

El sorollós i meravellós món molecular de la biologia

Fèlix Ritort

Small Biosystems Lab, Departament de Física de la Matèria Condensada, Universitat de Barcelona.

Correspondència: Fèlix Ritort, Small Biosystems Lab, Departament de Física de la Matèria Condensada, Facultat de Física, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona. Adreça electrònica: ritort@ub.edu

DOI: 10.2436/20.1501.02.175

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (ed. digital): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 10/02/2018

Acceptat: 02/05/2018

Resum

En el camp molecular, la biologia és intrínsecament sorollosa. Les forces que regulen els milions de reaccions moleculars són petites, de l'ordre de piconewtons (10^{-12} newtons), i tot i això les reaccions se succeeixen en la seqüència adequada per fer possible la vida. Entendre com això és possible és una de les qüestions més fonamentals que els biofísics voldríem entendre. Els experiments realitzats amb molècules individuals ofereixen l'oportunitat d'aprofundir en les lleis fonamentals que fan sorgir la complexitat biològica en un món dominat per la segona llei de la termodinàmica. Tècniques com l'espectroscòpia de força, la fluorescència, la microfluidica, la seqüenciació molecular i els estudis computacionals, entre d'altres, projecten una visió del món biomolecular governada per la lluita desfermada entre les forces desorganitzadores degudes al moviment tèrmic i l'impuls còsmic de l'evolució. En aquest article aprofundirem en algunes de les evidències que donen suport a aquest punt de vista, així com en el paper de la informació física en la biologia.

Paraules clau: biofísica, experiments de molècula individual, física del no-equilibri, teoria de la informació.

Abstract

At the molecular level biology is intrinsically noisy. The forces that regulate the myriad of molecular reactions are tiny, on the order of piconewtons (10^{-12} Newtons), yet they proceed in concerted action making life possible. Understanding how this is possible is one of the most fundamental questions biophysicists would like to understand. Single molecule experiments offer an opportunity to delve into the fundamental laws that make biological complexity surface in a physical world governed by the second law of thermodynamics. Techniques such as force spectroscopy, fluorescence, microfluidics, molecular sequencing, computational studies among others project a view of the biomolecular world ruled by the conspiracy between the disorganizing forces due to thermal motion and the cosmic evolutionary drive. Here we will digress on some of the evidences in support of this view and the role of physical information in biology.

Keywords: biophysics, single-molecule experiments, nonequilibrium physics, information theory

Aquest article està escrit en memòria de Jorge Wagensberg, que va morir el 3 de març del 2018 a l'edat de 69 anys. El doctor Wagensberg va ser un científic i filòsof inspirador que va veure en la ciència i l'art la bellesa de la natura i el coneixement. El seu amor per totes les expressions de la humanitat intel·lectual continuarà essent font d'inspiració i llegat per a futures generacions de científics.

Biologia, física i tot plegat

El 1944 Erwin Schrödinger va publicar un inspirador assaig titulat *Què és la vida?* en què deia (Schrödinger, 1944): «La gran, important i àmpliament discutida qüestió és: com podem explicar a través de la física i la química els esdeveniments espacials i temporals que tenen lloc dins els límits d'un organisme viu?». Acceptem que els organismes vius no violen les lleis fonamentals de la física. No obstant això, els éssers vius són estranys. Com va dir el químic Addy Pross (Pross, 2012), sembla com si els éssers vius eludissin o fessin mofa de les lleis tal com les entenem. Una pedra caurà per gravetat si la deixem caure, però un ocell volarà sempre que ho vulgui. Els biòlegs han inventat un terme (*teleonomia*) per expressar el

fet fonamental que els éssers vius tenen els seus propis plans. Amb això els biòlegs volen dir que els éssers vius es mouen, salten, juguen, mengen, es reproduïxen, planifiquen, negocien, compren, investiguen, etcètera. La biologia abasta totes les escales possibles de mida i temps, des de molècules fins a cèl·lules, teixits, òrgans, comunitats i ecosistemes, etcètera, i des de temps molt antics (tal com testimonien els registres fòssils) fins al present. La biologia, per tant, no és tan diferent de la física, les lleis de la qual prevalen en totes les escales temporals i espacials. La universalitat, això és la recerca d'uns quants principis fonamentals que unifiquen els fenòmens més diversos, ha estat el principi bàsic de les ciències experimentals que ha fet possible el progrés de la humanitat. Normalment, els fenòmens fisicoquímics més diversos es poden explicar apel·lant a tan sols un grapat de lleis universals de la física (per exemple, les lleis de conservació o la segona llei de la termodinàmica). De manera similar, els processos biològics més diversos es poden explicar de manera recurrent amb mecanismes similars, o fonamentalment idèntics. Però hi ha una diferència. La meravellosa complexitat de la matèria viva es troba lluny de ser tan sols una interacció simple o casual de

les lleis de la física i la química. Per justificar la impressionant complexitat dels éssers vius es recorre sense excepció al terme d'*evolució biològica*. El dilema de l'ou o la gallina plana damunt de tots els aspectes de la biologia, en la mateixa mesura que la teleonomia. En contrast, en física no trobem conceptes equivalents als de l'ou o la gallina i la teleonomia, ja que les observacions poden ser explicades i predites a partir d'un grapat de lleis fonamentals.

La biologia és reconeguda com la ciència natural dedicada a l'estudi de tots els aspectes dels organismes vius. No és cap exageració afirmar que tradicionalment la física ha evitat estudiar la qüestió dels éssers vius. Deixant de banda la seva aparent complexitat, a la matèria viva se l'ha considerada igual a la matèria ordinària. Sovint s'atribueix als químics del segle XIX el reconeixement de la importància d'entendre la matèria viva, cosa que dona peu a una nova disciplina: la bioquímica. Tanmateix, conceptes com espai, temps, força o energia no són només quantitats fonamentals en física, sinó que també són centrals en biologia. La biofísica ha emergit com la disciplina que aplica els conceptes i les tècniques de la física a l'estudi dels éssers vius. D'aquesta manera, tècniques usades en física, com la difracció de

raigs X, la ressonància magnètica nuclear, i la microscòpia electrònica, entre d'altres, han contribuït a revolucionar la biologia. En els darrers temps som, però, testimonis de la tendència oposada: els físics utilitzen sistemes biològics com a models físics inspiradors per contrastar i analitzar noves teories físiques (Bialek, 2012). Un exemple d'aquesta nova tendència són els experiments amb molècules individuals (Ritort, 2006) en què molècules d'origen biològic es manipulen individualment mentre se'n mesura la força exercida (Quadre 1).

La matèria biològica està intrínsecament fora d'equilibri, i les forces intra i intermoleculars en determinen l'estabilitat termodinàmica i cinètica. Les energies típiques implicades en els processos de remodelació cauen en l'escala de baixa energia de l'ordre $k_B T$ ($1k_B T \approx 4 \cdot 10^{-21}$ joules en condicions estàndard, $T = 298$ °K). Aquest és també el nivell del soroll tèrmic o brownià determinat per l'energia cinètica mitjana de les molècules d'aigua quan es mouen lliurement en medis aquosos (Quadre 2). En els darrers anys s'han produït nombrosos avenços en l'estudi físic del no-equilibri en sistemes petits, és a dir, en sistemes on la magnitud de les forces d'interacció febles i les forces brownianes presents són comparables (Bustamante *et al.*, 2005; Ritort, 2008). Això ha portat a una fructífera transferència i fertilització creuada de conceptes teòrics i mètodes experimentals entre la física i la biologia. Molts físics han emprès l'estudi de l'estat de no-equilibri més sorprenent en la naturalesa: la matèria viva. És en la matèria viva on els científics reconeixen l'energia, l'entropia i la informació com els tres principals eixos motors de la natura. Mentre els processos termodinàmics en la matèria ordinària estan controlats per la minimització de l'energia lliure (és a dir, la competició entre energia i entropia), la matèria viva sembla estar predominantment governada per fluxos d'informació a través de tots els nivells organització i estratificació (des de molècules a cèl·lules, teixits, òrgans, organismes...). En aquest article es tracten els aspectes esmentats de la matèria viva des del punt de vista del físic. Hi sostinc que és necessari un nou avenç en conceptes físics fonamentals per tal d'aconseguir una comprensió satisfactòria de la matèria viva i la vida en general.

La matèria viva és heterogènia i plàstica

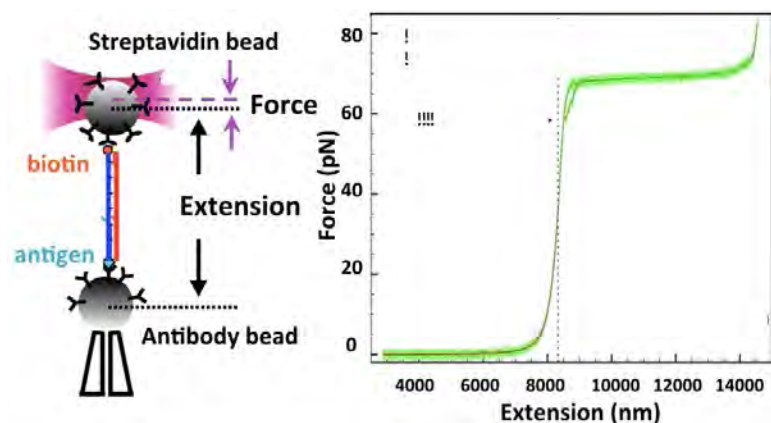
La matèria biològica és intrínsecament tova. L'estabilitat termodinàmica la hi donen forces

moleculars dèbils (electroestàtica, hidrofòbica...). A més a més, les energies típiques que intervenen en processos de remodelació cauen en el rang d'energia de $k_B T$, al nivell de les fluctuacions de soroll tèrmic. Això vol dir que la matèria viva està sotmesa a fortes fluctuacions degudes al fet que les magnituds de les forces dèbils d'interacció són comparables a les forces brownianes presents en medis aquosos. Aquesta característica distingeix la matèria biològica de la matèria ordinària, i fa de la primera un terreny ideal per investigar els fenòmens físics fora de l'equilibri.

Una característica principal de la matèria viva comparada amb la matèria inanimada és la seva gran complexitat. Es pot considerar les cèl·lules com petites bossetes plenes de diferents tipus de molècules que interactuen a través d'una infinitat de vies reguladores. Aquesta complexitat és diferent al que podem

observar, per exemple, en una gota d'aigua. Hi ha dos aspectes fonamentals de la matèria viva que la fa única als ulls d'un físic. Les poblacions biològiques són fonamentalment heterogènies i plàstiques. Què signifiquen aquestes paraules? Parlem primerament d'heterogeneïtat. Les variacions fenotípiques i genotípiques entre individus d'una determinada població mono específica són la norma. Una població de cèl·lules de la mateixa soca és intrínsecament heterogènia, la qual cosa fa que els experiments no sempre siguin reproduïbles: la mateixa tensió, les mateixes condicions ambientals, el mateix «tot» sovint produeix resultats diferents. A escales biològiques més grans, el desenvolupament imprevisible de les malalties evolutives en organismes (per exemple, el càncer), són un exemple prominent que mostra el paper principal de l'heterogeneïtat en cèl·lules i teixits. Les conseqüències de l'hete-

.....
 Quadre 1. Experiments amb molècules individuals. «Agafa una única molècula d'ADN i estira'n els extrems, mesurant a la vegada la corba entre l'extensió i la força fins que estigui completament redreçada.» Aquesta idea experimental, que era un somni fa només unes dècades, és ara mateix un experiment rutinari en molts instituts de recerca d'arreu del món. Marcant els extrems d'una molècula d'ADN amb grups químics específics (biotina, avidina, digoxigenina), és possible ancorar una única molècula d'ADN entre dues superfícies. Movent una superfície respecte de l'altra, i usant-ne una com a sensor de força, és possible mesurar la corba de força-extensió en biopolímers individuals, des d'ADN fins a ARN i proteïnes. Les pinces òptiques es basen en el principi de conservació del moment lineal pel qual un objecte microscòpic transparent (per exemple, una esfera de poliestirè o de sílici), amb un índex de refracció superior al medi circumdant, desvia un raig de llum entrant que exerceix una força neta sobre l'objecte. També es pot crear una trampa òptica per a la manipulació de molècules individuals enfocant un feix de raigs infrarojos a l'interior d'una cambra fluida, atrapant òpticament una esfera de mida micromètrica i mesurant o bé la llum desviada usant detectors sensibles a la posició, o bé la posició de l'esfera amb una càmera CCD o per interferometria de pla focal posterior. En els experiments dissenyats per estirar molècules s'usen unes manilles fetes amb una molècula unida a dues esferes (Figura 1, esquerra). En configuracions amb una sola trampa, una esfera s'immobilitza amb una pipeta per aspiració d'aire, l'altra es captura en una trampa òptica i es mesura la força exercida sobre la molècula. En moure la trampa òptica en relació amb la pipeta, podem registrar l'anomenada corba d'extensió-força. A la Figura 1 (dreta) es mostra una corba extensió-força obtinguda mitjançant l'estirament d'una molècula d'ADN de 24 kb. Aquests experiments s'utilitzen no només per mesurar les propietats elàstiques de biopolímers individuals (per exemple, la longitud de persistència o rigidesa de la flexió dels biopolímers), sinó també per desxifrar les reaccions moleculars més complexes, des del plegament de les proteïnes fins a reaccions enzimàtiques. També s'utilitzen per estudiar les propietats viscoelàstiques de cèl·lules individuals i, fins i tot, per contrastar teories físiques.



.....
 † Figura 1. (Esquerra) Configuració experimental d'un experiment d'estirament d'ADN. (Dreta) Corba d'extensió vs. força mesurada mitjançant l'estirament d'un únic ADN de 24 kb en condicions estàndard ($T = 298$ K i tampó Tris 1M NaCl). Es poden identificar almenys tres regims de força. Per forces inferiors a 10 pN l'ADN s'allarga contra les fluctuacions tèrmiques (règim entròpic); per forces entre 10 pN i 60 pN l'ADN s'estira per sobre de la seva longitud de contorn (8.3 μ m) (règim entàlpic). Per sobre de 65 pN l'ADN està sobreestirat en aproximadament un 70% de la seva longitud de contorn (règim de sobreestirament).

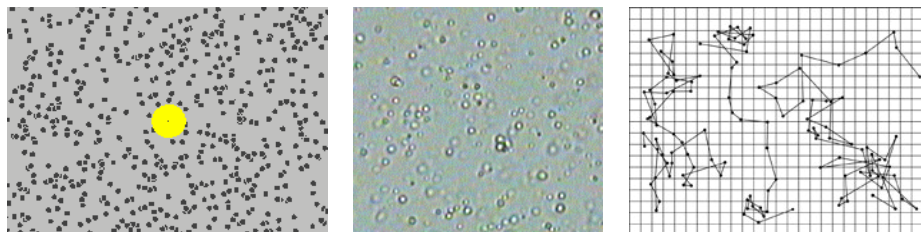
rogeïtat són tràgiques per al tractament del càncer: es desconeix si n' existeix una cura universal (Zhang i Austin, 2012).

L'heterogeneïtat no és només una característica de poblacions cel·lulars, sinó que també està present en totes les escales. A nivell molecular estructural, se sap que la mioglobina, la proteïna de transport d'oxigen en el teixit muscular dels vertebrats, es replega en un conjunt heterogeni de diferents estructures natives, totes elles funcionals per a l'enllaç amb l'oxigen (Austin *et al.*, 1975). El recent descobriment d'una multiplicitat d'estats nadius d'enzims d'ARN (Solomartin *et al.*, 2010), d'helicases de desenrotllament de l'ADN (Liu *et al.*, 2013) i la gran variabilitat observada d'anticossos policlonals evolucionats en el sistema immune (Thorpe i Brooks, 2007) són tan sols manifestacions del mateix fet fonamental.

La segona característica bàsica de la matèria viva és la plasticitat. La plasticitat té dues cares, amb característiques aparentment oposades: adaptabilitat (capacitat de canviar) i resiliència (capacitat de resistència als canvis). La vida i la matèria viva s'adapten als canvis ambientals intermitents i es resisteixen a les agressions continuades. Sota l'acció continuada de les forces remodelitzadores, les estructures biològiques han de ser prou estables per mantenir la seva integritat estructural (resilients) i, al mateix temps, suficientment malleables per adaptar-se a canvis ambientals importants (adaptabilitat). Si no són capaces de fer-ho, la funció biològica en resulta danyada. La plasticitat també és essencial en un context evolutiu on les mutacions (adaptabilitat) i l'amplificació dels individus millor adaptats (resiliència) condueixen a la diversificació i a noves poblacions més ben adaptades. La resiliència i l'adaptació són forces de caràcter oposat i ingredients essencials de la plasticitat de la matèria viva. Massa resiliència dificulta l'adaptació i massa adaptació inhibeix la resiliència. En el context evolutiu, es necessita un equilibri entre aquestes dues forces que es contraresten per garantir organismes de vida suficientment llarga que es reproduïxin a taxes prou altes per evitar l'extinció de les espècies.

La plasticitat està present en biologia a través de totes les escales de la vida: des de molècules i cèl·lules fins a teixits, òrgans, individus i fins i tot poblacions, societats i comunitats. Curiosament, aquests dos tipus de forces contràries (resiliència i adaptació) fins i tot estan presents en el món físic inanimat. Inserides en sorollosos entorns aquosos, les forces que sostenen la matèria biològica han de ser prou for-

Quadre 2. Moviment brownià. El 1827 Robert Brown, un botànic molt conegut per les seves descripcions detallades del nucli i el citoplasma de la cèl·lula i per les seves contribucions a la taxonomia de les plantes, va fer un important descobriment durant els seus estudis de pol·linització. Mentre examinava a través del microscopi el moviment dels grans de pol·len d'una planta suspesos en aigua, va observar que el moviment era erràtic i imprevisible, com si els grans estiguessin vius. Després del desenvolupament de la teoria atòmica a principis del segle xx, es va fer evident que el que Brown havia observat era l'efecte de les col·lisions estocàstiques o aleatòries de les molècules d'aigua contra els grans de pol·len. Colpejats per molècules d'aigua que provenen de totes direccions, els grans de pol·len, de mida molt més gran, es belluguen erràticament dins de la solució d'aigua. Aquest moviment erràtic ha rebut el nom de moviment brownià i és clau per a totes les reaccions moleculars (Figura 2). A principis del segle xx la teoria del moviment brownià va ser desenvolupada per Marian Smoluchowski a Cracòvia i Albert Einstein a Berna, de manera gairebé independent l'un de l'altre. Experiments posteriors a la dècada del 1920 realitzats per Jean Baptiste Perrin en partícules col·loïdals difusives va proporcionar-ne la prova final. Perrin va poder també extreure estimacions del nombre d'Avogadro utilitzant només mètodes físics, que van coincidir amb els obtinguts per mètodes químics.



† Figura 2. (Esquerra) Il·lustració del moviment brownià. Un gra de pol·len (cercle central, groc) envoltat per l'aigua (molècules d'aigua representades com petits punts negres). (Centre) Imatge confocal d'una solució col·loïdal. En solucions aquoses (fons gris), les partícules col·loïdals estan sotmeses al moviment brownià. Les molècules d'aigua no es poden veure. (Dreta) Trajectòries mesurades i dibuixades per Perrin de partícules de làtex en els seus experiments originals fa un segle. La constant de difusió D es pot estimar calculant el desplaçament quadrat mitjà de la posició. A partir de la viscositat de l'aigua η i de l'expressió per al coeficient de fricció pel cas d'una esfera, $g = 6 R\pi \eta$, es pot calcular el valor de la constant de Boltzmann k_B i el nombre d'Avogadro: $N_A = R/k_B$, essent R la constant dels gasos ideals.

tes perquè les molècules siguin estables i funcionals i, al mateix temps, prou febles per permetre'n la remodelació i adaptació. La coexistència d'aquestes dues característiques és possible en presència del moviment brownià, el soroll de fons degut al moviment erràtic de les molècules d'aigua en un ambient aquós (Quadre 2). En el moviment brownià operen dues forces contràries que cancel·len la mitjana: la col·lisió activa per molècules d'aigua en el gra de pol·len i la força de resistència per fricció experimentada pel gra quan es mou a través de l'aigua. L'intercanvi energètic entre el gra i el medi ambient segueix la regla «el que obtens és el que dones». L'energia cinètica mitjana subministrada al gra per les col·lisions d'aigua es perd en forma d'escalfament al medi ambient a causa de la fricció amb l'aigua. En física, aquest equilibri energètic es coneix com a relació Stokes-Einstein o, en termes més generals i tècnics, com a teorema de fluctuació-dissipació (Chandler, 1987). La relació Stokes-Einstein estableix que la constant de difusió del gra, D , és igual a la unitat d'energia tèrmica $k_B T$ dividida pel coeficient de fricció

γ , $D = k_B T / \gamma$. La constant de difusió D és una mesura de quant es mou del gra de pol·len en totes direccions. Per tant, és equivalent a l'adaptabilitat en biologia, a la facilitat per canviar de configuració o d'estat. En comparació, el coeficient de fricció γ és l'equivalent a la resiliència en biologia, és la resistència al moviment induït per les col·lisions del gra amb les molècules d'aigua de l'entorn circumdant.

La vida al llindar del caos

L'equilibri entre les forces d'adaptació i les de resiliència té una conseqüència visible en la matèria viva a escala molecular. Les forces biològiques fonamentals que regulen les interaccions a nivell intra i intermolecular operen al llindar del caos. Això vol dir que el nivell de soroll tèrmic i les energies estabilitzants de les macromolècules en els teixits són comparables i del mateix ordre, generalment de pocs kcal/mol, o $k_B T$ ($1 k_B T \cong 0,6$ kcal/mol a 298K). Aquest equilibri només es pot aconseguir mitjançant la compensació entre les forces entàlpiques i entròpiques, sovint coneguda com a compensació entalpia-entropia. En termodi-

nàmica, l'entalpia (H) i l'entropia (S) són les dues aportacions a l'energia lliure (G): $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. L'energia lliure G expressa la quantitat de treball que un sistema pot exercir en condicions específiques de temperatura (T) i pressió. La majoria de les interaccions intra i intermoleculars són el resultat de l'acció combinada de diverses forces febles (enllaços d'hidrogen, electrostàtics, hidrofòbics...). L'entalpia típica d'un sol enllaç d'hidrogen en una molècula d'aigua és d'unes 7 kcal/mol, per tant, l'entalpia de formació ΔH de la majoria de complexos biomoleculars que implica diversos enllaços d'hidrogen (per exemple, l'estat natiu d'una proteïna) pot arribar fàcilment a uns quants centenars de kcal/mol. Tanmateix, l'estabilitat general d'aquest complex, mesurada per la seva energia lliure de formació ΔG , no supera les desenes de kcal/mol, és a dir, és deu vegades més petita (això explica per què les proteïnes solen fondre's a temperatures molt per sota del punt d'ebullició de l'aigua, 100 °C). Això només es pot aconseguir si la contribució de l'entropia a la formació d'aquest complex ΔS és comparable a ΔH i del mateix signe, fent la diferència $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ menor que la magnitud dels dos termes, ΔH i $T\Delta S$. De manera il·lustrativa, podríem dir que les proteïnes són com roques que, tanmateix, es fonen a temperatures moderades.

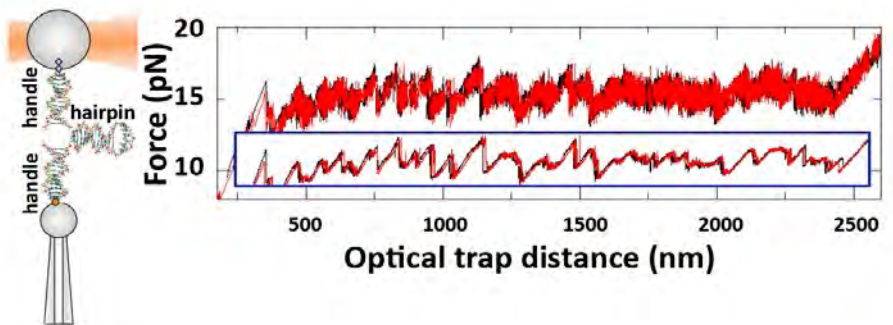
Una característica notable de la plasticitat molecular és el plegament molecular. En les condicions adequades, els àcids nucleics (ADN i ARN), les proteïnes i altres biopolímers es pleguen espontàniament adquirint les seves estructures estables i natives (és a dir, l'estructura tridimensional plegada adequada i biològicament funcional). Si s'escalfen per sobre de la temperatura de fusió T_M , les múltiples interaccions que estableixen els àcids nucleics i les proteïnes es veuen afectades i generen un cabdell desordenat. El procés invers, el plegament molecular, s'obté després de refredar la mostra per sota de T_M . És destacable que els processos d'escalfament i refredament sovint són quasi reversibles, la qual cosa significa que les biomolècules transiten sense problemes entre les conformacions plegades i desplegadas, evitant quedar atrapades per estats mal plegats o parcialment plegats. La plasticitat molecular es pot observar en experiments de desnaturalització mecànica de molècules individuals, en què s'altera l'estructura nativa d'una biomolècula mitjançant l'aplicació de forces mecàniques. Per exemple, per dissociar ADN, les dues cadenes d'ADN s'estiren entre elles fins que la doble hèlix es disso-

ca en dues cadenes individuals. El procés de tornar a entrellaçar les cadenes és quasi reversible, la qual cosa porta al replegament de les dues cadenes en una doble hèlix (Quadre 3).

Els estats no-natius són problemàtics per a la funció biològica: els plegaments deficients sovint impedeixen les reaccions moleculars i els processos reguladors en general. Els àcids nucleics i les proteïnes són polímers desordenats que transmeten informació biològica, ja sigui al nivell de la seva seqüència monomèrica (estructura primària) o en la seva estructura plegada tridimensional (estructura secundària i terciària). En el procés cinètic del plegament, les proteïnes haurien de o bé quedar atrapades en un dels múltiples estats termodinàmicament estables i d'energies comparables, o bé

no plegar-se en absolut. No obstant això, solen plegar-se de manera reproducible en una única estructura nativa molt estable, determinada per la seqüència (hipòtesi d'Anfinsen; vegeu, tanmateix, els desenvolupaments recents esmentats a la secció anterior). Dissenyar seqüències d'àcids nucleics (cadenes soltes) o cadenes polipeptídiques que es dobleguin en estructures específiques és un problema matemàtic complicat (pertanyent a la classe de problemes d'optimització completa no-polinòmica, Mezard i Montanari, 2009). El plegament molecular (el problema de l'existència de plegaments nadius ben definits i únics en cadenes polipeptídiques desordenades) és, per tant, un tema important en la biofísica que encara no es comprèn completament. La clau, com en la

.....
 Quadre 3. Trencament molecular. Un experiment bonic i senzill que demostra la plasticitat de les biomolècules és el desenrotllament de l'ADN, el procés físic pel qual la doble hèlix es veu alterada mecànicament, separant-ne les dues cadenes. Aquests experiments es poden dur a terme amb pinces òptiques (Quadre 1) unint cadascuna de les dues cadenes dels extrems d'un fragment d'ADN a esferes micromètriques de plàstic a través d'uns enllaços flexibles d'ADN (Figura 3, esquerra). Després, una de les esferes és capturada amb una trampa òptica que actua com a sensor de força. Movent la trampa òptica lluny de la pipeta, és possible exercir forces cada vegada més grans, primer per estirar els enllaços flexibles d'ADN i, en sobrepassar els 15 pN, per trencar els enllaços (d'aparellament i apilament de bases) que estableixen la doble hèlix. Les corbes d'extensió-força mesurades mostren un patró serrat característic indicatiu de fusió «induïda per força» de la doble hèlix. Cada corba de trencament específica és característica d'una seqüència d'ADN particular. La plasticitat de les molècules d'ADN és revelada en invertir el moviment de la trampa òptica. La doble hèlix pot restablir-se reversiblement (és a dir, sense histèresi) proporcionant una mesura de la corba termodinàmica d'extensió-força (Figura 3, dreta). Reproduir aquesta corba emprant models de polinucleòtids per a la formació de dúplex d'ADN ens permet extreure valors millorats d'energia per a la hibridació de seqüències complementàries, útils per predir temperatures de fusió en dúplex d'ADN de seqüències arbitràries (Huguet *et al.*, 2010, 2017). L'experiment de trencament també es pot utilitzar per a tècniques d'empremta d'ADN o per a la determinació de la posició en què els lligands petits s'uneixen a l'ADN amb una resolució de pocs parells de bases (Manosas *et al.*, 2017).



.....
 † Figura 3. (Esquerra) Configuració experimental per a experiments de trencament. La figura no és a escala. (Dreta) Posició de trampa òptica vs. força mesurada en un experiment de trencament (corba negra) i renaturalització (corba vermella) d'un fragment d'ADN de 2,2 kB adquirida a 1 kHz de freqüència. El patró serrat de la força a 15 pN mostra el trencament progressiu dels parells de bases al llarg de la seqüència. La part més dreta de la corba correspon a la resposta elàstica de l'ADN monocatenari. Noteu les fluctuacions de força al llarg de la corba causades pel soroll tèrmic i la baixíssima histèresi entre les corbes de desintegració i renaturalització (superposició de dades negres i vermelles). A sota s'ha inserit la mateixa figura filtrada a 1 Hz d'amplada de banda. Dades de Huguet *et al.* (2010).

majoria dels problemes de la biologia, rau en el context evolutiu. Per entendre el plegament molecular cal comprendre les seqüències primàries i els plecs terciaris des d'una perspectiva coevolutiva. Aquest és el clàssic dilema de l'ou o la gallina que impregna la biologia.

La majoria de les vies de reacció i els processos reguladors a la cèl·lula pateixen el mateix problema: els paràmetres termodinàmics i cinètics estan molt ben ajustats per operar en un marge estret de condicions, essent una altra manifestació de la vida a la vora del caos. Desafortunadament, la tasca de determinar amb precisió els paràmetres de la majoria de vies moleculars en les cèl·lules (tant en condicions *ex vivo* com *in vivo*), que ja de per si és tediosa i requereix molt de temps, es fa molt difícil a causa de l'extraordinària complexitat de la infinitat de factors endògens i exògens implicats, essent l'heterogeneïtat l'obstacle final que limita la precisió de les mesures. En aquesta nova era de la informació i de la biologia podem ser testimonis d'una nova indeterminació fonamental en la biologia, que recorda el paper que va jugar la teoria del caos en les matemàtiques i la física a principis del segle passat.

La tendència actual en la biologia de classificar les eines de caracterització i quantificació col·lectivament utilitzant el neologisme *-òmica* (genòmica, proteòmica, metabolòmica, interactòmica...) pot resultar insuficient tant per comprendre millor la complexitat biològica com per fer prediccions fiables en les ciències de la vida. Com en la teoria matemàtica del caos, el fet que el nostre coneixement dels detalls biològics mai no sigui prou complet, evitarà prediccions fiables de l'«agenda» dels éssers vius: la teleonomia (primera secció de l'article) seguirà sent inaccessible. Igualment, el progrés en el pronòstic mèdic de la majoria de les malalties evolutives i degeneratives (en aquest moment, possiblement el repte més gran en medicina) es revelarà frustrant a pesar de les inversions i els esforços financers massius. Les malalties evolutives, com el càncer i molts trastorns neurològics relacionats amb l'envelliment, continuaran sent un desafiament. En aquest sentit, el raonament per inferència, més que el coneixement deductiu, podria ser l'estratègia apropiada per afrontar els nous reptes de la biologia.

Energia, entropia i informació

L'entropia és una de les quantitats més rellevants en física, propera a l'energia, l'altra quantitat física que mesura la capacitat d'un sistema físic per exercir treball (Callen,

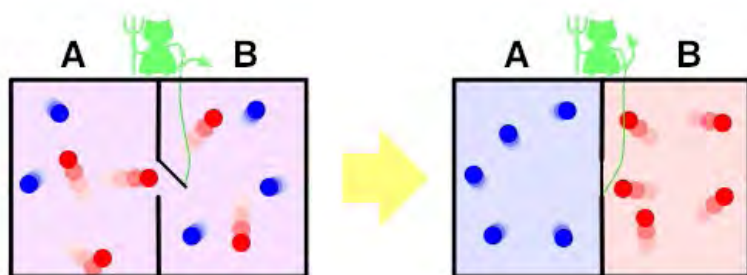
2006). No obstant això, l'entropia està dotada d'algunes característiques que la fan especial, de vegades evasiva i, per què no, fins i tot misteriosa. El concepte d'energia es va introduir a finals del segle XVII pel duet, pare i fill, Johann i Daniel Bernoulli, i per l'inventor del càlcul Leibnitz, per quantificar la *vis viva*, la capacitat d'un sistema per generar moviment. L'entropia va ser introduïda molt més tard, a mitjan segle XIX, per Clausius, el qual va intentar quantificar la superior qualitat del treball en comparació amb la calor en els processos tèrmics. D'acord amb la primera llei de la termodinàmica, la calor i el treball són dos tipus d'energia totalment intercanviables. No obstant això, tot i que el treball es pot convertir completament en calor, el contrari no és cert. L'entropia regeix el destí de les transformacions termodinàmiques segons la segona llei: l'entropia total de l'univers sempre augmenta. Probablement, la termodinàmica és l'única disciplina en la física les lleis de la qual es mantenen fermament malgrat tots els avenços revolucionaris de la física durant el segle XX. Fins i tot el naixement de la mecànica quàntica va ser estimulada per la termodinàmica: els estudis de Boltzmann, Wien i altres sobre la radiació del cos negre van ser el camp de proves de la llei de radiació de Planck i dels nombrosos desenvolupaments que van arribar a continuació (Abro, 1952).

Tanmateix, energia i entropia presenten diferències sorprenents. En primer lloc, l'energia és conservativa (primera llei), mentre que l'entropia no ho és (segona llei). Això fa que la segona llei sigui encara més estranya, perquè probablement és l'única llei física descrita per una desigualtat matemàtica, mentre que la resta de lleis descriuen la conservació de les quantitats físiques (energia-massa, moment lineal i angular, càrrega elèctrica...). Si no fos pel fet que la segona llei està tan fermament establerta, un científic suspicax podria pensar que en l'equilibri de l'entropia hi falta alguna cosa que redimeix la segona llei en plena igualtat. En segon lloc, l'energia és una quantitat determinista assignada a un estat caracteritzat per un conjunt de probabilitats P_i per a les i diferents configuracions disponibles. Tot i que és possible fer una instantània d'un sistema i definir el seu contingut energètic en un moment donat, no és possible definir el seu contingut d'entropia. L'entropia estadística de Gibbs sol definir-se per la relació matemàtica $S = -k_B \sum_i p_i \log(p_i)$, en què la suma passa per tots els resultats experimentals possibles, i és igual a l'entropia termodinàmica en condicions

d'equilibri. A més, l'entropia estadística de Gibbs coincideix amb la definició matemàtica d'informació. Però, què és la informació? En ciència, i en la física en particular, una quantitat determinada només té un significat veritable si es pot mesurar. La informació, un terme àmpliament utilitzat en els àmbits humans més diversos, va veure el seu desenvolupament més fructífer en l'obra de Claude Shannon el 1948, que va establir la base de la teoria de la informació moderna (Cover i Thomas, 1991). Segons Shannon, «la informació és la resolució de la incertesa» i la seva mesura quantitativa és l'anomenada *funció d'incertesa H*, que és igual a l'entropia estadística de Gibbs. S'ha atribuït a John Von Neumann, el pare de l'ordinador modern, la següent cita: «Heu d'anomenar-ho entropia per dos motius. En primer lloc, la vostra funció d'incertesa s'ha utilitzat en mecànica estadística amb aquest nom, de manera que ja té un nom. En segon lloc, i més important, ningú sap què és realment l'entropia, així que en un debat sempre tindreu avantatge». L'entropia i la informació són, doncs, dues cares de la mateixa moneda. És natural esperar que, si sabem com mesurar l'energia i l'entropia, també hem de saber mesurar la informació. Algunes pistes ja es van descobrir durant les acalorades discussions de fa un segle entre químics i físics sobre la irreversibilitat en la mecànica estadística (per exemple, les paradoxes de Loschmidt i el dimoni de Maxwell) desencadenades per la hipòtesi molecular (Quadre 4).

Encara no està clar com mesurar la informació (Shanon, 1948; Cover i Thomas, 1991) en condicions i sistemes arbitraris, encara que el recent desenvolupament dels teoremes de fluctuació en l'àmbit de la física n'ha donat algunes pistes. Recentment s'han descobert relacions matemàtiques en mecànica estadística que poden estendre la validesa del teorema fluctuació-dissipació o la relació Stokes-Einstein (segona secció de l'article) a sistemes lluny de l'equilibri (Evans i Searles, 2002; Ritort, 2008; Seifert, 2012). La clau per mesurar la informació és determinar les diferències d'energia amb mesures de treball. De la mateixa manera que les entropies corresponen a diferències d'energia lliure mesurades a dues temperatures properes, la informació correspon a diferències d'energia lliures mesurades en dues condicions experimentals determinades. En el cas del dimoni de Maxwell (Quadre 4), el treball mitjà per cicle que es pot extreure correspon a la diferència d'energia lliure d'esborrar un sol bit. La generalització d'aquests

Quadre 4. Entropia i informació. La relació entre entropia i informació es remunta a James Clerk Maxwell, que, el 1867, va proposar un experiment pensat per violar la segona llei de la termodinàmica. Maxwell va imaginar «un ésser molt petit i intel·ligent dotat de lliure albir, i amb suficient capacitat d'organització tàctil i perceptiva per donar-li la facultat d'observar i influir en molècules individuals de la matèria» (Bennett, 1987; Leff i Rex, 1990). Observant la velocitat de les molècules en un recipient aïllat amb dos compartiments separats per una paret, però connectats a través d'una petita porta, el dimoni podria, sense esforç i sense cap despesa de treball, obrir i tancar la porta per separar les molècules fredes (de moviment lent) de les calentes (de moviment ràpid) (Figura 4). El decidit dimoni genera un gradient de temperatura en un sistema aïllat de temperatura constant, disminuint així l'entropia total, en contra de la segona llei. Una variant del dimoni de Maxwell és el motor de Szilard, en què el dimoni actua en un sistema isotèrmic (en comptes d'aïllat) i utilitza la mesura de la posició d'una molècula per extreure calor del bany i convertir-la completament en treball, arribant al màxim de $k_B T \log(2)$, també anomenat límit Landauer, en el cas d'un sol bit (dos estats). La resolució d'aquesta paradoxa (col·loquialment, exorcitzar el dimoni) prové de la termodinàmica del processament de dades. El 1961, Rolf Landauer va demostrar que qualsevol operació lògica irreversible és també termodinàmicament irreversible, requerint una dissipació de calor típicament de l'ordre de $k_B T$ (Landauer, 1961). Posteriorment Charles H. Bennett va demostrar que esborrar un bit és una operació lògica intrínsecament irreversible necessària per a restaurar l'estat inicial del dimoni (Bennett, 2003). Aquesta connexió explícita salva la segona llei i resol la vella paradoxa centenària. Hom no pot evitar comparar l'acció de retroalimentació del dimoni de Maxwell i els multitudinaris processos reguladors en éssers vius cursats per màquines moleculars. Fins on podem estirar l'analogia? Saber si la informació és una quantitat rellevant i mesurable en processos biològics continua sent un problema obert.



↑ Figura 4. (Esquerra) El dimoni (de color verd) observa les partícules en moviment d'un gas i separa les que es mouen ràpidament (punts vermells) de les que es mouen lentament (punts blaus) obrint una porta sense fer cap esforç. (Dreta) S'estableix un gradient de temperatura en contra de la segona llei de la termodinàmica. La imatge «Maxwell's demon», per Htkym, està sota llicència CC BY-SA 3.0 de Wikimedia Commons.

resultats a condicions i sistemes arbitraris de no-equilibri segurament generarà nous avenços fascinants en física i biologia.

Observacions finals

En biologia, els éssers vius i els individus (des de molècules a organismes) no estan sols, sempre formen part d'una població o un conjunt d'individus. Els éssers vius, les poblacions i la vida en general són el resultat de l'evolució natural. Les poblacions evolucionen sota les regles de la selecció darwiniana, en què els individus més adequats a la pressió ambiental avantatgen la resta. L'evolució darwinista es basa en dinàmiques d'un tipus molt especial

en què les mutacions i les amplificacions selectives de les espècies més aptes determinen l'evolució dels fenotips. Des del punt de vista d'un físic, l'evolució de les poblacions produeixen un sorprenent estat no estacionari en què conceptes bàsics en termodinàmica, com ara l'energia, la matèria, l'entropia i la informació, es troben entrellaçats d'una manera complexa i indesxifrable (Goldenfeld i Woese, 2011). Elucidar com s'ha de definir i mesurar la informació en sistemes biològics sembla un pas crucial per avançar en la comprensió de la complexitat biològica. La plasticitat, la característica més destacada de la matèria viva, prové de la interacció entre l'energia (resiliència) i

l'entropia (adaptabilitat). Tanmateix, no està clar com aquestes dues forces motores (energia i entropia) poden totes soles conduir la matèria inanimada fins a una matèria viva d'una tal meravellosa complexitat. No hi ha cap evidència que l'estat viu estigui en conflicte amb cap llei fonamental de la física i la química, però tanmateix no sabem com explicar la teleonomia (o el fet que els éssers vius tenen agendes pròpies) a partir només dels principis físics. La informació física pot ser l'enllaç perdut que necessitem per fer de la teleonomia un aspecte universal de la matèria viva, i potser també de la matèria inanimada. Hom podria especular que la informació, la germana de l'entropia, és una quantitat físicament mesurable governada per lleis encara desconegudes que, malgrat els grans avenços en biologia, ha passat desapercebuda pel científic esperant ser descoberta en el futur. Està clar que això és pura especulació. En el que estan d'acord els científics que investiguen la matèria viva en la seva vida quotidiana és que la informació és allà fora, penetrant totes les capes del món vivent (Kirschner *et al.*, 2000). Hom pot fins i tot ser una mica més agosarat i afirmar que la informació és la contribució perduda que fa de la llei física més estranya (la segona llei) una igualtat matemàtica (en lloc d'una desigualtat). Per tal d'avançar en aquesta línia de pensament, és imprescindible buscar teories que elevin la informació al mateix estatus científic que tenen l'energia i l'entropia. Sense un treball teòric i experimental dedicat i simultani no serà possible desenredar els fils d'aquest misteri.

En ciència, molts descobriments es poden atribuir a assaigs experimentals de teories en què s'han observat discrepàncies respecte de les previsions esperades. L'experiment o l'observació crucial que revoluciona la ciència canviant completament la nostra visió del món (el canvi de paradigma de Kuhn [Kuhn, 1962]) és un tema recurrent en ciència. Alguns exemples d'aquests experiments són l'experiment Michelson-Morley del moviment de la Terra en relació amb l'èter (que va donar a llum la teoria de la relativitat) o l'efecte fotoelèctric (que va estimular el desenvolupament de la teoria quàntica). Fins ara, tots els desenvolupaments teòrics i experimentals destinats a comprendre millor la matèria viva no han impugnat cap llei fonamental de la física i la química. Però pot arribar un moment en el qual, en el curs d'una nova observació o prova experimental, hi hagi un clar desacord amb les prediccions teòriques. Aquest dia pot estimu-

lar un canvi de paradigma que desencadeni una nova revolució científica unificant la física i la biologia (com ho va fer la teoria quàntica per a la física i la química fa un segle). Tal vegada la informació sigui l'element crucial de la pròxima revolució científica.

Agraïments

Vull agrair el suport del Premi ICREA Acadèmia 2013 i del Projecte del MCYT, FIS2016-80458-P. També agraeixo l'excel·lent tasca duta a terme per Mariona Segura en la traducció d'aquest article, originalment redactat en anglès, al català.

Bibliografia

- D'ABRO, A. (1952). «*The Rise of the New Physics*. Dover.
- AUSTIN, R. H. [et al.] (1975). Dynamics of ligand binding to myoglobin». *Biochemistry*, 14(24): 5355–5373.
- BENNETT, C. H. (1987). «Demons, engines and the second law». *Scientific American*, 257(5): 108–116.
- BENNETT, C. H. (2003). «Notes on Landauer's principle, reversible computation, and Maxwell's Demon». *Stud. Hist. Philos. Sci.*, 34: 501–510.
- BIALEK, B. (2012). *Biophysics: searching for principles*. Princeton University Press.
- BUSTAMANTE, C. [et al.] (2005). «The nonequilibrium thermodynamics of small systems». *Phys. Today*, 58(7): 43.
- CALLEN, H. (2006). *Thermodynamics & Introduction to Thermostatistics*. Wiley.
- CHANDLER, D. (1987). *Introduction to Modern Statistical Mechanics*. Oxford University Press.
- COVER, T. M.; THOMAS, J. A. (1991). *Elements of information theory*. John Wiley & Sons, Inc.
- EVANS, D. J.; SEARLES, D. (2002). «The fluctuation theorem». *Adv. Phys.*, 51(7): 1529–1585.
- GOLDENFELD N.; WOESE, C. (2011). «Life is Physics: Evolution as a Collective Phenomenon Far From Equilibrium». *Annu Rev. Condens. Matter Phys.*, 2: 375–399.
- HUGUET, J. M. [et al.] (2010). «Single-molecule derivation of salt dependent base-pair free energies in DNA». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(35): 15431–15436.
- HUGUET, J. M. [et al.] (2017). «Derivation of nearest-neighbor DNA parameters in magnesium from single molecule experiments». *Nucleic Acids. Res.*, 45(22): 12921–12931.
- KIRSCHNER, M. [et al.] (2000). «Molecular "vitalism"». *Cell*, 100(1): 79–88.
- KUHN, T. S. (1962). *The structure of scientific revolutions*. University of Chicago Press.
- LANDAUER, R. (1961). «Irreversibility and heat generation in the computing process». *IBM J. Res. Develop.*, 5: 183–191.
- LEFF H. S.; REX, A. F. (ed.) (1990). *Maxwell's Demon: Entropy, Information, Computing*. Bristol: Adam-Hilger.
- LIU, B., [et al.] (2013). «DNA unwinding heterogeneity by RecBCD results from static molecules able to equilibrate». *Nature*, 500: 482–485.
- MANOSAS, M., [et al.] (2017). «Single molecule high-throughput footprinting of small and large DNA ligands». *Nature Communications*, 8: 304.
- MEZARD M.; MONTANARI, A. (2009). *Information, Physics, and Computation*. Oxford University press.
- PROSS, A. (2012). *What is life?* Oxford University Press.
- RITORT, F. (2006). «Single molecule experiments in biological physics: methods and applications». *J. Phys.: Condens. Matter*, 18: R531.
- RITORT, F. (2008). «Nonequilibrium fluctuations in small systems: from physics to biology». *Adv. Chem. Phys.*, 137: 31–123.
- SCHRÖDINGER, E. (1944). *What is life?* Cambridge University Press 1944, Re-edited 1992.
- SEIFERT, U. (2012). «Stochastic thermodynamics, fluctuation theorems and molecular machines». *Rep. Prog. Phys.*, 75: 126001
- SHANNON, C. E. (1948). «A Mathematical Theory of Communication». *Bell Syst. Tech. J.*, 27(3): 379–423.
- SOLOMATIN, S. V., [et al.] (2010). «Multiple native states reveal persistent ruggedness of an RNA folding landscape». *Nature*, 463(7281): 681–684.
- THORPE I. F.; BROOKS, C. L. (2007). «Molecular evolution of affinity and flexibility in the immune system». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(21): 8821–8826.
- ZHANG, Q.; AUSTIN, R. H. (2012). «Physics of cancer: the impact of heterogeneity». *Annu Rev Condens. Matter Phys.*, 3: 363–382.