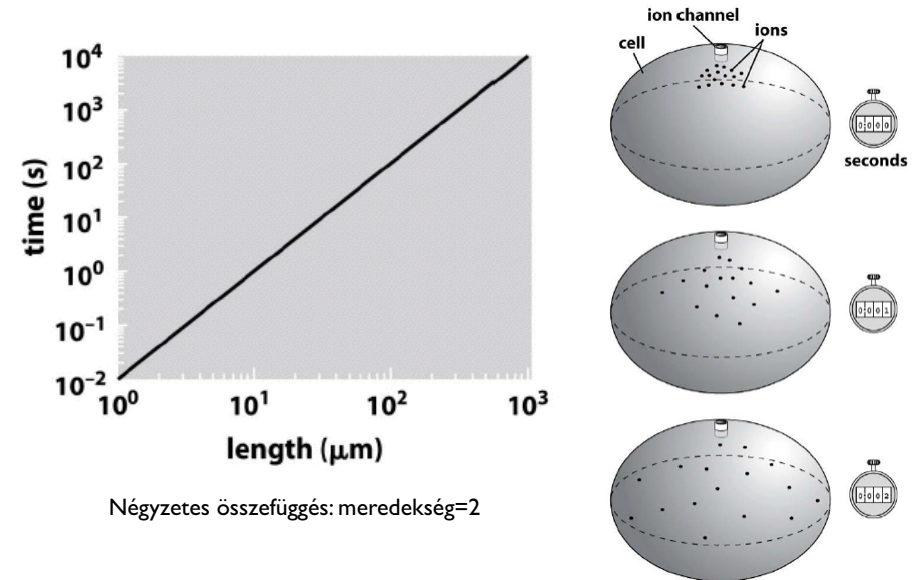


# AZ ÉLŐ SEJT FIZIKAI BIOLÓGIÁJA: DIFFÚZIÓ, POLIMERIZÁCIÓ, REPTÁCIÓ

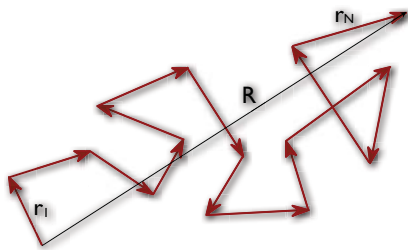
KELLERMAYER MIKLÓS

## A diffúzió csak rövid méretsálán gyors



## A DIFFÚZIÓ ÉS BOLYONGÓ MOZGÁS KAPCSOLATA

### Brown-mozgás - "random walk"



### "Négyzetgyök törvény":

$$\langle R^2 \rangle = Nl^2 = Ll$$

$R$  = elmozdulás  
 $N$  = elemi lépések száma  
 $l = |\vec{r}_i|$  = átlagos szabad úthossz  
 $r_i$  = elemi lépés  
 $Nl = L$  = teljes út

Átlagos részecske  
sebesség:  $v = \frac{l}{\tau}$

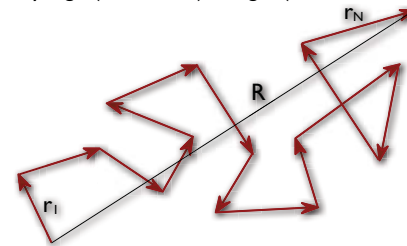
Teljes bolyongási  
idő:  $t = N\tau$

Diffúziós  
együttható:  $D = \frac{1}{3}v^2\tau$

$$\langle R \rangle = \sqrt{Nl^2} = \sqrt{\frac{t}{\tau}l^2} = \sqrt{t}l = \sqrt{3Dt}$$

## A polimérek alakja a bolyongó mozgásra emlékeztet

### Bolyongó (Brown-féle) mozgás ("random walk")



### "Négyzetgyök törvény": $\langle R^2 \rangle = Nl^2 = Ll$

$R$  = vég-vég távolság;  $r_i$  = elemi vektor;  $N$  = elemi vektorok száma;  
 $l = |\vec{r}_i|$  = korrelációs hossz ("perzisztenciahossz", hajlítómerevség mértéke);  $Nl = L$  = kontúrhossz

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

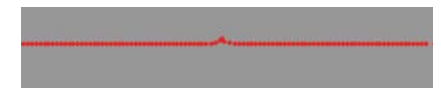
Makroszkópikus folyamat esetén:  $\langle \Delta x^2 \rangle = 2Dt$ .  
 $\langle \Delta x^2 \rangle$  = átlagos négyzetes elmozdulás,  $D$  = diffúziós állandó,  $t$  = diffúziós idő (megfigyelés időtartama)

Az elemi vektorok orientációs rendezetlenségére törekvése **rugalmasságot** eredményez

**Entropikus rugalmasság:**  
 Termikus gerjesztésre a polimerlánc random, ide-oda hajló fluktuációkat végez.

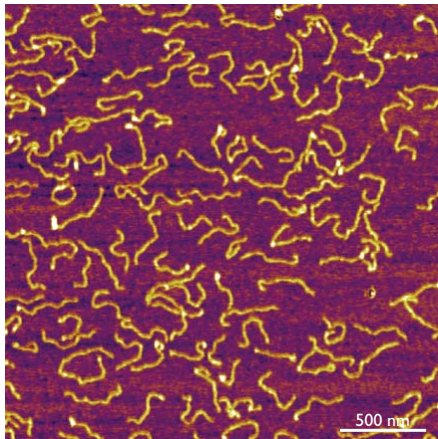
Nő a lánc konformációs entrópiája (elemi vektorok orientációs rendezetlensége).

Az entrópiamaximumba törekvés miatt a polimerlánc rövidül.

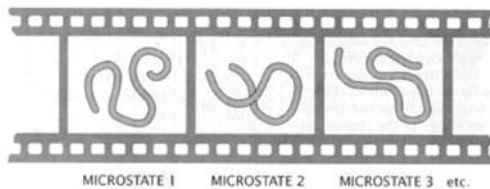


# Polimerlánc “egyensúlyi” alakja

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

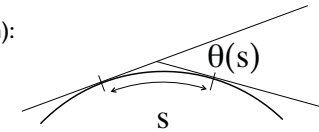


DNS molekulák atomerő mikroszkópos felvétele



# 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  $\theta(s)$   $0^\circ$  és  $360^\circ$  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

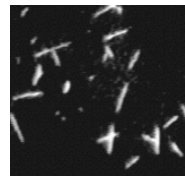
Értelme: minél merevebb egy lánc, annál nagyobb távolságon ( $l_p$ ) lesznek csak észlelhetők a termikusan gerjesztett fluktuációk.

# 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  
 $l \ll L$

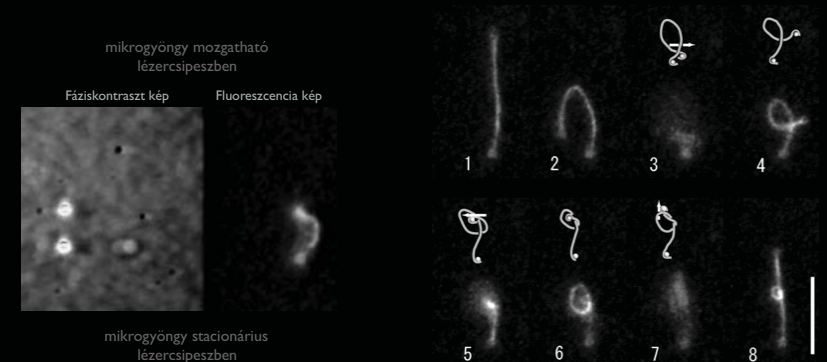


DNS molekula



# Entropikus rugalmasság vizualizálása

## Csomókötés egyetlen DNS láncra



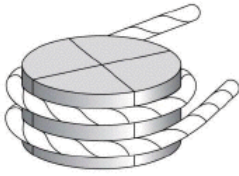
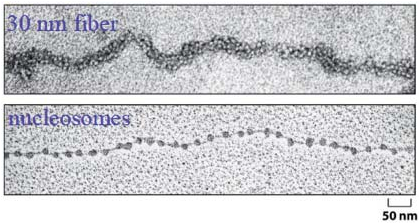
Kinosita Group

# A humán genom fizikai mérete

A tanteremnyi modell-sejtre adaptálva:

	Idealizált sejt: 20 µm oldalalú kocka	Analogia - 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 $\sqrt{\langle R^2 \rangle} = \sqrt{L_p L_c}$	320 µm	320 m
Girációs sugár ( $R_G$ ) $R_G = R/\sqrt{6}$	130 µm	130 m

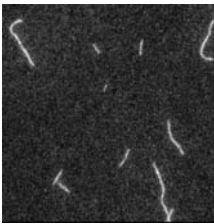
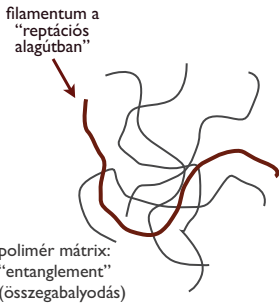
- Tehát: az egyensúlyi alakú DNS nem férne el a sejtben.
- Teljesen kompakt DNS (elméletileg legkisebb) térfogata (2 mm alapterületű, 2000 km hosszú henger térfogata): **8 m<sup>3</sup>** (2 m élhosszúságú kocka)
- A DNS-t a sejtben **csomagolni** szükséges!



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

# A DIFFÚZIÓ SPECIÁLIS ESETE: REPTÁCIÓ

- Reptáció: polimér hálóban történő "kígyószzerű" diffúzió. (Reptila: hüllők)



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

$\tau_r$  = Reptációs idő, egy kontúrhossznyi távolság megtételéhez szükséges idő;  
 $L$  = kontúrhossz;  $N$  = elemi szegmensek száma;  $\mu$  = lánc mozgékonyaság;  $kT$  = termikus energia

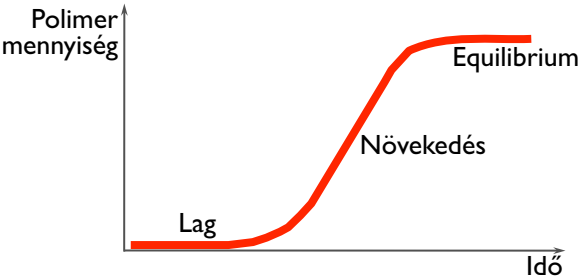
$$D_r = \frac{(a \cdot \sqrt{N})^2}{\tau_r}$$

$D_r$  = Reptációs diffúziós állandó;  
 $N$  = elemi szegmensek száma;  $a$  = elemi szegmens hossz (~perzisztenciahossz);  $\tau_r$  = 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

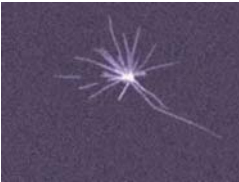


# Polimerizációs egyensúlyok

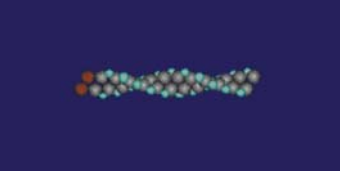
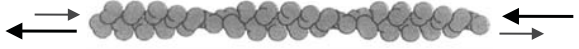
1. valódi equilibrium



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

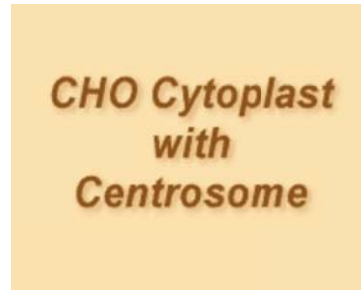
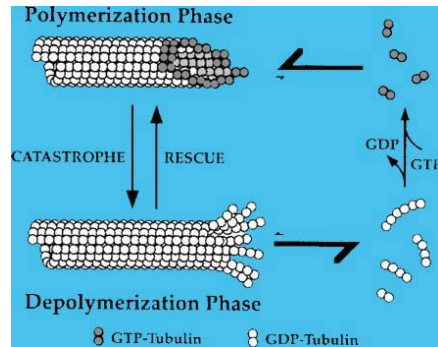


3. Treadmilling: taposómalom



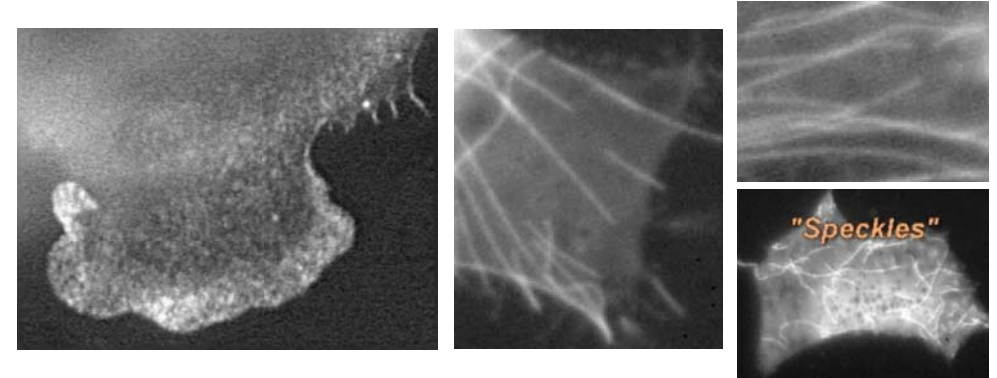


# Dinamikus instabilitás Mikrotubulusok



Gary Borisy

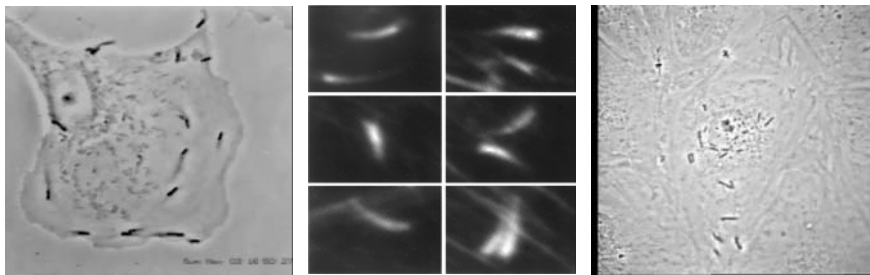
# *In vivo* treadmilling



Aktin  
GFP-aktin Speckle microscope  
Clare Waterman-Storer

Microtubulusok  
Gary Borisy

# Motilitás aktin polimerizációval Intracelluláris patogének mozgása



*Listeria monocytogenes*

F-aktin jelölés phalloidinnel

*Shigella flexneri*

# Motilitás aktin polimerizációval *In vitro* körülmények



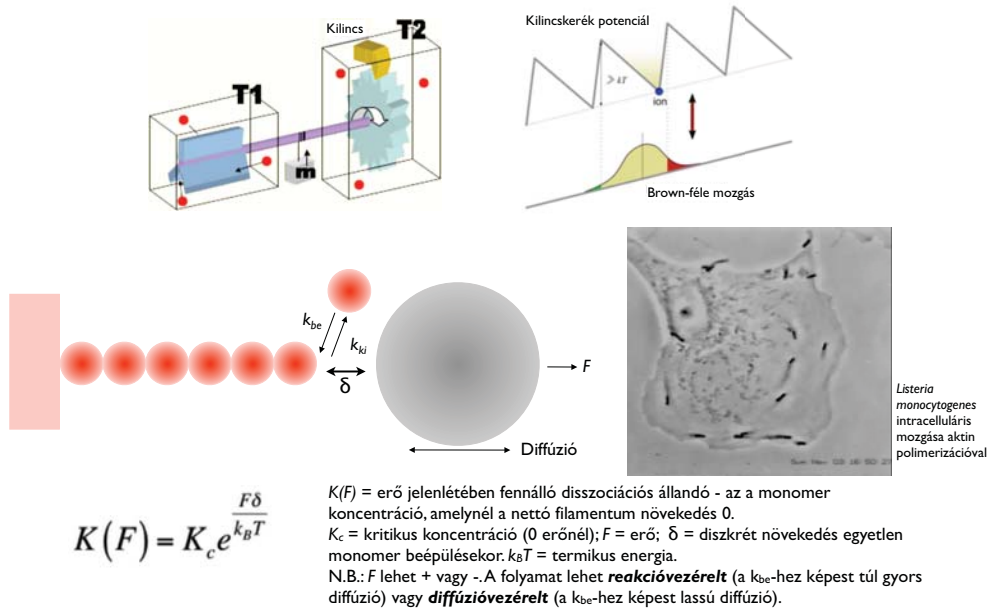
*Listeria* Xenopus extraktumban

ActA-val aszimmetrikusan bevont  
mikrogönggy Xenopus extraktumban

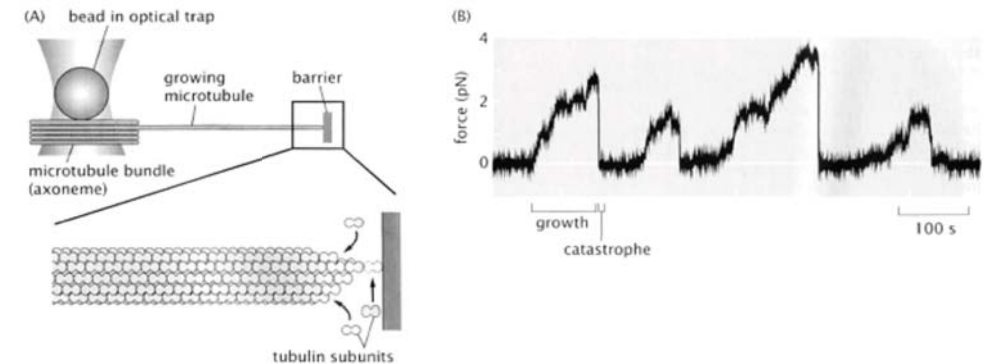
ActA-val szimmetrikusan bevont  
mikrogönggy Xenopus extraktumban

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.

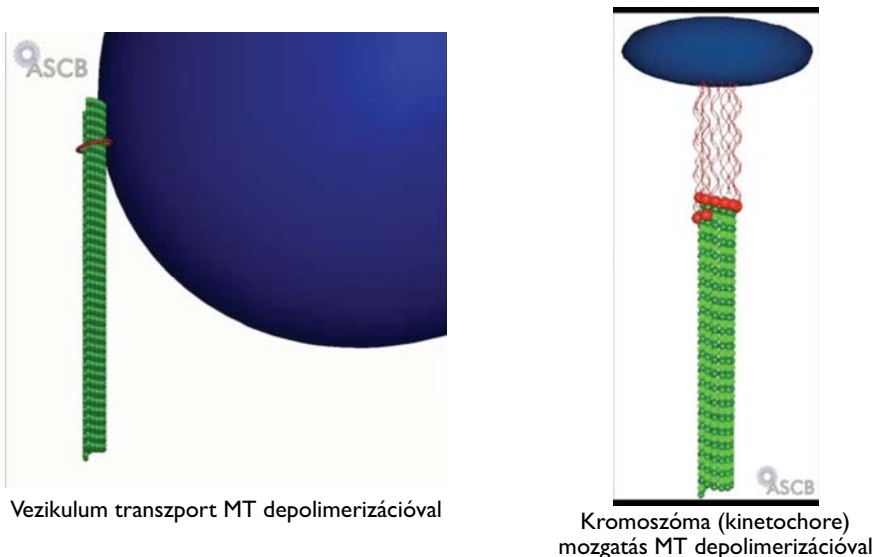
# A diffúzió speciális esete: Brown-féle kilincskerék



# A polimerizációs erő megmérhető

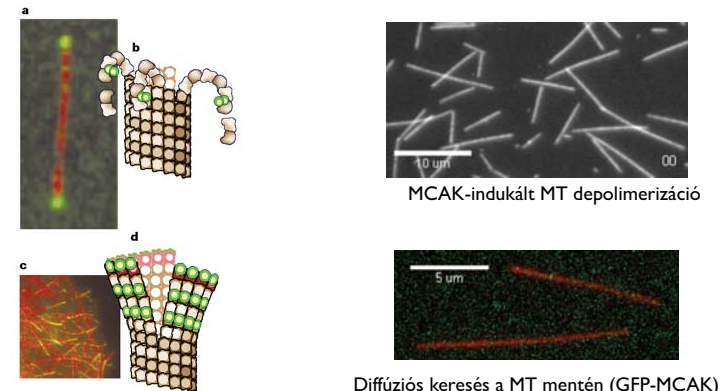


# MT-depolimerizáció- vezérelt erő kifejtés



# 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")



# AZ ÉLŐ SEJT FIZIKAI BIOLÓGIÁJA: MOTORFEHÉRJÉK

## Motorfehérjék

1. Specifikus citoszkéletális 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)

## Motorfehérjék alaptípusai

### 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 minusz vég irányába mozognak.

**b. Kinezinok:** 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 fonál mentén haladnak és fejtenek ki erőt

### 4. Rotációs motorok

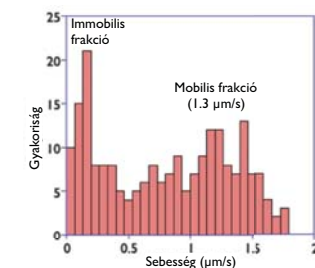
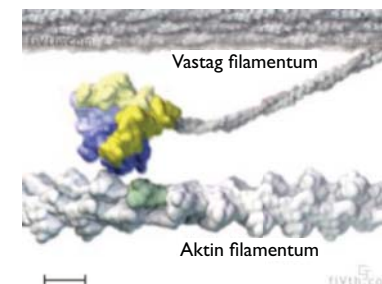
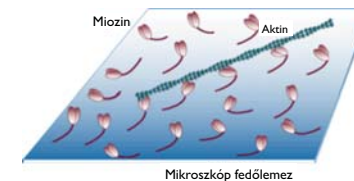
F1F0-ATP szintetáz

Bakteriális flagelláris motor

### 5. Mechanoenzim komplexek

Riboszóma

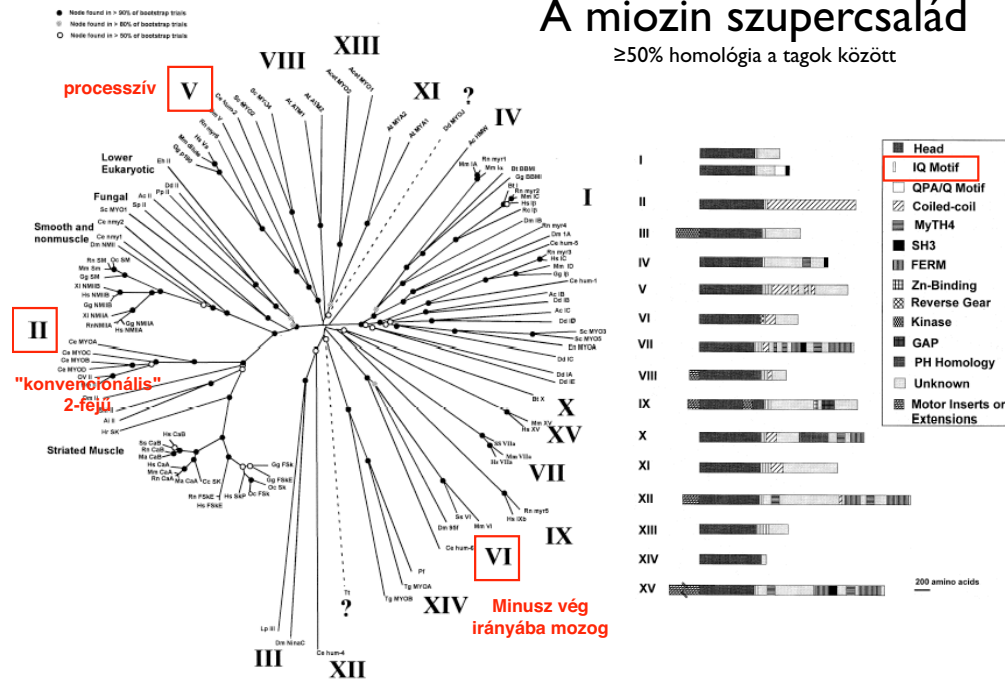
## In vitro aktomiozin motilitás



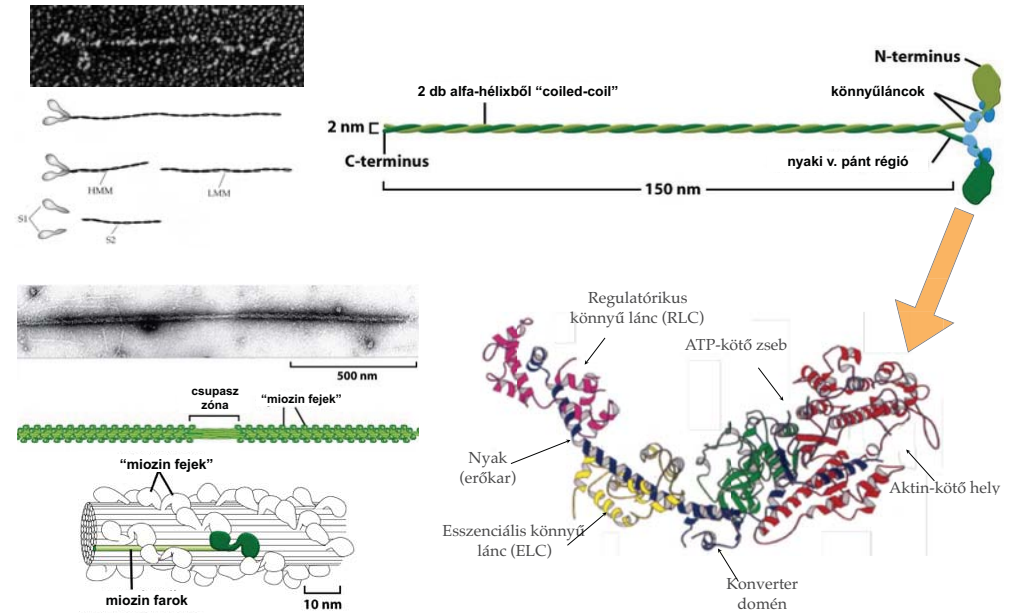


## A miozin szupercsalád

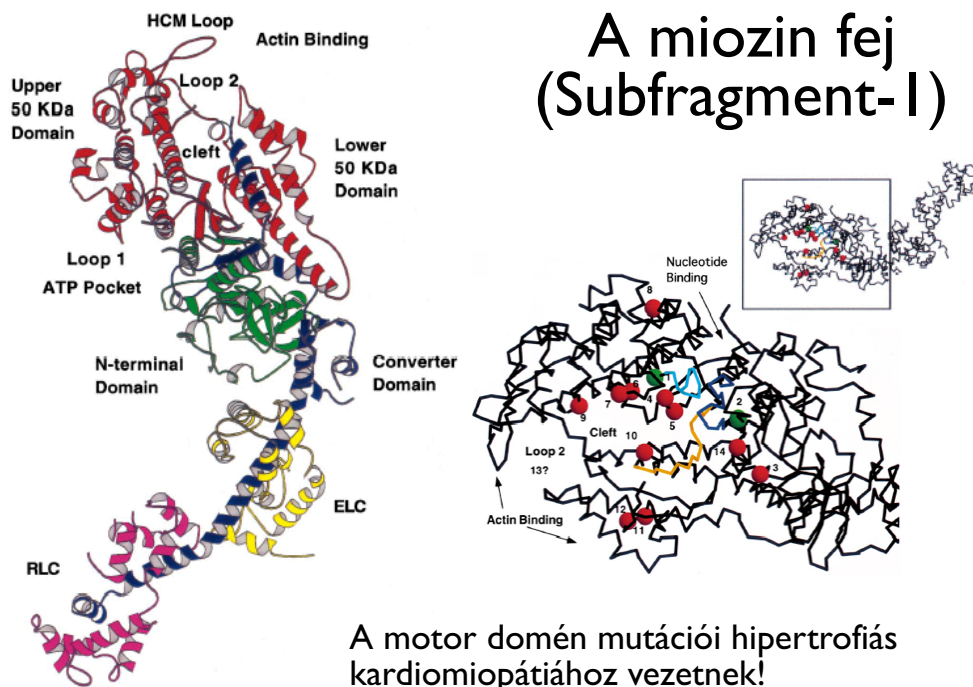
≥50% homológia a tagok között



## A miozin II



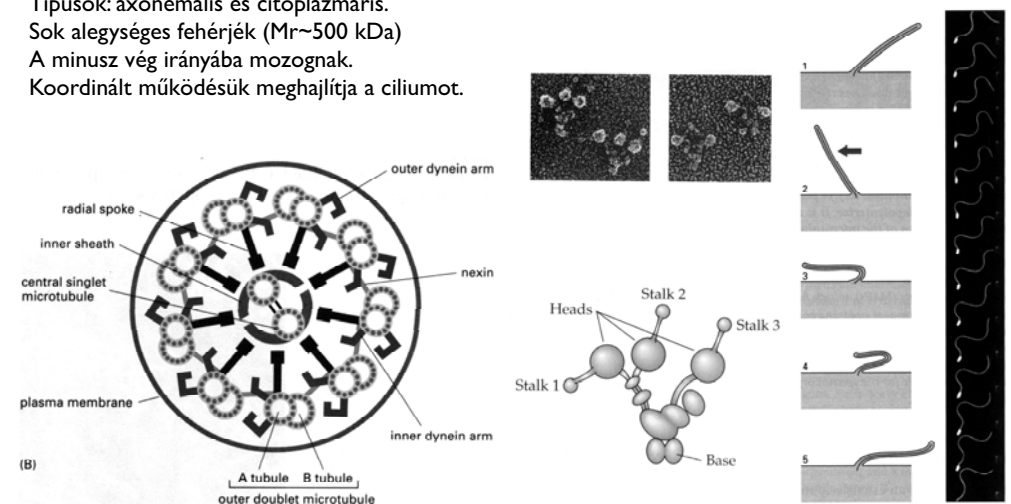
## A miozin fej (Subfragment-I)



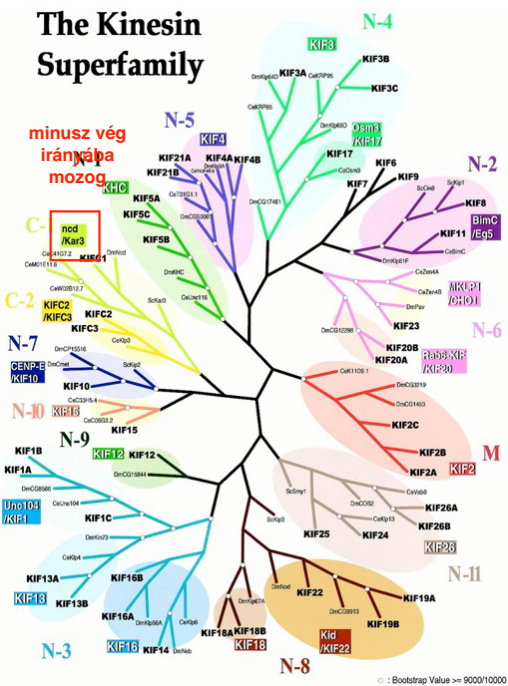
A motor domén mutációi hipertrofiás kardiomiopátiához vezetnek!

## Dineinek

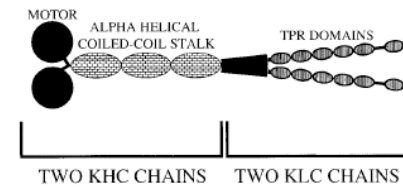
Típusok: axonemális és citoplazmális.  
Sok alegységes fehérjék (Mr~500 kDa)  
A minusz vég irányába mozognak.  
Koordinált működésük meghajlítja a ciliumot.



## The Kinesin Superfamily



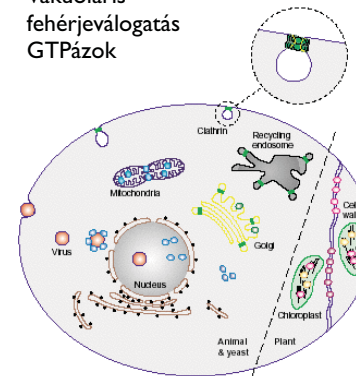
Processzív motorok.  
Plusz vég irányába mozognak.  
Vesicular transport



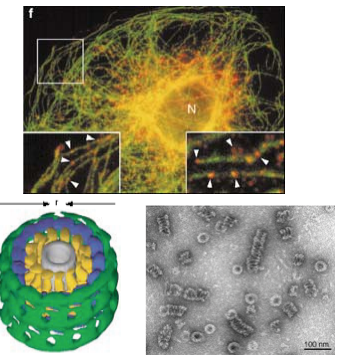
Switch domén:  
hasonlít a  
miozinhoz és  
G-fehérjékhez.

## Dinaminok

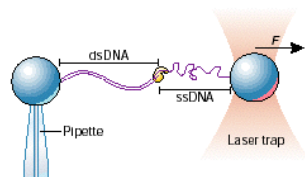
Vakuoláris  
fehérjevalogatás  
GTPázok



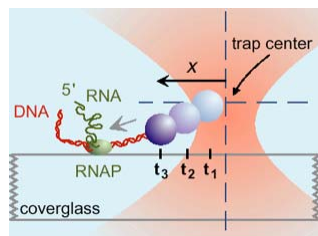
Protein	Localization	Function	Self-assembly
Dynamin	Plasma membrane (clathrin coat), Golgi, endosomes	Vesicle formation, fission	+
Vps1	Golgi	Vesicle formation and transport	Unknown
Drp1/Grp1/COP1	Mitochondria outer membrane	Mitochondrial fission and morphology	+
Mgm1/Msp1/COP1	Mitochondria inner or outer membrane, or matrix	Mitochondrial morphology	Unknown
Phragmoplastin	Cell wall	Cell wall morphology	+
ADL1	Cell wall, chloroplast	Membrane blebbing	+
ADL2	Chloroplast	Unknown	Unknown
HSBP1	Cytoplasm	Anti-viral activity	+
Mx	Cytoplasm, nucleus	Anti-viral activity	+



## DNS motorok

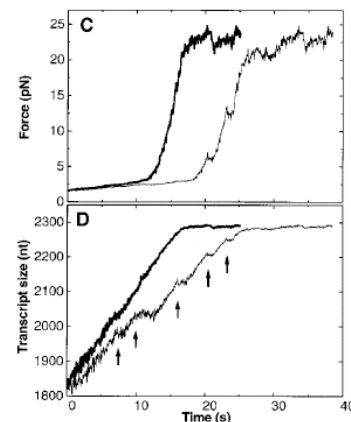


T7 DNS Polimeráz



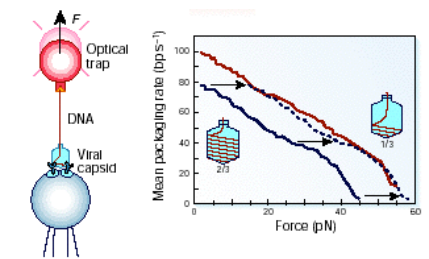
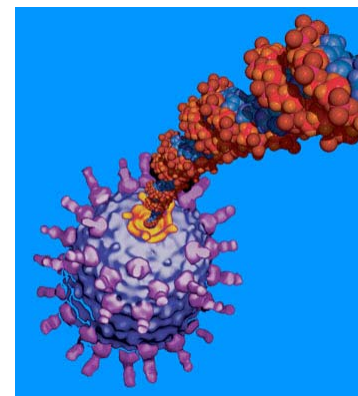
RNS Polimeráz

Processzív motorok



RNS Polimeráz, Wang et al. 1998.

## Vírus portális motor Különleges DNS motor



φ29 bakteriofág portális motor

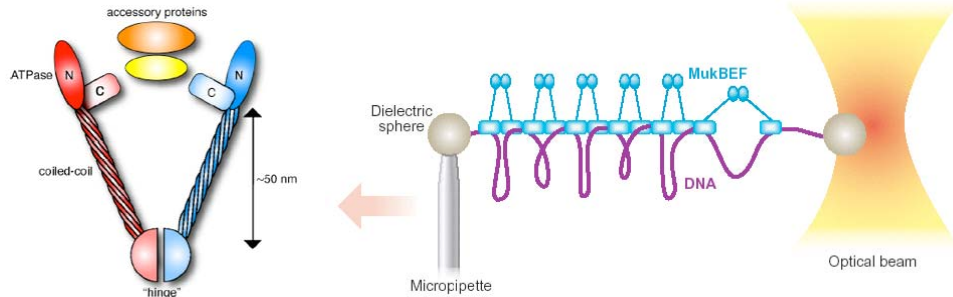


# DNS mechanoenzimek

## Kondenzinek

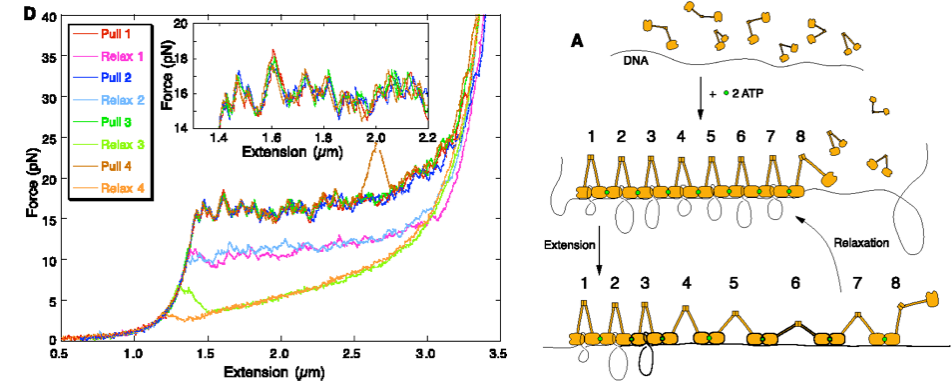
### SMC fehérjecsald

SMC = "structural maintenance of chromosomes"



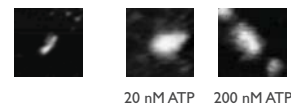
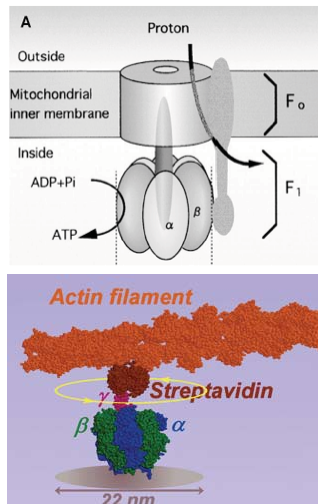
# MukBEF nanomechanika

## és kondenzációs model

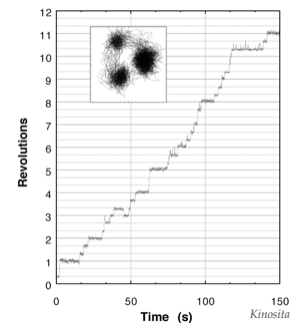


# ROTÁCIÓS MOTOROK I:

## F1F0-ATP SZINTETÁZ

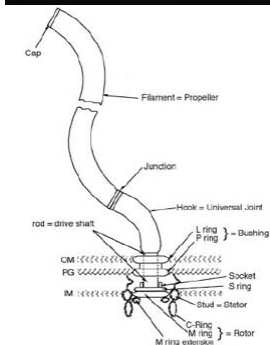
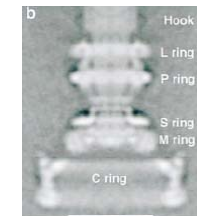


Diszkrét 120° rotációs lépések



# ROTÁCIÓS MOTOROK II:

## Bakteriális flagellum motor



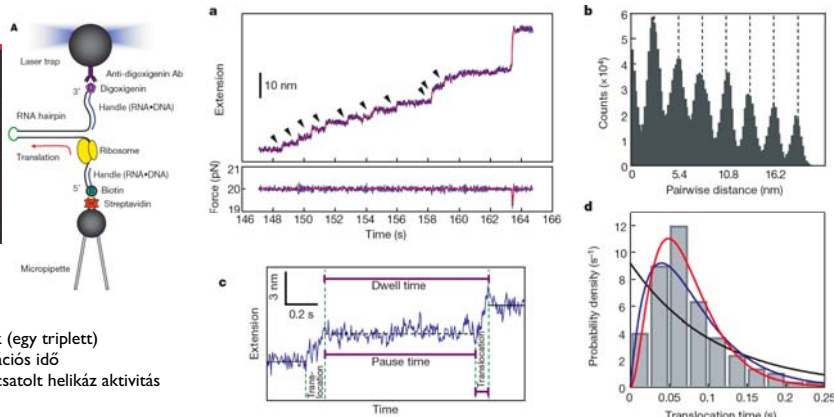
Fordulatszám: > 20000 rpm  
Fogyasztás: 10<sup>-16</sup> W  
Hatásfok: > 80%  
Energiaforrás: protonok

# Mechanoenzim komplex Riboszóma



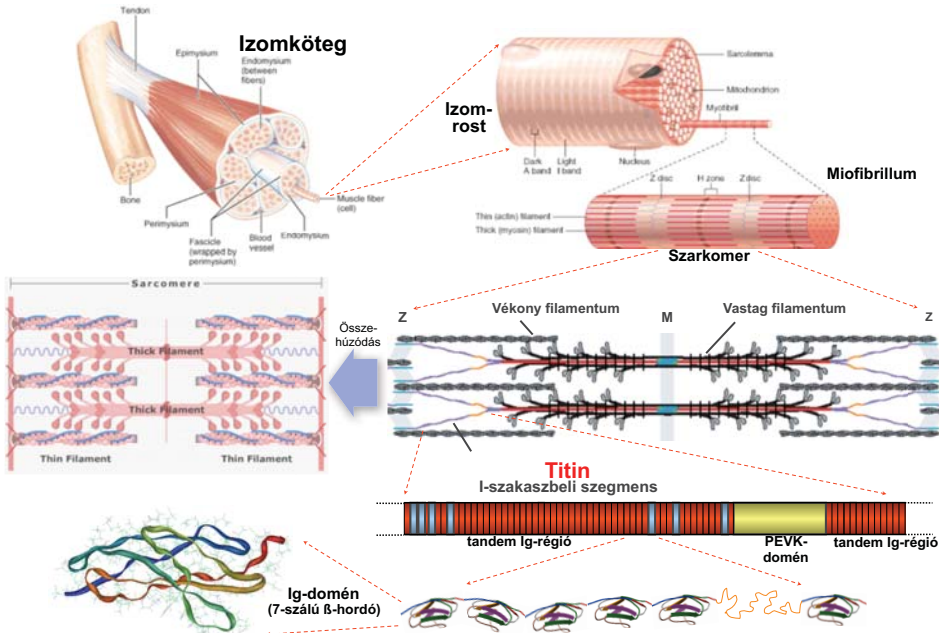
Wen et al. Nature 2008

2.7 nm-es lépések (egy triplétt)  
0.078 s transzlokációs idő  
Transzlokációval csatolt helikáz aktivitás

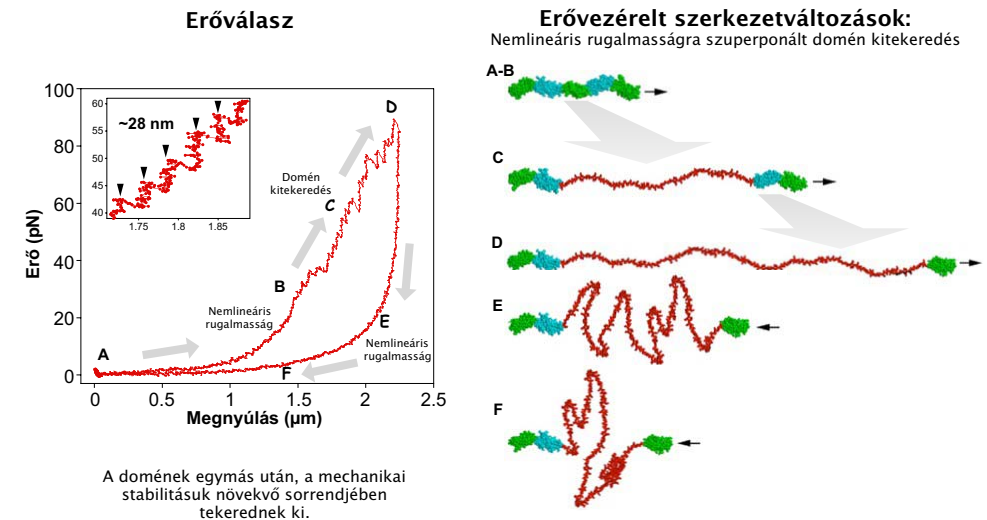


## AZ ÉLŐ SEJT FIZIKAI BIOLÓGIÁJA: EGYENSÚLYTÓL TÁVOLI FOLYAMATOK

## Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfűzér”

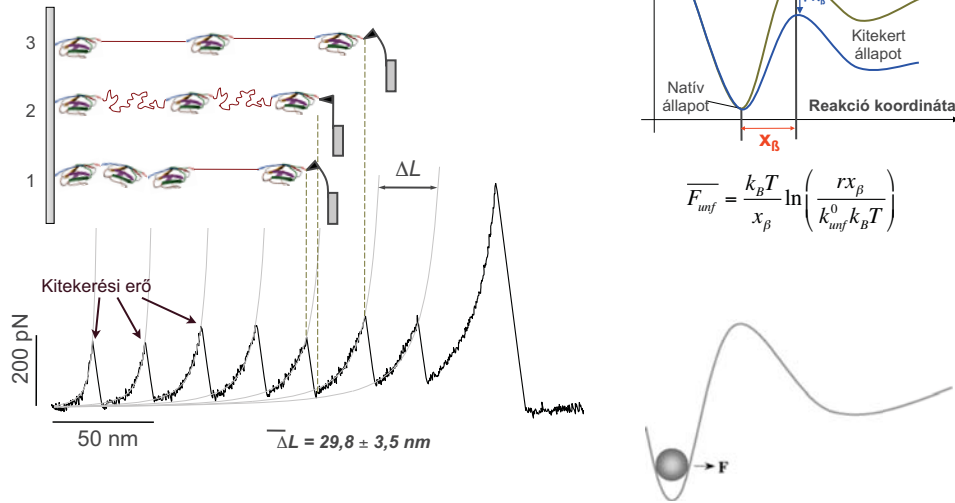


## Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesszel



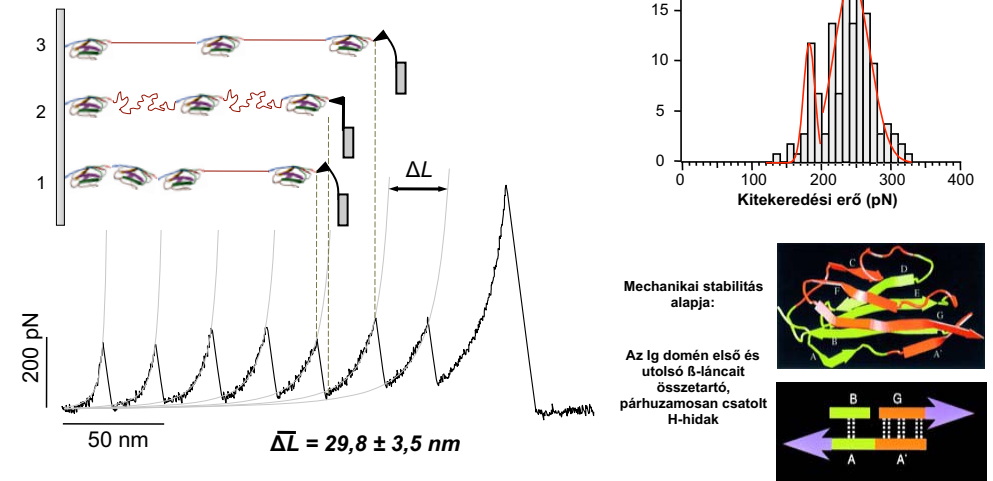
# Erővezérelt fehérje-kitekeredés

Titin I55-62 rekombináns fragmentum kitekerése



# Titin I55-62: viszkoelasztikus molekulaszakasz

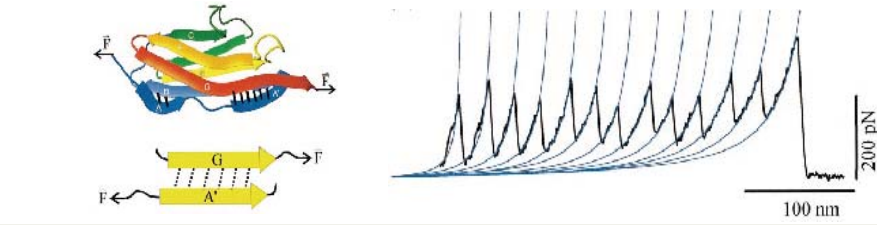
Az I55-62 fragmentum kitekeredési görbéje



## A mechanikai stabilitás biológiai logikája

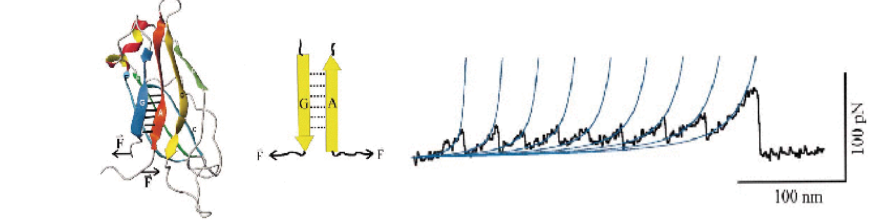
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kitekeredési erő

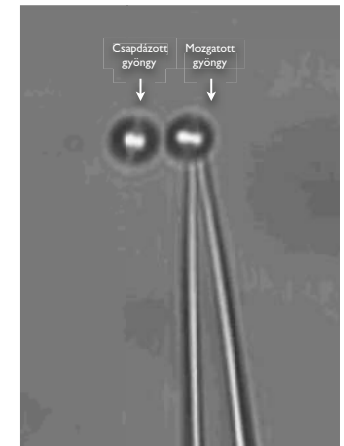
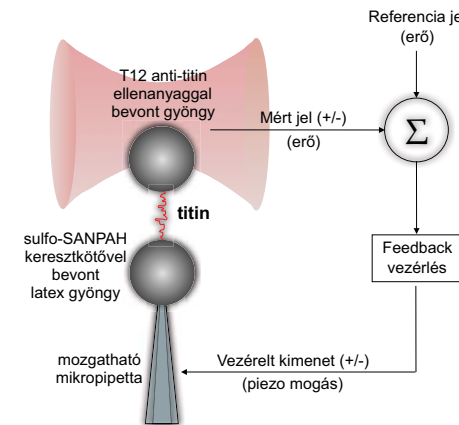


Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

Alacsony kitekeredési erő

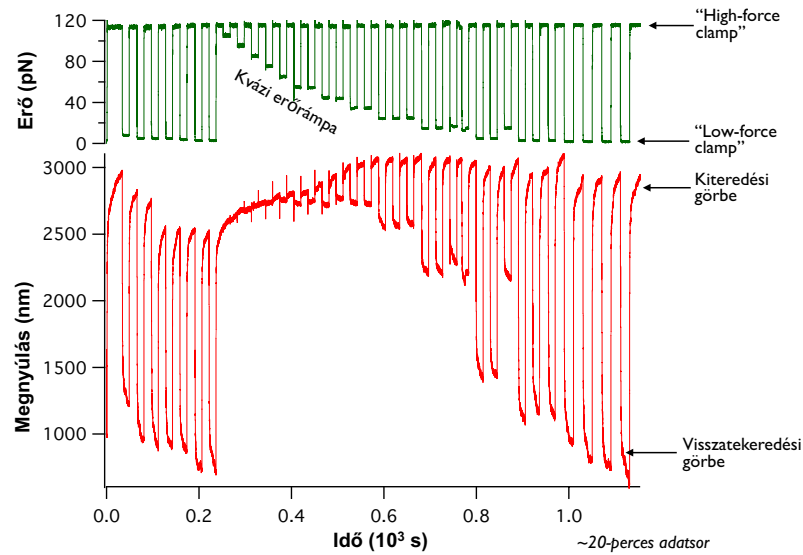


## Titin nanomanipulálás erővisszacsatolt lézercsippessel

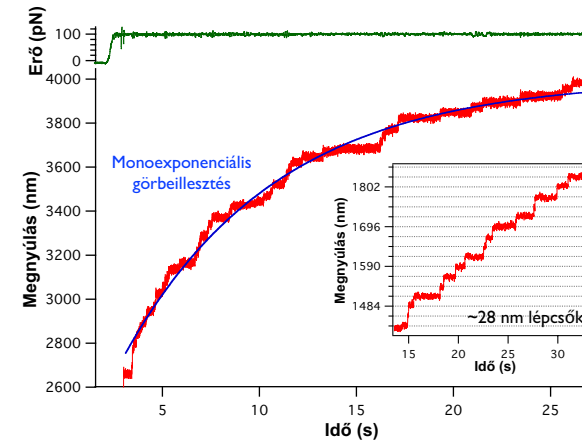




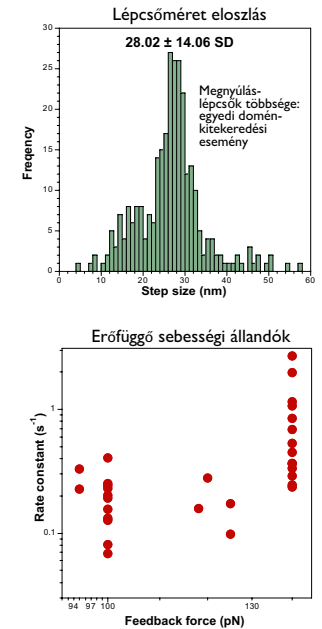
# Konstans-erő kísérlet egyetlen titinmolekulán



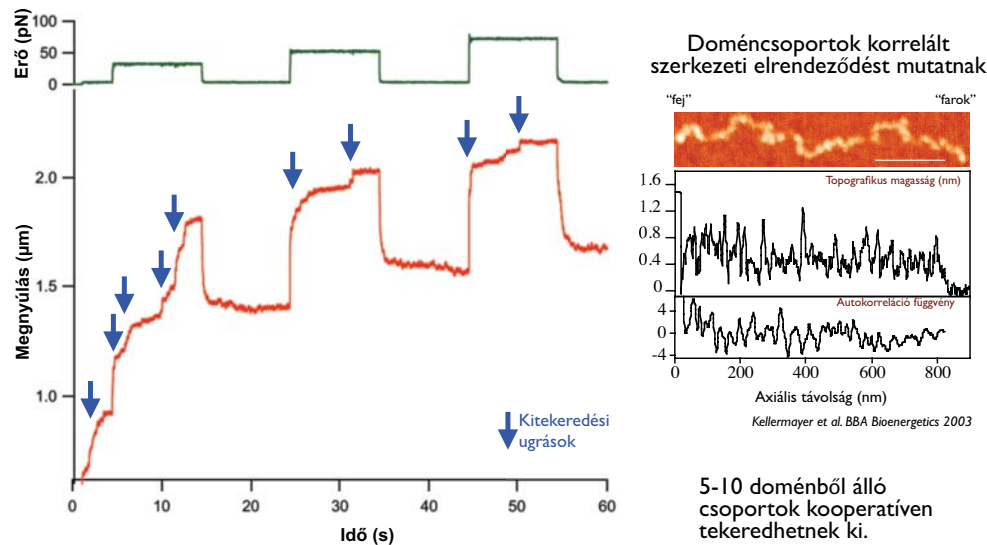
# Titin kitekeredés konstans erőnél



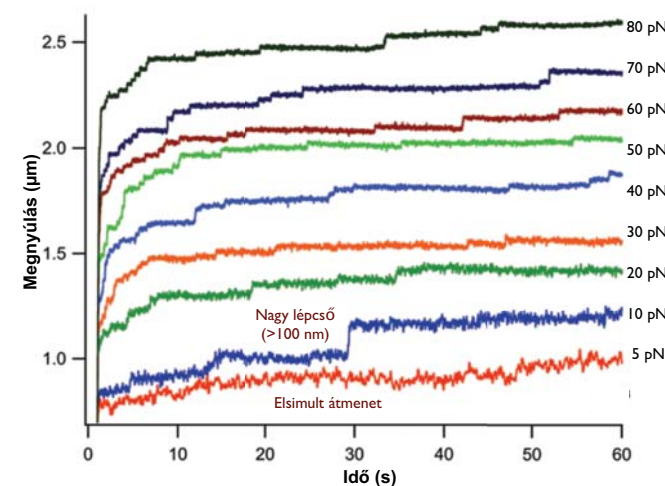
A várttól eltérések mutatkoznak a lépcsőméret eloszlásban, a monoexponenciális idő-megnyúlás görbe lefutásában és az erőfüggő sebességi állandó összefüggésben.



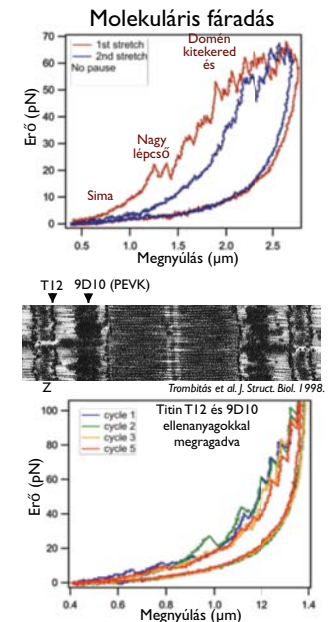
# Doménkitekeredés hirtelen ugrásokban



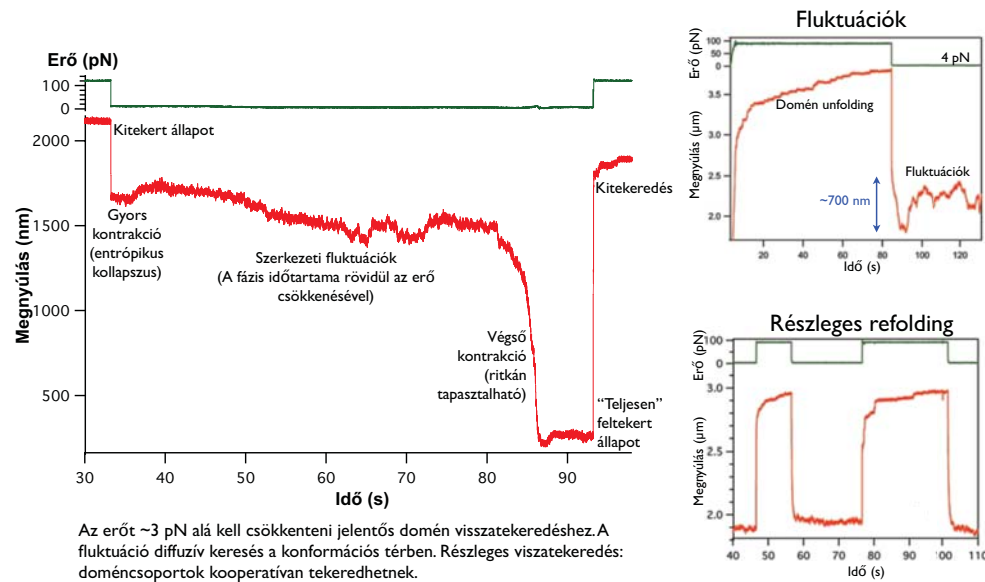
# Szerkezeti átmenetek alacsony erőnél



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

