegado del filamento), y los centros activos que unen al nucleótido deben pasar por cuatro estados químicos (vacío, ATP, ADP•Pi, y ADP). El recorrido a través de los diferentes estados mecanoquímicos se le llama ciclo mecanoquímico. Aunque existen a la fecha varios modelos (79,120,121,127-129) que intentan explicar y dar cuenta de todos los estados posibles, entre ellos se puede visualizar algunos aspectos generales en los cuales están de acuerdo, y en aquellos en los que todavía existe debate.

Una consecuencia de trabajos con estudios cristalográficos y de reconstrucción de imágenes es el requerimiento de que la interface del dímero debe abrirse (53,84)- lo que permitiría que las cabezas se coloquen sobre el microtúbulo con la orientación adecuada (53,84). Durante la mitad del ciclo, la cinesina regresa al punto de partida – a excepción de que la cabeza que estaba adelante ahora está atrás y viceversa-, una molécula de ATP es hidrolizada y el centro de masa se ha translocado 8 nm sobre el microtúbulo.

Desde un punto de vista estructural hay dos estados de referencia, el estado en solución, libre de microtúbulos (con una interfase de aprox. 120°), y el estado de rigidez, donde ambas cabezas están unidas al microtúbulo (con la interfase de 180°). En el estado libre, el cuello se encuentra cerrado, mientras que en el de rigidez está completamente abierto y las cabezas han rotado para que puedan unir diferentes heterodímeros de tubulina, que se encuentran alejados por 8 nm. El microtúbulo acelera la liberación de ADP, el cual se une fuertemente a ambas cabezas en solución. Cuando los microtúbulos son mezclados con las cinesinas díméricas, el ADP se disocia de sólo una cabeza. La unión de la cinesina al microtúbulo tiene una constante de $20 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ y su reverso de 20 ms. La unión del ATP (fig. 2-15(1)) ($\rightarrow 2 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\leftarrow 0.5 \text{ ms}$) causa una transición alostérica que es propagada a la interfase de la subunidad y esto genera que la otra cabeza se mueva y se pueda unir a su vez sobre el microtúbulo ($\rightarrow 300 \text{ s}^{-1}$, $\leftarrow 3.3 \text{ ms}$), figura 2-15(2). Lo que conlleva a liberación de su ADP que es simultáneo a la unión al microtúbulo. La presencia del análogo de ATP no-hidrolizable AMP-PNP también acelera la liberación del segundo ADP, con lo que se muestra que la hidrólisis no es necesaria para la liberación del ADP de la segunda cabeza (fig. 2-15(3)). Sin embargo, la hidrólisis usualmente se lleva a cabo antes de la unión de la segunda cabeza. Esta separación de cabezas y la unión de la que no estaba interaccionando con el microtúbulo se dan gracias a que la región del cuello, esta espiral enrollada, se abre. La importancia del conector del cuello y de la espiral enrollada del cuello se ha discutido más ampliamente en la sección de estructura. De hecho se mantiene abierta, permitiendo que se de el paso de la cabeza que se encuentra atrás para el próximo monómero de β -tubulina en la dirección más. Aquí nuevamente tenemos a las dos cabezas unidas al microtúbulo, donde se intercambia el ADP por ATP (fig. 2-15(4)). Y el ciclo comienza de nuevo.

Un aspecto importante de este ciclo es la eficiencia en el uso de su combustible. La cinesina es un motor "altamente acoplado", ya que hidroliza una molécula de ATP para cada paso de 8 nm (67-69,130,131) en condiciones de bajo peso. Datos de trampas ópticas sugieren que este acoplamiento permanece hasta inclusive pesos de 5 pN (69).

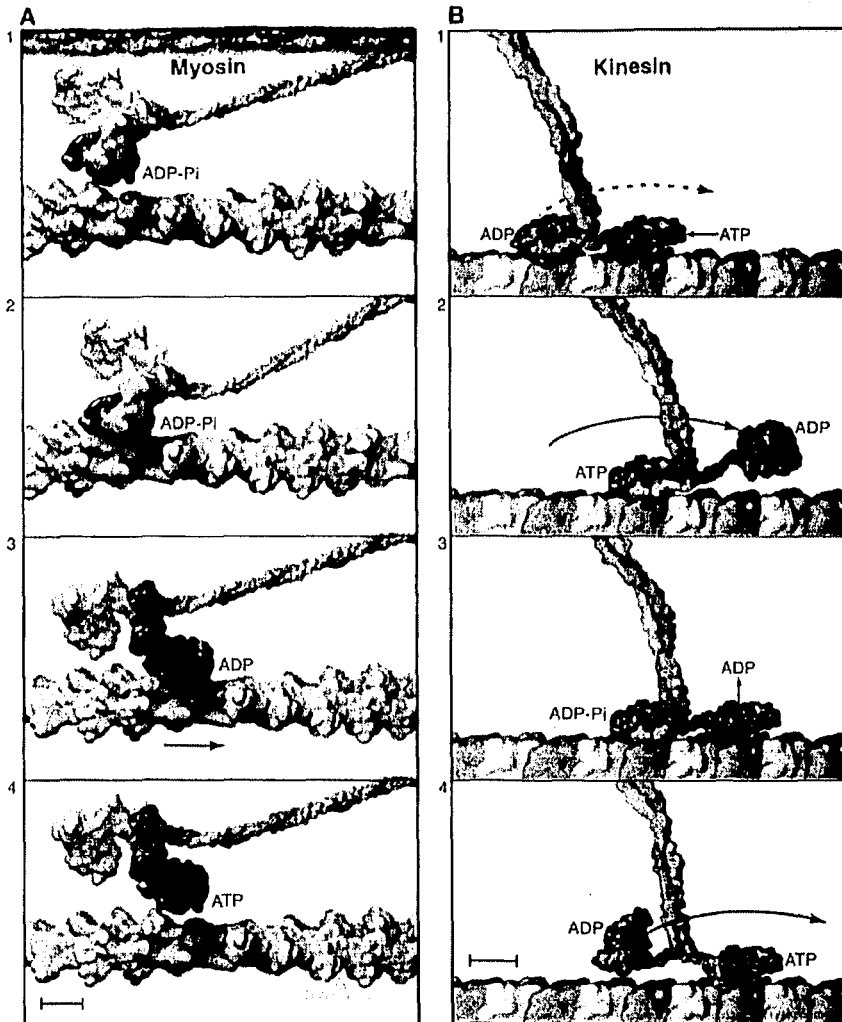


Figura 2-15 Comparación de los ciclos mecanoquímicos en miosina (A) y cineína (B). Para una explicación del ciclo de la cineína, ver texto (Miosina, ver capítulo 1).

Entre las preguntas que aún quedan por contestar están: ¿Cómo el cambio conformacional inicial en el bolso o hueco que une al ATP de la cabeza unida al microtúbulo es transmitido y amplificado en un movimiento más largo de la cabeza que está libre? Hay dos

modelos que pretenden dar luz sobre la posible respuesta a esta pregunta. Uno en el cual el ATP induce un cambio conformacional de desorden-orden en el conector del cuello (55,79,127). Por otro lado experimentos de crio-microscopía electrónica (72,79,132,133) y de liberación de ADP (121,134,135) son consistentes con un modelo en el cual la unión del ATP a la cabeza que se encuentra unida al microtúbulo, resulta en una mayor movilidad de la cabeza que no lo está, en contraste con el otro modelo (79). La propuesta de una isomerización siguiendo la unión del ATP (129), en la cual la cinesina atraviesa por rápidas fluctuaciones entre dos subestados conformacionales en equilibrio, es también consistente con la libertad inducida conformacionalmente de la cabeza no-unida. Finalmente, una conformación desordenada del estado de ATP podría explicar la falta de un cristal de la estructura cinesina-ATP. La unión del ATP a la cabeza que se encuentra unida podría resultar en una apertura parcial de el dominio dimerizado de espiral enrollada.

Una posibilidad intrigante es que la simetría de la cinesina podría proveer una base estructural para la comunicación entre las cabezas (115). La mayoría de las proteínas homodiméricas tienen un eje que les da una simetría de reflexión con respecto a él, debido a una interacción isóloga de los monómeros (115). Esto significa que las dos cabezas están relacionadas por una rotación de 180° en el caso de rigidez y 120° en solución.

Un estimado del desplazamiento asociado con la unión del ATP puede saberse usando la distribución de Boltzmann de la manera siguiente. Si el estado de transición del paso de unión de ATP corresponde a mover la carga una distancia d relativa al estado libre de nucleótido, entonces la aplicación de una fuerza opuesta de magnitud F reducirá la constante del paso de unión de ATP por un factor de $\exp(-Fd/kT)$, donde k es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. Si este paso es irreversible, entonces a una baja concentración de ATP la velocidad de la cinesina puede ser modelada como $v(F) = v_0 \exp(-Fd/kT)$, donde $v(F)$ y v_0 son las velocidades de la cinesina con o sin peso, respectivamente. En el límite de bajo peso, la pendiente de la curva de velocidad vs peso es $-v_0 d/kT$. Esta expresión para la pendiente puede ser comparada con las medidas experimentalmente para obtener la d . De las curvas de velocidad-peso de las cinesinas medidas a bajos niveles de ATP usando trampas ópticas (69,136,137) o microagujas de vidrio (138) la pendiente a bajos pesos cae en el rango de $-v_0/(2.5 \text{ pN})$ a $-v_0/(7 \text{ pN})$, así que la $d \approx 0.6 - 1.6 \text{ nm}$. Por lo que la unión del ATP (o pasos que están en rápido equilibrio con este paso de unión) es asociada con el cambio conformacional de aprox. 1-2 nm.

¿Existe una manera simple de racionalizar acerca de la coordinación mecanoquímica entre las dos cabezas? ¿Se podrá describir todo este complejo mecanismo biológico en términos más sencillos? Eso trataré en el transcurso de esta tesis, y se podrá juzgar con el capítulo 5, donde se estudiará un modelo de la caminata de la kinesina.

CAPÍTULO TRES. MOTORES BROWNIANOS

3.1 El modelo de “matraca” de Feynman.

¿Se puede extraer trabajo útil de las fluctuaciones al azar? ¿Podemos construir un aparato que viole la segunda ley? En el caso de fluctuaciones macroscópicas, la tarea puede ser llevada a cabo por varios tipos de rectificadores mecánicos o eléctricos. Pero la respuesta no es sencilla en el caso de que fluctuaciones microscópicas de origen Browniano clásico o cuántico estén involucradas (144-151). La idea básica puede ser rastreada a una conferencia de Smoluchowski en 1912 en Münster y luego expuesto en sus famosas lecturas, Feynman (141) idealiza un aparato que a *prima facie* es capaz de violar la segunda ley. Por el trabajo de Carnot, el hecho de que no se pueda extraer más que una cierta cantidad de trabajo al ir de una temperatura a otra se deduce de otro axioma: si todo está a la misma temperatura el calor no se puede convertir en trabajo mediante un proceso cíclico.

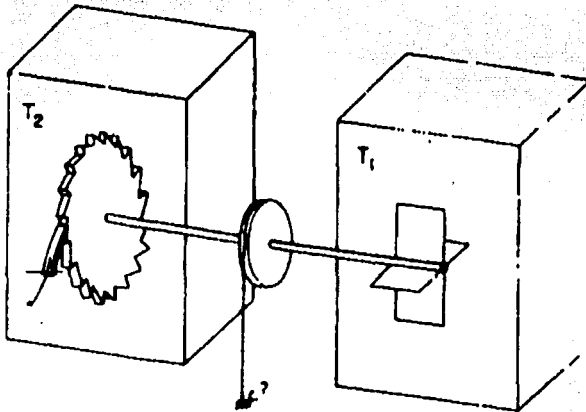


Fig. 3-1

El aparato se constituye de la siguiente forma: una caja la cual contiene un gas a cierta temperatura y que dentro hay un eje con aspas. Consideraré como primer caso las temperaturas de los recipientes T_1 y T_2 iguales [fig 3-1 y 3-2]. A causa del bombardeo de las moléculas de gas sobre las aspas, éstas oscilan y se mueven con pequeñas sacudidas. En el otro extremo del eje se coloca una rueda que sólo pueda girar en un sólo sentido –rueda dentada y trinquete (~ matraca)- Así, cuando el eje trate de vibrar en un sentido, no girará, y cuando vibre en el otro, sí girará. Feynman incluso ata una pulga a una cuerda que pende de un tambor en el eje y quiere ver si es capaz su aparato de levantarla.

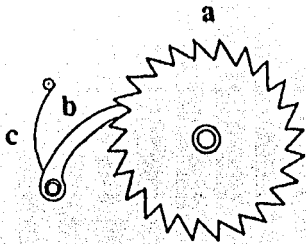


Fig. 3-2 (a) Rueda dentada, (b) trinquete de la matraca o ratchet, y (c) resorte.

La idealización de Feynman es la más simple posible, así que tiene que introducir un resorte al trinquete. Para que éste pueda volver (i.e. para continuar en contacto con la rueda) después de pasar un diente. Otro aspecto importante es el que exista un amortiguador que pare los rebotes, ya que en la idealización, el resorte es completamente elástico. Cuando hay amortiguamiento, naturalmente, la energía que había en el trinquete pasa a la rueda y se transforma en calor. De modo que la rueda se irá calentando a medida que gira. Simplifica las cosas colocando un gas alrededor de la matraca para que tome parte del calor. Pero como el trinquete y la rueda están a la misma temperatura T , éstos a su vez experimentan movimiento browniano. Este movimiento es tal que de vez en cuando, accidentalmente, el trinquete se levanta sobre un diente exactamente en el momento en que el movimiento browniano de las aspas está tratando de girar al eje hacia atrás. Y cuanto más se calienta todo, más frecuentemente ocurre esto.

Cuando las aspas son empujadas, algunas veces el trinquete se levanta sobre un diente. Pero otras veces, cuando trata de girar en el otro sentido, el trinquete se ha levantado ya debido a las fluctuaciones térmicas de los movimientos en el extremo de la rueda, con lo que se gira al eje en el otro sentido. El resultado neto es nada.

Es necesario realizar trabajo contra el resorte para que se levante el trinquete hasta el tope de un diente. Si esa energía es ϵ y θ el ángulo entre los dientes, la probabilidad de que el sistema pueda acumular suficiente energía ϵ para llevar el trinquete hasta el tope de un diente es,

$$e^{-\epsilon/kT}$$

Pero la probabilidad de que el trinquete esté accidentalmente levantado es también,

$$e^{-\epsilon/kT}$$

Por lo cual el número de veces que el trinquete está levantado y la rueda puede girar hacia atrás libremente es igual al número de veces que hay suficiente energía para girarla hacia adelante cuando el trinquete está abajo. De esta forma se obtiene un equilibrio y la rueda no girará.

En resumen, Feynman resuelve la paradoja mostrando que la aplicación consistente de las leyes de la mecánica estadística a todas las partes del aparato, restaura el resultado de que no se puede extraer trabajo del ruido térmico en un sistema isotérmico.

Toda esta discusión ha sido para temperaturas iguales, pero, ¿qué pasa si las temperaturas son distintas? Describamos ahora a la rueda dentada como la máquina que Feynmann analizó. Hagamos a T_2 menor que T_1 . Como la rueda está fría y las fluctuaciones del trinquete no son muy frecuentes, será muy difícil que el trinquete alcance una energía ϵ . Y a causa de que T_1 es mayor, las aspas alcanzarán con frecuencia la energía ϵ , por lo que el dispositivo, ahora sí, irá en una dirección como se le diseñó originalmente.

Veamos si podemos extraerle trabajo útil a este dispositivo. Atamos una cuerda al tambor de enmedio y colocamos un peso en la cuerda, puede ser la pulga que Feynmann puso, o cualquier otra cosa. Si el torque debido al peso es L , y si no es muy grande, la máquina levantará el peso porque las fluctuaciones brownianas hacen que se mueva con más probabilidad en un sentido que en otro. Para que dé un paso hacia adelante, ¿cuánta energía se tiene que tomar prestada de las aspas? Tenemos que tomar prestada una energía ϵ para levantar el trinquete. La rueda gira un ángulo θ contra el torque L , por lo que también necesitamos la energía $L\theta$. La cantidad total de energía que tenemos que tomar es, pues $\epsilon + L\theta$. La probabilidad de que la obtengamos es proporcional a

$$e^{-(\epsilon+L\theta)/kT_1}$$

La probabilidad por segundo de tener esta energía es proporcional a la probabilidad de energía, y se llama $1/\tau$ a la constante de proporcionalidad.

Para considerar el caso contrario todo lo que tenemos que hacer es dar energía para levantar el trinquete lo bastante alto para que la rueda se escape. Sigue siendo esta energía ϵ . La probabilidad por segundo de que el trinquete se levante esa altura es ahora

$$\left(\frac{1}{\tau}\right) e^{-(\epsilon+L\theta)/kT_2}$$

La constante de proporcionalidad es la misma, pero aparece ahora kT_2 porque la temperatura es diferente. Cuando esto sucede, se libera trabajo ya que la rueda va hacia atrás. Pierde un diente y libera el trabajo $L\theta$. La energía tomada del sistema dentado es ϵ , y la energía dada al gas a T_1 donde están las aspas es $L\theta + \epsilon$. Vemos que todas estas energías son exactamente iguales pero invertidas. Por lo que, según cual de estas dos probabilidades por segundo sea mayor, el peso será levantado lentamente o dejado caer lentamente. Naturalmente estará sacudiéndose constantemente, yendo hacia arriba durante un instante y hacia abajo durante otro, pero estoy hablando del comportamiento medio.

A primera vista parece que la rueda dentada ("ratchet"¹) de Feynman, aunque una ilustración muy buena de la Segunda Ley de la Termodinámica, no es relevante para los sistemas biológicos dado que no hay presentes en los organismos grandes gradientes térmicos. Pero el punto crucial aquí no es el gradiente de temperatura, sino el hecho de que el sistema está fuera del equilibrio. Es esta distancia del equilibrio, acoplada con el ruido térmico quien parece permitir el transporte dirigido. Mucho trabajo se ha hecho y se está haciendo en esta dirección (139,140,142-151).

3.2 El modelo general.

El trabajo original de Feynman sirvió de inspiración para lo que ahora se conoce como motores brownianos. Esta denominación surge dada la aproximación que se ha usado -

¹ En lo siguiente usaré ya sea el término original, "ratchet" o "potencial asimétrico" para denominar el tipo general de potenciales con que se trabajará en el resto de esta tesis.

potenciales asimétricos- en el entendimiento de cómo una proteína —ya sea cinesina, miosina o bombas iónicas- puede generar transporte unidireccional a partir de la hidrólisis del ATP.

La física del mundo microscópico es fundamentalmente diferente de la física de nuestro alrededor macroscópico, y requiere una descripción completamente distinta. Primero que nada, como la escala de longitud y de velocidad caen hasta escalas moleculares, el número de Reynolds también cae, y nos aproximamos al régimen sobreamortiguado en el cual la inercia no tiene más un rol (152,153) y donde la velocidad (y no la aceleración) de los objetos es proporcional a las fuerzas que actúan sobre ellos. Segundo, hay movimiento browniano. Los objetos microscópicos son golpeados al azar por las moléculas del medio circundante, y los procesos tienen una naturaleza inherentemente estocástica.

Dado que la escala temporal de los procesos macroscópicos está determinada por la velocidad y la aceleración de los objetos masivos, las fluctuaciones térmicas son despreciables. Por otro lado, para objetos microscópicos cada grado de libertad tiene una energía térmica significativa $\frac{1}{2} k_B T$ en promedio. Por lo que, el tiempo de los procesos está determinado por los eventos asistidos térmicamente (tal como la difusión o las transiciones activadas sobre barreras energéticas). Así, el diseño de aparatos microscópicos debe tomar en cuenta las fluctuaciones térmicas para explotarlas en vez de suprimirlas.

Consideremos el modelo más sencillo de potencial asimétrico. El cual sería una partícula Browniana en una dimensión con coordenada $x(t)$ y masa m , la cual es gobernada por la ecuación de movimiento de Newton:

$$m \left(\frac{d^2 x}{dt^2} \right) + V'(x(t)) = -\eta \frac{dx}{dt} + \xi(t) \quad (3.1)$$

Aquí $V(x)$ es un potencial periódico con periodo L ,

$$V(x + L) = V(x) \quad (3.2)$$

y simetría espacial rota, por lo que es el potencial asimétrico ya generalizado y tiene el papel del potencial asimétrico dado por Feynmann (Fig. 3-1 y 3-2).

Un ejemplo típico de éste sería:

$$V(x) = V_1 - V_0 \sin \frac{2\pi}{L} (x - x_0) - \frac{V_0}{4} \sin \frac{4\pi}{L} (x - x_0) \quad (3.2)$$

donde V_0 es la amplitud, y V_1 una constante arbitraria. El potencial está movido por una cantidad x_0 para hacer que el mínimo quede localizado en el origen [Fig. 3-3].

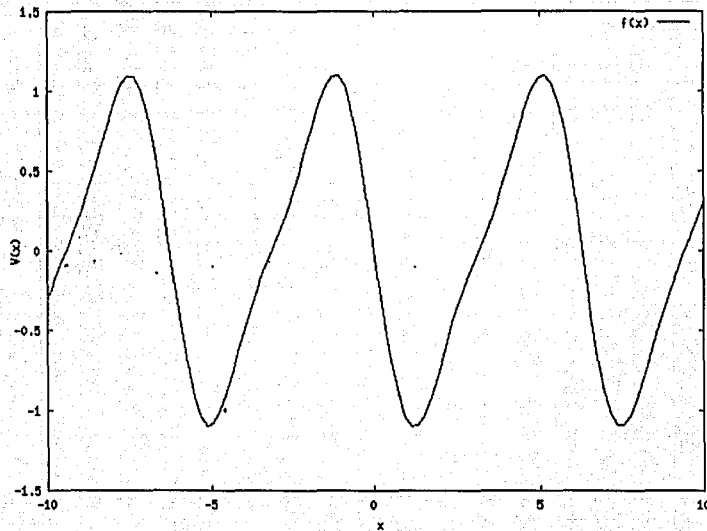


Fig.3-3

La parte izquierda de la ecuación 3.1 representa la parte determinística, conservativa de la dinámica de la partícula, mientras que el lado derecho da cuenta de los efectos térmicos del ambiente. Éstos son la disipación de energía, modelada en 3.1 como la fricción debido a la viscosidad con un coeficiente de fricción η , y fuerzas que fluctúan al azar en la forma de ruido térmico $\xi(t)$. Estos dos efectos no son independientes el uno del otro dado que ambos tienen el mismo origen, la interacción de la partícula $x(t)$ con un gran número de grados de libertad microscópicos del ambiente; i.e. una partícula va a "sentir" los golpes de las miles de moléculas, y a mayor temperatura, mayor energía con la que pueden golpear a la partícula y hacer más

azaroso su camino. Esta relación será expuesta en amplitud en las dos siguientes subsecciones. Por lo que aquí sólo utilizaré su resultado, el ruido y el coeficiente de fricción están relacionados,

Hagamos ahora algunas consideraciones que nos serán de gran utilidad para nuestra meta final, describir en términos físico-matemáticos la caminata de la cinesina sobre microtúbulos.

3.2.1 Sobreamortiguamiento

Para las biomoléculas que nos interesan o para sistemas muy pequeños, y para las cuales las fluctuaciones térmicas no son despreciables, la dinámica de 3.1 es sobreamortiguada, i.e. el término inercial $m\ddot{x}(t)$ es despreciable. Veamos porqué.

El cociente $\tau_{\text{relax}} = m/\gamma$ es una escala temporal característica de la ecuación de Langevin (3.1) y nos dice que tanto tiempo le tomará a una partícula perder su velocidad inicial via la fricción por viscosidad si el ruido térmico y todas las demás fuerzas que pudiera haber están apagadas. Multiplicando este tiempo por la velocidad característica de la partícula v , encontramos la distancia característica $\lambda_{\text{relax}} = v \tau_{\text{relax}} = v m/\gamma$ en la cual la partícula se detiene. Comparando esta distancia contra el tamaño de la partícula a , obtenemos información sobre la fuerza de amortiguamiento por viscosidad: si $\lambda_{\text{relax}}/a \ll 1$, el amortiguamiento es fuerte, porque la partícula se detiene en una distancia mucho menor que su propio tamaño; y si $\lambda_{\text{relax}}/a \gg 1$, el amortiguamiento es débil. Suponiendo que m es proporcional a $a^3\rho$ y γ es proporcional a $a\eta$ (cf. Ley de Stokes), donde ρ y η son la densidad y la viscosidad dinámica del medio, respectivamente. Entonces λ_{relax}/a se vuelve proporcional a

$$R = \frac{v a}{\eta/\rho} = \frac{v a}{\nu} \quad (3.4)$$

lo cual es llamado *número de Reynolds* ($\nu = \eta/\rho$ es la viscosidad dinámica). Es entonces el número de Reynolds el que caracteriza la fuerza del amortiguamiento.

Estimemos ahora el número de Reynolds para moléculas biológicas. El tamaño típico de una proteína es del orden de nanómetros ($a \approx 1$ nm), y la densidad y viscosidad dinámica del agua son $\rho \approx 10^3$ kg/m³ y $\eta \approx 10^{-3}$ kg/s/m, respectivamente. Las fuerzas máximas que actúan sobre proteínas son del orden de piconewtons (unos cuantos $k_B T$ sobre unos cuantos nanómetros); por lo que la velocidad de una proteína no puede ser mayor de $v = 1$ pN/($a\eta$) ≈ 1 m/s. Esto muestra que el número de Reynolds para biomoléculas es del orden de 10^{-3} o menor, i.e., estamos en el

régimen fuertemente amortiguado o *sobreamortiguado*. Un valor de $R = 10^3$ es algo asombroso, ¡Significa que la fricción por viscosidad puede detener a una proteína en una distancia ($\sim 10^3$ nm) mucho menor que el tamaño los átomos! (152, 174).

En este régimen sobreamortiguado, cuando las fuerzas cambian, la velocidad de la partícula se relaja tan rápidamente (durante τ_{relax}) y sobre una distancia tan pequeña ($\lambda_{\text{relax}} \ll a$) que el término de la aceleración en el lado izquierdo de la ecuación 3.1 puede ser despreciado. Por lo que nuestro sistema se simplifica aún más.

3.3 La Relación de Einstein.

La Ley de Boltzmann (implícitamente usada para calcular la probabilidad para producir una móvil perpetuo de segundo orden, en la primera sección) nos permite derivar una expresión que relacione el coeficiente de difusión con el coeficiente de fricción (i.e., conectar la parte termodinámica con la mecánica). Suponga que una fuerza externa, $F(x)$, actúa sobre la molécula que difunde. La fuerza podría ser la gravedad o por un resorte. La fuerza causará que la molécula se mueva con velocidad $v(x) = F(x)/\gamma$, donde γ es el coeficiente de fricción. Esta velocidad de "arrastre" es una superposición sobre el movimiento difusivo. La demostración es directa para mostrar que la fuerza genera un incremento en el flujo, dado por $v(x) \cdot c(x,t)$, o por $v(x) \cdot p(x,t)$ si estamos pensando en el flujo probabilístico, $j(x)$:

$$j(x) = -D \frac{dp}{dx}(x) + \frac{F(x)}{\gamma} p(x) \quad (3.5)$$

donde $c(x,t)$ y $p(x,t)$ son la concentración y la probabilidad, ambas como funciones de la posición y el tiempo. Entonces, en la presencia de la fuerza, la probabilidad satisface

$$\frac{\partial p}{\partial t}(x,t) = D \frac{\partial^2 p}{\partial x^2}(x,t) - \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{F(x)}{\gamma} p(x,t) \right]. \quad (3.6)$$

Esta ecuación, que describe la difusión con arrastre, es conocida como la ecuación de Fokker-Planck (151). Es usada ampliamente para calcular la densidad de probabilidad (como se le conoce a $p(x,t)$) en la literatura física sobre motores moleculares (139, 140, 142, 143, 151, 162, 175-178).

Si el sistema está en equilibrio, la probabilidad no cambia con el tiempo. La ecuación de Fokker-Planck puede ser resuelta para obtener $p(x)$. Esto es:

$$-D \frac{dp}{dx}(x) + \frac{F(x)}{\gamma} p(x) = j_0 = \text{constante} \quad (3.7)$$

Puede ser reescrito como

$$\frac{d}{dx} \left\{ p(x) \exp \left[\frac{U(x)}{D\gamma} \right] \right\} = -\frac{j_0}{D} \exp \left[\frac{U(x)}{D\gamma} \right] \quad (3.8)$$

donde $F(x) = -dU/dx$. Si integramos obtenemos

$$p(x) \exp \left[\frac{U(x)}{D\gamma} \right] = A - \frac{j_0}{D} B(x) \quad (3.9)$$

donde A es una constante y $dB/dx = \exp[U(x)/D\gamma]$. Después de reorganizar, esto se transforma en

$$p(x) = \left\{ A - \frac{j_0}{D} B(x) \right\} \exp \left[-\frac{U(x)}{D\gamma} \right] \quad (3.10)$$

La única manera que esta expresión pueda estar de acuerdo con la Ley de Boltzmann es hacer $A = 1/Z$, $j_0 = 0$, y $D\gamma = kT$. Y se puede concluir que en el equilibrio el flujo es cero.

Cuando la solución se compara con la Ley de Boltzmann, se encuentra que el flujo debe ser igual en todos lados, y que el coeficiente de difusión está relacionado con el coeficiente de fricción por,

$$D = \frac{k_B T}{\gamma} \quad (3.11)$$

Esta ecuación es conocida como la Relación de Einstein. Al relacionar un parámetro molecular, el coeficiente de fricción, con un parámetro macroscópico, el coeficiente de difusión, la relación de Einstein prueba ser un puente entre las teorías micro y macroscópicas de difusión. Con la ayuda de la Ley de Stokes, podemos estimar el coeficiente de difusión conociendo el tamaño de una partícula y la viscosidad de la solución

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (3.12)$$

donde r es el radio de una partícula esférica, y η es la viscosidad.

3.4 La Corriente y el Transporte.

La cantidad de mayor interés en el contexto del transporte en sistemas periódicos (como en nuestro caso) es la *corriente* $\langle dx/dt \rangle$, definida como el promedio dependiente del tiempo sobre las velocidades,

$$\langle x' \rangle \equiv \langle x'(t) \rangle \quad (3.13)$$

Por conveniencia, el argumento t en $\langle x' \rangle$ es omitido.

La dirección del transporte dirigido no es usualmente obvia *a priori*; depende de los detalles del arreglo del sistema y puede cambiar el signo como función de los parámetros de control como la temperatura, la masa de la partícula, la fuerza de fricción, la escala temporal y la fuerza de la perturbación fuera de equilibrio, por nombrar algunos. Por lo tanto el transporte en general puede pasar por el cero en un valor definido de algún parámetro. Nótese que las (o la) inversiones de corriente ocurren no sólo como función de un parámetro dado, como e.g. la temperatura, sino que la naturaleza misma del transporte rectificado implica así mismo una inversión de corriente como función de otros parámetros (147, 151, 154). Estas inversiones de corriente son de gran importancia para aplicaciones tecnológicas; forman la base necesaria para eficientes esquemas de separación de partículas. Como ejemplo, en (160) usan un ratchet para separar dos tipos distintos de fosfolípidos inmersos en una bicapa fluida bidimensional; y en (161) se logra transportar DNA con un microchip de silicón.

3.5 Principales tipos de ratchets.

Hay dos clases fundamentales de modelos de ratchets que surgen si consideramos como modelo general,

$$\eta \frac{dx}{dt} = -V'(x(t), f(t)) + y(t) + \xi(t) \quad (3.14)$$

Nótese que el término inercial ya desapareció, por las razones argumentadas en la subsección de sobreamortiguamiento.

El primero surge con $y(t) \equiv 0$, el cual se conoce como "ratchets pulsátiles". El segundo modelo es con $f(t) \equiv 0$, llamados "ratchets de fuerza cambiante".²

Dentro de los ratchets pulsátiles, la primera subclase es obtenida cuando $f(t)$ es aditiva, i.e.

$$V(x, f(t)) = V(x)[1 + f(t)] \quad (3.15)$$

Tales modelos llevan el nombre de "ratchets de potenciales fluctuantes". El sumando 1 es por convención. Esta clase contiene como caso especial los "ratchets on-off" o de encendido-apagado, cuando $f(t)$ puede tomar sólo dos posibles valores, uno es -1 (o 0 , como apagado -off- del potencial), y el otro valor es 1 , para cuando está prendido -on-.

Una segunda clase de ratchets pulsátiles, son los llamados "ratchets de potenciales viajeros", los cuales tienen potenciales de la forma,

$$V(x, f(t)) = V(x - f(t)) \quad (3.16)$$

La elección más natural, sugerida por el mismo nombre, es que $f(t)$ tenga un tiempo de deriva suficientemente largo. De esta subclase existen los ratchets de potenciales viajeros genuinos y los impropios.

Regresando ahora a los ratchets de fuerza cambiante, se caracterizan por $f(t) \equiv 0$, y por lo tanto

$$V(x, f(t)) = V(x) \quad (3.17)$$

Si $y(t)$ es un proceso estocástico, hablamos de un "ratchet de fuerza fluctuante". El caso en que sea con una fuerza $y(t)$ periódica, entonces es como las que se usan a nivel experimental (160, 161), y lleva el nombre de "ratchet mecedor".

² Existe una amplia literatura que revisa estos temas, 146 y 151 contienen buenas referencias además de ser 151 una muy buena revisión.

Si tenemos que el coeficiente de difusión depende del tiempo como $D(t) = D(t + T)$, entonces es un "ratchet difusivo". Ya que la fuerza es uniforme espacialmente, y con un coeficiente de difusión periódico en el tiempo,

Una clase importante de ratchets es dada en modelos con $f(t)$ y $y(t) \equiv 0$, pero con una dependencia espacial o temporal de la temperatura T en (3.13). Llevan los nombres de "ratchets de Seebeck" y "ratchets de temperatura". En el caso de la dependencia espacial de la temperatura, $T(x)$ es asumida con la misma periodicidad L que el potencial $V(x)$. En el caso de una dependencia temporal de la temperatura $T(t)$, se asume de nuevo un comportamiento estacionario, ya sea periódico o estocástico.

3.6 Aplicaciones.

El proceso estocástico $x(t)$ en 3.1 tiene un espacio de estado que es todo el eje real, y por simplicidad se le llama (a $x(t)$) una "partícula Browniana". Mientras que en algunos casos, $x(t)$ de hecho sí representa a una partícula física verdadera, en otros puede referirse a un tipo distinto de grados de libertad colectivos o alguna variable de estado (lenta vs t). Ejemplos de los segundos son por ejemplo la coordenada de reacción química de una enzima, la configuración geométrica o algún otro grado de libertad interno de una molécula, la posición de la matraca circular de la fig. 3.1, la fase Josephson en un SQUID (aparato de interferencia cuántica superconductor, SQUID por sus siglas en inglés), y la variable angular colectiva en modelos fenomenológicos de ondas de densidad de carga.

Veamos un ejemplo de cómo se usa toda esta teoría que hemos descrito a lo largo del capítulo para construir un motor molecular.

Un Ratchet Molecular (159). Los componentes principales de una matraca son una rueda, un trinquete y un resorte, que mantenga al trinquete contra la rueda (fig. 3.2). En este diseño se hizo al tripticeno la rueda, y el heliceno, que servirá como resorte y trinquete al mismo tiempo. Aunque los helicenos son helicoidales mas que planos, suponemos que la rotación del tripticeno alrededor del enlace tripticeno/heliceno doblará al heliceno más hacia que sea más plano, y la resistencia a esa deformación proveerá la fuerza de restauración inherente a un resorte (fig. 3.4).

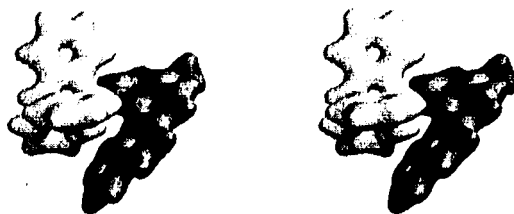


Fig. 3.4

En este trabajo Ross Kelly, trata de responder a la pregunta, ¿en qué dirección girará el triptíceno? Y aunque encuentra a través de experimentos de polarización de spin que el triptíceno girará igualmente en ambas direcciones, lo cual es una confirmación de nuestra discusión inicial de la segunda ley de la Termodinámica.

Sin embargo decide modificar la molécula, añade un grupo amino a una hoja del triptíceno y un grupo hidroxialquil es añadido al heliceno. Usando el combustible químico fosgeno (el cual es parecido químicamente al ATP), se reestructura el grupo amino como isocianato. A través de una serie de pasos, la molécula modificada rota unidireccionalmente 120° en el s.m.r. Incluso logra, modificando aún más la molécula, que adquiera una velocidad significativa de rotación de $t_{1/2} \approx 5$ minutos.

El estudio de los ratchets ha servido incluso para entender el funcionamiento de la reorganización inter-subunidades del ribosoma durante la traslocación (168), proceso mediante el cual se lleva a cabo la síntesis de proteínas en el ribosoma.

Hay mucho camino aún por delante, pero se está avanzando poco a poco.

CAPÍTULO CUATRO. MOTORES CAÓTICOS

De igual manera a como describimos en el capítulo pasado el modelo general de motores brownianos, en este haremos una descripción de las llamadas "matracas" deterministas, o "ratchets" deterministas. Éstos surgen cuando se estudian sistemas similares a los que se estudiaron en el capítulo pasado, pero en el límite determinista, es decir, cuando no existe ninguna clase de ruido. Lo que vamos a hacer es enfocarnos en la parte izquierda de la ecuación 3.1. Hay mucho trabajo dedicado a este tema (153-157 y las referencias que allí se encuentran). Estos ratchets (i.e. sistemas con un potencial periódico pero con asimetría espacial) tienen en general una dinámica caótica de la cual dependen sus propiedades de transporte. A lo largo de este capítulo hablaré de lo que es el caos de manera general, así como las distintos métodos que se usan para estudiarlo. Además veré la relación que tiene éste con la dinámica de estos ratchets o matracas.

4.1 Sistemas dinámicos (158).

Empecemos entendiendo que es un sistema dinámico. Los sistemas dinámicos son una rama de las matemáticas, que intenta entender los procesos en movimiento. Este tipo de procesos se dan en todas las áreas de la ciencia. Por ejemplo, el movimiento de estrellas y galaxias en los cielos es un sistema dinámico, que ha sido estudiado durante cientos de años por miles de científicos. El mercado financiero es otro sistema que cambia en el tiempo, como lo es el clima mundial. Los cambios que atraviesan diferentes químicos, el crecimiento y la caída de poblaciones, el latido cardiaco, y el movimiento del péndulo simple son ejemplos clásicos de sistemas dinámicos en química, biología y física.

¿Y para qué necesitamos un sistema dinámico? Bueno, dado que el sistema se está moviendo o cambiando con el tiempo, queremos predecir a dónde se dirige el sistema, a dónde irá a final de cuentas. Claramente, algunos sistemas dinámicos son predecibles, mientras otros no lo son. Sabemos que el sol saldrá mañana y que, cuando agregó crema a mi café, la reacción

química resultante no explotará. Por otro lado, predecir el clima dentro de un mes o el promedio del Dow Jones por una semana parece imposible.

Sin embargo, hay que recordar que lo que hacemos en realidad es proponer modelos de la realidad. Al proponer un sistema dinámico como modelo del mundo real, y al analizarlo nos ponemos en la tarea de entender al menos un poco más, el cómo del funcionamiento de esa maraña de fenómenos que observamos todos los días.

Los sistemas dinámicos que en particular me interesa tratar en este trabajo se relacionan directamente con lo que hemos visto en el capítulo pasado y que servirán de base para el próximo.

Recordemos pues la ecuación 3.1 pero ahora sin ruido,

$$m \left(\frac{d^2 x}{dt^2} \right) + V'(x(t)) = -\eta \frac{dx}{dt}$$

Donde m es la masa de la partícula, η es el coeficiente de fricción, $V(x)$ es el potencial periódico asimétrico.

Esta ecuación puede ser reescrita como un sistema de dos ecuaciones diferenciales,

$$\frac{dx}{dt} = v$$

$$m \left(\frac{dv}{dt} \right) = -\eta v - V'(x(t))$$

(4.1)

En las que se puede observar que el tiempo está dado de manera implícita. Este sistema puede o no tener solución analítica dependiendo de la forma del potencial al que es sometida la dinámica. Si por ejemplo es un potencial como el que aparece en el capítulo pasado, y que se utilizará también en el capítulo 5, el sistema se transforma en un sistema no-lineal, para el cual no existe solución analítica. Por lo que se recurrirá a resolverlo por medio del método de Runge-Kutta de orden cuatro.

El sistema 4.1 tiene mucho que dar si se le estudia con cuidado. En este capítulo hablaremos un poco de este sistema y de lo último que ha surgido de su estudio. Pero antes de

ello, analicemos un sistema sencillo, y observemos cuales son las herramientas para estudiar sistemas como el que nos compete en esta ocasión.

4.2 El péndulo y el plano fase (158, 163).

La razón de analizar primeramente al péndulo, es porque es quizás es el modelo más sencillo, del cual se pueden construir los conceptos y técnicas más usadas, a la vez que el modelo sencillo del péndulo se puede complicar para ejemplificar claramente cómo un sistema completamente determinístico puede exhibir comportamiento impredecible o "caótico".

El plano fase de un sistema dinámico es un espacio matemático con direcciones coordenadas ortogonales representando cada una de las variables que se necesita para especificar el estado en un instante del sistema. Por ejemplo, el estado de una partícula moviéndose en una dimensión es especificado por su posición (x) y su velocidad (v); por lo que su espacio fase es un plano. Por otro lado, si tuviésemos una partícula moviéndose en tres dimensiones tendría un espacio fase de seis dimensiones, tres de posición y tres de velocidad.

Enfoquémonos en la discusión del péndulo y empecemos con el simple péndulo y la aproximación de amplitudes pequeñas donde el término $\sin\theta$, lo tomamos como θ . La ecuación de movimiento es:

$$d^2\theta/dt^2 + \theta = 0$$

Con la adición de la velocidad angular como variable, $\omega = d\theta/dt$, esta ecuación lineal de segundo orden puede ser reducida a dos ecuaciones de primer orden:

$$d\theta/dt = \omega$$

$$d\omega/dt = -\theta$$

(4.2)

En este sentido cada variable dinámica tiene su propia ecuación diferencial de primer orden. Sin pérdida de generalidad, las condiciones iniciales pueden ser elegidas tal que la solución sea

$$\theta = a_1 \cos t \text{ y } \omega = a_1 \sin t$$

donde $\{a_i\}$ representa las posibles amplitudes del movimiento. Este conjunto solución da curvas paramétricas para θ y ω , y uno puede eliminar el tiempo para generar representaciones bidimensionales para diferentes valores de a_i . Este diagrama, ilustrado en la figura 4-1, es el diagrama del espacio fase apropiado. Cada valor de a_i genera una órbita cerrada de energía fija. La energía se incrementa con el cuadrado del radio a_i . Esta órbita es usualmente llamada una trayectoria fase.

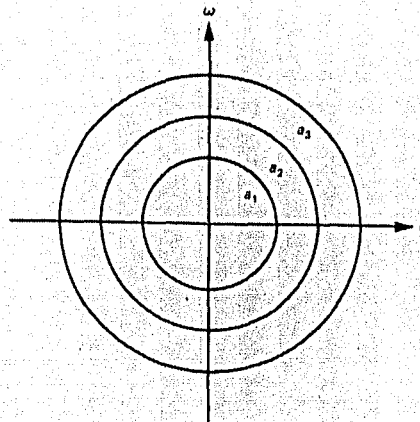


Figura 4-1, Espacio fase conformado por ejes θ y ω , donde cada a_i es una órbita cerrada de energía fija.

Aún más, el espacio fase está repleto de trayectorias, dado que cada punto juega el papel de una condición inicial. Para sistemas no-lineales, no hay típicamente esperanza de encontrar las trayectorias analíticamente. Incluso cuando hay disponibles fórmulas explícitas, son por lo general muy complicadas para proveer un acercamiento. En lugar de eso nosotros trataremos de determinar cualitativamente el comportamiento de las soluciones. Nuestro objetivo es el encontrar el espacio fase directamente de las propiedades del sistema (4.2 por ejemplo), o que en su forma general de campo vectorial en el plano fase puede ser escrito como,

$$\frac{dx_1}{dt} = f_1(x_1, x_2)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = f_2(x_1, x_2)$$

donde f_1 y f_2 son funciones dadas. Este sistema puede ser escrito de forma más compacta en notación vectorial como,

$$\frac{dx}{dt} = f(x)$$

donde $x = (x_1, x_2)$ y $f(x) = (f_1(x), f_2(x))$.

Algunas de las características más sobresalientes de cualquier espacio fase son:

- a. Los puntos fijos. Éstos satisfacen $f(x^*) = 0$, y corresponden a los estados estacionarios o de equilibrio del sistema.
- b. Las órbitas cerradas. Éstas corresponden a las soluciones periódicas, esto es, soluciones para las cuales $x(t + T) = x(t)$ para toda t , y para algunas $T > 0$.
- c. El arreglo o disposición de las trayectorias cerca de los puntos fijos o de las órbitas cerradas.
- d. La estabilidad o inestabilidad de los puntos fijos y de las órbitas cerradas.

Una característica importante del espacio fase es que dos trayectorias correspondientes a energías similares pasarán muy cerca una de la otra, pero las órbitas no se cruzarán. Esta propiedad de no-cruzamiento se deriva del hecho de que los estados pasados y futuros de un sistema mecánico determinístico están dados unequivocamente por el estado del sistema a un tiempo dado. Un cruzamiento de las trayectorias al tiempo t introduciría ambigüedad en los estados pasados y futuros, por lo tanto el sistema quedaría indeterminado. Asimismo la no intersección de las trayectorias proviene como corolario del teorema de existencia y unicidad. Si dos trayectorias se intersectaran, entonces habría dos soluciones que surgirían del mismo punto (el punto en el cual se cruzan), y por lo tanto violando la parte de unicidad del teorema.

Otra característica del espacio fase de sistemas conservativos (de energía constante) es la preservación de áreas. Esto significa que todos los puntos que se encuentran en una área dada del espacio fase a un tiempo se mueve de tal modo que en un tiempo posterior el área ocupada por éstos puntos sigue siendo la misma (Fig. 4-2). Esta propiedad de preservación de área, o de

volumen en un espacio de más dimensiones, es una característica general de los sistemas conservativos. Ésto lleva a una clasificación de los sistemas dinámicos en dos categorías – conservativos o disipativos – dependiendo si los volúmenes del espacio fase permanecen constantes o se contraen, respectivamente.

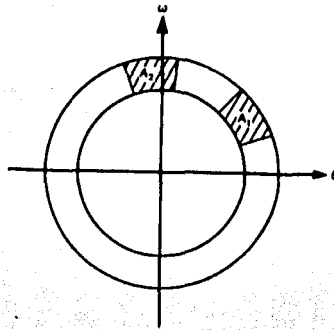


Figura 4-2, Se muestra la preservación de áreas en el plano fase.

Por ejemplo, el péndulo linealizado sin amortiguamiento conserva la energía, y sus trayectorias preservan el área fase. Por el otro lado, las trayectorias del péndulo linealizado pero amortiguado,

$$d^2\theta/dt^2 + d\theta/dt + \theta = 0 \tag{4.3}$$

decaen a un sólo punto: $\omega = 0 = \dot{\theta}$. Esta contracción de área se ilustra en la figura 4-3. Tal punto es llamado atractor, porque un conjunto finito de coordenadas (θ, ω) convergen a él. Obviamente el área fase no se preserva y se dice que el sistema es disipativo.

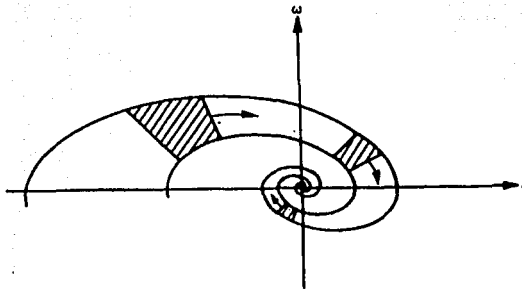


Figura 4-3, contracción del espacio fase hacia un atractor.

Ahora veamos el péndulo restaurando el torque, $\sin\theta$, en (4.3),

$$d^2\theta/dt^2 + d\theta/dt + \sin\theta = 0 \quad (4.4)$$

Como se indicó anteriormente, el término de amortiguamiento resulta en un atractor en el origen cuando $\sin\theta \approx \theta$. Ahora, sin embargo, más atractores existen en $\theta = \pm n\pi$, $\omega = 0$. Esto puede ser visto fijando la velocidad fase igual a cero y resolviendo para valores estacionarios de θ y ω ; esto es,

$$\begin{aligned} d\theta/dt &= \omega = 0 \\ d\omega/dt &= -\omega - \sin\theta = 0 \end{aligned} \quad (4.5)$$

Mientras que estos atractores son puntos donde la velocidad fase se hace cero, surgen preguntas acerca de la estabilidad de estos puntos. ¿Regresarán las trayectorias a estos puntos si son ligeramente perturbadas? ¿Dependerá la estabilidad de la dirección de la perturbación? Estas preguntas pueden ser respondidas mirando cuidadosamente cerca de los puntos críticos. Una técnica muy usada para examinar el comportamiento dinámico cerca de los puntos críticos involucra la suposición de que el sistema no se desviará substancialmente del comportamiento lineal cerca de los puntos críticos. Entonces cada uno de los términos no-lineales en las ecuaciones diferenciales se le asigna una aproximación lineal cerca de los puntos críticos. Este método fue desarrollado por Poincaré en 1914.

En el caso del péndulo amortiguado,

$$\begin{aligned} d\theta/dt &= \omega \\ d\omega/dt &= -\omega - \sin\theta \end{aligned} \quad (4.6)$$

es fácil de ver que cerca de $\theta = \pm n\pi$, donde n es par, la aproximación lineal es,

$$\begin{aligned} d\theta/dt &= \omega \\ d\omega/dt &= -\omega - (\theta - n\pi) \end{aligned} \quad (4.7)$$

y cuando n es impar, la aproximación lineal se convierte en,

$$\begin{aligned} \frac{d\theta}{dt} &= \omega \\ \frac{d\omega}{dt} &= -\omega + (\theta - n\pi) \end{aligned} \quad (4.8)$$

En cada caso θ es transformada en un valor centrado en el punto crítico tal que $\theta \rightarrow \Delta\theta = \theta - n\pi$ y por lo tanto las ecuaciones del plano fase linealizadas son,

Para n par;

$$\begin{aligned} \frac{d\Delta\theta}{dt} &= \omega \\ \frac{d\omega}{dt} &= -\omega - \Delta\theta \end{aligned}$$

n impar;

$$\begin{aligned} \frac{d\Delta\theta}{dt} &= \omega \\ \frac{d\omega}{dt} &= -\omega + \Delta\theta \end{aligned}$$

(4.8)

Siguiendo el método usual para resolver conjuntos de ecuaciones diferenciales lineales de primer orden, se proponen soluciones de la forma $\Delta\theta = Ae^{\lambda t}$ y $\omega = Be^{\lambda t}$ para ser sustituidas en las ecuaciones; esto lleva a dos pares de ecuaciones homogéneas algebraicas. La condición para una solución no-trivial es el desvanecimiento de los determinantes de los coeficientes de A y B. Esta condición produce ecuaciones características cuadráticas en λ para cada caso:

$$\lambda^2 + \lambda + 1 = 0: \text{ si } n \text{ es par,} \quad \lambda^2 + \lambda - 1 = 0: \text{ si } n \text{ es impar.} \quad (4.9)$$

Para el caso n par, los valores de λ son conjugados complejos con parte real negativa. Esto implica que ambos $\Delta\theta$ y ω serán atraídos en forma de espiral hacia el punto atractor de equilibrio, el cual es llamado foco. Este caso se muestra en la figura 4-4(a).

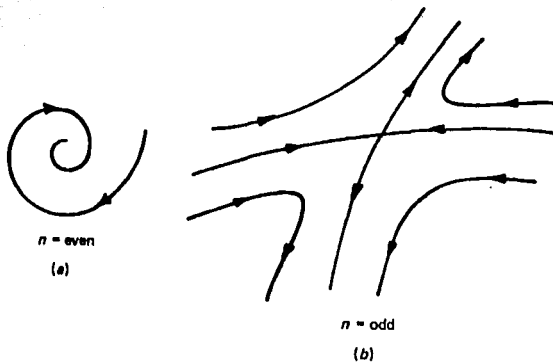


Figura 4-4, (a) un atractor, y (b) un punto silla.

Por otro lado, cuando n es impar se producen dos valores reales de λ , uno positivo y uno negativo. En este caso las trayectorias fase estables se mueven hacia el punto crítico en una dirección (exponente negativo), pero las trayectorias inestables se mueven alejándose de el punto crítico en otra dirección (exponente positivo). Este tipo de punto crítico es llamado punto silla y se muestra en la figura 4-4(b). Las direcciones respectivas son obtenidas determinando los coeficientes apropiados de A y B para cada valor de λ . Juntando toda esta información, el diagrama fase para el péndulo amortiguado puede ser dibujado como en la figura 4-5. Como puede ser visto en la figura (4.5), el espacio fase es dividido en regiones que se alternan indicado por el sombreado. Dentro de cada región todas las trayectorias eventualmente se irán en espiral hacia el punto focal de su región. Tales regiones son llamadas cuencas de atracción. Más aún, cada una de las curvas diagonales que divide una cuenca de otra es llamada separatriz. La flechas indican el flujo de las trayectorias, hacia y desde los puntos silla. Una característica del caos es la disolución parcial de la separatrizen cuando las cuencas empiezan a mezclarse.

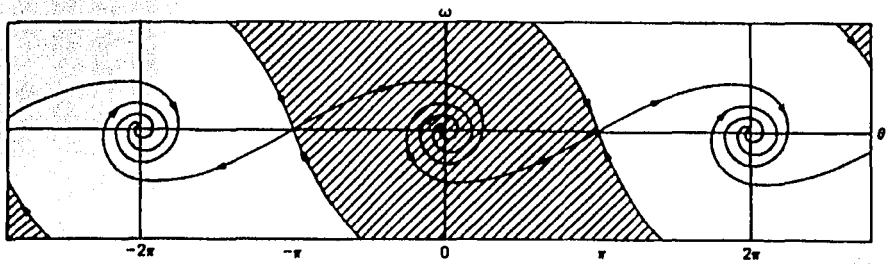


Figura 4-5, Se puede observar el plano fase completo del péndulo amortiguado. Se alternan regiones sombreadas y no sombreadas, mostrando las cuencas de atracción.

Aunque nuestra discusión se ha centrado en el plano fase, es importante darse cuenta que la construcción del espacio fase no está necesariamente confinada a dos dimensiones. Más aún, si el sistema (no su plano fase) no tiene más de tres dimensiones no es posible el comportamiento caótico. Esto es fundamentado en el hecho inverso, en dos dimensiones: sólo existen o puntos fijos, o ciclos límites como soluciones estables a sistemás dinámicos (Teorema Poincaré-Bendixson).

De hecho la estructura geométrica de los atractores es mucho más compleja que lo que se ha visto hasta ahora. Un atractor extraño es un atractor que exhibe sensibilidad a las condiciones iniciales (característica fundamental del caos, como veremos más adelante en este mismo

capítulo). Los atractores extraños fueron llamados originalmente extraños porque generalmente son conjuntos fractales (conjuntos matemáticos de dimensión no entera o fraccionaria). Hoy en día esta propiedad geométrica se le considera menos importante que la propiedad dinámica de su dependencia a las condiciones iniciales. Los términos atractor caótico y atractor fractal son usados cuando alguien desea enfatizar una o la otra de estas propiedades.

4.3 La Sección de Poincaré (158).

La sección de Poincaré es un instrumento inventado por Henri Poincaré como medio para simplificar los diagramas del espacio fase de sistemas complicados. Es construido mirando estroboscópicamente el diagrama del espacio fase de tal manera que el movimiento es observado periódicamente. Para el péndulo forzado, el periodo del estroboscopio es el periodo del forzamiento.

El método de Poincaré consiste en cortar o seccionar el atractor espiral (de nuestro caso del péndulo) en intervalos regulares y observar estas secciones a lo largo del eje ϕ a través del plano (θ, ω) . Si este seccionamiento es realizado a intervalos correspondientes al movimiento del forzamiento, entonces la imagen estroboscópica muestra sólo un punto. El movimiento siempre vuelve a las mismas coordenadas (θ, ω) siempre que ϕ se incrementa con 2π . La figura 4-6 ilustra este resultado.

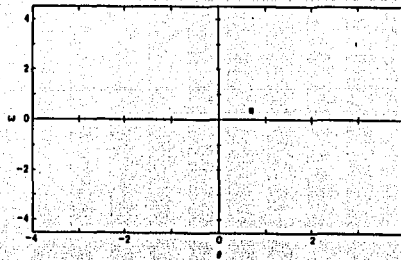


Figura 4-6, Sección de Poincaré del péndulo linealizado.

La sección de Poincaré puede darnos información acerca de la razón de la frecuencia estroboscópica, ω_s , sobre la frecuencia natural de la dinámica, ω_0 . Por ejemplo, si un movimiento

el cual su frecuencia natural es igual a 1 fuera sometido al estroboscopio con frecuencia igual a 2, la sección de Poincaré tendría dos puntos. En general, si la frecuencia natural, ω_0 , es igual a $(p/q)\omega_s$, donde p/q es racional, entonces hay q puntos, y el orden de aparición es tal que, cuando aparece un punto sobre el círculo, se saltan las siguientes $[q-(p+1)]$ posiciones (fig. 4-7).

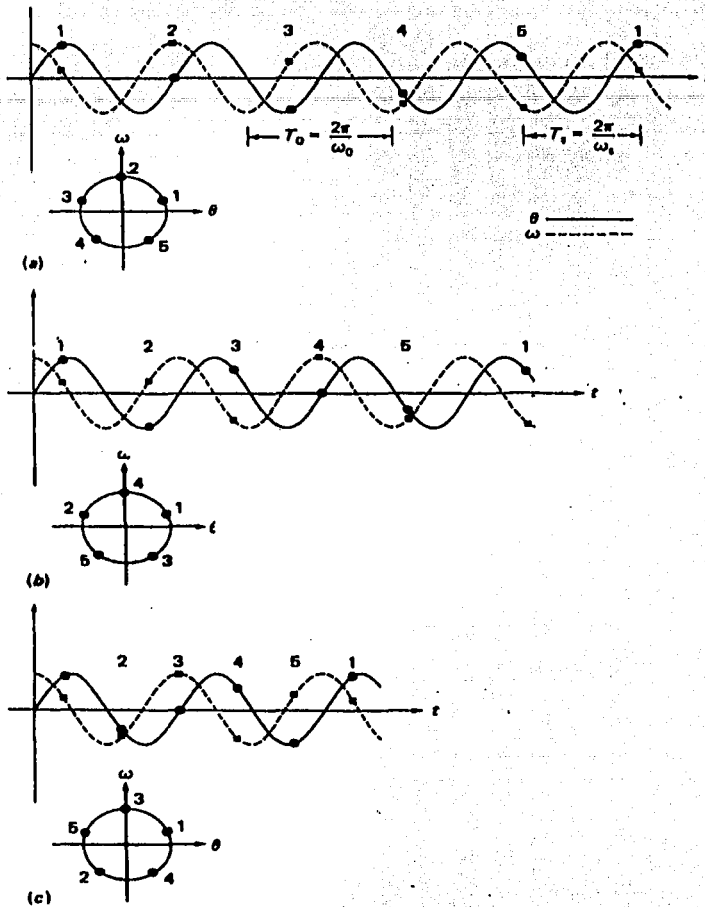


Figura 4-7. Se ilustra la relación entre el período del estroboscopio, y la frecuencia del movimiento.

Si el péndulo da toda una vuelta completa, entonces ω tiene una componente de corriente directa también, y el patrón de puntos no está centrado en el origen. Dado que la mezcla de

rotación y oscilación pueden conducir a un desplazamiento promedio $\langle \theta \rangle$ distinto de cero, el conjunto de puntos obtenidos será generalmente asimétrico. Más aún, si la relación entre la frecuencia del estroboscopio y la frecuencia del péndulo (o la natural de lo que sea que se trate) es irracional, entonces los puntos nunca se repetirán y gradualmente llenarán un círculo en la sección de Poincaré. Finalmente, si el sistema se torna disipativo (o lo es de antemano) —en el caso del péndulo con la adición del término de amortiguamiento— entonces los puntos en la sección de Poincaré se moverán hacia el atractor apropiado. Los tres tipos se muestran en la figura 4-8.

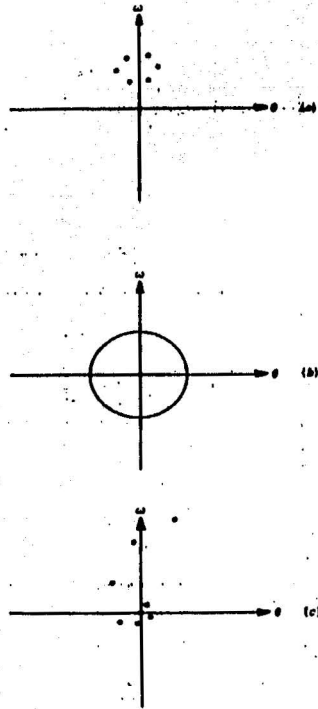


Figura 4-8, (a) Movimiento combinado (oscilatorio y rotacional), (b) Movimiento oscilatorio, y (c) Movimiento disipativo.

Para un sistema dinámico con un término de forzamiento periódico, la sección de Poincaré provee una simplificación del diagrama fase al mismo tiempo que conserva las características esenciales de la dinámica. Para movimientos periódicos, la apariencia de estas

secciones es bastante sencilla. Pero, como más adelante veremos al estudiar el comportamiento caótico, incluso en el péndulo, la simplificación del espacio fase con la sección de Poincaré es muy importante para el entendimiento de la física del sistema.

4.4 Diagramas de Bifurcación (158).

Estudiemos ahora la ecuación del péndulo forzado

$$\ddot{\theta} + \frac{1}{q}\dot{\theta} + \sin \theta = g \cos \omega_D t \quad (4.10)$$

donde g es la amplitud del forzamiento, $1/q$ es el coeficiente de fricción, y ω_D la frecuencia del forzamiento.

Diagramas del espacio fase, así como secciones de Poincaré dan información acerca de la dinámica del péndulo (o de cualquier otro sistema) para valores específicos de los parámetros g , q , y ω_D . La dinámica puede ser más globalmente observada sobre un gran rango de valores de los parámetros, posibilitándonos la comparación simultánea del comportamiento periódico y caótico.

Para algunos valores de los parámetros, el péndulo tendrá un sólo tipo de movimiento a largo plazo, mientras que para pequeñas diferencias de estos valores, dos o más comportamientos son posibles. Si muchos de ellos son estables, el comportamiento adquirido dependerá de las condiciones iniciales. En dinámica un cambio en el número de soluciones de una ecuación diferencial cuando se varía el parámetro se llama bifurcación.

Para el péndulo, las bifurcaciones son fácilmente detectadas examinando una gráfica de ω (a una fase fija en el ciclo de forzamiento) versus la amplitud del forzamiento g . Un ejemplo de esto es la figura 4-9. La interpretación es relativamente directa. Si el péndulo es forzado ligeramente y el movimiento es periódico con el mismo periodo que el de la frecuencia de forzamiento, ω_D , entonces la velocidad angular ω tiene un valor a un tiempo dado (punto de fase constante) durante el ciclo de forzamiento. Si el parámetro g se incrementa suficientemente, más componentes de periodo mayor son adicionados al movimiento, y uno observa más de un valor para ω en una fase dada. Este sistema ha sufrido una bifurcación.

Para los diagramas mostrados en la figura 4-9, ω es tomada al principio del ciclo de forzamiento ($\phi = 0$). A este sistema se le permite llegar a un estado estacionario omitiendo los primeros 30 ciclos de forzamiento. La figura muestra los 30 siguientes ciclos. Supongamos que el péndulo es ligeramente forzado (digamos $g = 0.9$) como en la figura 4-9(a). Su movimiento es una oscilación en la frecuencia del forzamiento. La trayectoria fase es un ciclo límite que es simétrico con respecto al origen; la sección de Poincaré correspondiente muestran un punto fijo. La velocidad angular toma sólo un valor en el diagrama de bifurcación.

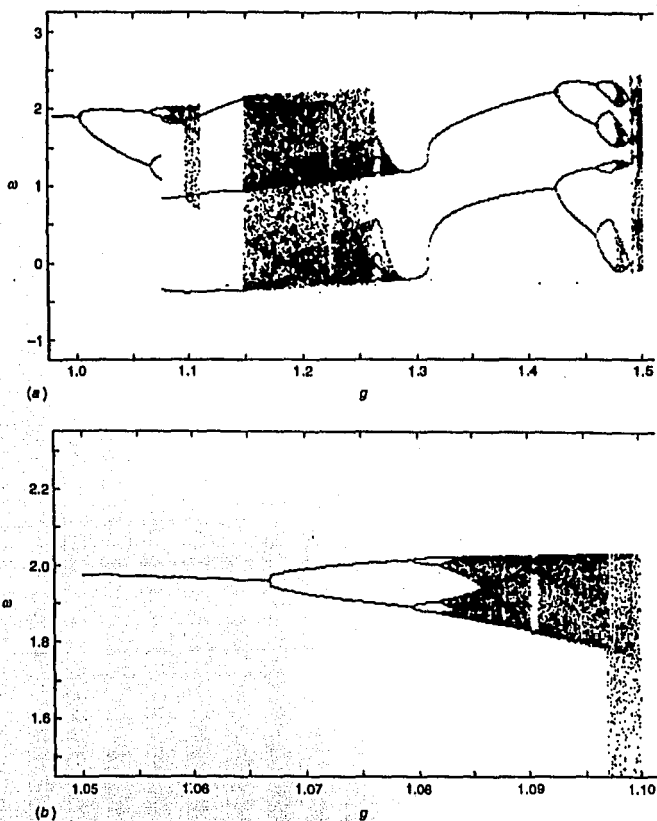


Figura 4-9 Mostrando (a) diagrama de bifurcación para valores de la velocidad angular, contra la amplitud del forzamiento; (b) ampliación de (a). Se puede apreciar las zonas caóticas y las periódicas. Donde $q = 2$, y $\omega_D = 2/3$.

Si el forzamiento es aumentado ligeramente a 1.025, entonces la trayectoria fase pierde su simetría con respecto al origen y adquiere dos diferentes formas dependiendo de las condiciones iniciales elegidas. Este doble valor aparece en la figura 4-9(a) como una separación. Pero nótese que el movimiento del péndulo es aún oscilatorio, con una frecuencia principal ω_D y con otros posibles armónicos de mayor frecuencia. Cada conjunto de condiciones iniciales produce sólo un valor de ω en el diagrama de bifurcación. Una de tales ramas se muestra en la figura 4-9(b). Si el forzamiento se incrementa a aproximadamente 1.07, la periodicidad del péndulo se dobla, y ahora tiene componentes de frecuencia a ω_D y a $\omega_D/2$. La observación de un conjunto dado de condiciones iniciales muestra dos movimientos oscilatorios ligeramente distintos de frecuencia ω_D cuya combinación tiene una frecuencia $\omega_D/2$. Este efecto es llamado doblamiento de periodo. Causa que el sistema varíe entre dos valores de ω (al inicio del ciclo) por cada conjunto de condiciones iniciales. Este cambio es evidente en la figura 4-9(a). Dado los dos valores resultantes de los dos atractores asimétricos, un total de 4 valores de ω pueden ocurrir a ϕ igual a 0. El diagrama de bifurcación es muy complejo. Para ciertos rangos del valor del parámetro g , la velocidad angular toma un número infinito número de valores, donde también hay mucho huecos; estos estados son caóticos. Es, así mismo, interesante observar que dentro de las regiones caóticas hay pequeños intervalos en los cuales el movimiento abruptamente se torna periódico de nuevo. A estos intervalos de zonas periódicas, se les conoce como ventanas periódicas. Más allá de la región caótica que ocupa mucho del intervalo $1.08 < g < 1.28$, un amplio intervalo de movimiento periódico surge de nuevo, centrado en $g = 1.35$.

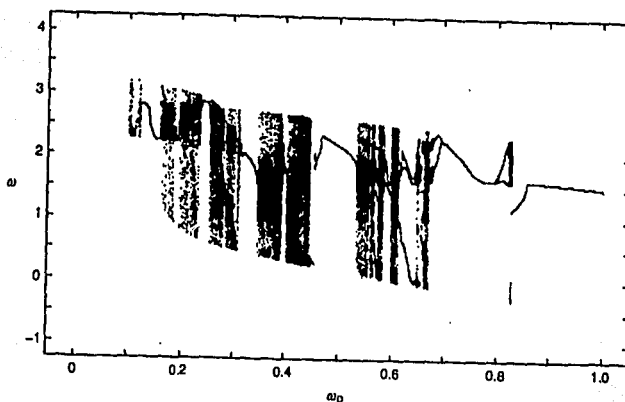


Figura 4-10 Diagrama de bifurcación usando ω_0 como parámetro a variar. Con $q = 4$ y $g = 1.1$.

La secuencia de bifurcación observada como función de g cambia dramáticamente si los parámetros q y ω_D cambian. Diagramas de bifurcación utilizando q y ω_D como variables independientes también generan variedad de comportamientos dinámicos; por ejemplo la figura 4-10.

4,5 Caos (163-165).

Los tres ingredientes básicos para que un sistema sea caótico son:

1. Conjunto denso de órbitas periódicas inestables.

En el plano fase podemos tener puntos atractores o repulsores, así como ciclos límites. En un mismo plano fase pueden coexistir más de un ciclo o punto. Incluso puede haber conjuntos de unos y otros. La dinámica será dirigida hacia uno de estos puntos o ciclos dependiendo de sus condiciones iniciales. Si tenemos un conjunto denso de órbitas periódicas inestables, la dinámica va a saltar de una órbita periódica a otra. Y aunque siempre va a tener un periodo, como brinca de una órbita a otra órbita, su periodo cambia también siempre.

Los puntos periódicos para una función F son densos, siendo muy formales:

Definición. Supóngase un conjunto X y un subconjunto Y de X . Decimos que Y es denso en X si, para cualquier punto $x \in X$, hay un punto y en el subconjunto Y arbitrariamente cercano a x .

Equivalentemente, Y es denso en X si para cualquier $x \in X$ podemos encontrar una secuencia de puntos $\{y_n\} \in Y$ que convergen a x . Por ejemplo, el subconjunto de números racionales es denso en el conjunto de los números reales. Así como también lo es el subconjunto de números irracionales. Sin embargo, los enteros están lejos de ser densos en los reales. Finalmente, el intervalo abierto (a, b) es denso en el intervalo cerrado $[a, b]$.

2. Existe el mezclado.

Esto en términos sencillos es que las órbitas periódicas inestables estén entre-mezcladas. Que no sea un arreglo estructurado donde de un punto se siga otro, o de un ciclo vaya otro, como en la figura 4-5. Sino que su estructura sea más bien como en la figura 4-18.

A esta propiedad de mezclado, los matemáticos que iniciaron el área, de forma muy rigurosa le llaman: la función F es transitiva.

Definición. Un sistema dinámico es transitivo si para cualquier par de puntos x y y , y cualquier $\varepsilon > 0$ existe un tercer punto z dentro de ε de x , cuya órbita pasa por dentro de ε de y .

En otras palabras, un sistema dinámico transitivo tiene la propiedad de que, dados dos puntos cualquiera, podemos encontrar una órbita que pasa arbitrariamente cerca de ambos puntos. Claramente, un sistema dinámico que tiene una órbita densa es transitivo, ya que la órbita densa pasa arbitrariamente cerca de todos los puntos. Y también la inversa es cierta —un sistema dinámico transitivo tiene una órbita densa.

3. La función F depende sensitivamente de las condiciones iniciales.

Definición. Un sistema dinámico F depende sensitivamente de las condiciones iniciales si hay una $\beta > 0$ tal que para cualquier x y cualquier $\varepsilon > 0$ hay una y dentro de ε de x y una k tal que la distancia entre $F^k(x)$ y $F^k(y)$ es al menos β .

En esta definición es importante el entender el orden de los cuantificadores. Esta definición dice que, no importa con cual x comencemos y sin importar que tan pequeña región escojamos alrededor de x , siempre podremos encontrar una y en esta región cuya órbita eventualmente se separa de x al menos por una β . Más aún, la distancia β es independiente de x . Como consecuencia, para cada x , hay puntos arbitrariamente cercanos cuyas órbitas eventualmente estarán “lejos” de x .

La definición de sensibilidad no requiere que la órbita de y permanezca lejos de x para todas las iteraciones. Sólo necesitamos un punto en la órbita que esté lejos del correspondiente iterado de x . Entre otras definiciones de sensibilidad a condiciones iniciales, una común requiere que ciertas órbitas cercanas divergan exponencialmente. Esto es, usando los exponentes de Lyapunov, si son positivos las órbitas divergirán exponencialmente unas de otras. Esto es claro si se piensa que e elevado a cualquier cosa positiva (en este caso un exponente multiplicado por el tiempo, que siempre positivo, depende del signo del exponente), se va rápidamente a infinito. Que conjuntamente con las otras propiedades hace que la dinámica esté “encerrada” en un volumen del espacio fase, nunca se cruce, pero dos condiciones muy cercanas se separen exponencialmente y un tiempo después vuelvan a estar arbitrariamente cerca.

4.6 Transporte caótico e Inversiones de Corriente (153-155),

Regresemos ahora al estudio del sistema 4.1, que puede ser escrito como,

$$m \left(\frac{d^2 x}{dt^2} \right) + V'(x(t)) = -\eta \frac{dx}{dt}$$

Si agregamos una fuerza externa,

$$m \left(\frac{d^2 x}{dt^2} \right) + V'(x(t)) = -\eta \frac{dx}{dt} + F_0 \cos(\omega_D t) \quad (4.11)$$

Donde m es la masa de la partícula, η es el coeficiente de fricción, $V(x)$ es el potencial periódico asimétrico, F_0 es la amplitud del forzamiento externo, y ω_D es la frecuencia del forzamiento externo.

Este sistema (4.11) ha sido estudiado por (157) Jung, Kissner, y Hänggi, donde motivados por el trabajo sobre motores brownianos, eliminan el ruido y analizan el sistema ahora con la parte inercial. Con inercia finita, se le permite a la dinámica ser más compleja, exhibiendo ambos comportamientos, regular y caótico. Usando 4.3 estudian hasta que grado el caos inducido determinísticamente puede imitar el rol del ruido. Ellos encuentran que la corriente o transporte, puede ser en cualquier dirección (múltiples inversiones de corriente). La dirección del transporte puede ser controlada simplemente ajustando la amplitud de la fuerza periódica externa, así como que depende sensitivamente de la fuerza de la inercia y de la fricción.

El estudio de las inversiones de corriente y de la dirección del transporte, tiene implicaciones tanto tecnológicas (147, 160, 161), como para la parte básica en investigación. Una de ellas es el entendimiento de los motores moleculares, tema del cual nos ocupamos en este trabajo.

El potencial con el cual vamos a trabajar es (153-155),

$$V(x) = V_1 - V_0 \left[\sin \frac{[2\pi(x-x_0)]}{L} + \frac{1}{4} \sin \frac{[4\pi(x-x_0)]}{L} \right] \quad (4.12)$$

donde L es la periodicidad del potencial, V_0 es la amplitud, C es una constante arbitraria, así como x_0 para tener un mínimo del potencial en $x = 0$ con $V(0) = 0$, y $\delta = \sin(2\pi|x_0|) + \sin(4\pi|x_0|)$; fig. 4-11.

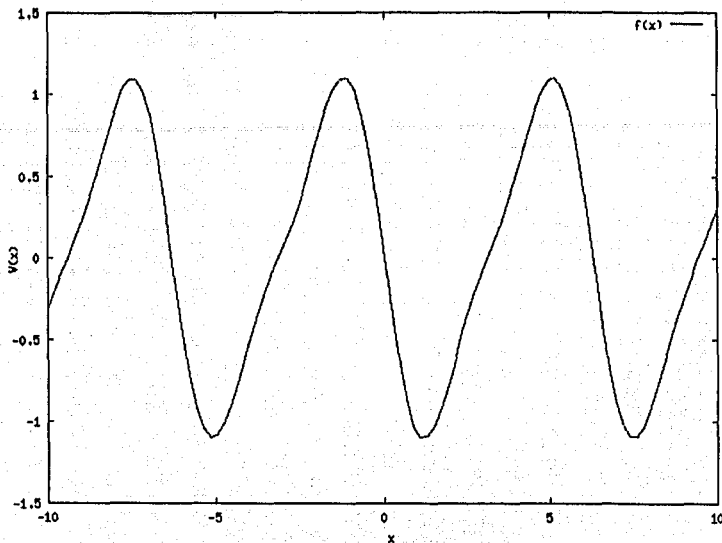


Figura 4-11 Potencial periódico asimétrico.

La ecuación (4.11) puede ser reescrita en forma adimensional como,

$$\left(\frac{d^2x}{dt^2}\right) + b\frac{dx}{dt} + \frac{dV(x)}{dx} = + a \cos(\omega t) \quad (4.13)$$

donde a es,

$$a = \frac{1}{4\pi^2\delta} \frac{F_0}{(V_0/L)}$$

que es, a excepción de un factor constante, a es la razón de F_0 y de la fuerza V_0/L , donde V_0 es la amplitud y L es la periodicidad del potencial.

Como lo que nos interesa es estudiar en detalle el origen de la inversión de corriente, estudiemos la corriente J en sí misma. Que la definimos como el tiempo promedio de la velocidad promedio sobre un conjunto de condiciones iniciales. Por lo tanto, la corriente involucra dos diferentes promedios; el primer promedio es sobre M condiciones iniciales, que tomamos como igualmente distribuidas en el espacio, centradas alrededor del origen y con una velocidad inicial igual a cero. Para un tiempo fijo, digamos t_j , obtenemos la velocidad promedio, que denotamos como v_j , y está dada por

$$v_j = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \frac{dx_i(t_j)}{dt} \quad (4.14)$$

El segundo promedio es el temporal; pero dado que tenemos que tomar un tiempo discreto para resolver la ecuación de movimiento por métodos numéricos, tenemos un conjunto discreto finito de N diferentes tiempos t_j ; entonces la corriente se define como

$$J = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N v_j \quad (4.15)$$

Usando esta definición, calculamos la corriente fijando los parámetros $b = 0.1$ y $\omega = 0.67$ y variando a . Como muestra la figura 4-12 existen múltiples inversiones de corriente; así como el comportamiento de la velocidad en algunas zonas es estable y en otras caótico. Este sistema es como el problema del péndulo, pero con simetría espacial rota. La ruptura de simetría es una característica de los sistemas complejos. Esta ruptura puede ser espacial o temporal como lo demuestran varios trabajos sobre el tema (156, 162, 167), además de estar asociada a las transiciones de fase (169).

Analizando sólo una pequeña región de los valores de a , observamos una de las rutas al caos, la del doblamiento de periodo (fig. 4-13(a)). Al principio, la corriente es dominada por órbitas periódicas, y en tanto crece la a las órbitas se tornan caóticas por esta ruta de doblamiento de periodo.

Cerca de $a \cong 0.08$ como se muestra en la figura 4-13, observamos un doblamiento de periodo que lleva al caos. De hecho en esta región, existe la posibilidad de coexistencia de múltiples atractores en el espacio fase. En este ejemplo existe uno caótico y uno periódico

cercano a $a = 0,067$. La corriente en esta región caótica se vuelve menos eficiente, hasta que exactamente en un punto ($a_c \equiv 0,08092844$) se abre una ventana periódica, la corriente se invierte.

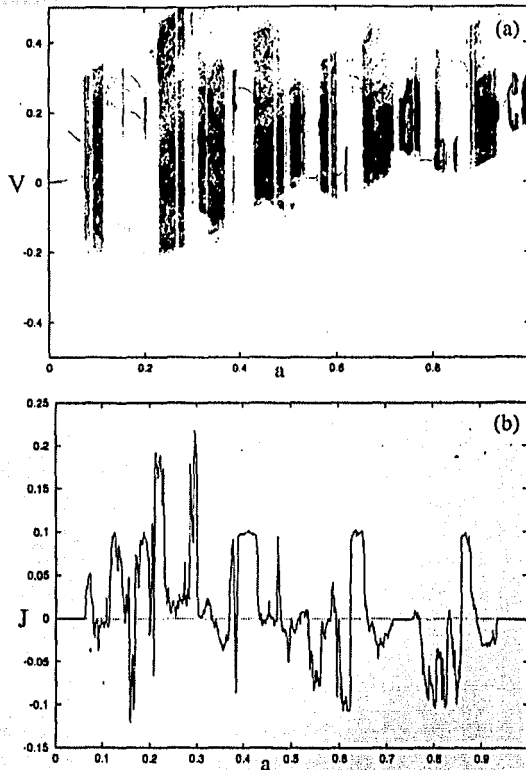


Figura 4-12 (a) Diagrama de Bifurcación como función de a , (b) la corriente J como función también de a .

Este punto es una bifurcación tipo nodo-silla, y la ventana de régimen periódico tiene un periodo igual a cuatro. En las figuras 4-13 (a), 4-13(b) analizamos sólo una pequeña región de valores de a , donde la primera inversión de corriente aparece. Si variásemos a más, obtendríamos múltiples inversiones de corriente, como se muestra en 4-12. Para valores de a mayores de a_c , como en la figura 4-13(a), el atractor es una órbita periódica. Para a 's ligeramente menores de a_c hay tiempos largos durante los cuales las órbitas aparentan ser periódicas y se parecen a las que son mayores de a_c , pero este comportamiento casi regular es interrumpido intermitentemente por

“disparos” de duración finita en los cuales las órbitas se comportan de manera caótica. A este fenómeno se le conoce como intermitencia, y puede ser otra ruta al caos. Así, cuando a se aproxima a a_c por valores menores, la duración de estos modos regulares en la dirección negativa se incrementan, hasta que la duración diverge en $a = a_c$, donde la trayectoria se vuelve completamente periódica.

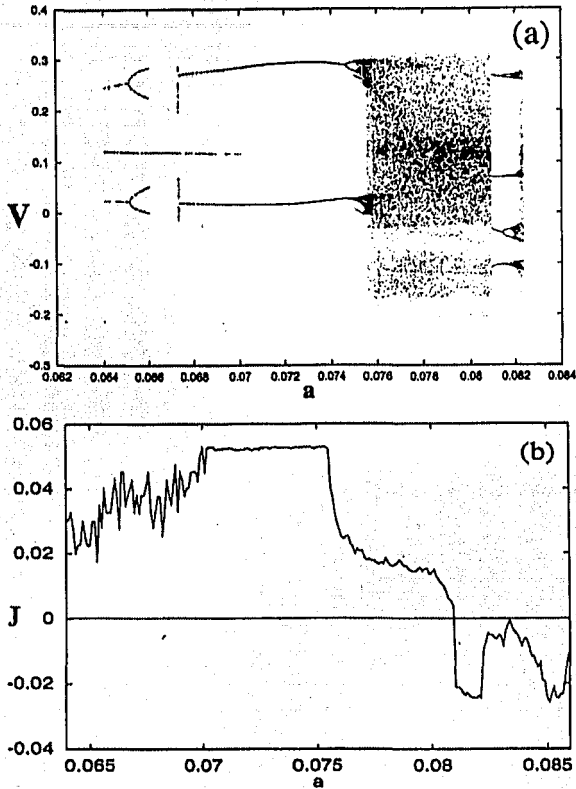


Figura 4-13 (a) Diagrama de bifurcación y (b) corriente como funciones de a . El rango de valores de a corresponden a la primera inversión de corriente.

En la figura 4-14 se muestran ambos atractores en la zona, que está ligeramente por debajo de a_c ; uno caótico y uno de periodo cuatro.

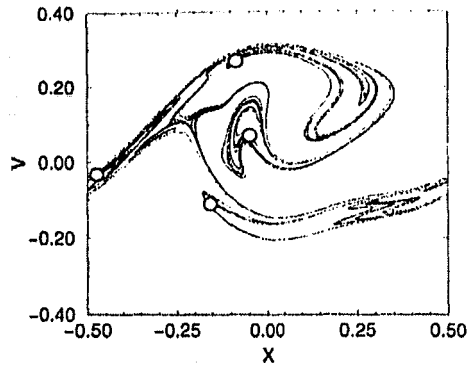


Figura 4-14 Dos atractores, uno caótico y uno periódico de periodo cuatro localizado en el centro de los círculos abiertos.

Cada uno de los atractores que hemos encontrado en la zona de estudio del parámetro a , tienen su propia cuenca de atracción en el espacio fase y, en general un atractor puede transportar partículas en una dirección, mientras que el otro lo puede hacer en la dirección contraria; o puede haber atractores que no tengan propiedades de transporte para nada. De hecho podemos invertir la dirección de la corriente escogiendo un atractor apropiado, dado que el atractor caótico genera una corriente positiva y el periódico una negativa (fig. 4-15). Entonces, es posible obtener inversiones de corriente sin cambiar ningún parámetro; lo único que necesitamos hacer es cambiar ligeramente las condiciones iniciales. Esto implicaría que estamos cambiando de una cuenca de atracción a otra.

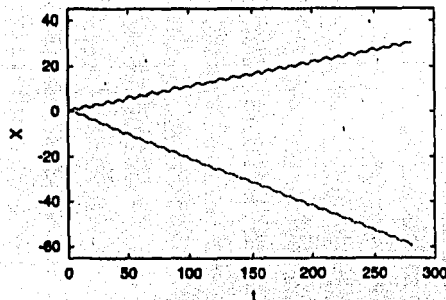


Figura 4-15 Corriente positiva (línea de arriba) generada por el atractor caótico; y corriente negativa (línea inferior) generada por el atractor periódico.

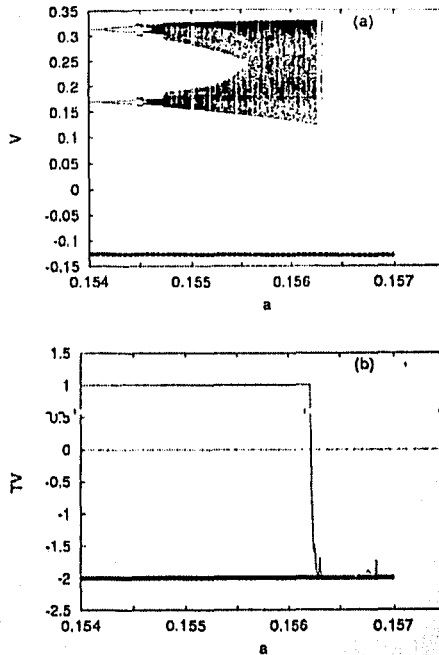


Figura 4-16 (a) Diagrama de bifurcación, y (b) La corriente rescalada, ambas como función de α .

En la figura 4-16(a) se muestra la coexistencia de dos atractores, uno caótico y uno periódico, en un rango dado del parámetro α . Notamos que hay una bifurcación de crisis cerca de $\alpha = 0.1563$ la cual destruye el atractor caótico, mientras que preserva el otro atractor.

En la figura 4-16(b) aparece la corriente normalizada $T\langle v \rangle$ (donde T es el periodo del forzamiento externo y $\langle v \rangle$ es la corriente). Se puede observar que existe una resonancia 1:1 para el atractor caótico y una resonancia 2:1 para el periódico.

La siguiente figura (4-17), simplemente muestra el espacio fase donde co-existen ambos atractores. En general, uno espera que estas cuencas estén mezcladas de una forma compleja, y que la cuenca frontera sea un conjunto fractal (fig. 4-18). Las regiones negras corresponden al atractor periódico y las regiones blancas al caótico. Como se puede apreciar por la figura, existe una extrema sensibilidad a las condiciones iniciales. Aunque nosotros tratemos de elegir un atractor en específico, el menor error puede guiarnos al otro.

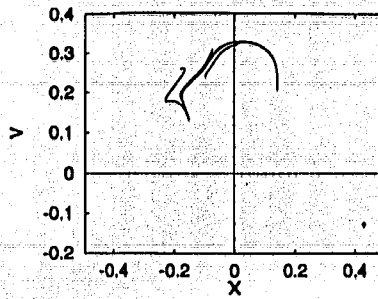


Figura 4-17 Dos atractores co-existiendo (uno caótico y uno periódico)

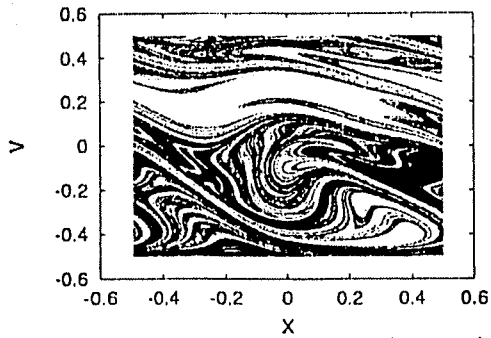


Figura 4-18 Las cuencas de atracción de los dos atractores que coexisten. La región en negro corresponde al periódico, y las blancas al caótico.

5.1 El Modelo.

El modelo de caminata de la cinesina que propongo es el siguiente:

$$\begin{aligned} \gamma \frac{dx}{dt} &= -f(t)U'(x) + \partial_x V(x-y) + F_{ext}(t) - F^{laser} \\ \gamma \frac{dy}{dt} &= -g(t)U'(y) - \partial_y V(x-y) + F_{ext}(t) - F^{laser} \end{aligned} \quad (5.1)$$

En el lado izquierdo de la ecuación 5.1 tenemos primeramente a γ el cual es el coeficiente de fricción que afecta la velocidad ya sea de la cabeza x o y (fig. 5-1). Así mismo tenemos a la velocidad de la cabeza x o y , que es la derivada de la posición de cada cabeza con respecto al tiempo t . En las subsecciones siguientes describiré detalladamente que es cada término en el lado derecho de la ecuación 5.1.

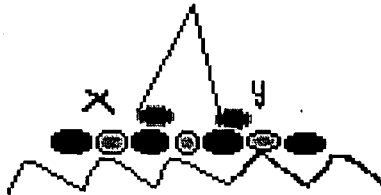


Fig. 5-1 Caricatura de la cinesina en interacción con el microtúbulo.

5.1.1 La Función Acople-Desacople de la Cinesina y el Microtúbulo.

Las primeras funciones que aparecen en el lado derecho de la ecuación 5.1 son $f(t)$ y $g(t)$, las cuales están multiplicando a la derivada de la función $U(x)$ y a $U(y)$. Las cabezas de la cinesina al caminar, hay momentos en que tocan al microtúbulo y hay otro en que no tienen

contacto. Dadas las limitaciones matemáticas del modelo, es decir, que para mantener el número de dimensiones no mayor a 3, las cabezas son partículas extendidas unidimensionales. Las cabezas, entonces x y y no pueden estar en la misma posición *espacialmente*, i.e. son iguales en magnitud (tamaño) pero están desfasadas en el ciclo mecanoquímico que vimos en el capítulo 2. Esta función lo que hace, según vamos a ver más abajo, es prender y apagar la interacción cinesina-microtúbulo, en diferentes momentos para cada una de las cabezas. Así, si una cabeza está en contacto con el microtúbulo, la otra va a estar despegada.

Por estas razones propongo la siguiente función que al estar multiplicando el potencial de acoplamiento entre el microtúbulo y la cabeza, lo prende y lo apaga, periódicamente, para una y para otra cabeza de la cinesina. Por lo que en realidad necesito dos funciones, una para cada cabeza, pero es la misma sólo que desfasada en el periodo;

Defino ahora $f(t)$

$$f(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } nT \leq t \leq T_d + nT \\ 1 & \text{si } T_d + nT \leq t \leq T_d + T_p + nT \end{cases} \quad (5.2)$$

Pero como, $T = T_p + T_d$, entonces se convierte en,

$$f(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } nT \leq t \leq T_d + nT \\ 1 & \text{si } T_d + nT \leq t \leq T + nT \end{cases} \quad (5.3)$$

Y entonces,

$$f(t+T) = f(t); \quad T = T_d + T_p \quad (5.4)$$

y esto es válido para cualquier T ,

$$f(t+nT) = f(t) \quad (5.5)$$

Como se puede ver por el tipo de función, es una función cuadrada, que sólo toma dos valores, 0 o 1, dependiendo de dónde se encuentre. Lo que quiero hacer con esta función, es que al estar multiplicando al potencial asimétrico periódico, que modela el potencial de interacción

cinesina-microtúbulo, lo prenda y apague periódicamente. Lo que simularía cuando una cabeza "siente" el microtúbulo, y cuando al estar desplazándose no lo percibe.

Digamos que la cabeza x empieza en cero, la cual es su posición al tiempo cero t_0 . Al tiempo siguiente t_1 se va a encontrar en algún lugar del periodo, entre 0 y 1. ¿Cómo puedo saber al tiempo t en qué parte de la onda cuadrada estoy situado? El tiempo t_1 es equivalente a una fracción más el número de periodos completos que se hayan recorrido en el tiempo t . Esto es,

$$t_0 - t_1 \quad -- \quad t_0 + T \quad \dots \quad -- \quad t_0 + nT \quad --- \quad t_1 + kT \quad ---- \quad t_0 + (n+1)T$$

Por lo que podemos reescribir a t_1 como

$$t_1 = nT + \varepsilon \quad (5.6)$$

donde T es el periodo completo, y $n \in \mathbb{N}$. Podemos observar entonces que ε es una fracción, entre 0 y 1. Si ahora defino la ecuación anterior, no para el tiempo siguiente sino para cualquier tiempo futuro de t_0 , obtengo,

$$\varepsilon = t - nT \quad (5.7)$$

y $f(t)$ se convierte

$$f(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } 0 \leq t - nT \leq T_d \\ 1 & \text{si } T_d \leq t - nT \leq T \end{cases} \quad (5.8)$$

Ahora si divido a la ecuación 5.7 entre T ,

$$\frac{t_0}{T} = \frac{nT + \varepsilon}{T} = n + \left(\frac{\varepsilon}{T} \right) \quad (5.9)$$

por lo que podemos ver que ε/T se va a encontrar entre 0 y 1. Siendo así nuestra función se convierte en

$$f(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } 0 \leq \frac{\varepsilon}{T} \leq \frac{T_d}{T} \\ 1 & \text{si } \frac{T_d}{T} \leq \frac{\varepsilon}{T} \leq 1 \end{cases} \quad (5.10)$$

Y para ponerlo en términos aún más sencillos,

$$\frac{t}{T} - \text{Int}\left(\frac{t}{T}\right) = \text{Fracc}\left(\frac{t}{T}\right) \quad (5.11)$$

que como es obvio de cualquier fracción, se encuentra entre 0 y 1.

Por lo tanto

$$f(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } 0 \leq \frac{t}{T} - \text{Int}\left(\frac{t}{T}\right) \leq \frac{T_d}{T} \\ 1 & \text{si } \frac{T_d}{T} \leq \frac{t}{T} - \text{Int}\left(\frac{t}{T}\right) \leq 1 \end{cases} \quad (5.12)$$

y equivalentemente el desarrollo sirve para $g(t)$, que está retrasada temporalmente con respecto a $f(t)$, y su expresión es:

$$g\left(\frac{t}{T}\right) = f\left(\frac{t}{T} - \frac{t_{ret}}{T}\right) \quad (5.13)$$

que como podemos observar es idéntica a $f(t)$ sólo que está desplazada por una fracción de tiempo, que es el tiempo de retraso. Veamos ahora que nos dice la biología sobre estos tiempos, el tiempo de despegado, el tiempo total, y el tiempo de retraso.

El tiempo total como definimos anteriormente, es la suma del tiempo que pasa la cinesina despegada del microtúbulo más el tiempo que permanece unida, $T = T_d + T_p$. Por comodidad hago el tiempo total igual a 1, que sería el tiempo normalizado que tarda la cinesina para un ciclo completo. Del libro de Jonathon Howard (174) sabemos que:

$$r = \frac{\tau_{on}}{\tau_{on} + \tau_{off}} = \frac{\tau_{on}}{\tau_{total}} = 0.5 \quad (5.14)$$

donde r es la proporción de tiempo que pasa pegado con respecto al tiempo total del ciclo. Por esta razón, podemos decir que la cinesina pasa una mitad del tiempo despegada y la otra pegada. Esto también es un indicador de cuál es el número mínimo de cabezas que se requieren para que nuestro motor sea procesivo, como en el caso de la cinesina.

El número mínimo de cabezas que se requieren para el movimiento continuo, N_{\min} , está relacionado al cociente anterior por

$$r \cong \frac{1}{N_{\min}} \quad (5.15)$$

y así se garantiza que al menos haya una cabeza unida al filamento. Como para la cinesina la r es igual a 0.5, el número mínimo de cabezas para su procesividad que requiere es de 2.

Para obtener el tiempo de retraso, el análisis conduce a otro camino. Veamos cual es. Sabemos ya que las cabezas están desfasadas una de la otra, es decir, se encuentran en diferentes puntos del ciclo mecanoquímico (discutido en el capítulo 2), pero ¿cuánto? Eso depende del modelo que escojamos. Si por ejemplo tomamos un modelo de seis estados mecanoquímicos (174), entonces un ciclo completo será de 12 estados, que son los que se necesitan para que la cabeza uno regrese a su posición original. Los modelos se hacen de acuerdo al número mínimo de estados, y dado que, por ejemplo el estado 1 es simétrico al estado 7, sólo contemplan la mitad de un ciclo. Esto considerando un ciclo cuando se han dado dos pasos. Véase el siguiente cuadro.

Número de estados	Posición de x	Posición de y
12	0	7./12
10	0	6./10
8	0	5./8
6	0	4./6
4	0	3./4
2	0	2./2

Cuadro 5.1

Como se puede observar del cuadro, cuando una cabeza (x) se encuentra en la coordenada de reacción original ($x = 0$), la otra cabeza (y) se va a encontrar en una coordenada determinada por el número de estados del modelo. Aquí me refiero a la coordenada de reacción como la posición dentro del ciclo mecanoquímico.

Es fácil ver, asimismo, que si el número de pasos tiende a infinito la coordenada de reacción de y tiende a $1/2$. Como el tiempo total es uno, el tiempo de retraso coincide con la coordenada de reacción. Esto no es coincidencia, ya que la coordenada de reacción tiene unidades de tiempo en este caso. Por lo que el tiempo de retraso estará entre $1/2$ y 1.

Hay que entender bien que el tiempo de retraso, es el desfazamiento mecánico, entre la interacción de una cabeza con el microtúbulo, y la siguiente interacción debida a la otra cabeza. Como se puede apreciar de la figura 2-15, las cabezas se alternan en su interacción con el microtúbulo. Este tiempo de retraso refleja únicamente la alternancia en su interacción con el microtúbulo. Más adelante hablaremos de otro tiempo, que tiene que ver con la unión del ATP, y que nos permitirá relacionar el modelo mecánico con su contraparte bioquímica.

5.1.2 El Potencial de interacción Cinesina-Microtúbulo.

Para modelar al microtúbulo usé un potencial asimétrico y periódico. Como vimos del capítulo 1, el microtúbulo es una estructura periódica y polar, por lo cual un potencial de esta forma asemeja, al menos en forma general, a la estructura real.

El potencial con el cual vamos a trabajar es (153-155), figura 5-1,

$$U(x) = U_1 - U_0 \left[\sin \frac{2\pi(x-x_0)}{L} + \frac{1}{4} \sin \frac{4\pi(x-x_0)}{L} \right] \quad (5.16)$$

donde L es la periodicidad del potencial, V_0 es la amplitud, C es una constante arbitraria, así como x_0 para tener un mínimo del potencial en $x = 0$ con $U(0) = 0$, y $\delta = \sin(2\pi|x_0|) + \sin(4\pi|x_0|)$. Que en su forma adimensional se toma la forma de

$$U(x) = C - \frac{1}{4\pi^2\delta} \left[\sin 2\pi(x-x_0) + \frac{1}{4} \sin 4\pi(x-x_0) \right] \quad (5.17)$$

donde la constante C es tal que $U(0) = 0$, y es dado por $C = -(\sin 2\pi x_0 + 0.25 \sin 4\pi x_0) / 4\pi^2 \delta$. En este caso, $x_0 \cong -0.19$, $\delta \cong 1.6$ y $C \cong 0.0173$.

De manera similar a 5.16 defino para y ,

$$U(y) = U_1 - U_0 \left[\sin \frac{2\pi(y-y_0)}{L} + \frac{1}{4} \sin \frac{4\pi(y-y_0)}{L} \right] \quad (5.18)$$

donde se aprecia que tiene la misma forma, sólo que está definido para la otra cabeza.

Ahora en vez de manejar una partícula puntual, como la manejan la mayoría de la literatura en motores moleculares (i.e., 139, 140, 162, 169), uso una partícula de tamaño l considerable, y no despreciable con respecto al tamaño del potencial (no despreciable en comparación con la longitud del microtúbulo) como hace Mateos (180). Defino a l como

$$l = \frac{l_{\text{cabeza}}}{l_0} = 0,9 \quad (5.19)$$

donde l_{cabeza} es la longitud de la cabeza que es de 4.5 nm, y l_0 es la distancia característica, que en este caso es la distancia entre los centros de masa de las dos cabezas, siendo igual a 5 nm. De este modo vamos introduciendo la biología en los parámetros del modelo. El dominio motor de la cinesina mide aprox. 4.5 nm, y la longitud del periodo del microtúbulo (dímero $\alpha\beta$) mide 8 nm. Por lo que $l = 0.5625$.

$$f_m(x) = \frac{1}{2} [U(x) + U(x+l)] \quad (5.20)$$

El potencial debe tener la misma periodicidad del microtúbulo. Entonces,

$$U(x+L) = U(x) \quad (5.21)$$

Si $l = L$, entonces

$$U_L(x) = \frac{1}{2} [U(x) + U(x+L)] = U(x) \quad (5.22)$$

Y si $l = 0$,

$$U_0(x) = \frac{1}{2} [V(x) + V(x+0)] = V(x) \quad (5.23)$$

El caso de que l sea igual a cero es el caso que se ha tratado ampliamente en la literatura (139, 140, 162, 169), donde consideran a una proteína como una partícula puntual. Se puede apreciar que el caso de la partícula puntual se obtiene como caso particular del potencial propuesto. Nuestro potencial se queda como está en la ecuación 5.19, ya que $0 < l/L < 1$.

El potencial tiene una altura, como se puede ver de la figura 5-1. Esta altura es la cantidad de energía que se tiene que proporcionar al sistema para pasar de un mínimo a otro. Si la

altura es muy pequeña, será muy sencillo, en el otro caso la cantidad de energía será elevada. Esto proviene del hecho que el potencial se puede escribir como,

$$U'(x) \equiv \tilde{U}'(x) \quad \text{y} \quad \tilde{U}'(x) = \tilde{U}_0 U(x), \quad (5.24)$$

donde queda simplemente la función $U(x)$, la cual es el potencial definido en 5.16, pero multiplicado por un escalar que le da cierta altura. Esta barrera es, en nuestro caso, la energía necesaria para que una cabeza esté interaccionando con un dímero del microtúbulo y pase al siguiente dímero disponible.

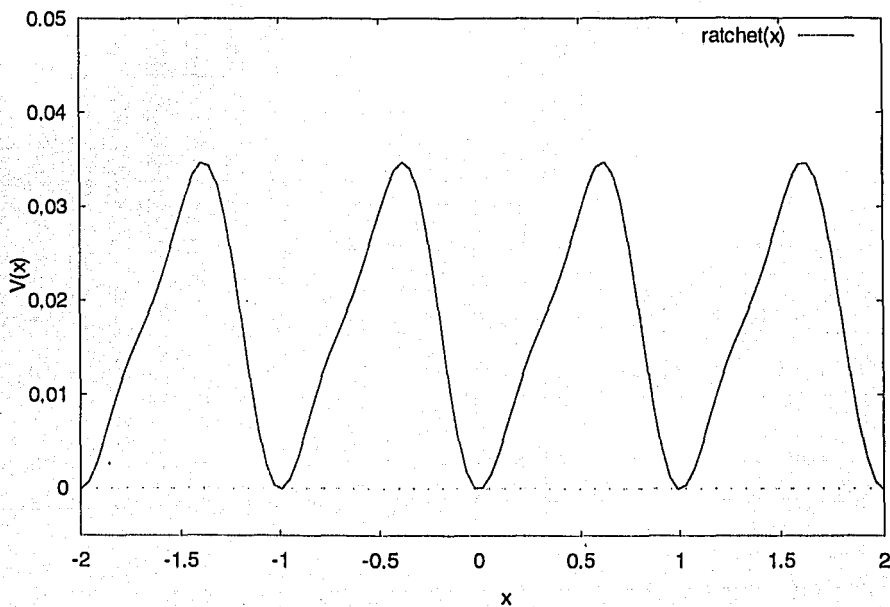


Figura 5-1 El potencial periódico asimétrico adimensional $V(x)$ (Véase sección para la adimensionalización).

5.1.3 El Potencial de interacción de las cabezas.

Este potencial trata de simular de cierta manera el acoplamiento que existe entre las cabezas de la cinesina. La literatura de motores moleculares usa como potencial de acople, una

parábola. Lo que significa que están suponiendo que es un resorte lineal. De antemano sabemos que eso no puede ser cierto (capítulo 2, Estructura de la Cinesina), así que vayamos un poco más lejos y usemos en vez de un resorte lineal, una función como la siguiente,

$$V(x-y) = -\frac{\alpha}{2}(x-y)^2 + \frac{\beta}{4}(x-y)^4 + C \quad (5.25)$$

Empecemos haciendo,

$$\eta = |x-y| \quad (5.26)$$

lo que toma la forma de (figura5-2),

$$V(\eta) = -\frac{\alpha}{2}\eta^2 + \frac{\beta}{4}\eta^4 + C \quad (5.27)$$

De la ecuación 5.25 obtenemos la fuerza que ejerce una cabeza sobre la otra,

$$\begin{aligned} f_x = -f_y & \Rightarrow f_x = -\partial_x V(x-y) \quad \text{y} \\ & f_y = -\partial_y V(x-y) \end{aligned} \quad (5.28)$$

$$\begin{aligned} \therefore -\partial_x V(\eta) &= \alpha\eta - \beta\eta^3 \quad \text{y} \\ -\partial_y V(\eta) &= -\alpha\eta + \beta\eta^3, \end{aligned}$$

y como la derivada del potencial es fuerza, ambos términos del lado derecho de la ecuación 5.26 deben tener unidades de fuerza (i.e., N). En términos de la fuerza hay un cambio de signo, porque por un lado derivamos con respecto a x y por otro con respecto a y .

Entonces corroborando unidades tenemos,

$$\begin{aligned} [F] &= \alpha m \\ [F] &= \beta m^3 \end{aligned} \quad (5.29)$$

porque η tiene unidades de metros m . Y por lo tanto (si usamos N como unidades de fuerza),

$$\alpha = \text{kg/s}^2 \quad \text{y} \quad \beta = \text{kg/s}^2 \text{m}^2, \quad (5.30)$$

lo que en efecto concuerda, al ser multiplicados por m y m^3 , las unidades de fuerza que supusimos.

Con la ecuación 5.26 podemos buscar los mínimos de la función definida por la ecuación

5.25:

$$V'(\eta) = 0 \Rightarrow (i) \eta = 0 \text{ (solución trivial)} \quad (5.31)$$
$$\therefore -\alpha + \beta \eta^3 = 0$$

$$(ii) \text{ y } (iii) -\alpha \eta + \beta \eta^3 = 0$$
$$-\alpha + \beta \eta^2 = 0$$

$$\eta^2 = \frac{\alpha}{\beta} \quad (5.32)$$

$$\eta = \pm \sqrt{\frac{\alpha}{\beta}}$$

Vemos entonces que los mínimos están situados en las soluciones no triviales de 5.29, y habrá un máximo cuando η sea igual a cero.

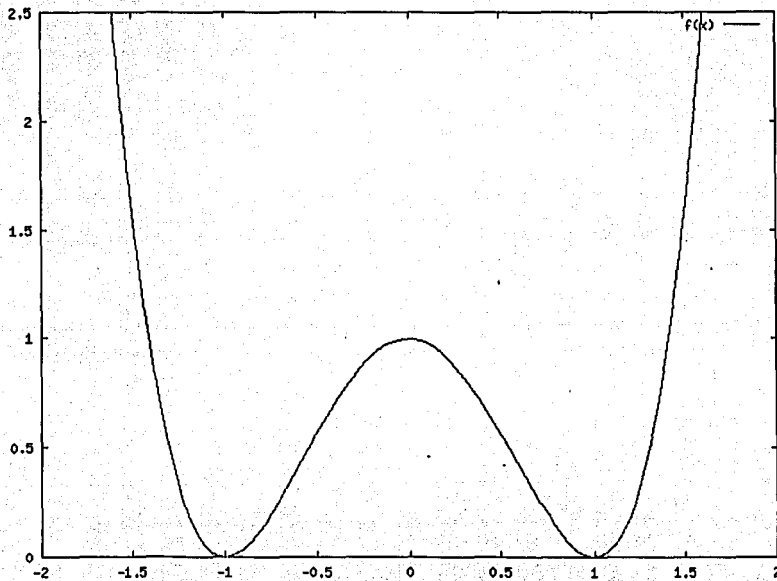


Figura 5-2 Potencial propuesto para el acoplamiento entre las cabezas. Como caso especial tiene los dos mínimos en 1 y -1. Con $\alpha = \beta = 4$ y por tanto $C = 1$.

La demostración de que son mínimos y máximo, es sencilla por criterio de la segunda derivada, esto es,

$$V''(\eta) = -\alpha + 3\beta\eta^2 \Rightarrow (i) \eta = 0 \Rightarrow V''(\eta) = -\alpha < 0$$

$$(ii) -\alpha + 3\beta \left(\sqrt{\frac{\alpha}{\beta}} \right)^2 = -\alpha + 3\alpha = 2\alpha > 0 \quad (5.33)$$

Para (i) la curvatura es negativa (la curva se abre hacia abajo), lo que indica un máximo, y para (ii) la curvatura es positiva (se abre hacia arriba) indicativo de un mínimo, que en este caso son dos. Todo esto es claramente visualizado en la figura 5-2.

Este potencial cuártico entonces tiene dos mínimos, los cuales hago coincidir con los dos estados que se observan, 1-2, luego 2-1, según la posición de las cabezas (x y). La distancia del origen a uno de los mínimo es la distancia que existe entre el centro de masa de cada dominio motor de la cinesina. Como se puede observar de la estructura obtenida por cristalografía (53, 56, 61, 62, 83), la cinesina en solución mantiene a sus cabezas más cerca una de otra, en comparación a como se observan, por reconstrucción de imágenes o por cristalografía, cuando interaccionan la cinesina y el microtúbulo (53, 56, 61, 62, 83). Con esto se modela en parte la procesividad de la molécula de cinesina (i.e., da muchos pasos antes de separarse del microtúbulo), así como el modelo de mano-sobre-mano, esto es, una cabeza delante de la otra, y luego al revés durante un largo tiempo. Es decir, este potencial de acoplamiento tiene dos estados estables, uno donde está la cabeza uno delante de la dos, y otro donde la dos está delante de la uno. Desde luego que estos estados son cuando ambas cabezas están unidas al microtúbulo. Y se requiere de una cantidad de energía, ya sea que provenga de un origen mecánico (desenrollamiento de la espiral enrollada) o químico (hidrólisis de ATP), para dar el paso necesario. La cantidad de energía necesaria es V_0 , que es en nuestro potencial idéntico a C.

La ecuación (5.25) modela efectivamente dos mínimos, un máximo entre ellos, y luego como podemos ver de la figura 5.2, cuando η tiende a $\pm \infty$, $V(\eta)$ se va a infinito, lo cual está modelando el hecho de que la cinesina no puede (i) mantener las dos cabezas en el mismo punto (caso i ecuación 5.29) y (ii) separar más allá de cierta distancia una cabeza una de la otra. Sino la

cinesina no estaría funcionando correctamente, al menos no como dímero. Es bueno hacer notar que modelar una cinesina monomérica como ncd, no tendría sentido, ya que desde el principio se ha hablado de que ncd no es procesiva (capítulo 2), i.e. no permanece unida al microtúbulo durante una secuencia de pasos en un tiempo dado.

Pero, ¿cuánto vale C y a qué es equivalente? Aunque ya lo mencionamos arriba, es necesario tenerlo claro, C es la altura del potencial, esto es, es la cantidad de energía que se requiere vencer para dar el paso. De la ecuación 5.25, y utilizando el valor de η obtenido en 5.29, puedo entonces calcular el valor de V_0 :

$$V\left(\sqrt{\frac{\alpha}{\beta}}\right) = -\frac{\alpha}{2} \frac{\alpha}{\beta} + \frac{\beta}{4} \frac{\alpha^2}{\beta^2} + V_0 = 0$$

$$\Rightarrow -\frac{\alpha^2}{2\beta} + \frac{\alpha^2}{4\beta} + V_0 = -\frac{\alpha^2}{4\beta} + V_0 \quad (5.34)$$

$$\therefore V_0 = \frac{\alpha^2}{4\beta}$$

Lo que resulta en,

$$V(\eta) = -\frac{\alpha}{2} \eta^2 + \frac{\beta}{4} \eta^4 + \frac{\alpha^2}{4\beta} \quad (5.35)$$

que es la forma general del potencial de acoplamiento. Y todo lo tenemos solamente en términos de alpha y beta. Incluso la altura del potencial que el una barrera energética queda en términos de estos dos parámetros.

Dado que la altura máxima entre los mínimos es V_0 , es ésta entonces la barrera a vencer para dar un paso; para pasar de la situación 1-2, a la 2-1. Que es lo que precisamente queremos modelar.

Este potencial puede ser imaginado como un resorte no-lineal, por lo que existe entonces una distancia de reposo. Esta distancia de reposo es precisamente la distancia entre los centros de masa de las cabezas de la cinesina en solución. Que al estar en contacto con el microtúbulo, se deforma o estira este resorte, lo cual generará una parte de la energía para poder dar el paso y pasar de la situación 1-2 a la 2-1. Podemos igualar, entonces a los valores de η en los mínimos con esa distancia de reposo (en solución), y es aproximadamente igual a 5 nm.

Potenciales del tipo 5.33 se usan, por ejemplo, en la teoría de Kramers para reacciones químicas. En las cuales se tienen dos estados estables, y existe una barrera entre ellos (174).

5.1.4 La Fuerza Externa.

El término $F_{ext}(t)$ en el sistema 5.1 es una fuerza externa. Y toma la siguiente forma general:

$$F_e \cos(\omega_e t) \quad (5.36)$$

donde F_e es la amplitud del forzamiento, y ω_e es la frecuencia. Para t_1 es la forma general, mientras que para t_2 se hace la sustitución

$$t_2 = t_1 + \varphi, \quad \text{donde} \quad \varphi = 2\pi\phi, \quad (5.37)$$

Donde logramos que el forzamiento esté en una fase para la cabeza x o l y en otra fase para la otra cabeza. Este forzamiento es periódico (dado que es un coseno) y simétrico. Aunque está desfasado para cada una de las cabezas. Lo que hace es inclinar o balancear el potencial cuártico hacia uno u otro lado. Esto genera que en un momento dado, sea más probable pasar del estado 1-2 al 2-1, que al revés. Es como si de pronto necesitara menos energía, ya que la barrera es menos alta.

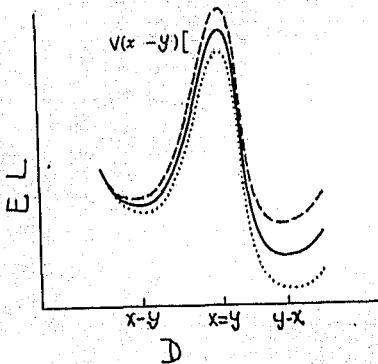


Figura 5-3 Energía libre (EL) vs distancia entre las cabezas, con diferentes forzamientos. Cuando el forzamiento es negativo los dos mínimos están situados casi al mismo nivel (línea entre cortada), mientras que si es positivo hay una diferencia apreciable en los niveles de energía libre de ambos mínimos.

Las oscilaciones periódicas serían cada vez que una molécula de ATP es unida y genera un cambio conformacional en el cuello, lo que facilita que la cabeza trasera rebasa a la que está

adelante. Por esto, el forzamiento externo simula el facilitamiento que proporciona la unión del ATP y el cambio conformacional para dar el paso. Esto se puede ilustrar en la figura 5-3.

Es importante hacer notar que el tiempo de desfazamiento aquí, estaría reflejando el desfazamiento químico, en contraste con el tiempo de retraso que simula el desfazamiento mecánico. Ambos están ligados en la molécula real, pero por simplicidad aquí los he separado. Es por esto que el tiempo de retraso y el desfazamiento en la fuerza externa deben de ser iguales, es decir, tener el mismo valor entre 0 y 1.

5.1.5 La Fuerza debida al Laser.

En estudios como el de Visscher, et al. (69) con trampas ópticas se puede medir la fuerza que se necesita aplicar para detener la caminata de una molécula de cinesina.

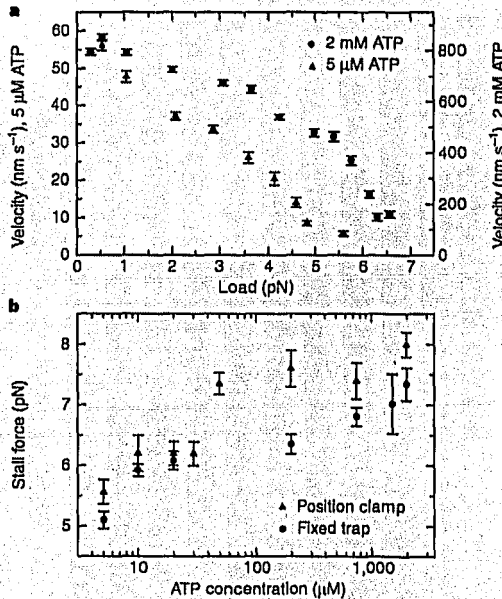


Figura 5-4 (a) Relación de la velocidad vs el peso de la carga, y (b) relación fuerza ejercida por el láser vs la concentración de ATP.

Esta fuerza es aplicada con un laser a una pequeña esfera de latex que se encuentra unida a la cinesina. Lo que se logra es mantener (con cierta fuerza) a la cinesina en su lugar. Y esta es llamada la fuerza para pararla (o stall force, por su nombre en inglés). La cantidad de fuerza necesaria para detenerla, es así, medida y registrada.

La máxima cantidad de fuerza que soporta una molécula de cinesina antes de detenerse por completo es de 5-6 pN, a concentraciones bajas de ATP. Y a mayor concentración mayor fuerza tiene que ser ejercida.

5.2 Adimensionalización de las ecuaciones.

La solución del sistema 5.1 no puede ser obtenida analíticamente, por lo que recorro a un método de integración numérica muy usado, el método Runge-Kutta (véase el Apéndice). Pero para introducir las ecuaciones a un programa computacional para su resolución es necesario adimensionalizarlas, ya que las máquinas sólo trabajan con números y no trabajan con unidades, como N, m, o cualquier otra.

Antes de empezar con la adimensionalización, recordemos nuestro sistema, ya con las funciones definidas,

$$\begin{aligned} \gamma \frac{dx}{dt} &= -f(t)U'(x) + (-\alpha\eta + \beta\eta^3) + F_e \cos(\omega t_1) - F^{laser} \\ \gamma \frac{dy}{dt} &= -g(t)U'(y) - (-\alpha\eta + \beta\eta^3) + F_e \cos(\omega t_1 + \varphi) - F^{laser} \end{aligned} \quad (5.38)$$

Notemos ahora las unidades,

$$[x] = d \quad [\gamma] = F/v \quad [\alpha] = F/d \quad [\beta] = F/d^3.$$

Primero adimensionalizo la distancia,

$$\bar{x} = \sqrt{\frac{\beta}{\alpha}} x; \quad \text{donde} \quad \left[\sqrt{\frac{\beta}{\alpha}} \right] = \frac{1}{d} \Rightarrow x = \sqrt{\frac{\alpha}{\beta}} \bar{x}. \quad (5.39)$$

Ahora el tiempo,

$$\bar{t} = \frac{\alpha}{\gamma} t; \quad \left[\frac{\alpha}{\gamma} \right] = \frac{1}{\text{tiempo}} \Rightarrow t = \frac{\gamma}{\alpha} \bar{t}, \quad (5.40)$$

y llamo t_0 a γ/α , y x_0 a $\sqrt{\frac{\alpha}{\beta}}$. Con esto obtengo la velocidad

$$\dot{x} = \frac{dx}{dt} = \frac{x_0}{t_0} \frac{d\bar{x}}{d\bar{t}}; \quad \frac{x_0}{t_0} = v_0 = \sqrt{\frac{\alpha}{\beta}} \frac{\alpha}{\gamma} = \frac{1}{\gamma} \sqrt{\frac{\alpha^3}{\beta}} \quad (5.41)$$

$$\left[\frac{1}{\gamma} \sqrt{\frac{\alpha^3}{\beta}} \right] = \frac{v}{F} \left(\frac{F^3}{d^3} \frac{d^3}{F} \right)^{1/2} = v$$

donde así mismo están correctas sus unidades. Falta entonces la frecuencia del forzamiento w_e ,

$$w_e t = w_e t_0 \frac{t}{t_0} = w_e t_0 \frac{t}{\gamma/\alpha} = w_e \frac{\gamma}{\alpha} \bar{t} = w_e t_0 \bar{t} = \bar{w} \bar{t} \quad (5.42)$$

$$\therefore \bar{w} = \frac{\gamma}{\alpha} w_e = t_0 w_e.$$

Ya estamos en posición de re-escribir nuestro sistema de ecuaciones, como

$$\frac{1}{\gamma} \sqrt{\frac{\alpha^3}{\beta}} \frac{d\bar{x}}{d\bar{t}} = -\frac{1}{\gamma} \sqrt{\frac{\alpha^3}{\beta}} \bar{\eta} + \frac{\beta}{\gamma} \left(\sqrt{\frac{\alpha}{\beta}} \right)^{3/2} \bar{\eta}^3 - f(t) \frac{U'(x)}{\gamma} + \frac{F_e}{\gamma} \cos(\bar{w} \bar{t}) - \frac{F^{laser}}{\gamma} \quad (5.43)$$

$$\frac{1}{\gamma} \sqrt{\frac{\alpha^3}{\beta}} \frac{d\bar{y}}{d\bar{t}} = \frac{1}{\gamma} \sqrt{\frac{\alpha^3}{\beta}} \bar{\eta} - \frac{\beta}{\gamma} \left(\sqrt{\frac{\alpha}{\beta}} \right)^{3/2} \bar{\eta}^3 - f(t) \frac{U'(y)}{\gamma} + \frac{F_e}{\gamma} \cos(\bar{w} \bar{t} + \varphi) - \frac{F^{laser}}{\gamma}$$

pasé dividiendo el coeficiente de fricción a todos los términos del lado derecho, y sustituí los valores de x , y , t , y w_e .

Reduciendo términos del sistema 5.41 y eliminando a lo que multiplica a la velocidad adimensional, se obtiene

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = -\bar{\eta} + \beta\bar{\eta}^3 - f(t) \left(\frac{\beta}{\alpha^3}\right)^{1/2} U'(x) + \left(\frac{\beta}{\alpha^3}\right)^{1/2} F_e \cos(\bar{\omega}t) - \left(\frac{\beta}{\alpha^3}\right)^{1/2} F^{laser} \quad (5.44)$$

$$\frac{d\bar{y}}{dt} = \bar{\eta} - \beta\bar{\eta}^3 - f(t) \left(\frac{\beta}{\alpha^3}\right)^{1/2} U'(\bar{y}) + \left(\frac{\beta}{\alpha^3}\right)^{1/2} F_e \cos(\bar{\omega}t + \varphi) - \left(\frac{\beta}{\alpha^3}\right)^{1/2} F^{laser}$$

Y puedo reducir aún más, si defino

$$F_0 = \sqrt{\frac{\alpha^3}{\beta}} \Rightarrow \frac{F^{peso}}{F_0} = F_{peso}, \quad \frac{F_e}{F_0} = a \quad \text{y} \quad \frac{\tilde{U}_0}{F_0} = U_0, \quad (5.45)$$

Donde la igualdad de U proviene del hecho,

$$\frac{U'(x)}{F_0} = \frac{\tilde{U}_0}{F_0} \frac{dU(\bar{x})}{d\bar{x}} = U_0 U'(\bar{x}). \quad (5.46)$$

Finalmente obtengo quitando las barras,

$$\frac{dx}{dt} = -\eta + \beta\eta^3 - f(t) U_0 U'(x) + a \cos(\omega t) - F_{laser} \quad (5.47)$$

$$\frac{dy}{dt} = \eta - \beta\eta^3 - f(t) U_0 U'(y) + a \cos(\omega t + \varphi) - F_{laser}.$$

El sistema 5.47 es el que se va a introducir a la computadora para su resolución de acuerdo a los siguientes parámetros.

5.3 Parámetros del Modelo.

Los parámetros del modelo son 8 en total. Pero antes mencioné que sólo se introducen números, así que empecemos a calcularlos. Primero que nada tengo

$$\sqrt{\frac{\alpha}{\beta}} = 5 \text{ nm.}$$

Tenemos dos parámetros energéticos, U_0 y V_0 ; que son las alturas de los potenciales. U_0 del potencial que simula al microtúbulo, y V_0 del potencial de la caminata. Es de mencionarse que no se conocen experimentalmente estas alturas energéticas. Es decir, se sabe que la hidrólisis de una molécula de ATP que son aprox. 25 kT, es suficiente para que la molécula de la cinesina

camine. Pero no se han determinado cuales son las alturas de la barreras, para (1) despegar-pegar una molécula de cinesina, y (2) para pasar de la configuración 1-2 a la 2-1. Que al conocer la cantidad de energía liberada por una molécula de ATP, puedo tener un límite superior de la suma de ambas alturas en términos energéticos,

$$25 kT = (25) * (1.38066 \times 10^{-23} \text{ J/K}) * (37 \text{ }^\circ\text{C} + 273.15 \cong 310 \text{ K}) \cong 10.7 \times 10^{-20} \text{ J.}$$

Ya con esto podemos calcular el valor de α y β , de acuerdo al sistema de ecuaciones,

$$\sqrt{\frac{\alpha}{\beta}} = 5 * 10^{-9} \text{ m} \tag{5.48}$$

$$\frac{\alpha^2}{4\beta} = 10.7 * 10^{-20} \text{ J}$$

lo que resulta en

$$\beta = \frac{4(10.7 * 10^{-20})}{(5 * 10^{-9})^4} = 6.848 * 10^{14} \text{ N/m}^3 \tag{5.49}$$

$$\alpha = \frac{4(10.7 * 10^{-20})}{(5 * 10^{-9})^2} = 17.12 * 10^{-3} \text{ N/m}$$

Este es un valor superior, ya que suponemos que la energía obtenida por la hidrólisis del ATP es mayor que la requerida para dar un paso. De hecho las estimaciones van desde 20 kT hasta 13. Teniendo estos valores podemos adimensionalizar el resto de los parámetros. Como vimos en la sección pasada. Veamos por ejemplo los valores de alfa y beta, en función del valor de V_0 (cuadro 5-2).

Tengo 2 geométricos, L y l , que nos indican la periodicidad del potencial y la longitud de la cabeza, respectivamente. El parámetro que va a ser introducido es el que fue calculado en la sección 5.1.2, ecuación 5.19.

$$L = 8 \text{ nm.}$$

$$L_{\text{cabeza}} = 4.5 \text{ nm.}$$

Dos temporales, T_p , y T_d , indican el tiempo que permanece pegada (p) o despegada (d) una cabeza del microtúbulo. Que como vimos en la sección 5.1.1, ecuación 5.14 es igual a:

$$T_p = 0.5 \text{ y a}$$

$$T_d = 0.5.$$

kT	Vo T=310	Alfa [N/m]	Beta [N/m ²]	(beta**1/2)/alfa**3/2
25	1.07E-19	0.01712	6.8481E+14	11682117435
20	8.56E-20	0.013696	5.4785E+14	14602646794
15	6.42E-20	0.010272	4.1088E+14	19470195725
10	4.28E-20	0.006848	2.7392E+14	29205293588
9	3.85E-20	0.006163	2.4653E+14	32450326209
8	3.42E-20	0.005478	2.1914E+14	36506616985
7	3E-20	0.004794	1.9175E+14	41721847983
6	2.57E-20	0.004109	1.6435E+14	48675489313
5	2.14E-20	0.003424	1.3696E+14	58410587176
4	1.71E-20	0.002739	1.0957E+14	73013233970
3	1.28E-20	0.002054	8.2177E+13	97350978627
2	8.56E-21	0.00137	5.4785E+13	1.46026E+11
1	4.28E-21	0.068481	2.7392E+15	2.92053E+11

Cuadro 5-2 Muestra los valores para la adimensionalización, de acuerdo al valor original de V_0 .

Tengo además la fuerza debida a la carga, que simula el peso de una vesícula como vimos en el capítulo 2.

F^{peso} = puede variar entre 0 y 5 pN.

Que en términos adimensionales es,

Fext [N]	Fe ad
1E-11	1.94702
8E-12	1.557616
7E-12	1.362914
6E-12	1.168212
5E-12	0.97351
4E-12	0.778808
3E-12	0.584106
2E-12	0.389404
1E-12	0.194702
0	0

El coeficiente de fricción, que como vimos en el capítulo 3 está relacionado con el posible ruido térmico existente, dado que el sistema se encuentra sumergido en un baño térmico (el medio ambiente, ya sea micro-intracelular- o macroscópico).

$$\gamma = 6 \times 10^{-11} \text{ kg/s (139) } \acute{o}$$

$$\gamma = 5.54 \times 10^{-11} \text{ kg/s (140) } \acute{o}$$

$$\gamma = (1-10) 10^{-8} \text{ kg/s (162)}$$

Calculando γ / α , obtenemos 8.76×10^{-9} . Con lo que podemos regresar del tiempo adimensional de la máquina, al tiempo real.

5.4 Resultados Numéricos y Discusión.

Ya con nuestras ecuaciones adimensionales, vamos a explorar las diversas dinámicas que este modelo genera. Lo primero que vamos a explorar son los tiempos. El tiempo de retraso que vimos en la sección 5.1.1 desfasa la interacción de las cabezas con el microtúbulo. Mientras que el cambio de tiempo en el forzamiento (de la fuerza externa) desfasa a las cabezas en el ciclo químico. Y por lo explicado en el capítulo 2, estos tiempos están relacionados.

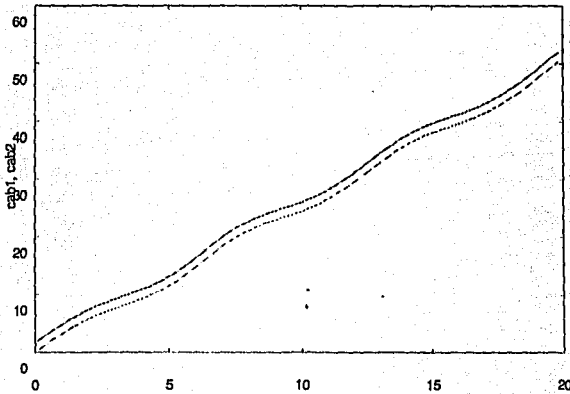


Figura 5-5 (a) Cabeza 1, cabeza 2 vs el tiempo, con $\phi = 1$ y $t_{ret} = 0.5$. Vemos claramente como en lugar de ser una caminata es un "patinaje", ya que al no haber cruzamiento pero sí corriente, es como si se deslizara nuestra proteína. El tiempo de retraso va a ser el mismo para todos los resultados, el que va a variar es ϕ .

Las figuras 5-5(a) a la 5-10(a) muestran la posición de las cabezas cab1, cab2 en el eje vertical, versus el tiempo en el eje horizontal. Las figuras 5-5(b) a la 5-10(b) muestran la distancia entre los centros de masa de las cabezas (eje y), versus el tiempo (eje x). La distancia entre los centro de masa es simplemente, la resta de la posición de la cabeza 1 menos la 2, entre 2. Dado que en nuestro sistema las cabezas son partículas extendidas unidimensionales, un paso es visualizado como un cruzamiento en las trayectorias de las cabezas versus en tiempo (figs. 5-7(a) a la 5-10(a)). Lo que genera que la distancia oscile alrededor del cero (figs. 5-7(b) a la 5-10(b)).

Figura 5-5 (b) d vs tiempo, $\phi = 1$.
La distancia entre las cabezas permanece constante, como se puede observar de la figura 5-3(a).

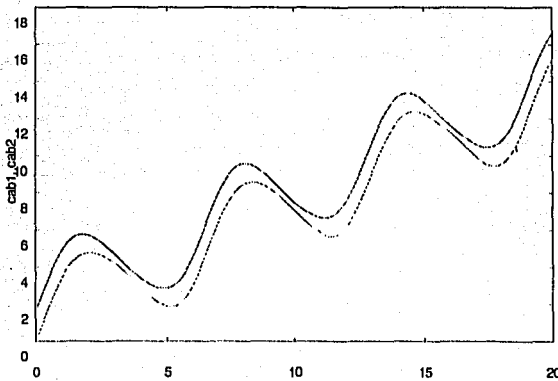
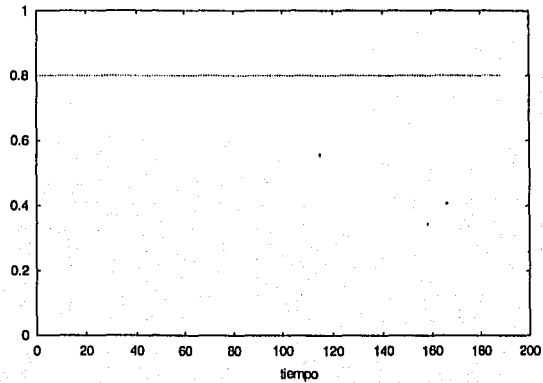
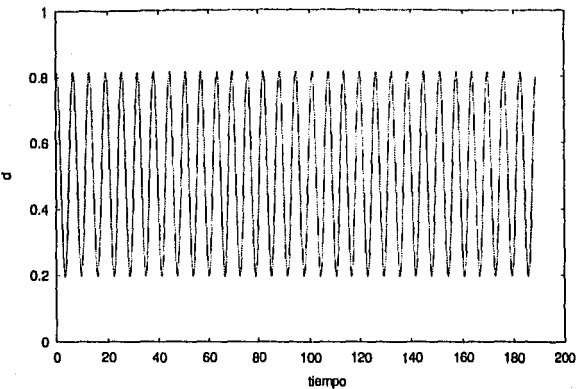


Figura 5-6(a) Cabeza 1, cabeza 2 vs el tiempo, con $\phi = 0.9$. Se observa el mismo "patinaje", ya que al no haber cruzamiento pero sí corriente, es como si se deslizara la proteína. Pero aquí la distancia entre las cabezas ya deja de ser continua y varía un poco con respecto al tiempo.

Figura 5-6 (b) d vs tiempo, $\phi = 0.9$. La oscilación de la distancia se hace notable con esta figura, mientras que en la figura pasada apenas se distinguía. En contraste con 5-3(b) donde no había oscilación.



Es interesante observar que aunque el tiempo de retraso sea el mismo, es decir 0.5, la dinámica sea distinta. De hecho no hay cambios en las dinámicas debido a cambios en el tiempo de retraso si yo fijara nada más ϕ . Mecánicamente las dos cabezas podrían incluso estar en fase con respecto a la interacción del microtúbulo, y el que haya corriente positiva depende del desfazamiento de la fuerza externa. En este caso, como las cabezas son partículas unidimensionales extendidas, no pueden separarse, pero a nivel biológico esto significaría que el mecanismo es más bien como el de la miosina, donde permanece por un tiempo en contacto toda la molécula, y luego no. Este resultado, que el tiempo de retraso no es importante para la dinámica, es un hecho que puede ser explotado para simular con este modelo un sinnúmero de fenómenos biológicos.

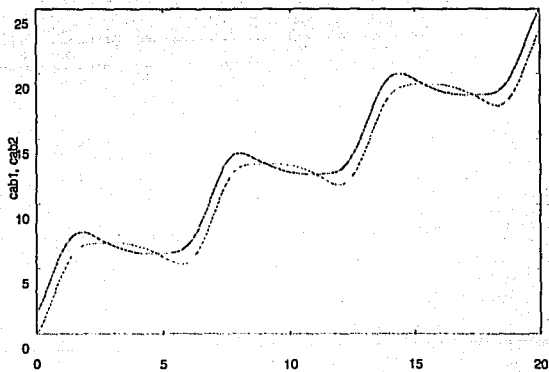


Figura 5-7 (a) Cabeza 1, cabeza 2 vs el tiempo, con $\phi = 0.8$. Se observa que empieza a haber un cruzamiento, entre la cabeza 1 y la 2, lo que significa que ¡ya camina!. Además de esto se observa una zona de deslizamiento.

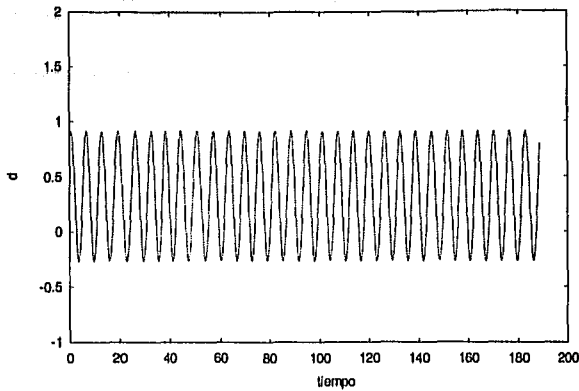


Figura 5-7 (b) d vs tiempo, $\phi = 0.8$. A partir de este valor de ϕ , la distancia entre las cabezas pasa por el cero, indicando una vez más, que las cabezas se están cruzando.

La oscilación observada en la figura 5-7 (b) y en las por venir, no ocurre alrededor del cero, sino más bien alrededor de la mitad de la distancia de respo, que en forma adimensional es de 0.9. Esto es explicable teniendo claro que el forzamiento mueve la fuerza debido al potencial de acoplamiento (figura 5-3). Al balancearlo de esta forma, genera que en promedio las cabezas se encuentren a la mitad de la distancia de respo. Lo que facilitaría el moverse hacia uno u otro lado, para dar el paso o cruzamiento correspondiente.

El comportamiento extraño de deslizamiento antes de cada paso, es una desviación de lo propuesto por la biología debido al tipo de forzamiento utilizado. Y como se verá en las siguientes figuras este comportamiento es evidenciado aún más, al disminuir ϕ .

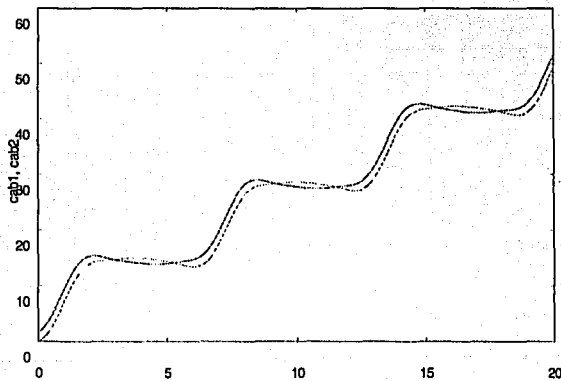


Figura 5-8 (a) Cabeza 1, cabeza 2 vs el tiempo, con $\phi = 0.7$. Vemos el cruzamiento y el deslizamiento.

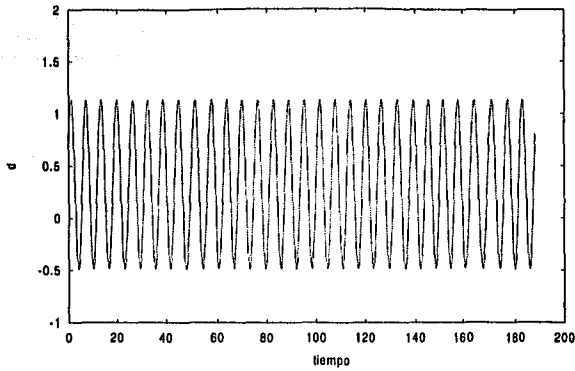


Figura 5-8 (b) d vs tiempo, $\phi = 0.7$. La distancia pasa por cero y se encuentra oscilando cerca de 4.5.

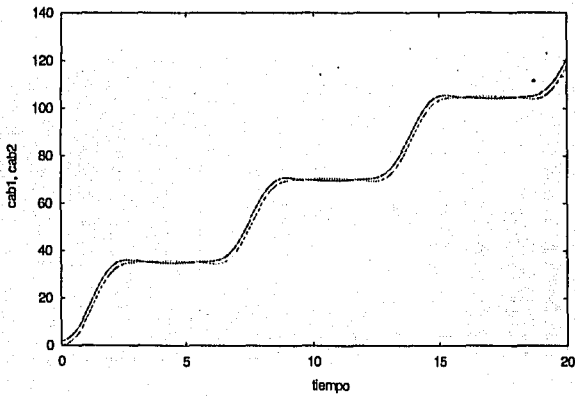


Figura 5-9 (a) Cabeza 1, cabeza 2 vs el tiempo, con $\phi = 0.6$. Cruzamiento y el deslizamiento como en las pasadas.

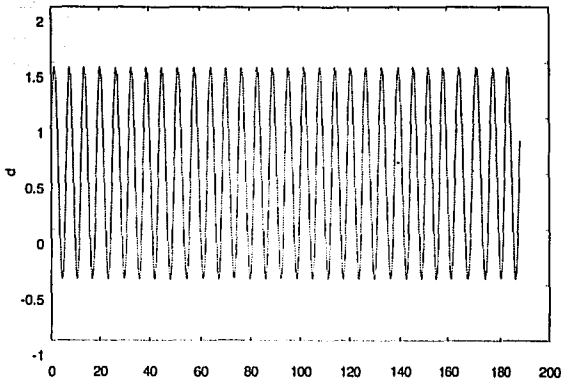


Figura 5-9 (b) d vs tiempo, $\phi = 0.6$. La distancia pasa por cero y se encuentra oscilando cerca de 4.5.

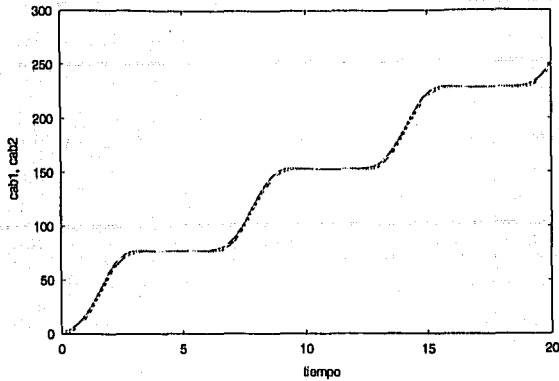


Figura 5-10 (a) Cabeza 1, cabeza 2 vs el tiempo, con $\phi = 0.5$. Cruzamiento y el deslizamiento como en las pasadas.

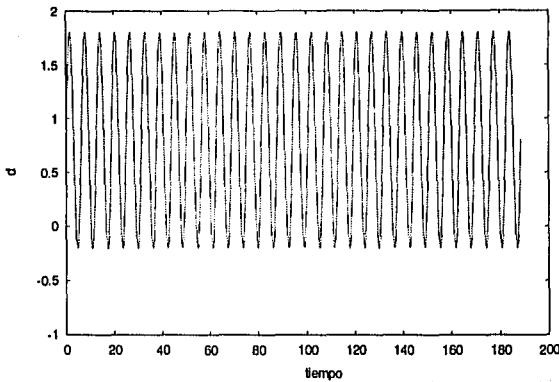


Figura 5-10 (b) d vs tiempo, $\phi = 0.5$. La distancia pasa por cero y se encuentra oscilando.

La distancia entre las cabezas oscila entre 4.5 aproximadamente, y pasa por cero. Esto es así excepto para $\phi = 0.5$, figura 5-10(b), donde parece oscilar más bien alrededor de 0.8. Aquí el desfazamiento es tan grande que las cabezas en promedio permanecen en su posición de reposo. Además de que el desfazamiento hace que se separen el doble de su posición de reposo. Este se puede entender dado que el desfase es tan grande que permite una apertura mayor de lo normal antes de que la fuerza debido al acople entre en acción.

De la figura 5-10 podemos ver además que la separación que existe entre las cabezas después de un cruzamiento y antes del otro (regiones de posición mas o menos constante), es muy

pequeña, lo que también es indicativo de un pobre paso en la caminata. U otra explicación, dos pequeños pasos que sirven para tomar impulso y seguir patinando,

Analizando estos diferentes tiempos con el plano fase, es muy sencillo darse cuenta a primera vista, de cuando existe una caminata y cuando no es así (figura 5-11 y 5-12).

Figura 5-11 Plano fase de la fig. 5-5. Nótese cómo simplemente se resbala y nunca las cabezas intercambian posición.

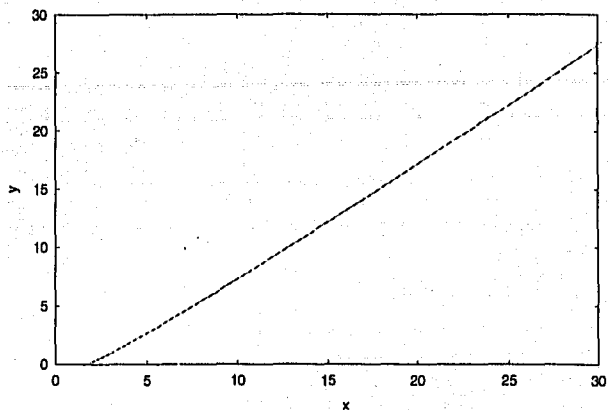
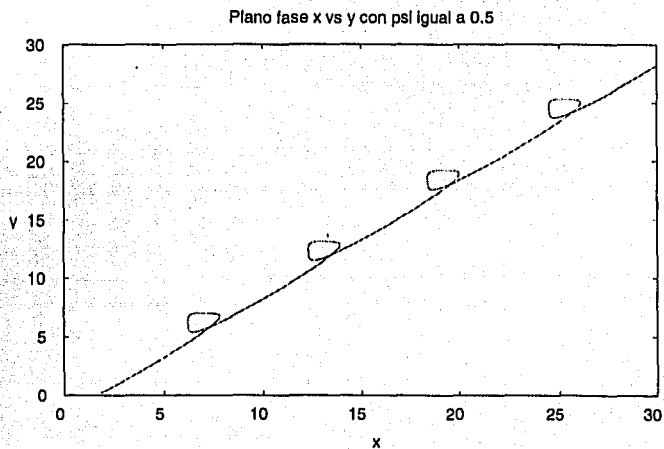


Figura 5-12 Plano fase de la Fig. 5-5. Compárese con la figura anterior. Aquí ya aparecen intercambios de posición.



Se puede observar de todas las figuras pasadas, que hay zonas donde se cruza, y otras donde parece moverse sin cruzamiento. Esto revela que un forzamiento periódico del tipo propuesto no puede reflejar la complejidad de los cambios conformacionales en la caminata de la

cinesina. Aunque esto suceda, es el forzamiento más sencillo y debe ser estudiado para poder más adelante buscar uno apropiado para la biología.

Voy a fijar el tiempo de desfazamiento en 0.8, porque es el que mejor refleja las propiedades de la molécula estudiadas experimentalmente. Y voy a estudiar el comportamiento de la distancia máxima que recorre la cinesina a diferentes proporciones de las barreras energéticas (figura5-13).

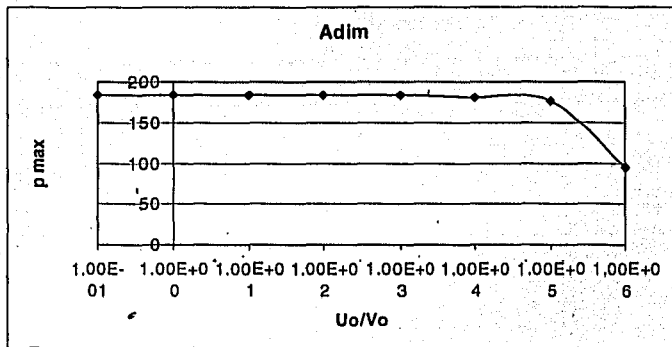


Figura 5-13 Pmax vs ln(Uo/Vo) sin unidades.

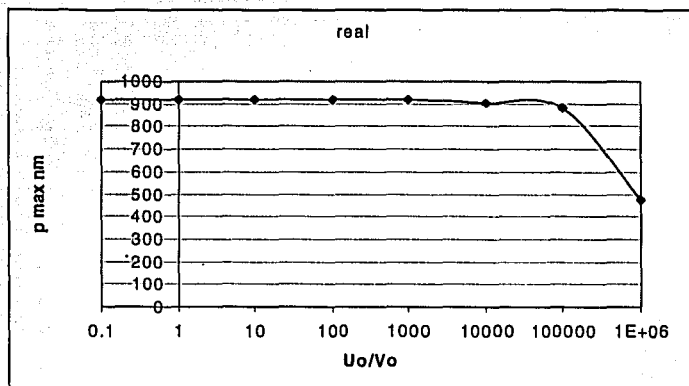


Figura 5-14 Pmax vs ln(Uo/Vo) en nanómetros.

De las figuras 5-13 y 5-14, vemos que hay una muy buena caminata, o transporte para un amplio rango de valores de la proporción U_0/V_0 . Lo que puede estar pasando es que exista una compensación, al pasar de un orden de magnitud a otro, uno de los potenciales compense el crecimiento o decaimiento del otro. En términos biológicos sería, que si la interacción cinesina-microtúbulo es más fuerte, una vez despegada la cabeza del microtúbulo, le será más fácil dar el paso, que si esta interacción fuera menor. Lo contrario también es válido, es decir, le cuesta más trabajo dar el paso, pero es más sencillo liberarse del microtúbulo.

El pasar de una condición donde cada uno de las alturas de los potenciales es casi la misma, es decir, le cuesta energéticamente mas o menos lo mismo para cada barrera, a una condición límite donde uno de ellos en este caso V_0 es enorme comparado con el otro, significaría que en este régimen el paso limitante es el despegado del microtúbulo, y no la energía con pasar un pie adelante del otro. Esto concuerda muy bien con la biología, ya que, la hidrólisis del ATP se utiliza no para dar el paso, sino para que pueda ser liberado, tanto el ADP, como el Pi. Es decir, la hidrólisis es sólo una forma de liberar el ATP que se usó para el cambio conformacional.

En el régimen donde ambas son muy similares (las alturas de las barreras), el modelo es muy sensible a aumentar la altura del acoplamiento (V_0). Esto sugiere que casi cualquier perturbación que impida el libre movimiento de la molécula una vez que está desprendida del microtúbulo, será una fuerte limitante para el transporte.

Veamos la respuesta de la caminata a la fuerza del láser (figura 5-15 a la 5-17).

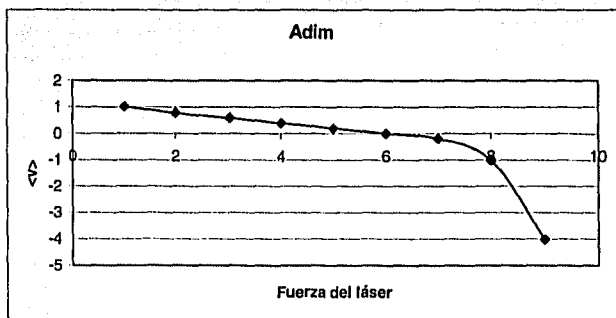


Figura 5-15 Relación corriente (velocidad promedio) sin unidades vs fuerza ejercida por el láser.

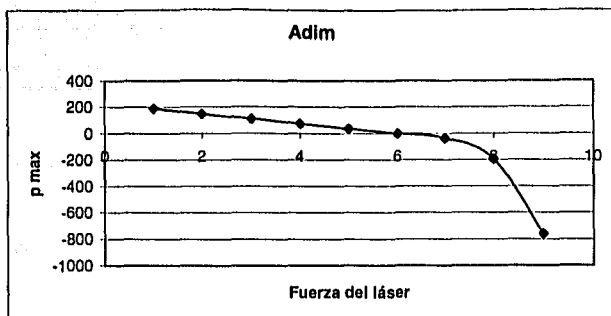


Figura 5-16 Relación entre la posición máxima vs la fuerza ejercida por el láser.

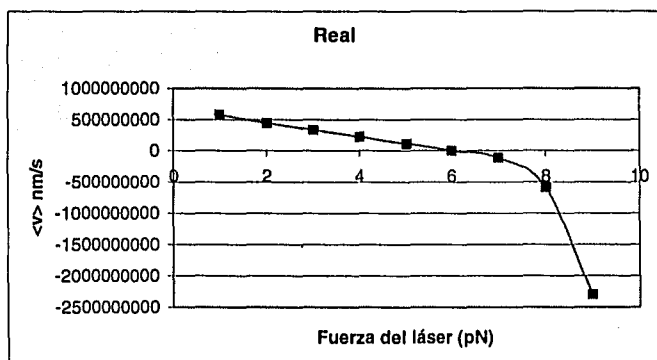


Figura 5-17 Relación corriente (velocidad promedio) en nm/s vs fuerza ejercida por el láser.

Se puede observar en las figuras 5-15 a la 5-17, un decaimiento monótono como el que se espera en concordancia con los resultados experimentales. Así mismo se observa una inversión de corriente conforme el peso se incrementa, esto tiene una causa. Le proporciona cierta pendiente al forzamiento externo. Por lo que es como si hubiésemos inclinado el potencial asimétrico hacia la derecha, así como también al potencial de acoplamiento entre las cabezas. Esta fuerza es una fuerza que se opone al movimiento tal como se manipula al láser en los experimentos de Visscher, et al. (69). Y como tal cuando es demasiado fuerte simplemente va a jalar a la protefna esté unida o no al microtúbulo. Es sabido que al hacer este tipo de experimentos con láser se puede incluso lograr que la cinesina camina hacia atrás (69). Es importante mencionar, que a nivel

puramente físico esta inversión de corriente es muy importante. Y se dedica actualmente un gran esfuerzo por entender la inversión de corriente en sistemas físicos, como se discutió en el capítulo pasado.

La fuerza externa modelada como un coseno, no es entonces similar para todos los valores, del cambio conformacional que produce la unión del ATP. Es debido, entonces, buscar una mejor manera de modificar el potencial de acoplamiento, para que después esta interacción con el potencial asimétrico periódico. Esto resulta aún más evidente, ya que los dos únicos parámetros no determinados por la biología fueron, la amplitud del forzamiento a , y su frecuencia ω . Vale sin embargo mencionar que aunque no fueron dictados por la bioquímica, los rangos de éstos para que hubiese caminata son muy pequeños. Es decir, si la amplitud disminuye (menos de 0.7) o aumenta (más de 2.5) no hay corriente. Así como si la frecuencia varía más allá de 0.5 de su valor fijado (igual a 1), también la corriente desaparece. Así, que aunque no están determinados por la biología, sí lo están por el modelo. Y este es otro punto a su favor.

El siguiente paso además involucra la adición del ruido térmico, es decir, que nuestro caminante sea sumergido en un baño a temperatura T finita. Lo mejor será, así mismo, estudiar primero la parte puramente física, antes de pasar al contexto biológico. Con un mejor entendimiento de la primera parte, el camino a seguir no será menos largo, pero al menos sí más transitable.

CONCLUSIÓN

La literatura existente sobre motores moleculares maneja en general un potencial asimétrico periódico tipo "ratchet". Este potencial tiene *grosso modo* las características del microtúbulo, es decir, es una estructura periódica, con polaridad. Aunque recientemente se encontró que la forma del potencial puede ser crucial en la dirección del transporte. El trabajar con modelos sencillos, e ir poco a poco complicándolos nos da una gran ventaja. La parte física del problema estará bien establecida para poder continuar hacia el mundo de lo biológico, que es *a priori* un sistema complejo.

El potencial propuesto aquí para el acoplamiento entre las cabezas, tiene muchas ventajas sobre los anteriormente propuestos. Por un lado refleja la naturaleza de que una cabeza tiene que rebasar a la otra en la caminata unidireccional, tiene cierta altura la barrera energética, asociada con la hidrólisis del ATP. Además es un acoplamiento no-lineal, en contraste con resortes lineales, que se estiran al infinito, manejados en la literatura. Y tiene una relación directa con la teoría de reacciones químicas como la de Kramers.

Las limitaciones del modelo son impuestas desde el principio. Para mantener un sistema manejable, el número de dimensiones no subió de 3. Lo que impide simular cambios conformacionales debidos a la hidrólisis del ATP, así como separar la interacción de la fuerza externa sobre el potencial de interacción cinesina-microtúbulo. Es este su principal punto de corrección. Además de que necesita, así mismo, conocerse el papel que juegan las fluctuaciones térmicas, en la caminata. Poco a poco se irá desenmarañando el problema, hasta que nos sea cognoscible el funcionamiento y la mecanotransducción llevada a cabo por la cinesina. Hasta entonces hay mucho camino aún por delante.

Integración Numérica y el método de Runge-Kutta,

El modelo matemático que hemos manejado a lo largo de este trabajo es no-lineal, es un sistema de ecuaciones diferenciales de primer orden acopladas, cuya solución es obtenida numéricamente. Este apéndice explica un método de integración numérica estándar, el método de Runge-Kutta.

Y aunque conceptualmente sencillo el método de Euler, los errores generados por éste crecen rápidamente con el número de iteraciones a comparación de métodos más sofisticados.

El método de Runge-Kutta es uno de los métodos más usados para la aproximación numérica de soluciones (i.e., 153-155). El método de orden cuatro Runge-Kutta recibe su nombre de los dos matemáticos alemanes que lo desarrollaron hace aproximadamente 100 años. Este método es similar a la regla de Simpson en tanto que considera un promedio ponderado.

La generalización del método hacia los sistemas de primer orden es directa si aprovechamos la notación vectorial para sistemas, como se vio en el capítulo 4. Una vez que tengamos implementado el método Runge-Kutta, tendremos también un método eficiente para el estudio numérico de ecuaciones diferenciales de orden superior, ya que éstas pueden ser reescritas como sistemas de primer orden. Consideremos el sistema de ecuaciones de primer orden

$$\frac{d\mathbf{Y}}{dt} = \mathbf{F}(t, \mathbf{Y}), \quad \mathbf{Y}(t_0) = \mathbf{Y}_0.$$

Para aplicar el método de Runge-Kutta a este sistema, necesitamos calcular cuatro vectores \mathbf{K}_1 , \mathbf{K}_2 , \mathbf{K}_3 , y \mathbf{K}_4 en cada paso del algoritmo. Estos vectores son análogos a las cuatro pendientes que se calculan para ecuaciones de primer orden y se definen esencialmente de la misma manera (179). Cada uno de estos vectores depende también del índice k , pero para hacer más comprensible las fórmulas no lo indicaré. Supongamos que tenemos el punto (t_k, \mathbf{Y}_k) . Los vectores son entonces

$$\mathbf{K}_1 = \mathbf{F}(t_k, \mathbf{Y}_k)$$

$$\mathbf{K}_2 = \mathbf{F}(t_k + \Delta t / 2, \mathbf{Y}_k + (\Delta t / 2)\mathbf{K}_1)$$

$$\mathbf{K}_3 = \mathbf{F}(t_k + \Delta t / 2, \mathbf{Y}_k + (\Delta t / 2)\mathbf{K}_2)$$

$$\mathbf{K}_4 = \mathbf{F}(t_k + \Delta t, \mathbf{Y}_k + \Delta t\mathbf{K}_3).$$

Con ello podemos formar un promedio ponderado como en el caso de las ecuaciones de primer orden (179). Obtenemos el vector

$$\mathbf{K} = \left(\frac{\mathbf{K}_1 + 2\mathbf{K}_2 + 2\mathbf{K}_3 + \mathbf{K}_4}{6} \right),$$

y utilizamos \mathbf{K} para formar el paso de (t_k, \mathbf{Y}_k) a

$$(t_{k+1}, \mathbf{Y}_{k+1}) = (t_k + \Delta t, \mathbf{Y}_k + \Delta t\mathbf{K}).$$

Si estamos trazando las curvas solución en el plano fase, entonces graficamos simplemente los puntos \mathbf{Y}_k .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hirokawa N. (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279: 519-526.
2. Mermall V., Post P. L. y Mooseker M. S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. *Science* 279: 527-533.
3. Tanaka Y., Zhang Z. y Hirokawa N. (1995) Identification and molecular evolution of new dynein-like protein sequences in rat brain. *J. Cell Sci.* 108: 1883-1893.
4. Porter M. E. (1996) Axonemal dyneins: assembly, organization and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 10-17.
5. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., y Watson J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell.* 3rd Ed. Garland Publishing, Inc, USA.
6. Spudis J. A. (1994) How molecular motors work. *Nature* 372: 515-518.
7. Goldstein L. S. B. y Philp A. V. (1999) The road less traveled: Emerging Principles of Kinesin Motor Utilization. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 141-183.
8. Mandelkow E. y Johnson K. A. (1998) The structural and mechanochemical cycle of kinesin. *TIBS* 23: 429-433.
9. Vale R. D., Reese T. S. y Shetz M. P. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42: 39-50.
10. Brady S. T. (1985) A novel brain ATPase with properties expected for fast axonal transport motor. *Nature* 317: 73-75.
11. Greene E. A. y Henikoff S. (1999) The Kinesin Home Page, <http://www.blocks.fhrc.org/~kinesin/>.
12. Vale R. D., Fletterick R. J. (1997) The design plan of kinesin motors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 745-777.
13. Hall D. H. y Hedgecock E. M. (1991) Kinesin related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* 65: 837-847.
14. Yonekawa Y., Harada A., Okada Y., Funakoshi T., Kanai Y., et al. (1998) Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J. Cell Biol.* 141: 431-441.
15. Afshar K., Scholey J. y Hawley R. S. (1995) Identification of the chromosome localization domain of the *Drosophila* nod kinesin-like protein. *J. Cell Biol.* 131: 833-843.

16. Alphey L., Parker L., Hawcroft G., Gou Y., Kaiser K. y Morgan G. (1997) KLP38B: a mitotic kinesin-related protein that binds PPI, *J. Cell Biol.* 138: 395-409.
17. Molina I., Baars S., Brill J. A., Hales K. G., Fuller M. T. y Ripoll P. (1997) A chromatin-associated kinesin related protein required for normal mitotic segregation in *Drosophila*, *J. Cell Biol.* 139: 1361-1371.
18. Tokai N., Fujimoto-Nishiyama A., Toyoshima Y., Yonemura S., Tsukita S., et al. (1996) Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. *EMBO J.* 15: 457-467.
19. Wang S. Z. y Adler R. (1995) Chromokinesin: a DNA-binding protein, kinesin-like nuclear protein. *J. Cell Biol.* 128: 761-768.
20. Yao X., Anderson K. L. y Cleveland D. W. (1997) The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules. *J. Cell Biol.* 139: 435-447.
21. Yen T. J., Li G., Schaar B. T., Schilak I. y Cleveland D. W. (1992) CENP-E is a putative kinetochore motor that acumulates just before mitosis. *Nature* 359: 536-539.
22. Seiler S., Nargang F. E., Steinberg G. y Schliwa M. (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 16: 3025-3034.
23. Nangaku M., Sato-Yoshitake R., Okada Y., Noda Y., Tatemura R., et al. (1994) KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79: 1209-1220.
24. Pereira A. J., Dalby B., Stewart R. J., Doxsey S. J., y Goldstein L. S. (1997) Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 136: 1081-1090.
25. Tanaka Y., Kanai Y., Okada Y., Nonaka S., Takeda S., et al. (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93: 1147-1158.
26. Cole D. G., Diener D. R., Himelblau A. L., Beech P. L., Fuster J. C., y Rosenbaum J. L. (1998) *Chlamidomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J. Cell Biol.* 141: 993-1008.
27. Kozminski K. G., Johnson K. A., Forscher P., y Rosenbaum J. L. (1993) A motility in the eukariotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5519-5523.

28. Piperno G., Mead K., y Henderson S. (1996) Inner dynein arms require the activity of kinesin homologue protein KHP1(FLA10) to reach the distal part of flagella in *Chlamidomonas*. J. Cell Biol. 133: 371-379.
29. Piperno G., y Mead K. (1997) Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of *Chlamidomonas* flagella. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4457-4462.
30. Prahlad V., Yoon M., Moir R. D., Vale R. D., y Goldman R. D. (1998) Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. J. Cell Biol. 143: 159-170.
31. Yoon M., Moir R. D., Prahlad V., y Goldman R. D. (1998) Motile properties of vimentin intermediate filaments networks in living cells. J. Cell Biol. 143: 147-157.
32. Saunders W., Lengyel V., y Hoyt M. A. (1997b) Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between diferent tipes of kinesin-related motors. Mol. Biol. Cell 8: 1025-1033.
33. Saunders W., y Hoyt M. A. (1992) Kinesin-related proteins required for structural integrity of the mitotic spindle. Cell 70: 451: 458.
34. Sharp D. J., McDonald K. L., Brown H. M., Matthies H. J., Walczak C., et al. (1999) The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles. J. Cell Biol. 144: 125-138.
35. Straight A. F., Sedat J. W., y Murray A. W. (1998) Time-lapse microscopy reveals unique roles for kinesins during anaphase in budding yeast. J. Cell Biol. 143: 687-694.
36. Whitehead C. M., y Rattner J. B. (1998) Expanding the role of HsEg5 within the mitotic and postmitotic phases of the cell cycle. J. Cell Sci. 111: 2551-2561.
37. Wilson P. G., Fuller M. T., y Borisy G. G. (1997) Monastral bipolar spindles: implications for dynamic centrosome organization. J. Cell Sci. 110: 451-464.
38. Yamamoto A. H., Komma D. J., Shaffer C. D., Pirotta V., y Endow S. A. (1989) The claret locus in *Drosophila* encodes products required for eyecolor and for meiotic chromosome segregation. EMBO J. 8: 3543-3552.
39. Endow S. A., y Komma D. J. (1996) Centrosome and spindle formation of the *Drosophila* ncd microtubule motor visualized in live embryos using Ncd-GFP fusion proteins. J. Cell Sci. 109: 2429-2442.
40. Noda Y., Sato-Yoshitake R., Kondo S., Nangaku M., y Hirokawa N. (1995) KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. J. Cell Biol. 129: 157-167.

41. Desai A., Verma S., Mitchinson T. J., y Walczak C. E. (1999) Kin I are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96: 69-78.
42. Maney T., Hunter A., Wagenbach M., y Wordeman L. (1998) Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 142: 787-801.
43. Wordeman L., y Mitchinson T. J. (1995) Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* 128: 95-104.
44. Lombillo V. A., Stewart R. J., y McIntosh J. R. (1995b) Minus-end-directed motion of kinesin-coated microspheres driven by microtubule depolymerization. *Nature* 373: 161-164.
45. Brown S. S. (1999) Cooperation between microtubule and actin-based motor proteins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 63-80.
46. Robbins D. J., Nybakken K. E., Kobayashi R., Sisson J. C., Bishop J. M., y Theron P. P. (1997) Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* 90: 225-234.
47. Sisson J. C., Ho K. S., Suyama K., y Scott M. P. (1997) Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 90: 235-245.
48. Nogales E., Whittaker M., Milligan R. A., y Downing K. H. (1999) High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96: 79-88.
49. Kull F. J., Sablin E. P., Lau R., Fletterick R. J., y Vale R. D. (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380: 550-555.
50. Sack S., Muller J., Marx A., Thormahlen M., Mandelkow E. M., Brady S. T., y Mandelkow E. (1997) X-ray structure of the motor and neck domains from rat brain kinesin. *Biochemistry* 36: 16155-16165.
51. Sablin E. P., Kull F. J., Cooke R., Vale R. D., y Fletterick R. J. (1996) Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. *Nature* 380: 555-559.
52. Gulik A., Song H., Endow S., y Rayment I. (1998) X-ray crystal structure of the yeast KAR3 motor domain complexed with MgADP to 2.3 Å resolution. *Biochemistry* 37: 1769-1776.
53. Kozielski F., Sack, Marx A., Thormahlen M., Schonbrunn E., Biou V., Thompson A., Mandelkow E. M., y Mandelkow E. (1997) The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell* 91: 985-994.

54. Sablin E. P., Case R. B., Dai S. C., Hart C. L., Ruby A., Vale R. D., y Fletterick R. J. (1998) Direction determination in the minus-end-directed kinesin motor *ncd*. *Nature* 395: 813-816.
55. Vale R. D., Case R. B., Sablin E. P., Hart C. L., y Fletterick R. J. (2000) Searching for the kinesin's mechanical amplifier. *Philos. Trans. R Soc. Lon.* 29; 355(1396): 449-457.
56. Sablin E. P. (2000) Kinesins and microtubules: their structure and motor mechanisms. *Curr. Op. Cell Biol.* 12: 35-41.
57. Sheetz M. P. (1999) Motor and cargo binding. *Eur. J. Biochem.* 262: 19-25.
58. Orozco J. T., Wedaman K. P., Signor D., Brown H., Rose I., y Scholey J. M. (1999) Movement of motor and cargo along cilia. *Nature* 398: 674.
59. Coy D. L., Hancock W. O., Wagenbach M., y Howard J. (1999) Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat. Cell Biol.* 1: 288-292.
60. Friedman D. C., y Vale R. D. (1999) Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargo-binding tail domain. *Nat. Cell Biol.* 1: 293-297.
61. Stone D. B., Rex P. H., y Mendelson R. A. (1999) Solution structures of dimeric kinesin and *ncd* motors. *Biochemistry* 38: 4938-4947.
62. Marx A., Thormahlen M., Muller J., Sack S., Mandelkow E. M., y Mandelkow E. (1998) Conformations of kinesin: solution vs. crystal structures and interactions with microtubules. *Eur. Biophys. J.* 27: 455-465.
63. Howard J., Hudspeth A. J., y Vale R. D. (1989) Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 348: 348-350.
64. Block S. M., Goldstein L. S., y Schnapp B. J. (1990) Bead movement by single kinesin molecules with optical tweezers. *Nature* 348: 350-352.
65. Svoboda K., Schimdt C. F., Schnapp B. J., y Block S. M. (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365: 721-727.
66. Vale R. D., Funatsu T., Pierce D. W., Romberg L., Harada Y., y Yanagida T. (1996) Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* 380: 451-453.
67. Schitzer M. J., y Block S. M. (1997) Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* 388: 386-389.
68. Coy D. L., Wagenbach M., y Howard J. (1999) Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyses. *J. Biol. Chem.* 274: 3667-3671.
69. Visscher K., Schitzer M. J., y Block S. M. (1999) Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* 400: 184-189.

70. DeCastro M. J., Ho C. H., y Stewart R. J. (1999) Motility of dimeric ncd on a metal-chelating surfactant; evidence that ncd is not processive. *Biochemistry* 38: 5076-5081.
71. Foster K. A., y Gilbert S. P. (2000) Kinetic studies of dimeric ncd; evidence that ncd is not processive. *Biochemistry* 39: 1784-1791.
72. Hirose K., Lockhart A., Cross R. A., y Amos L. A. (1996) Three-dimensional cryoelectron microscopy of dimeric kinesin and ncd motor domains on microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9539-9544.
73. Hirose K., Cross R. A., y Amos L. A. (1998) Nucleotide-dependent structural changes in dimeric ncd molecules complexed to microtubules. *J. Mol. Biol.* 278: 389-400.
74. Vale R. D. (1996) Switches, latches, and amplifiers; common themes of molecular motors and G proteins. *J. Cell Biol.* 135: 291-302.
75. Song H., y Endow S. A. (1999) Decoupling of nucleotide- and microtubule binding sites in a kinesin mutant. *Nature* 396: 587-590.
76. Henningsen U., y Schliwa M. (1997) Reversal in the direction of movement of a molecular motor. *Nature* 389: 93-95.
77. Endow S. A., y Waligora K. W. (1998) Determinants of kinesin motor polarity. *Science* 28: 1200-1202.
78. Case R. B., Rice S., Hart C. L., y Vale R. D. (2000) Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule based motility. *Curr. Biol.* 10: 157-160.
79. Rice S., Lin A. W., Safer D., Hart C. H., Naber N., Carragher B. O., Cain S. M., Pechatnikowa E., Wilson-Kubalek E. M., Pate E., et al. (1999) A structural changes in the kinesin motor that drives motility. *Nature* 402: 778-784.
80. Romberg L., Pierce D. W., y Vale R. D. (1998) Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility. *J. Cell Biol.* 140: 1407-1416.
81. Hancock W. O., y Howard J. (1998) Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J. Cell Biol.* 140: 1395-1405.
82. Mandelkow E., y Johnson K. A. (1998) The structural and mechanochemical cycle of kinesin. *Trends Biochem. Sci.* 23: 429-434.
83. Mandelkow E., y Hoenger A. (1999) Structure of kinesin and kinesin-microtubule complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 34-44.
84. Hoenger A., Sack S., Thormahlen M., Marx A., Muller J., Gross H., y Mandelkow E. (1998) Image reconstructions of microtubules decorated with monomeric and dimeric kinesins: comparisons with X-ray structure and implications for motility. *J. Cell Biol.* 141: 419-430.

85. Song Y. H., y Mandelkow E. (1993) Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1671-1675.
86. Kikkawa M., Ishakawa T., Nakata T., Wakabayashi T., y Hirokawa N. (1995) Three-dimensional structure of the kinesin head-microtubule complex. Nature 376: 274-277.
87. Walker R. A. (1995) Ncd and kinesin motor domains interact with both alpha- and beta-tubulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5960-5964.
88. Tucker C., y Goldstein L. S. B. (1997) Probing the kinesin-microtubule interaction, J. Biol. Chem. 272: 9481-9488.
89. Thormahlen M., Marx A., Müller S. A., Song Y. H., Mandelkow E. M., Aebi U., y Mandelkow E. (1998) Interaction of monomeric and dimeric kinesin with microtubules. J. Mol. Biol. 275: 795-809.
90. Lockhart A., Crevel I. M., y Cross R. A. (1995) Kinesin and ncd bind through a single head to microtubules and compete for shared MT binding site. J. Mol. Biol. 249: 763-771.
91. Tripet B., Vale R. D., y Hodges R. S. (1997) Demonstration of coiled-coil interactions within the kinesin neck region using synthetic peptides – implications for motor activity. J. Biol. Chem. 272: 8946-8956.
92. Morii H., Takenawa T., Arisaka F., y Shimizu T. (1997) Identification of kinesin neck region as a stable alpha-helical coiled-coil and its thermodynamic characterization. Biochemistry 36: 1933-1942.
93. Small J. V., Isenberg G., y Celis J. E. (1978) Polarity of the actin in the leading edge of cultured cells. Nature 272: 638-639.
94. Small J. V., Herzog M., y Anderson K. (1995) Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. J. Cell Biol. 129: 1275-1286.
95. Titus M. A., y Gilbert S. P. (1999) The diversity of molecular motors: an overview. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 56: 181-183.
96. Mermall V., Post P. L., y Mooseker M. S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. Science 279: 527-533.
97. Avraham K. B., Hasson T., Steel K. P., Kingsley D. M., Russel L. B., Mooseker M. S., et al. (1995) The mouse *Snell's maltzer* deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. Nature Genet. 11: 369-375.
98. Gibson F., Walsh J., Mburu P., Varela A., Brown K. A., Antonio M. et al. (1995) A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene *shaker-1*. Nature 374: 62-64.

99. Weil D., Blanchard S., Kaplan J., Guliford P., Gibson F., Walsh J., et al. (1995) Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374: 60-61.
100. Probst F. J., Fridell R. A., Raphael Y., Saunders T. L., Wang A., Liang Y., et al. (1998) Correction of deafness in *shaker-2* mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* 280: 1444-1447.
101. Wang A., Liang Y., Probst F. J., Fridell R. A., Wilcox E. R., Touchman J. W., et al. (1998) Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 280: 1447-1451.
102. Pastural E., Barrat F. J., Dufourcq-Lagelouse R., Certain S., Sanal O., Jabado N., et al. (1997) Griscelli disease maps chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nature Genet.* 16: 289.
103. Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y., Takeda S., Harada A., Kanai Y., et al. (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95: 829-837.
104. Marszalek J. R., Ruiz-Lozano P., Roberts E., Chien K. R., y Goldstein L. S. B. (1999) Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5043-5048.
105. Kuznetsov S. A., Langford G. M., y Weiss D. M. (1992) Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* 356: 722-725.
106. Lantz V. A., y Miller K. G. (1998) A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at posterior pole of *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* 140: 897-910.
107. Huang J. D., Brady S. T., Richards B. W., Stenoien D., Resau J. H., Copeland N. G., et al. (1999) Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* 397: 267-270.
108. Rogers S. L., Tint I. S., Fanapour P. C., y Gelfand V. I. (1997) Regulated bidirectional motility of melanophore pigment granules along microtubules in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3720-3725.
109. Rogers S. L., y Gelfand V. I. (1998) Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr. Biol.* 8: 161-163.
110. Wells A. L., Lin A. W., Chen L.-Q., Safer D., Cain S. M., Hasson T., Carragher B. O., Milligan R. A., y Sweeney H. L. (1999) Myosin VI is a myosin that moves backwards. *Nature* 401: 505-508.

111. Hasson T., y Cheney R. E. (2001) Mechanisms of protein motor reversal, *Curr. Op. Cell Biol.* 13: 29-35.
112. Mooseker M. S., y Cheney R. E. (1995) Unconventional myosins, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 633-675.
113. Sellers J. (2000) Myosins: a diverse superfamily, *Biochim. Biophys. Acta* 1496: 3-22.
114. Kull F. J., Vale R. D., y Fletterick R. J. (1998) The case for a common ancestor; kinesin and myosin motor proteins and G proteins, *J Muscle Res Cell Motil.* 19(8):877-86.
115. Howard J. (1996) The movement of kinesin along microtubules, *Ann. Rev. Physiol.* 58: 703-729.
116. Endow S. A., y Higuchi H. (2000) A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules, *Nature* 406: 913-916.
117. de Castro M. J., Ho C. H., y Stewart R. J. (1999) Motility of dimeric ncd on a metal-chelating surfactant: evidence that ncd is not processive, *Biochemistry* 38: 5076-5081.
118. de Castro M. J., Fondecave R. M., Clarke L. A., Schmidt C. F., y Stewart R. J. (2000) Working strokes by single molecules of the kinesin-related ncd microtubule motor, *Nat. Cell Biol.* 2: 724-729.
119. Howard J. (1997) Molecular motors: structural adaptations to cellular functions, *Nature* 389: 561-567.
120. Hancock W. O., y 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. USA* 96: 13147-13152.
121. Crevel I., Carter N., Schliwa M., y Cross R. (1999) Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive *Neurospora* kinesin, *EMBO J.* 18: 5863-5872.
122. Hoenger A., Thormahlen M., Diaz-Avalos R., Doerhoefer M., Goldie K. N., Muller J., y Mandelkow E. (2000) A new look at the microtubule binding patterns of dimeric kinesins, *J. Mol. Biol.* 279: 1087-1103.
123. Ishiwata S., y Kawaguchi K. (1999) Nucleotide and loading rate-dependent switching of single- to double-loaded binding of kinesin, *Biophys. J.* 78: 278A.
124. Kikkawa M., Okada Y., y Hirokawa N. (2000) A resolution model of the monomeric kinesin motor KIF1A, *Cell* 100: 241-252.
125. Okada Y., y Hirokawa N. (2000) Mechanism of the single-headed processivity: diffusional anchoring between the K-loop of the kinesin and the C terminus of tubulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 640-645.

126. Okada Y., y Hirokawa N. (1999) A processive single-headed motor; kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* 283: 1152-1157.
127. Vale R. D., y Milligan R. A. (2000) The ways things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288: 8960-8972.
128. Cross R. A., Crevel I., Carter N. J., Alonso M. C., Hirose K., y Amos L. A. (2000) The conformational cycle of kinesin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 459-464.
129. Schnitzer M. J., Visscher K., y Block S. M. (2000) Force production by single kinesin motors. *Nat. Cell Biol.* 2: 718-723.
130. Iwanati S., Iwane A. H., Higuchi H., Ishii Y., y Yanagida T. (1999) Mechanical and chemical properties of cysteine-modified kinesin molecules. *Biochemistry* 38: 10318-10323.
131. Hua W., Young E. C., Fleming M. L., y Gelles J. (1997) Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature* 388: 386-390.
132. Hirose K., Lowe J., Alonso M., Cross R. A., y Amos L. A. (1999) Congruent docking of dimeric kinesin and ncd into three-dimensional electron cryomicroscopy maps of microtubule-motor ADP complexes. *Mol. Biol. Cell* 10: 2063-2074.
133. Arnal I., y Wade R. H. (1998) Nucleotide-dependent conformations of the kinesin dimer interacting with microtubules. *Structure* 6: 33-38.
134. Hackney D. D. (1994) Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6865-6869.
135. Ma Y. Z., y Taylor E. W. (1997) Interacting head mechanism of microtubule-kinesin ATPase. *J. Biol. Chem.* 272: 724-730.
136. Svoboda K., y Block S. M. (1994) Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* 77: 773-784.
137. Kojima H., Muto E., Higuchi H., y Yanagida T. (1997) Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.* 73: 2012-2022.
138. Meyhöfer E., y Howard J. (1995) The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 574-578.
139. Derenyi I., Vicsek T. (1996) The kinesin walk: a dynamical model with elastically coupled heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6775-6779.
140. Fox R. R., Choi M. H. (2001) Rectified Brownian motion and kinesin motion along microtubules. *Physical Rev. E* 63: 051901:1-12.

141. Feynman R. P., Leighton R. B., y Sands M, (1963) *The Feynman Lectures on Physics*, mainly mechanics, radiations and heat, volume I. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, USA.
142. Lipowsky, R., y Harms, T. (2000) Molecular motors and nonuniform ratchets. *Eur. Biophys. J.* 29: 542-548.
143. Astumian, R. D., Derényi I. (1998) Fluctuation driven transport and models of molecular motors and pumps. *Eur. Biophys. J.* 27: 474-489.
144. Astumian, R. D. (1997) Thermodynamics and Kinetics of a Brownian Motor. *Science* 276: 917-922.
145. Brooks, M. (2000) Quantum Clockwork. *New Scientist* 2222: 29-31.
146. Hänggi, P., and Bartussek, R. (1996) Brownian rectifiers: How to convert Brownian motion into directed transport. In: *Nonlinear Physics of Complex Systems – Current Status and Future Trends*. J. Parisi, S. C. Müller and W. Zimmermann, eds., *Lecture Notes in Physics* 476: 294-308. Springer, Berlin, New York.
147. Hänggi, P., and Reimann, P. (1999) Quantum ratchets reroute electrons. *Physics World* 12: 21-22.
148. Jülicher, F., Ajdari, A., Prost, J. (1997) Modeling molecular motors. *Rev. Mod. Phys.* 69: 1269-1281.
149. Lieber, S. (1994) Moving forward noisily. *Nature* 370: 412-413.
150. Reimann, P., and Hänggi, P. (1998) Quantum features of Brownian motors and Stochastic Resonance. *Chaos* 8: 629-642.
151. Reimann, P. (2002) Brownian Motors: noisy transport far from thermal equilibrium. *Physics Reports* 361: 57-265.
152. Derényi, I. (2001) Stochastic processes. In: *Fluctuations and Scaling in Biology*. Tamás Vicsek, ed., 27-31. Oxford University Press.
153. Mateos, J. L. (2000) Chaotic Transport and Current Reversal in Deterministic Ratchets. *Phys. Rev. Lett.* 84, 2: 258-261.
154. Mateos, J. L. (2001) Current Reversals in Chaotic Ratchets. *Acta Physica Polonica B* 32-2: 307-320.
155. Mateos, J. L. (2002) Current Reversals in Chaotic Ratchets: the Battle of Attractors. (Submitted).
156. Cilla, S., Falo, F., Florja, L. M. (2001) Mirror symmetry breaking through an internal degree of freedom leading to directional motion. *Phys. Rev. E.* 63, 031110: 1-5.

157. Jung, P., Kissner J. G., y Hänggi P. (1996) Regular and Chaotic Transport in Asymmetric Periodic Potentials: Inertia Ratchets. *Phys. Rev. Lett.* 76, 18: 3436-3439.
158. Baker, G. L., Gollub, J. P. (1996) *Chaotic dynamics: an introduction*, 2nd ed. Cambridge University Press.
159. Kelly, T. R. (2001) Progress toward a Rationally Designed Molecular Motor. *Acc. Chem. Res.* 34, 6: 514-522.
160. Van Oudenaarden, A., Boxer, S. G. (1999) Brownian Ratchets: Molecular Separations in Lipid Bilayers Supported on Patterned Arrays. *Science* 285: 1046-1048.
161. Bader, J. S., Hammond, R. W., et. al. (1999) DNA transport by a micromachined Brownian ratchet device. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 23: 13165-13169.
162. Jülicher, F. (1999) Force and Motion Generation of Molecular Motors: A Generic Description. In *Transport and Structure: Their Competitive Roles in Biophysics and Chemistry*. Edited by S.C. Müller, J. Parisi and W. Zimmermann, Lecture Notes in Physics, Springer, Berlin.
163. Strogatz, S. H. (1994) *NONLINEAR DYNAMICS AND CHAOS. With Applications to Physics, Biology, Chemistry and Engineering*. Addison-Wesley Publishing Company.
164. Devaney, R. L. (1989) *An Introduction to Chaotic Dynamical Systems*, 2nd ed. Addison-Wesley.
165. Devaney, R. L. (1992) *A First Course in Chaotic Dynamical Systems: Theory and Experiment*. Addison-Wesley.
166. Barbi, M., Salerno, M. (2000) Phase locking and current reversals in deterministic underdamped ratchets. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 62(2 Pt A):1988-94.
167. Denisov, S. (2002) Particle with internal dynamical asymmetry: chaotic self-propulsion and turning. *Phys. Lett. A* 296: 197-203.
168. Frank, J., Kumar Agrawal, R. (2000) A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406; 318-322.
169. Kaminskis, A., Rosenkranz, S., Fretwell, H. M., et al. (2002) Spontaneous breaking of time-reversal symmetry in the pseudogap state of a high-T_c superconductor. *Nature* 416; 610-613.
170. Katz, B. (1966) *Nerve, Muscle, and Synapse*. McGraw-Hill, New York.
171. Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, M. A.

172. Junge, D. (1992) *Nerve and Muscle Excitation*, 3rd ed, Sinauer Associates, Sunderland, M. A.
173. Aidley, D. J. (1998) *The Physiology of Excitable Cells*, Cambridge University Press, New York.
174. Howard, J. (2001) *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc.
175. Li, Y., Wu, X., Zhuo, Y. (2000) Directed motion of two-headed Brownian motors. *Mod. Phys. Lett.* 14(13); 479-486.
176. Kostur, M., Luczka, J. (2001) Multiple current reversal in Brownian ratchets. *Phys. Rev. E.* 63: 021101.
177. Parmeggiani, A., Jülicher, F., Peliti, L., y Prost, J. (2001) Detachment of molecular motors under tangential loading. *Europhys. Lett.* 56 (4); 603-609.
178. Magnasco, M. O. (1993) Forced Thermal Ratchets. *Phys. Rev. Lett.* 71 (10); 1477-1481.
179. Blanchard, P., Devaney, R. L., Hall, G. R. (1999) *Differential Equations*. Brooks Cole Publishing, an ITP Company.
180. Mateos, J. L. (2002) Current Reversals in Deterministic Ratchets: points and dimers. *Physica D* (In press).