

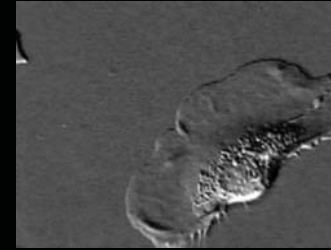
Biomolekulák és sejtek mechanikai tulajdonságai

Kellermayer Miklós



Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

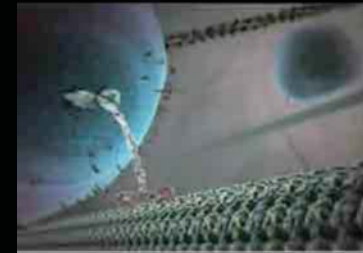
ÉLŐ SEJT: MOLEKULAGÉPEZETEK SOKASÁGA



Tovacsúsó keratinocita



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transzport kinesinnel



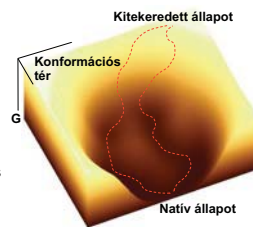
Fehérjészintézis riboszómán

<http://multimedia.mcb.harvard.edu>

MIÉRT EGYEDI MOLEKULÁK?

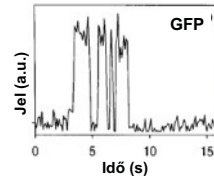
1. Térbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

párhuzamos útvonalakon haladó folyamatok, pl. fehérjégombolyodás



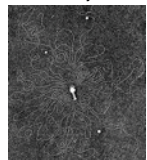
2. Időbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

Sztochasztikus folyamatok, pl. fluorofór pislogás

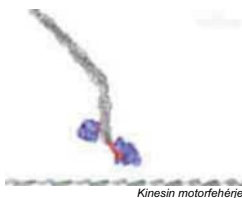


3. Biomolekuláris mechanika

Molekuláris rugalmasság, motorfehérje funkció



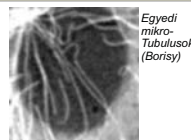
Bakteriófágból kiszabadult DNS



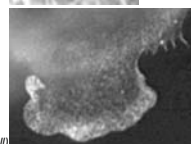
Kinesin motorfehérje

4. Egyedek azonosítása, követése sokaságban

Térbeli és időbeli transzport útvonalak (pl. víruspartikulumok celluláris mozgása, citoskeletális filamentumok dinamikája)



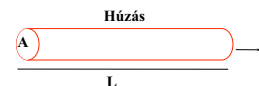
Egyedi mikro-Tubulusok (Borisy)



Aktin "speckle" mikroszkópia (Small)

Rövid anyagtudomány

Merev testek rugalmassága 1



$$\frac{F}{A} = E \frac{\Delta L}{L}$$

F=erő

A=keresztmetszet

E=Young-féle modulus

ΔL =megnyúlás

L=kiindulási hossz

Anyag	Young modulus (GPa)
Gyémánt	1200
Acél	211
Üveg	73
Plexi	3
Gumi	0.02
Selyem	5-10
Keratin	2.4
Aktin	2.3
Kollagén	2
Tubulin	1.9
Elasztin	0.002

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Húzófeszültség

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L}$$

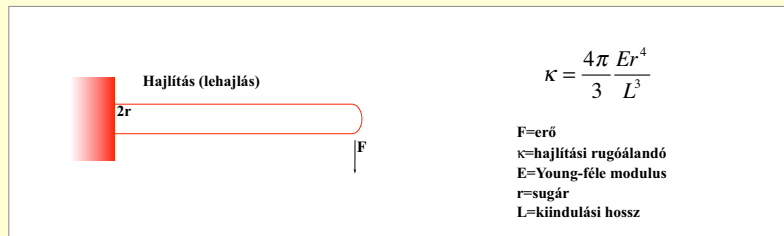
Fajlagos megnyúlás

$$\kappa = \frac{F}{\Delta L}$$

Rugóállandó

Rövid anyagtudomány

Merev testek rugalmassága 2



$\sigma = \frac{F}{A}$	$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L}$	$\kappa = \frac{F}{\Delta L}$
Húzófeszültség	Fajlagos megnyúlás	Rugóállandó

Rövid anyagtudomány

Termikus rugalmasság 1

Termikus (entropikus) rugalmasság

termikus gerjesztésre a polimerlánc random, ide-oda hajló fluktuációkat végez



nő a lánc konformációs entrópiája (elemi vektorok orientációs entrópiája).



Az entropikus lánc alakja és rugalmassága

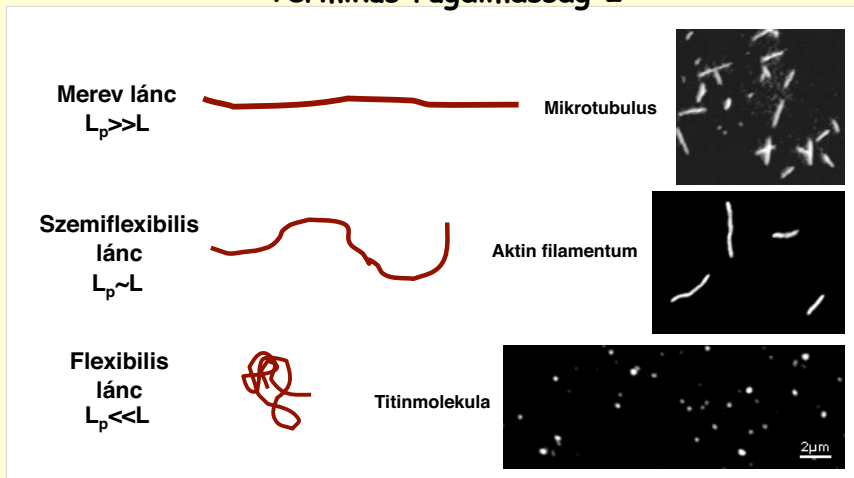
$$\langle R^2 \rangle_{\text{átlag}} = 2L_p L \quad \frac{FL_p}{k_B T} \sim \frac{R}{L}$$



F=erő
 L_p =korrelációs hossz (perzisztenciahossz, mely a hajlítómerevséget jellemzi)
 k_B =Boltzmann állandó
 T=abszolút hőmérséklet
 L=kontúrhossz
 R/L=relatív megnyúlás

Rövid anyagtudomány

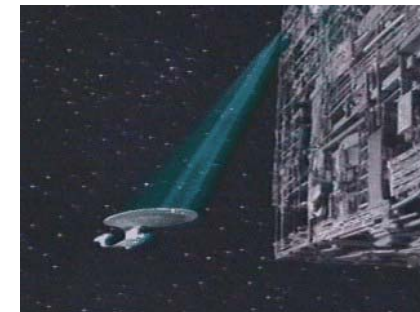
Termikus rugalmasság 2



L_p = perzisztenciahossz (hajlítómerevséget jellemzi)
 L = kontúrhossz

HOGYAN FOGJUNK MEG EGY MOLEKULÁT?

Lézerfénnyel?



StarTrek Enterprise űrhajó a vontató lézernyaláb („tractor beam”) fogságában.

MOLEKULA - FOGANTYÚ GEOMETRIA

mikrogyöngy ~ 1 μm

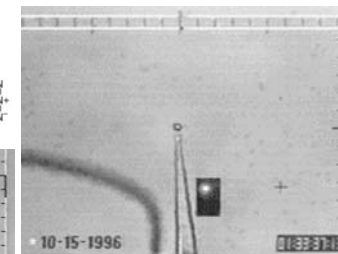
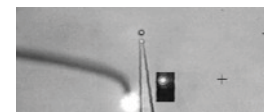
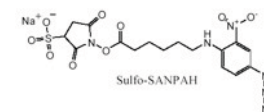
molekula ~ 10 nm

HOGYAN RAGADJUNK MEG EGY MOLEKULÁT?

Például "molekulahegesztéssel"!

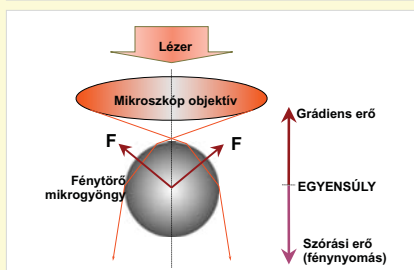
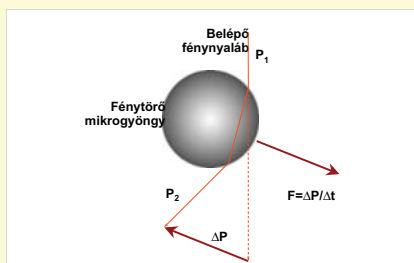
Fotoreaktív keresztkötők

Nem-specifikus
Fotoreaktív N_3 (azid)
csoport
UV megvilágítás

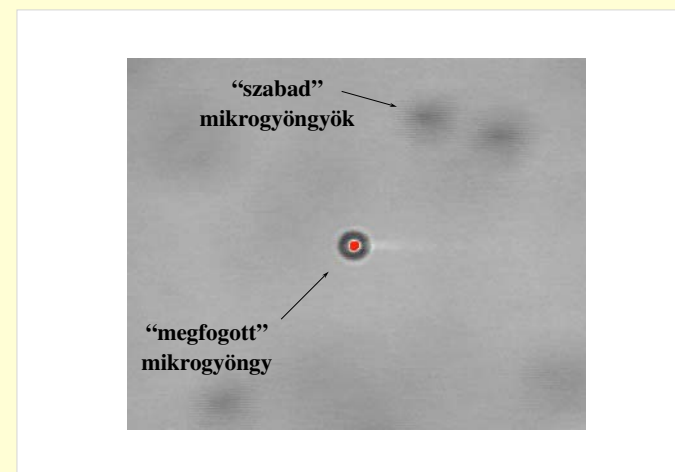


HOGYAN MANIPULÁLJUK A MOLEKULÁT?

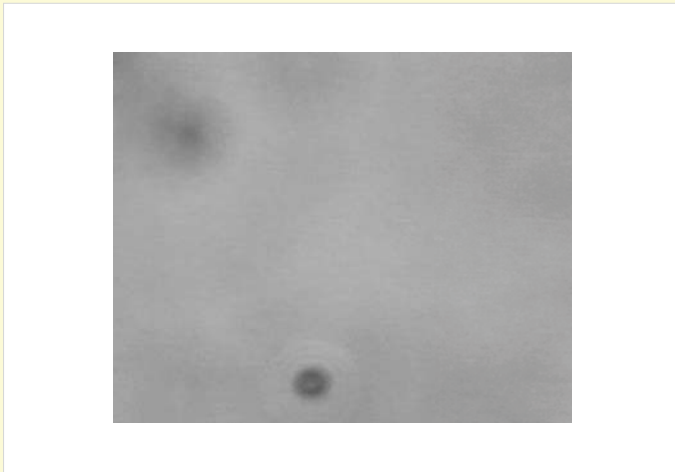
Lézercsipesszel!



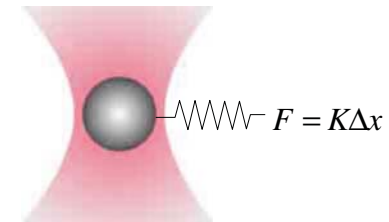
Polistírol mikrogyöngyök lézercsipeszben



Polistirol mikrogöngyök lézercsipeszben



A lézercsipesz virtuális rugó "Pikotenzíométer"

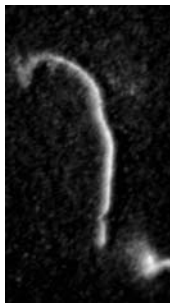


$\Delta x \approx$ nanométer tartomány
 $K \approx 0.01 - 1$ pN/nm
 $F \approx$ pikonewton tartomány

CSOMÓKÖTÉS MOLEKULAFONÁLRA

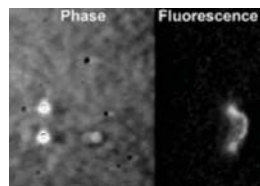
Anélkül, hogy a fonál végeit elengednénk!

Aktin filamentum



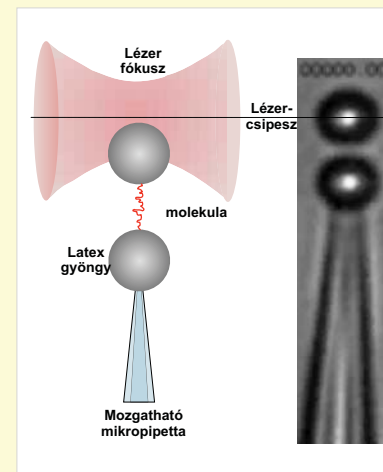
Arai et al. Nature 399, 446, 1999.

DNS



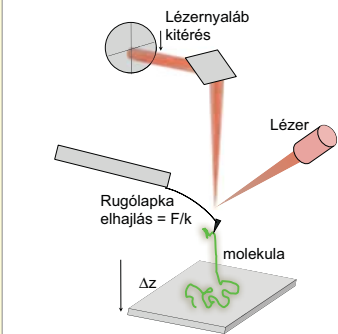
MEKKORA ERŐ KELL A MOLEKULANYÚJTÁSHOZ?

A lézercsipeszrel erőt is lehet mérni!



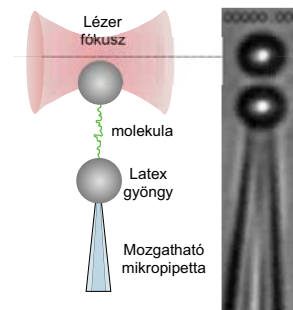
EGYEDI MOLEKULÁK MECHANIKAI MANIPULÁLÁSA

"Rugólapka alapú" módszer: atomerő-mikroszkóp (AFM)



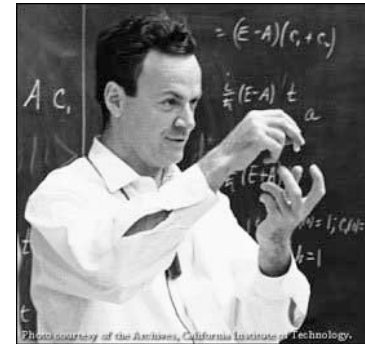
Kellermayer, Physiol. Meas. 26, R119, 2005

"Mező alapú" módszer: lézercsipesz



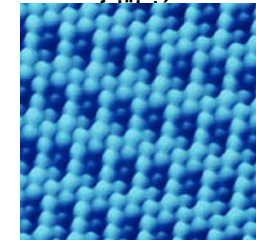
Kettős szálú
DNS molekula
megnyújtása

AFM történelem



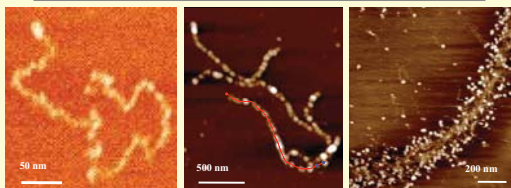
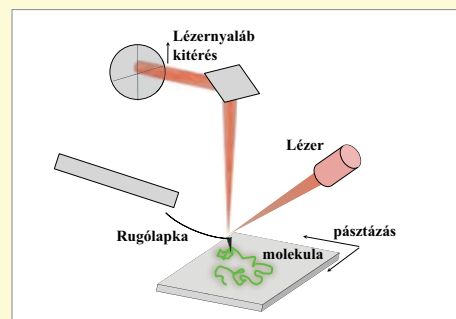
Richard P. Feynman:
"There is plenty of room at the bottom"
1959. december 29.

Oxigén atomok rhodium egykristály

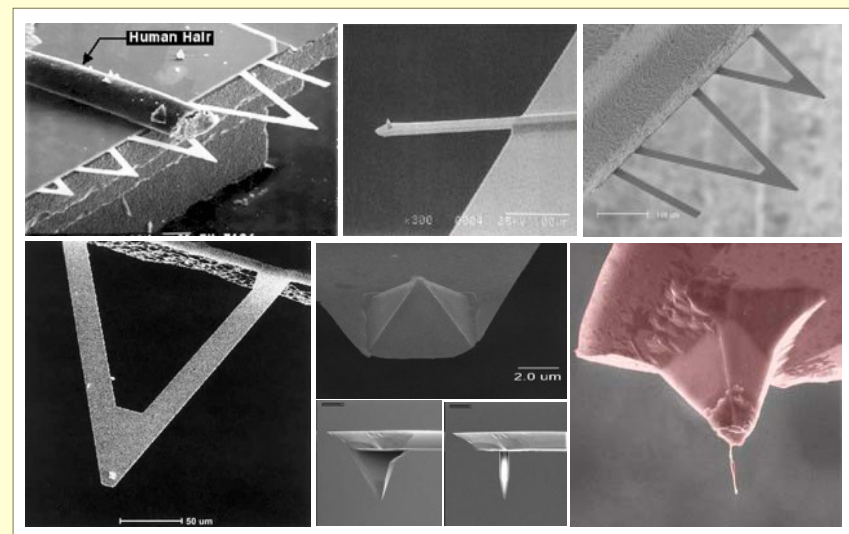


a "nanovilág" léptéke:
1 nanométer

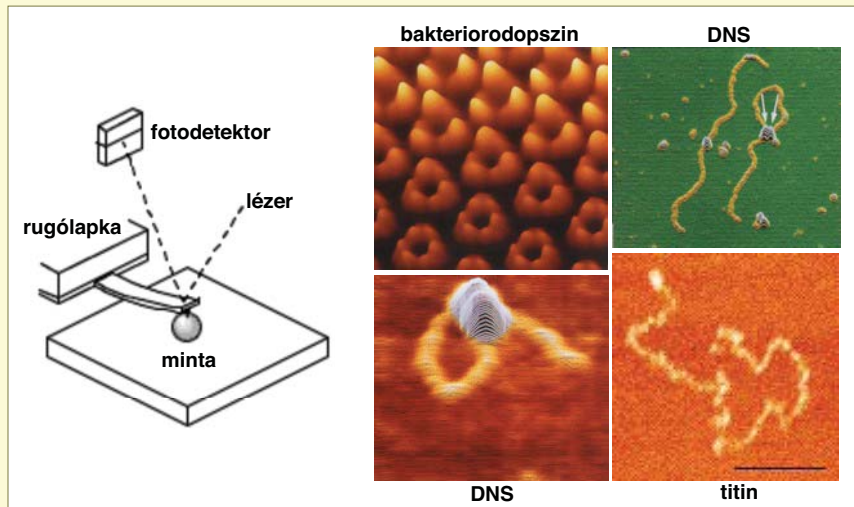
AFM mint pásztázó szondás mikroszkóp



AFM Rugólapkák és hegyek



Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscope = AFM)

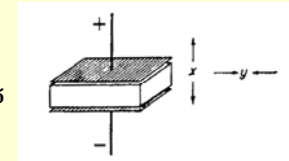


Piezelektromos hatás

Inverz piezelektromos hatás

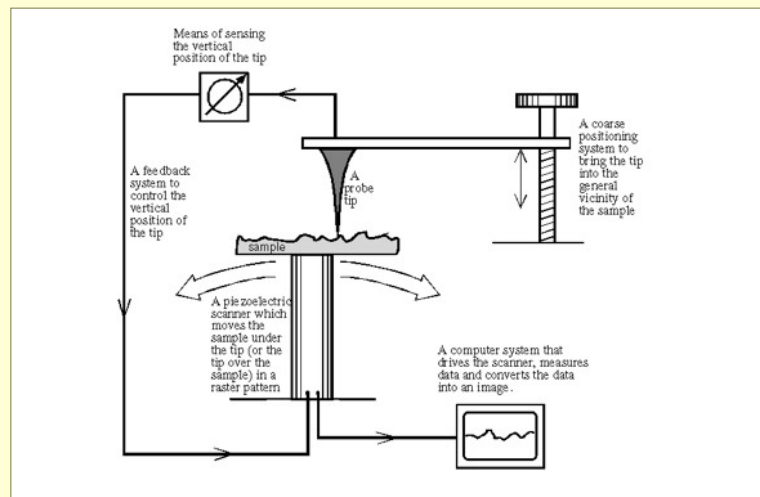
Piezelektromosság (Pierre és Jacques Curie, 1880): "nyomáselektromosság"

Direkt piezelektromos hatás: bizonyos kristályokban mechanikai deformálásra fellépő elektromos polarizáció (P):

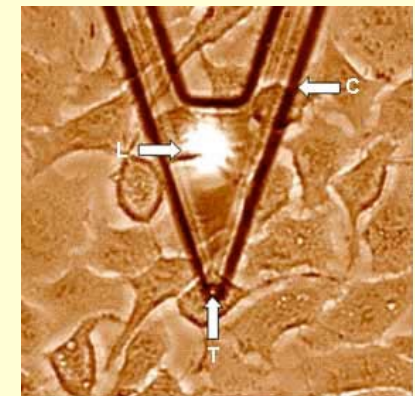
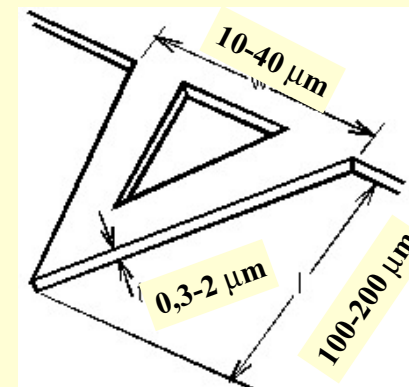


Inverz piezelektromos hatás: bizonyos kristályokban potenciálkülönbség hatására fellépő deformáció:

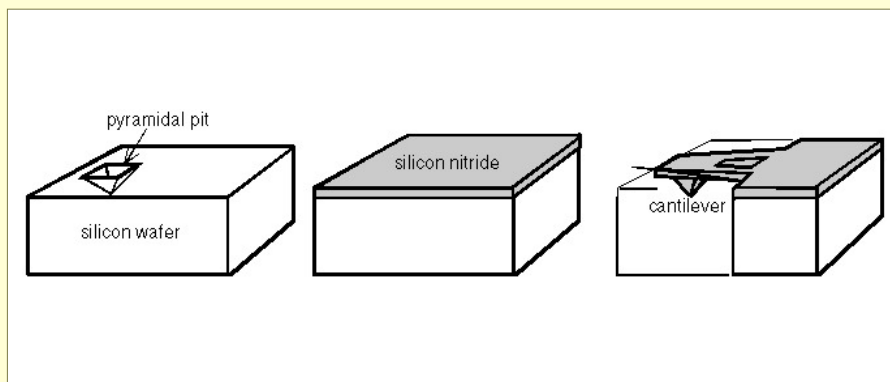
Pásztázó tűszondás mikroszkópia (Scanning Probe Microscopy = SPM)



Rugólap méretei

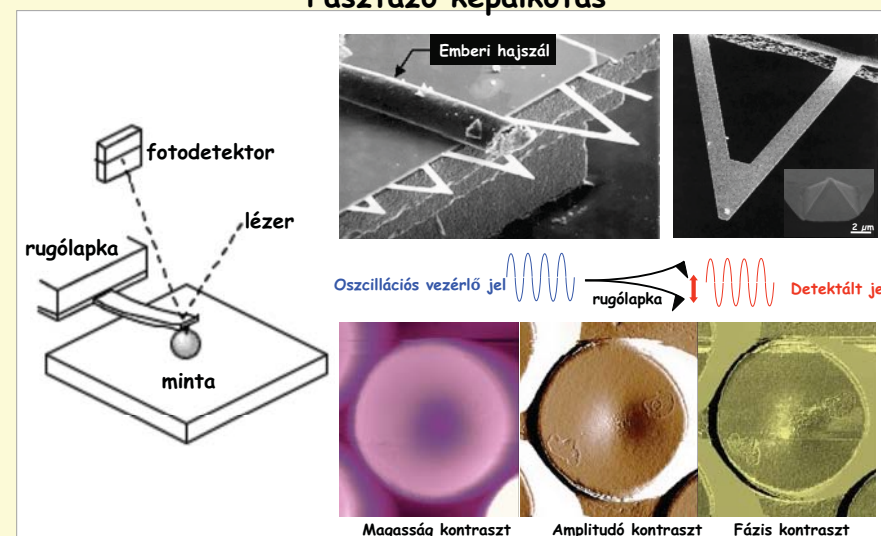


Rugólapkák készítése



AFM alapok

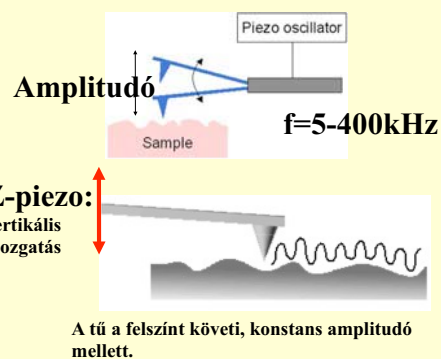
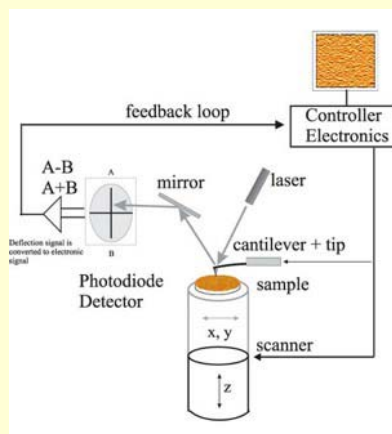
Pásztázó képalkotás



Képalkotási módok

Oscillációs mód – **biológiai minták** esetében ideális.

Kontakt mód



Ideális képalkotás feltételei

Felszín: kösse a mintát

Nem specifikus kötés: csillám, grafit.

Specifikus kötés: keresztkötőkkel (amino-, carboxil-, SH-csoportok)

A felszín legyen sima (lehetőleg atomi simaságú – csillám, grafit)

Rugólap: legyen kellően flexibilis, $k \approx 50 - 0,03 \text{ N/m}$.

Rugólap tűje: nem alakulhat ki erős interakció a minta és a tű között
átmérője legyen „minél kisebb”: 5 - 80nm.

Minta: legyen minél laposabb
ne legyen viszkózus

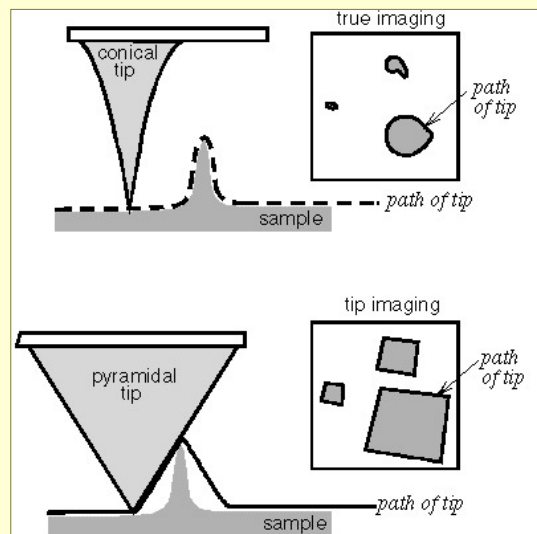
„Az AFM hátrányai”

Időfelbontás: perces nagyságrendbe esik

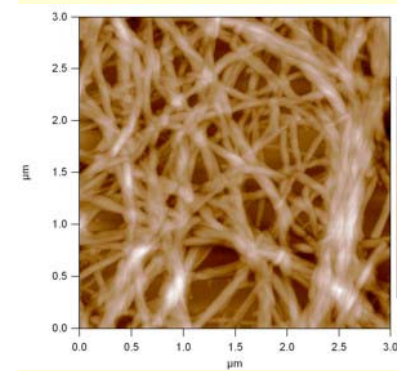
Csak felszínhez kötött minta vizsgálható

Csak felszínen zajló folyamat követhető nyomon

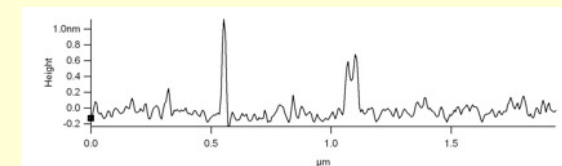
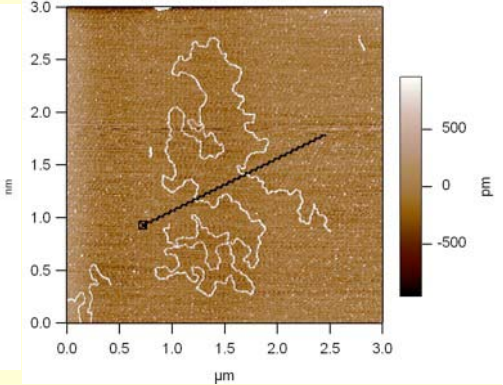
Képkotási hibák, felbontás



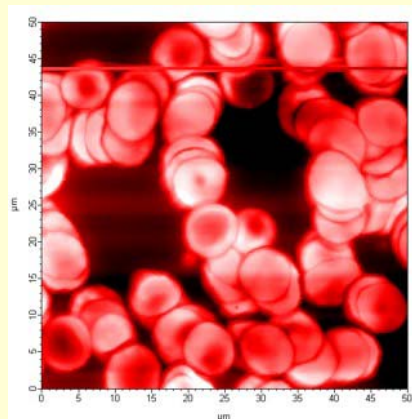
Béta-amyloid fibrillumok



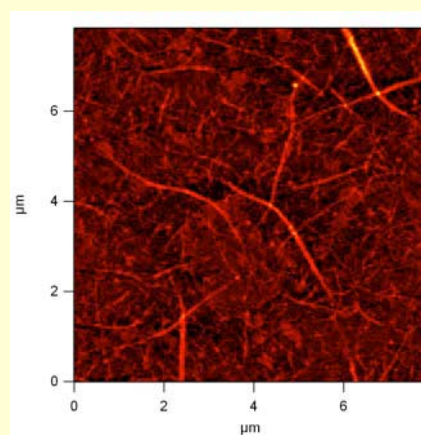
DNS



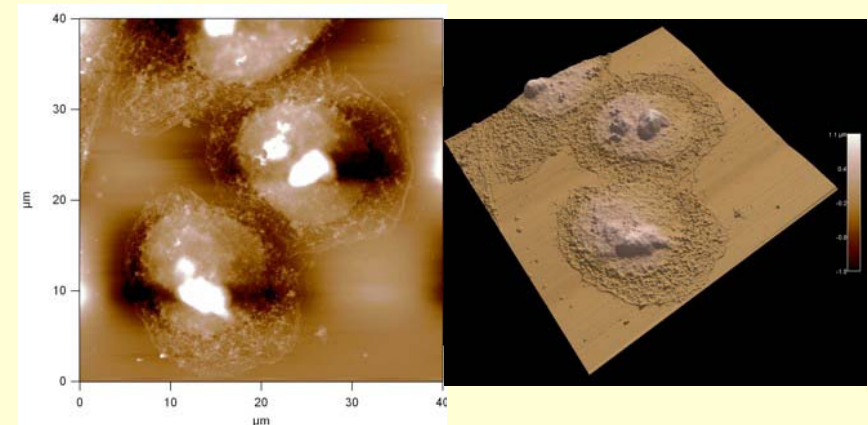
Vvt kenet



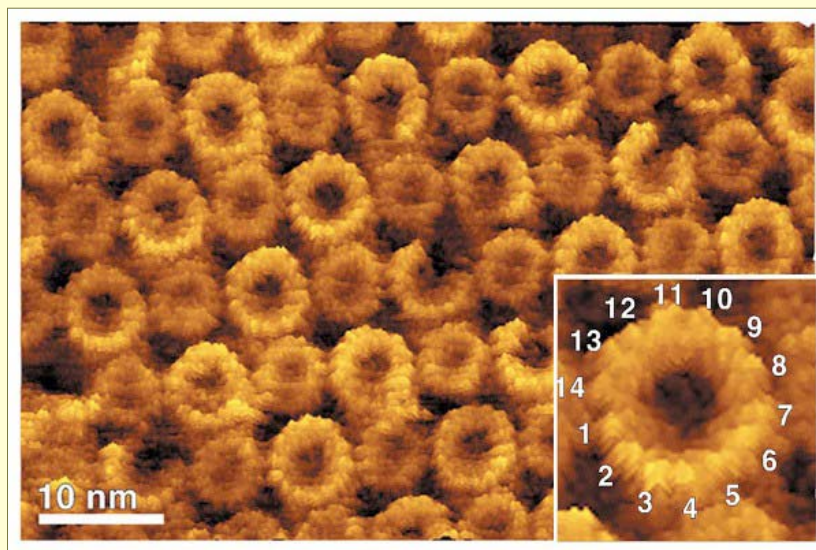
Fibrin hálózat



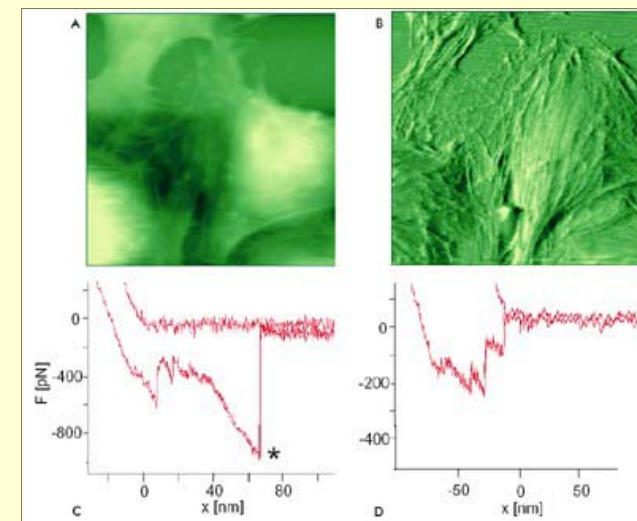
HeLa sejtek



Képek: ATP-szintáz

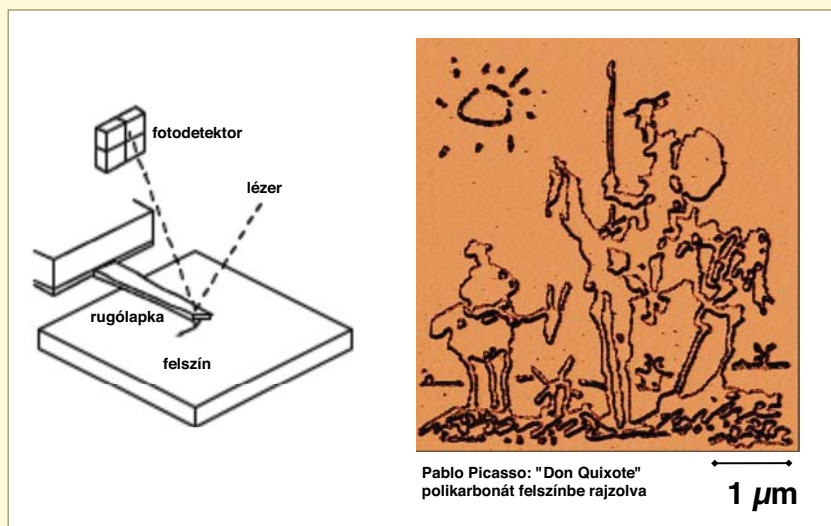


Képek: endotél sejtek



Nanolitográfia

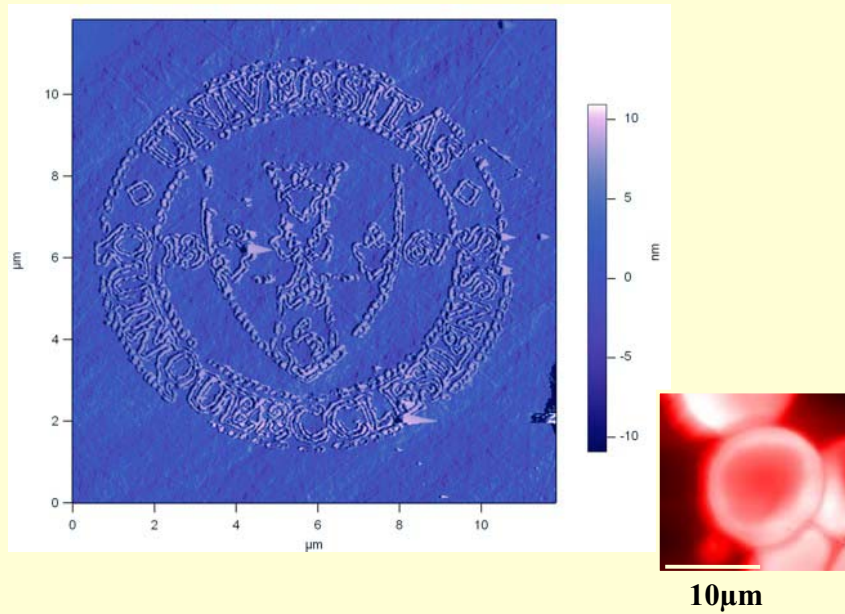
Lithos: kő, gráfia: rajzolni



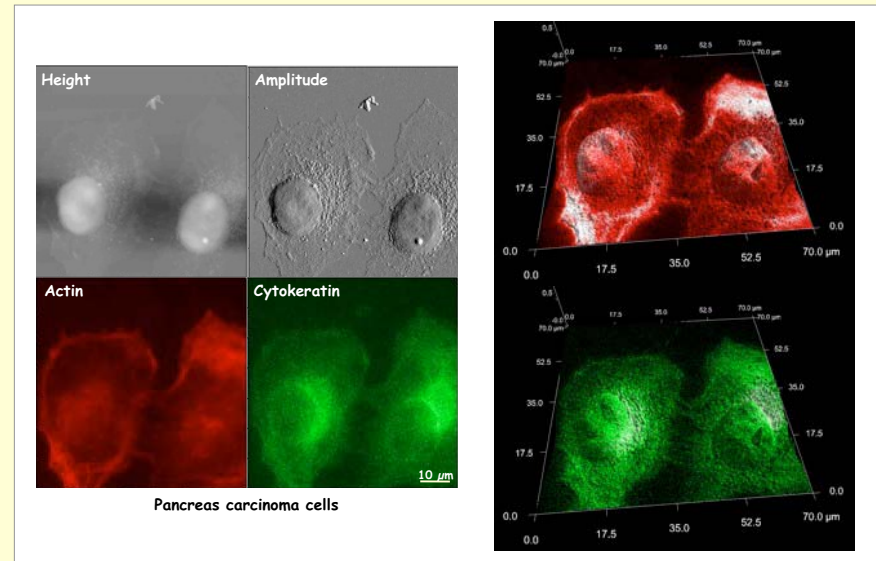
Nanolitográfia



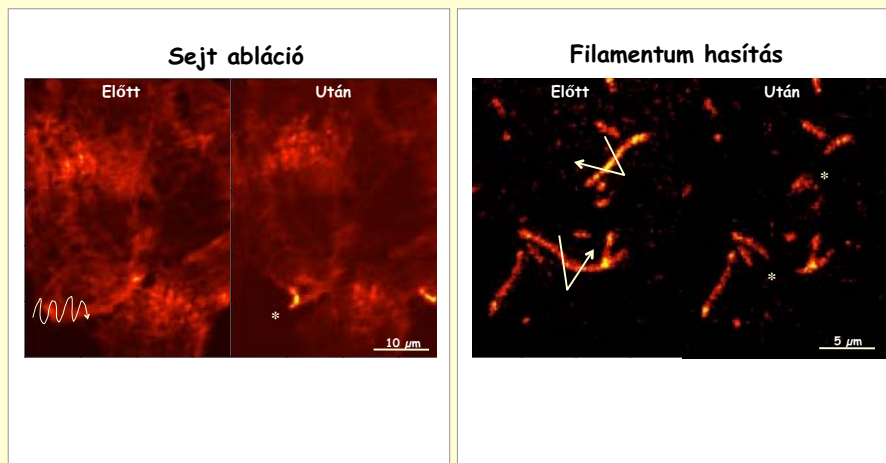
Nanolitográfia



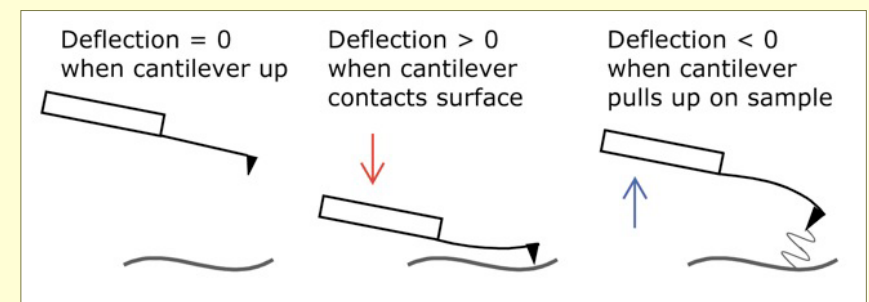
Szekvenciális két-hullámhossz STIRF-AFM



Lágy minta manipulációja STIRF-AFM segítségével

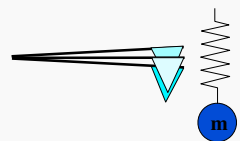


Molekulanyújtás atomerőmikroszkóppal alapelvek



Termikus rugólapka-kalibráció

Termikusan gerjesztett rugólapka: harmonikus oszcillátor

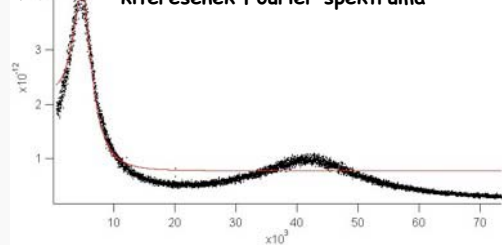


$$K = m\omega_0^2 \quad \frac{1}{2}K\langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$$

Rezgés
(Amplitudó)²

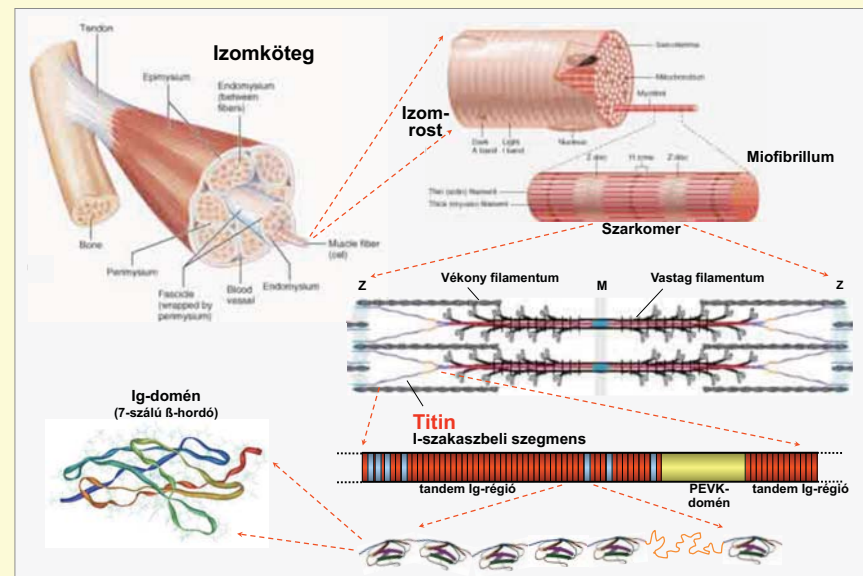
$\times 10^{12}$

Termikusan gerjesztett rugólapka
kitérésének Fourier spektruma

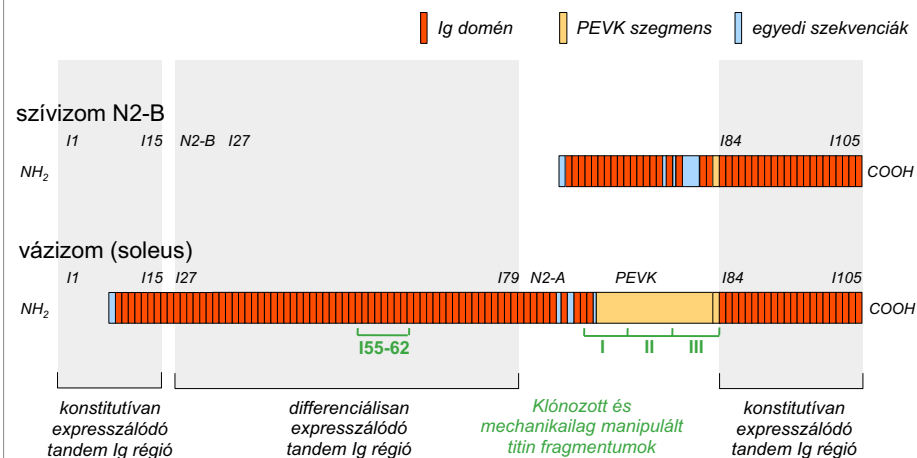


$\times 10^{-3}$

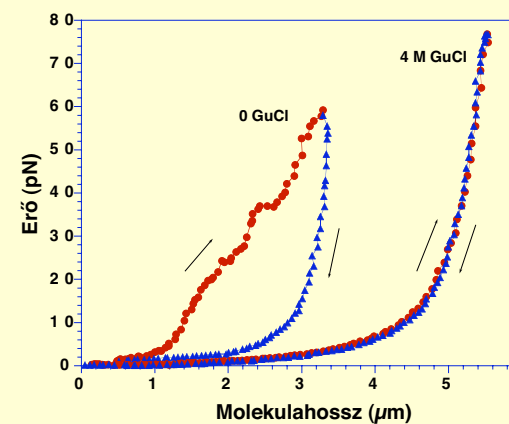
TITIN: MOLEKULÁRIS RUGÓ AZ IZOMSZARKOMERBEN



DOMÉNSZERKEZET A TITINBEN

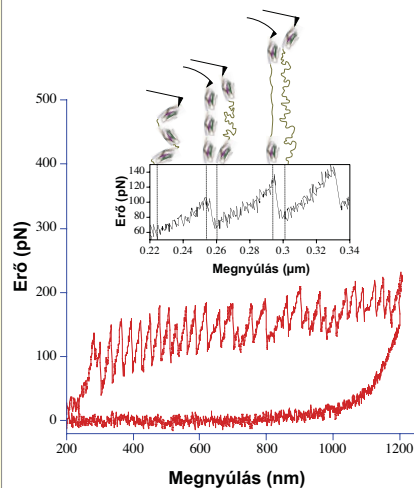


Az erőhiszterézis eltűnik kémiailag denaturált molekulában



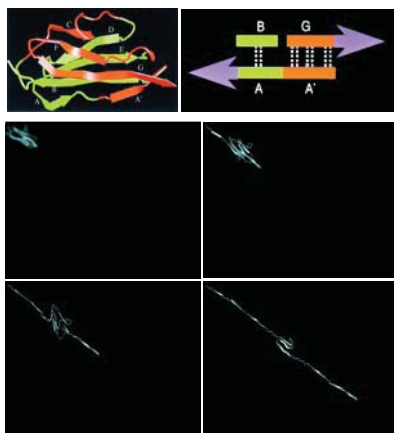
TITIN NANOMECHANIKA ATOMERŐ-MIKROSZKÓPPAL

Egyedi molekula erőspektroszkópia



Kellermayer et al. BBA 1604, 105, 2003

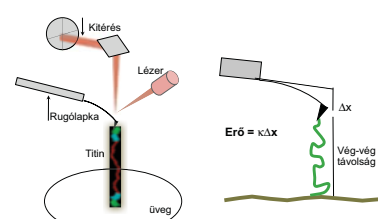
Erő-fűrészfogak: mechanikailag stabil domének nem-kooperatív kitekeredése



Molekuladinamika szimuláció, K. Schulten

TITIN NANOMECHANIKA

Erőmérés AFM-mel

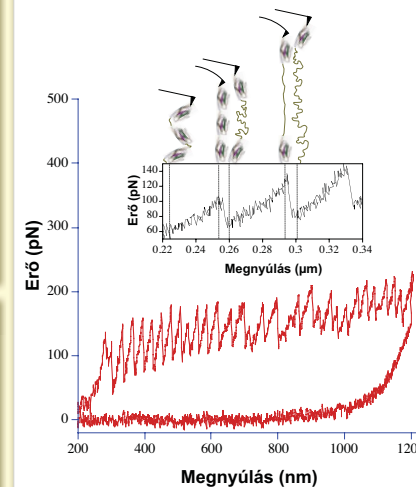


A titin "muzsikája"



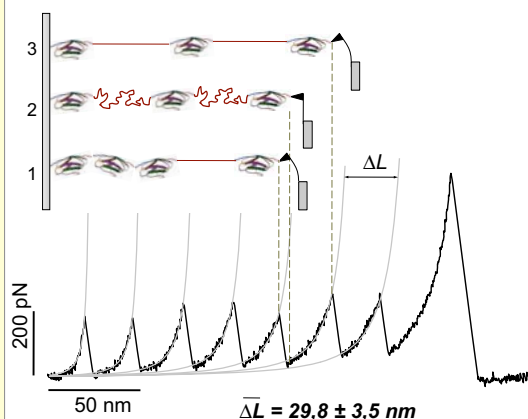
Doménkitekeredés hangspektruma

Egyedi molekula erőspektroszkópia

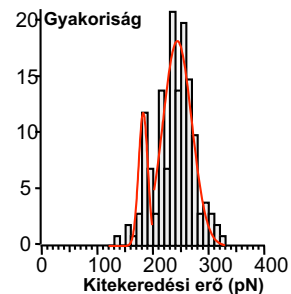
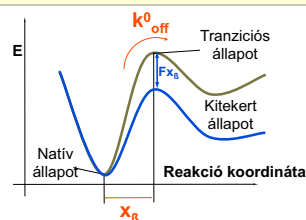


REKOMBINÁNS TANDEM-IG FRAGMENTUM MECHANIKÁJA

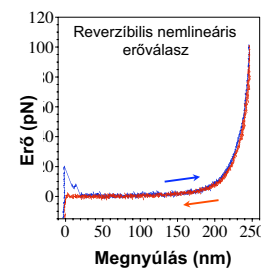
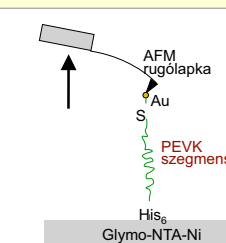
Az I55-62 fragmentum kitekeredési görbéje



Grama et al. Croat. Chem. Acta 78, 405, 2005.

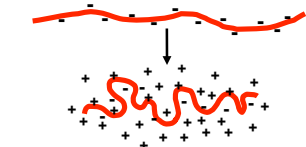
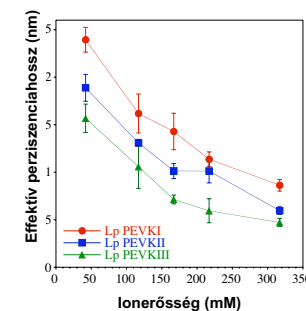


REKOMBINÁNS PEVK FRAGMENTUMOK MECHANIKÁJA

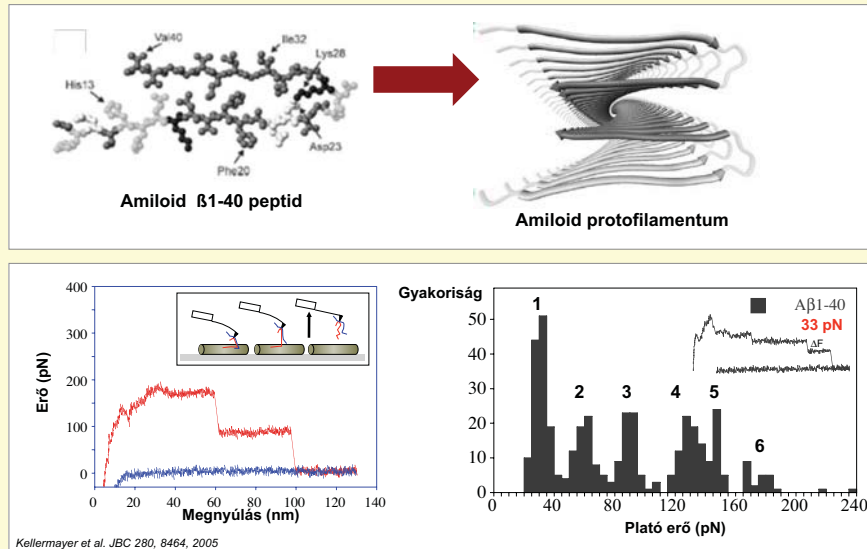


Nagy et al. Biophys. J. 89, 329, 2005.

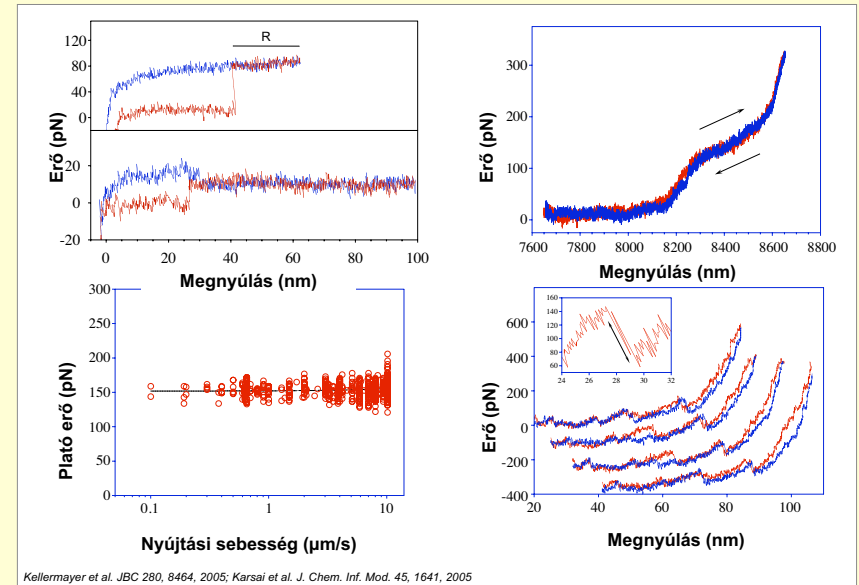
A PEVK domén elektrosztatikusan hangolható molekula-teleszkóp



AMILOID FIBRILLUMOK NANOMECHANIKÁJA

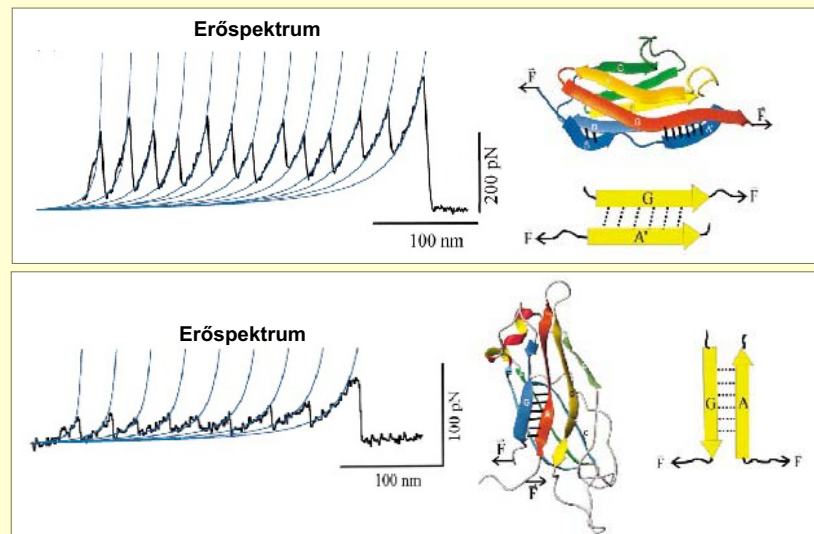


AZ AMILOID SZÉTZIPPÁZÁS REVERÍBILIS



MECHANIKAI STABILITÁS HANGOLÁSA

Mechanikai stabilitás alapja: nyíróerő irányába álló H-híd csoport

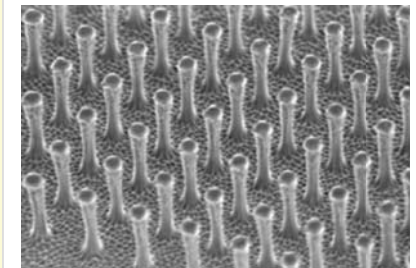
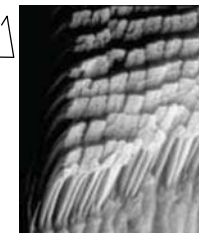


NANOTECHNOLÓGIAI ALKALMAZÁS

Effektív ragasztók a párhuzamos csatolás elvén



Gecko talp tapadása:
Párhuzamosan csatolt sertékkal



Mesterséges gecko talp