

Biomolekulák és sejtek mechanikai tulajdonságai

Kellermayer Miklós

Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

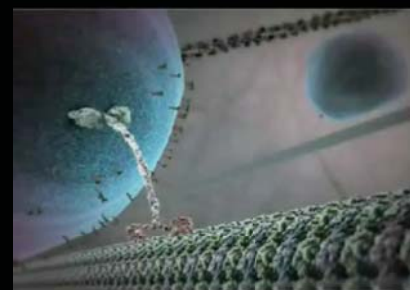
Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



Toxoplasma gondii



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transport kineezinnel



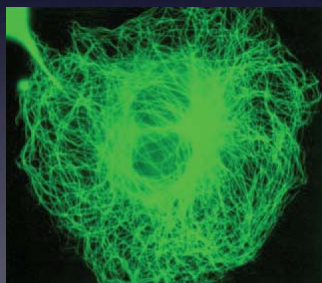
Fehérjeszintézis riboszómán

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

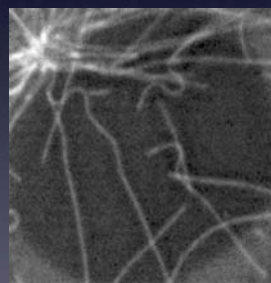
Miért egyedi molekulák?

1. Egyének azonosíthatók a tömegben

Microtubuláris rendszer



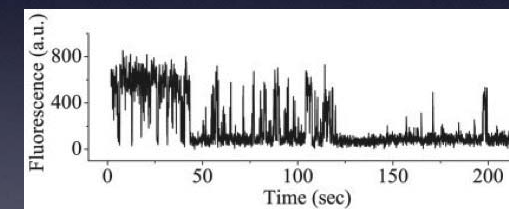
Egyedi mikrotubulusok -
treadmilling



Miért egyedi molekulák?

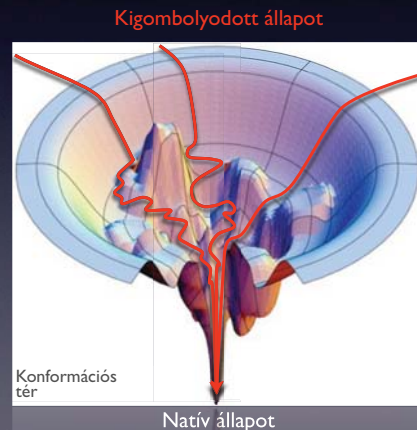
2. Véletlenszerű eseményeket fedeztünk fel

Kvantumpont pislogás



Miért egyedi molekulák?

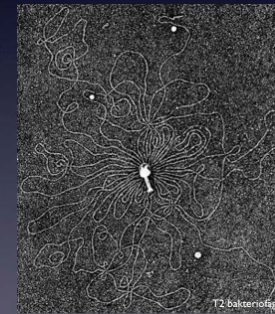
3. Párhuzamos útvonalon haladó folyamatokat ismerhetünk meg



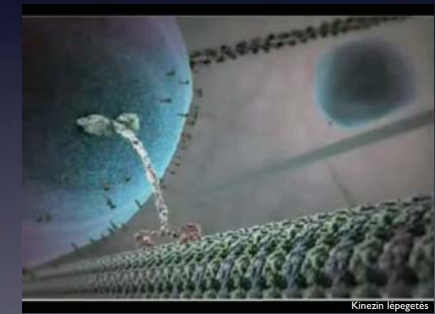
Miért egyedi molekulák?

4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük

Hajlítási rugalmasság



Motor fehérje működés



Rövid anyagtudomány

Merev testek rugalmassága: Hooke törvény

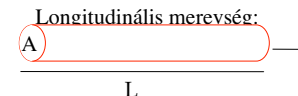
$$\frac{F}{A} = E \frac{\Delta L}{L}$$

F = erő
A = test keresztmetszete
L = nyugalmi hossz
 ΔL = megnyúlás
F/A = feszültség
 $\Delta L/L$ = relatív megnyúlás
E=Young féle vagy elasztikus modulus (Pa)

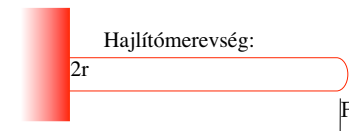
Anyag	Young modulus (Pa)
Gyémánt	1200
Acél	211
Üveg	73
Plexi	3
Gumi	0.02
Selyem	5-10
Keratin	2.4
Aktin	2.3
Kollagén	2
Tubulin	1.9
Elasztin	0.002

Merevségi (vagy rugó-) állandó

Merevségi (vagy rugó-) állandó ($k=F/\Delta L$) nem anyagfüggő paraméter. A merevségi állandó (k) függ a test alaki paramétereitől, az erő irányától, és azt mutatja meg, hogy egységnyi megnyúlást mekkora erő idéz elő.



$$K = \frac{F}{\Delta L} = \frac{EA}{L}$$



$$K = \frac{4\pi}{3} \frac{Er^4}{L^3}$$

A polimerlánc és a bolyongó mozgás (random walk) közötti kapcsolat

A polimerlánc alakja hasonlítható a Brown mozgáshoz (random)

Egyenesvonalú mozgás esetén: $R = v(t_2 - t_1)$

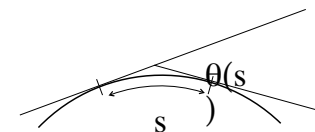
Bolyongó mozgás esetén: $R = l^{1/2} [v(t_2 - t_1)]^{1/2}$

R=elmozdulás,
v= átlagos sebesség,
t₁, t₂=mérési időpontok,
l=átlagos korrelált lépéshossz

A Kuhn szegmens ("freely jointed chain") és a perzisztencia hossz ("wormlike chain")

FJC (freely jointed chain): Kuhn szegmens = l_{eff}

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.

"Termikus" rugalmasság

A polimerlánc átlagos alakja leírható egyszerű paraméterek segítségével:

$$\langle R^2 \rangle = 2L_p L$$

A perzisztenciahossz a lánc hajlítómerevségével áll összefüggésben: minél rövidebb L_p, annál hajlékonyabb a lánc, és megfordítva.

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

EI = hajlítómerevség

E=Young modulus

l=hajlítási tehetetlenségi nyomaték (körkeresztmetszetű rúd esetében $I = r^4 \pi / 4$)

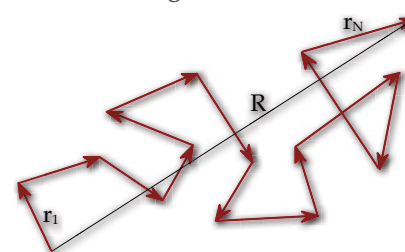
k_B =Boltzmann állandó

T abszolút hőmérséklet.

Merev	$L_p \gg L$	
Szemiflexibilis	$L_p \sim L$	
Flexibilis	$L_p \ll L$	

A POLIMÉREK ALAKJA A BOLYONGÓ MOZGÁSRA EMLÉKEZTET

Brown-mozgás - "random walk"



"Négyzetgyök törvény":

$$\langle R^2 \rangle = N l^2 = L l$$

R = vég-vég távolság

N = elemi vektorok száma

$l = |\vec{r}_i|$ = korrelációs hossz

r_i = elemi vektor

Nl = L = kontúrhossz

l összefüggésben van a hajlítómerevséggel.

Bolyongó (diffúzióvezérelt) mozgás esetén R=elmozdulás, N= elemi lépések száma, L=teljes megtett út, és l=átlagos szabad úthossz.

BIOPOLIMÉREK MECHANIKÁJA

Entrópikus rugalmasság

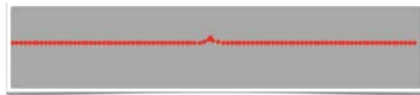
Termikus gerjesztésre a polimerlánc random, ide-oda hajló fluktuációkat végez.



Nő a lánc konformációs entrópiája (elemi vektorok orientációs rendezetlensége).



Az entrópiamaximumra törekvés miatt a polimerlánc rövidül.



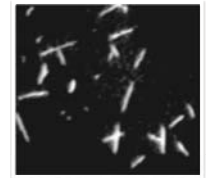
BIOPOLIMÉREK RUGALMASSÁGA

l = korrelációs hossz (hajlítómerevséget jellemzi)
 L = kontúrhossz

Merev lánc
 $l \gg L$



Mikrotubulus



Szemiflexibilis lánc
 $l \sim L$



Aktin filamentum



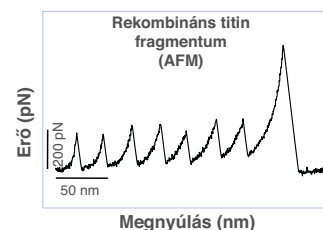
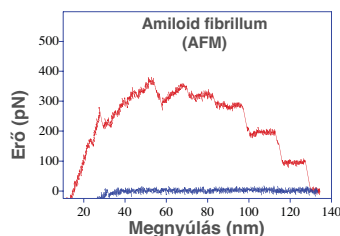
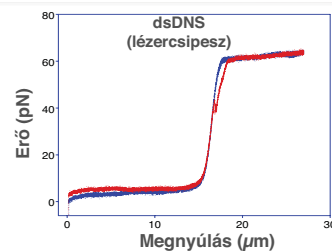
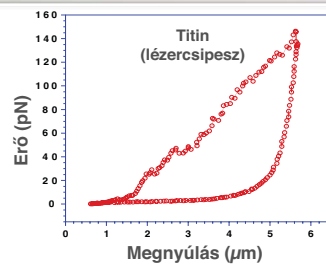
Flexibilis lánc
 $l \ll L$



DNS molekula

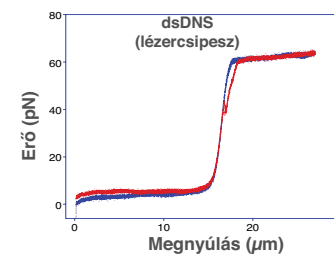
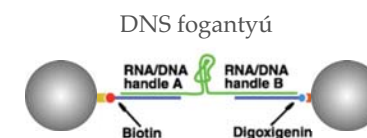


Vizsgálható paraméterek: erő



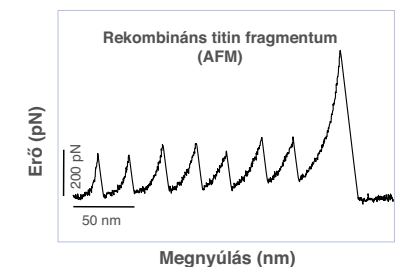
RUGALMASSÁG + SZERKEZETI VÁLTOZÁS ("ÁTMENET")

Molekuláris szingularitás: nanomechanikai ujjlenyomat



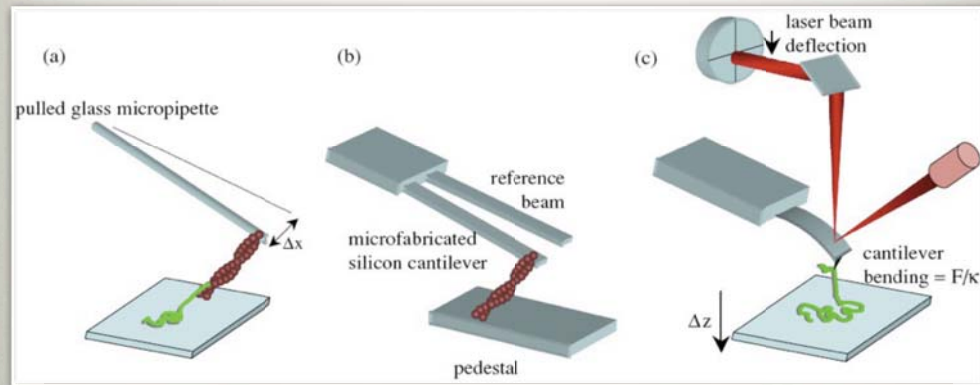
Kooperatív átmenet 65 pN-nál
 DNS-RNS hibrid

Rekombináns poliprotein

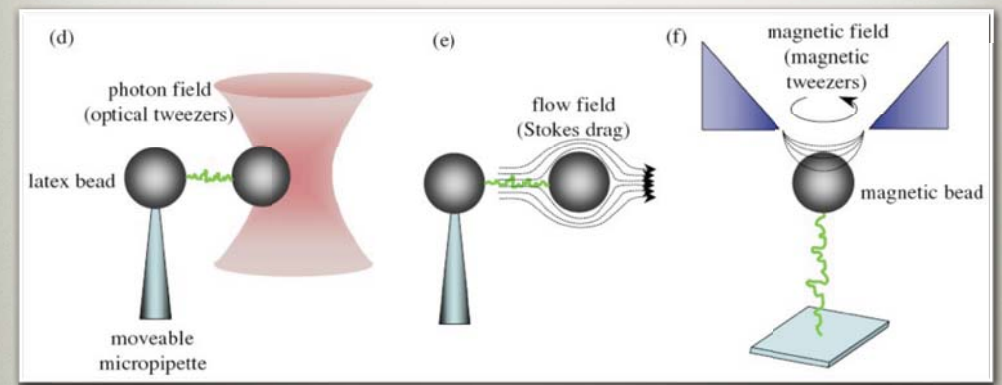


Fűrészfog alakú átmenetek
 Egyenlő távolság a fogak között

Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció rugólapka technikákkal

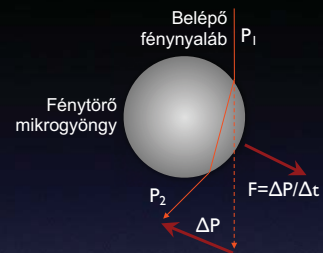
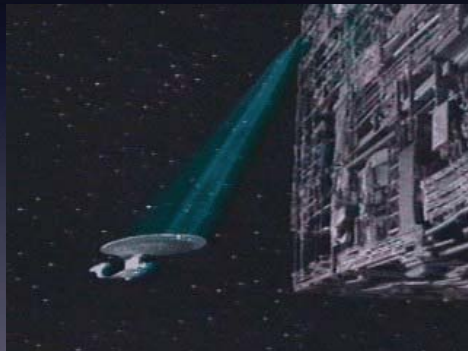


Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció mező alapú technikákkal



Hogyan fogjunk meg egyetlen molekulát?

Lézerrel!



MOLEKULA - FOGANTYÚ GEOMETRIA

mikrogönggy ~ 1 μm

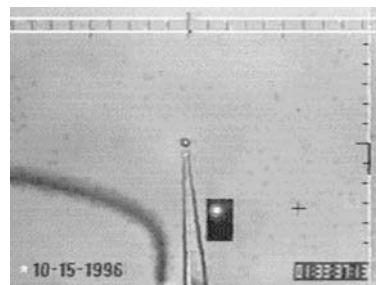
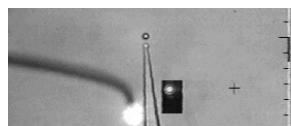
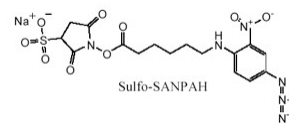
molekula ~ 10 nm

HOGYAN RAGADJUNK MEG EGY MOLEKULÁT?

Például "molekulahegesztéssel"!

Fotoreaktív keresztkötők

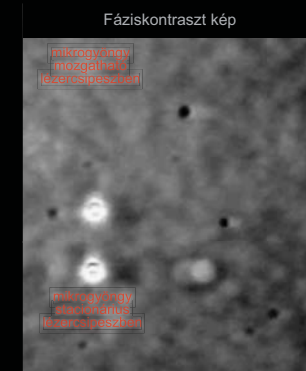
Nem-specifikus
Fotoreaktív N₃ (azid)
csoport
UV megvilágítás



Csomókötés egyetlen molekulafonálra lézercsipesszel

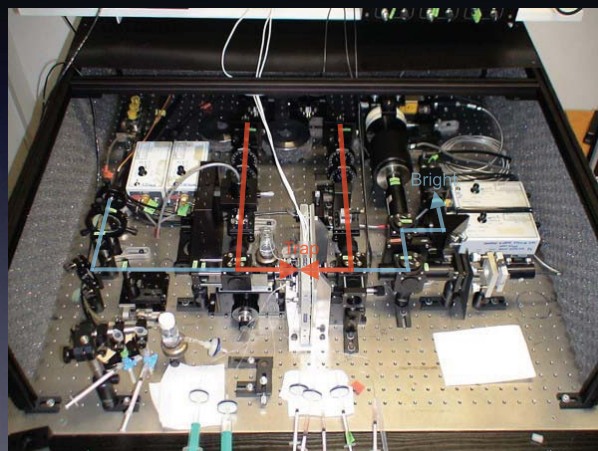
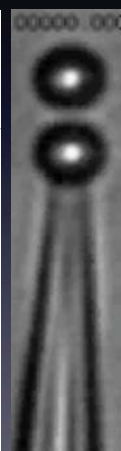
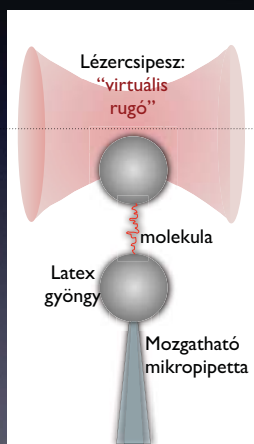
Aktin filamentum

DNS



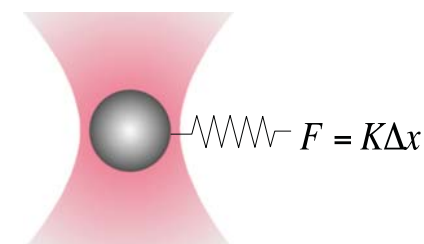
Arai et al. Nature 399, 446, 1999.

A lézercsipesszel erőt is lehet mérni!



Két lézersugaras optikai csipész berendezés

A lézercsipesz virtuális rugó "Pikotenziométer"

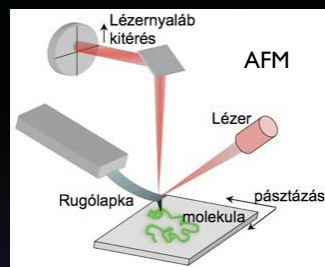


$\Delta x \approx$ nanométer tartomány

$K \approx 0.01 - 1$ pN/nm

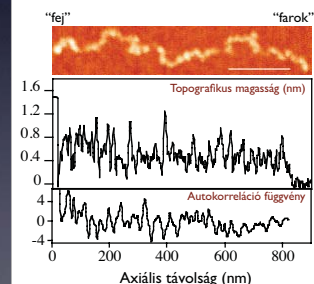
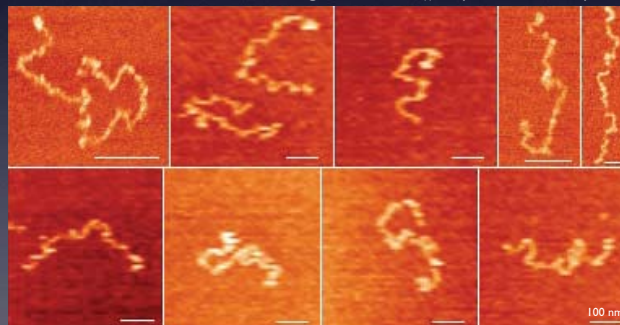
$F \approx$ pikonewton tartomány

Egyedi titinmolekulák vizualizálása AFM-mel



Doménsoportok korrelált organizációja

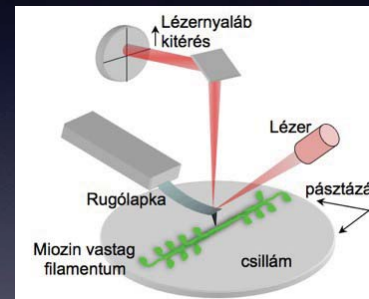
“Random coil” filamentum globuláris fejjel (C-terminális)



Egyedi miozin filamentumok vizualizálása

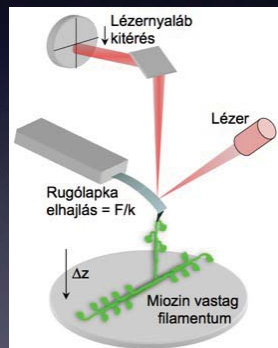
Atomerő mikroszkópia

Szintetikus miozin filamentum
Egyedi miozinmolekulák feloldhatóak vizes közegben

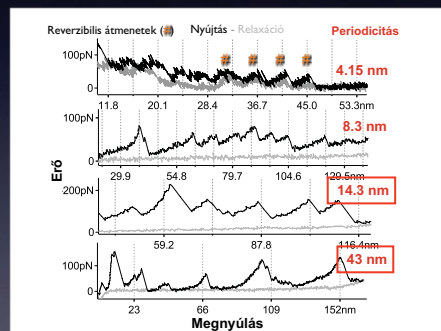


Miozin filamentumok nanomechanikája

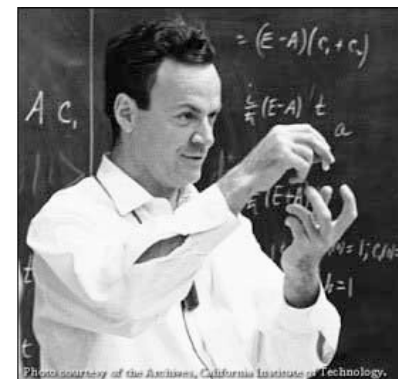
Egymolekula erőspektroszkópia
 $\text{Erő (pN)} = \text{Rugóállandó (pN/nm)} * \text{Elhajlás (nm)}$



Periodicity of repetitive force peaks correlates with spacing of charged regions along backbone

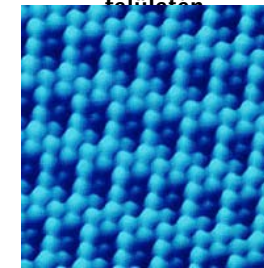


AFM történelem



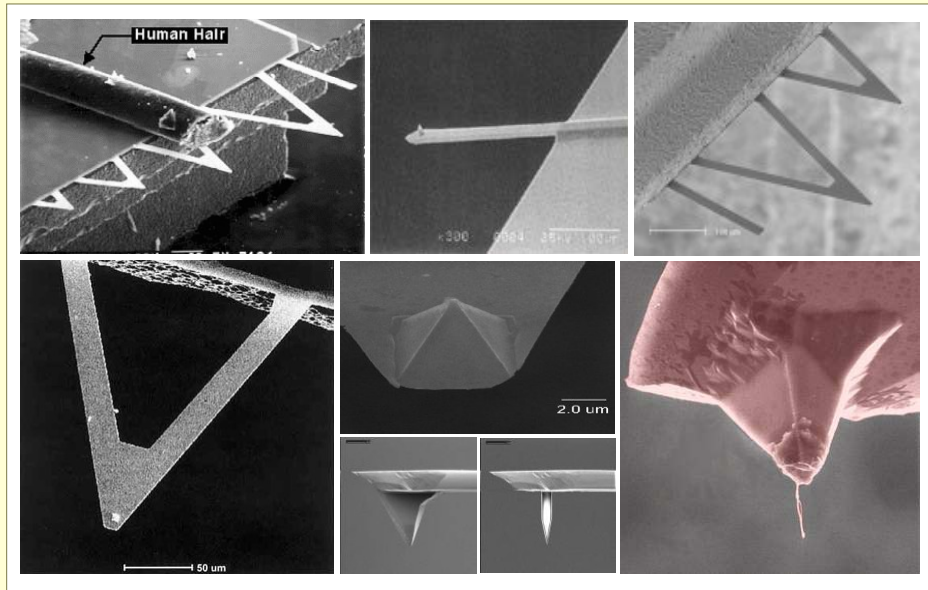
Richard P. Feynman:
“There is plenty of room at the bottom”
1959. december 29.

Oxigén atomok
rhodium egykristály
felületén

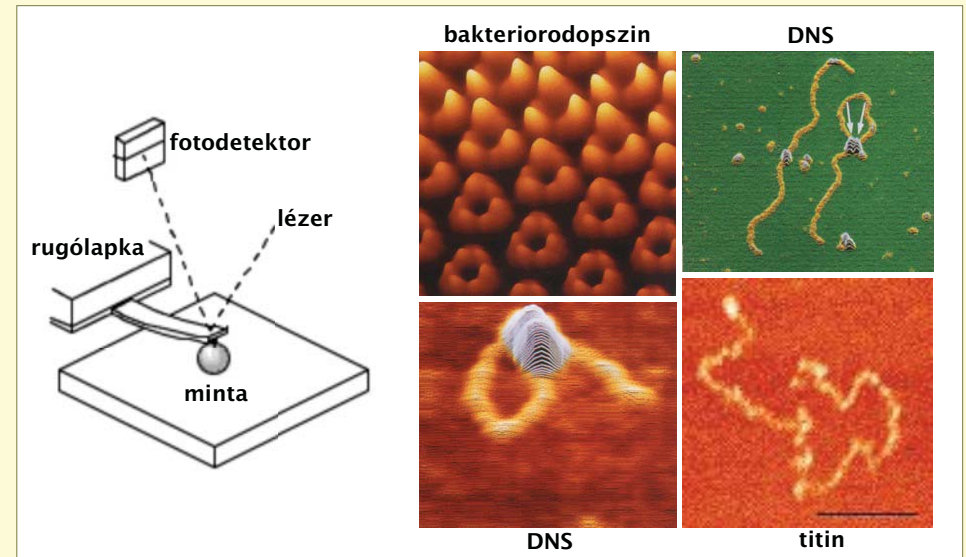


a “nanovilág” léptéke:
1 nanométer

AFM Rugólapkák és hegyek



Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscope = AFM)

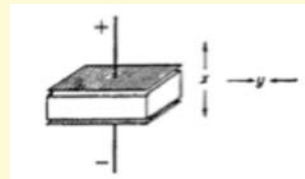


Piezelektromos hatás

Inverz piezelektromos hatás

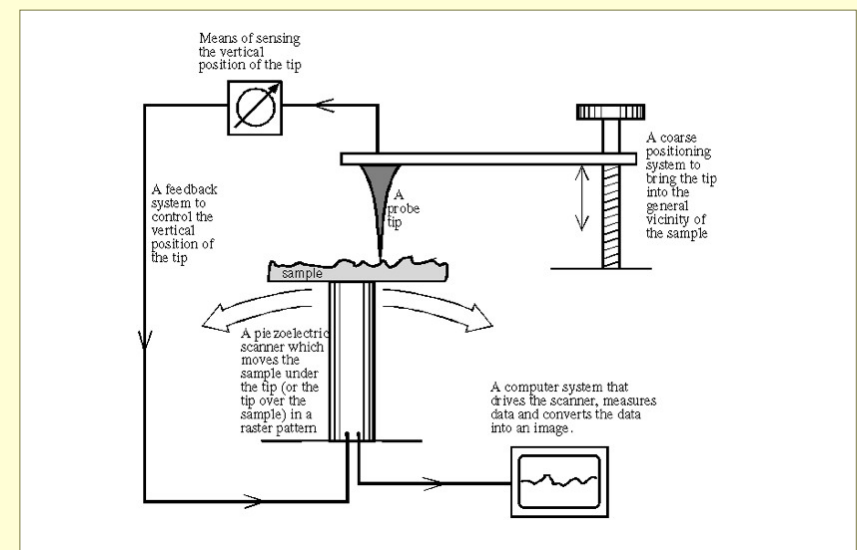
Piezelektromosság (Pierre és Jacques Curie, 1880): "nyomáselektromosság"

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

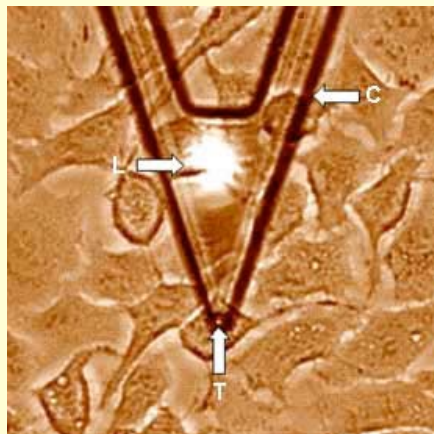
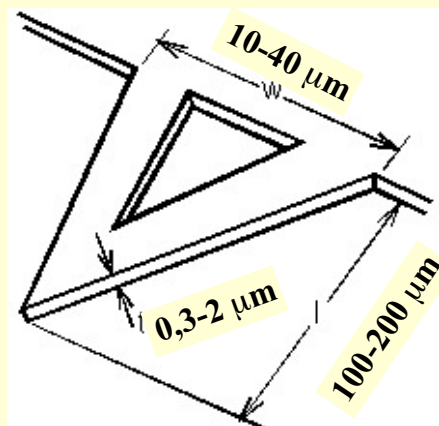


Inverz piezelektromos hatás: bizonyos kristályokban potenciálkülönbség hatására fellépő deformáció:

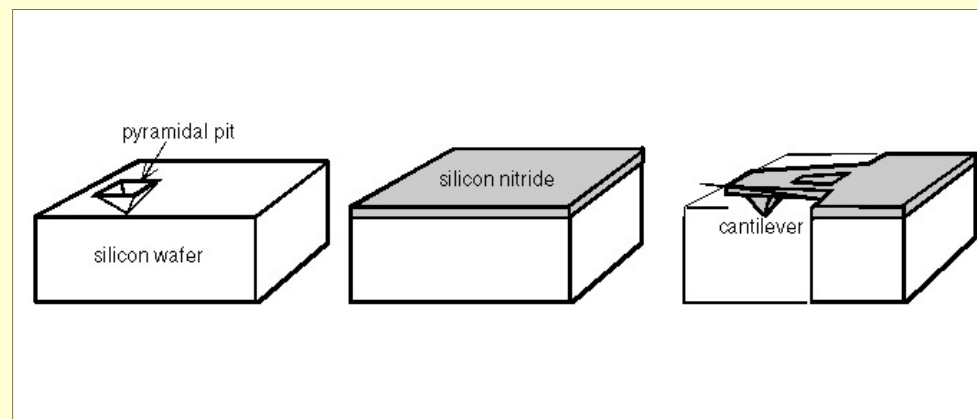
Pásztázó tűszondás mikroszkópia (Scanning Probe Microscopy = SPM)



Rugólap méretei

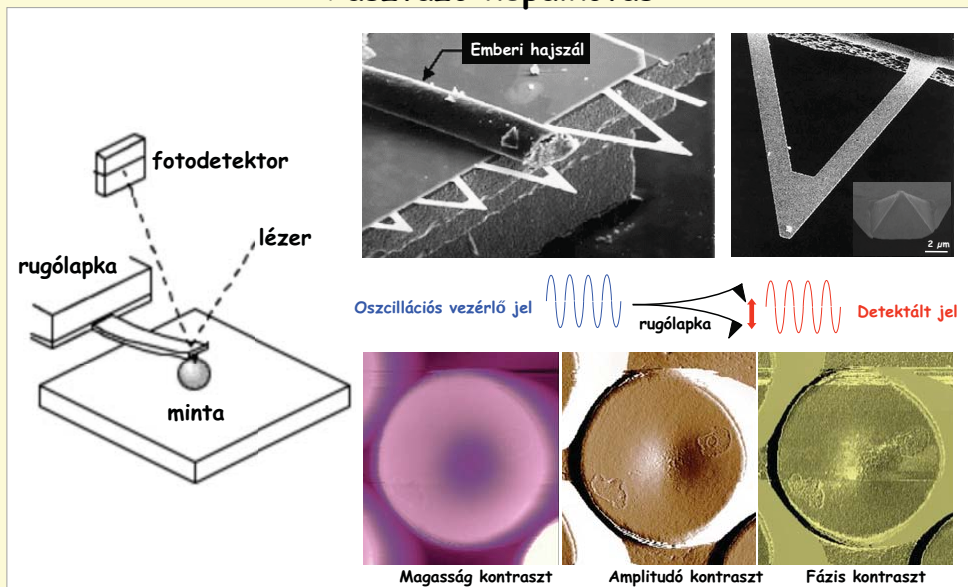


Rugólapkák készítése



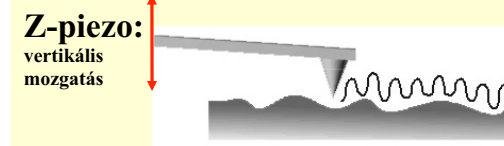
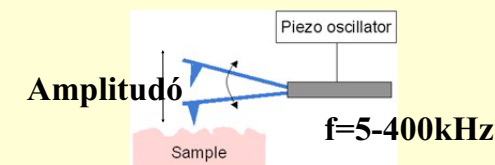
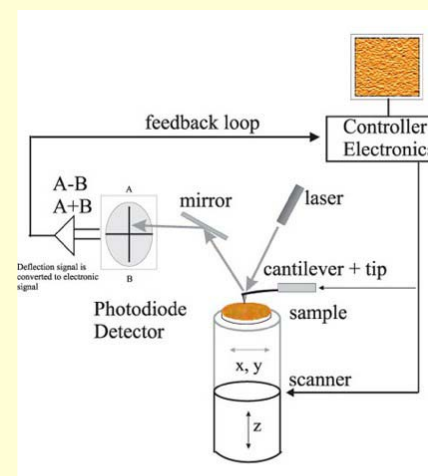
AFM alapok

Pásztázó képalkotás



Képalkotási módok

Oszcillációs mód – **biológiai minták** esetében ideális.
Kontakt mód



A túl a felszínt követi, konstans amplitudó mellett.

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

Minta: legyen minél laposabb
ne legyen viszkózus

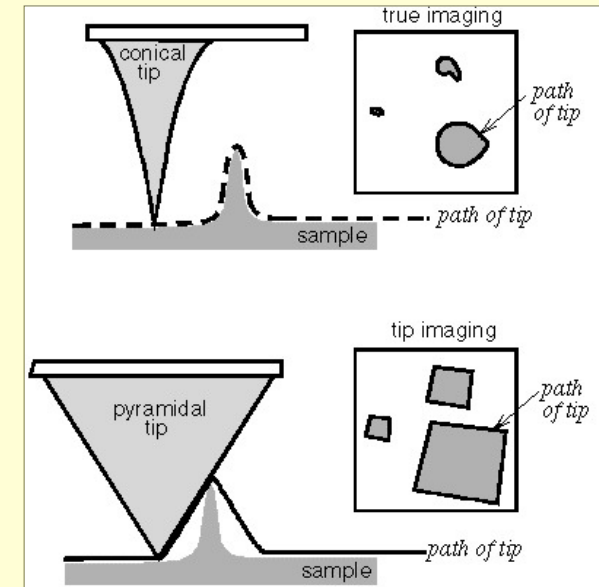
„Az AFM hátrányai”

Időfelbontás: perces nagyságrendbe esik

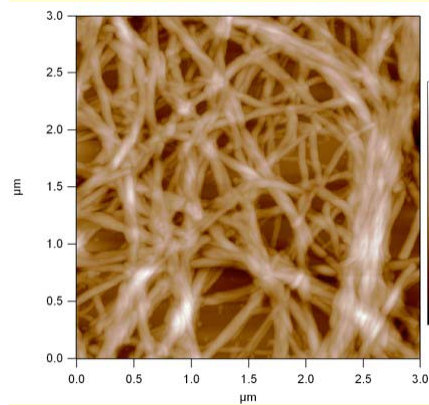
Csak felszínhez kötött minta vizsgálható

Csak felszínen zajló folyamat követhető nyomon

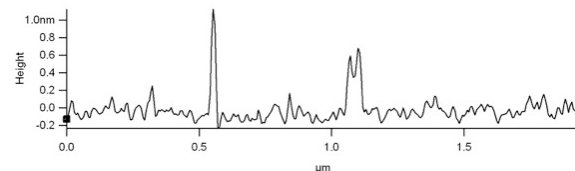
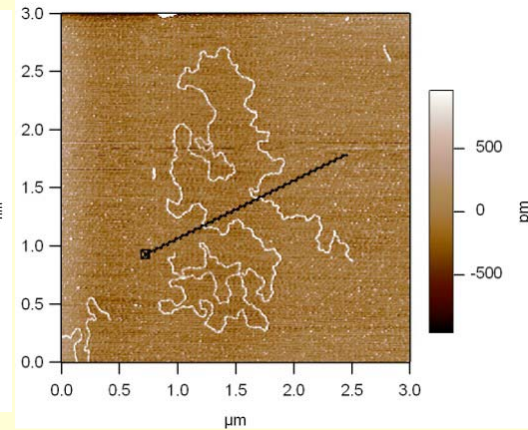
Képalkotási hibák, felbontás



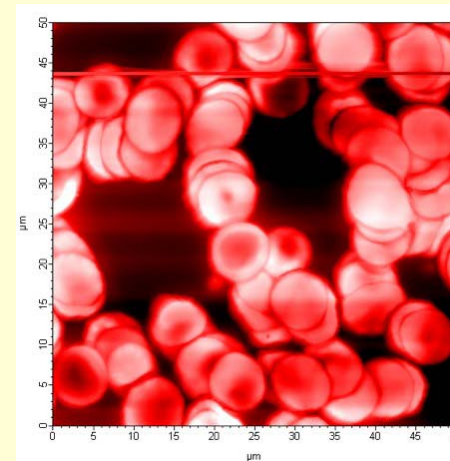
Béta-amyloid fibrillumok



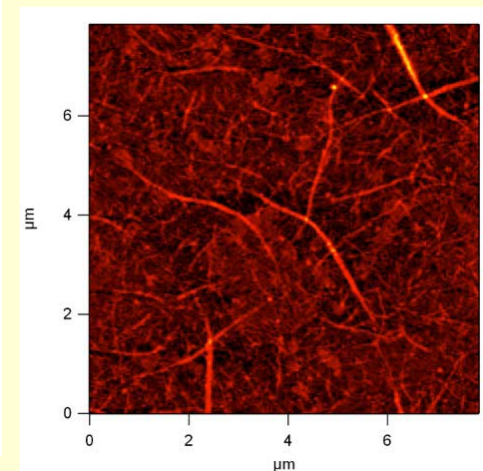
DNS



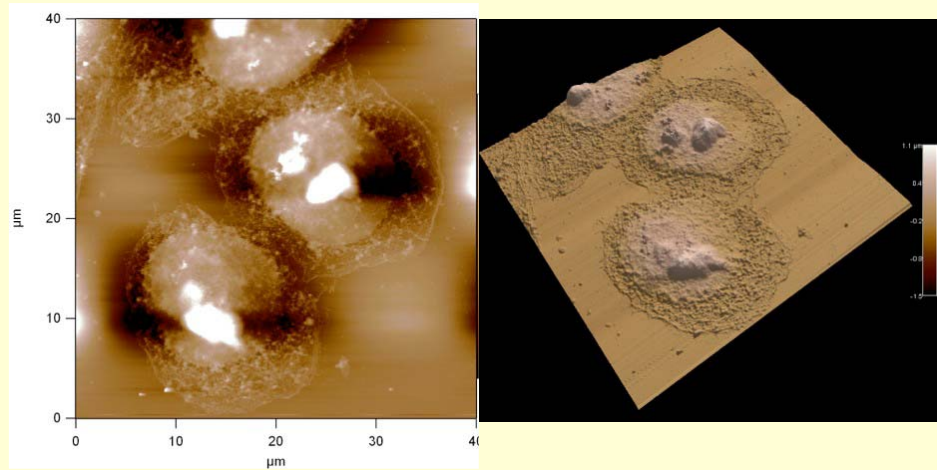
Vvt kenet



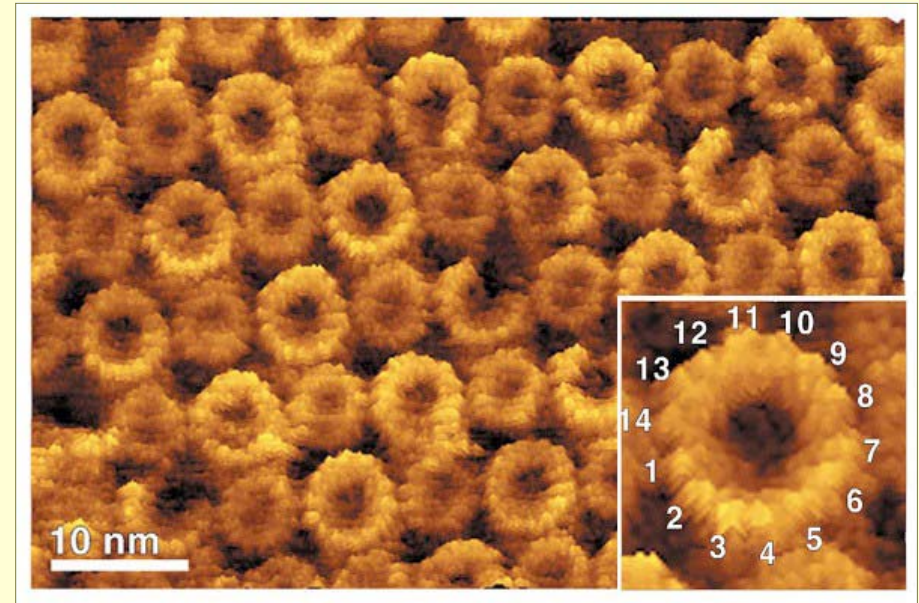
Fibrin hálózat



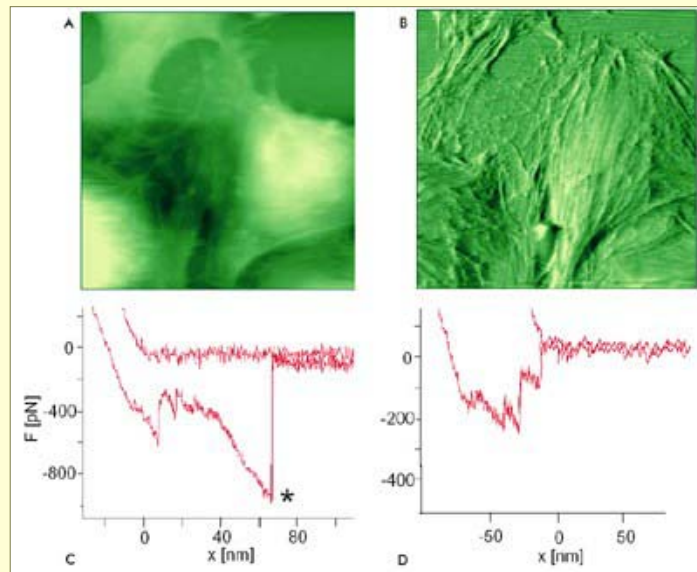
HeLa sejtek



Képek: ATP-szintáz

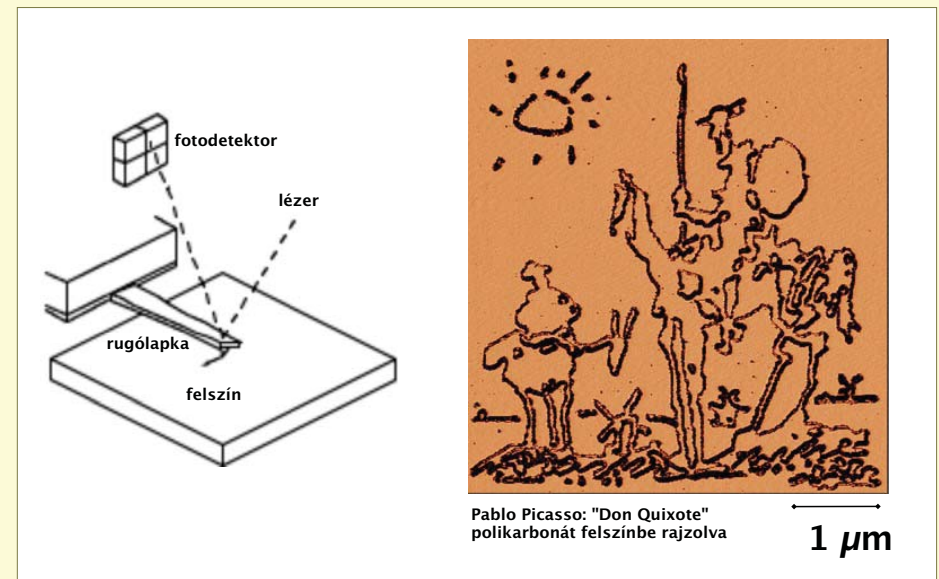


Képek: endotél sejtek

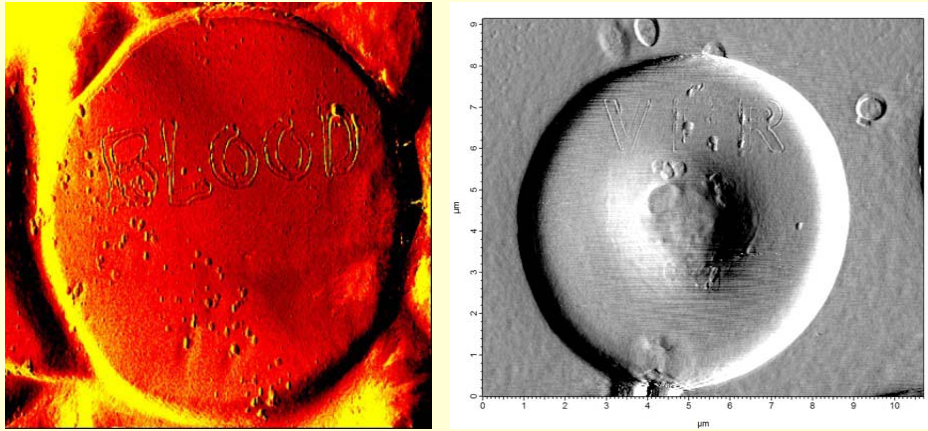


Nanolitográfia

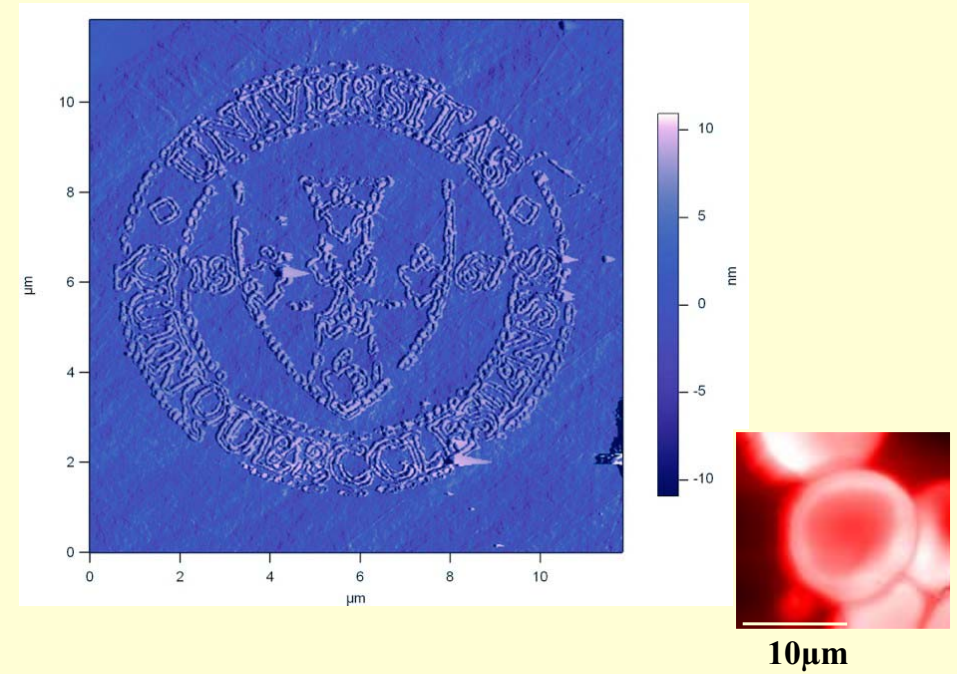
Lithos: kő, gráfia: rajzolni



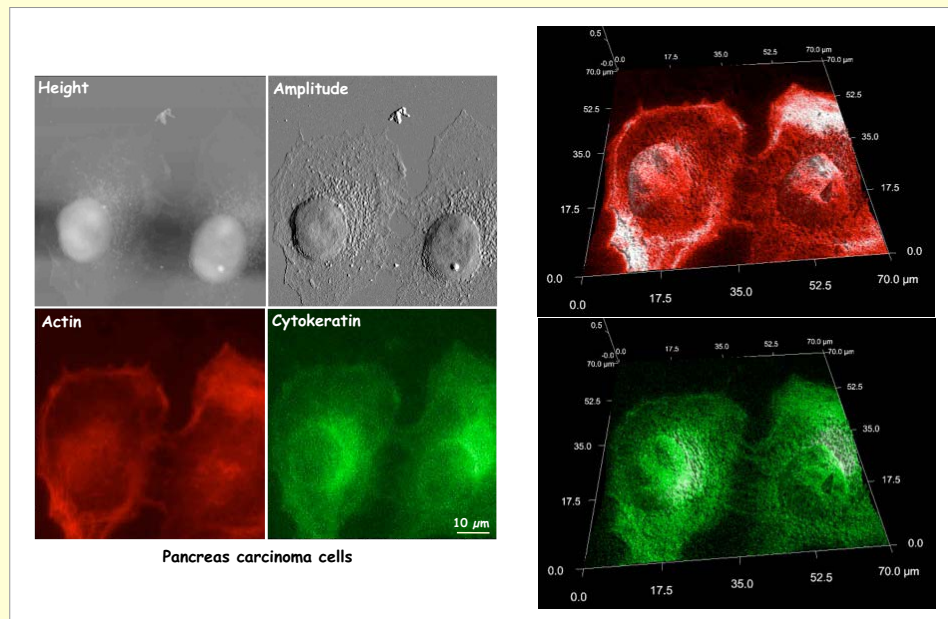
Nanolitográfia



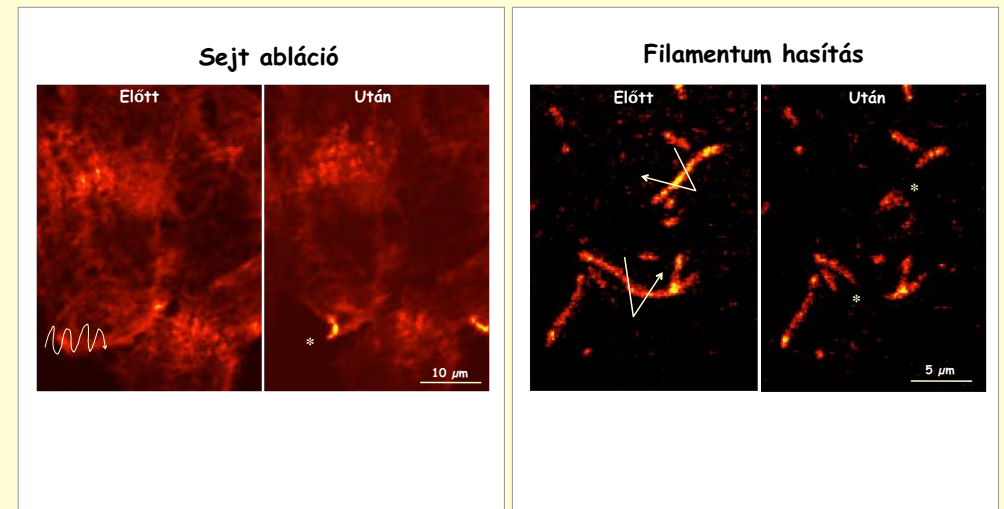
Nanolitográfia



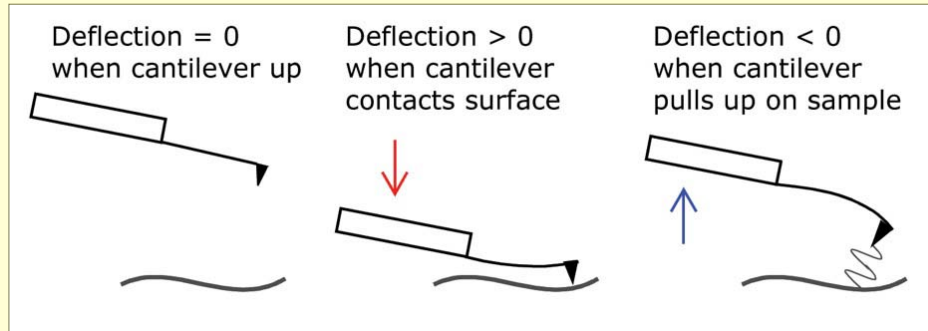
Szekvenciális két-hullámhossz STIRF-AFM



Lágy minta manipulációja STIRF-AFM segítségével

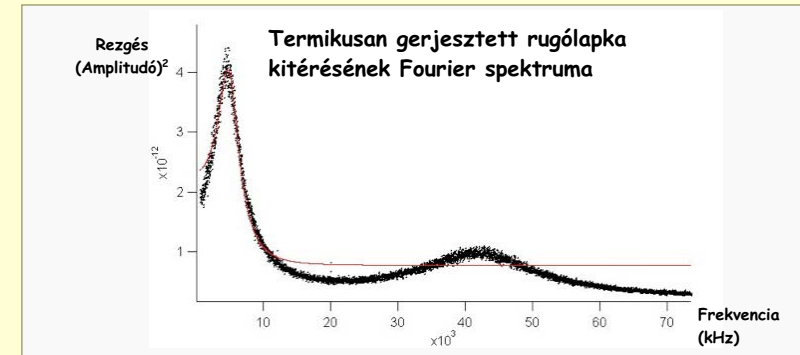
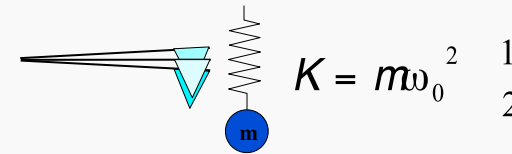


Molekulanyújtás atomerőmikroszkóppal alapelvek

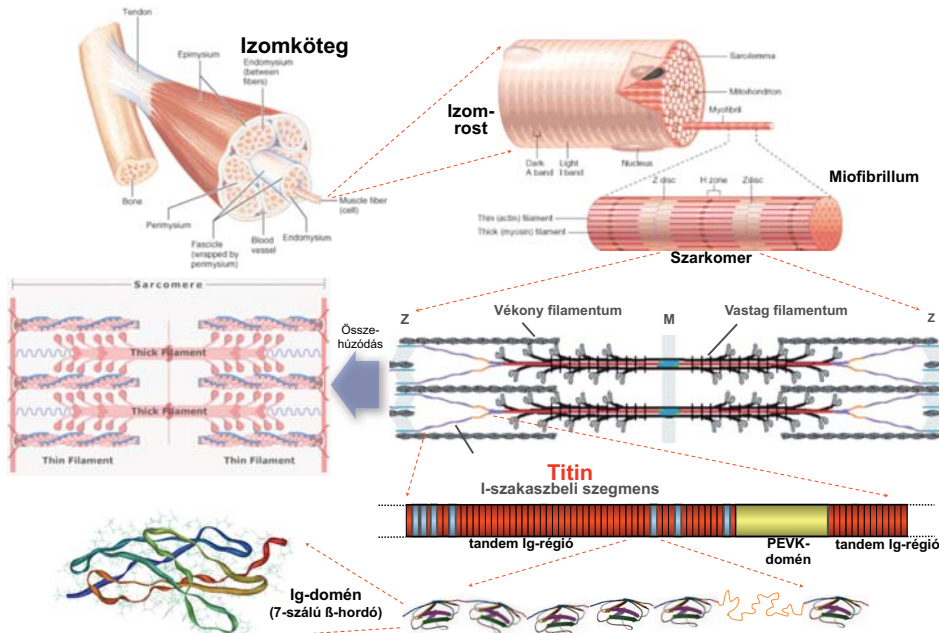


Termikus rugólapka-kalibráció

Termikusan gerjesztett rugólapka: harmonikus oszcillátor

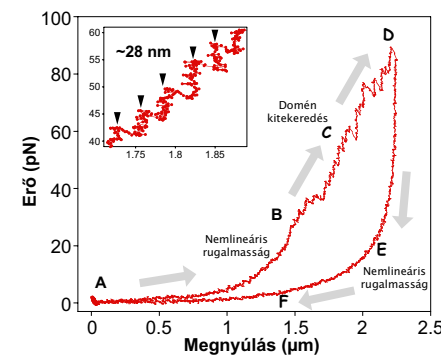


Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfűzér”



Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesszel

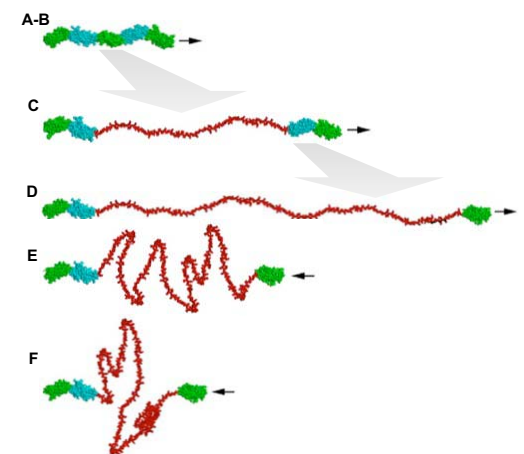
Erőválasz



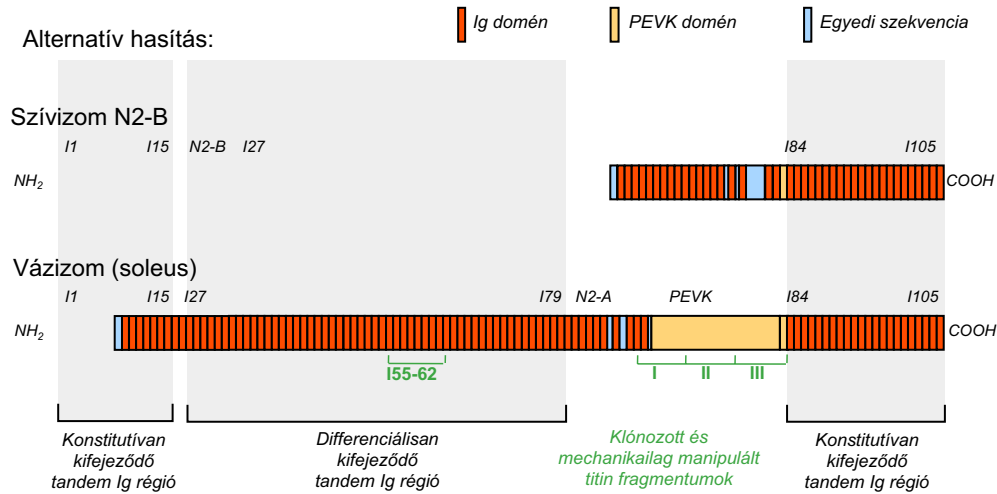
A domének egymás után, a mechanikai stabilitásuk növekvő sorrendjében telerednek ki.

Erővezérelt szerkezetváltozások:

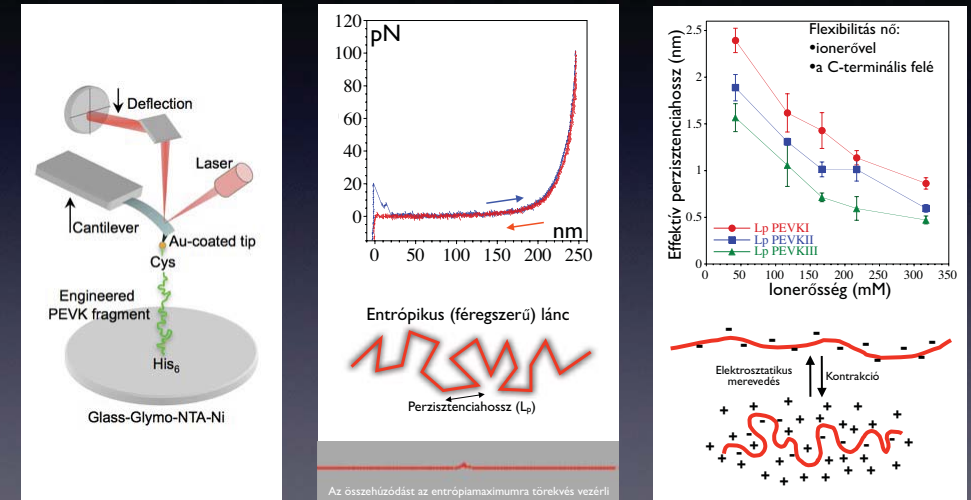
Nemlineáris rugalmasságra szuperonált domén kitekeredés



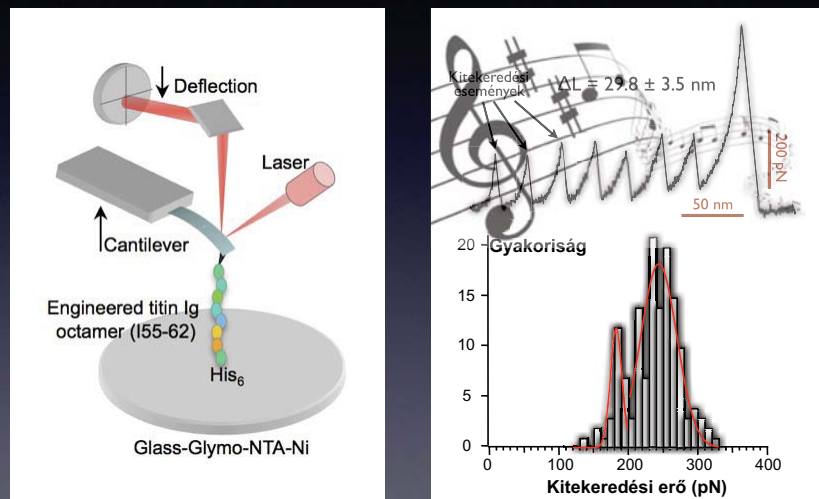
A titin nanomechanikai boncolása



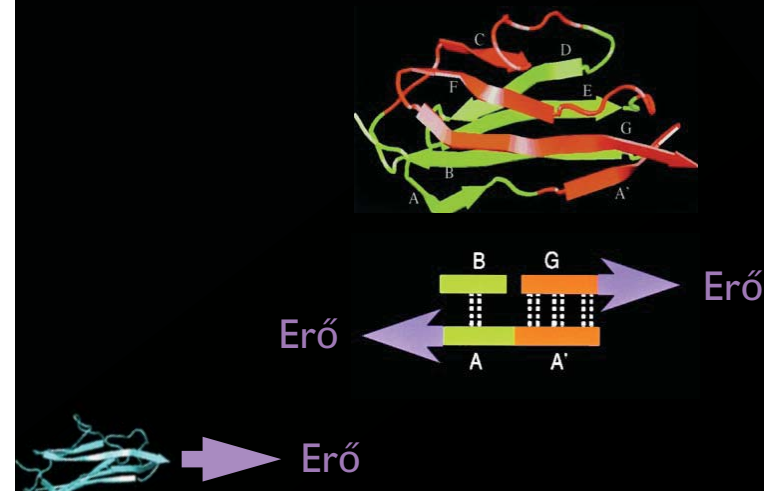
Titin PEVK: hangolható rugó



Titin I55-62: viszkoelasztikus elem

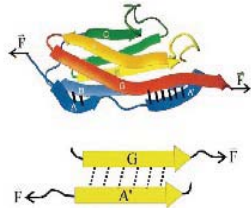


A titin doméneket párhuzamosan csatolt H-hidak stabilizálják

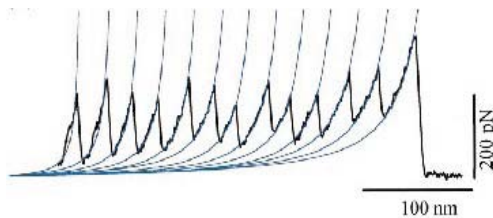


A mechanikai stabilitás biológiai logikája

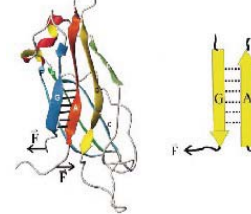
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása



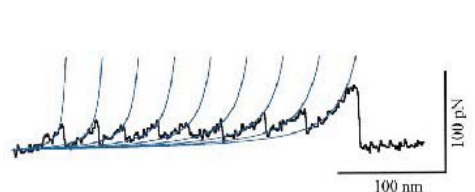
Nagy kiteredési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

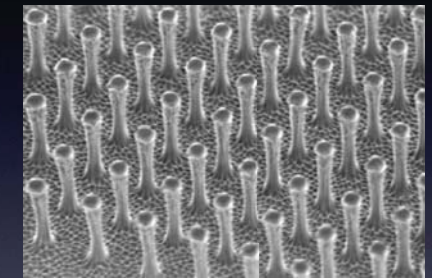


Alacsony kiteredési erő



Makroszkópikus mechanikai stabilitás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén

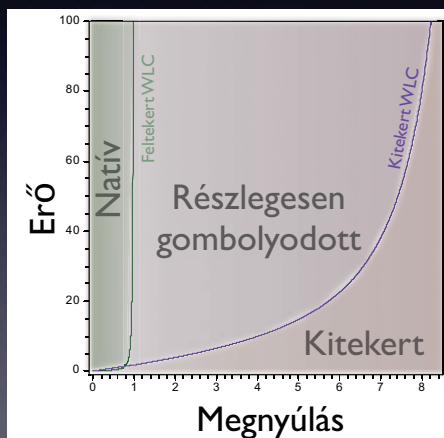


Mesterséges gecko talp
Nanotechnológiával készítve

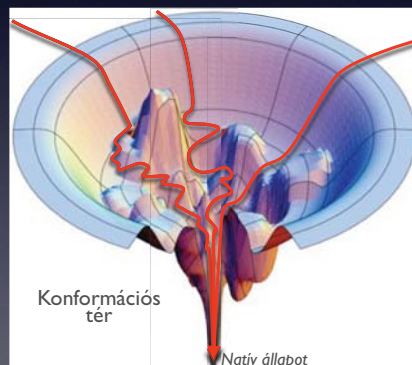
Gecko talp felületi tapadása:
Párhuzamosan csatolt Van der Waals kötések a serték és a felület között

A megnyújtott titin bejárja a gombolyodási fázisteret

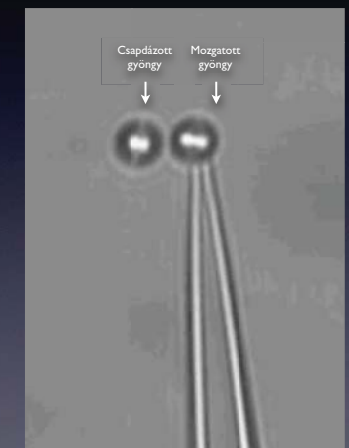
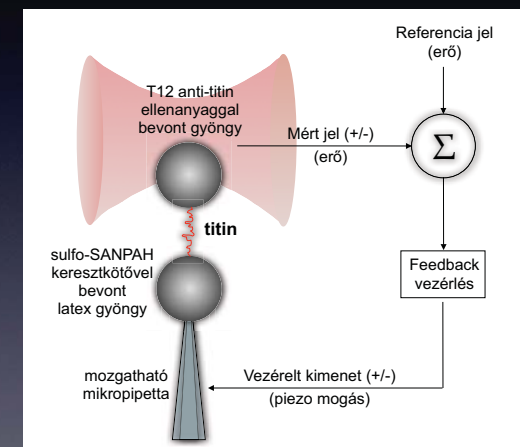
Vajon milyen útvonalon?



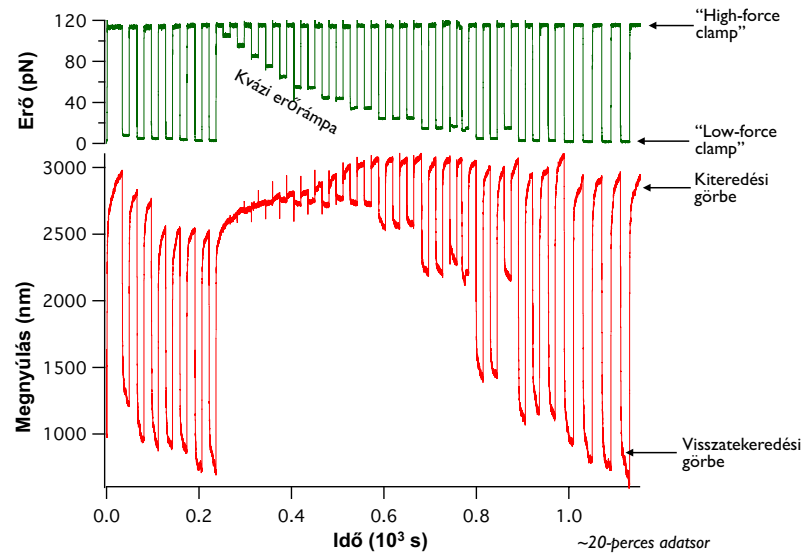
Spontán gombolyodási folyamat:
Diffúzió az energiaprofilon?



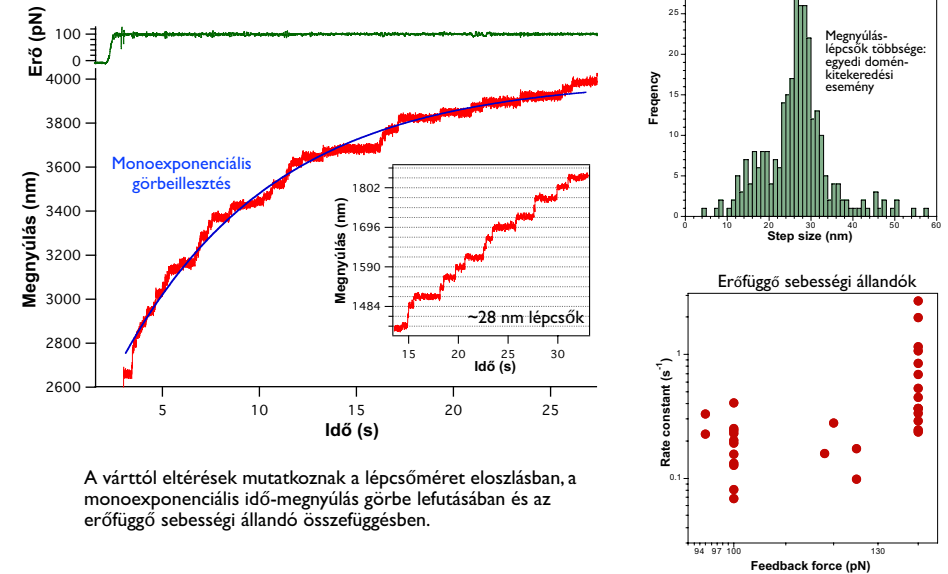
Titin nanomanipulálás erővisszacsatolt lézercsipesszel



Konstans-erő kísérlet egyetlen titinmolekulán

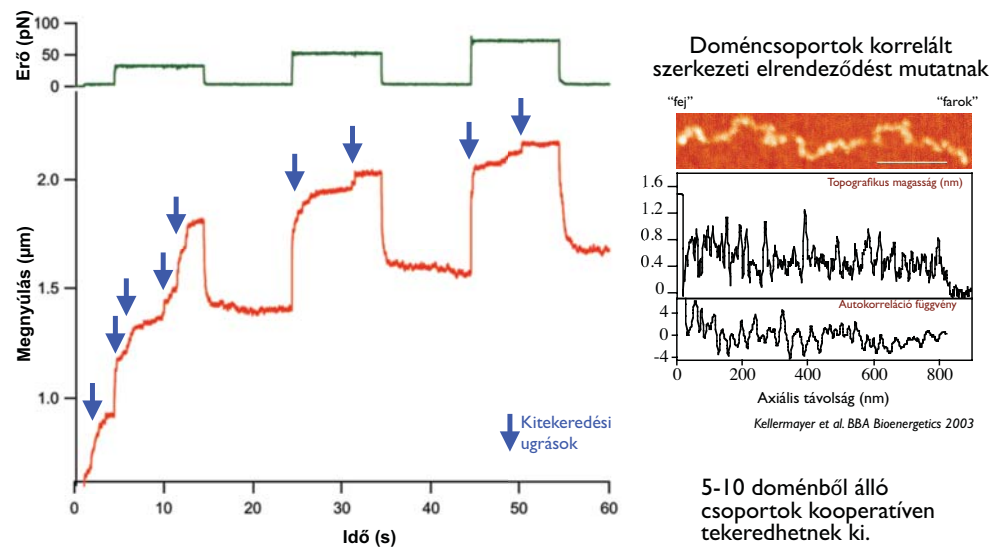


Titin kitekeredés konstans erőnél



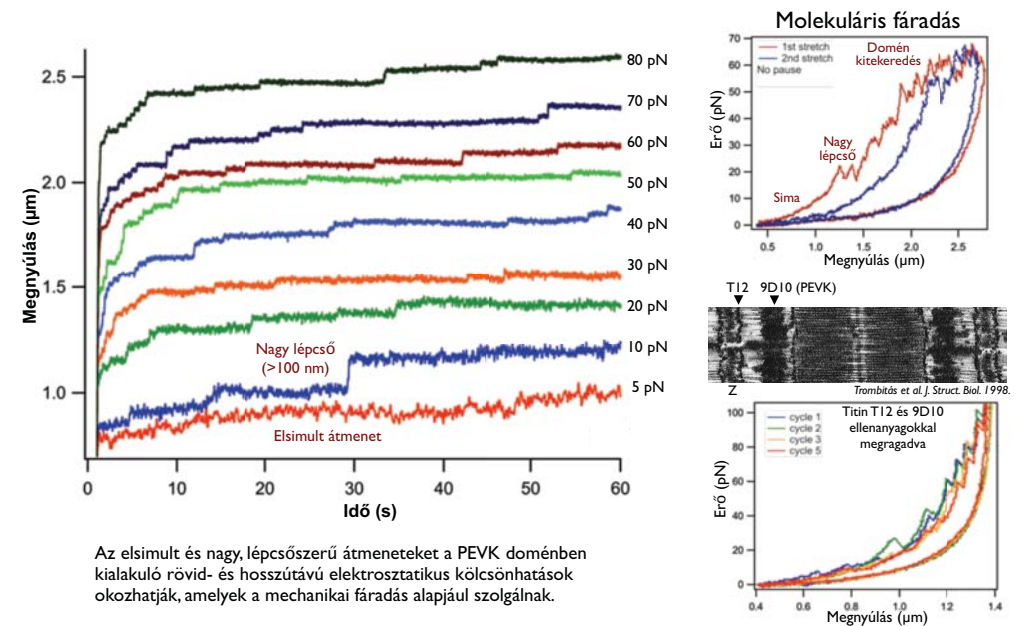
A várttól eltérések mutatkoznak a lépcsőméret eloszlásban, a monoexponenciális idő-megnyúlás görbe lefutásában és az erőfüggő sebességi állandó összefüggésben.

Doménkitekeredés hirtelen ugrásokban



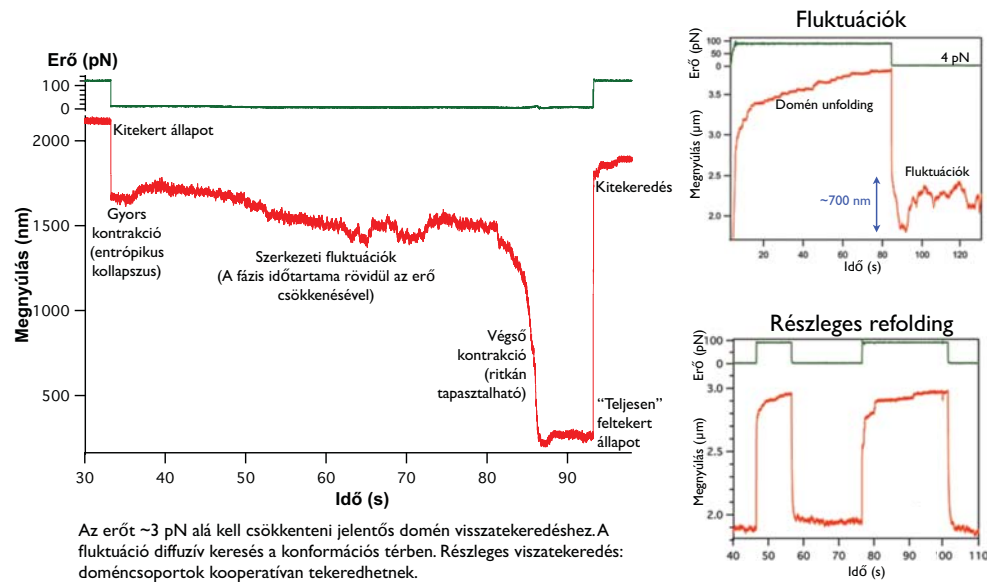
5-10 doménből álló csoportok kooperatíven tekeredhetnek ki.

Szerkezeti átmenetek alacsony erőnél



Az elsimult és nagy, lépcsőszerű átmeneteket a PEVK doménben kialakuló rövid- és hosszútávú elektrosztatikus kölcsönhatások okozhatják, amelyek a mechanikai fáradás alapjául szolgálnak.

Titin gombolyodás konstans erőnél



A visszatekeredési útvonal változatos még egyetlen molekula esetén is

