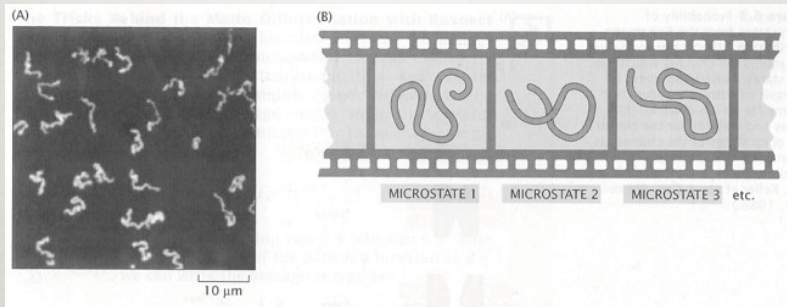


POLIMERLÁNC “EGYENSÚLYI” ALAKJA

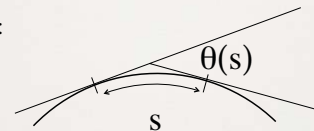
Az a makroállapot, amely a legtöbb mikroállapottal
valósítható meg (legvalószínűbb állapot)



DNS molekulák fluoreszcencia mikroszkóp alatt

FÉREGSZERŰ POLIMERMODELL (WORMLIKE CHAIN)

WLC (wormlike chain):



ha s elég nagy, $\langle \cos\theta(s) \rangle$ s függvényében lecseng: $\langle \cos\theta(s) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{l_p}\right)$
 l_p =perzisztencia hossz

ha $s \ll l_p$, akkor $\langle \cos\theta(s) \rangle \sim 1$, és a $\theta(s)$ szög 0 körül fluktuál.

Ha $s \gg l_p$, akkor $\langle \cos\theta(s) \rangle \sim 0$,

azaz $\theta(s)$ 0° és 360° közötti értékeket ugyanolyan valószínűséggel vehet fel.

A perzisztencia hossz értelme:

az a hossz, amelyen belül a lánc megtartja irányát (emlékszik rá).

A perzisztencia hosszon túl a lánc elfelejti irányítottságát.

$$l_p = \frac{EI}{k_B T}$$

EI = hajlítómerevség (E = Young modulus - anyagfüggő, I = keresztmetszet
másodrendű nyomatéka - alakfüggő); $k_B T$ = termikus energia

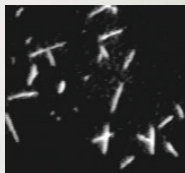
Értelme: minél merevebb egy lánc, annál nagyobb távolságon (l_p) lesznek csak észlelhetők a termikusan gerjesztett fluktuációk.

A GLOBÁLIS ALAK ÉS RUGALMASSÁG KÖZÖTT ÖSSZEFÜGGÉS VAN

l = perzisztencia hossz (hajlítómerevséget jellemzi)
 L = kontúrhossz

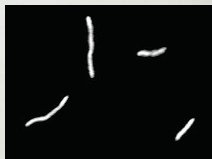
Merev lánc
 $l \gg L$

Mikrotubulus



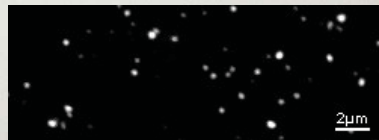
Szemiflexibilis lánc
 $l \sim L$

Aktin filamentum



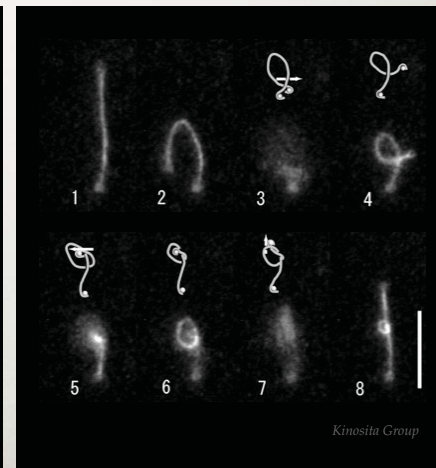
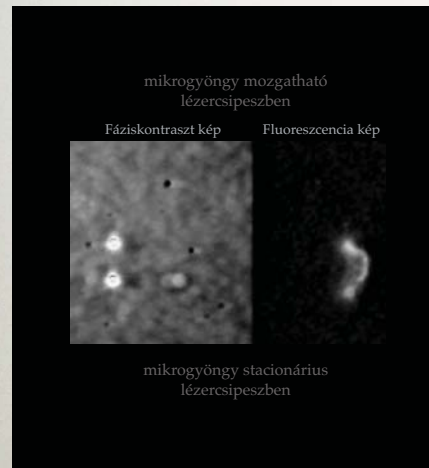
Flexibilis lánc
 $l \ll L$

DNS molekula



ENTROPIKUS RUGALMASSÁG VIZUALIZÁLÁSA

CSOMÓKÖTÉS EGYETLEN DNS LÁNCRA

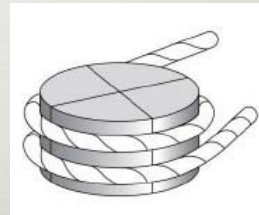
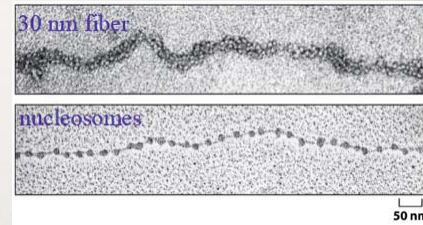


A HUMÁN GENOM FIZIKAI MÉRETE

A tanteremnyi modell-sejtre adaptálva:

	Idealizált sejt: 20 μm oldalalú kocka	Analógia - Tanterem: 20 m oldalalú kocka
DNS vastagsága	2 nm	2 mm
DNA teljes hossza	2 m	2000 km
Perzisztenciahossz (L_p)	50 nm	5 cm
Átlagos vég-vég hossz $\sqrt{\langle R^2 \rangle} = \sqrt{L_p L_r}$	320 μm	320 m
Girációs sugár (R_G) $R_G = R/\sqrt{6}$	130 μm	130 m

- Tehát: az egyensúlyi alakú DNS nem férne el a sejtben.
- Teljesen kompakt DNS (elméletileg legkisebb) térfogata (2 mm alapterületű, 2000 km hosszú henger térfogata): 8 m^3 (2 m élhosszúságú kocka)
- A DNS-t a sejtben **csomagolni** szükséges

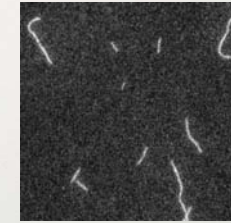


Egyedi nukleosóma partikulum: hiszton fehérjekomplex (oktamer) + ~ 1.6 -ször köré tekercsedett DNS

A DIFFÚZIÓ SPECIÁLIS ESETE: REPTÁCIÓ

- **Reptáció:** polimér hálóban történő "kígyószerű" diffúzió. (*Reptilia*: hüllők)

polimér mátrix:
"entanglement"
(összegabalyodás)



Actin filamentumok metil-cellulóz mátrixban.
"Egyenirányított diffúzió"

$$\tau_r = \frac{L^2 \cdot N}{\mu \cdot k \cdot T}$$

τ_r = Reptációs idő, egy kontúrhossznyi távolság megtételéhez szükséges idő;
 L = kontúrhossz; N = elemi szegmensek száma; μ = lánc mozgékonyaság; kT = termikus energia

$$D_r = \frac{(a \cdot \sqrt{N})^2}{\tau_r}$$

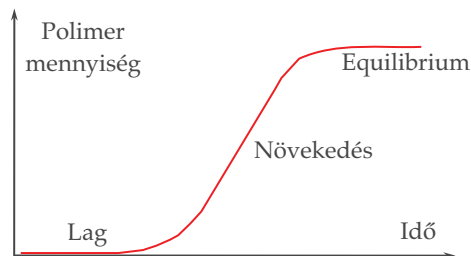
D_r = Reptációs diffúziós állandó;
 N = elemi szegmensek száma; a = elemi szegmens hossz (\sim perzisztenciahossz);
 τ_r = reptációs idő.
 N.B.: számláló az átlagos négyzetes elmozdulással analóg.

Polimerizáció

Alegységek összeállásának folyamata

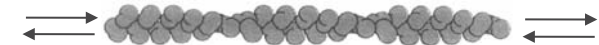
A polimerizáció fázisai:

1. Lag fázis: nukleáció
2. Növekedés fázisa
3. Equilibrium (egyensúly) fázisa



Polimerizációs egyensúlyok

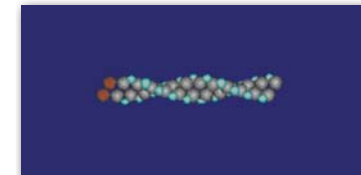
1. valódi equilibrium



2. dinamikus instabilitás: folyamatos, lassú növekedést követő katasztrofikus depolimerizáció

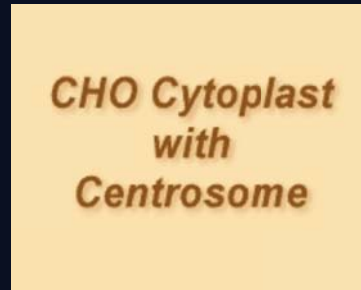
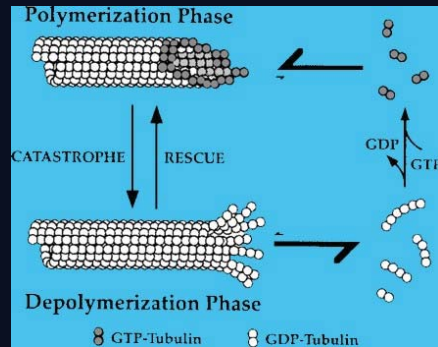


3. Treadmilling:
taposómalom



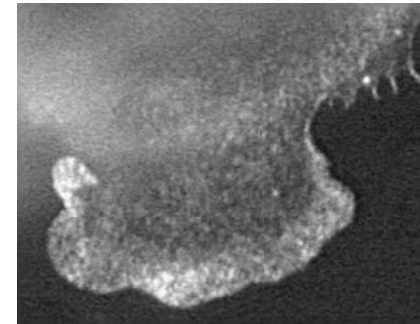
Dinamikus instabilitás

Mikrotubulusok

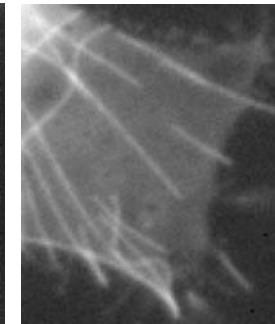


Gary Borisy

In vivo treadmilling



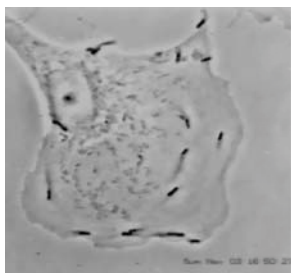
Aktin
GFP-aktin Speckle microscope
Clare Waterman-Storer



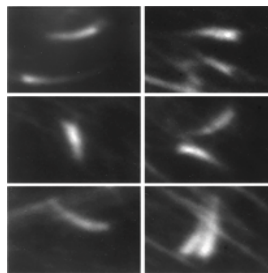
Microtubulusok
Gary Borisy

Motilitás aktin polimerizációval

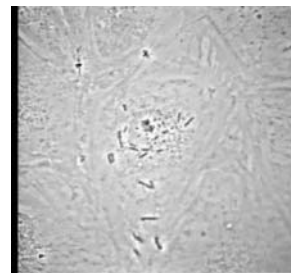
Intracelluláris patogének mozgása



Listeria monocytogenes



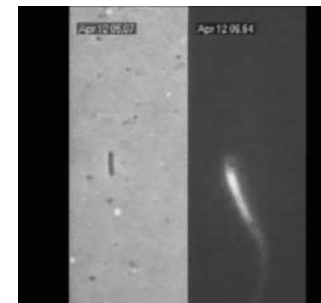
F-aktin jelölés phalloiddinnel



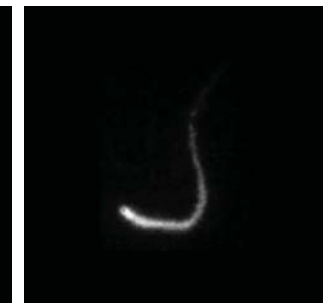
Shigella flexneri

Motilitás aktin polimerizációval

In vitro körülmények



Listeria Xenopus extraktumban



ActA-val aszimmetrikusan bevont mikrogöngy Xenopus extraktumban

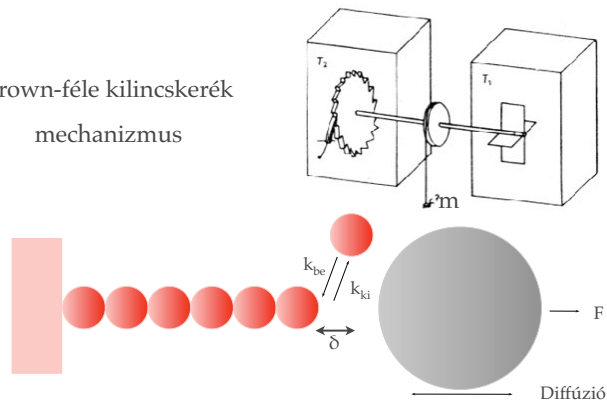


ActA-val szimmetrikusan bevont mikrogöngy Xenopus extraktumban

ActA: A protein expressed by the bacterium *Listeria monocytogenes* that is responsible for the "rocketing" motility of the bacterium throughout the eukaryotic host cell. In addition to other host proteins, ActA binds actin directly.

Erőkifejtés citoszelektális filamentum polimerizációjával

Brown-féle kilincskerék
mechanizmus



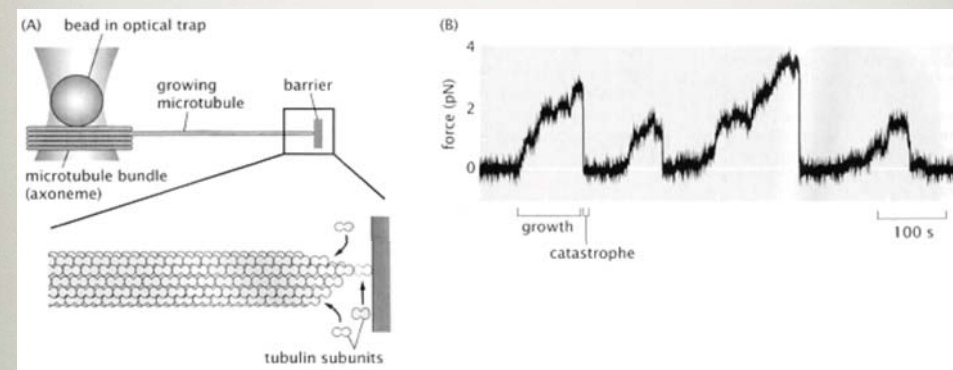
$$K(F) = K_c e^{\frac{F\delta}{k_B T}}$$

$K(F)$ = erő jelenlétében fennálló disszociációs állandó - az a monomer koncentráció, amelynél a nettó filamentum növekedés 0.

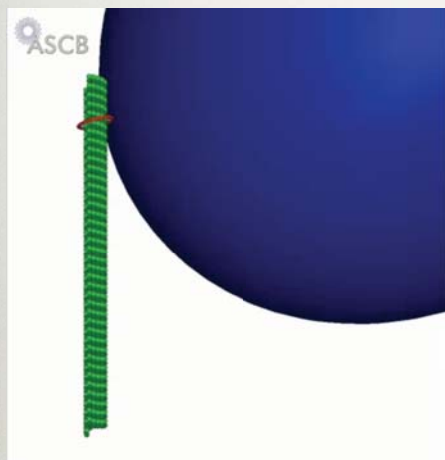
K_c = kritikus koncentráció (0 erőnél); F = erő; δ = diszkrét növekedés egyetlen monomer beépülésekor. $k_B T$ = termikus energia.

N.B.: F lehet + vagy -. A folyamat lehet *reakcióvezérelt* (a k_{be} -hez képest túl gyors diffúzió) vagy *diffúzióvezérelt* (a k_{be} -hez képest lassú diffúzió).

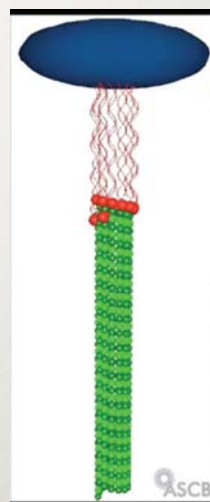
A POLIMERIZÁCIÓS ERŐ MEGMÉRHETŐ



MT-depolimerizáció-vezérelt erőkifejtés



Vezikulum transzport MT depolimerizációval



Kromoszóma (kinetochore) mozgatós
MT depolimerizációval

MCAK: MT-depolimerizáló kinezin

MCAK:

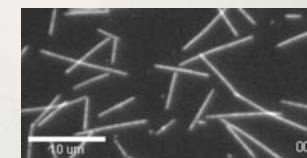
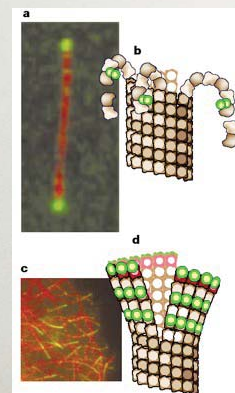
"Kinezin-13"

A MT + végéhez kötődik

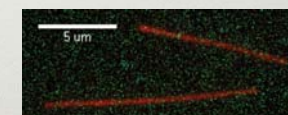
Diffúziós mechanizmussal keresi meg a + véget

ATP-t hidrolizál

MT depolimerizációt szabályoz ("katasztrófa-faktor")



MT-indukált MT depolimerizáció



Diffúziós keresés a MT mentén (GFP-MCAK)

AZ ÉLŐ SEJT FIZIKAI BIOLÓGIÁJA: MOTORFEHÉRJÉK, EGYENSÚLYTÓL TÁVOLI FOLYAMATOK

KELLERMAYER MIKLÓS

TEMATIKA

- Motorfehérjék működése. A munkaciklus
- Egyensúlytól távoli folyamatok. Erővezérelt fehérjegombolyodás.
- Bemutatók: in vitro motilitási próba. Az atomerőmikroszkóp. Titin kitekerés AFM-mel.

MOTORFEHÉRJÉK

1. Specifikus citoszkeletális filamentumhoz kapcsolódnak (DE...)
2. Elmozdulást és erőt generálnak
3. Kémiai energiát használnak fel
4. Kémiai energiát közvetlenül alakítják mechanikai munkává (nincs közbülső hő- vagy elektromos energia)

A MOTORFEHÉRJÉK TÍPUSAI

1. Aktin alapú

Miozinok: Konvencionális (miozin II) és nem-konvencionális Miozin szupercsalád (I-XXIV osztályok). Plusz vég irányába mozognak.

2. Mikrotubulus alapú

a. Dineinek: Ciliáris (flagelláris) és citoplazmáris dineinek.

A mikrotubulus mentén a mínusz vég irányába mozognak.

b. Kinezinek: Kinezin szupercsalád: konvencionális és nem-konvencionális.

A mikrotubulus mentén a plusz vég irányába mozognak.

c. Dinaminok: MT-függő GTPáz aktivitás

Biológiai szerep: vakuoláris fehérjeválogatás (pinchase enzimek)?

3. DNS alapú mechanoenzimek

DNS és RNS polimerázok, vírus kapszid csomagoló motor, kondenzinek

A DNS fonal mentén haladnak és fejtenek ki erőt

4. Rotációs motorok

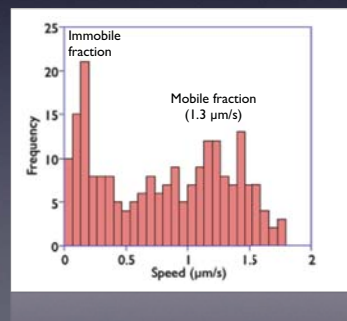
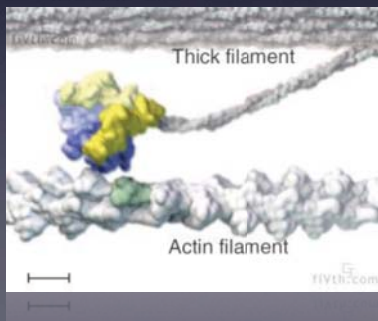
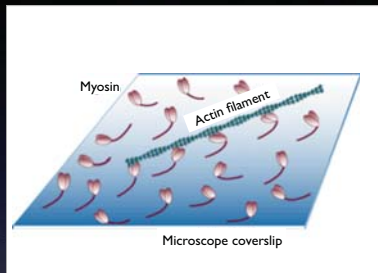
F1F0-ATP szintetáz

Bakteriális flagelláris motor

5. Mechanoenzim komplexek

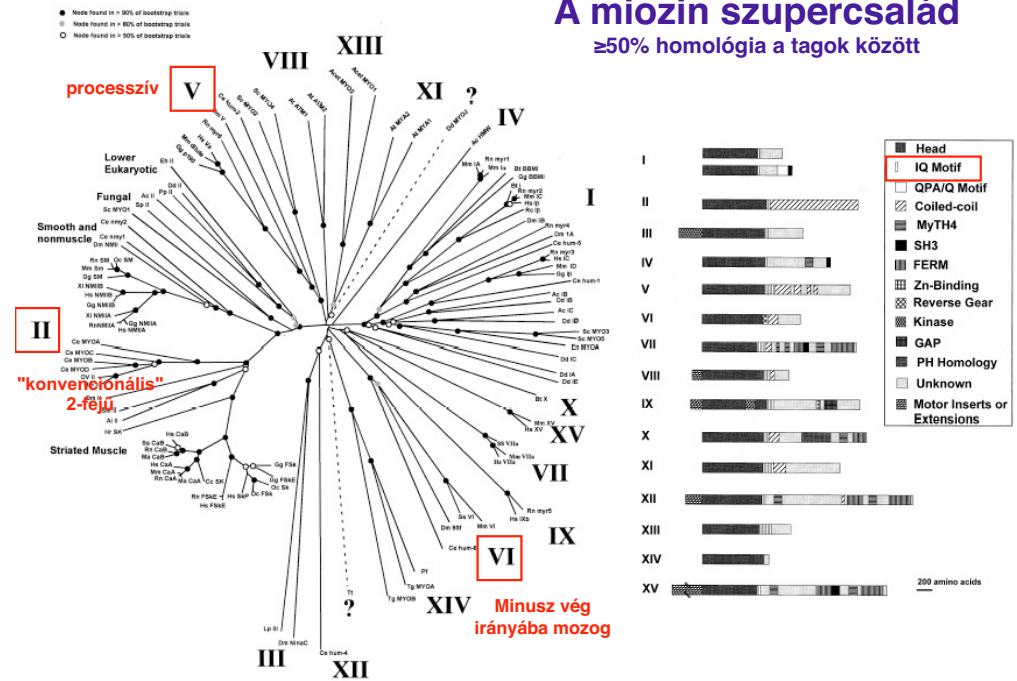
Riboszóma

In vitro aktomiozin motilitás

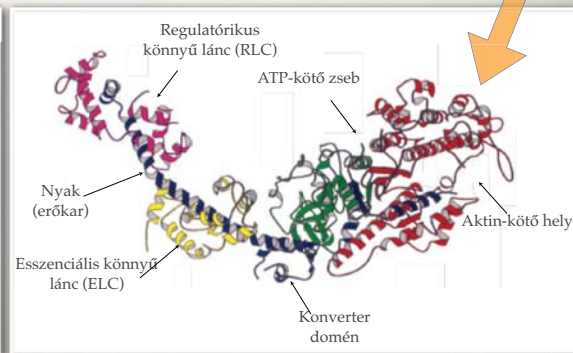
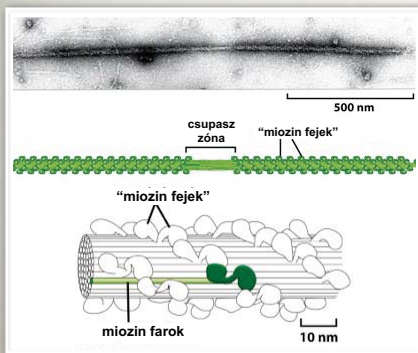
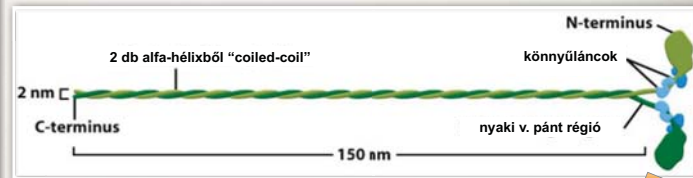
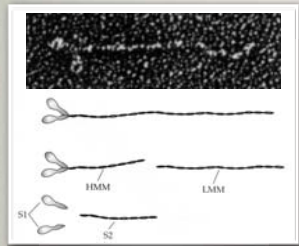


A miozin szupercsalád

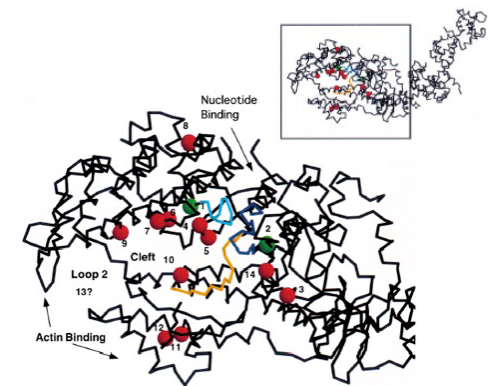
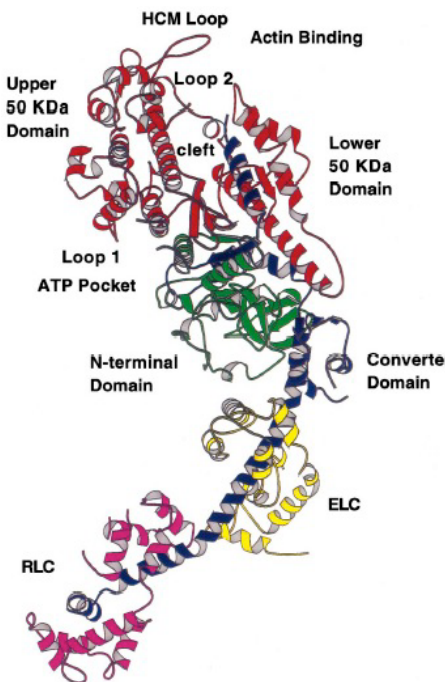
≥50% homológia a tagok között



A miozin II



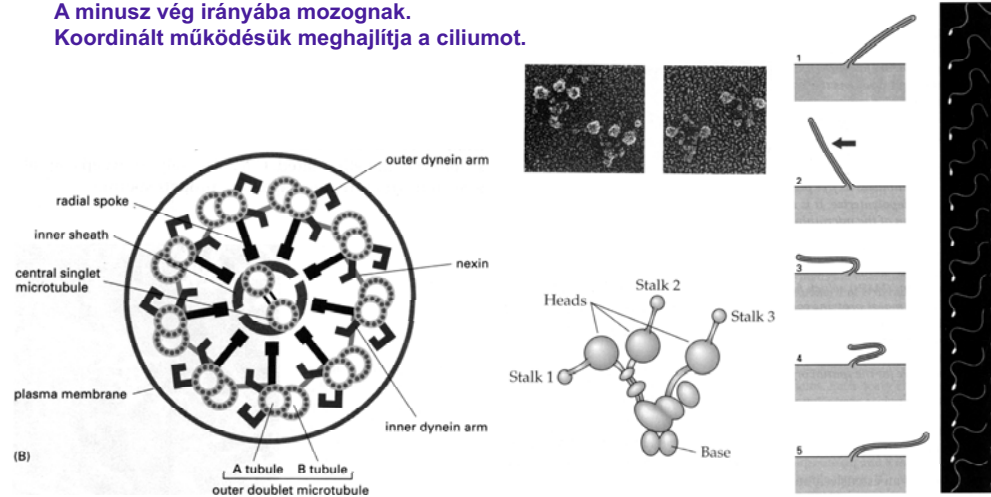
A miozin fej (Subfragment-1)



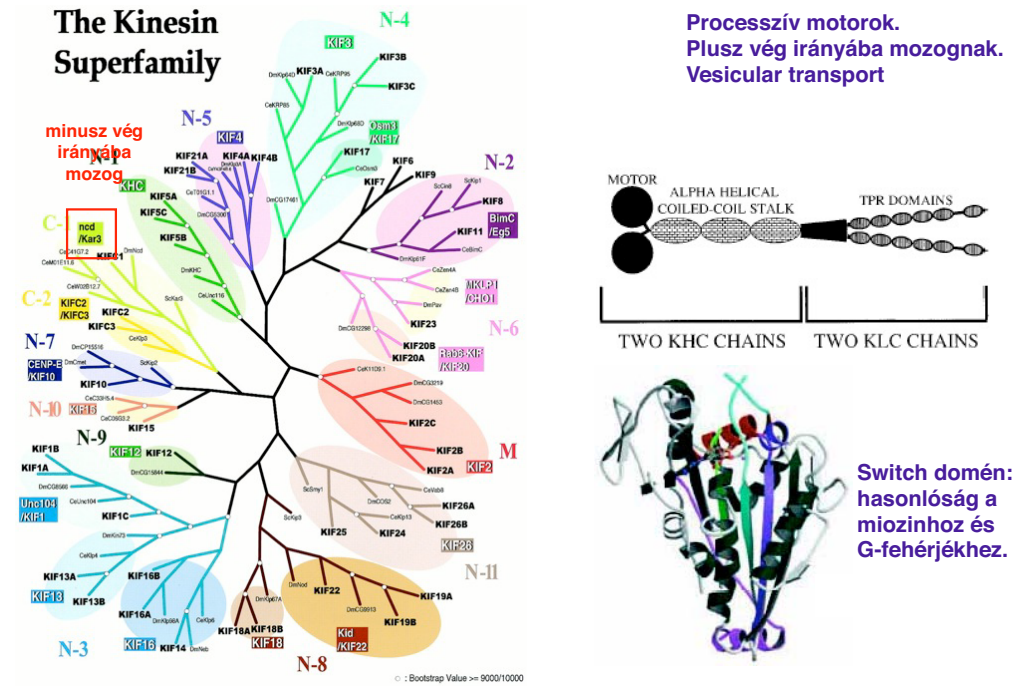
A motor domén mutációi hipertrofiás kardiomiopátiához vezetnek.

Dineinek

Típusok: axonemális és citoplazmáris.
Sok alegységes fehérjék (Mr~500 kDa)
A mínusz vég irányába mozognak.
Koordinált működésük meghajlítja a ciliumot.



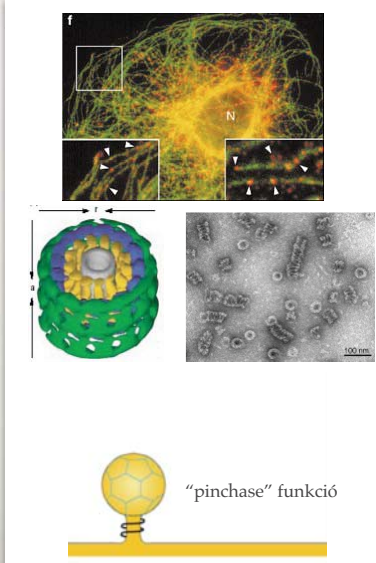
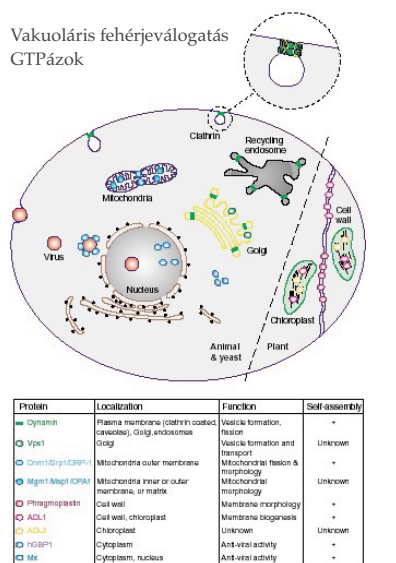
The Kinesin Superfamily



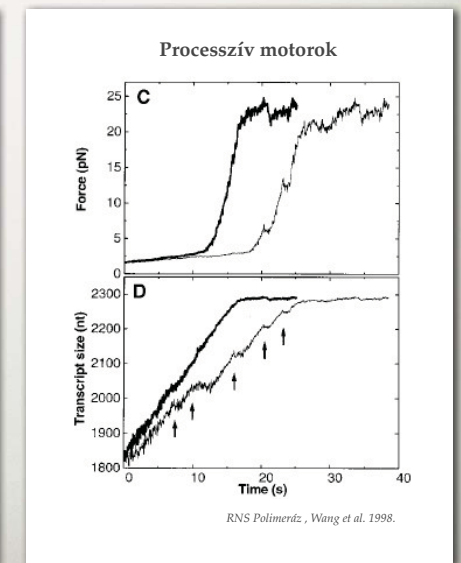
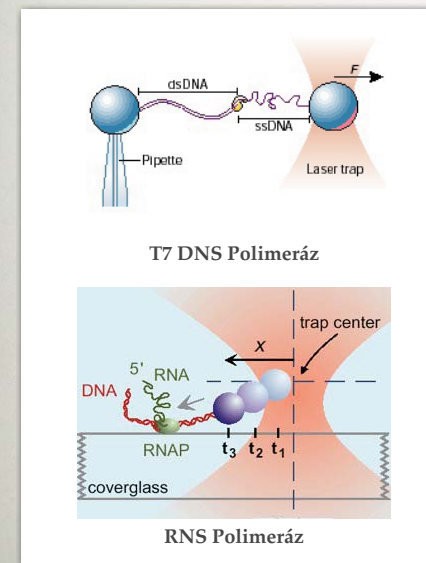
Processzív motorok.
Plusz vég irányába mozognak.
Vesicular transport

DINAMINOK

Vakuoláris fehérjevalogatás
GTPázok

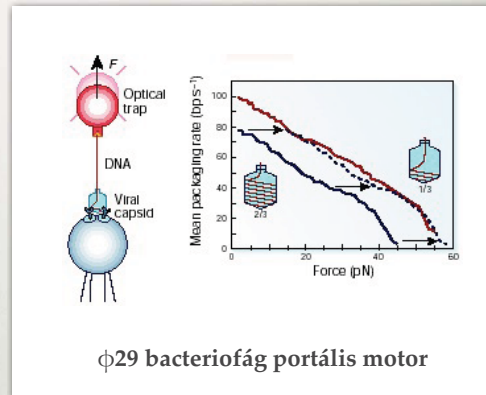
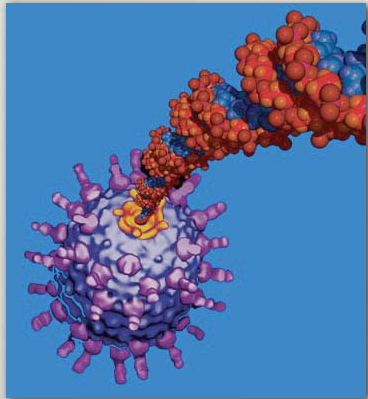


DNS MOTOROK



RNS Polimeráz, Wang et al. 1998.

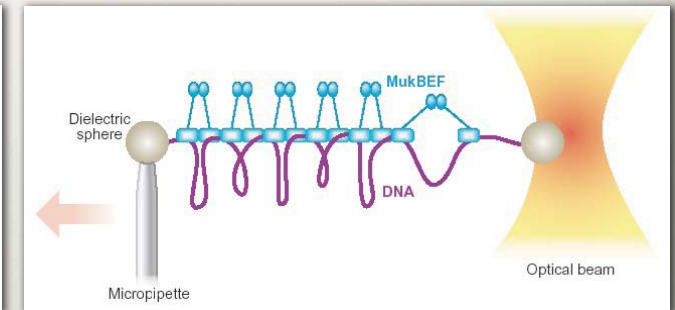
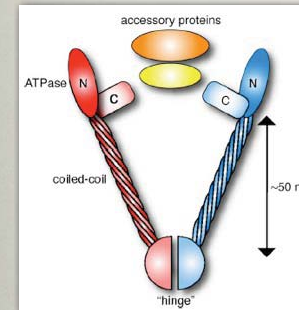
VÍRUS PORTÁLIS MOTOR KÜLÖNLEGES DNS MOTOR



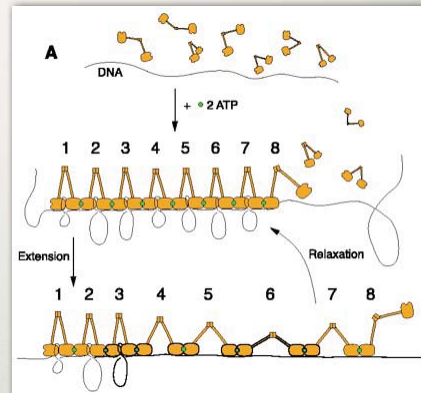
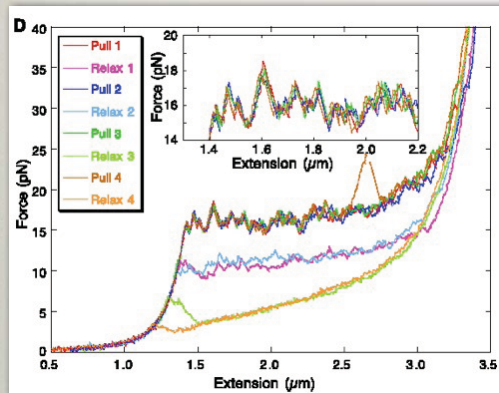
DNS MECHANOENZIMEK KONDENZINEK

SMC fehérjecsalád

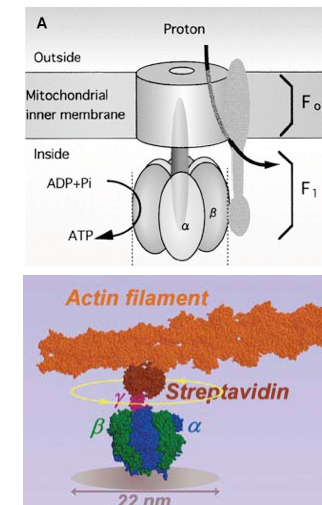
SMC = "structural maintenance of chromosomes"



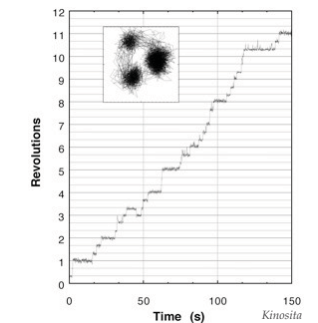
MUKBEF NANOMECHANIKA ÉS KONDENZÁCIÓS MODEL



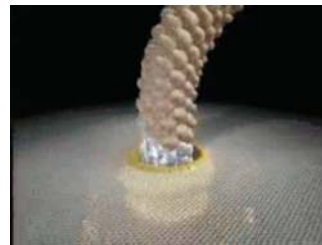
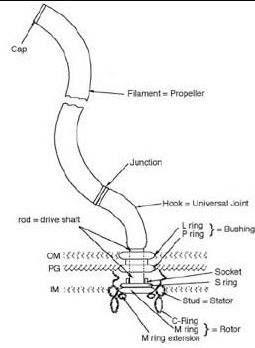
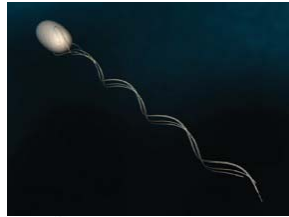
ROTÁCIÓS MOTOROK I: F1FO-ATP SZINTETÁZ



Diszkrét 120° rotációs lépések

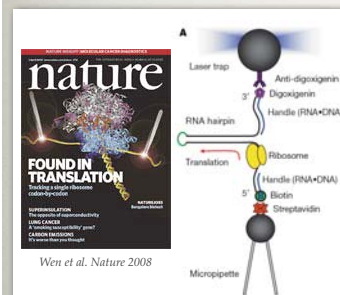


ROTÁCIÓS MOTOROK II: BAKTERIÁLIS FLAGELLUM MOTOR

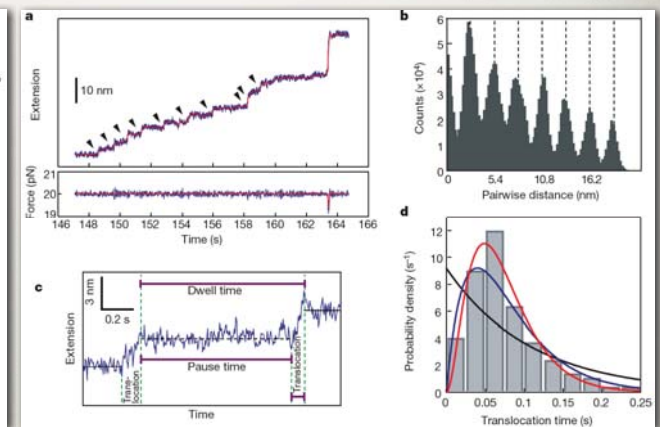


Fordulatszám: > 20000 rpm
Fogyasztás: 10^{-16} W
Hatásfok: > 80%
Energiaforrás: protonok

MECHANOENZIM KOMPLEX RIBOSZÓMA

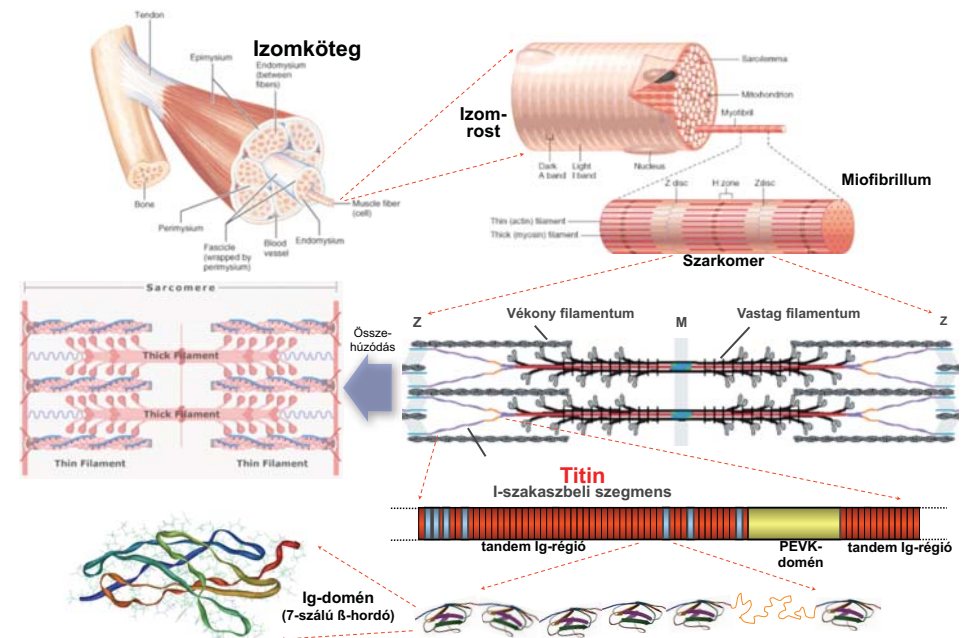


2.7 nm-es lépések (egy triplétt)
0.078 s transzlukációs idő
Transzlukációval csatolt helikáz aktivitás



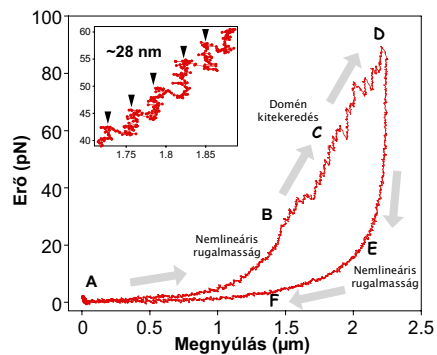
- Egyensúlytól távoli folyamatok:
erővezérelt fehérjekitekeredés és
gombolyodás

Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfűzér”



Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesszel

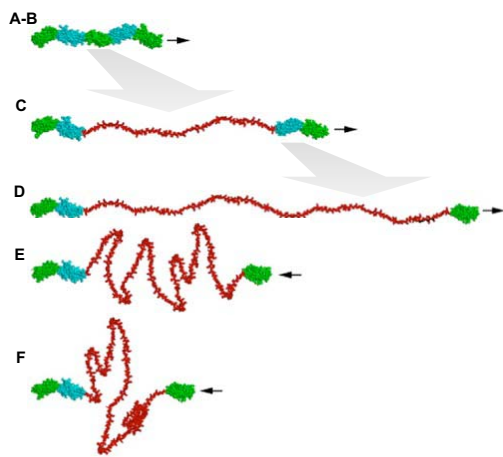
Erőválasz



A domének egymás után, a mechanikai stabilitásuk növekvő sorrendjében telerednek ki.

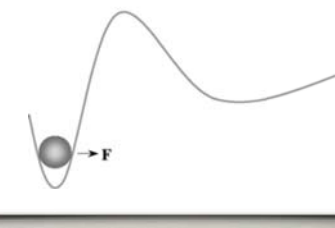
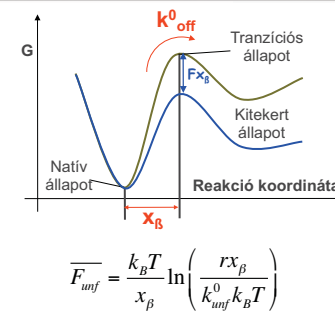
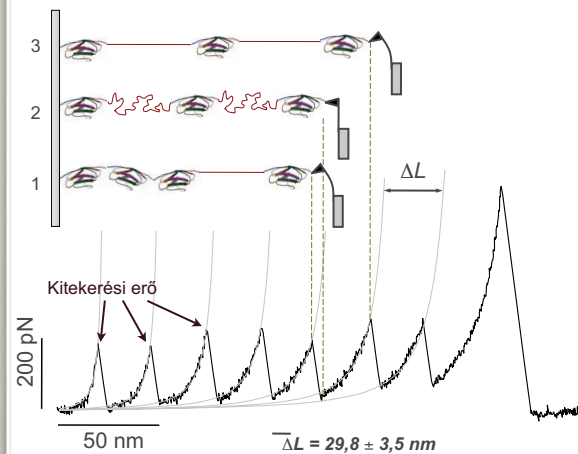
Erővezérelt szerkezetváltozások:

Nemlineáris rugalmasságra szuperonált domén kitekeredés



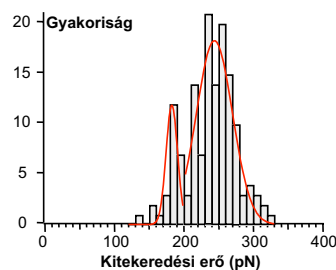
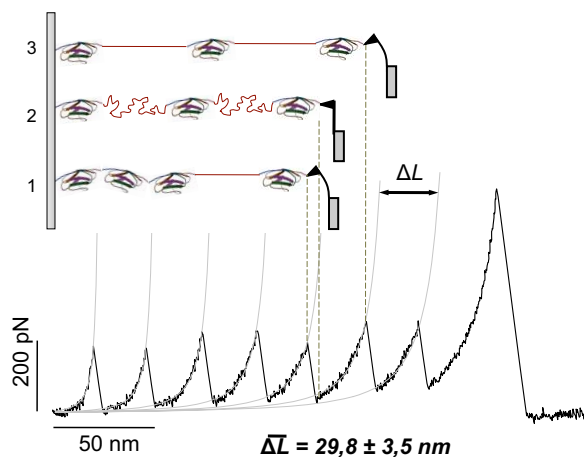
Erővezérelt fehérje-kitekeredés

Titin I55-62 rekombináns fragmentum kitekerése



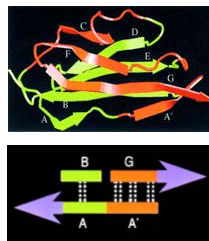
Titin I55-62: viszkoelasztikus molekulaszakasz

Az I55-62 fragmentum kitekeredési görbéje



Mechanikai stabilitás alapja:

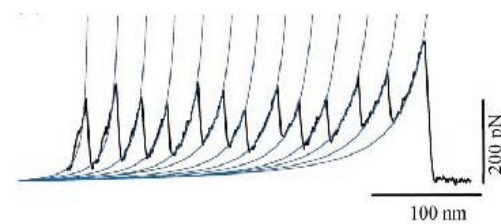
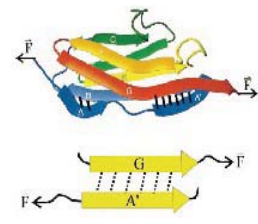
Az Ig domén első és utolsó β-láncait összetartó, párhuzamosan csatolt H-hidak



A mechanikai stabilitás biológiai logikája

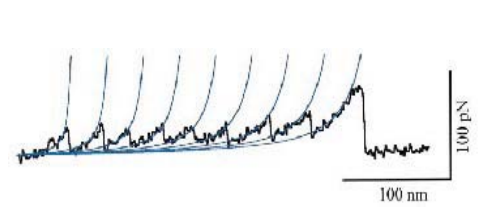
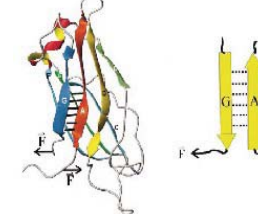
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kitekeredési erő

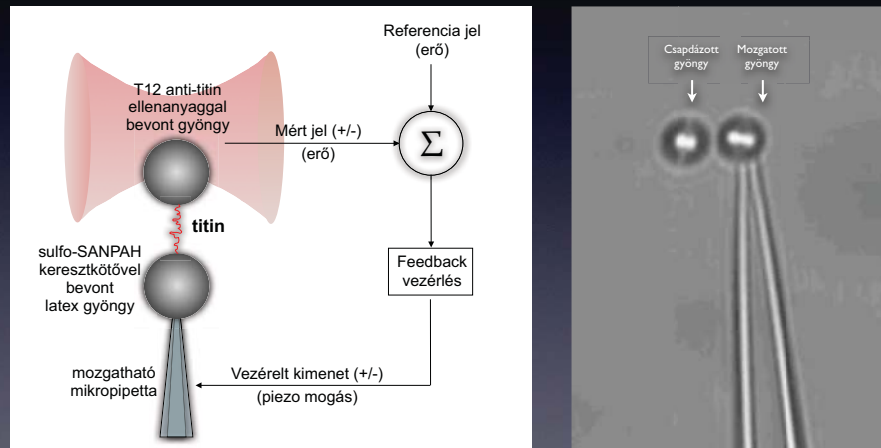


Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

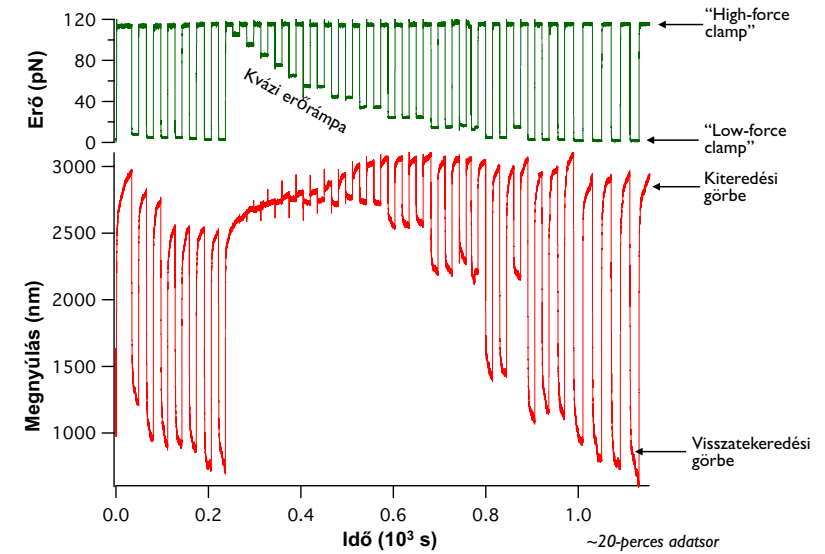
Alacsony kitekeredési erő



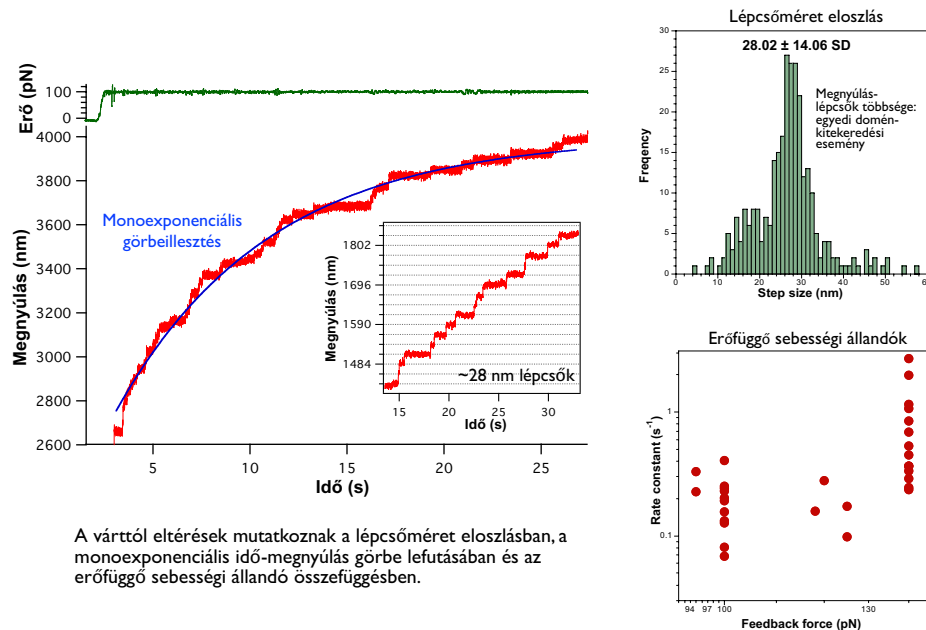
Titin nanomanipulálás erővisszacsatolt lézercsipesszel



Konstans-erő kísérlet egyetlen titinmolekulán

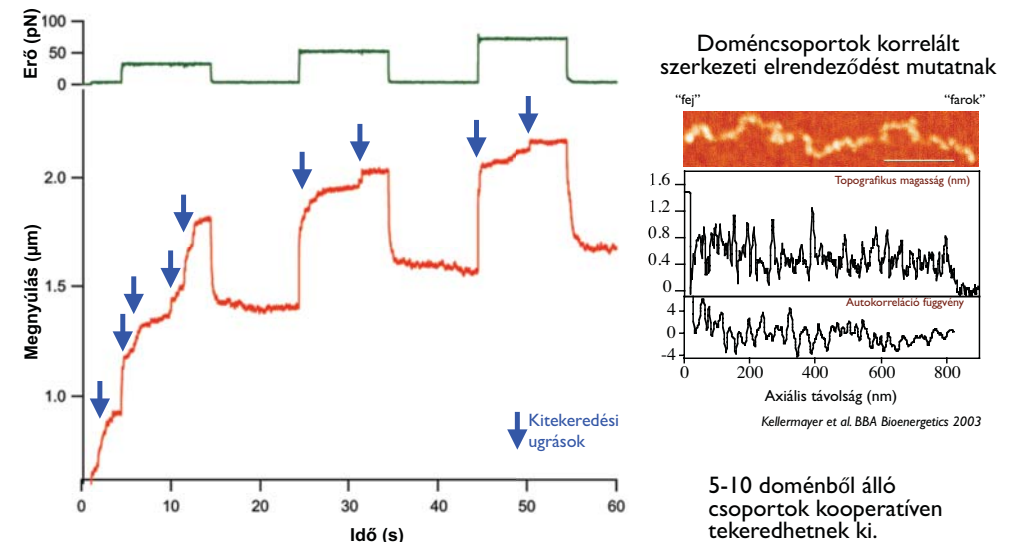


Titin kitekeredés konstans erőnél



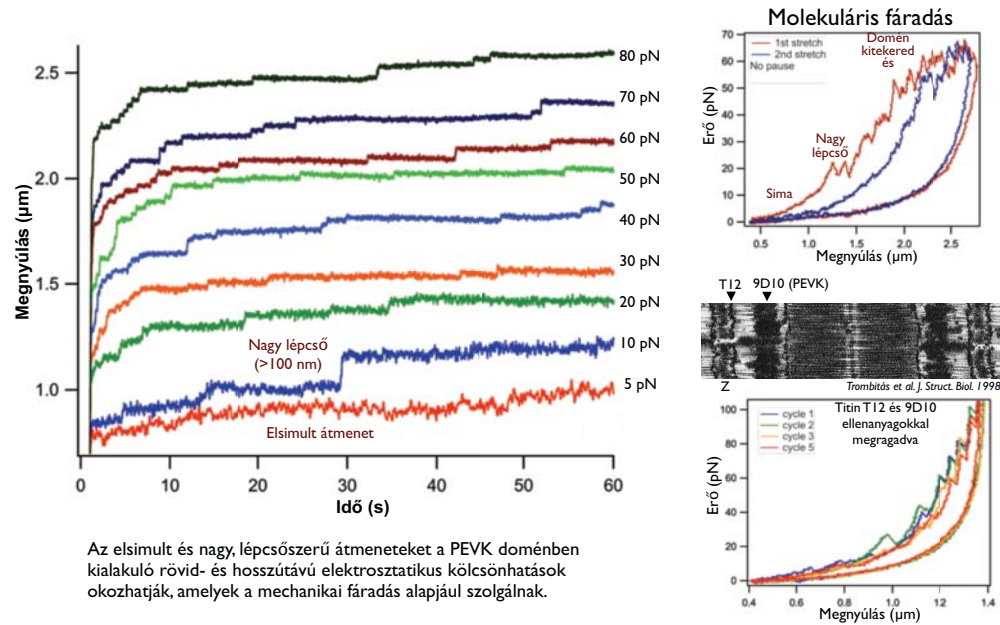
A várttól eltérések mutatkoznak a lépcsőméret eloszlásban, a monoexponenciális idő-megnývulás görbe lefutásában és az erőfüggő sebességi állandó összefüggésben.

Doménkitekeredés hirtelen ugrásokban

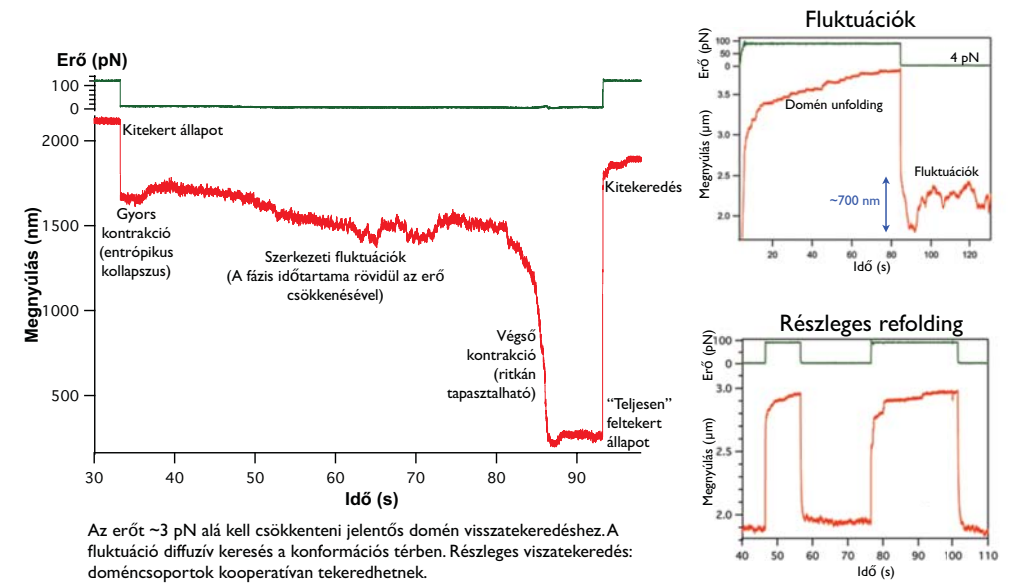


Kellermayer et al. BBA Bioenergetics 2003

Szerkezeti átmenetek alacsony erőnél



Titin gombolyodás konstans erőnél



A visszatekeredési útvonal változatos még egyetlen molekula esetén is

