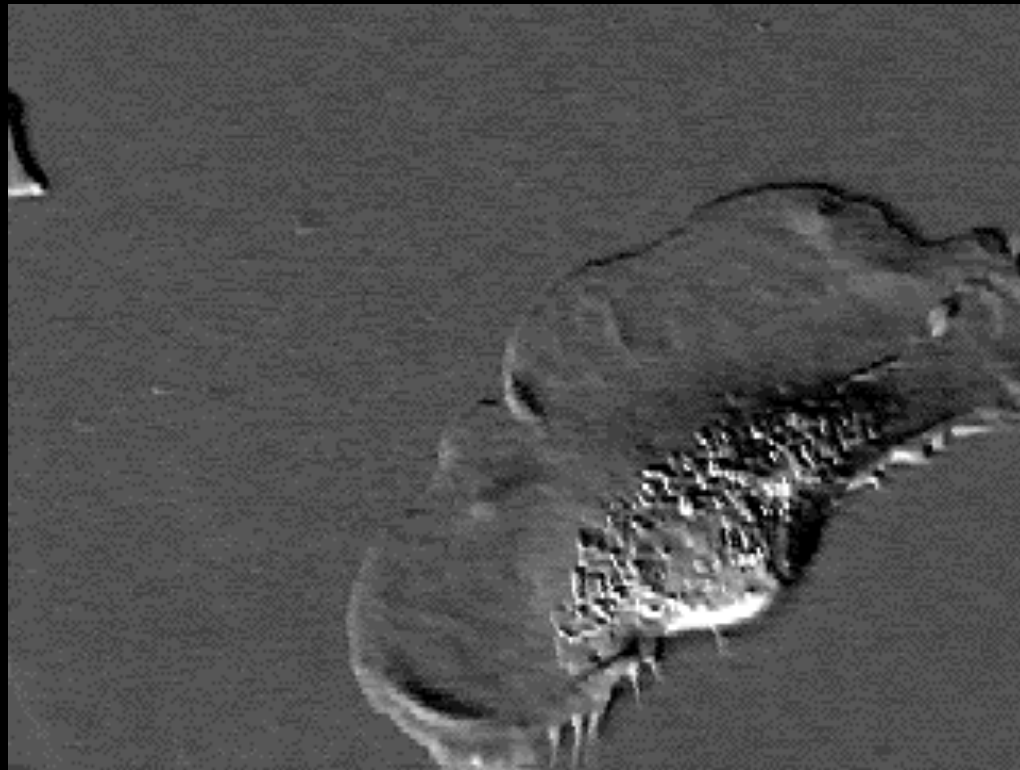


EGYEDI MOLEKULA VIZSGÁLATOK

KELLERMAYER MIKLÓS

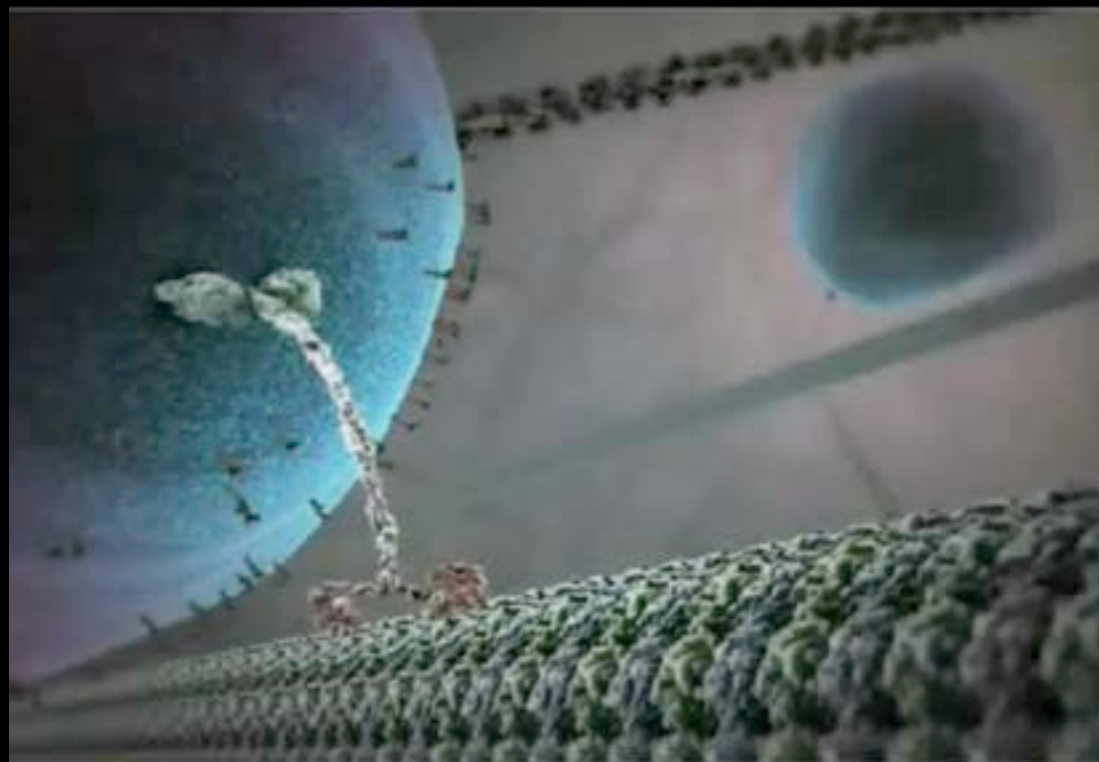
Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



Tovakúszó keratinocita



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transzport kinezinnel



Fehérjeszintézis riboszómán

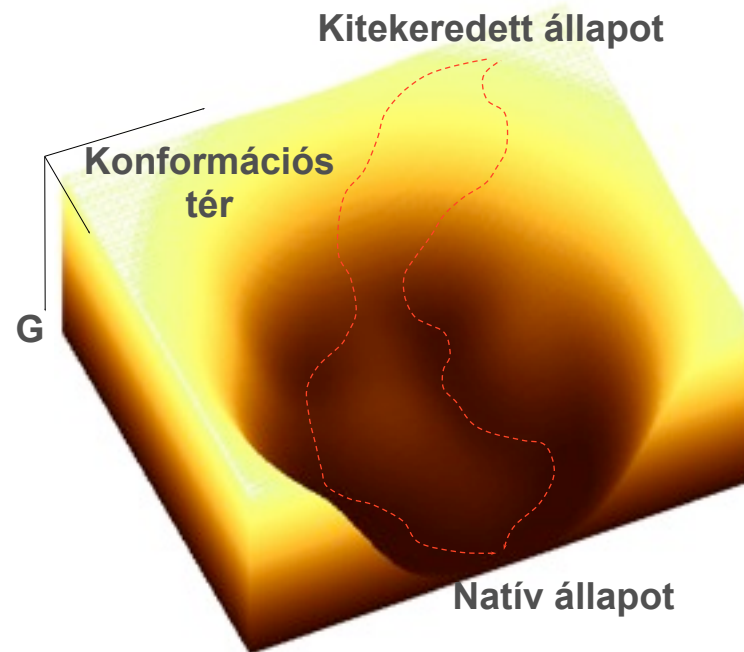
Egyedi molekula vizsgálatok

- Miért vizsgáljunk egyedi molekulákat?
- Az egyedi molekula tudomány rövid története
- Vizsgálható paraméterek (topográfia, fluoreszcencia, erő)
- Egyedi molekulák vizsgálati technikái (fluoreszcencia, mechanika, molekuláris fogantyúk problémája)
- A molekuláris szingularitás (egylépcsős bleaching, erőgörbe)
- Folyamatok az egyedi molekula skálán (fluktuációk, átmenetek)
- Szabadentalpia, aktivációs energia, reakciósebesség, reverzibilitás
- Mechanikai erő hatása az aktivációs kinetikára; mechanokémia
- Példák (fehérjetekeredés, RNS tekeredés, thioredoxin, motorfehérjék)

Miért vizsgáljunk egyedi molekulákat?

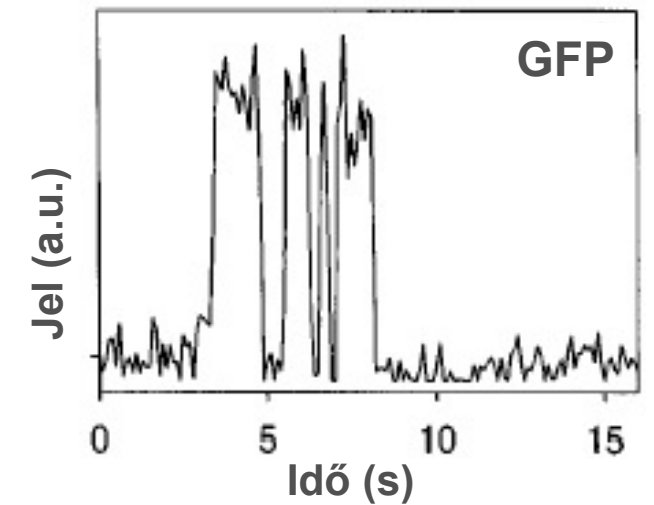
1. Térbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

párhuzamos útvonalakon haladó folyamatok, pl. fehérjegombolyodás



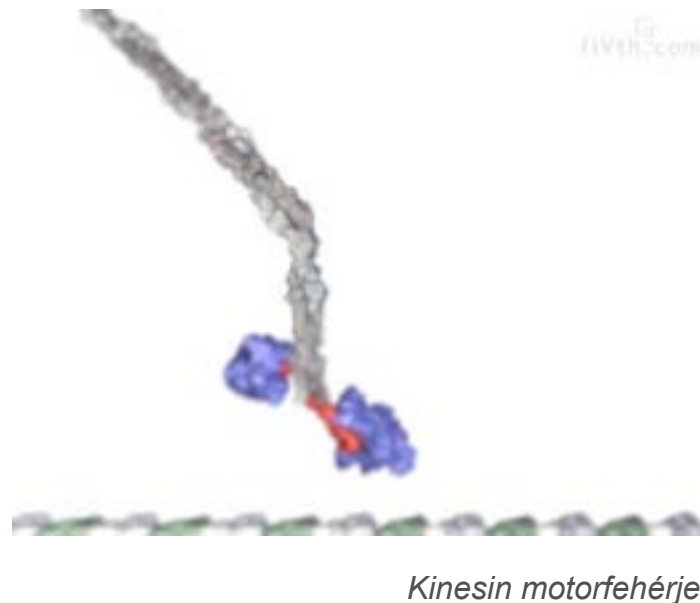
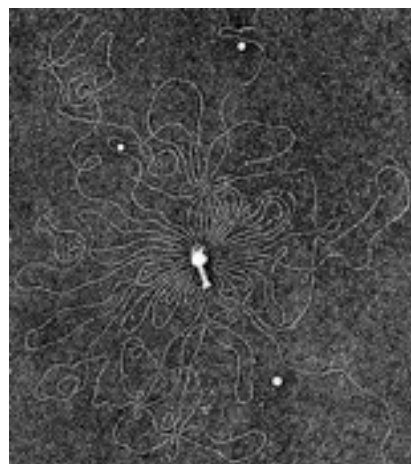
2. Időbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

Sztochasztikus folyamatok, pl. fluorofór pislogás



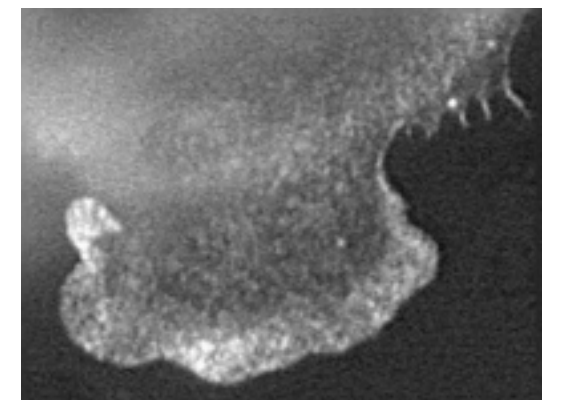
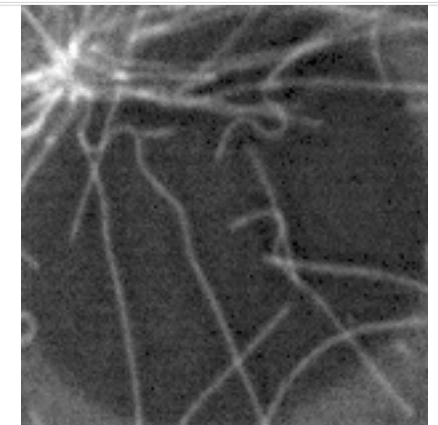
3. Biomolekuláris mechanika

Molekuláris rugalmasság, motorfehérje funkció

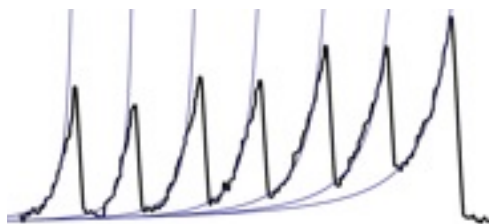


4. Egyedek azonosítása, követése sokaságban

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



Egyedi molekula tudomány története



1976: Egyetlen antitestmolekula fluoreszcencia mikroszkópos felvétele

1986: J. Spudich, T. Yanagida, in vitro motilitási próba

1991: J. Spudich, T. Yanagida, J. Molloy, egyedi miozin mechanika

1994: T. Yanagida, egyetlen ATP turnover miozinon

1994: K. Svoboda, S. Block, egyedi kinesin mechanika

1996: C. Bustamante, D. Bensimon, DNS molekula megnyújtása

1996: T. Ha, S. Weiss, egy-molekulapár FRET

1997: W. E. Moerner, GFP pislogás

1997: M. Kellermayer, M. Rief, L. Tskhovrebova, titin megnyújtás (első fehérje)

1998: Kinosita, F1F0 ATPase lépési kinetika

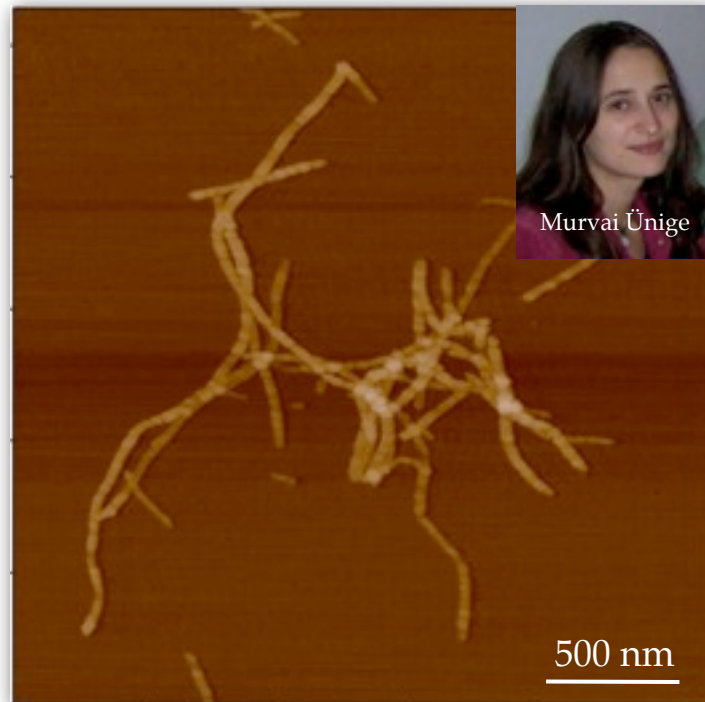
1998: J. Fernandez, genetikai poliprotein mechanika

2001: J. Liphardt, C. Bustamante, RNS megnyújtása

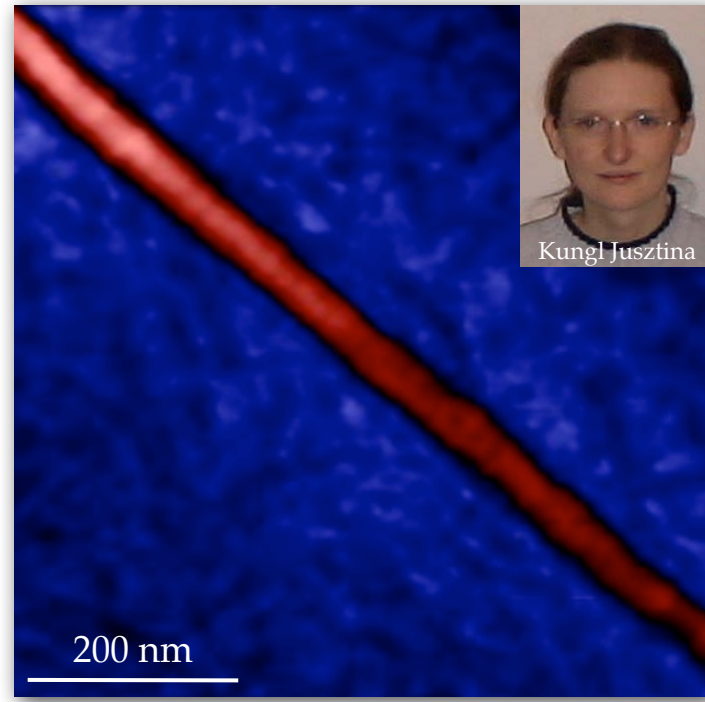
2004: J. Fernandez, egyedi fehérjemolekula folding

2008: Bustamante, Tinoco: riboszóma mechanika

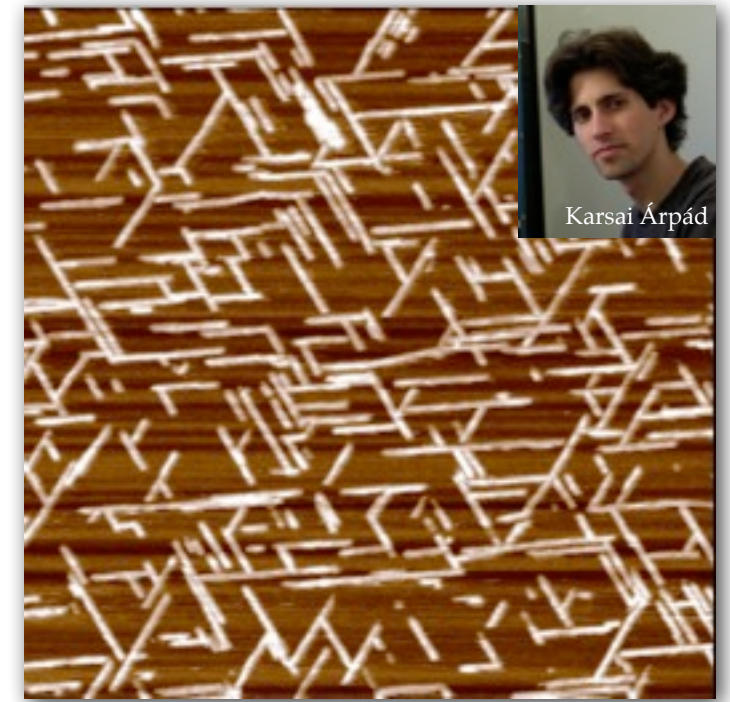
Vizsgálható paraméterek: topográfia



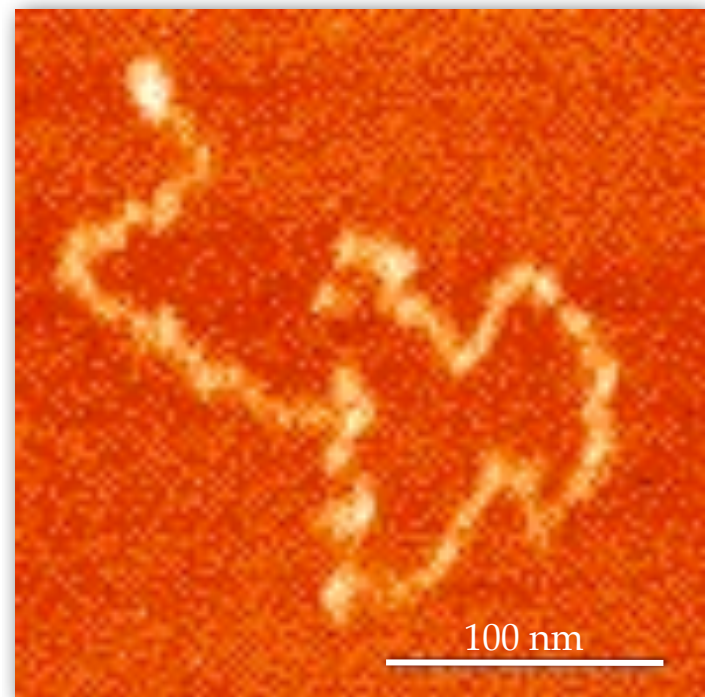
Amyloid β 1-42



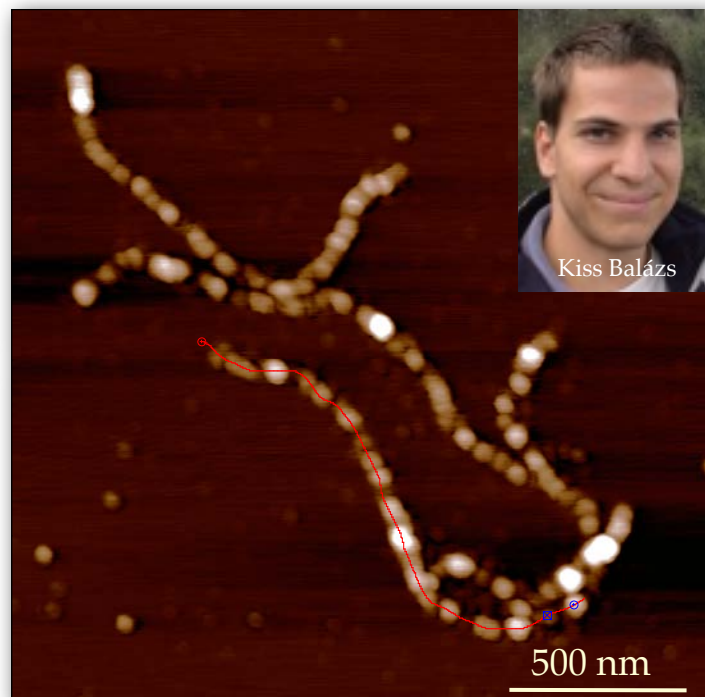
Fibrin protofibrillum



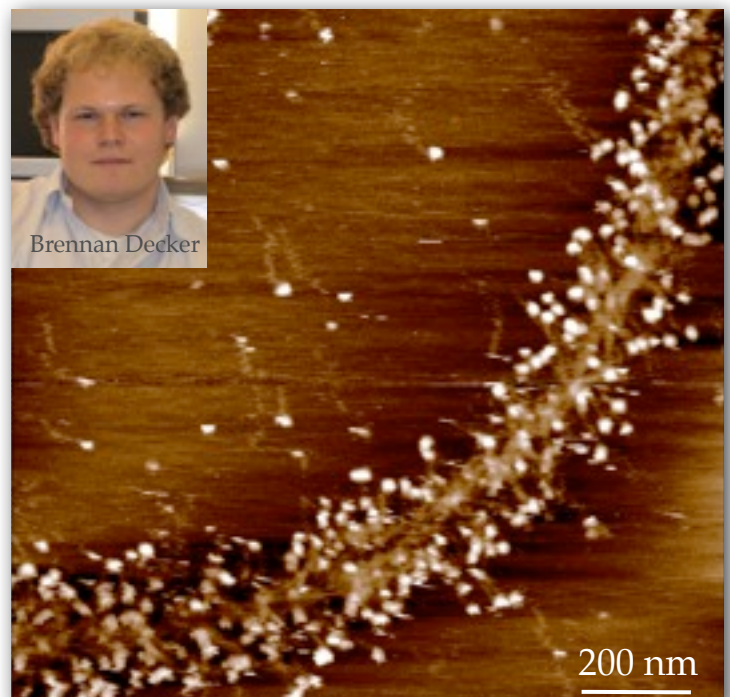
Amyloid β 25-35



Titinmolekula

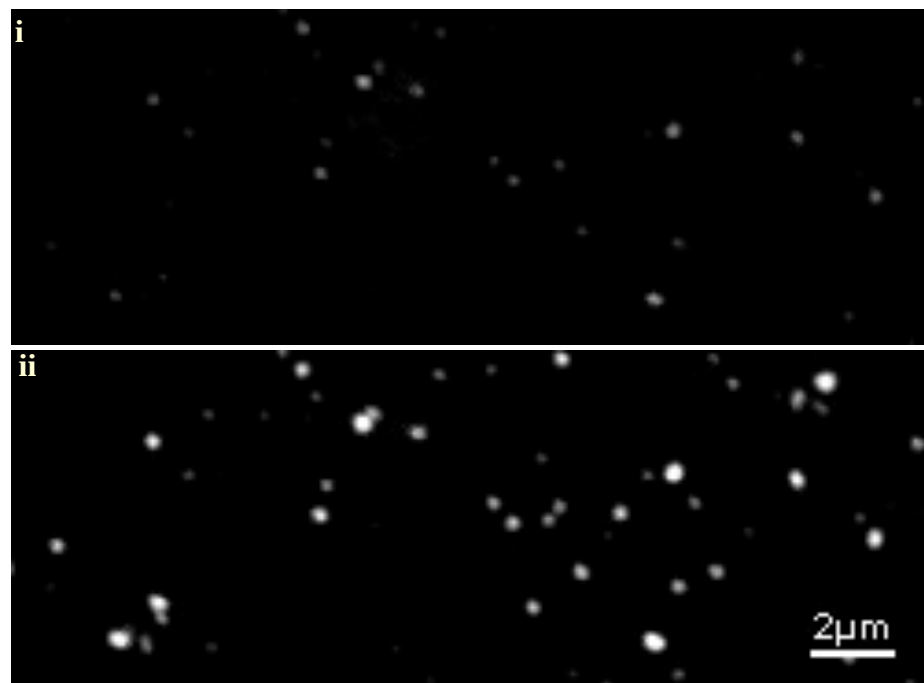
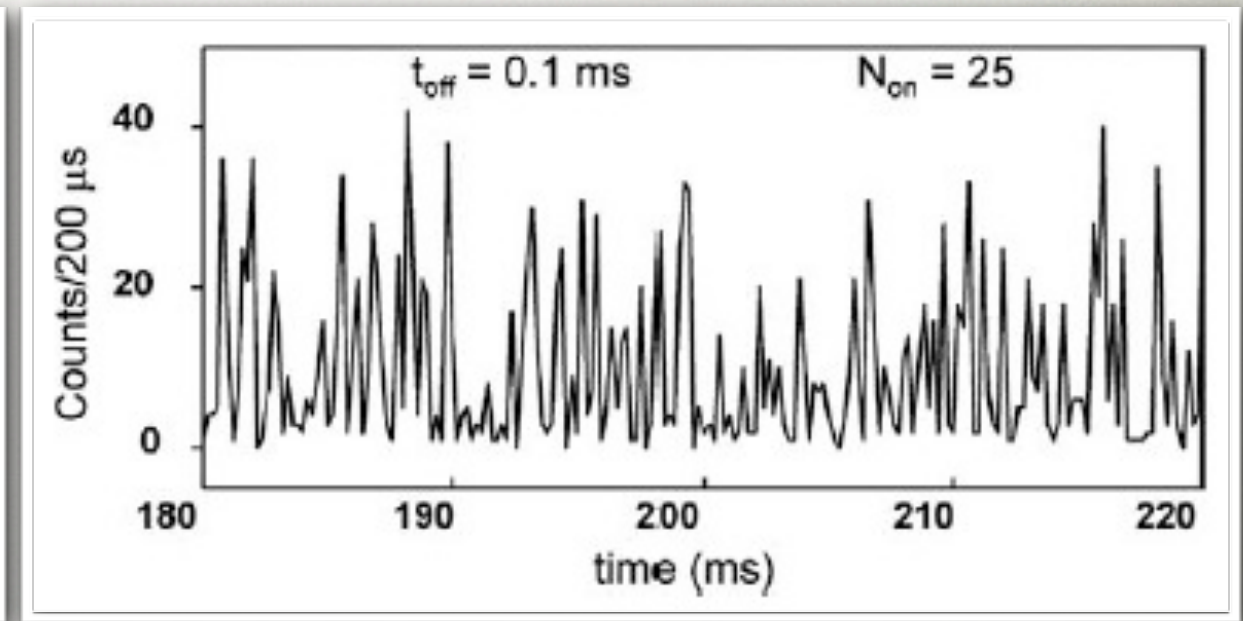
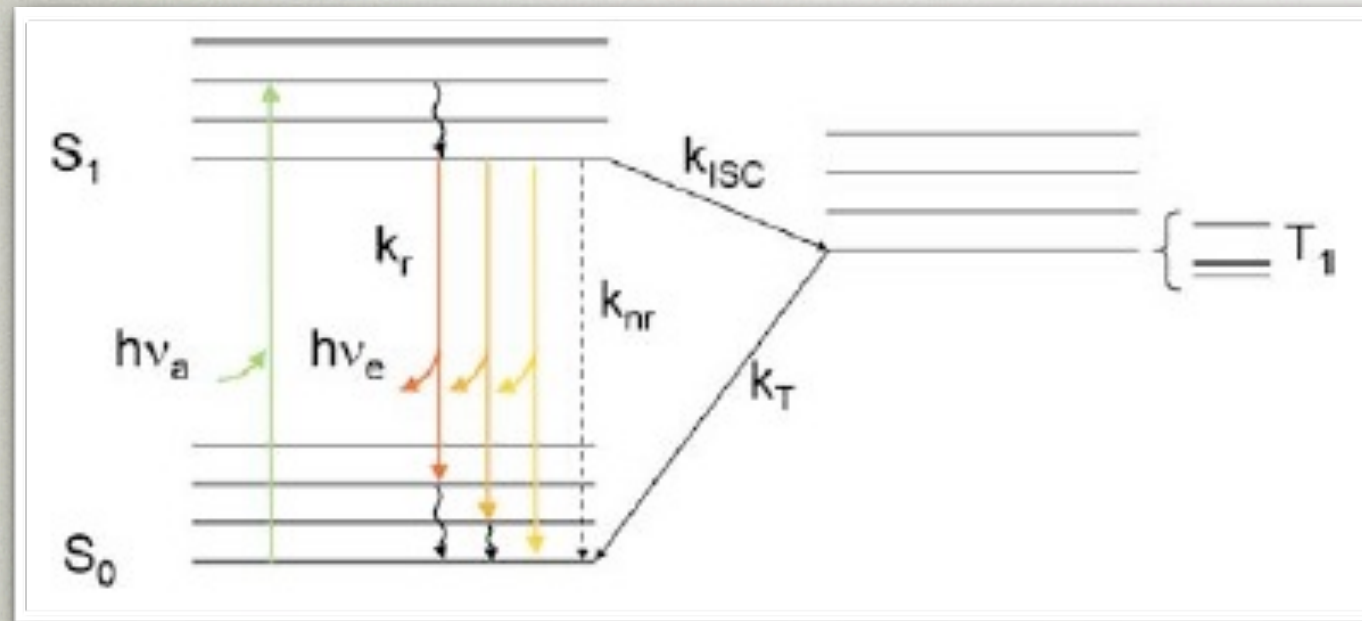


Desmin filamentum

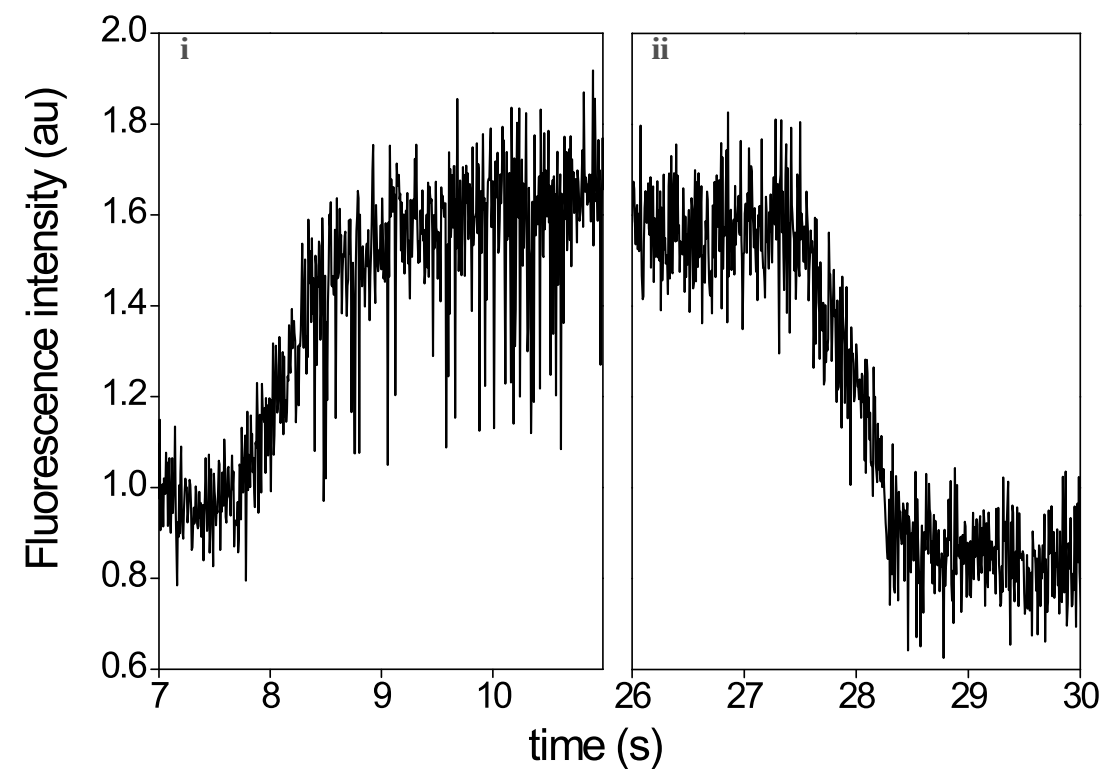


Miozin vastag filamentum

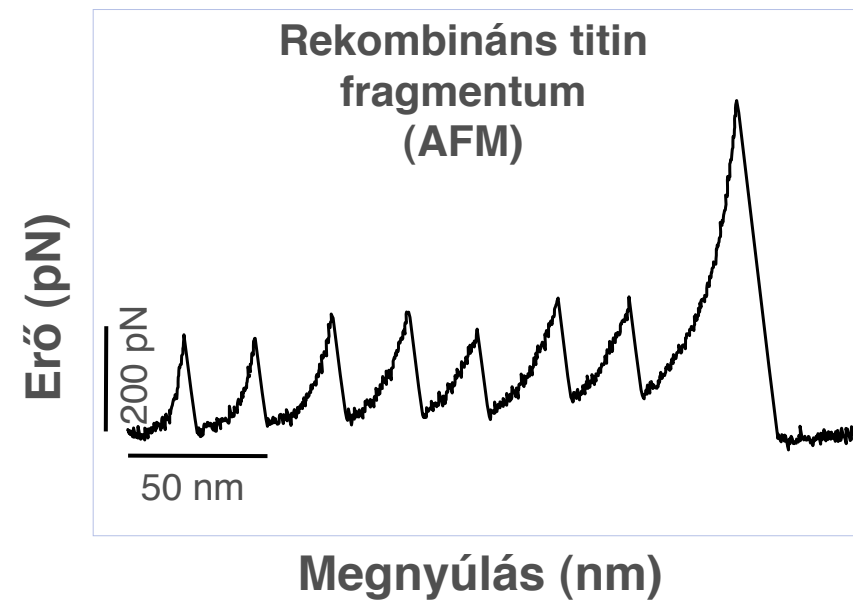
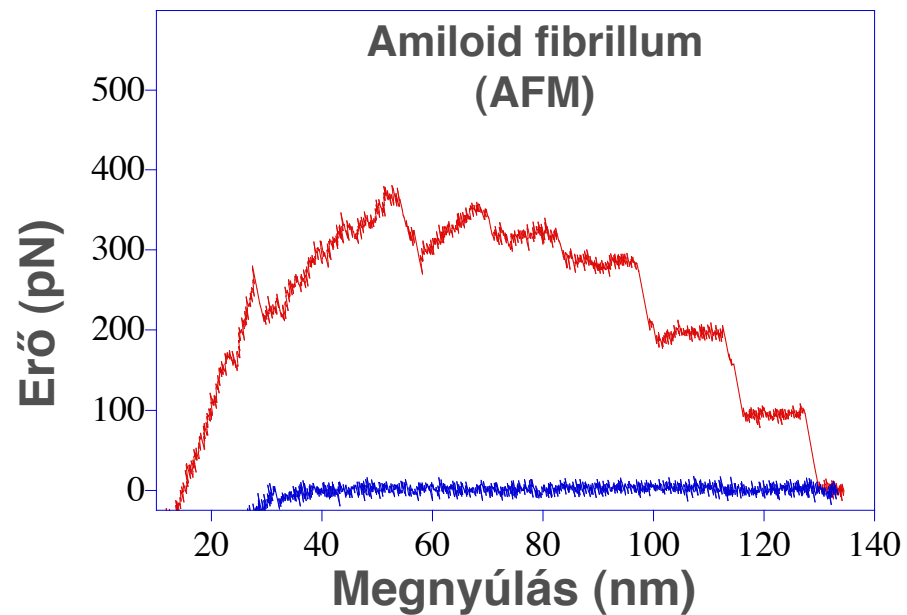
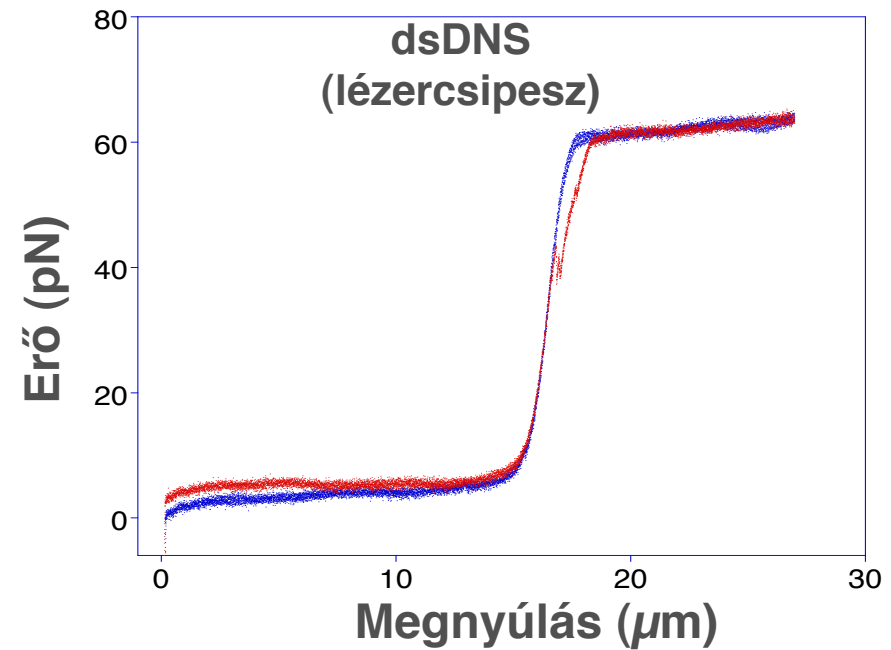
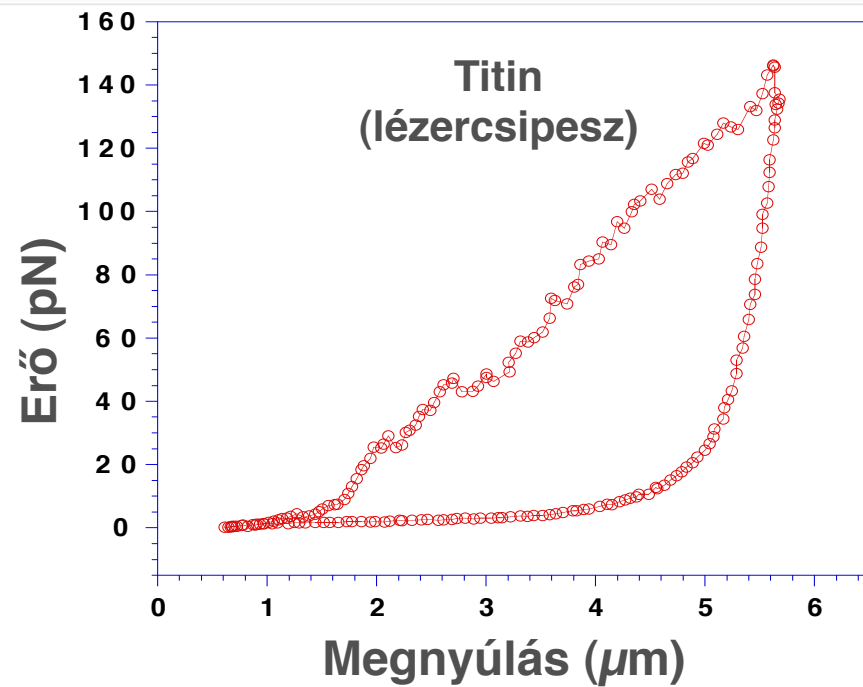
Vizsgálható paraméterek: Fluoreszcencia



TRITC-jelölt titinmolekulák



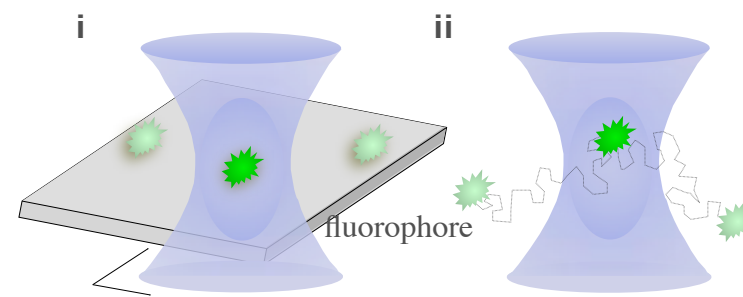
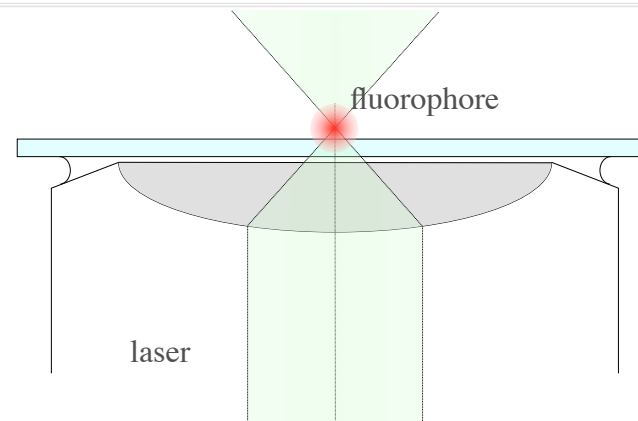
Vizsgálható paraméterek: erő



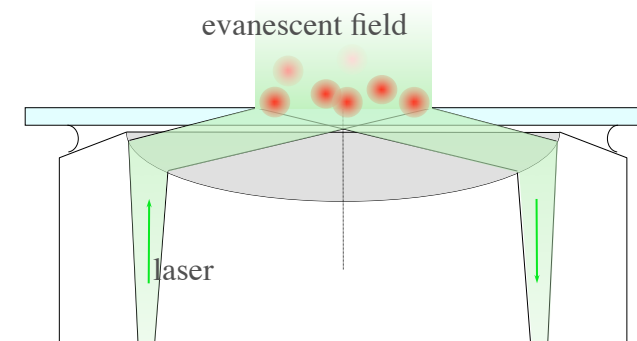
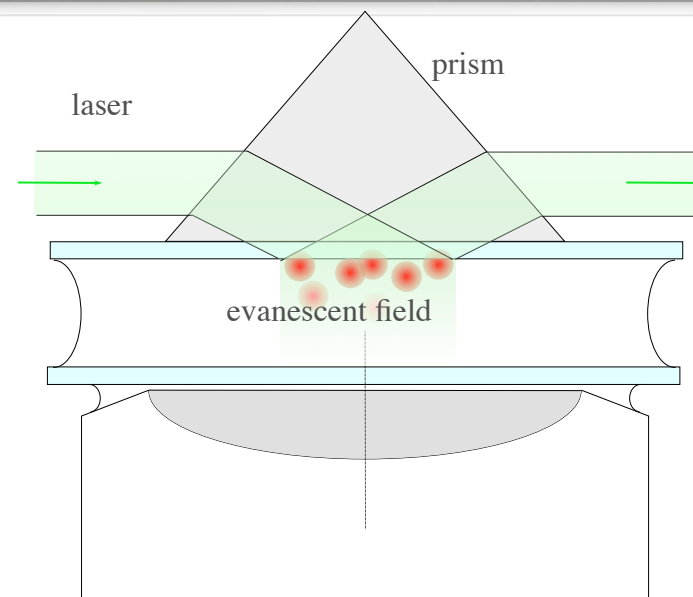
RUGALMASSÁG + SZERKEZETI VÁLTOZÁS ("ÁTMENET")

Egyedi molekulák vizsgálata: fluoreszcencia technikák

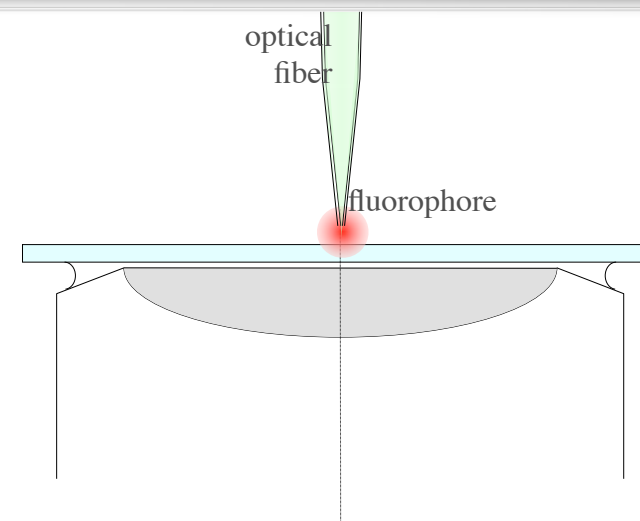
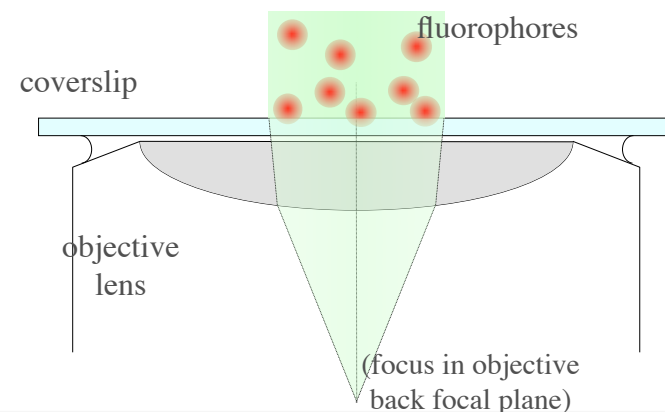
**Konfokális
mikroszkópia**



**TIRF
mikroszkópia**

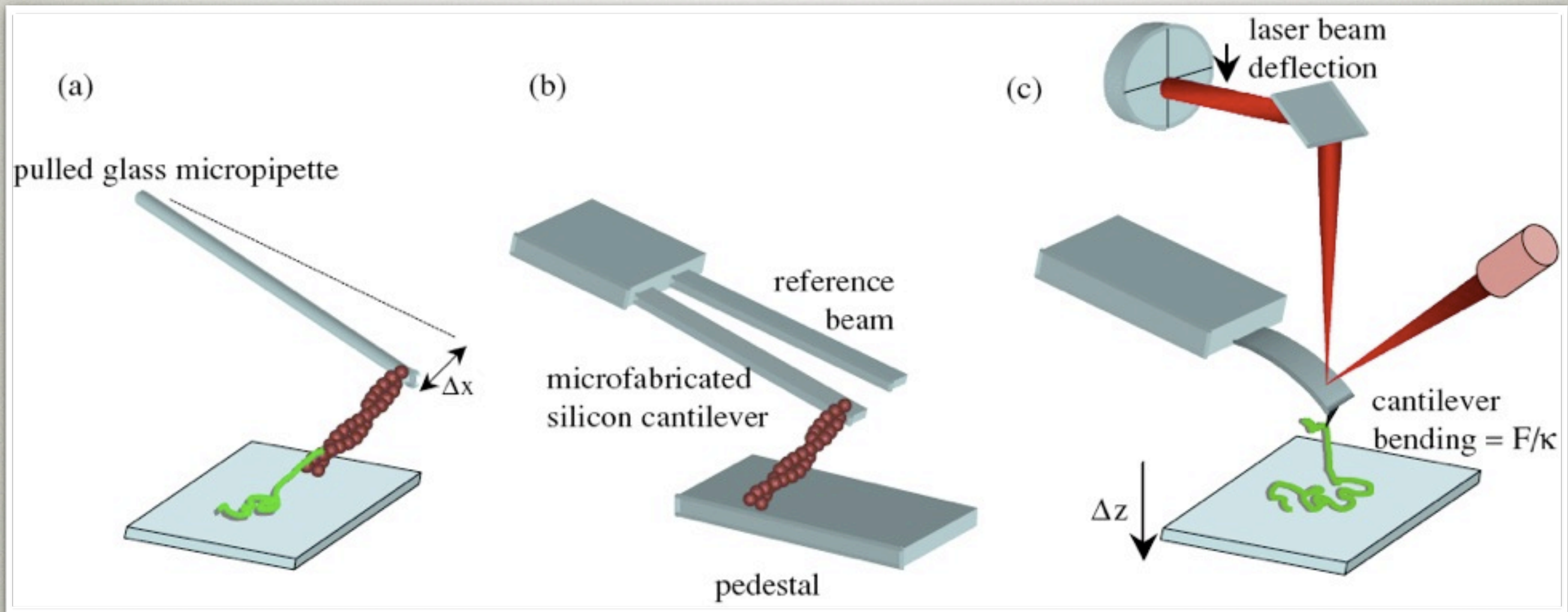


**Epifluoreszcencia
mikroszkópia**

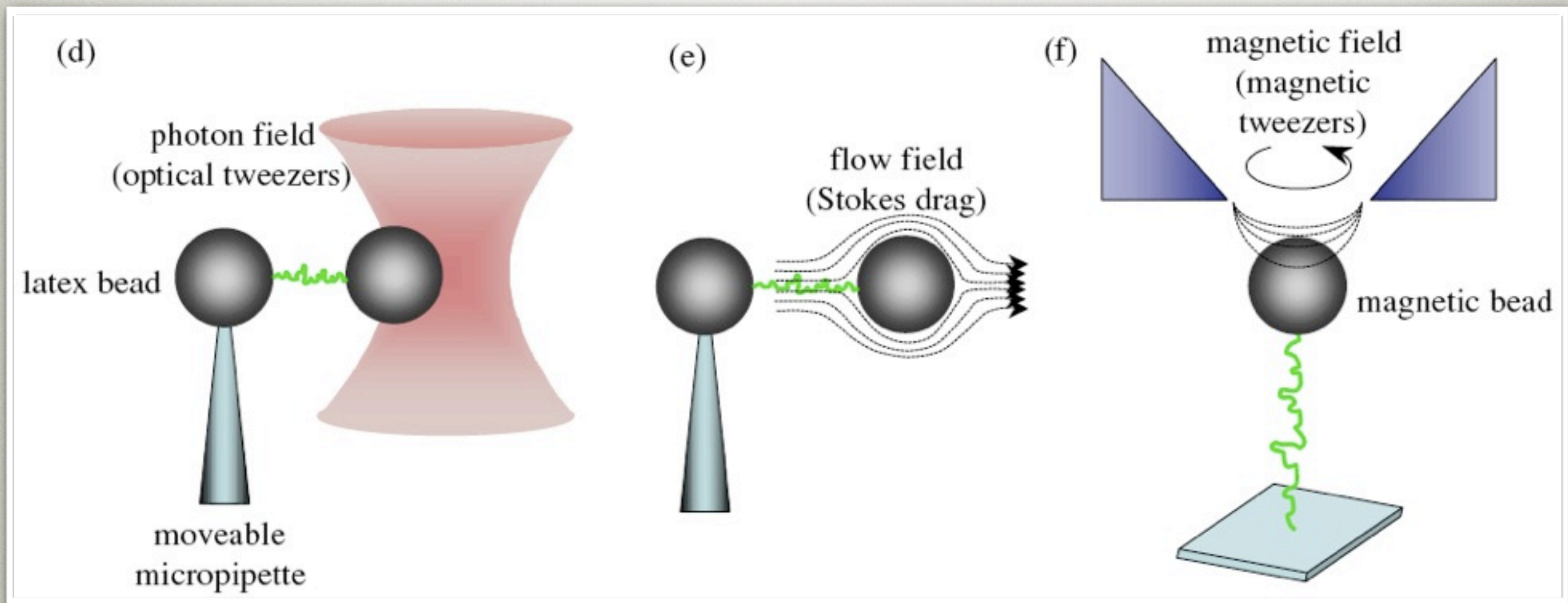


NSOM

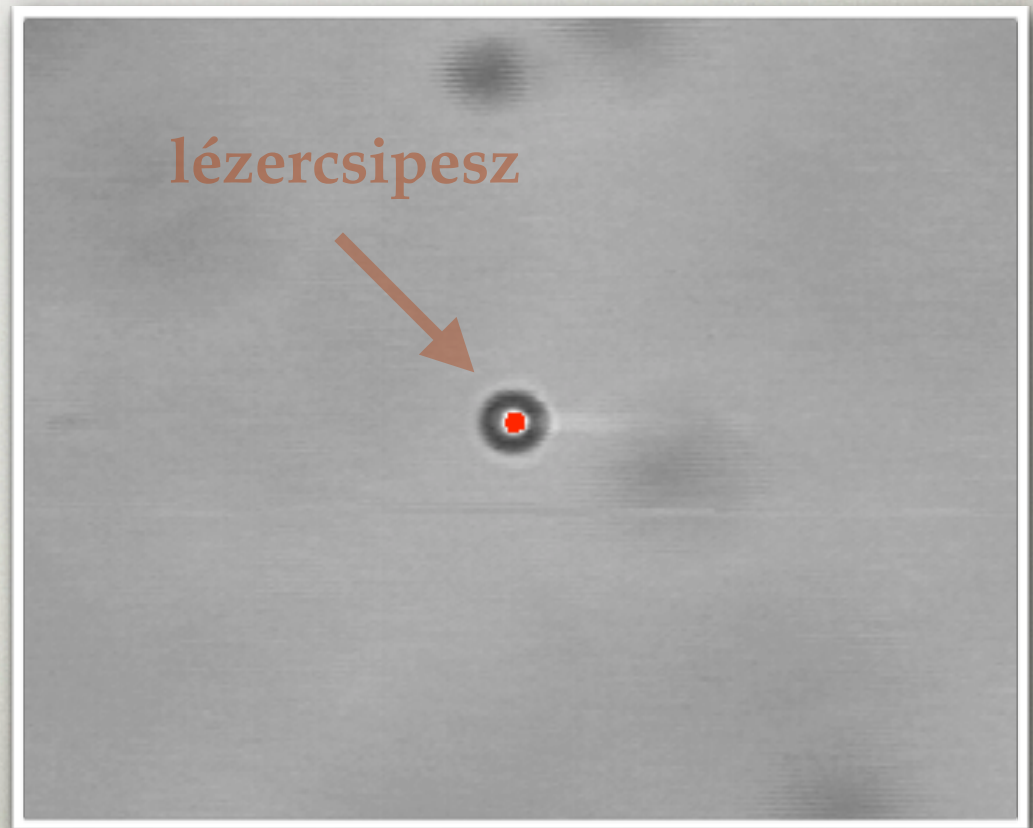
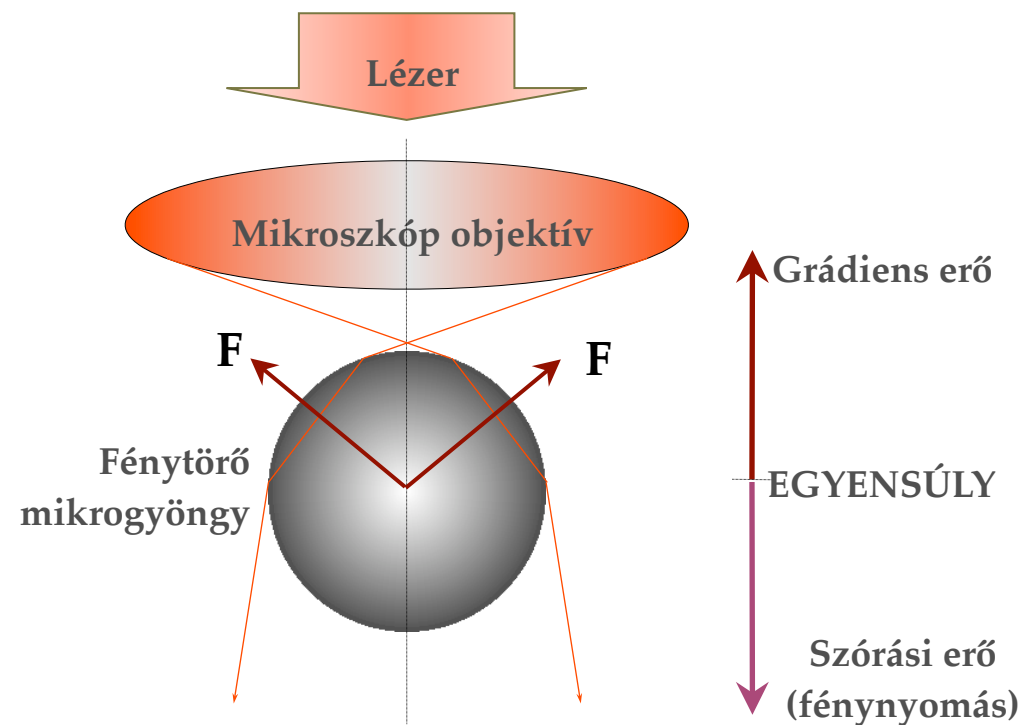
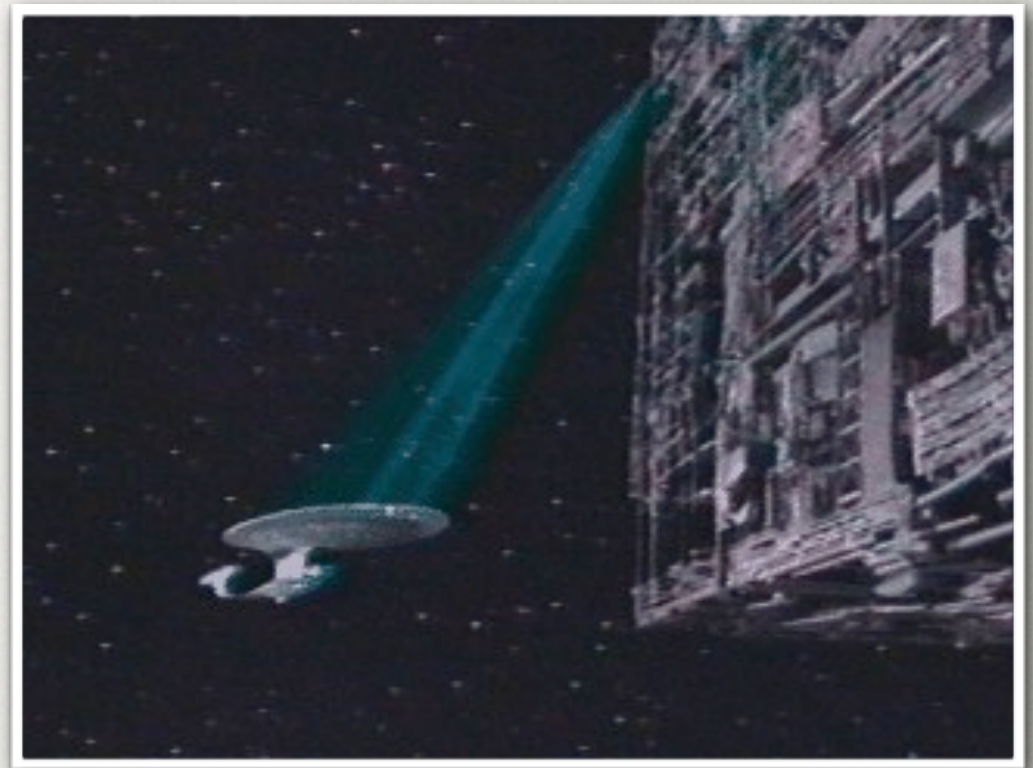
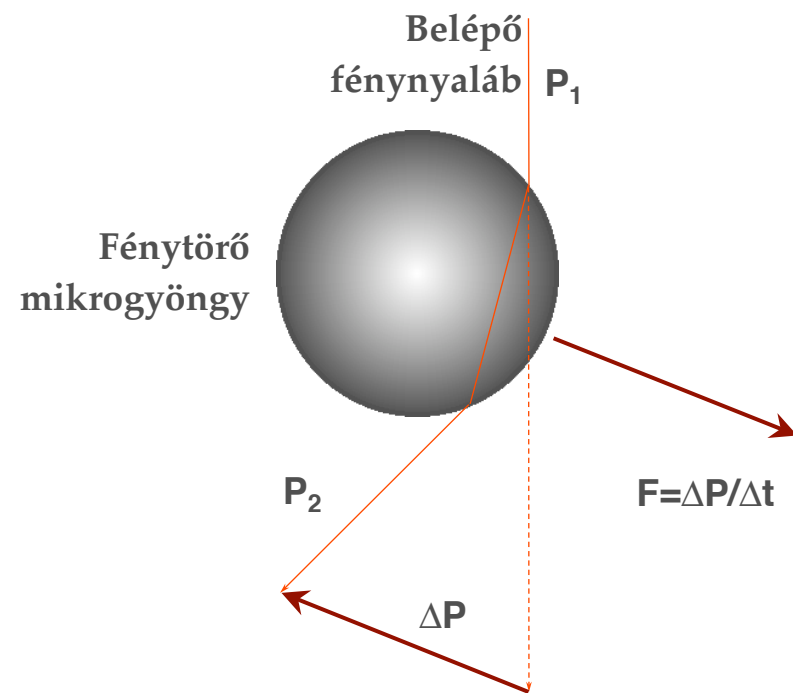
Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció rugólapka technikákkal



Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció mező alapú technikákkal

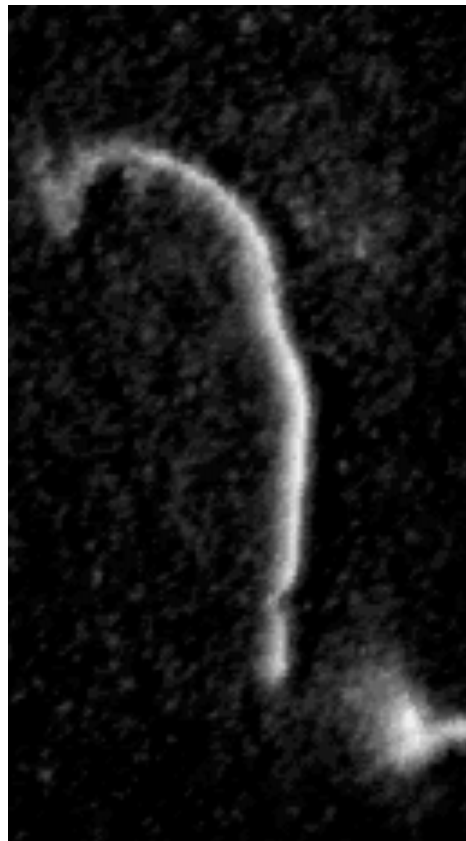


A lézersipesz

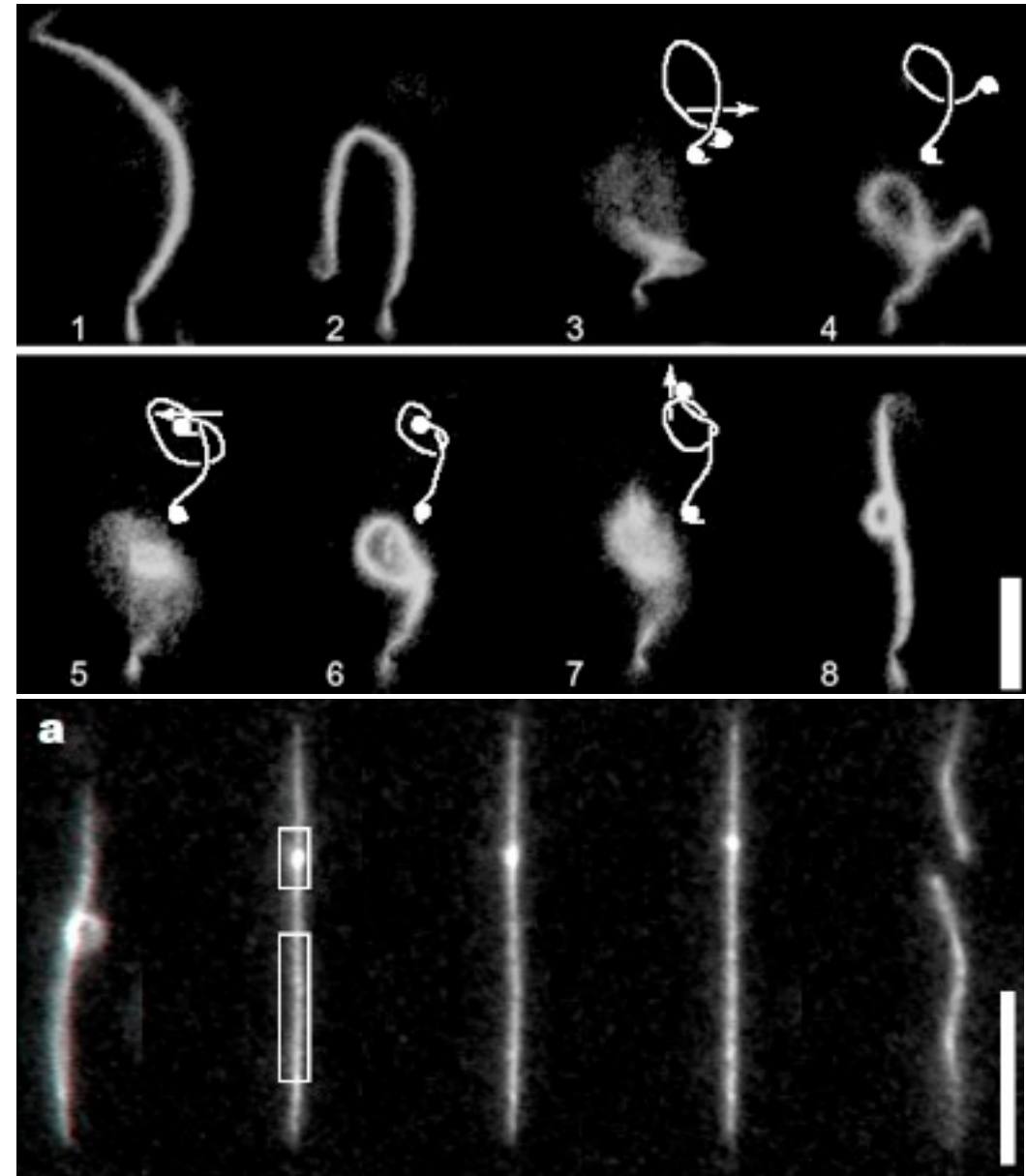


Csomókötés egyetlen aktin filamentumra lézercsipesssel

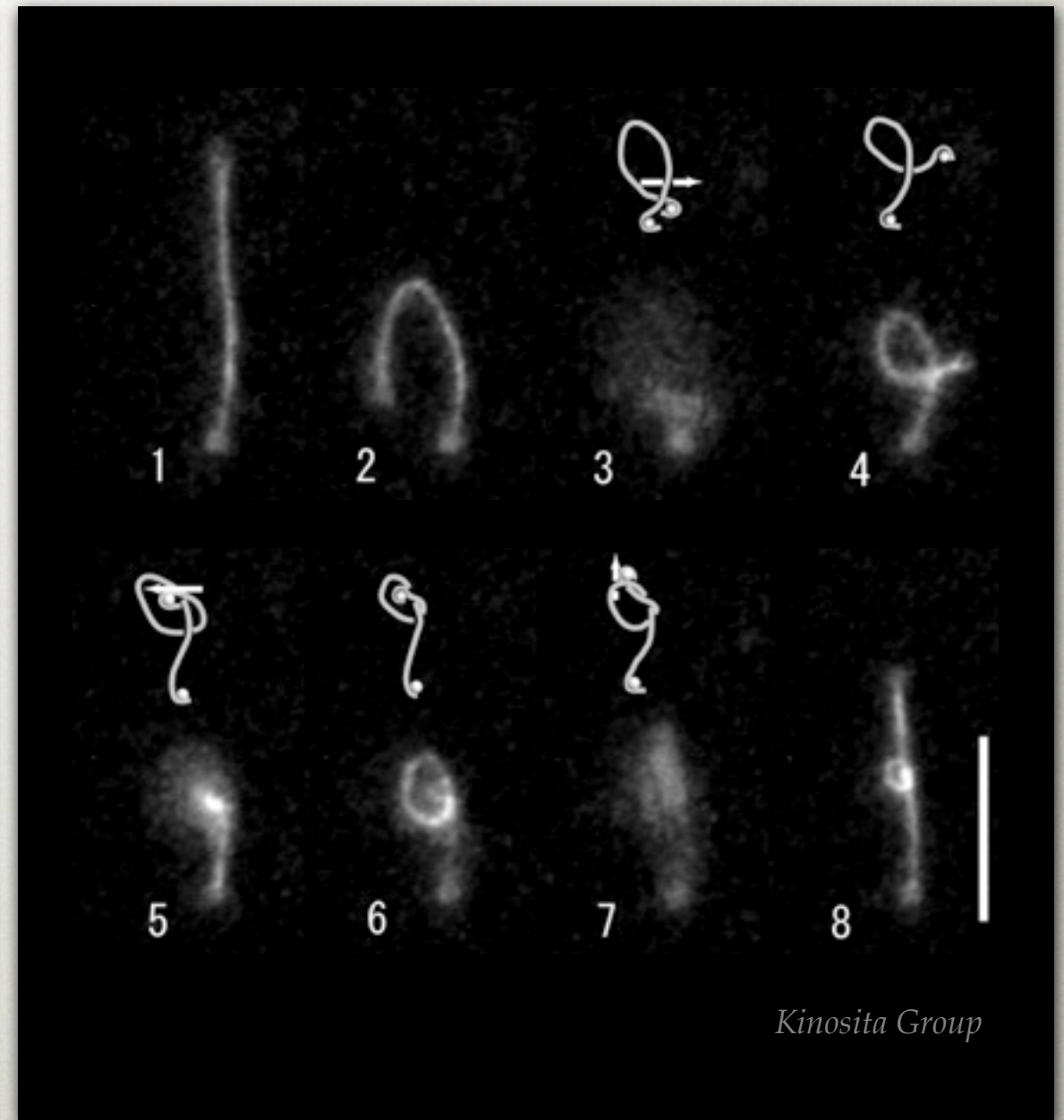
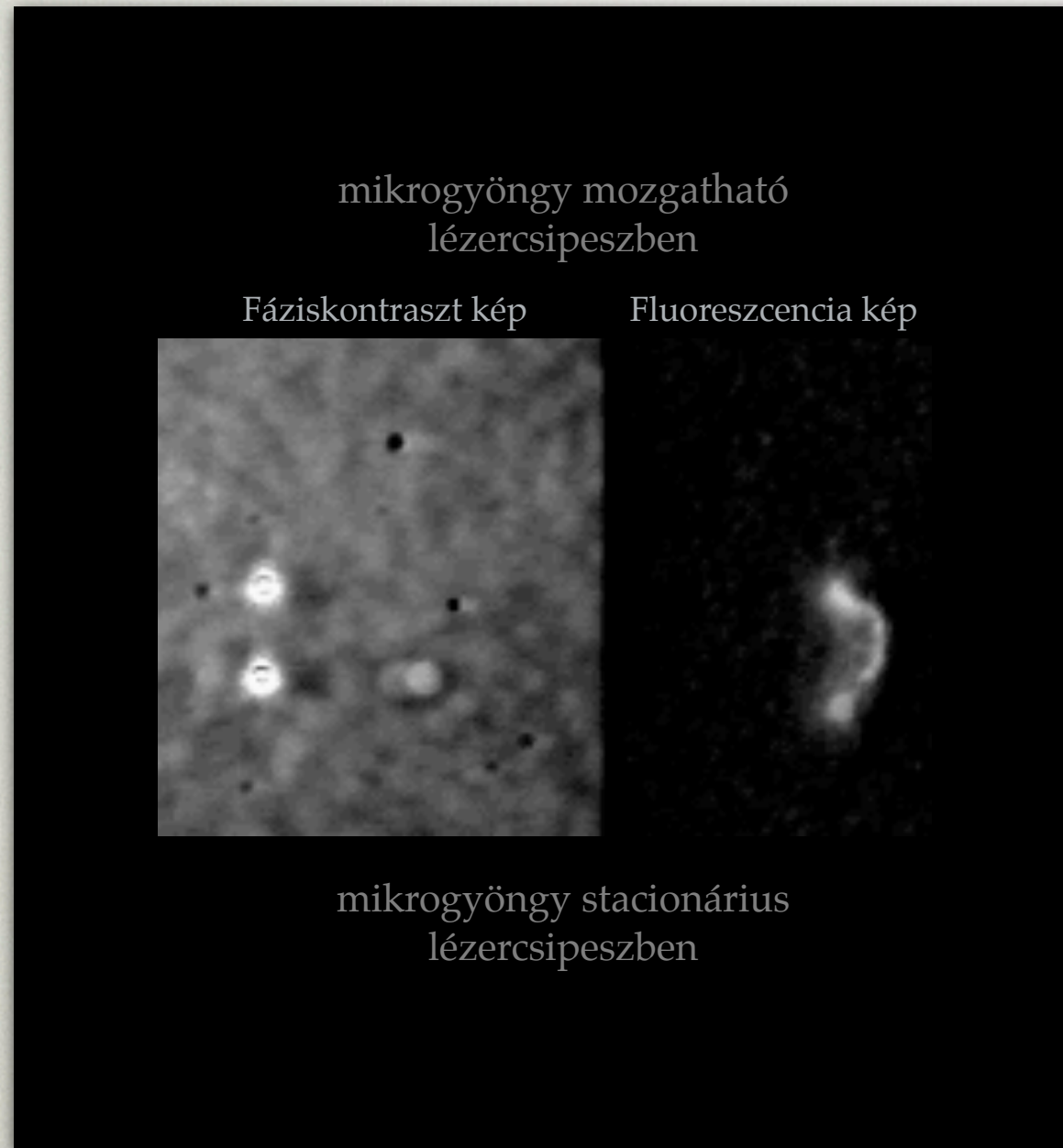
Aktin filamentum manipuláció



Arai et al. Nature 399, 446, 1999.

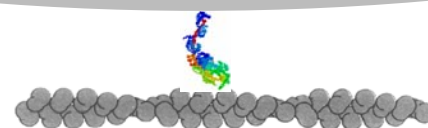


Csomókötés egyetlen DNS láncra



Molekuláris fogantyúk problémája

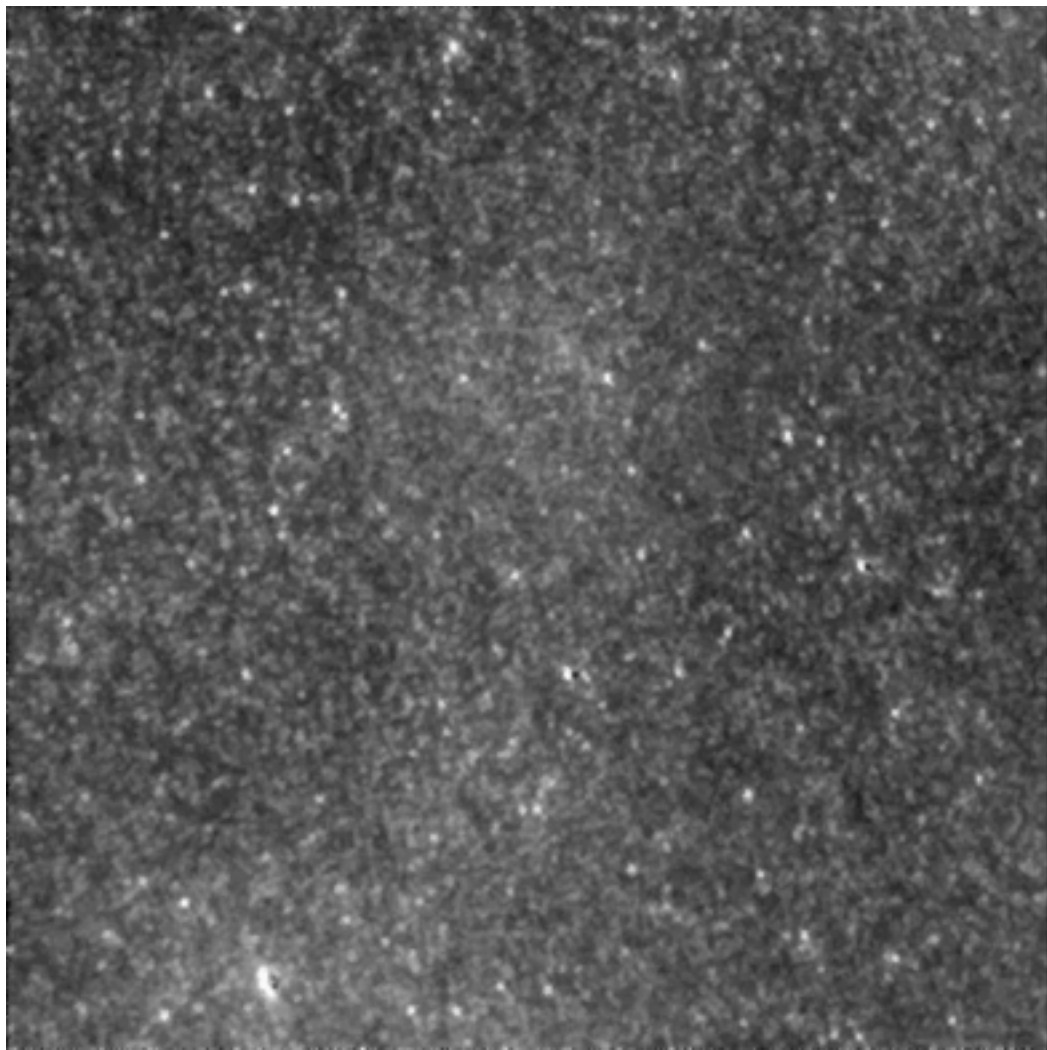
mikrogyöngy $\sim 1 \mu\text{m}$



molekula $\sim 10 \text{ nm}$

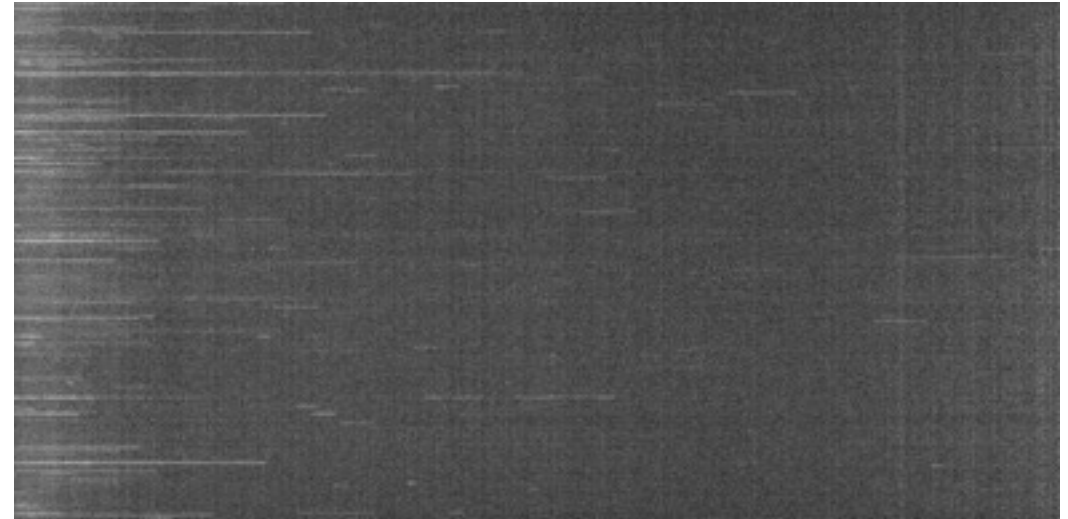
Molekuláris szingularitás: egylépcsős photobleaching

TIRFM

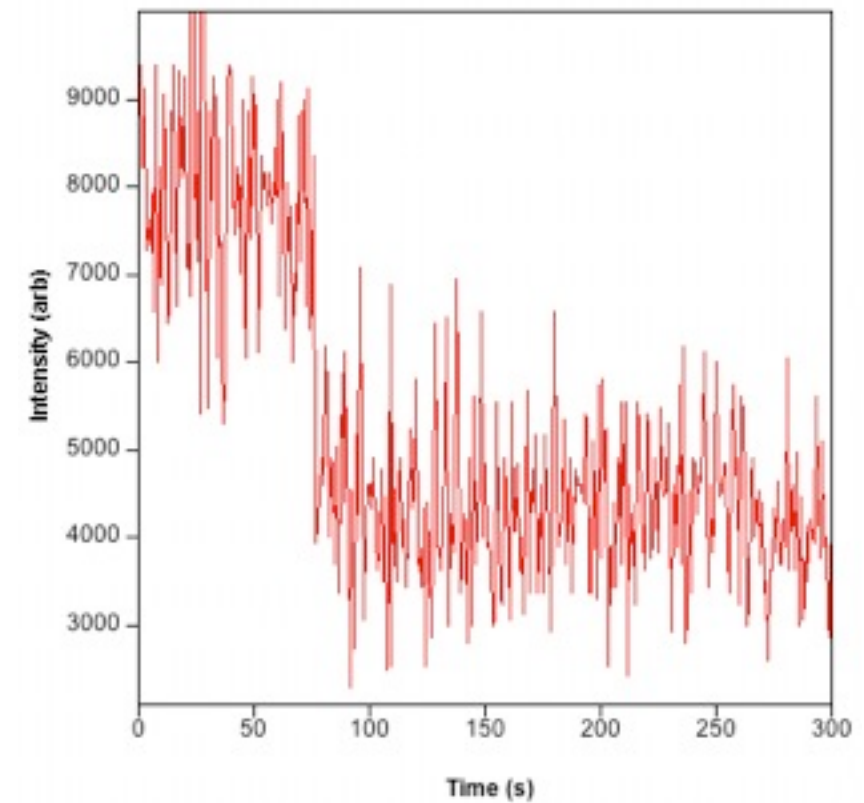


Alexa-488-PGK

Kimogram

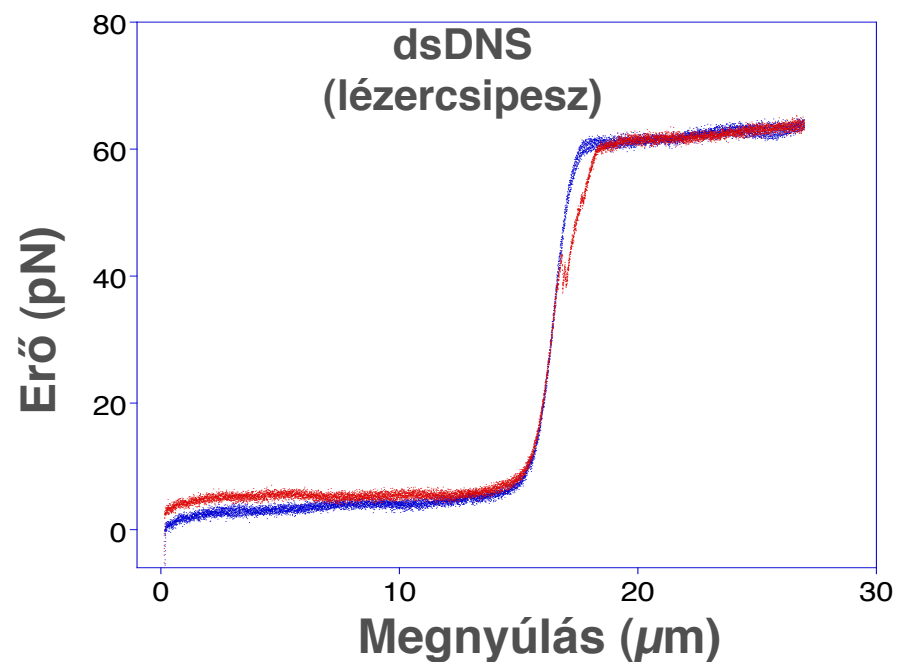
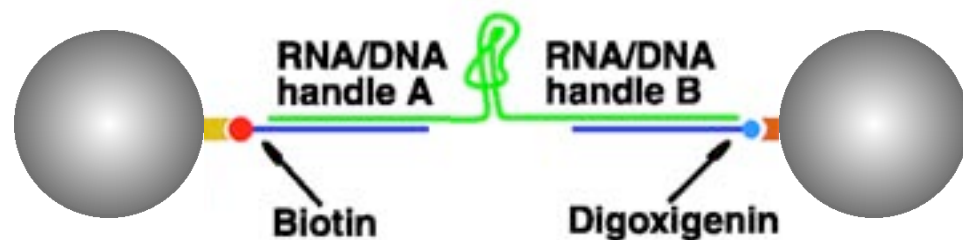


Idő →



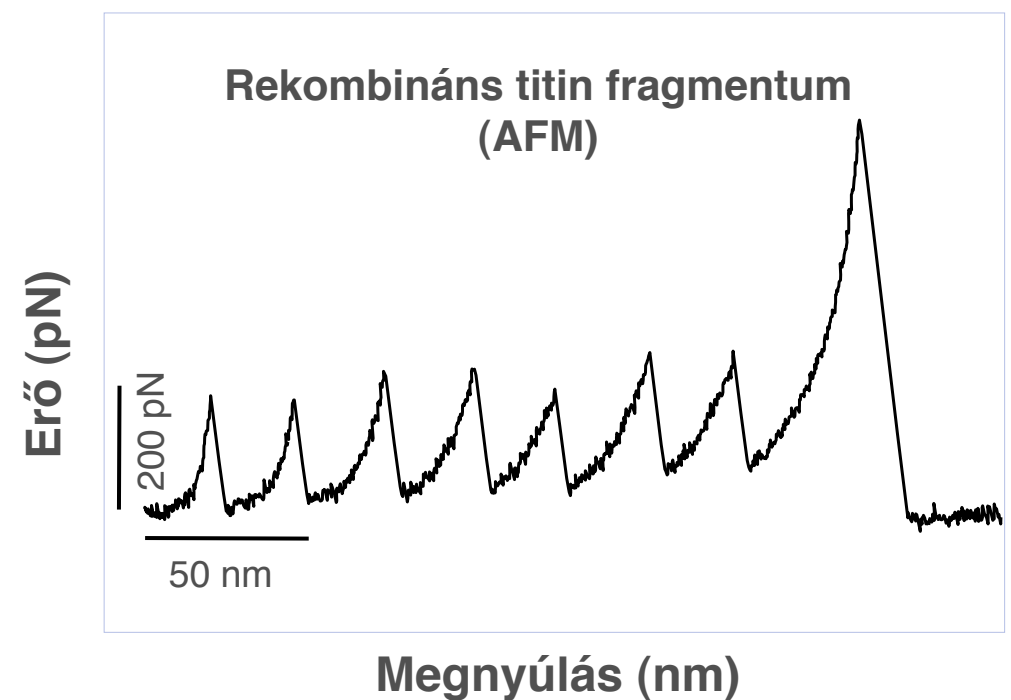
Molekuláris szingularitás: nanomechanikai ujjlenyomat

DNS fogantyú



Kooperatív átmenet 65 pN-nál
DNS-RNS hibrid

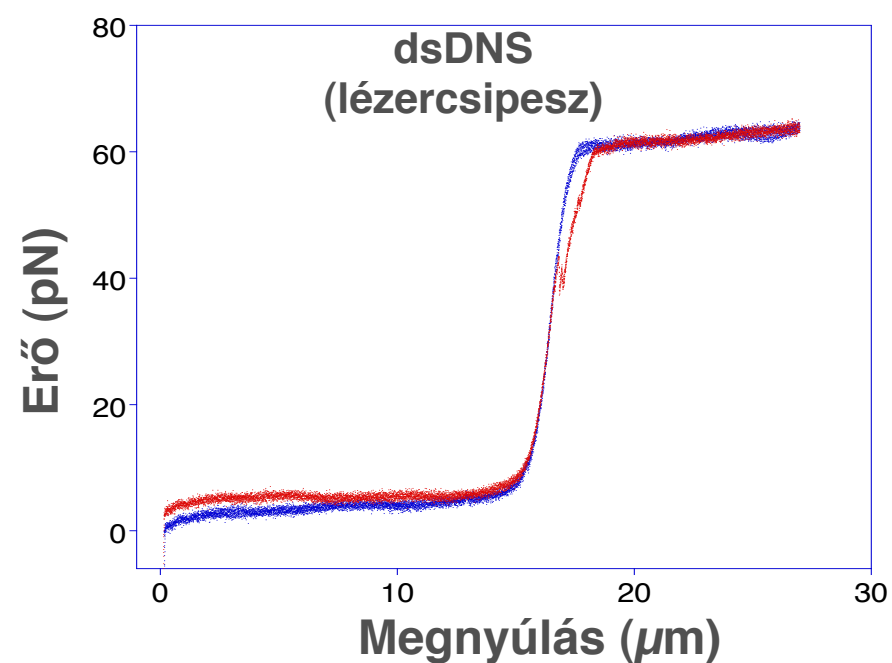
Rekombináns poliprotein



Fűrészfog alakú átmenetek
Egyenlő távolság a fogak között

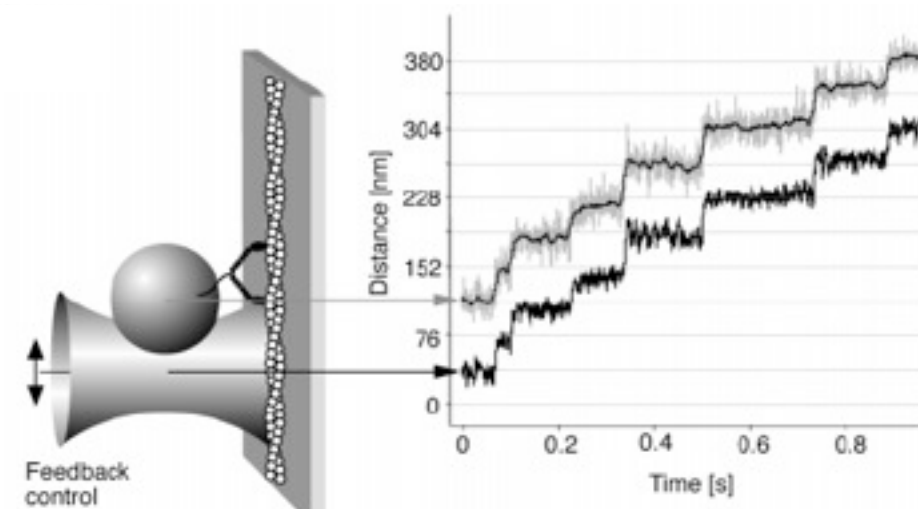
Folyamatok az egyedi molekula skálán

Kooperatív erőátmenet

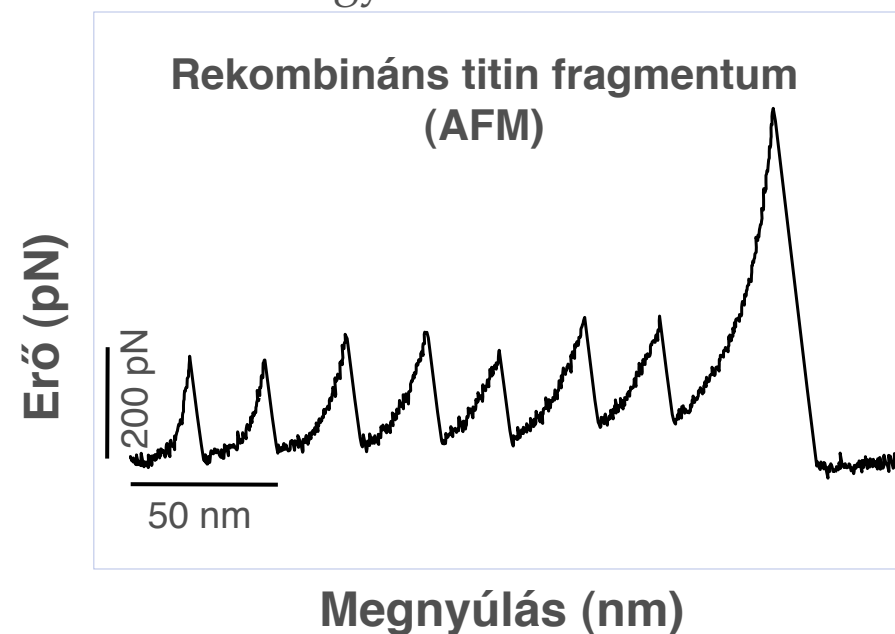


Diszkrét lépések:

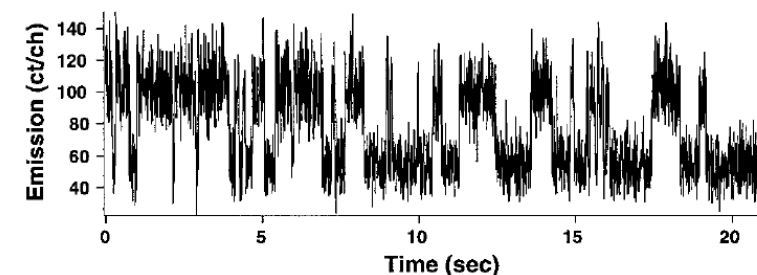
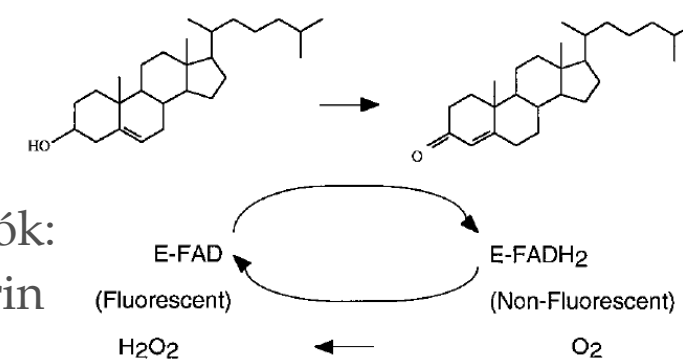
Miozin V - processzív motor



Minden-vagy-semmi erőátmenet



Fluktuációk:
Koleszterin
oxidáz



“Bulk versus single”

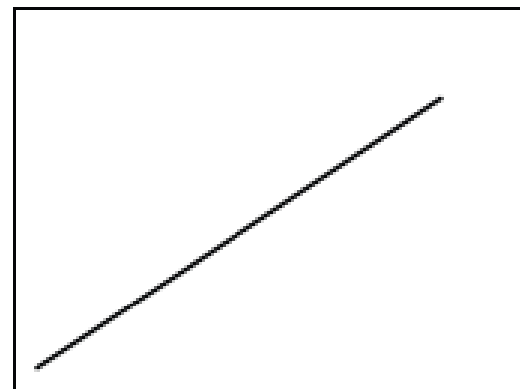
Többszörös turnover

Egy (egyedi) turnover

BULK

(a)

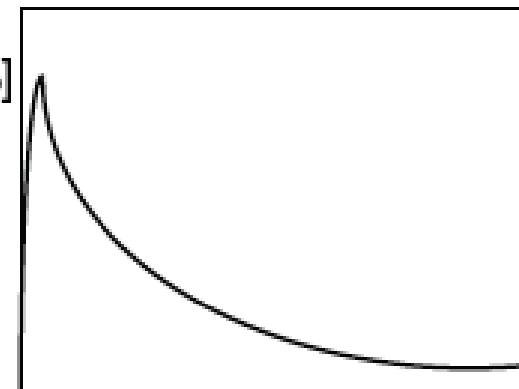
[Product]



Time

(b)

[ES]



Time

(c)

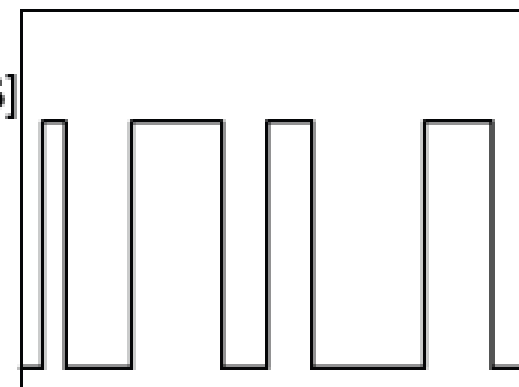
[Product]



Time

(d)

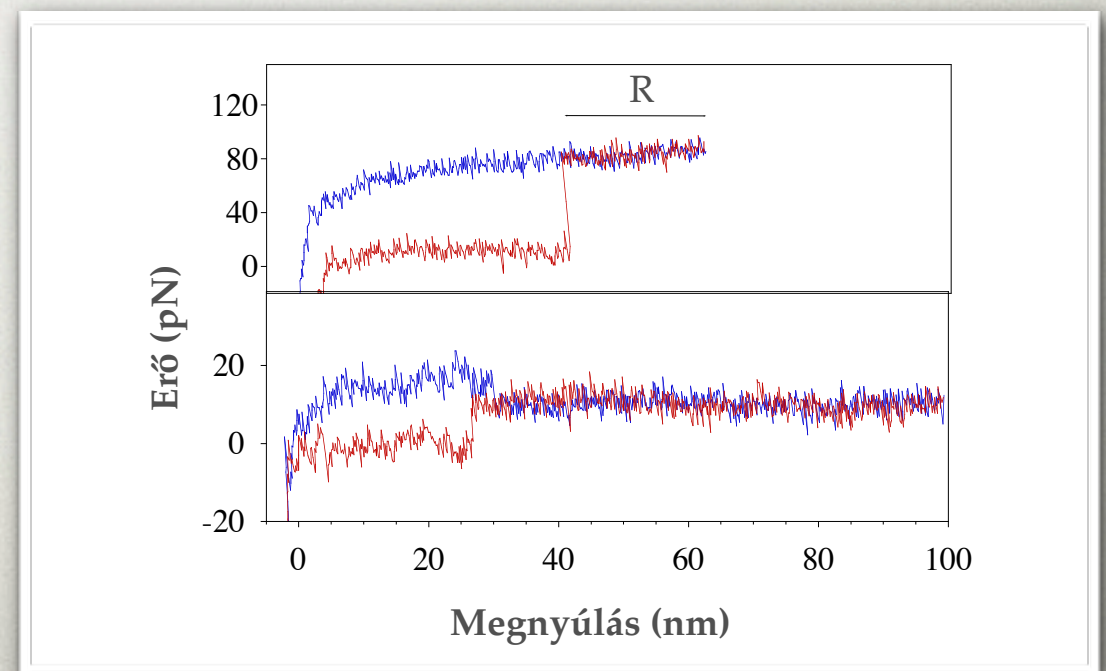
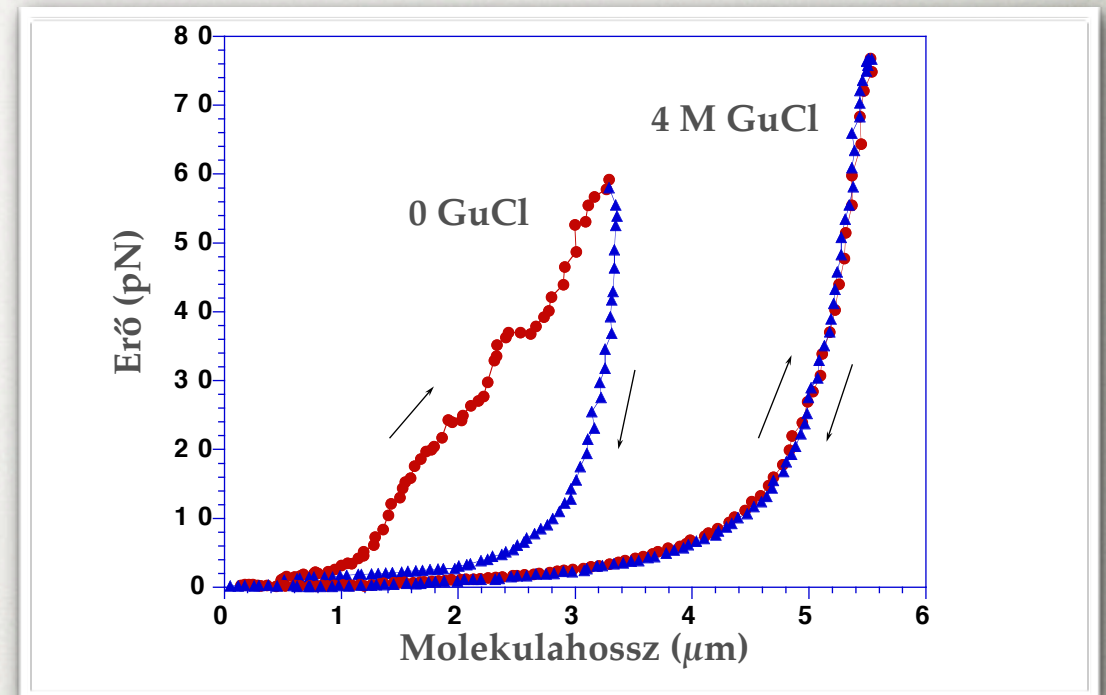
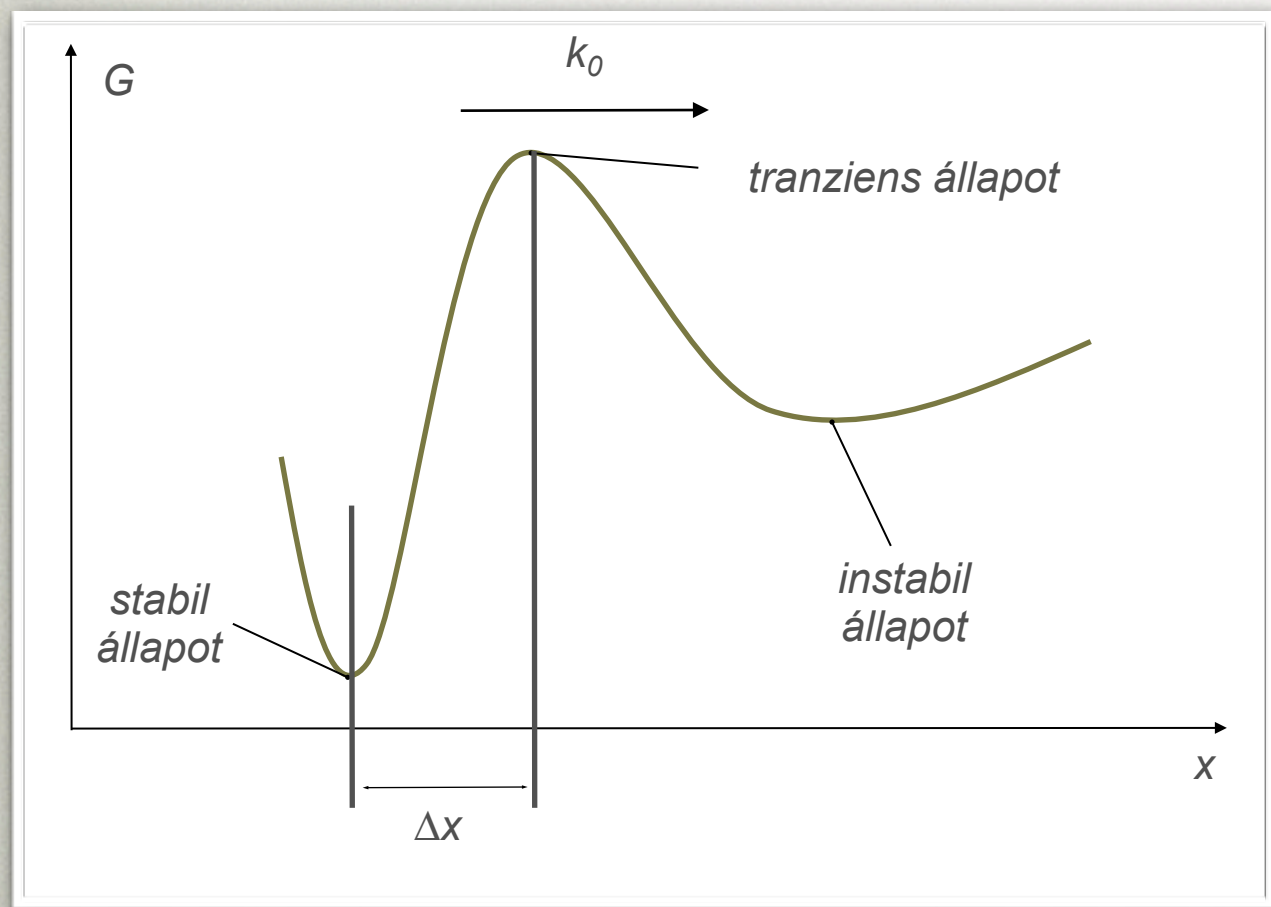
[ES]



Time

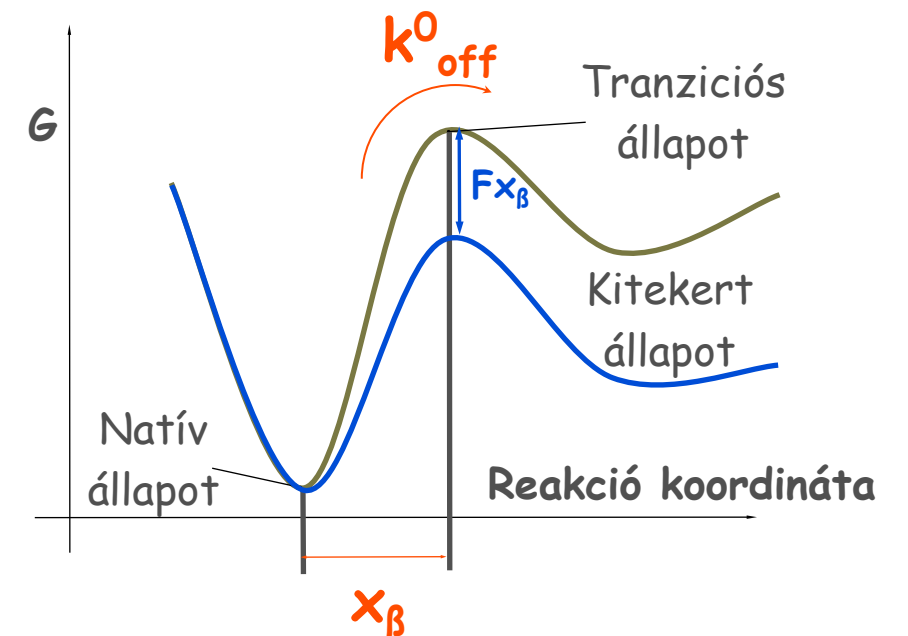
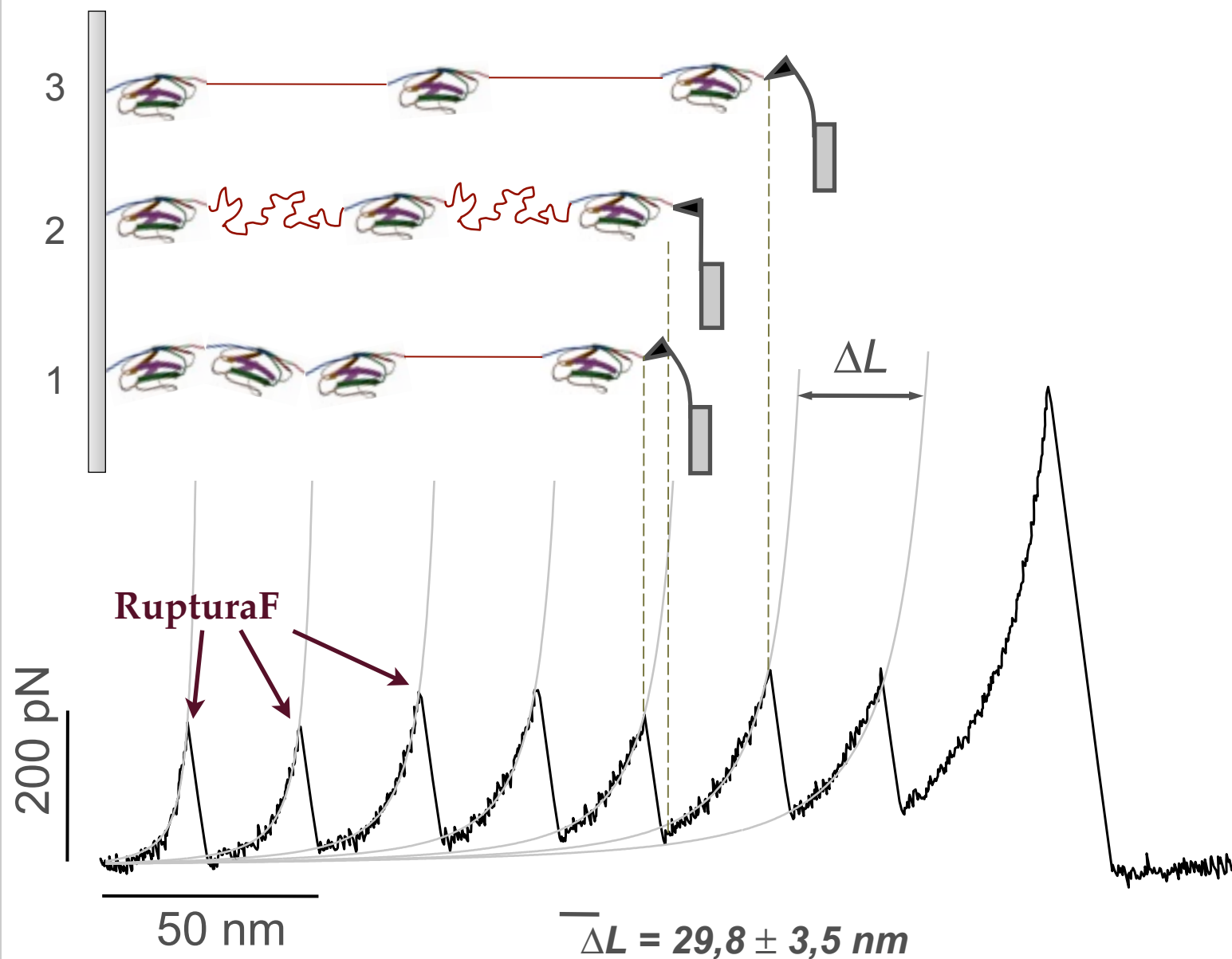
SINGLE

Aktiváció, sebesség, reverzibilitás

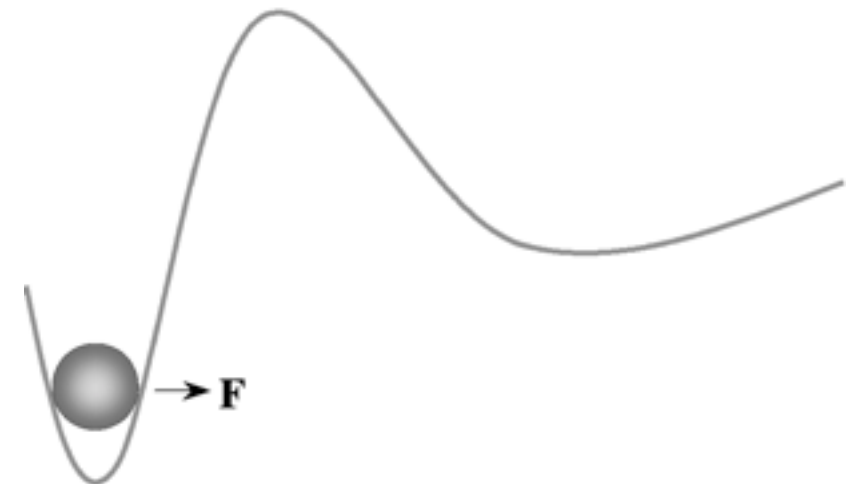


Erő hatása az aktivációra: titin irreverzibilis kitekerése

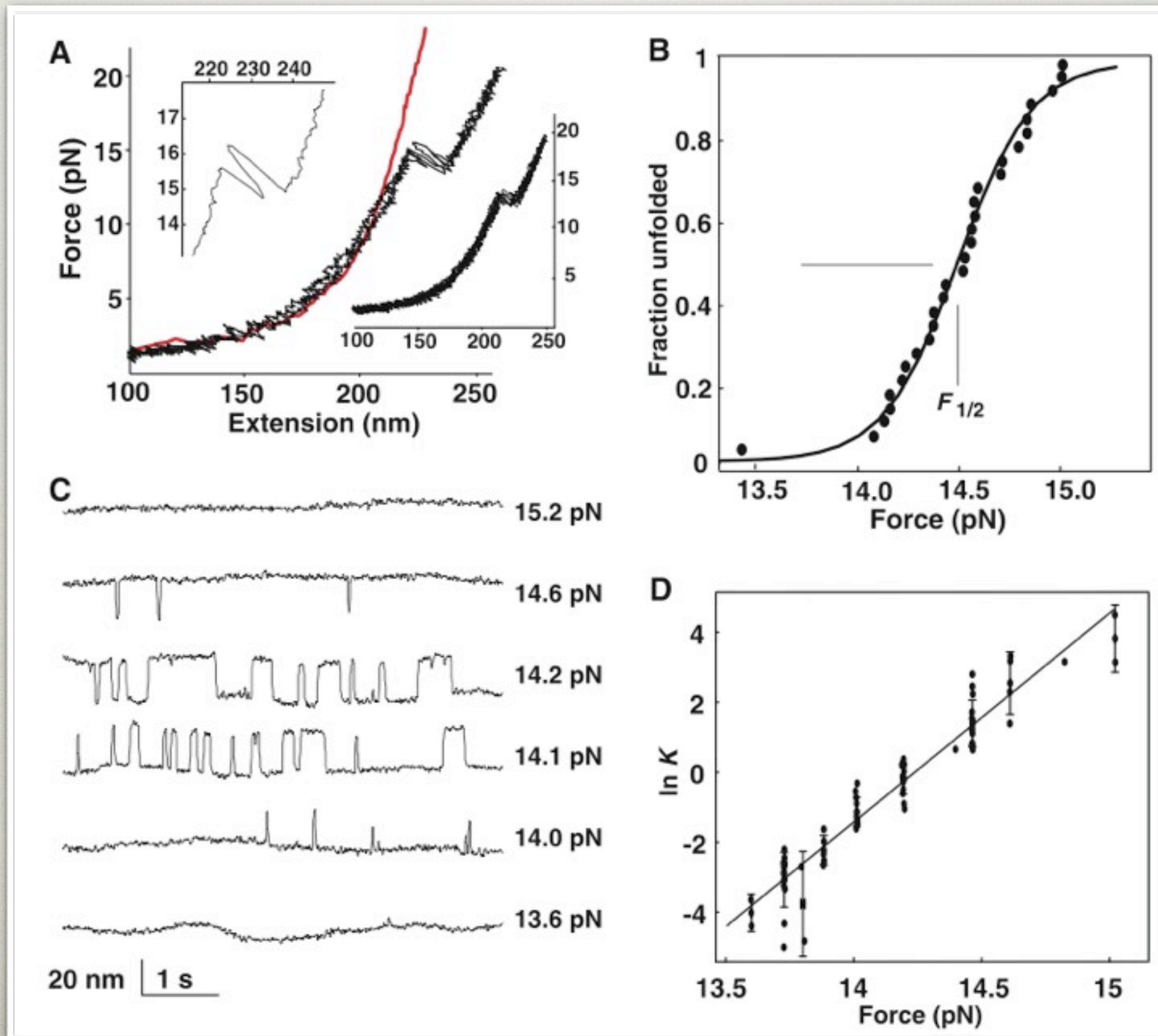
Az I55-62 fragmentum kitekeredési görbéje



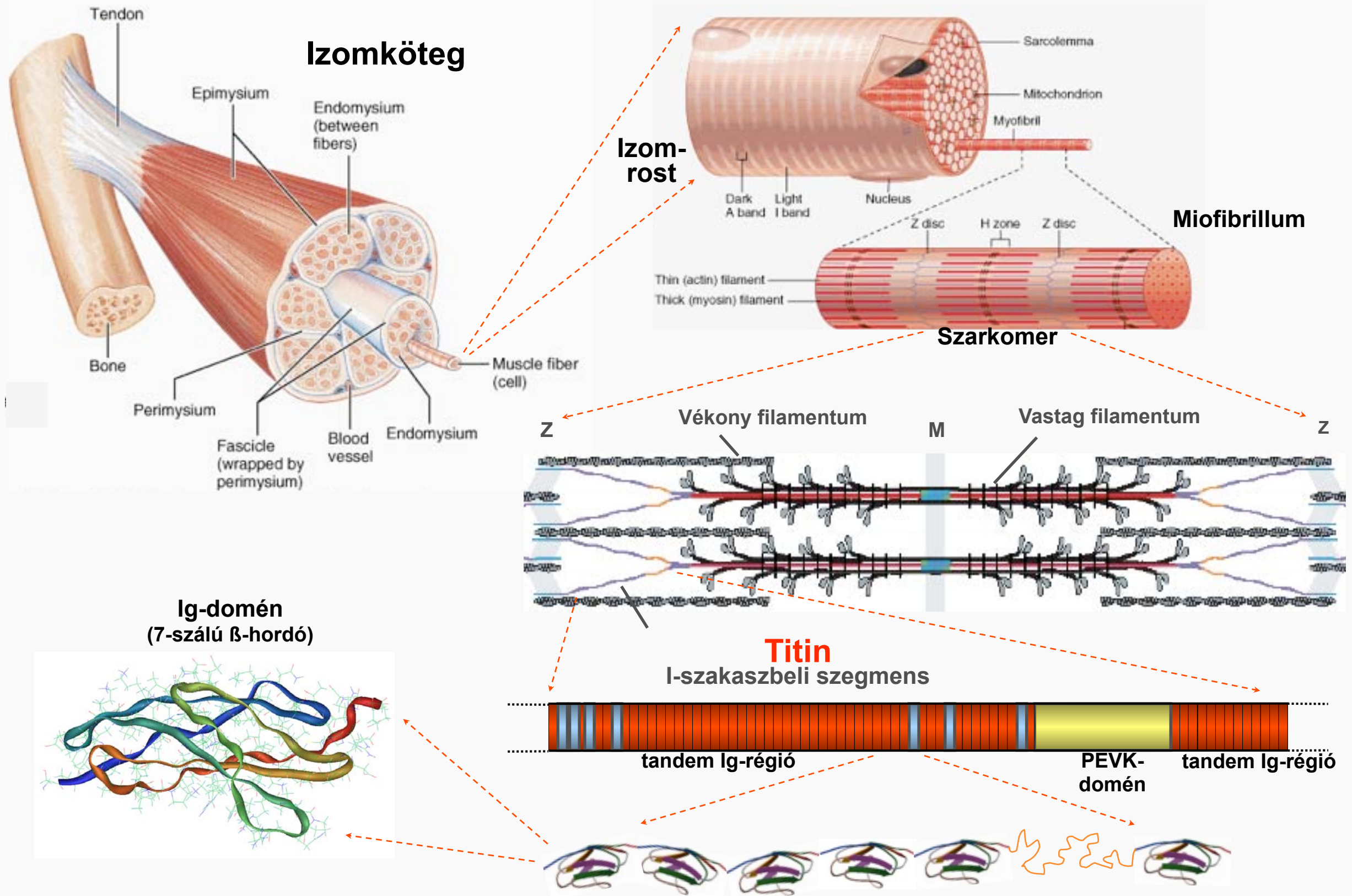
$$\overline{RupturaF} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{r x_\beta}{k_{off}^0 k_B T} \right)$$



Erő hatása az aktivációra: RNS hajtű egyensúlyi kitekerése

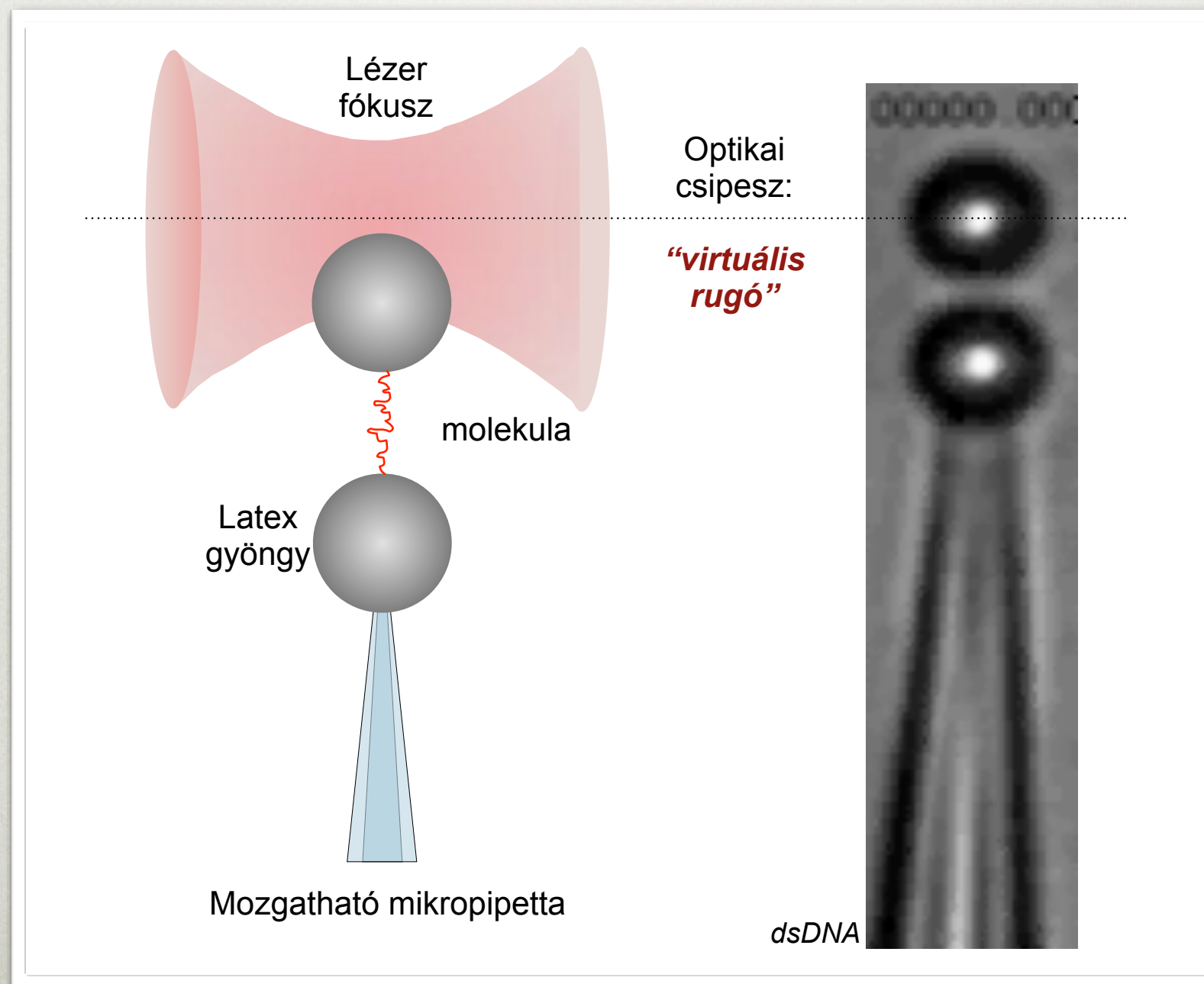


Példa: fehérjeterjedés



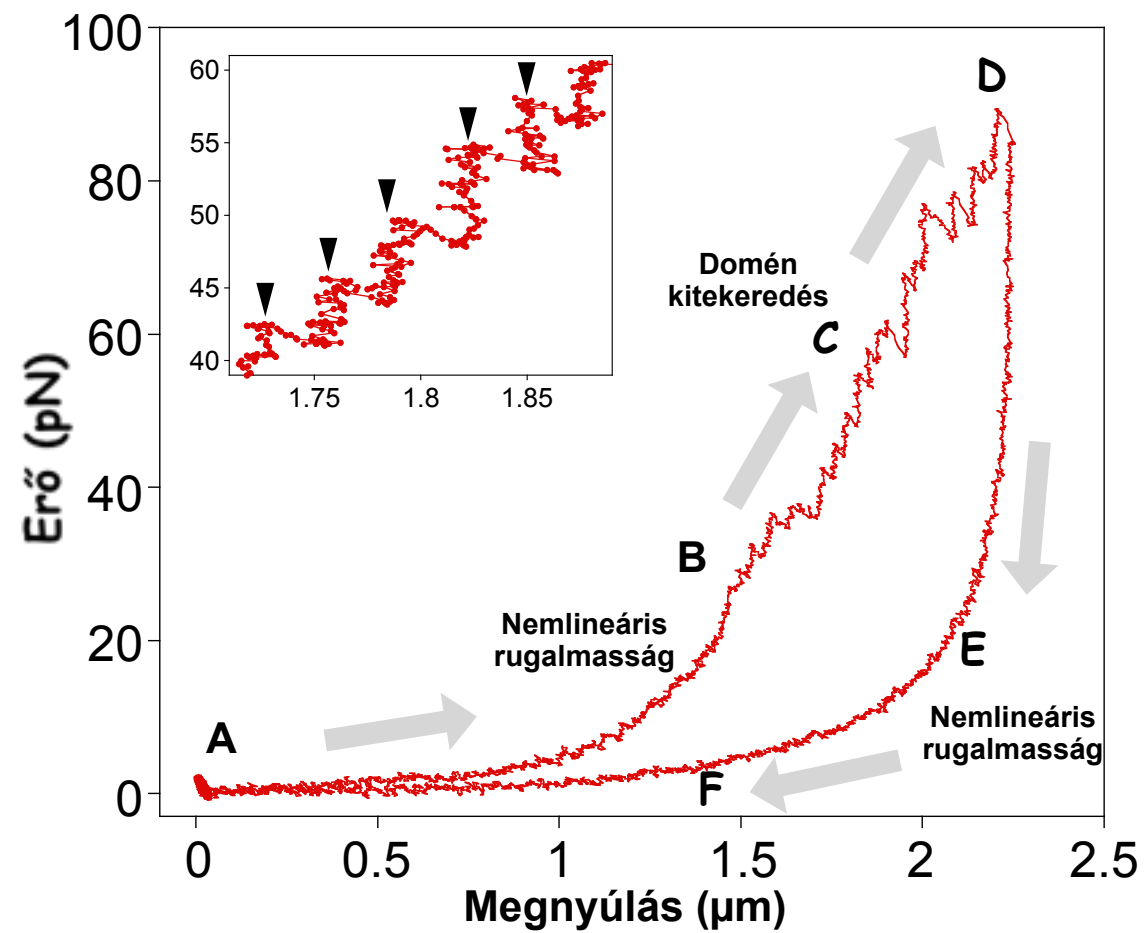
EGYETLEN MOLEKULA MEGNYÚJTÁSA LÉZERCSIPESSZEL

Molekuláris erők mérhetők a lézercsipesz *virtuális rugó* tulajdonságai miatt



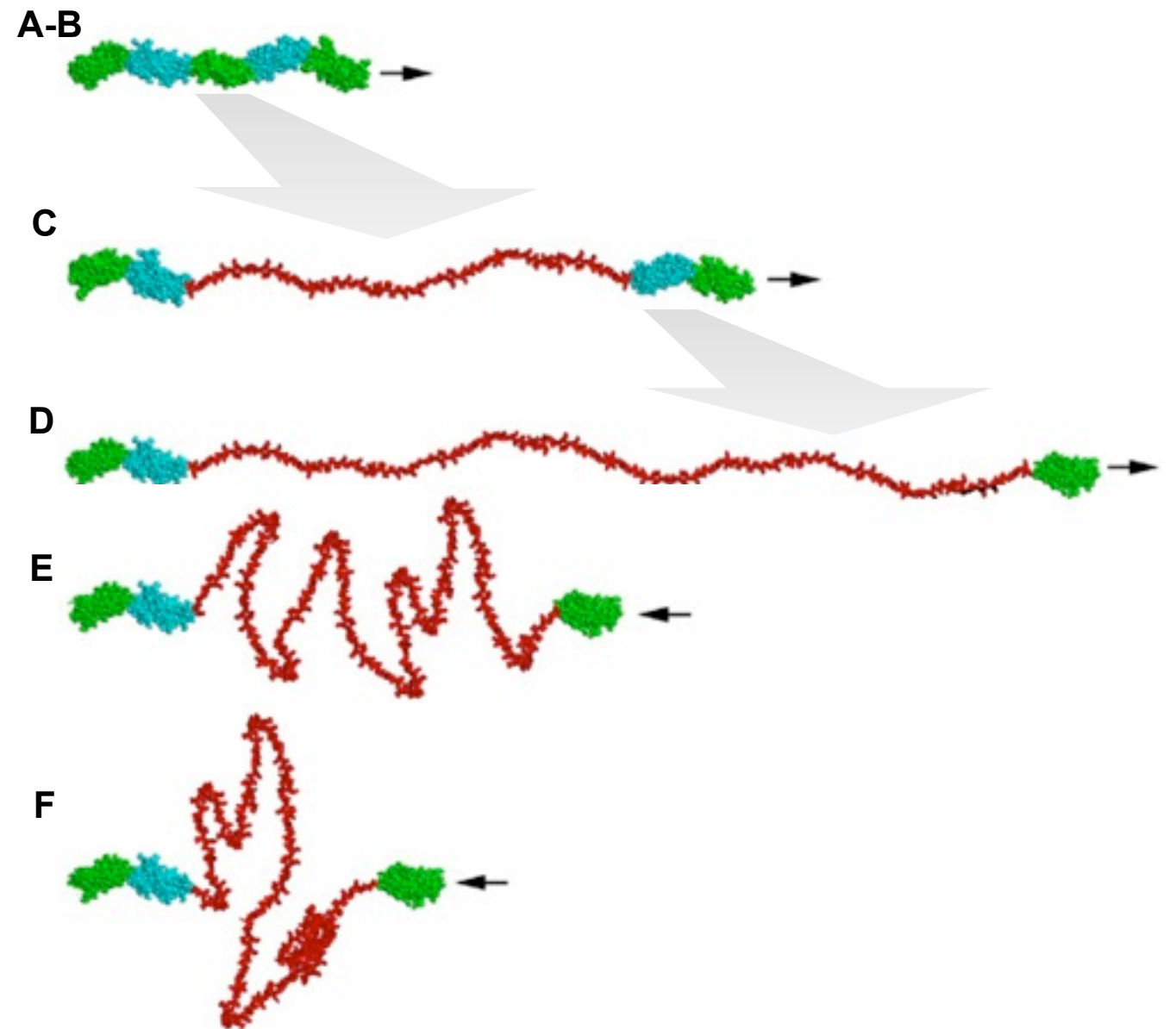
Natív titin nanomechanikája

Erőválasz

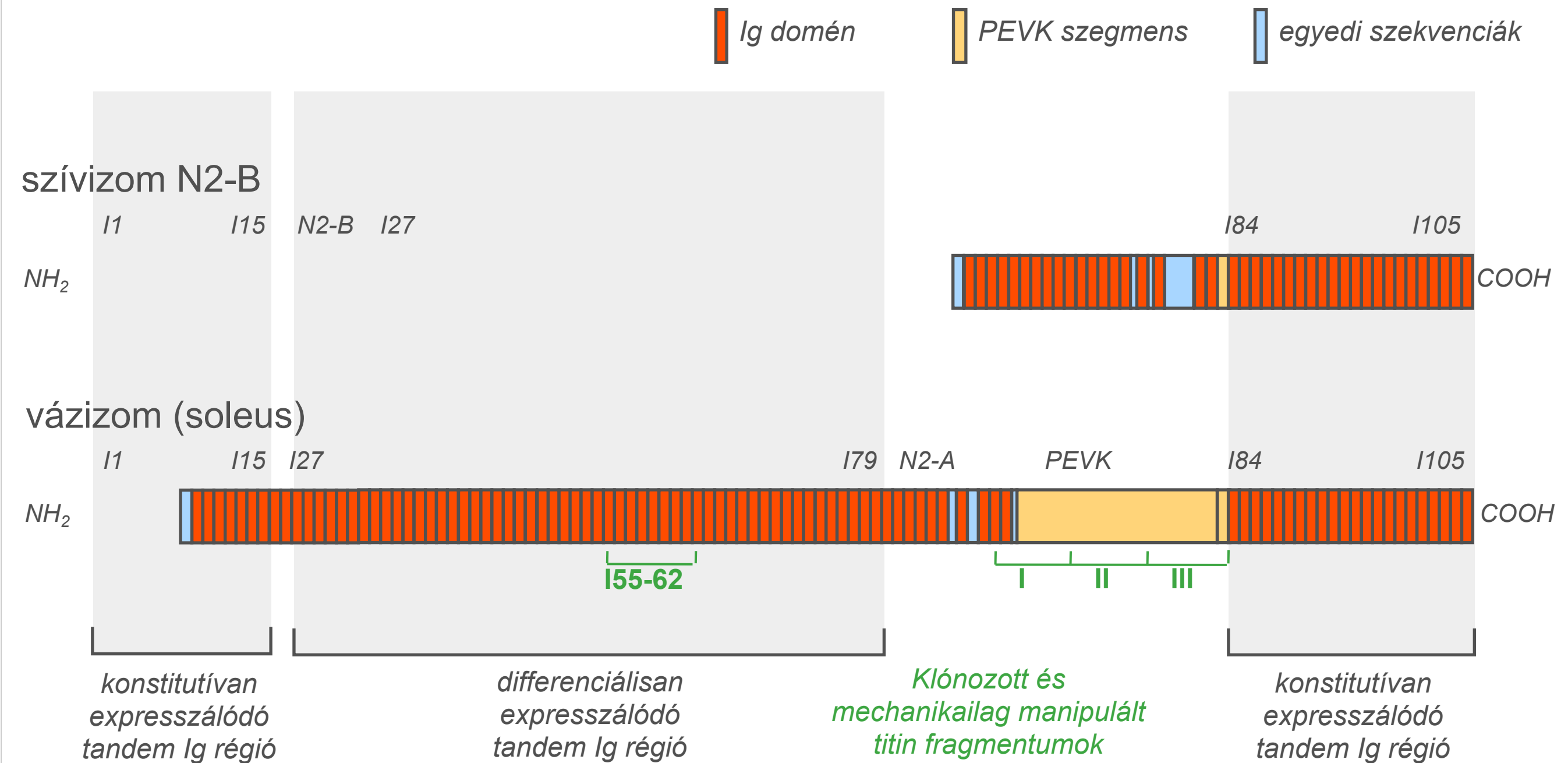


A mechanikai erő stabilitási sorrendbe szervezi a titin doménjeit.

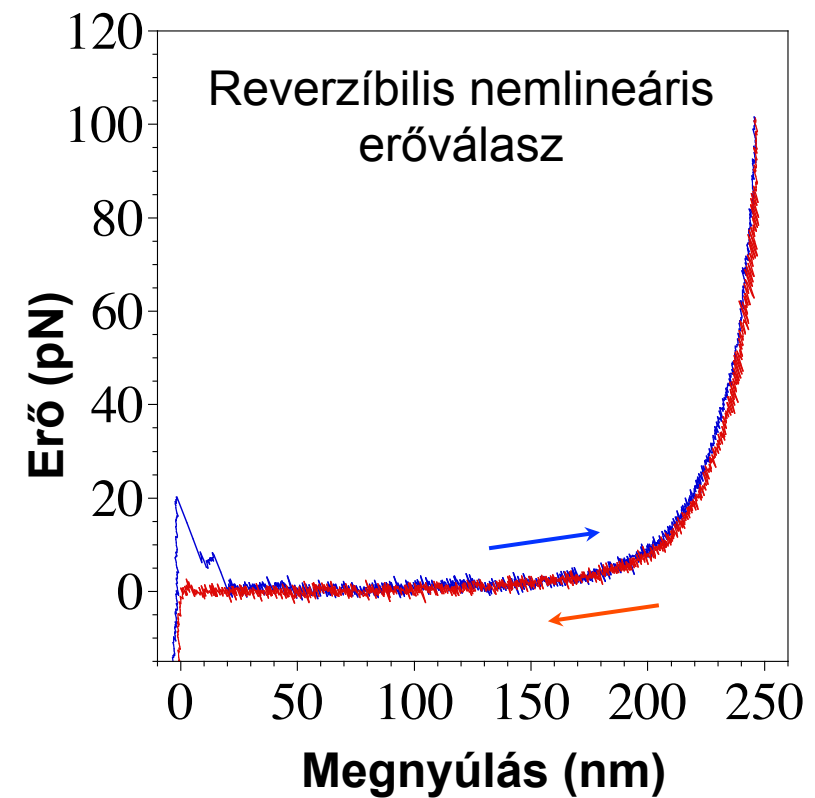
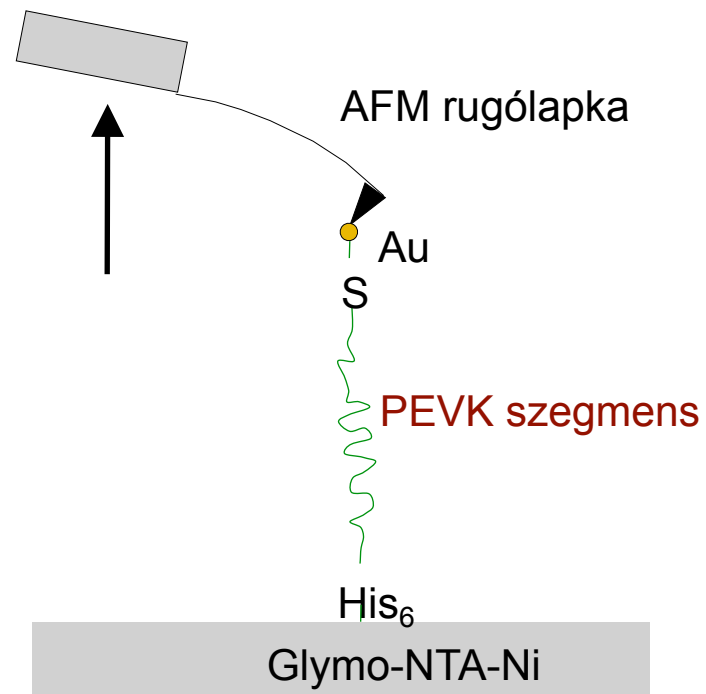
Erővezérelt szerkezeti változások



Titin doménszerkezet

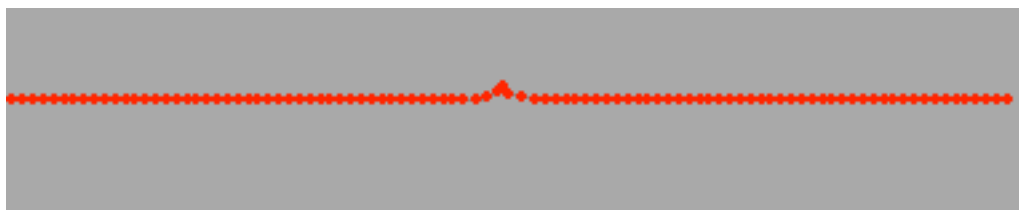
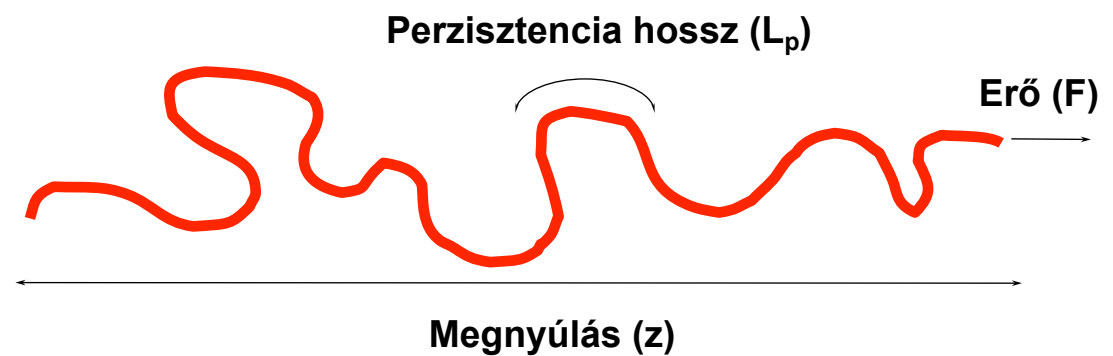


PEVK domén: elasztikus molekulaszakasz

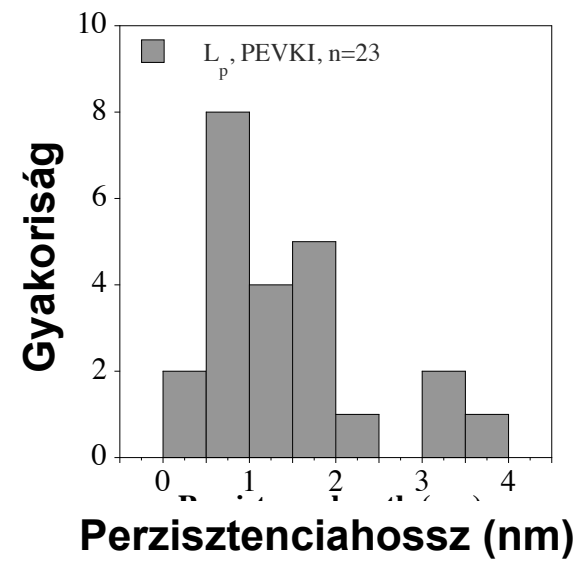


Féregszerű lánc (Wormlike chain) model

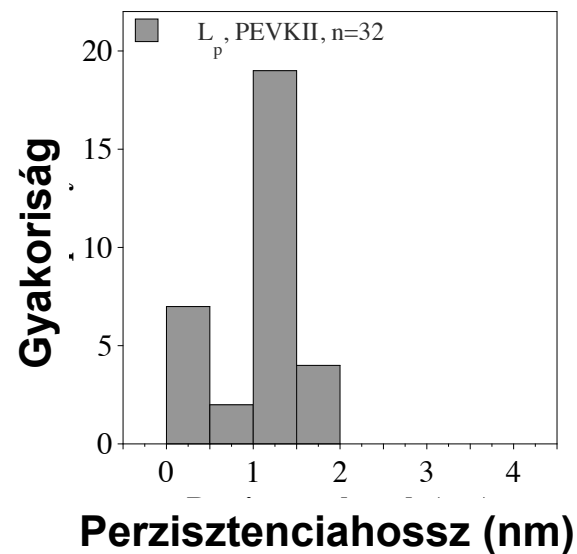
$$\frac{FL_p}{k_B T} = \frac{z}{L_C} + \frac{1}{4(1 - z/L_C)^2} - \frac{1}{4}$$



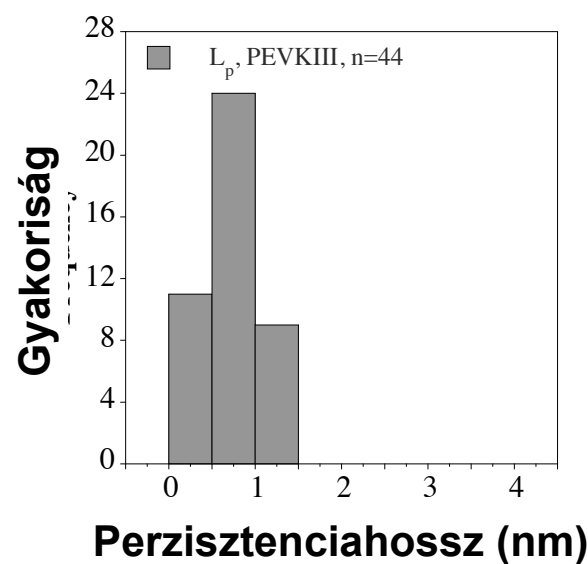
A PEVK domén elektrosztatikusan hangolható molekula-teleszkóp



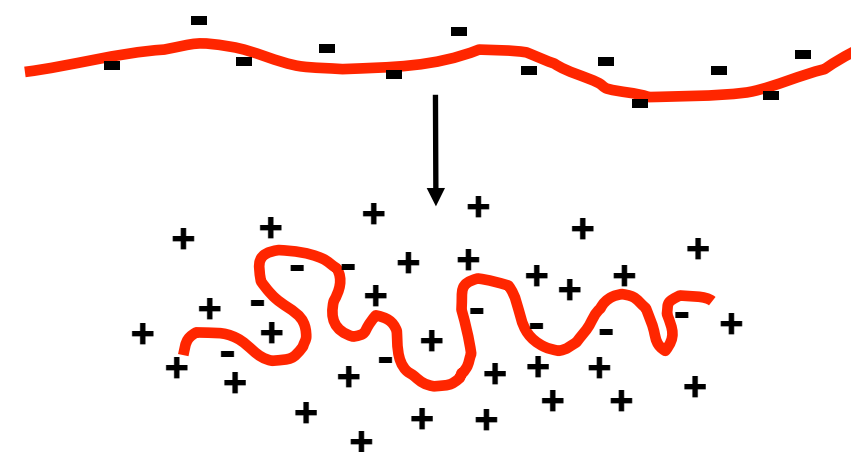
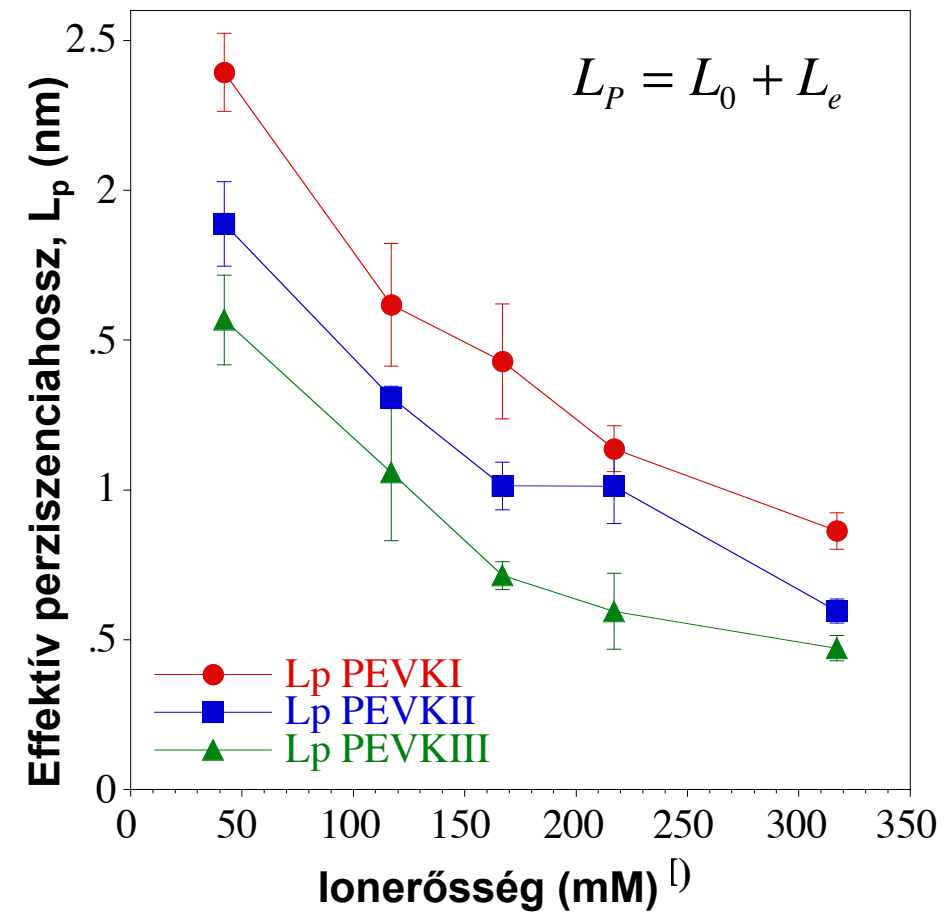
N-terminális
szegmens



Középső
szegmens

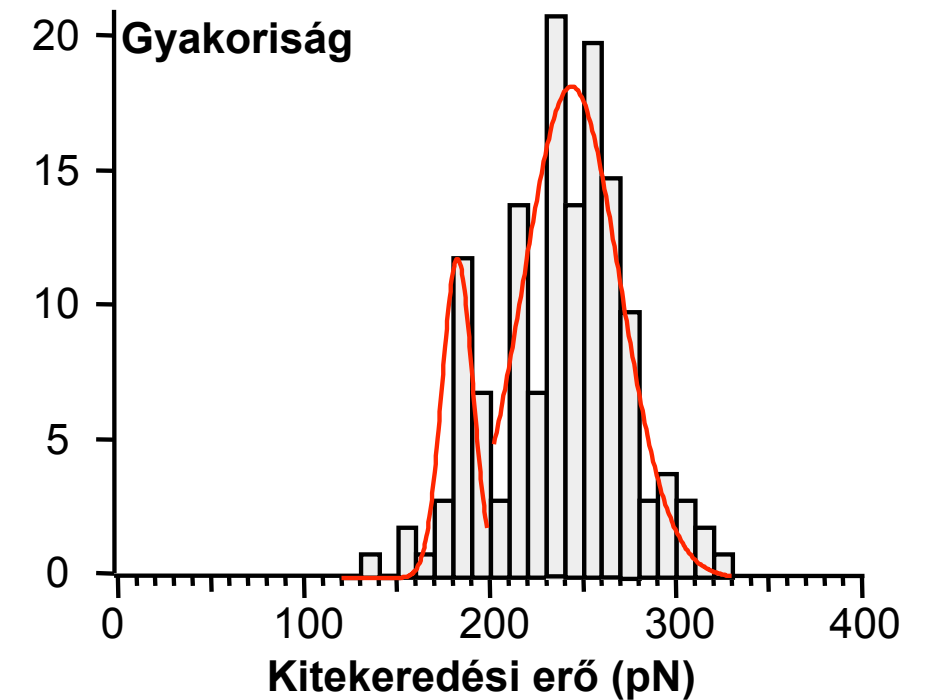
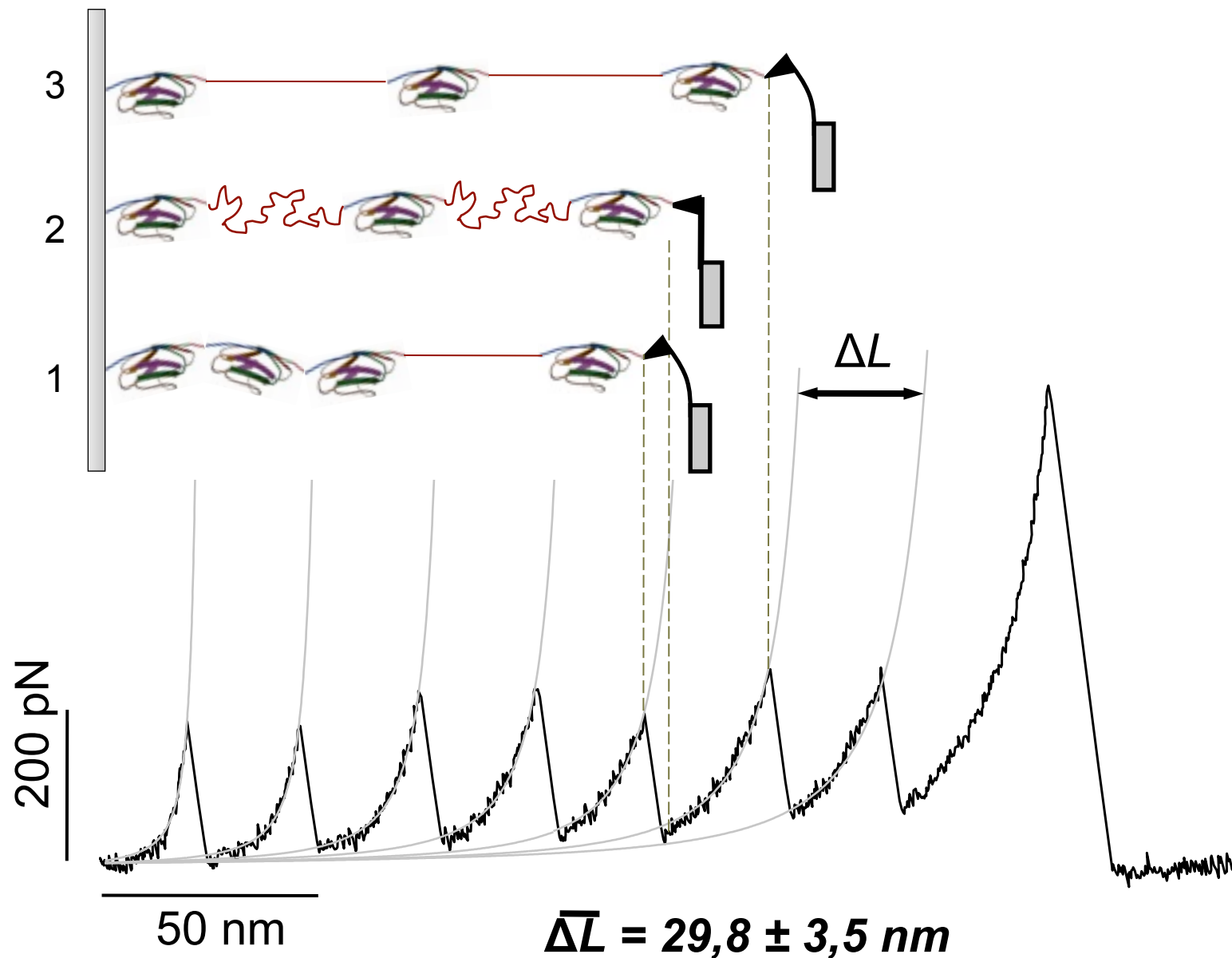


C-terminális
szegmens



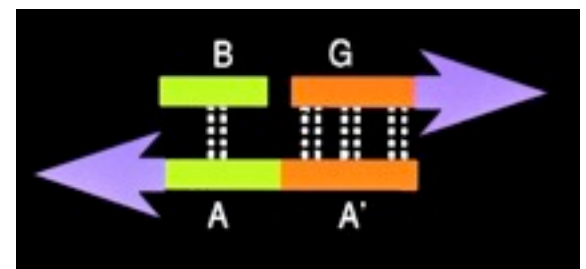
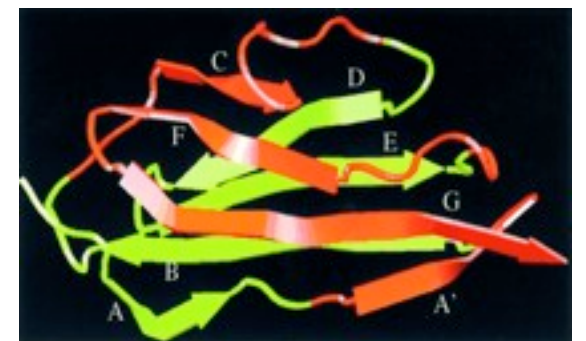
Titin I55-62: viszkoelasztikus molekulaszakasz

Az I55-62 fragmentum kitekeredési görbéje



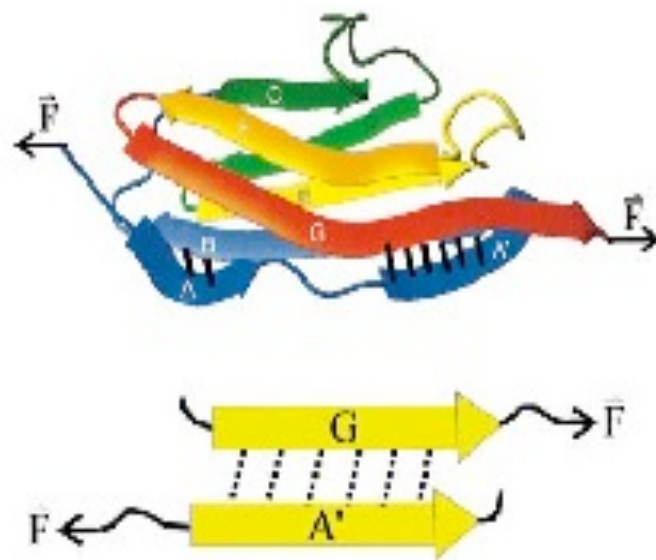
Mechanikai stabilitás
alapja:

Az Ig domén első és
utolsó β -láncait
összetartó,
párhuzamosan csatolt
H-hidak

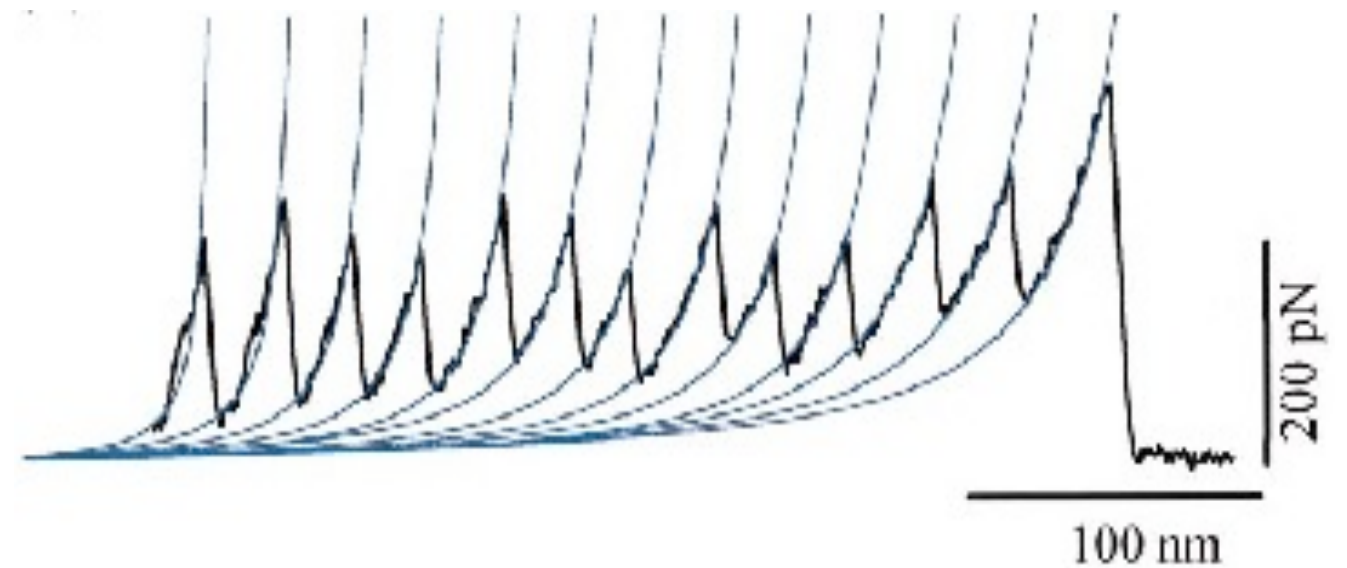


A mechanikai stabilitás biológiai logikája

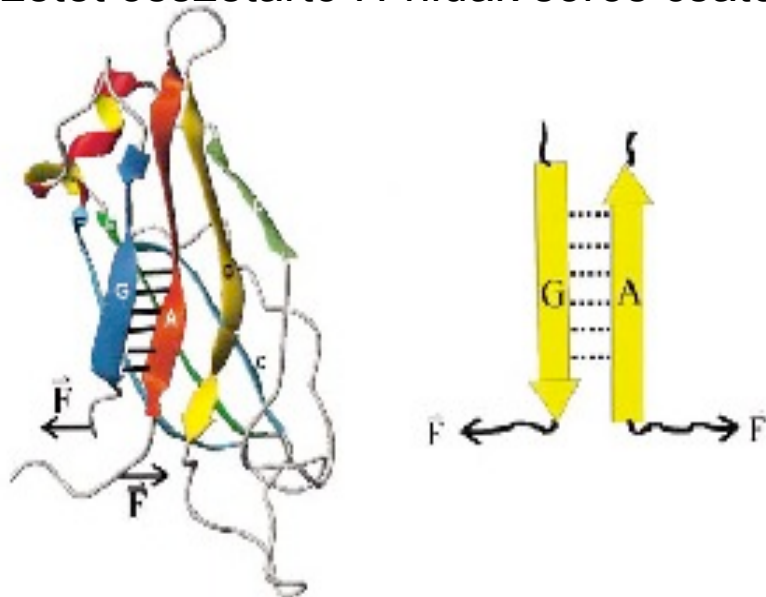
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása



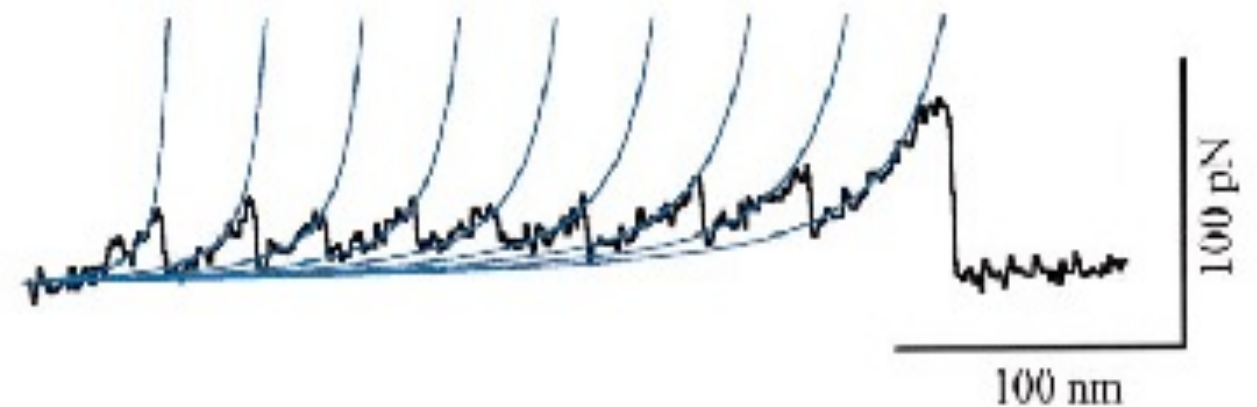
Nagy kitereredési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása



Alacsony kitereredési erő



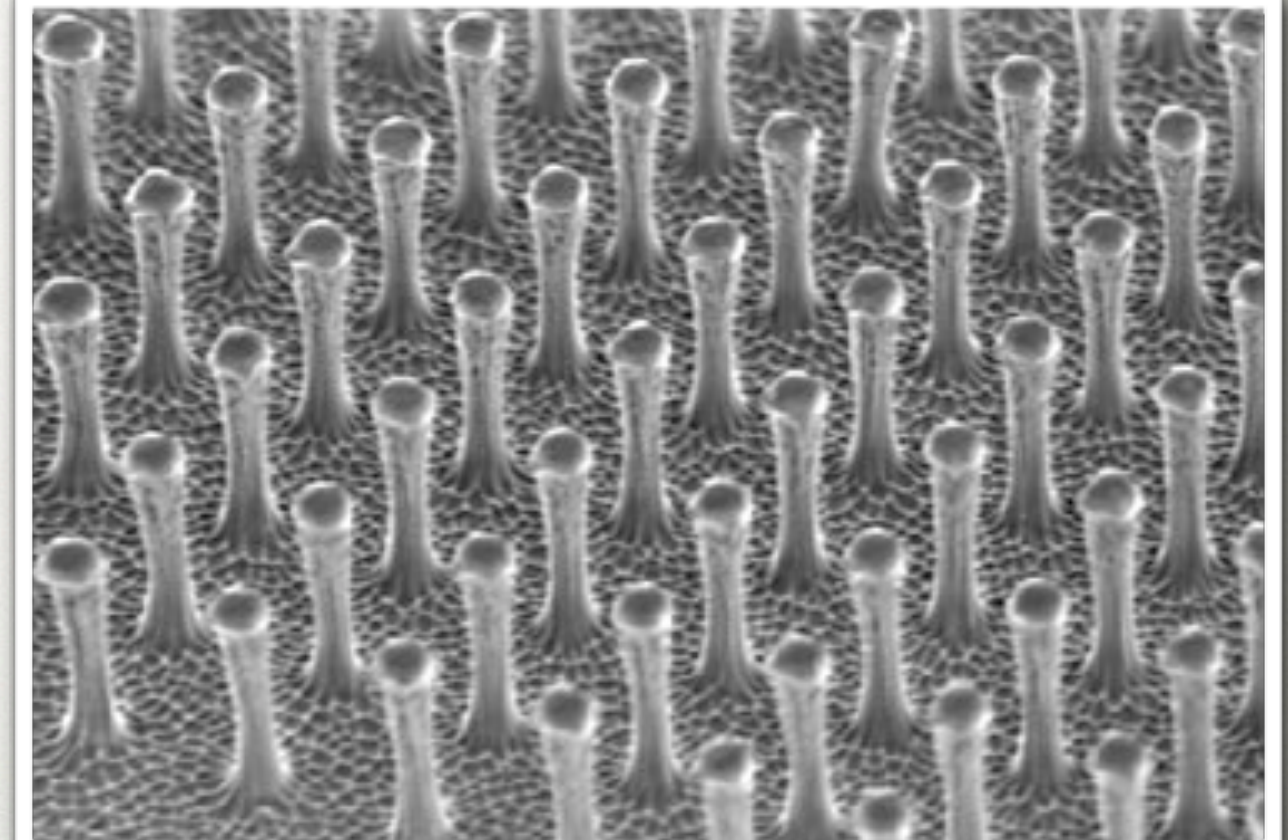
Nanotechnológiai alkalmazás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



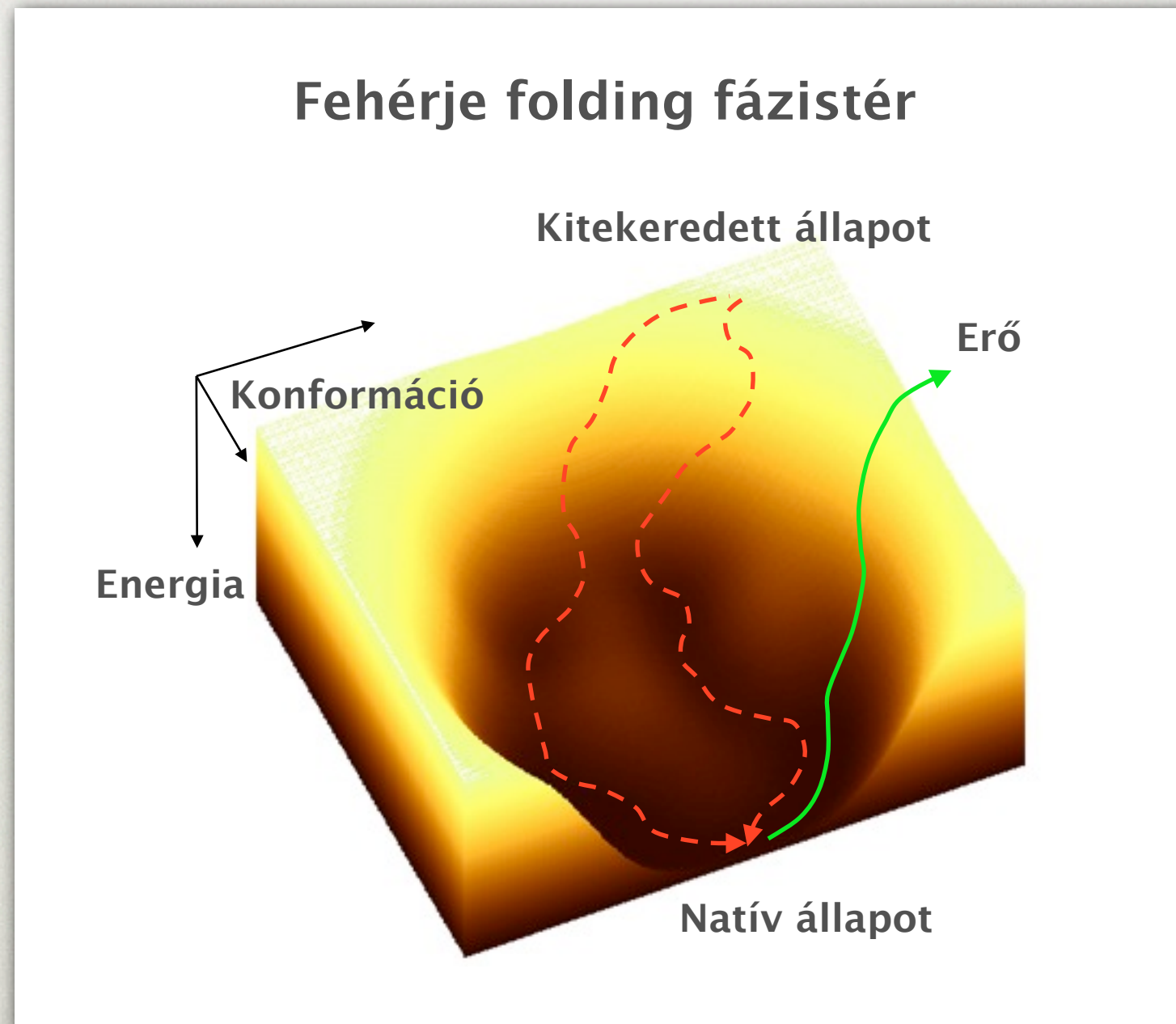
Gecko talp
tapadása:

Párhuzamosan
csatolt Van der
Waals kötések a
serték és a felület
között



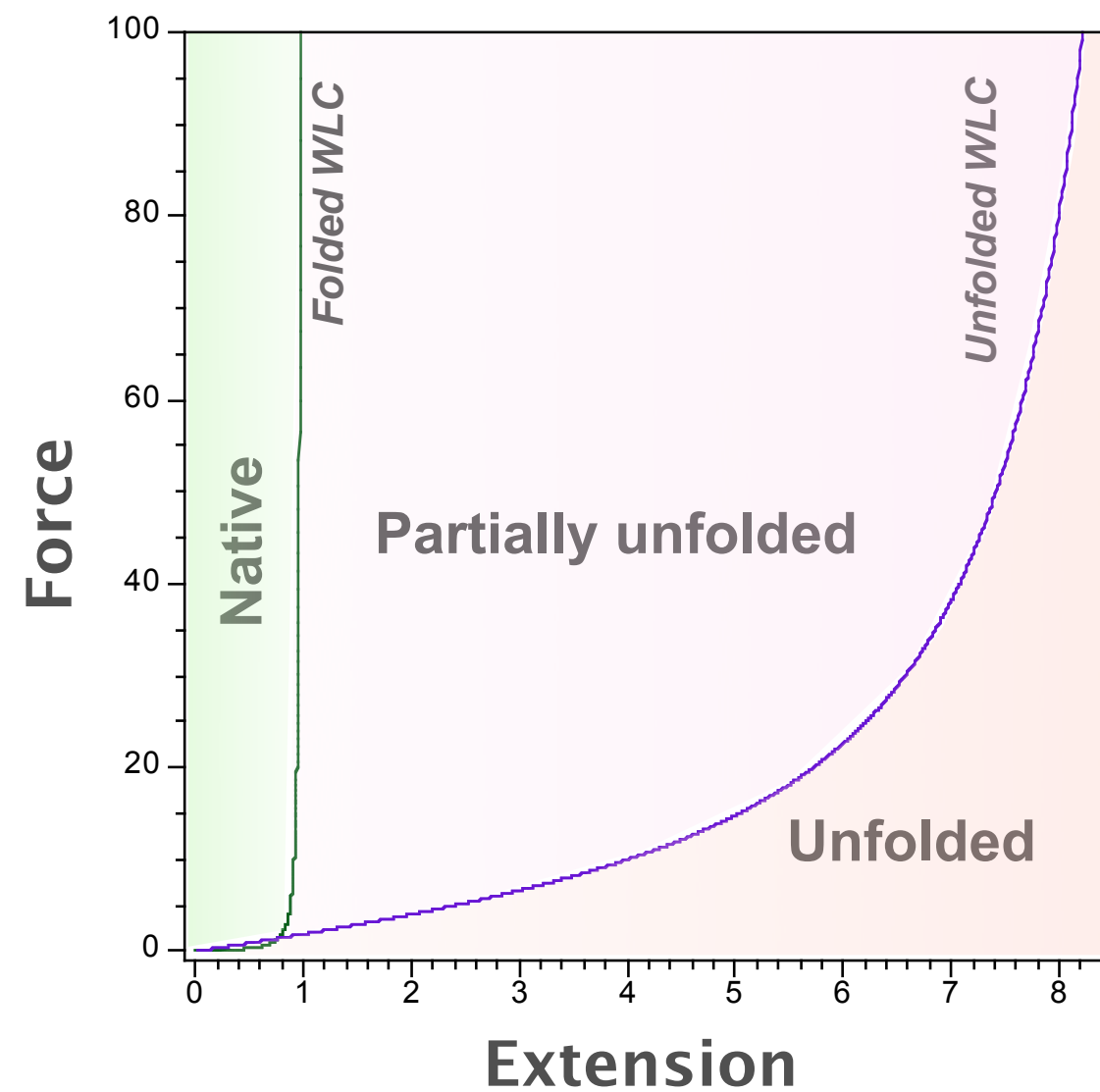
Mesterséges gecko talp

A FEHÉRJEGOMBOLYODÁS FÁZISTERÉNEK VIZSGÁLATA EGYEDI MOLEKULA MÓDSZERREL

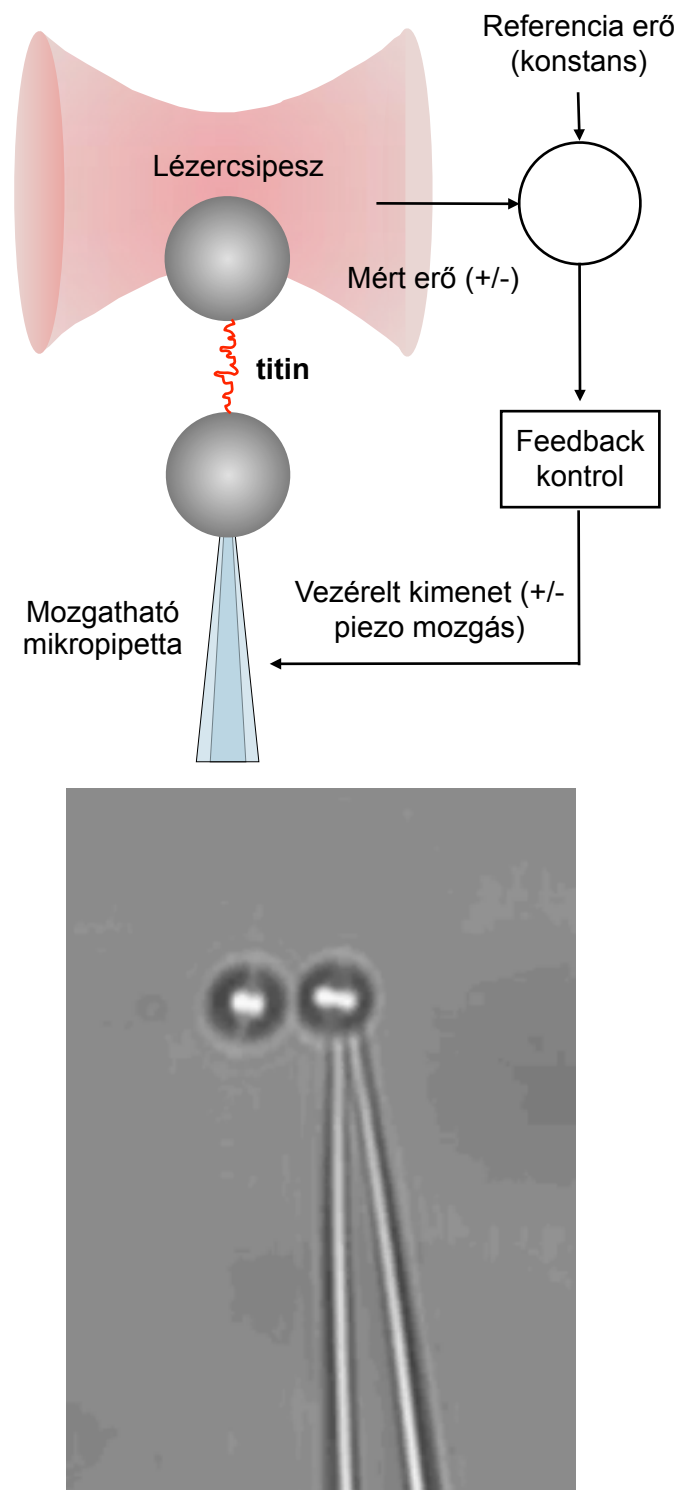


Mechanikai erő segítségével a konformációs tér kevésbé betöltött részei is vizsgálhatók.

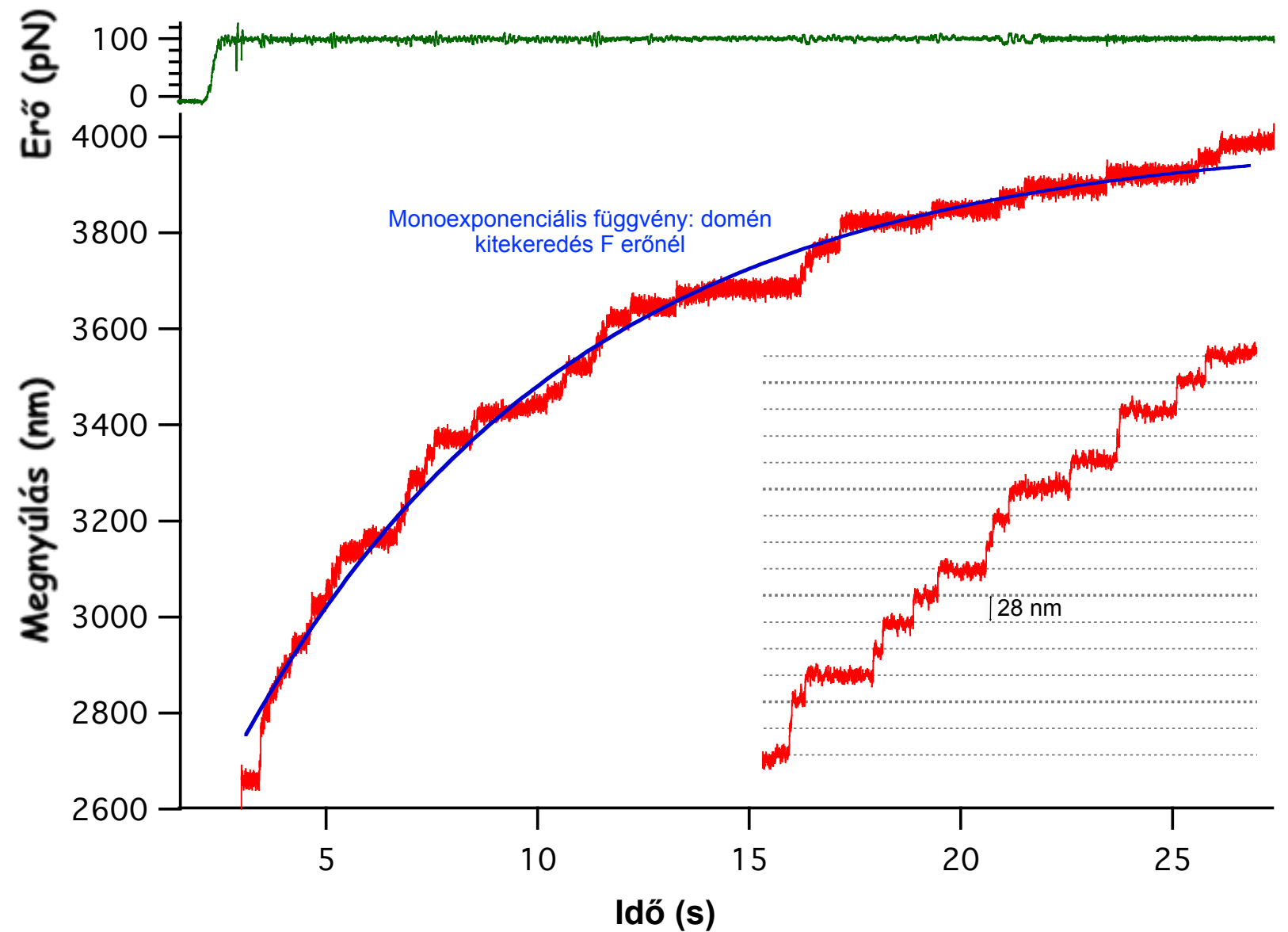
A TITIN GOMBOLYODÁSI FÁZISITERE



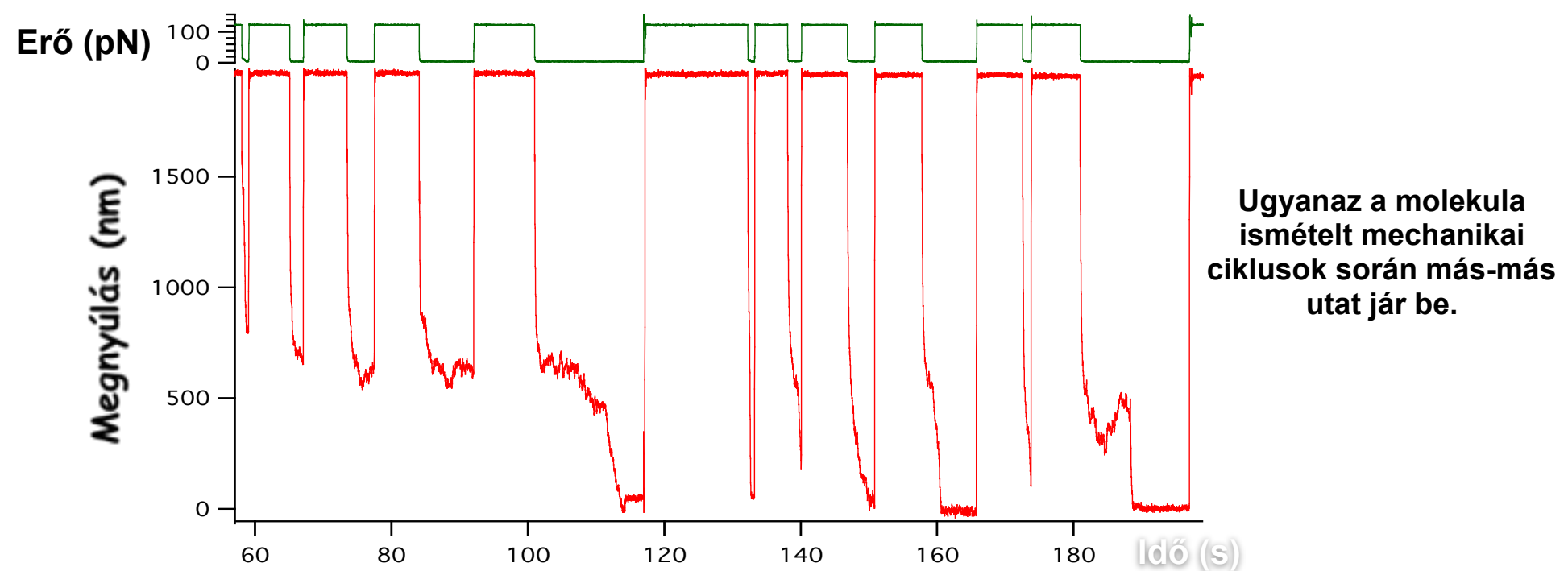
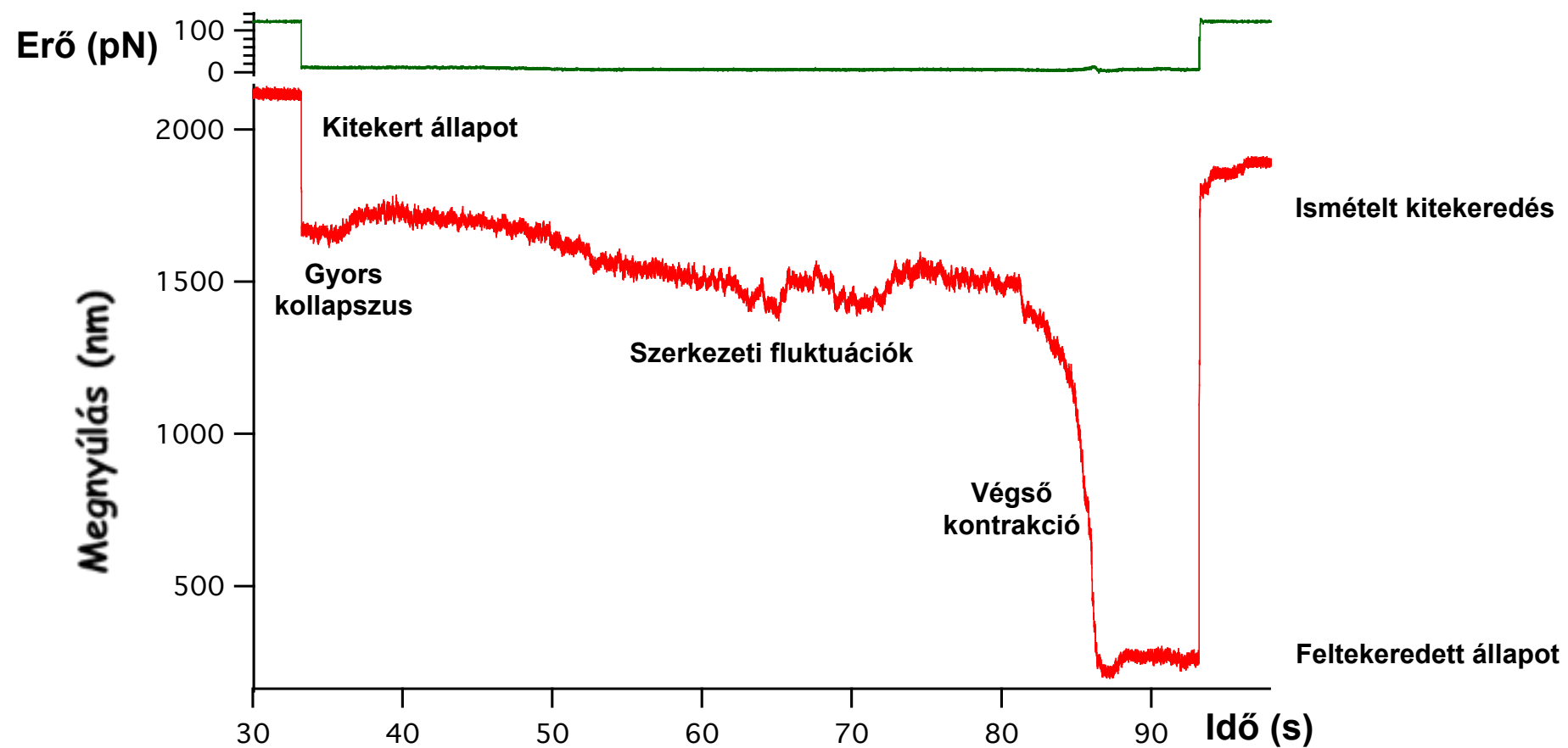
Titin nanomechanika erővisszacsatolt lézercsipeszszel



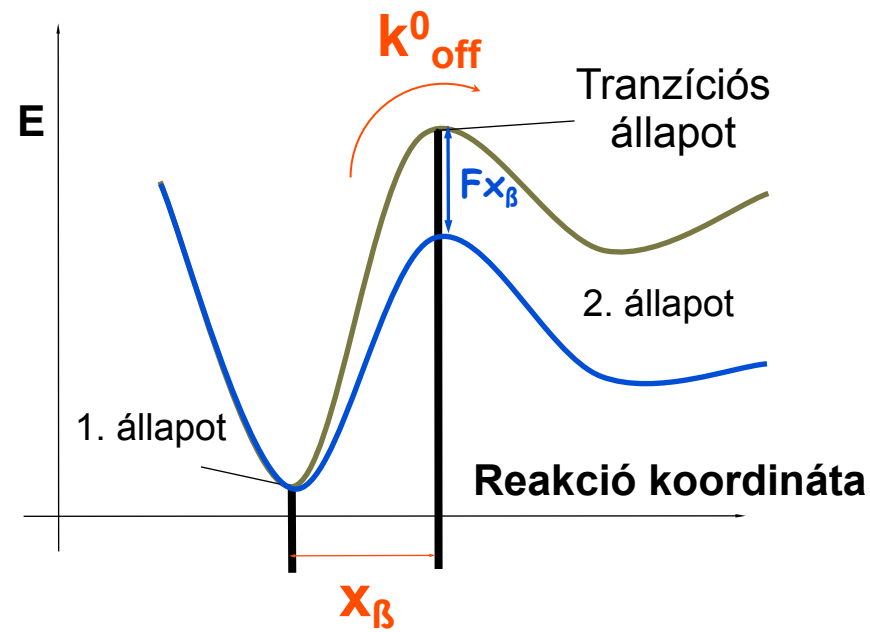
Doménkitekeredési folyamat konstans erőnél



Titin feltekeredés konstans erőnél

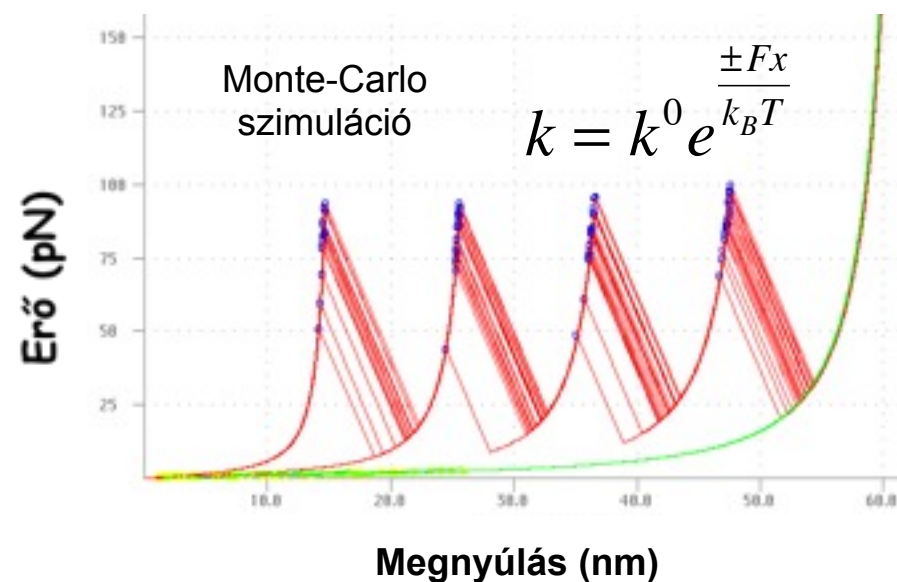


Biomolekuláris folyamatok mechanikai erőterben



A pillanatnyi erő (F) a vezérelt folyamat (k_{off}) illetve terhelés (r) sebességeinek arányától és az energiaprofil alakjától (x_β) függ:

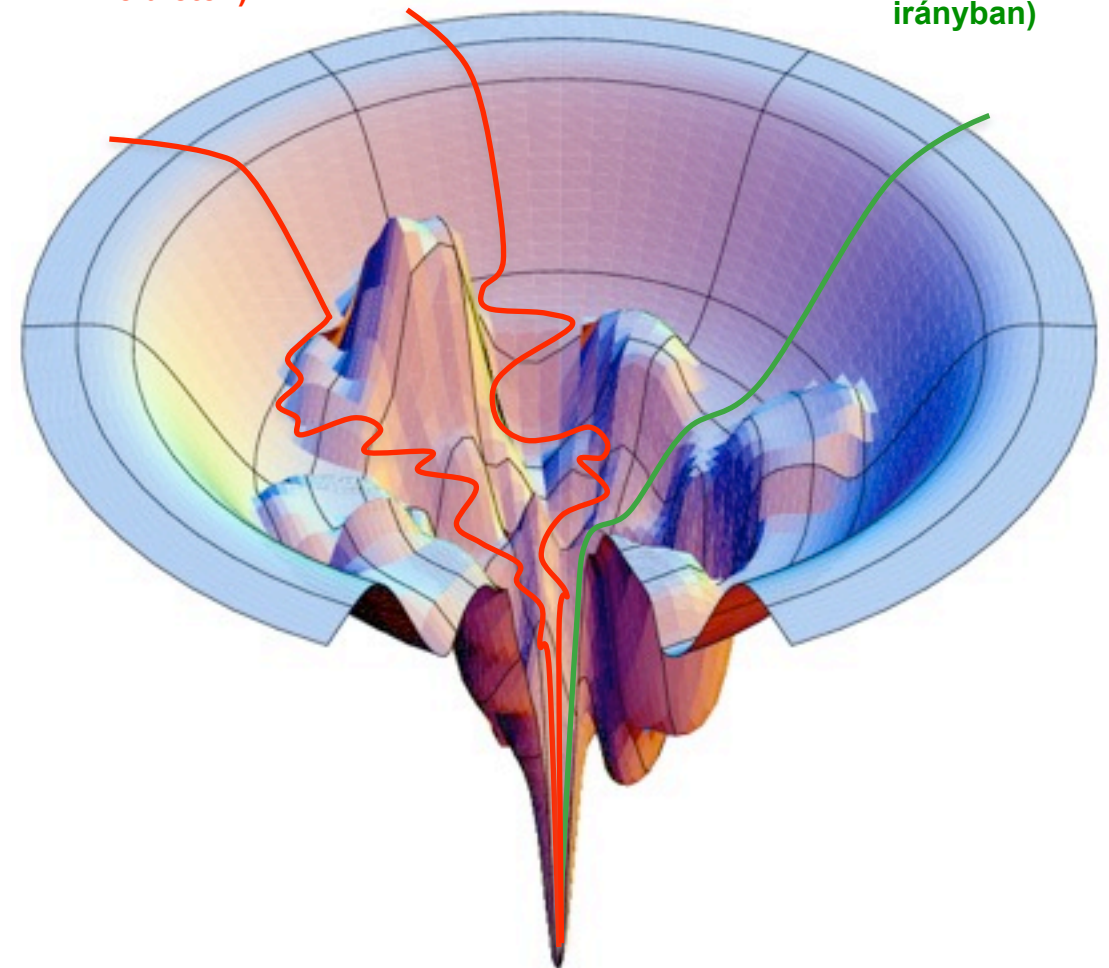
$$\bar{F} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{rx_\beta}{k_{off}^0 k_B T} \right)$$



Kitekert állapot

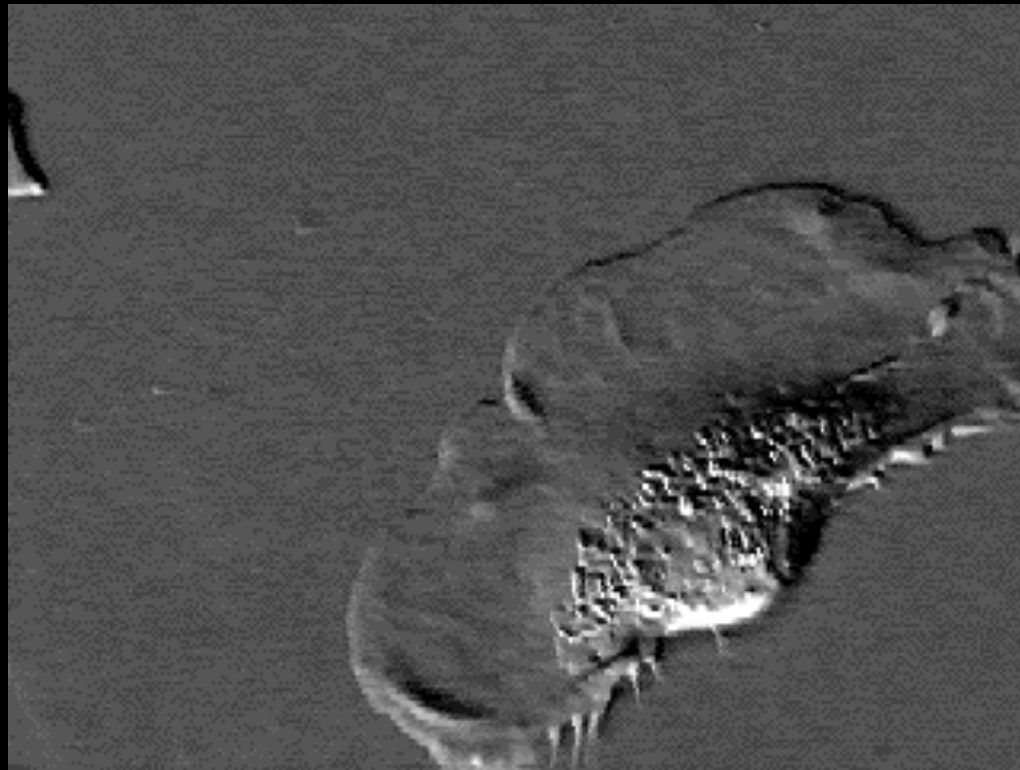
Gombolyodás
(Diffúzió az energiaprofil felületén)

Erővezérelt kitekeredés
(erő által meghatározott irányban)



Natív állapot

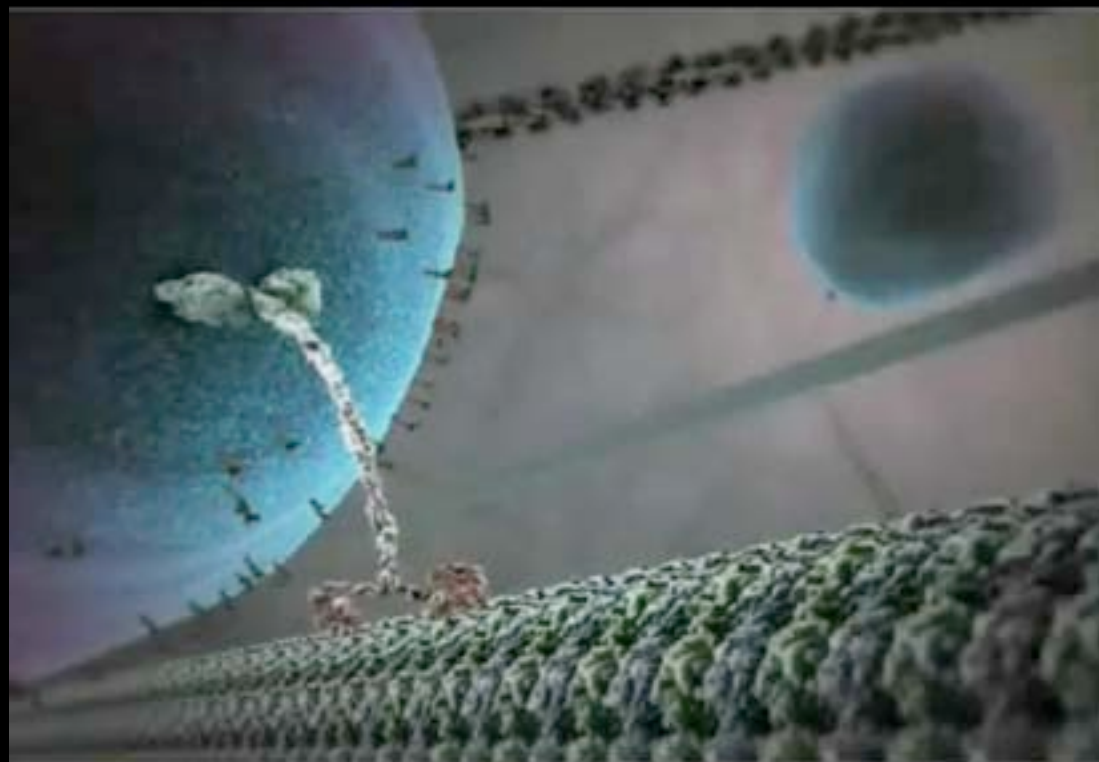
Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



Tovakúszó keratinocita



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transzport kinezinnel



Fehérjeszintézis riboszómán