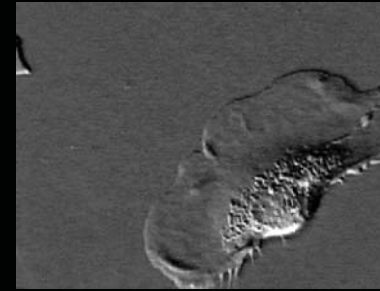


# EGYEDI MOLEKULA VIZSGÁLATOK

KELLERMAYER MIKLÓS

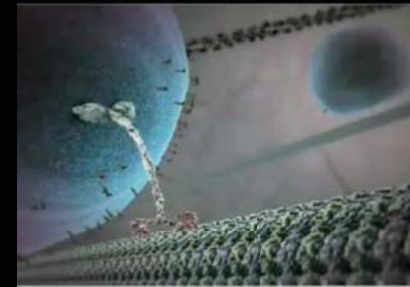
## Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



Tovakúszó keratinocita



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transzport kinezzinnel



Fehérjeszintézis riboszómán

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

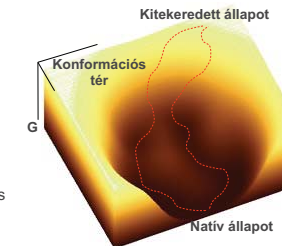
## Egyedi molekula vizsgálatok

- 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 (fehérjeterjedés, RNS tekercs, thioredoxin, motorfehérjék)

## Miért vizsgáljunk egyedi molekulákat?

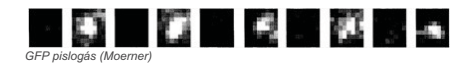
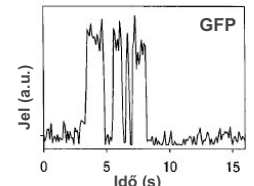
### 1. Térbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

párhuzamos útvonalakon haladó folyamatok, pl. fehérjegombolyódás



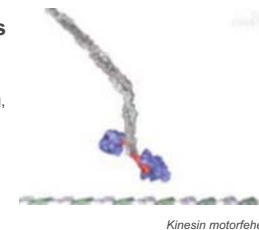
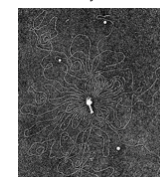
### 2. Időbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

Sztokasztikus folyamatok, pl. fluorofor pislogás



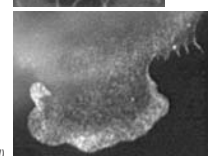
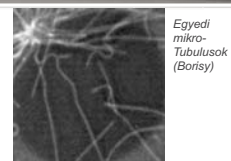
### 3. Biomolekuláris mechanika

Molekuláris rugalmasság, motorfehérje funkció



### 4. Egyedek azonosítása, követése sokaságban

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

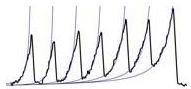
1998: Kinosita, F1F0 ATPase lépési kinetika

1998: J. Fernandez, genetikai polipeptid mechanika

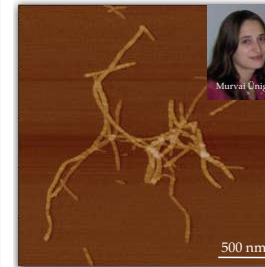
2001: J. Liphardt, C. Bustamante, RNS megnyújtása

2004: J. Fernandez, egyedi fehérjemolekula folding

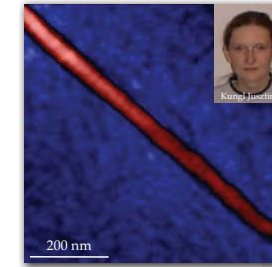
2008: Bustamante, Tinoco: riboszóma mechanika



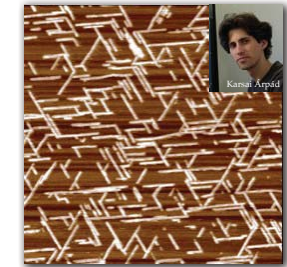
## Vizsgálható paraméterek: topográfia



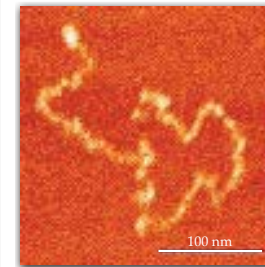
Amyloid β1-42



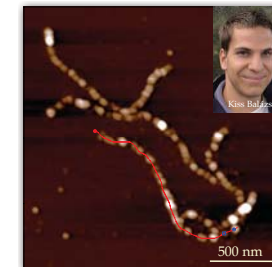
Fibrin protofibrillum



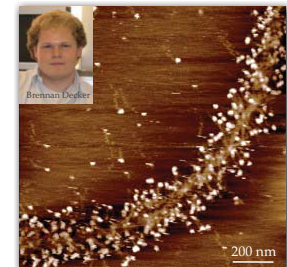
Amyloid β25-35



Titinmolekula

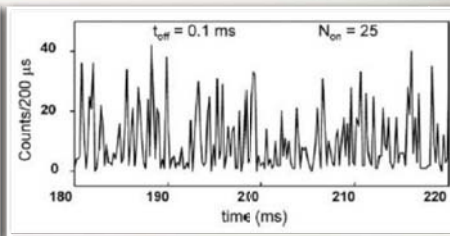
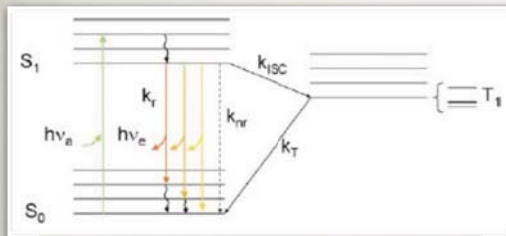


Dezmin filamentum

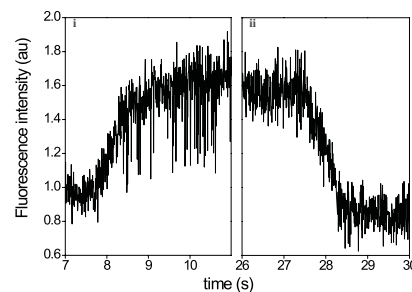


Miozin vastag filamentum

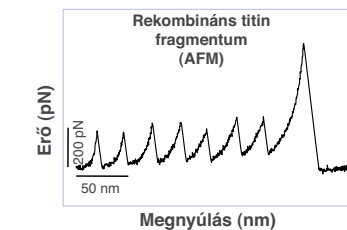
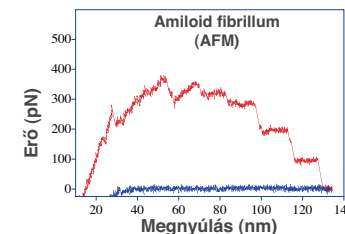
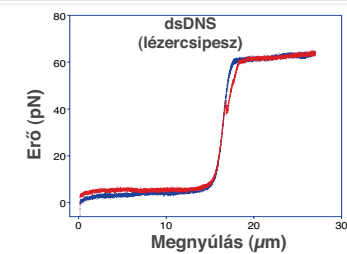
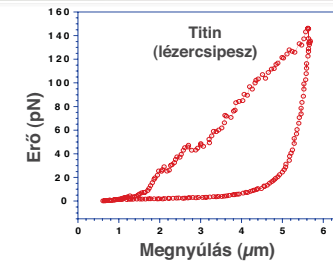
## Vizsgálható paraméterek: Fluoreszcencia



TRITC-jelölt titinmolekulák



## Vizsgálható paraméterek: erő

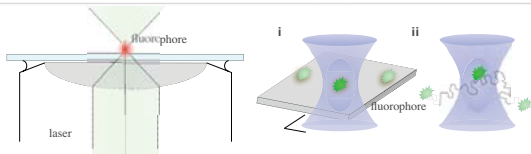


RUGALMASSÁG + SZERKEZETI VÁLTOZÁS ("ÁTMENET")

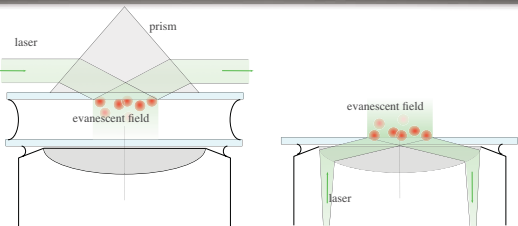


## Egyedi molekulák vizsgálata: fluoreszcencia technikák

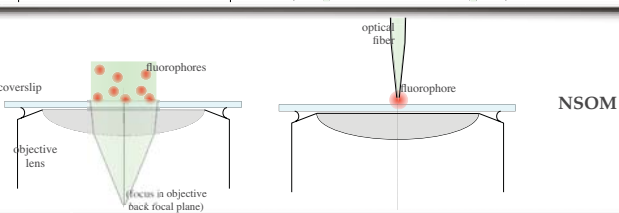
Konfokális  
mikroszkópia



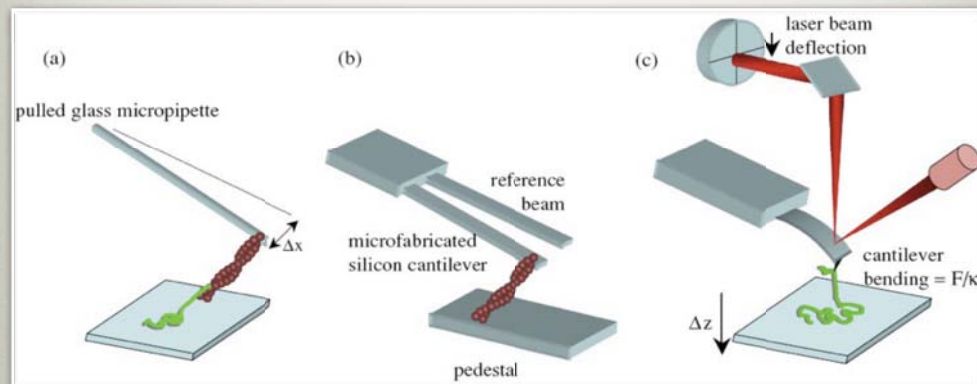
TIRF  
mikroszkópia



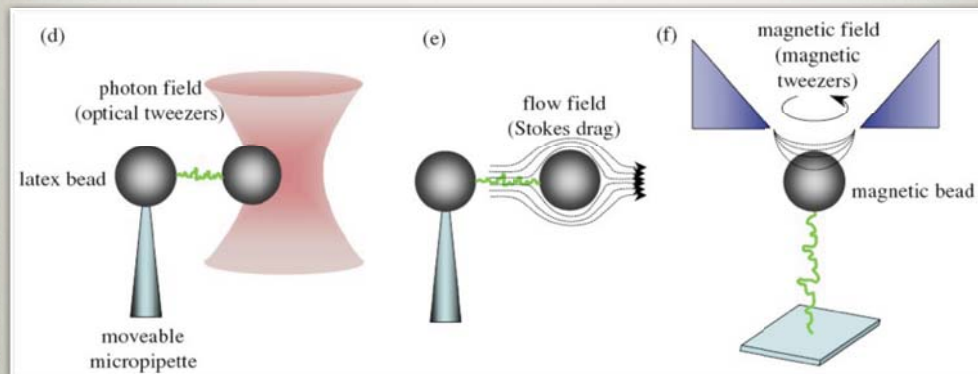
Epifluoreszcencia  
mikroszkópia



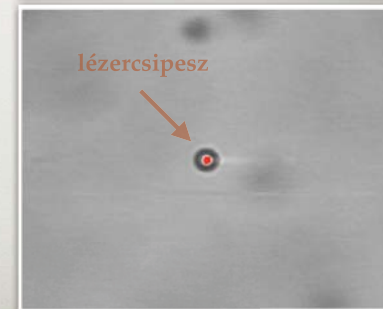
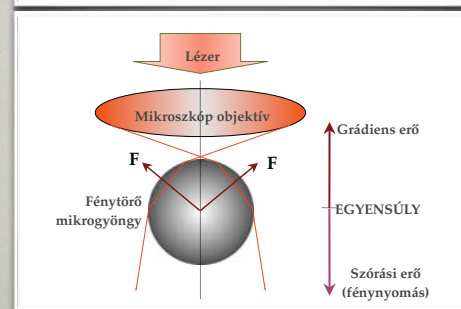
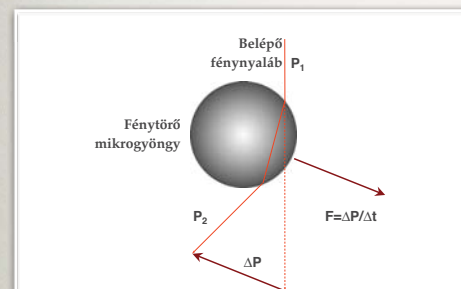
## Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció rugólapka technikákkal



## Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció mező alapú technikákkal

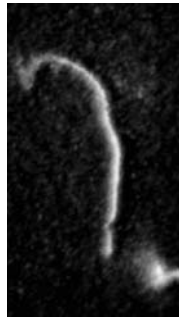


## A lézercsipesz

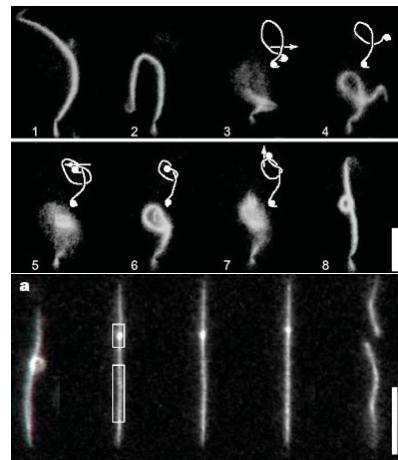


## Csomókötés egyetlen aktin filamentumra lézercsipessel

Aktin filamentum  
manipuláció



Arai et al. Nature 399, 446, 1999.

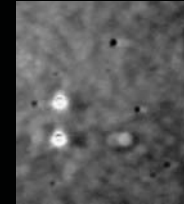


## Csomókötés egyetlen DNS láncra

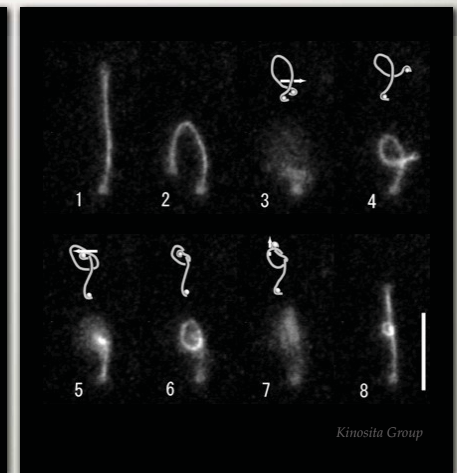
mikrogyöngy mozgatható  
lézercsipeszben

Fáziskontraszt kép

Fluoreszcencia kép



mikrogyöngy stacionárius  
lézercsipeszben



Kinosita Group

## Molekuláris fogantyúk problémája

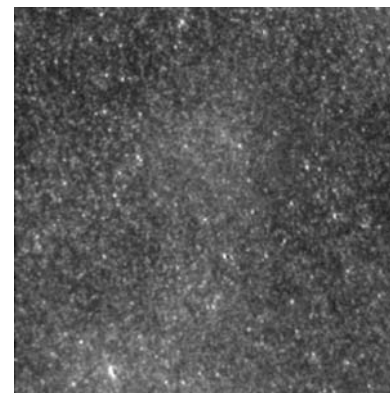
mikrogyöngy  $\sim 1 \mu\text{m}$



molekula  $\sim 10 \text{ nm}$

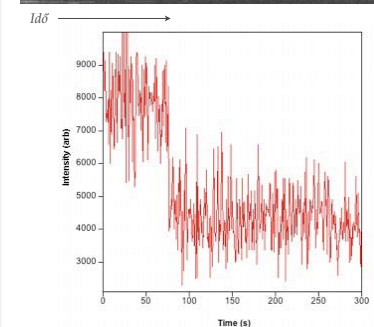
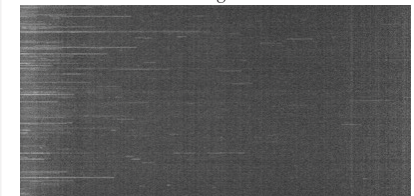
## Molekuláris szingularitás: egylépcsős photobleaching

TIRFM

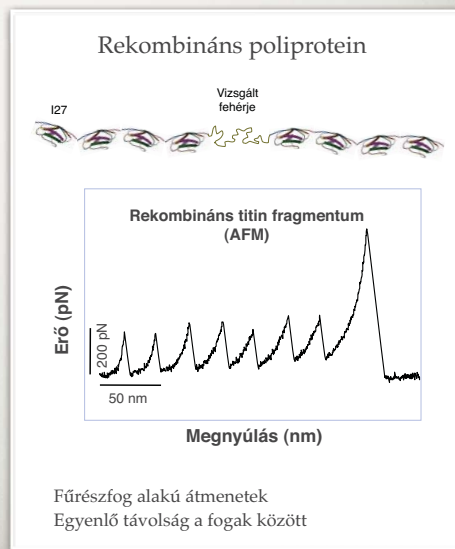
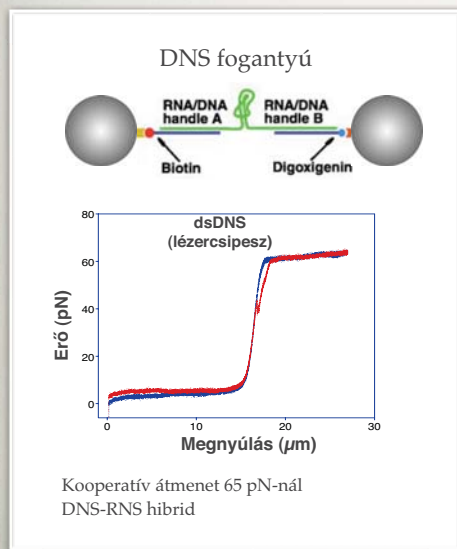


Alexa-488-PGK

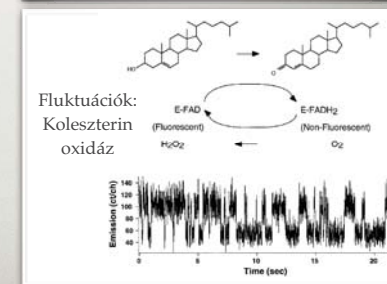
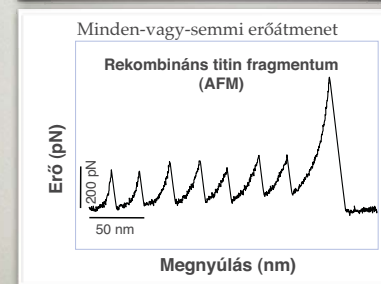
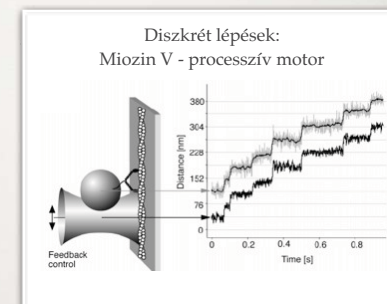
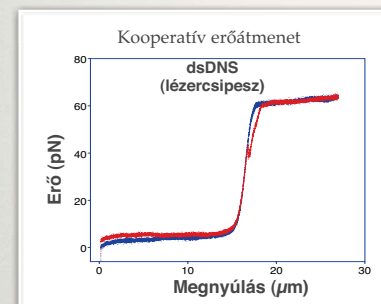
Kimogram



## Molekuláris szingularitás: nanomechanikai ujjlenyomat



## Folyamatok az egyedi molekula skálán

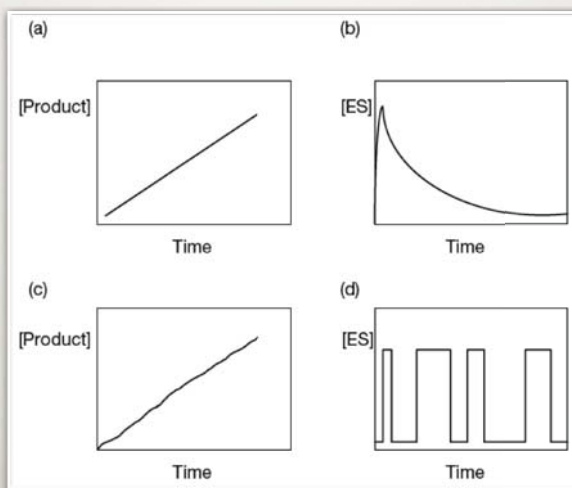


## “Bulk versus single”

Többszörös turnover

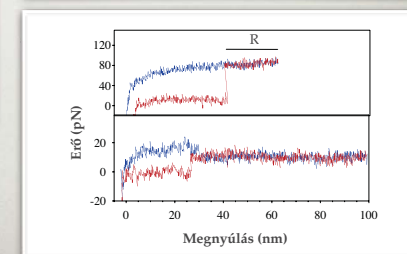
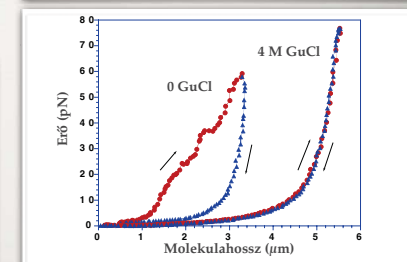
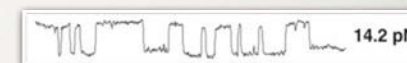
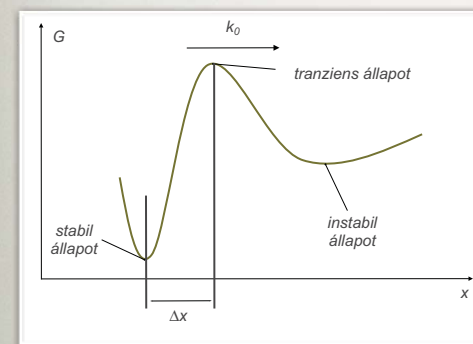
Egy (egyedi) turnover

BULK



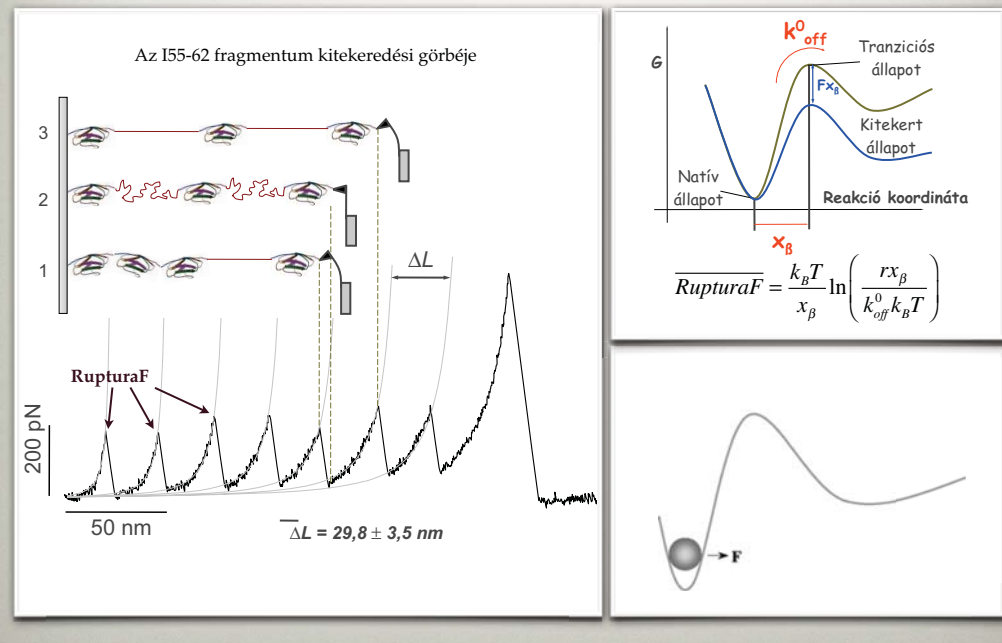
SINGLE

## Aktiváció, sebesség, reverzibilitás

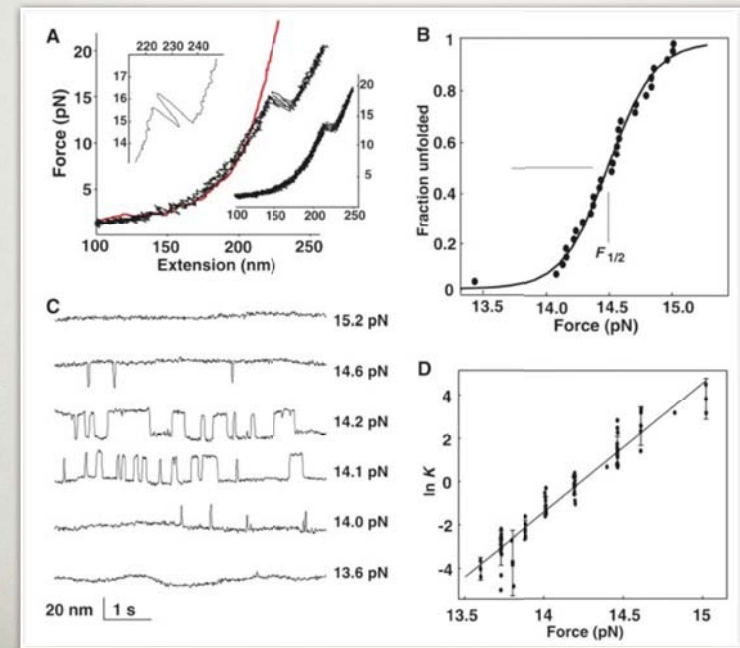




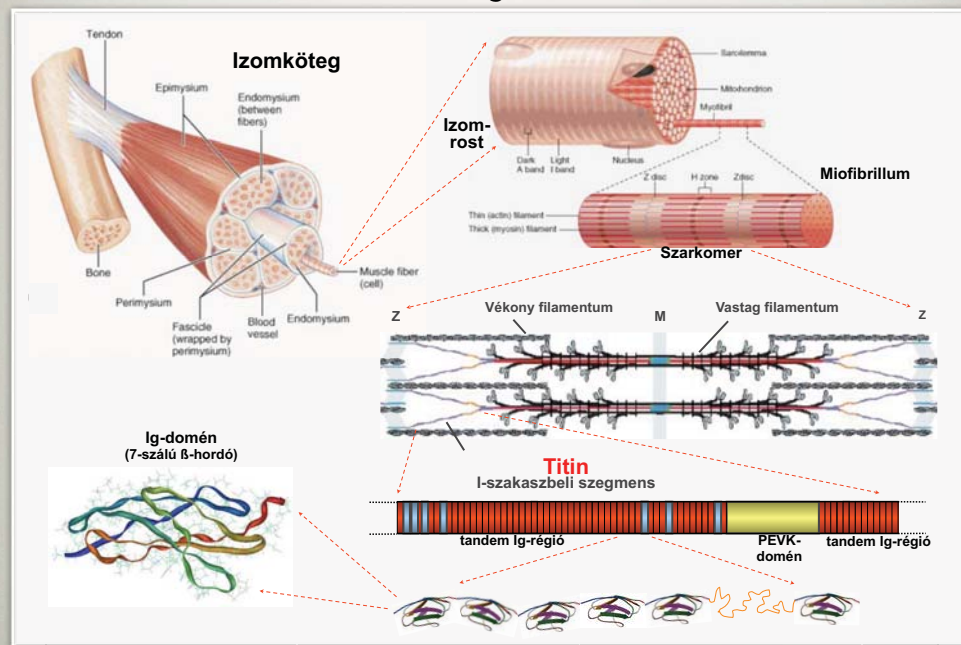
## Erő hatása az aktivációra: titin irreverzibilis kitekerése



## Erő hatása az aktivációra: RNS hajtű egyensúlyi kitekerése

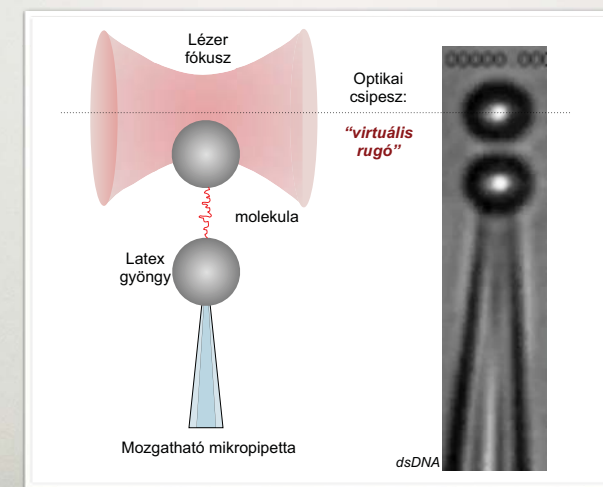


## Példa: fehérjetekeeredés



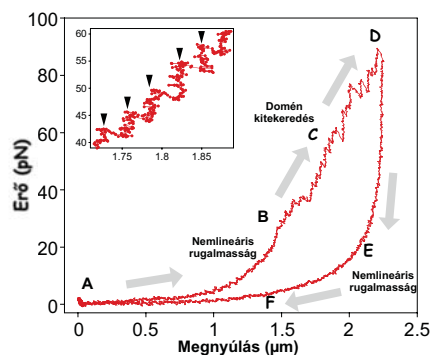
## EGYETLEN MOLEKULA MEGNYÚJTÁSA LÉZERCSIPESSZEL

Molekuláris erők mérhetők a lézercsipesz *virtuális rugó* tulajdonságai miatt



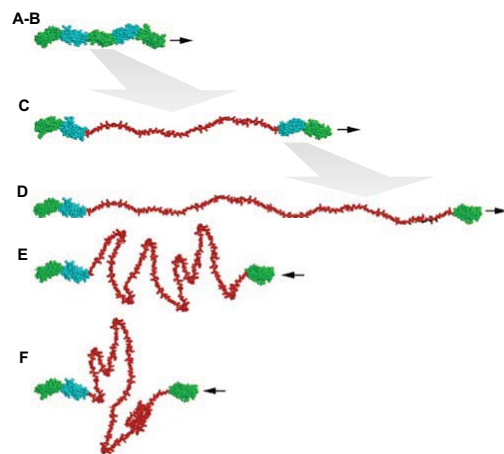
## Natív titin nanomechanikája

### Erőválasz

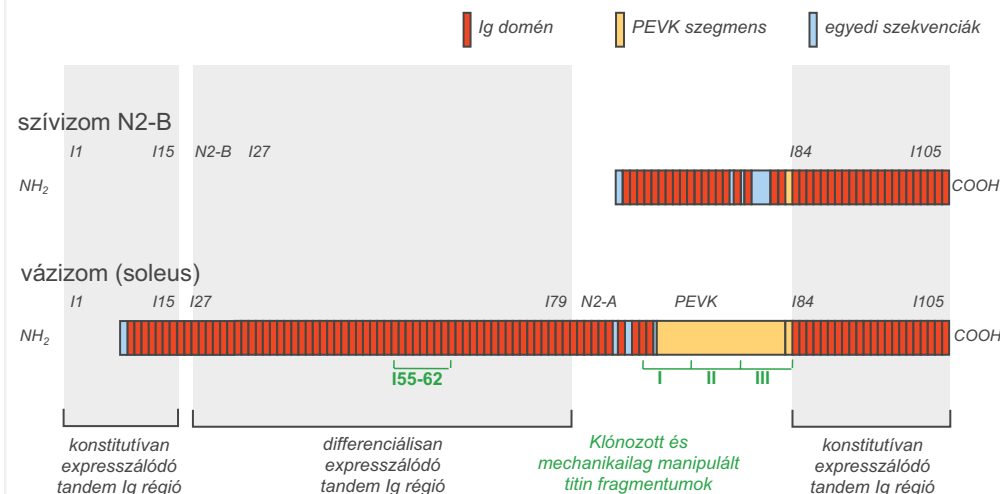


A mechanikai erő stabilizációs sorrendbe szervezi a titin doménjeit.

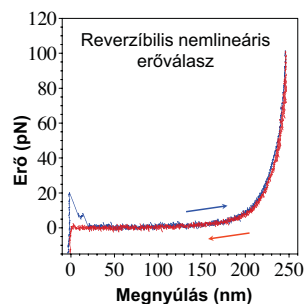
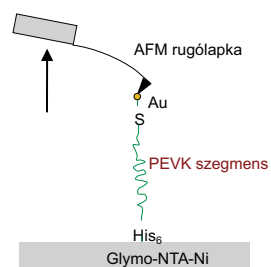
### Erővezérelt szerkezeti változások



## Titin doménszerkezet

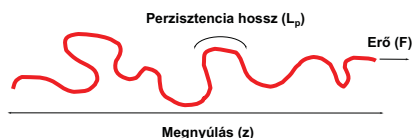


## PEVK domén: elasztikus molekulaszakasz

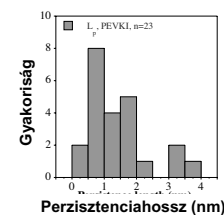


### Féregszerű lánc (Wormlike chain) model

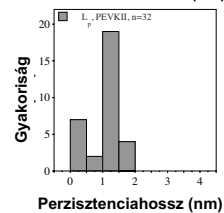
$$\frac{FL_p}{k_B T} = \frac{z}{L_c} + \frac{1}{4(1 - z/L_c)^2} - \frac{1}{4}$$



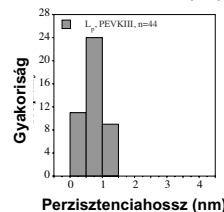
## A PEVK domén elektrosztatikusan hangolható molekula-teleszkóp



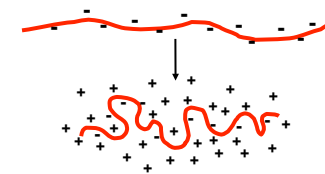
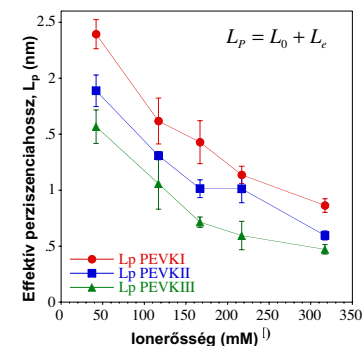
N-terminális szegmens



Középső szegmens

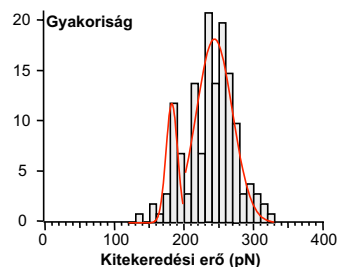
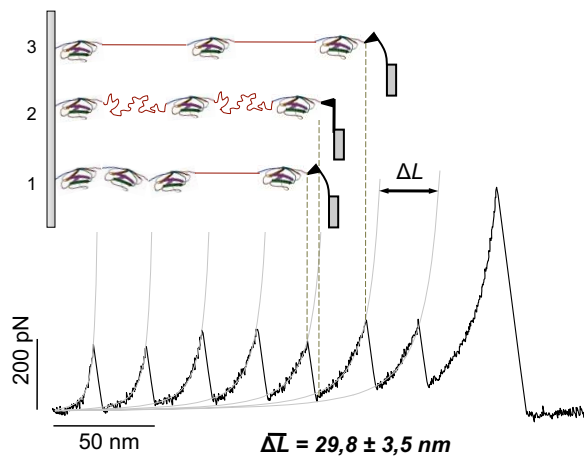


C-terminális szegmens



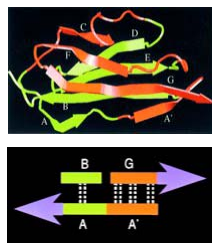
## Titin I55-62: viszkoelasztikus molekulaszakasz

Az I55-62 fragmentum kitekeredési görbéje



Mechanikai stabilitás alapja:

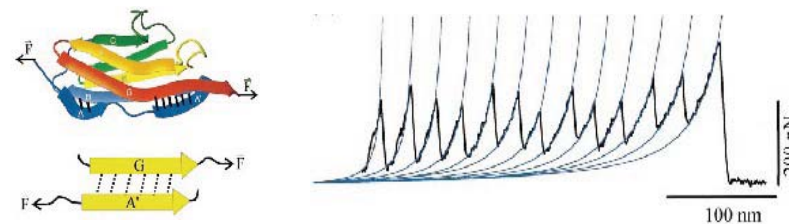
Az Ig domén első és utolsó  $\beta$ -láncait összetartó, párhuzamosan csatolt H-hidak



## A mechanikai stabilitás biológiai logikája

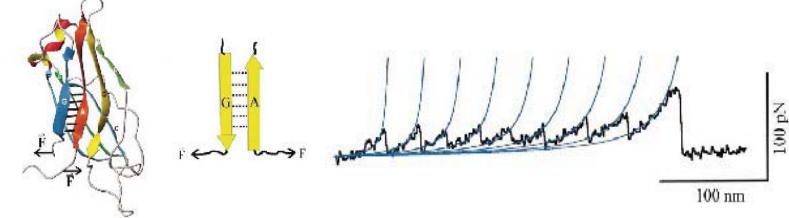
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kitekeredési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

Alacsony kitekeredési erő



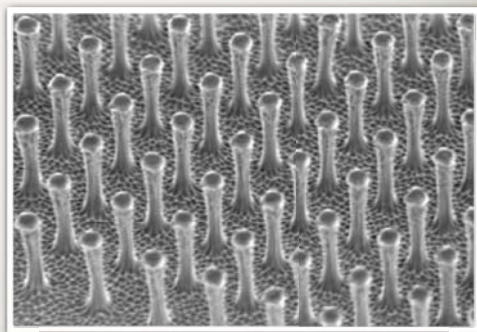
## Nanotechnológiai alkalmazás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



Gecko talp tapadása:

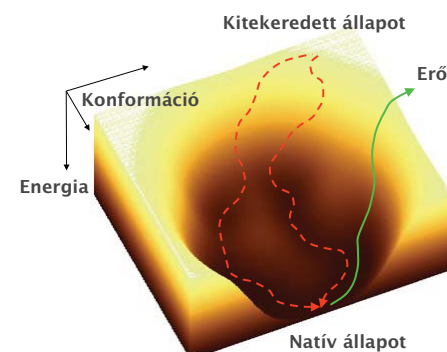
Párhuzamosan csatolt Van der Waals kötések a serték és a felület között



Mesterséges gecko talp

## A FEHÉRJEGOMBOLYODÁS FÁZISTERÉNEK VIZSGÁLATA EGYEDI MOLEKULA MÓDSZERREL

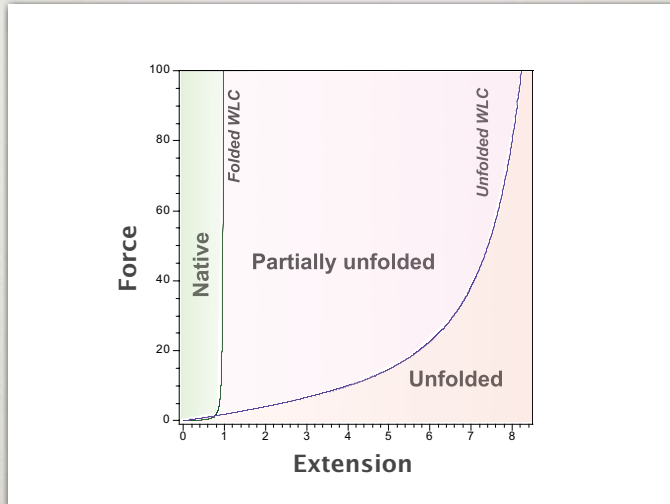
Fehérje folding fázistér



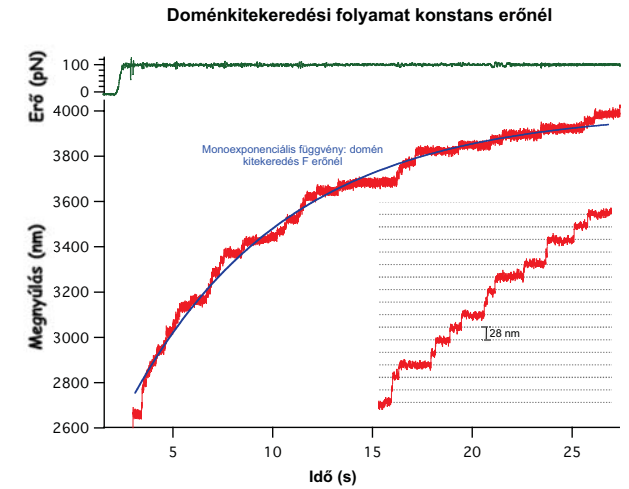
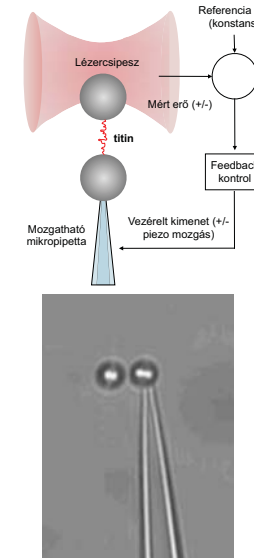
Mechanikai erő segítségével a konformációs tér kevésbé betöltött részei is vizsgálhatók.



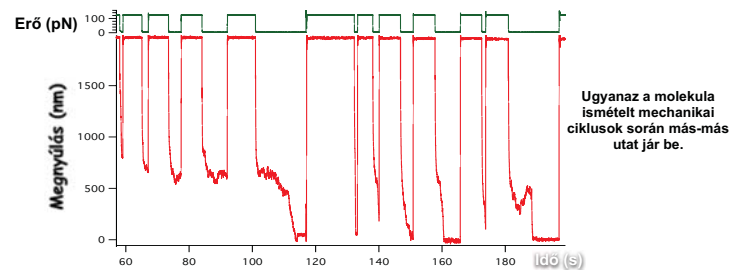
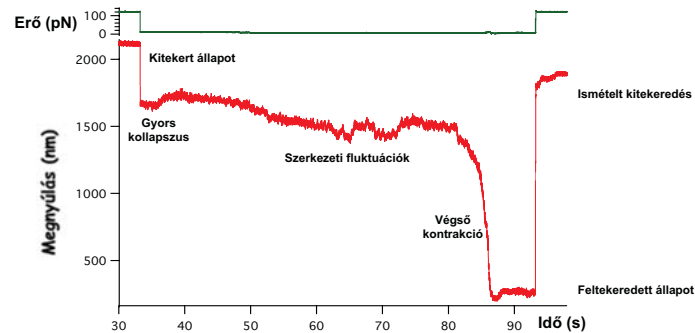
# A TITIN GOMBOLYODÁSI FÁZISTERE



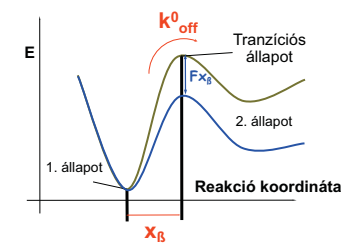
# Titin nanomechanika erővisszacsatolt lézercsipessel



# Titin feltekeredés konstans erőnél

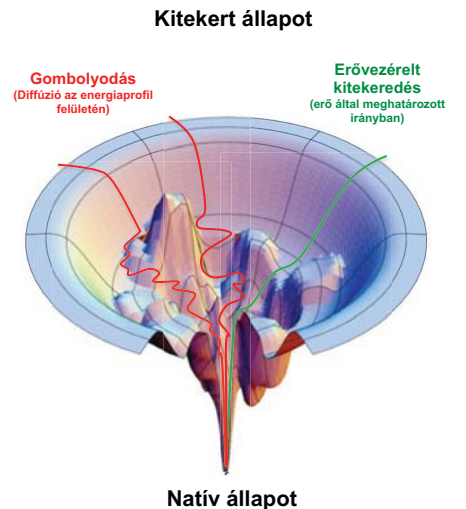
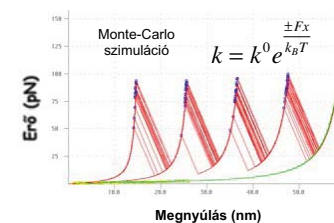


# Biomolekuláris folyamatok mechanikai erőterben

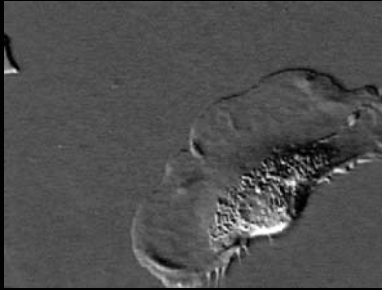


A pillanatnyi erő (F) a vezérelt folyamat ( $k_{off}$ ) illetve terhelés (r) sebességeinek arányától és az energiaprofil alakjától ( $x_B$ ) függ:

$$\bar{F} = \frac{k_B T}{x_B} \ln \left( \frac{r x_B}{k_{off}^0 k_B T} \right)$$



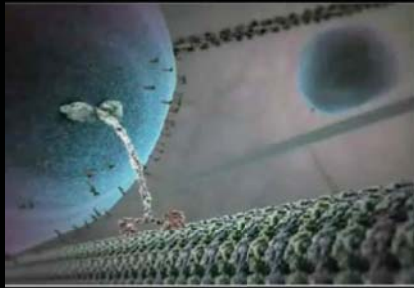
# Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



*Tovakúszó keratinocita*



*Mikrotubulus dinamikus instabilitás*



*Vezikulum transzport kinezinnel*



*Fehérjeszintézis riboszómán*

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