

# Lecture 1 : Introduction

Bertrand Fourcade  
Bertrand.Fourcade@ujf-grenoble.fr

3 mai 2010

## Physical approaches to cell mechanics and cell signalization

Living systems offer the best collection of nano-machines which work under extremal conditions :

- 1 Work at a scale where Brownian noise dominates
- 2 Work at a scale where initial forces play a minor role
- 3 Work at a scale where fluid motion is not chaotic (low Reynolds limit)
- 4 Work with remarkable efficiency

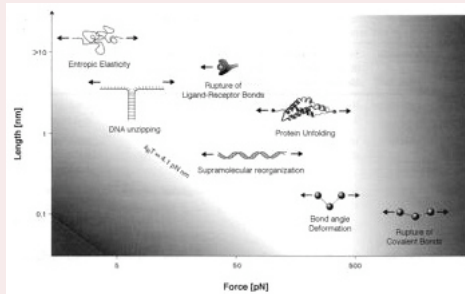
## Conclusion

Cells seen as the smallest integrated living systems use efficient strategies. These strategies are based on biochemical and physical principles. A truism ? biochemistry is stress dependent. There are new experimental approaches to **quantify** collective properties of these molecular "mecano". Here we introduce these experimental techniques through biological examples.

## Outline

- ❶ Chapter 1 : The 4 molecular plans of living systems illustrated by examples of physical and experimental approaches. Examples of constraints at the molecular scale. Force scale and time scales appropriate to living systems.
- ❷ Chapter 2 : Chemical and biochemical networks. How are they organized?
  - ❶ in time (non-linear effects, switch, robustness, fast and slow variables separation ...)
  - ❷ in space (reaction-diffusion, mobile boundaries ...)
- ❸ Chapter 3 :
  - ❶ Brownian movement
  - ❷ Molecular motors
  - ❸ Physical Ratchets
  - ❹ Single molecule experiments. Force spectroscopy.
- ❹ Chapter 4 : Polymers and Biopolymers. From entropy to twist and curvature. Dynamic 1d self-assemblies. Polymerization versus depolymerization.
- ❺ Chapter 5 : 2d self-assemblies. Membrane, bending, adhesion. From passive adhesion to active adhesion.

## Forces are used to probe chemical bonds



## Conclusion

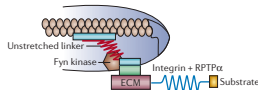
Mechanical forces have compatible strength with chemical forces (and thermal forces).



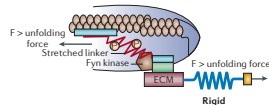
Mechanical forces are compatible with internal forces which trigger biochemical reactions. Ex. Cell substrate contact area.

**Initial adherence** cannot resist to mechanical forces larger than  $2\text{pN}$ . Typical time scale is  $1\text{mn}$ .  
**Stage 2**: If the substrate is sufficiently rigid, new proteins are recruited (vinculin). This will reinforce the mechanical connection to  $5\text{nN}$ . **Stage 3**: Fusion and maturation of the focal complexes. the mechanical resistance to an external stress is now increased by a factor 7.

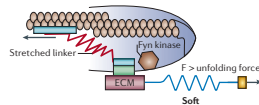
a Rigid or soft surface, resting state



b Rigid surface, linker phosphorylated



c Soft surface, linker not phosphorylated

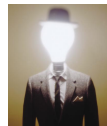


**Figure 4 | Mechanisms of rigidity sensing.** These panels illustrate the position-dependent mechanism of rigidity sensing. **a** | The crucial feature in such a model is that the enzyme, Fyn, and the substrate to be activated by stretch (kinase and substrate in this example) move relative to one another by actin rearward transport. **b** | If the surface is hard, the components would be close enough for modification to occur (causing small displacement). **c** | If the surface is soft, then enzyme and substrate would be separated before force could activate the reaction (in this case phosphorylation of the linker; causing large displacement). Contractile activity in a soft tissue could make it seem hard, because an external pull on the integrin before it moves significantly will cause unfolding while the substrate and enzyme are still close together. A time-dependent mechanism would be similar except that activity, rather than position, would be force-dependent with a biphasic response. The velocity of the cytoskeleton contraction would define the time window of the relevant activity in that model. We feel that position-dependent mechanisms are more robust. ECM, extracellular matrix; F, applied force; RPTP $\alpha$ , receptor-like protein tyrosine phosphatase- $\alpha$ . Figure modified, with permission, from REF. 30 © (2006) The Biophysical Society.

Système	Taille	Vitesse	Force	Fonction et intérêt
Polymères	$> 10 \text{ nm}$		$2 - 3 \text{ pN}$	Élasticité entropique
ADN	$2 \text{ nm}$		$2 - 3 \text{ pN}$	Séparation des deux doubles brins
Ligand-récepteur	$10 \text{ nm}$		$50 \text{ pN}$	Liaison chimique non-covalente
Assemblages supramoléculaires	$10 \text{ nm}$		$100 \text{ pN}$	Organisation fonctionnelle
Protéines	$20 \text{ nm}$		$300 \text{ pN}$	Repliment des protéines
Macromolécules	$0.5 \text{ nm}$		$> 600 \text{ pN}$	Liaison covalente
Moteurs moléculaires	Taille du moteur			
(a) Myosine (actine)	$20 \text{ nm}$	$3 \cdot 10^{2-4} \text{ nm s}^{-1}$	$10 \text{ pN}$	Contraction et transport
(b) Kinésine (microtubule)	$6 \text{ nm}$	$800 \text{ nm s}^{-1}$	$6 \text{ pN}$	Mitose
(c) RNA polymérase	$15 \text{ nm}$	$5 \text{ nm s}^{-1}$	$25 \text{ pN}$	Transcription
(d) Flagelle	$45 \text{ nm}$	$300 \text{ rps}$	$500 \text{ pN nm}$	Propulsion
(e) $F_1$ -ATPase		$8 \text{ rps}$	$100 \text{ pN nm}$	Synthèse de l'ATP

# The cost of living

$$12 \text{ kcal/Mol} = 8 \cdot 10^{-20} \text{ J/molecule} = 0.5 \text{ eV} = 20 k_B T$$



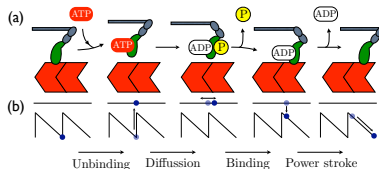
➤ Intracellular conditions

Conditions cellulaires:  
 $[ATP] = 1-2 \text{ mM}$   
 $[ADP] = [AMP] = 0, 1-0, 2 \text{ mM}$   
 $[P_i] = 10-50 \text{ } \mu\text{M}$   
 $[Mg^{2+}] = 1-10 \text{ mM}$

$Mg^{2+}$  ions bind to polyphosphates

$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i + H^+ \quad \Delta G \approx -12 \text{ kcal/mole}$   
 $ATP + H_2O \rightleftharpoons AMP + PP_i + H^+ \quad \Delta G \approx -12 \text{ kcal/mole}$   
 $PP_i + H_2O \rightleftharpoons 2 P_i + H^+ \quad \Delta G \approx -12 \text{ kcal/mole}$

$$\Delta G = \Delta G_0 - RT \ln \left( \frac{[ADP]_i [P_i]_i}{[ATP]_i} \right)$$



ATP hydrolysis supplies energy (Cf. ratchets) : **ATP** and **GTP** are used for energy supply.

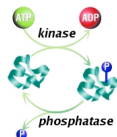


FIG.: Phosphorylation and dephosphorylation for reaction networks

## 4 molecular plans

There are 4 molecular basic plans used to construct these nano-machines. Lead to different types of (dynamic) self-assembled system with different properties :

- 1 Nucleic acids (molecular biology)
- 2 Proteins (cell biology)
- 3 Lipids (biochemistry)
- 4 Other (ex. sugar, polyglycans, glycocalyx, collagen, fibronectin) How cells sense their environments.

We review them and outline remarkable examples of new experimental approaches.

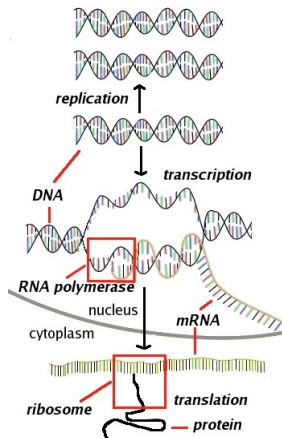
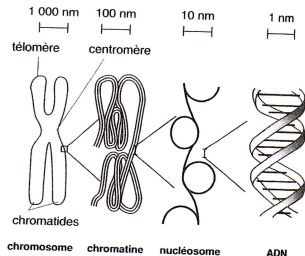


# Nucleic acids

## Molecular Approach : DNA and RNA

- 1 DNA : storehouse for genetic information
- 2 mRNA : temporary carrier of this information

Small chemical differences (the sugar has an extra oxygen and the thymine base is replaced by uracil). Not a big deal, but the oxygen makes RNA a little bit less stable than DNA.



# To manipulate, use optical tweezers (also AFM)

$$\lambda \gg R \text{ or } \lambda \ll R? \quad (1)$$

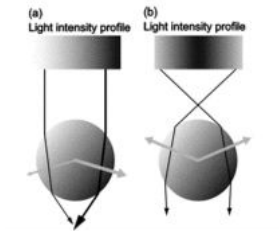


Schéma de principe du piège optique dans l'approximation de **Mie** : le rayon de la sphère est beaucoup plus grand que la longueur d'onde et l'optique géométrique s'applique[?]. The bead is not exactly at the focal point (just below).

In the other limit where  $\lambda \ll R$  (**Rayleigh's** regime) the bead is approximated as a dipole. If  $I_0$  is the intensity

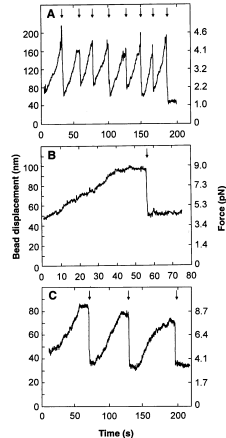
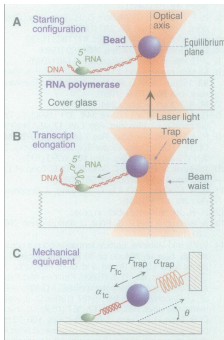
$$\mathbf{F}_{\perp} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0 \quad (2)$$

où  $\alpha$  définit la polarisabilité de la sphère ( $m$  est le rapport des indices de réfraction de la bille,  $n_p$ , sur celle du milieu,  $n_m$ )

$$\alpha = n_m^2 R^3 \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (3)$$

# Transcription against force, Gelles, 1995

What is the force produced by a single enzyme (RNA polymerase) along a DNA template?



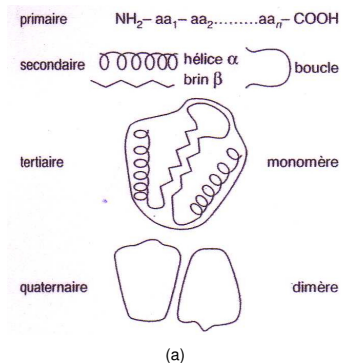
**Fig. 2.** Time courses for displacement from the trap center and the corresponding optical force applied to single beads driven by translocation of an RNA polymerase molecule along DNA. Force scales (right-hand axes) are nonlinear (14). The zero of the time axis is arbitrary. Reactions were conducted at 1 mM NTPs with 0.001 mM (A) or 1 mM (B and C) PP at laser powers of 25 (A), 82 (B), or 99 (C) mW. Vertical arrows designate times at which the trap was repositioned to reduce the optical force. An irreversible stall is shown in (B), and reversible stalls (first two stalls) and an irreversible stall (third stall) are shown in (C).

## Molecular Approach

- 1 Chemical Enzymes (Chemical reaction networks - system biology)
- 2 Structures - Cytoskeleton (mechanics and signalization)
- 3 Molecular motors (Brownian ratchets)



# What is a protein ?



**FIG.:** Schéma des niveaux hiérarchiques impliquant différentes structures pour une protéine typique. La structure tertiaire protège un ion du milieu extérieur. Un changement de conformation de cette structure expose cet ion au solvant, ce qui peut rendre la protéine active du point de vue de la réaction chimique.

Mouvement	Échelle de temps caractéristique (en unité logarithmique)
Vibration moléculaire	-14 à -13
Transfert d'un proton	-12
Lien hydrogène	-12
Vibration élastique d'une région globulaire	-12, -11
Flexion d'une charnière à l'interface de deux domaines	-11 à -7
Réarrangement des molécules d'eau	-8
Formation Hélice-Pelote	-8 à -7

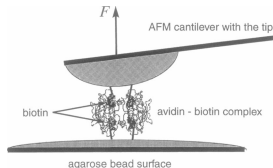
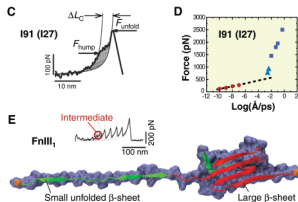
Une protéine possède plusieurs niveaux de structure qui provient de son repliement dans l'espace (voir Fig. 2). Ces structures lui confèrent une fonction particulière. En augmentant le niveau de résolution, on distingue en particulier :

- 1 la structure primaire des acides aminés qui sont des molécules du type  $\text{NH}_2\text{-aa}_1\text{-aa}_2\text{-...-aa}_n\text{-COOH}$  et qui diffèrent du groupement de la chaîne latérale branchée sur l'atome de carbone central. Cet assemblage est dû à liaisons chimiques fortes qui sont appelées liaisons **peptidiques**.
- 2 La structure secondaire faite d'hélices  $\alpha$ , de feuillets  $\beta$  et de boucles plus flexibles. Ces structures sont généralement stabilisées par des liaisons pont-hydrogène.
- 3 Enfin, la structure tertiaire où l'ensemble se replie en forme de globule. Cette structure est stabilisée par des forces faibles comme les liaisons pont hydrogène ou les interactions de Van de Waals. Mais les forces ioniques ou même covalentes peuvent jouer un rôle. Chacun de ces globules forme des mères qui s'associent en di, tri etc. mères pour former la structure quaternaire. Cette dernière structure est dynamique et peut adopter **différentes configurations**.

## Remarques

- Le poids des protéines est exprimée en Dalton (Typiquement, 200 kDa).
- 1000 à 10000 différentes protéines dans un cellule.
- Les séquences des protéines sont définies par des gènes.
- L'expression des protéines est contrôlée par des facteurs de transcription et par la structure fine des gènes.
- Les interactions protéines - protéines sont à courte portée.
- Les interactions sont spécifiques.
- La conformation des protéines est spécifique.
- Les protéines sont flexibles.
- Elles sont instables et biodégradables.

# Unfolding Titin using AFM cantilever tip



## Conclusion

- 1 A peak in the force-distance curve corresponds to the unfolding of a domain
- 2 The characteristic force at which the domain unfolds depends on the **loading rate**. This is due to thermal fluctuations (see later on)

# Optical microscopies at the limit

- 1 Fluorescence microscopy
- 2 FCS, FRAP, FRET to analyse reaction kinetic
- 3 Beyond the diffraction limit



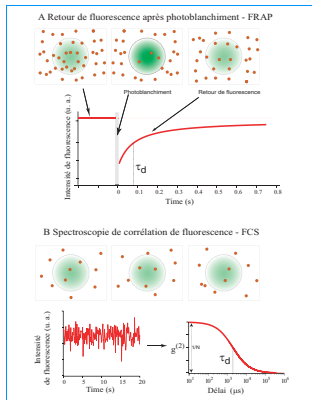
Note that the chromophore is in the center (thus very stable)

# GFP : the green revolution

Back to 1994. **Fluorescent protein** (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* can be used as a marker for protein localization and expression in living bacteria and worm cells (Nobel prize in chemistry in 2008). Today, fluorescent proteins are available in many colors and some of them can photo-activated (PA-GFP) or photoconverted (Kaede).



- 1 **Fluorescence Correlation Microscopy** (FCS) detects stochastic movements of fluorophores in and out of a focused laser beam. It is used to measure the kinetics of biological reactions, diffusion and flow. Today, Fluorescence Cross-Correlation Microscopy (FCCS) measures protein interaction.
- 2 **Fluorescence Recovery After Photobleaching** (FRAP) is a robust technique which allows to measure the recovery curve of photobleached samples by lateral diffusion. It is used to study traffic among the cell compartments.



**Figure 1** – Principes du FRAP et de la FCS. Ces deux méthodes utilisent un laser pour éclairer une petite région de la membrane (en vert) et collectent la fluorescence de molécules marquées (en rouge) à l'aide d'un montage confocal. D'après Marguet *et al.* 2006. Dynamics in the plasma membrane - How to conciliate fluidity and order. Embo. J., sous presse.

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t)^2 \rangle} \quad (4)$$

If simple brownian diffusion :

$$g^2(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_d} \quad (5)$$

Where  $N$  is the number of molecules. We have

$$\tau_d = \frac{w^2}{4D} \quad (6)$$

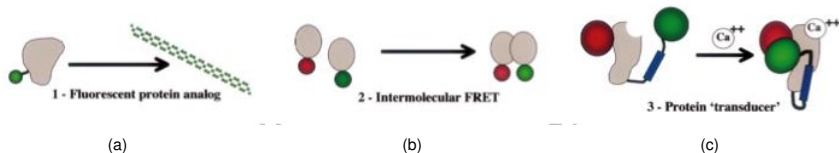


# FRET (Förster Resonance Energy Transfert)

Excitation energy can be transferred from a donor fluorophore to an acceptor chromophore in **close** proximity with an efficiency scaling as

$$e \propto 1/d^6 \quad (7)$$

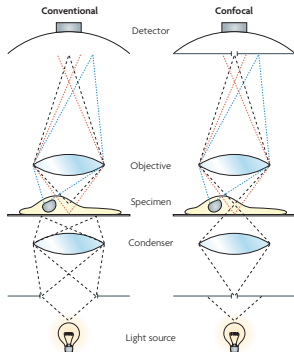
→ suited to imaging protein-protein interaction.



**FIG.:** Les différentes stratégies d'utilisation du FRET [?]. En (a), les protéines étiquetées par la G.F.P. peuvent être introduites dans la cellule, ce qui permet de les suivre en temps réel. En (b) on utilise le transfert d'énergie entre les deux molécules pour savoir si elles interagissent. En (c) un ligand et un récepteur se lient en présence de calcium. Le FRET est alors utilisé pour connaître la concentration de ligands et récepteurs qui sont liés.

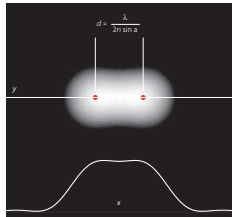
# Light microscopy at the limit

Confocal microscopy has been one of the milestones of the last century (see also bi-photon microscopy also)



In a conventional microscope (left), a large region of the specimen is illuminated by the light source and condenser. The detector forms an image from both the in-focus light (black lines) and the out-of-focus light (red and blue lines). Conversely, a confocal microscope (right) restricts both the illumination and the light that can reach the detector by introducing two pinholes, so only the in-focus light is detected (black lines). Adapted, with permission, from Spector D. L. & Goldman, R. D. Basic Methods in Microscopy (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2006).

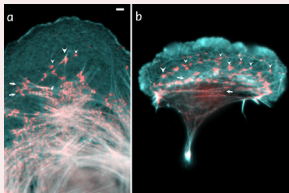
## Below the limit of diffraction



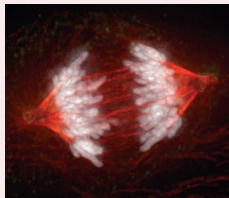
Blurred by diffraction, the image of two point objects (red) can just about be resolved at distance  $d$ . Line profile (bottom) quantifies the brightness along the direction of separation. Diagram courtesy of S. Hell, MPI Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany.

# Fluorescence microscopy and the cytoskeletons

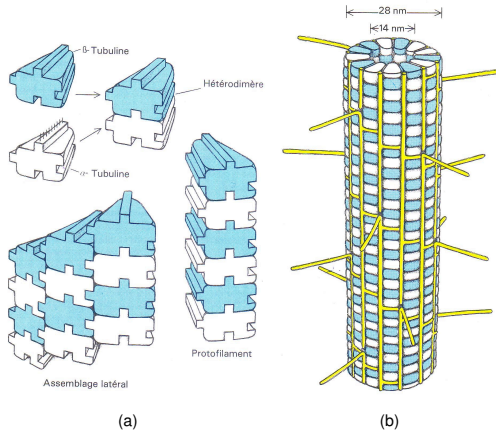
## The actin cytoskeleton: ATPase



## The microtubule cytoskeleton : GTPase

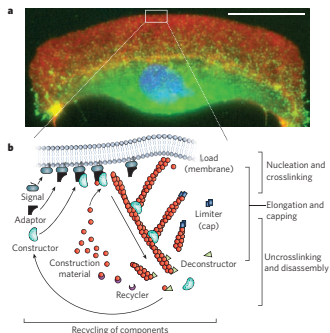


Chromosomes (white) segregated by microtubules (stained with anti-tubulin, (red)), illustrating the dynamics of mitosis that Inoue deduced from the birefringent observation of spindle fibres. Courtesy of Z. Yang and C. L. Rieder, Wadsworth Center, Albany, NY, USA.



**FIG.:** Tubuline is a GTPase. Microtubules are **much more rigid** than actin filaments.

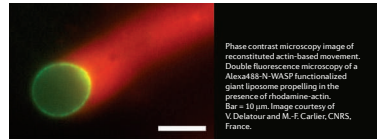
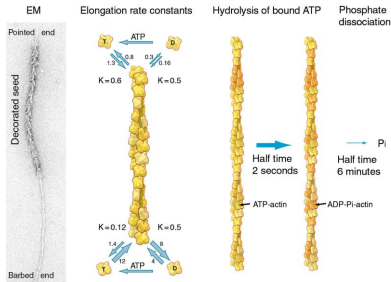
# Cell motility involves subtle polymerization-depolymerization processes



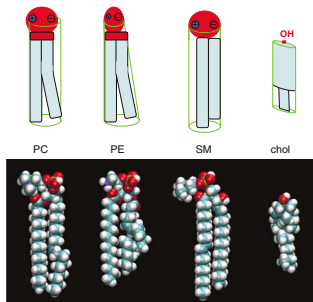
# Artificial Motility : Mimicking Listeria

Actin is a dynamic polymer able to polymerize because of activation centers located near the membrane. Polymerization is an active phenomenon (needs ATP)

Today, reconstituted systems (here a vesicle coated with polymerizing centers) allow to study listeria like propulsion

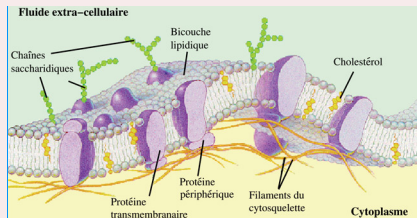


# Lipids: Molecular Approach



Structure des phospholipides usuels. La structure est plus ou moins cylindrique et a taille des têtes polaires varie en passant de PC (phosphatidylcholine), PE (phosphatidylethanolamine) dont la forme est plutôt conique, et SM (sphingolipid sphingomyelin) qui a une grande affinité pour le cholestérol (d'après Ref. [?]).

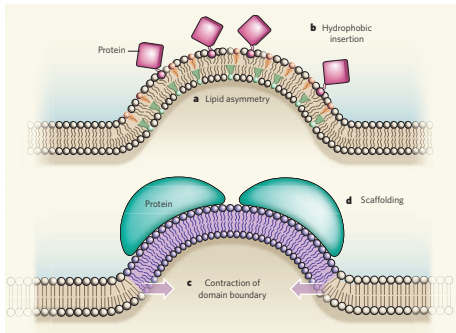
## Fluid Mosaic model



**Figure 1** – Schéma de la membrane plasmique, avec ses composants évoqués dans le texte. La bicouche a une épaisseur de l'ordre de 5 nm. D'après Greg Geibel, [http://sun.menloschool.org/~cweaver/cells/c/cell\\_membrane/](http://sun.menloschool.org/~cweaver/cells/c/cell_membrane/).

## Rafts

Existence of **rafts** (1988, Simons and Van Meer, micro-domains  $\simeq 30$  nm): platform for signalization. Proven but origin ?



**Figure 1 | Mechanisms of bending in lipid bilayers.** **a**, Lipid asymmetry. This occurs when each monolayer is enriched with lipid molecules of different shapes (such as the orange and green molecules shown) and/or when one monolayer contains more lipid molecules than the other. **b**, Proteins cause membrane asymmetry by inserting their hydrophobic domains into one side of the bilayer. **c**, When bilayer matrices contain domains consisting of different lipid phases (such as the ordered (brown) and disordered (purple) regions shown), the boundaries between the domains tend to contract, causing the intervening region to bend. **d**, Finally, proteins bound to the bilayer can act as scaffolds that force curvature on the membrane. Yu *et al.*<sup>2</sup> report a synthetic model of membranes in which both hydrophobic insertion and domain-boundary contraction bring about bending.

Courber la membrane requiert une énergie de l'ordre de  $20 k_B T$ . Ici mécanismes qui permettent de courber une membrane fluctuante pour faire des sphérules ou des tubes → systèmes reconstitués. There are now evidences that there are proteins which can **sense** the curvature (see Antony)





# Physical constraints

- 1 Low Reynolds Number Fluid Mechanics
- 2 Thermal effect : Brownian motion

# Life at low Reynolds number

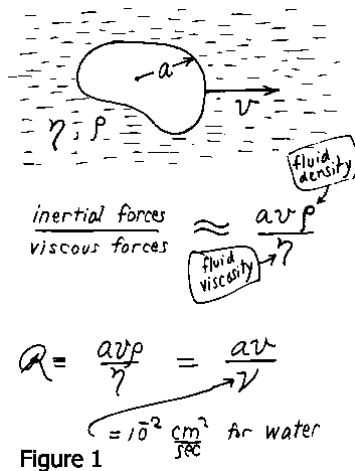


FIG.: Importance de la viscosité (prédictions  $\Rightarrow$  ordre de grandeur?!)

## Ordres de grandeur

- $\eta_{\text{eau}} = 10^{-2} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- $R \simeq 10^{-2}$  sperm
- Sang  $\simeq 10^2$  (aorte  $10^3$ )
- Vous (et moi)  $10^6$
- Pétrolier  $> 10^{10}$

## Conclusion

Le mouvement du fluide n'a **rien** à voir avec notre expérience quotidienne. Inertie est totalement non pertinente. Nage est très majestueuse

## Petit problème

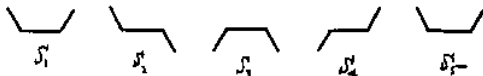
Soit objet taille  $L$ , densité  $\rho$  soumis à  $F$ . À  $t = 0$  on a  $F = 0$ , longueur d'arrêt ?

$$\frac{d^2x}{dt^2} - 6\pi \frac{\eta \rho_w L}{\rho_p L^3} \frac{dx}{dt} = 0$$

- Bactérie :  $\Rightarrow$  temps caractéristique  $\mathcal{R} \times \frac{\text{taille}}{\text{vitesse}} \simeq 10^{-6}$  ( $d < 1\text{\AA}$ )
- Pétrolier  $10^5 \text{ km}$  (hum ... ne jamais écrire cette loi pour un objet macroscopique, car turbulence)

$$\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v} = \cancel{\rho \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t}} + \cancel{\rho (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}} = 0 \quad (8)$$

**Conséquences :** Le temps n'intervient pas de façon explicite et symétrie  $t \rightarrow -t$ . Les équations sont identiques si l'on renverse le signe du temps de tel sorte que des mouvements avant et arrière ont des effets strictement opposés. On ne peut pas nager avec un seul degré de liberté, car ce que l'on gagne sur un 1/2 cycle est perdu au cours du 1/2 cycle suivant. Il faut **2** degrés de liberté (2 bras !) et parcourir un cycle



## Diffusion versus mélange

- 1 Temps caractéristique de mélange à vitesse  $v$  sur une distance  $l$ :  $\frac{l}{v}$
- 2 Temps caractéristique lié à la diffusion ( $D \simeq 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ):  $\frac{l^2}{D}$

**Conséquence** : le temps caractéristique lié à la diffusion est beaucoup plus petit que le temps caractéristique lié au mélange. Mélanger ne sert à rien, il suffit d'attendre pour manger. Pourquoi bougent-elles alors ?

# Vesicles under shear flow (A. Viallat, M. Abkarian)

## Near a wall (fluid is moving from left to right)

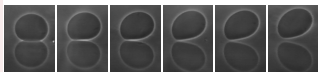


Figure 6: Unbinding of a vesicle in a shear flow. The lowest image is the reflection on the substrate. From left to right, each picture is taken at increasing shear rates: 0, 0.09, 0.14, 0.23, 0.32,  $0.36 \text{ s}^{-1}$ ,  $R=36, 9 \mu\text{m}$ ,  $\nu = 0.98$

## Tankthreading (fluid is moving from left to right)

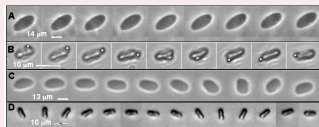


Figure 1 : Vesicles and red blood cells in shear flow. A : tanktreading vesicle, viscosity ratio  $c = \eta_p/\eta_o = 1$  ; B : rotation of a bead (diameter  $1 \mu\text{m}$ ) stuck on the membrane of a tanktreading RBC with  $c = 1/47$ , shear rate :  $6 \text{ s}^{-1}$ ; C : tumbling vesicle with  $c = 8$  ; D : tumbling RBC with  $c = 1/47$ , shear rate :  $0.8 \text{ s}^{-1}$

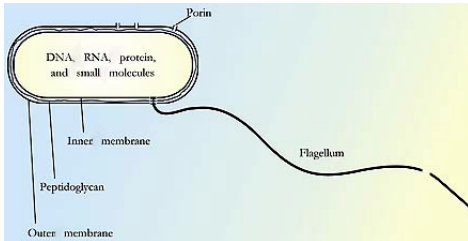
# Life at low Reynolds number : le rêve des nanotechnologies

## De Howard Berg (Physics Today, janvier 2000)

« *E. Coli*, a self-replicating object only a thousand millimeter in size, can swim 35 diameters a second, taste simple chemical in its environment, and decide whether life is getting better or worse. »

- Vit dans nos estomacs (désolé ...sorry).
- 4286 gènes  $\simeq 1\mu m$  diamètre (H. sapiens  $\simeq 25000$ )
- Présence de flagelles ( $\Rightarrow$  Motiles sauf mutants sans flagelle)
- vitesse = 60 fois sa longueur en 1 seconde ( $\gg$  tous animaux macroscopiques !)

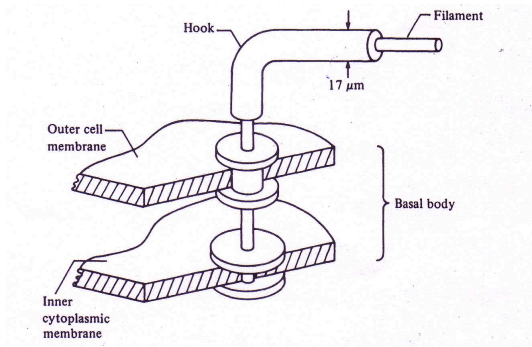




(a)



(b)



(c)

## *E. Coli*

Lorsque la rotation des flagelles a lieu dans le sens horaire, les filaments forment une tresse et la rotation des flagelles entraîne un mouvement continu de la bactérie vers l'avant. Au contraire, lorsque les moteurs tournent dans le sens anti-horaire, les mouvements des flagelles ne sont plus coordonnés et la bactérie a un mouvement de culbute qui lui permet de changer de direction.

Le mouvement des moteurs est dû à un **flux** de protons de l'extérieur vers l'intérieur. Une rotation nécessite environ 1000 protons et celle-ci est assurée par un corps basal enfoui sous la membrane plasmique.

Tout comme les machines rotatives artificielles, le corps basal est constitué d'anneaux externes qui jouent le rôle de stator et qui permettent de stabiliser l'ensemble, alors que la rotation est assurée par des anneaux internes qui jouent le rôle de rotor. Une quarantaine de gènes sont requis pour l'assemblage de cette machine moléculaire.