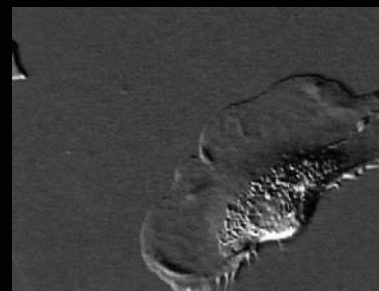


# Biomolekulák és sejtek mechanikai tulajdonságai

Kellermayer Miklós

Semmelweis Egyetem  
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

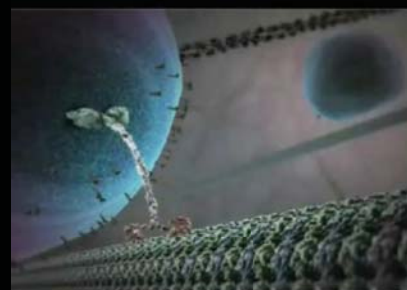
## Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



Toxoplasma gondii



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transport kineztin



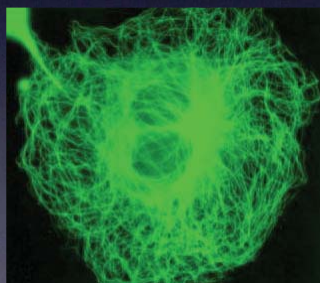
Fehérjeszintézis riboszómán

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

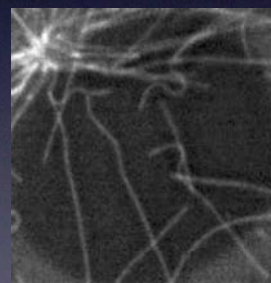
## Miért egyedi molekulák?

1. Egyének azonosíthatók a tömegben

Microtubuláris rendszer



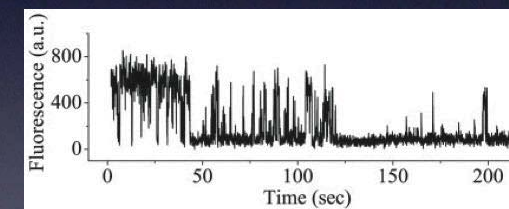
Egyedi mikrotubulusok -  
treadmilling



## Miért egyedi molekulák?

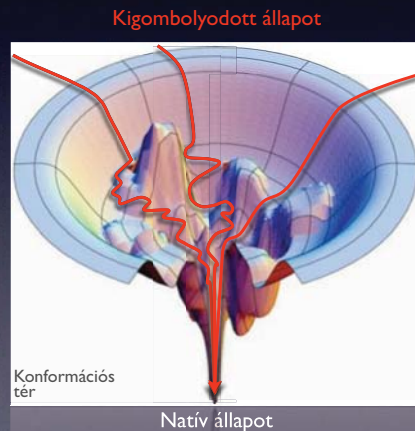
2. Véletlenszerű eseményeket fedeztünk fel

Kvantumpont pislogás



# Miért egyedi molekulák?

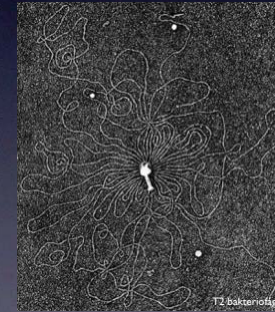
## 3. Párhuzamos útvonalon haladó folyamatokat ismerhetünk meg



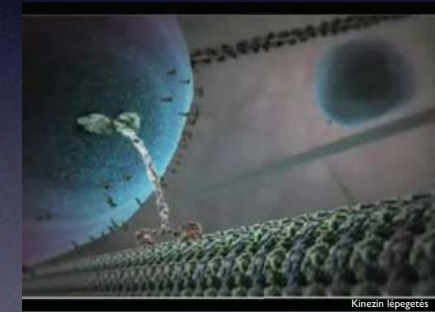
# Miért egyedi molekulák?

## 4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük

Hajlítási rugalmasság



Motor fehérje működés



## Rövid anyagtudomány

Merev testek rugalmassága: Hooke törvény

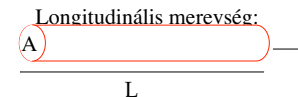
$$\frac{F}{A} = E \frac{\Delta L}{L}$$

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

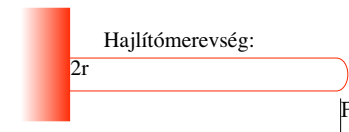
Anyag	Young modulus (Pa)
Gyémánt	1200
Acél	211
Üveg	73
Plexi	3
Gumi	0.02
Selyem	5-10
Keratin	2.4
Aktin	2.3
Kollagén	2
Tubulin	1.9
Elasztin	0.002

## Merevségi (vagy rugó-) állandó

Merevségi (vagy rugó-) állandó ( $k = F/\Delta L$ ) nem anyagfüggő paraméter. A merevségi állandó (k) függ a test alakjaitól, 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:  $R = v(t_2 - t_1)$

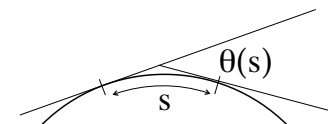
Bolyongó mozgás esetén:  $R = l^{1/2} [v(t_2 - t_1)]^{1/2}$

R=elmozdulás,  
v= átlagos sebesség,  
 $t_1, t_2$ =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  $\theta(s)$   $0^\circ$  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.

## "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  $I = r^4 \pi / 4$ )

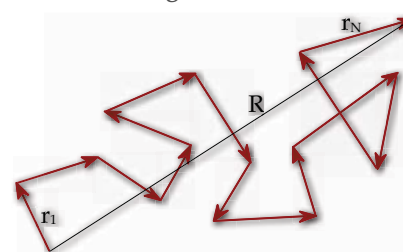
$k_B$  =Boltzmann állandó

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

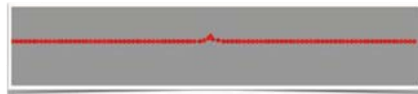
Termikus gerjesztésre a polimerlánc random, ide-oda hajló fluktuációkat végez.



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



Az entrópiamaximumra törekvés miatt a polimerlánc rövidül.



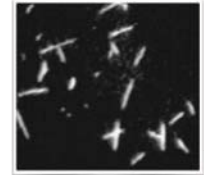
## BIOPOLIMÉREK RUGALMASSÁGA

$l$  = korrelációs hossz (hajlítómerevséget jellemzi)  
 $L$  = kontúrhossz

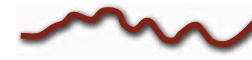
Merev lánc  
 $l \gg L$



Mikrotubulus



Szemiflexibilis lánc  
 $l \sim L$



Aktin filamentum



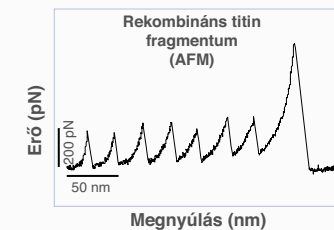
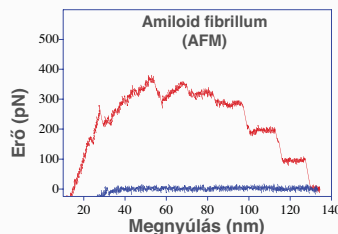
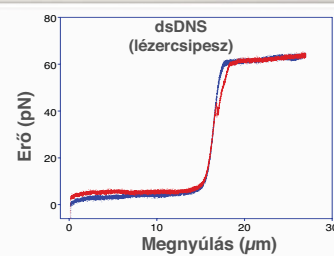
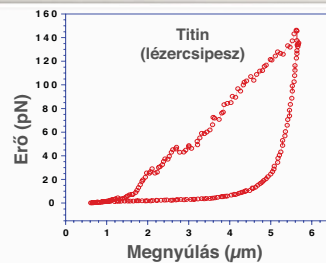
Flexibilis lánc  
 $l \ll L$



DNS molekula

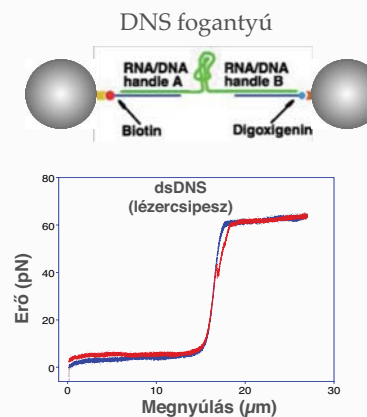


## Vizsgálható paraméterek: erő

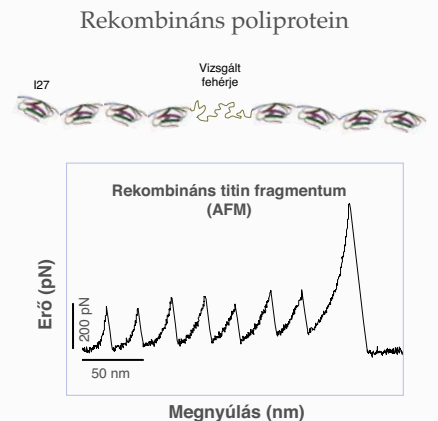


RUGALMASSÁG + SZERKEZETI VÁLTOZÁS ("ÁTMENET")

## Molekuláris szingularitás: nanomechanikai ujjlenyomat

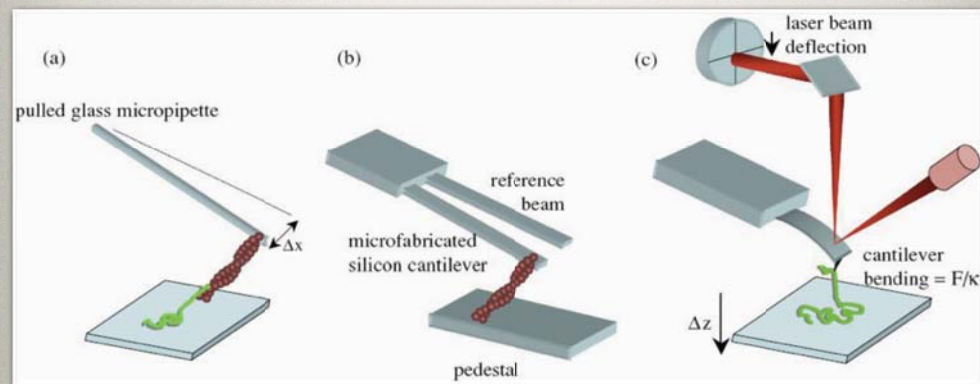


Kooperatív átmenet 65 pN-nál  
 DNS-RNS hibrid

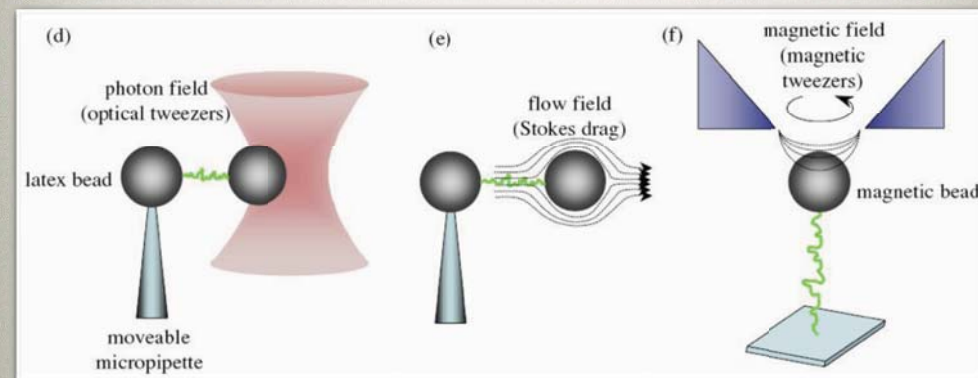


Fűrészfog alakú átmenetek  
 Egyenlő távolság a fogak között

## Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció rugólapka technikákkal



## Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció mező alapú technikákkal

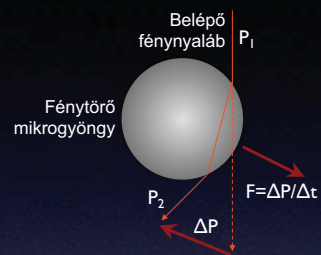


## Hogyan fogjunk meg egyetlen molekulát?

Lézerrel!



"Tractor beam", Star Trek Enterprise



3 μm latex mikrogönggy a lézercsipeszben

A mikrogönggyöket mint fogantyúkat alkalmazzuk.

## MOLEKULA - FOGANTYÚ GEOMETRIA

mikrogönggy ~ 1 μm



molekula ~ 10 nm

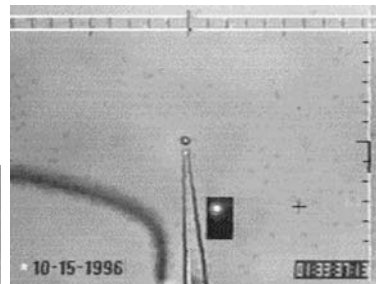
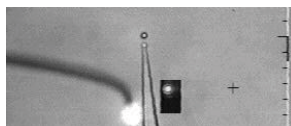
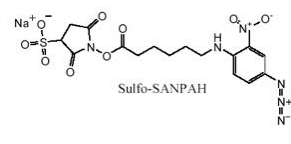


# HOGYAN RAGADJUNK MEG EGY MOLEKULÁT?

Például "molekulahegesztéssel"!

## Fotoreaktív keresztkötők

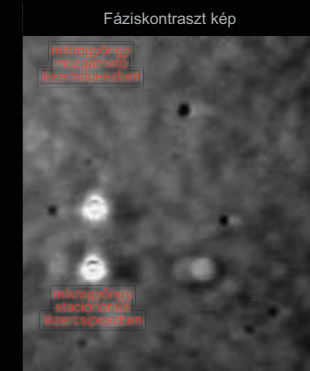
Nem-specifikus  
Fotoreaktív N<sub>3</sub> (azid)  
csoport  
UV megvilágítás



## Csomókötés egyetlen molekulafonálra lézercsippessel

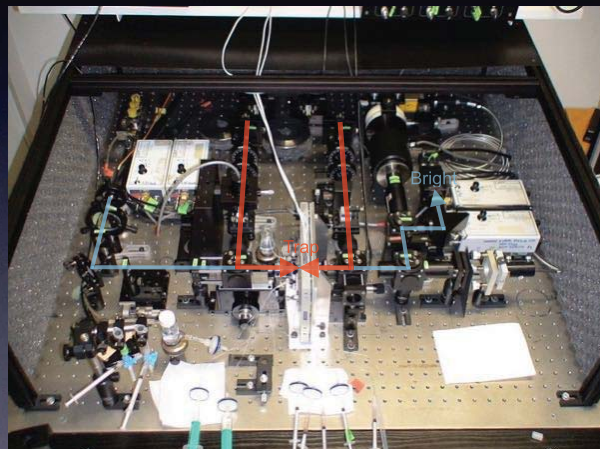
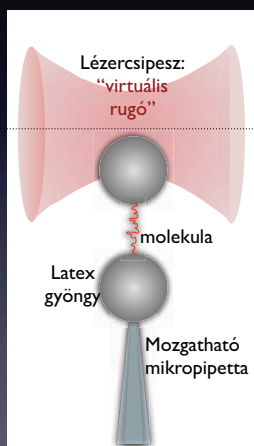
Aktin filamentum

DNS



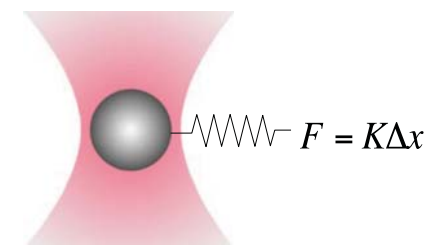
Arai et al. Nature 399, 446, 1999.

## A lézercsippessel erőt is lehet mérni!



Két lézergyűrűs optikai csipesz berendezés

## A lézercsipesz virtuális rugó "Pikotenziométer"

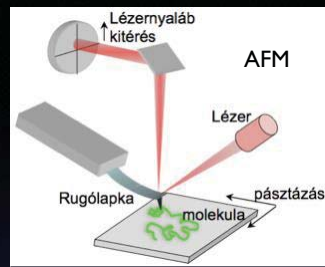


$\Delta x \approx$  nanométer tartomány

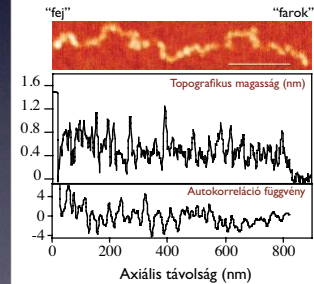
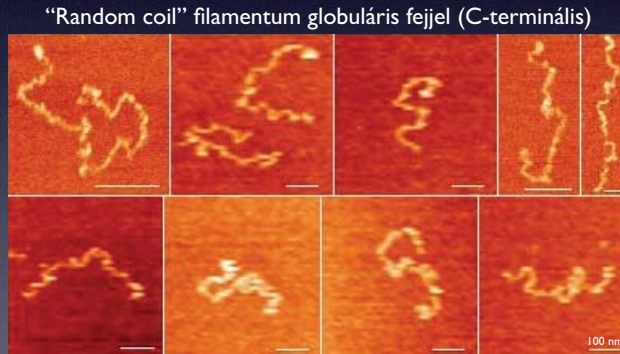
$K \approx 0.01 - 1$  pN/nm

$F \approx$  pikonewton tartomány

# Egyedi titinmolekulák vizualizálása AFM-mel



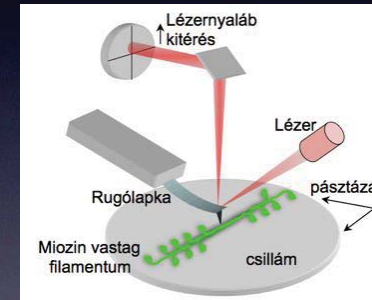
Doménsoportok korrelált organizációja



# Egyedi miozin filamentumok vizualizálása

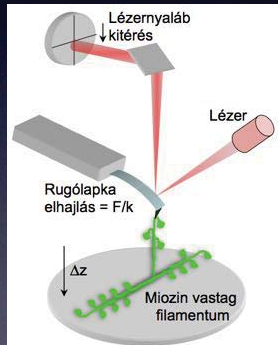
Atomerő mikroszkópia

Szintetikus miozin filamentum  
Egyedi miozinmolekulák feloldhatóak vizes közegben

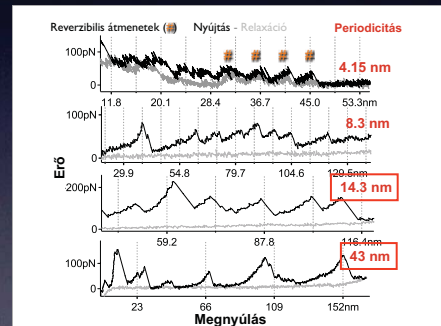


# Miozin filamentumok nanomechanikája

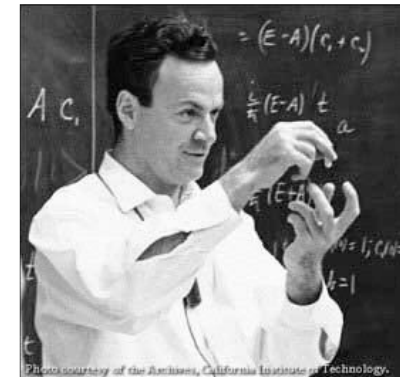
Egymolekula erőspektroszkópia  
 $\text{Erő (pN)} = \text{Rugóállandó (pN/nm)} \cdot \text{Elhajlás (nm)}$



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

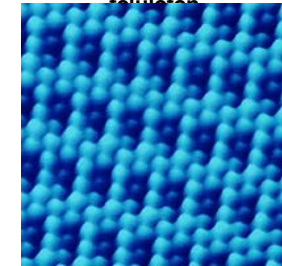


# AFM történelem



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

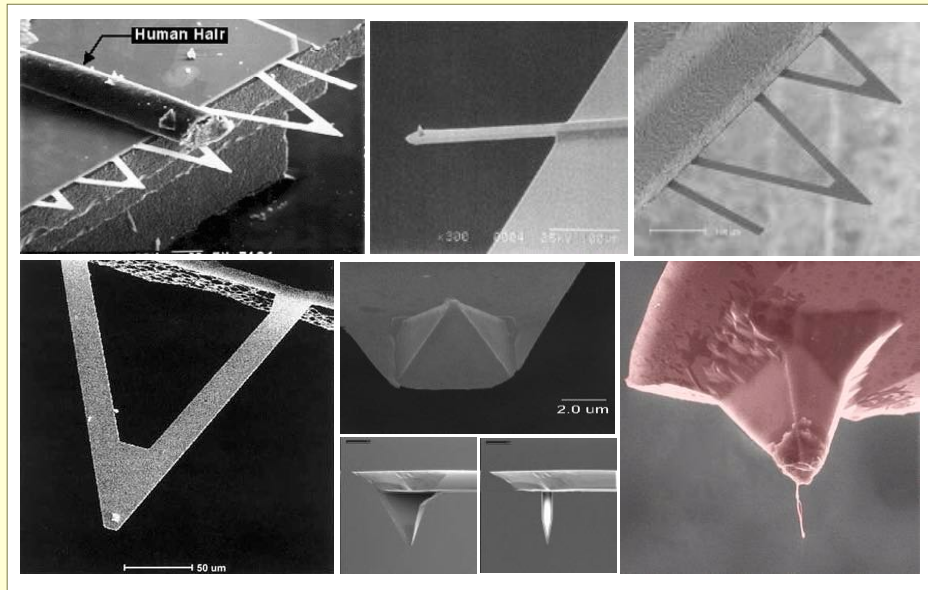
Oxigén atomok  
rhodium egykristály felületén



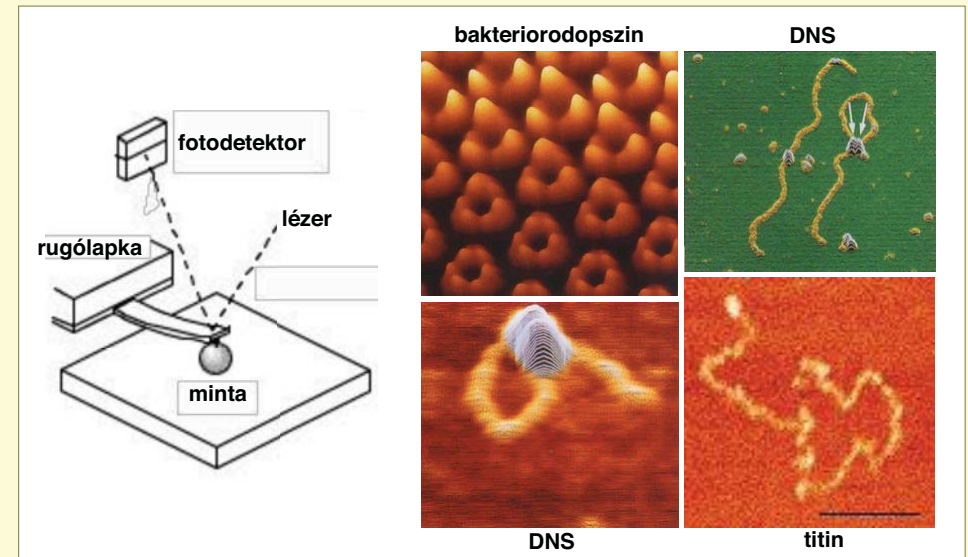
a "nanovilág" léptéke:  
1 nanométer



## AFM Rugólapkák és hegyek



## Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscope = AFM)

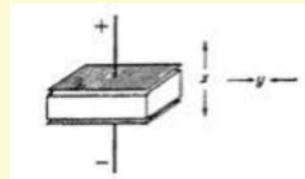


## Piezelektromos hatás

### Inverz piezelektromos hatás

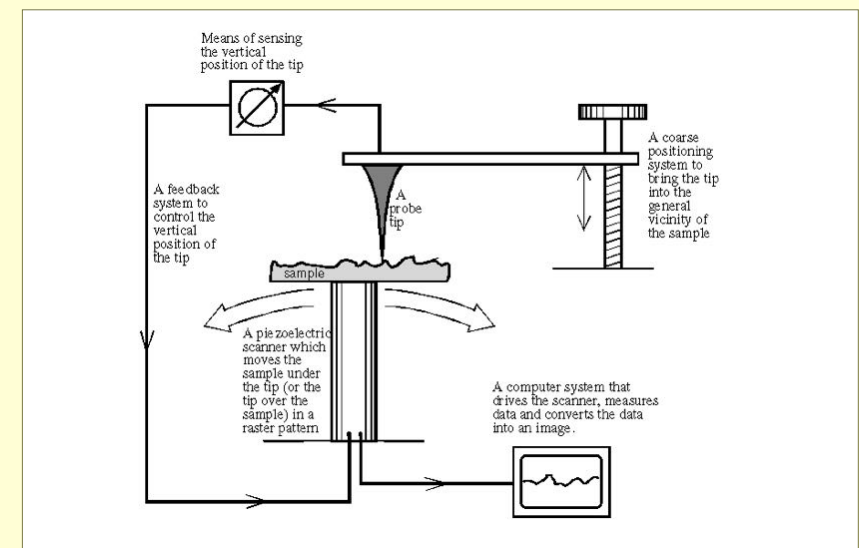
Piezelektromosság (Pierre és Jacques Curie, 1880): "nyomáselektromosság"

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



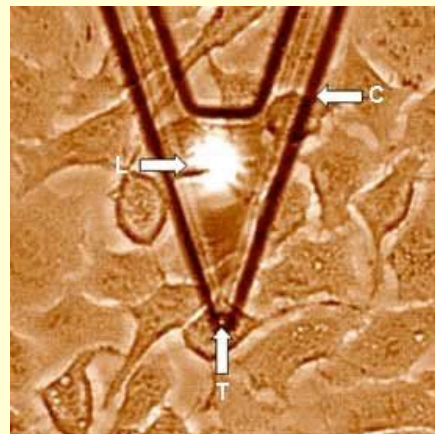
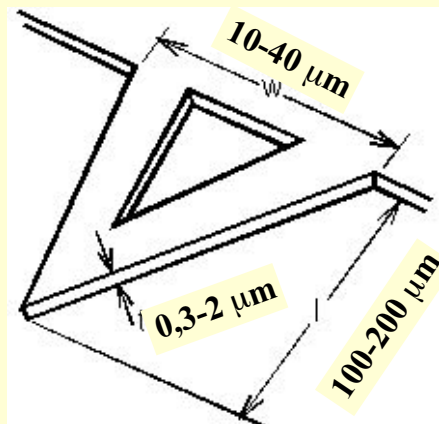
Inverz piezelektromos hatás: bizonyos kristályokban potenciálkülönbség hatására fellépő deformáció:

## Pásztázó tűszondás mikroszkópia (Scanning Probe Microscopy = SPM)

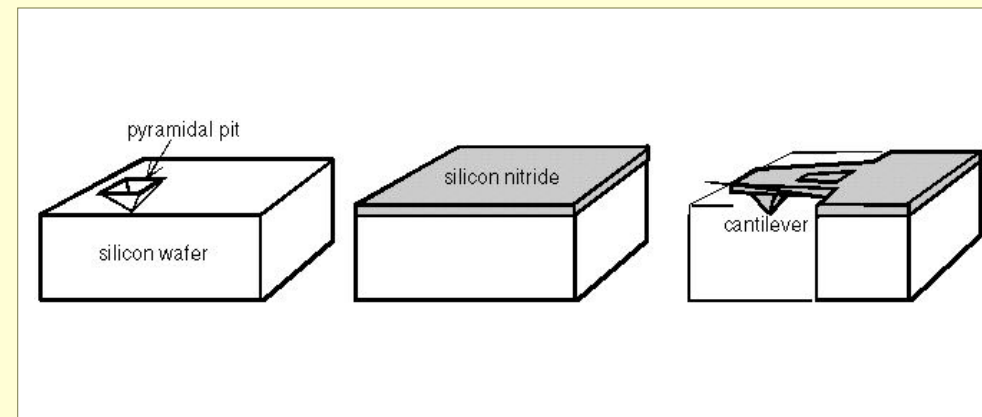




## Rugólap méretei

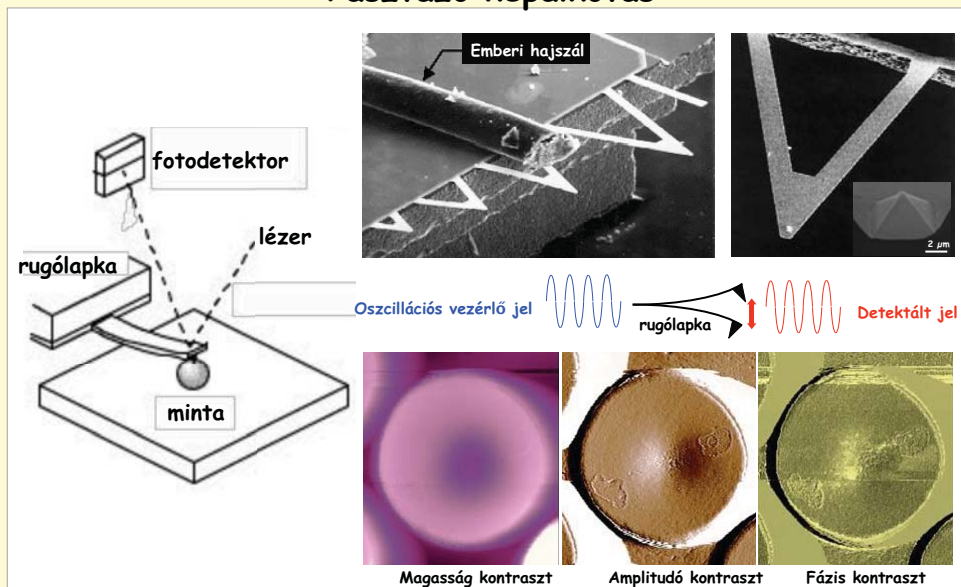


## Rugólapkák készítése



## AFM alapok

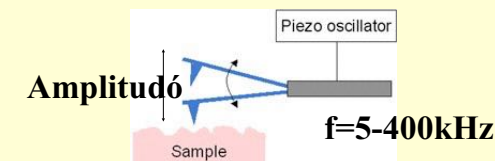
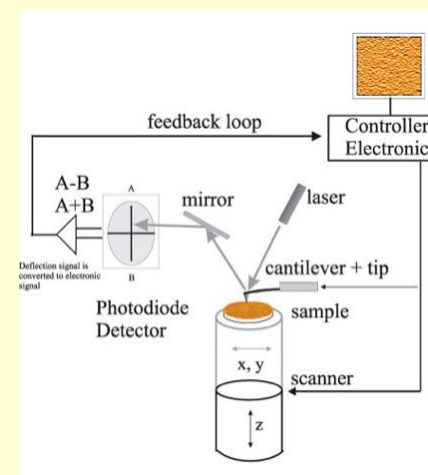
### Pásztázó képalkotás



### Képalkotási módok

Oszillációs mód – **biológiai minták** esetében ideális.

Kontakt mód



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

**Minta:** legyen minél laposabb  
ne legyen viszkózus

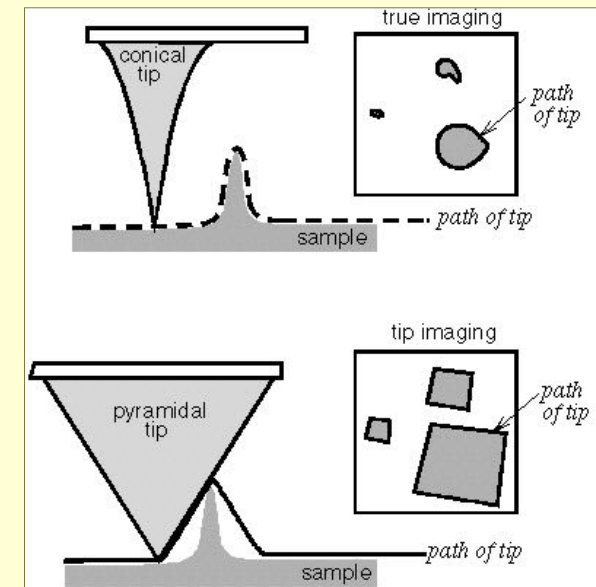
„Az AFM hátrányai”

Időfelbontás: perces nagyságrendbe esik

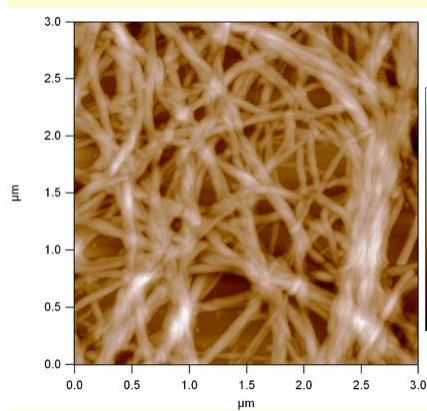
Csak felszínhez kötött minta vizsgálható

Csak felszínen zajló folyamat követhető nyomon

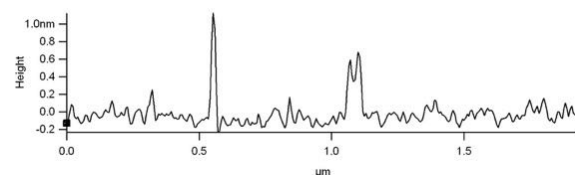
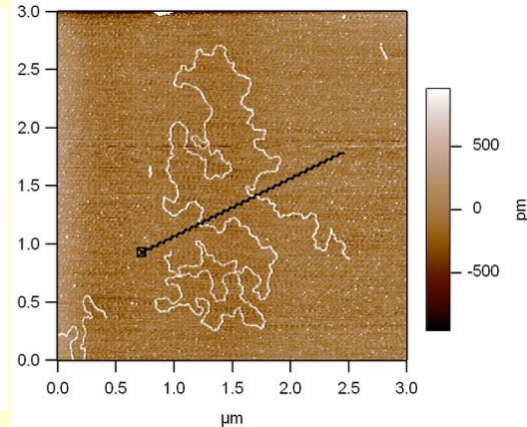
## Képalkotási hibák, felbontás



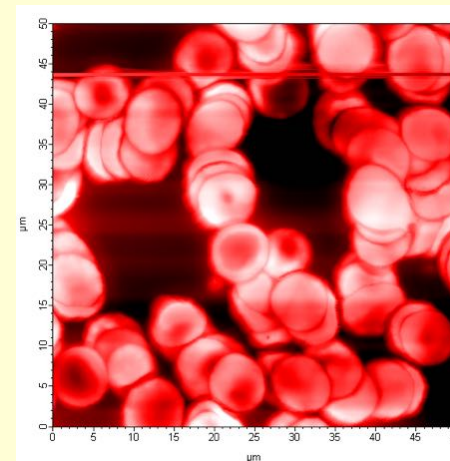
## Béta-amyloid fibrillumok



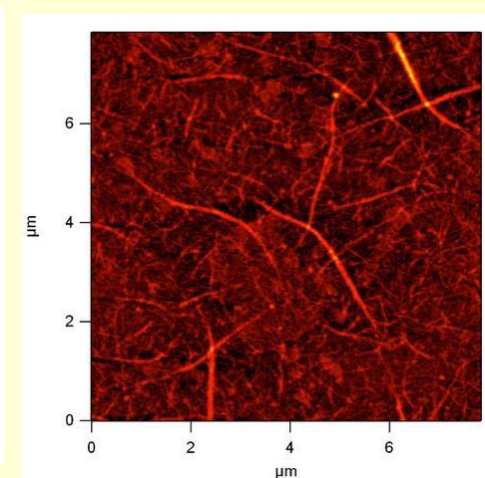
## DNS



## Vvt kenet

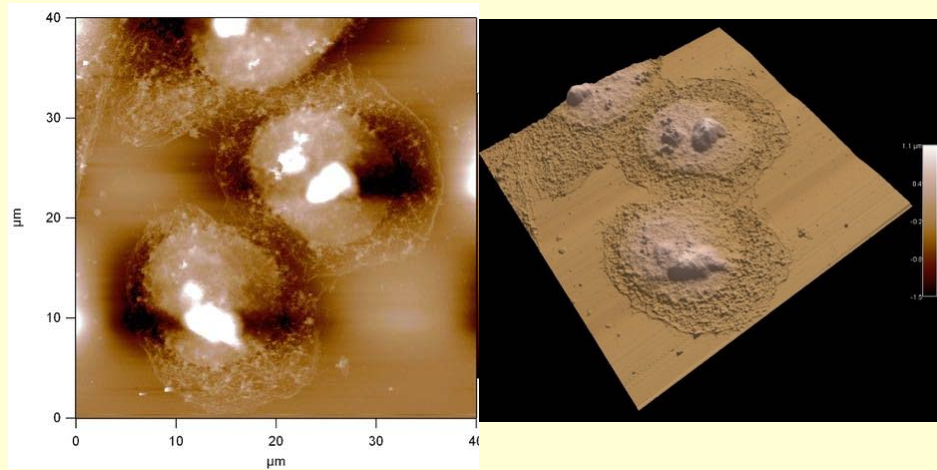


## Fibrin hálózat

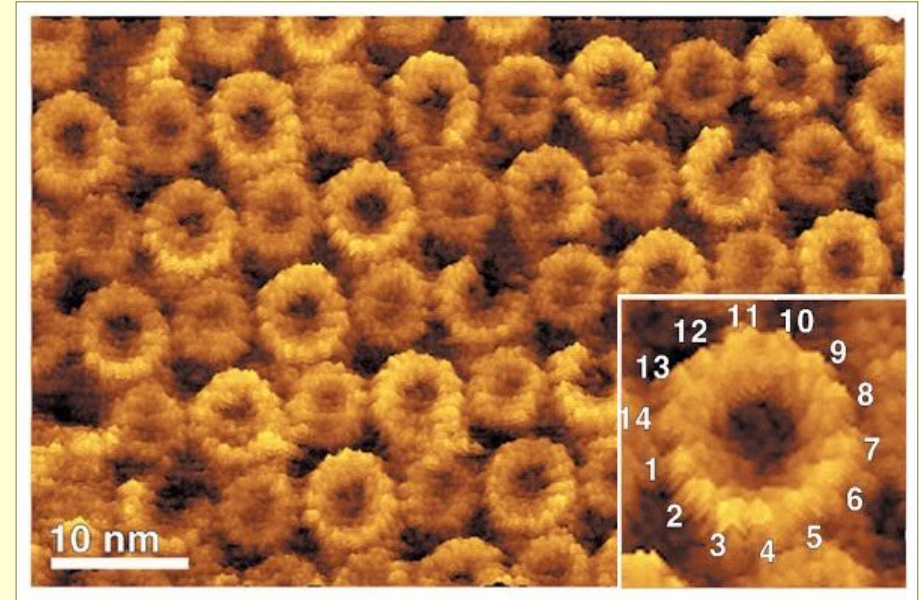




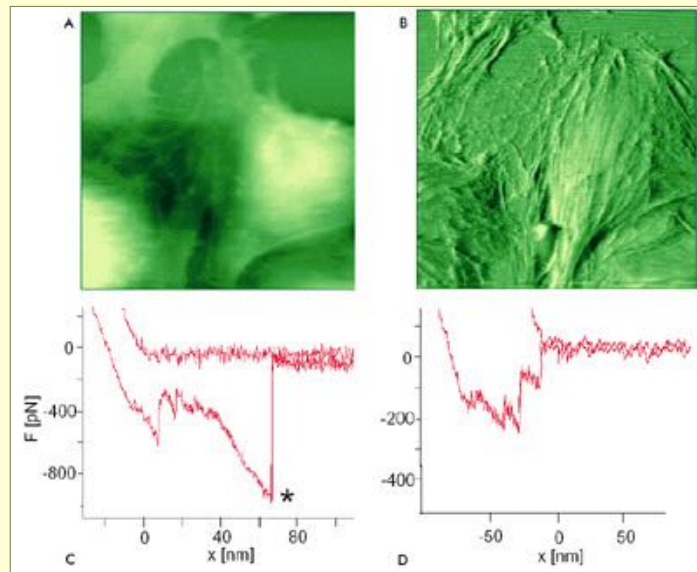
## HeLa sejtek



## Képek: ATP-szintáz

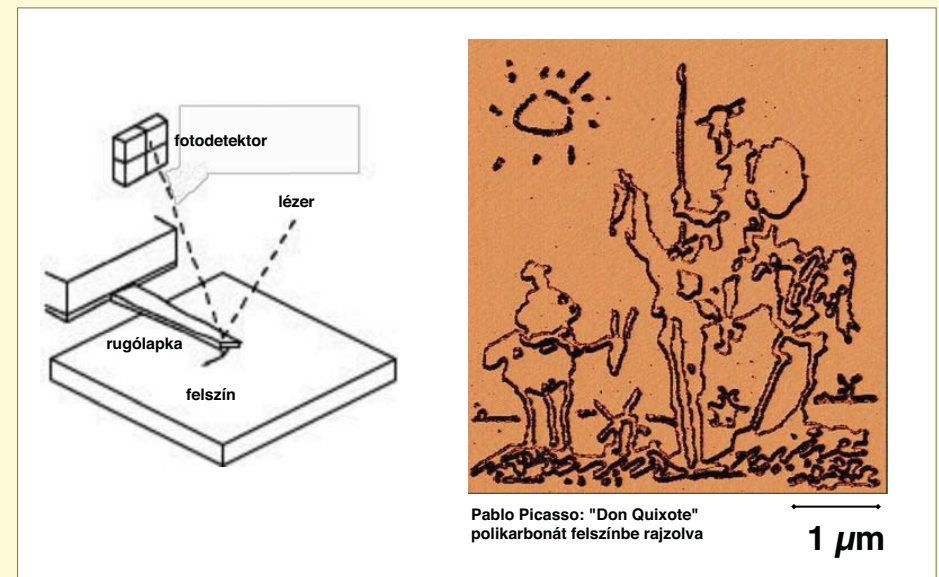


## Képek: endotél sejtek

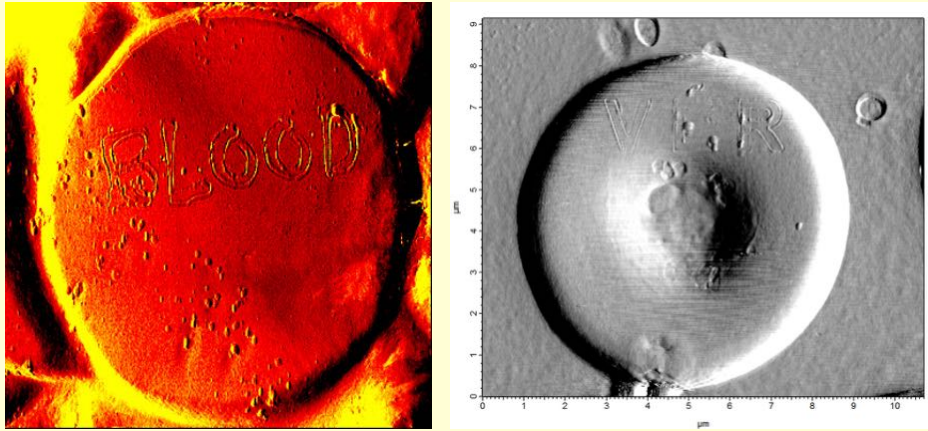


## Nanolitográfia

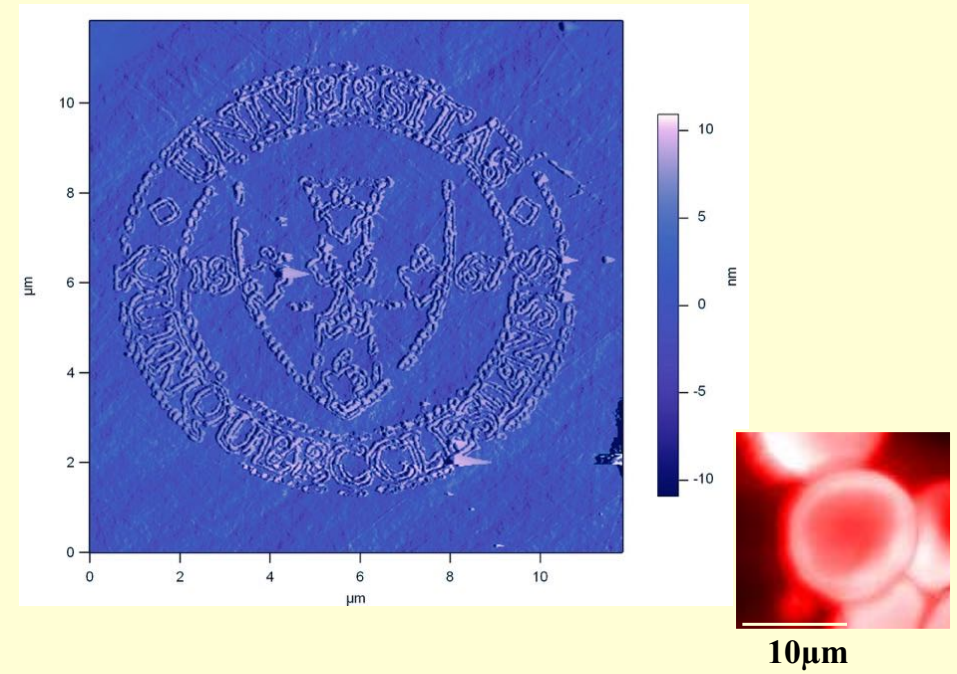
Lithos: kő, gráfia: rajzolni



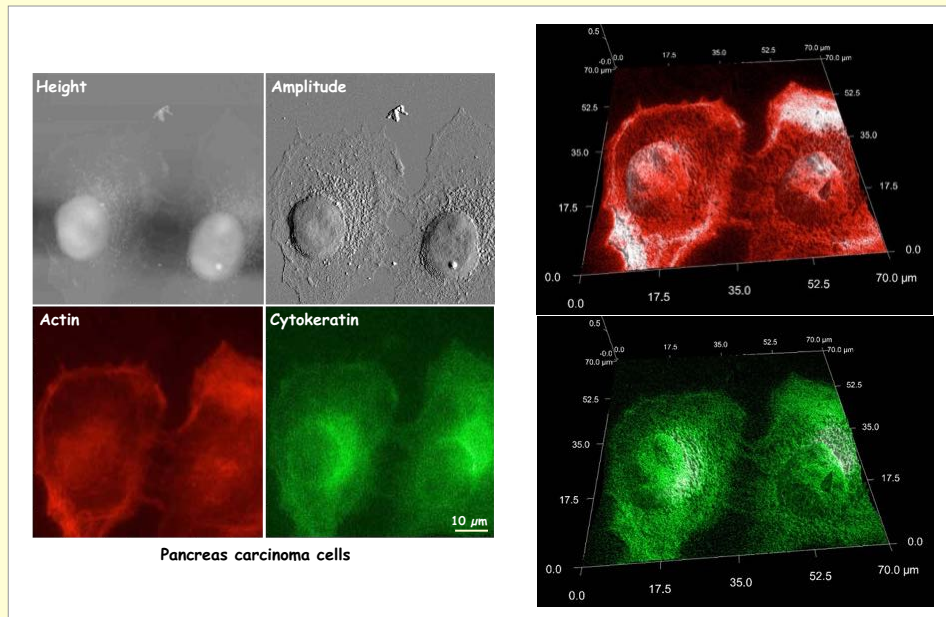
## Nanolitográfia



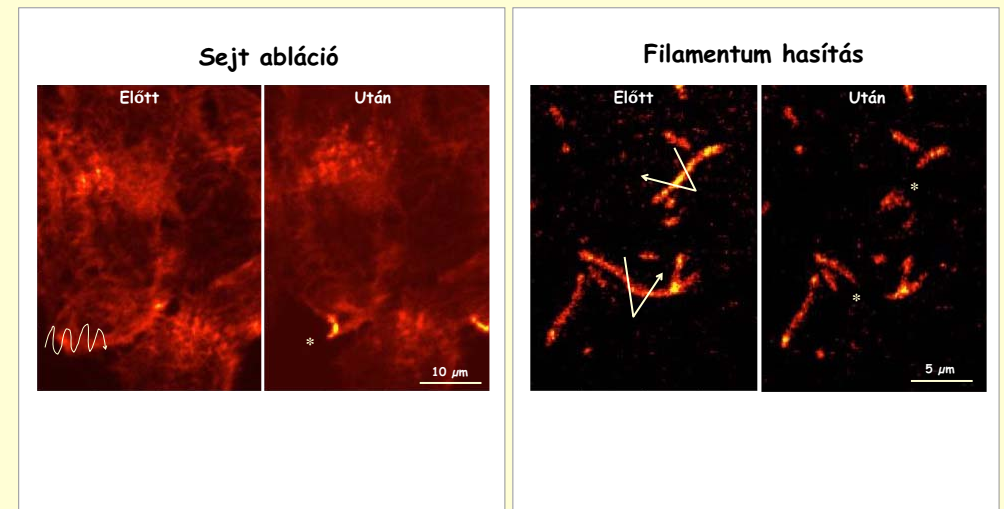
## Nanolitográfia



## Szekvenciális két-hullámhossz STIRF-AFM

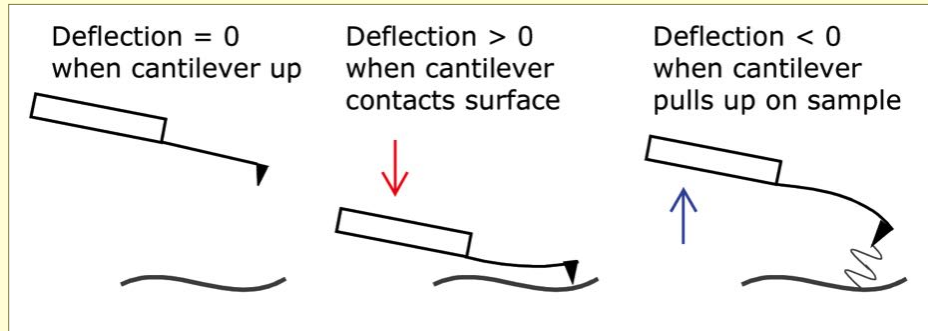


## Lágy minta manipulációja STIRF-AFM segítségével



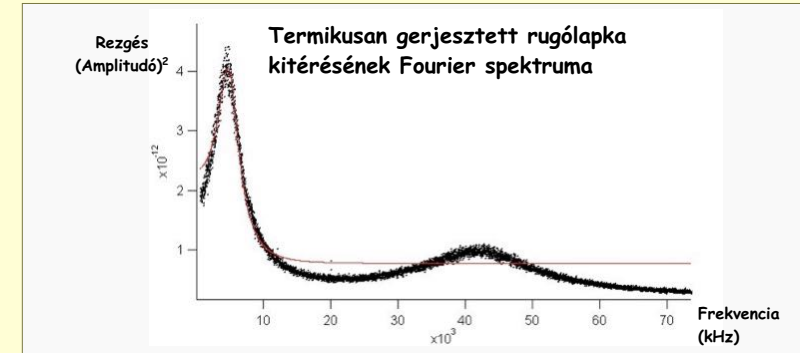
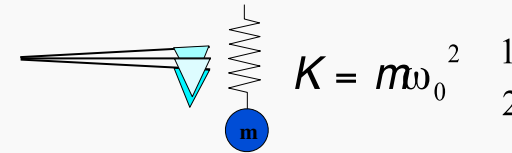


## Molekulanyújtás atomerőmikroszkóppal alapelvek

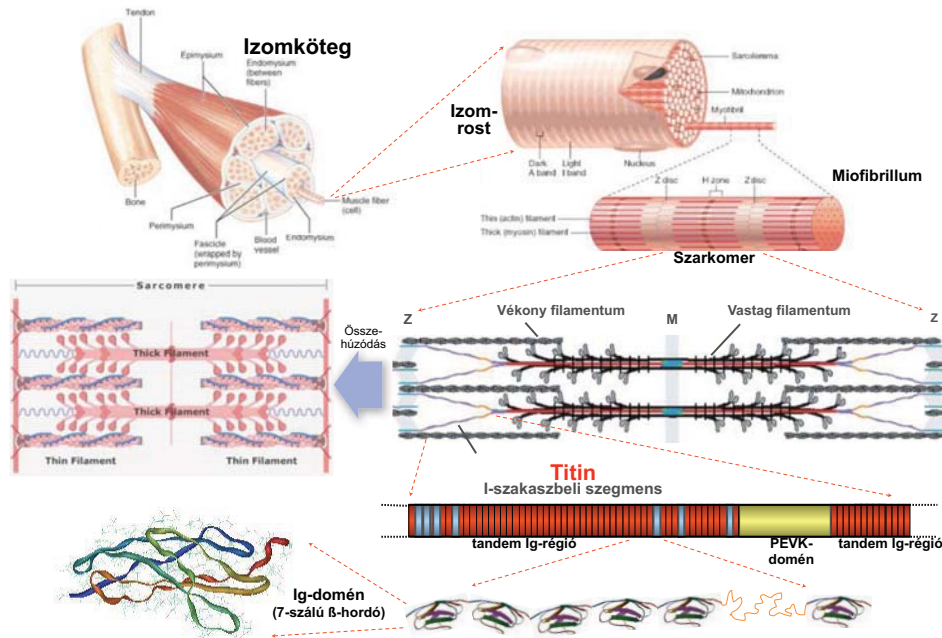


## Termikus rugólapka-kalibráció

Termikusan gerjesztett rugólapka: harmonikus oszcillátor

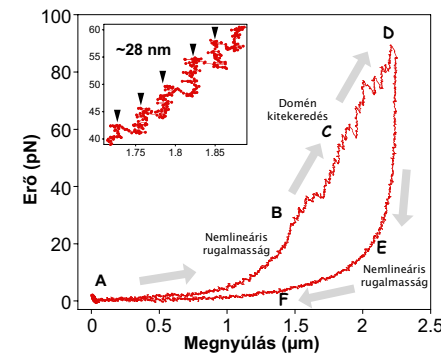


## Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfűzér”



## Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesszel

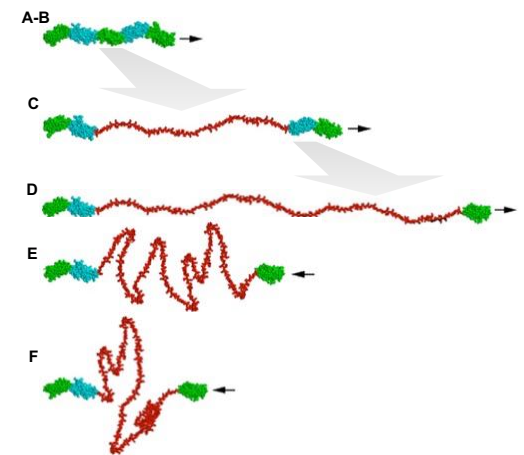
Erőválasz



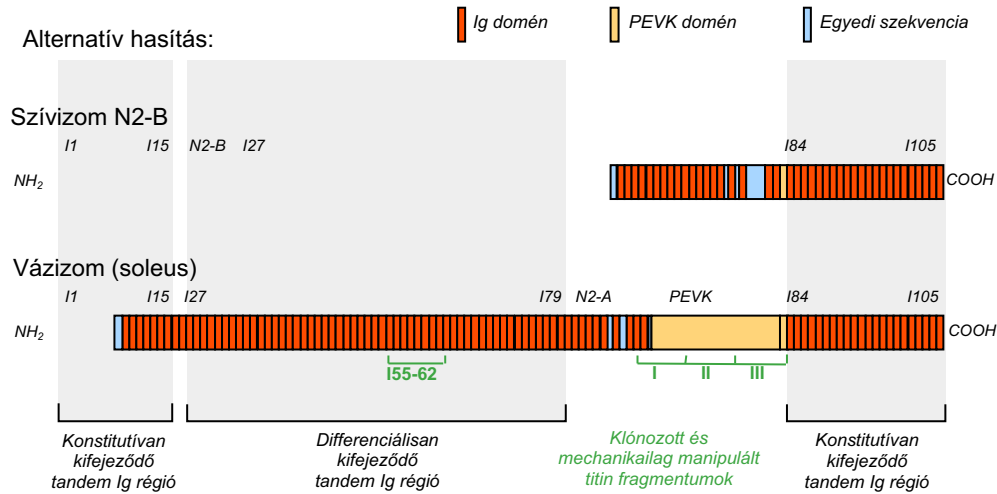
A domének egymás után, a mechanikai stabilitásuk növekvő sorrendjében telerednek ki.

Erővezérelt szerkezetváltozások:

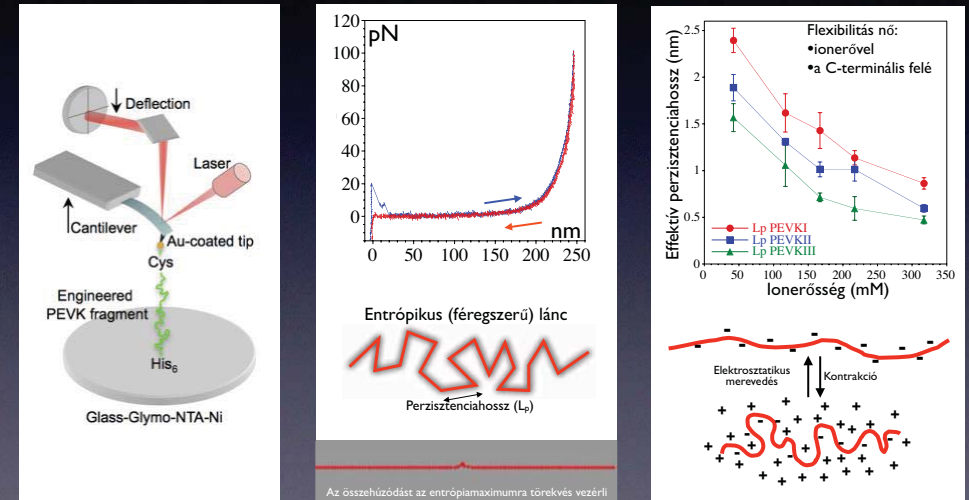
Nemlineáris rugalmasságra szuperonált domén kitékeredés



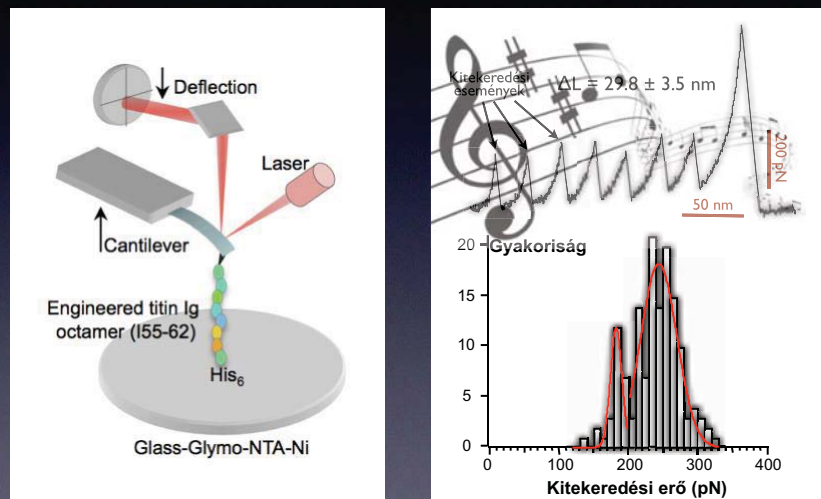
# A titin nanomechanikai boncolása



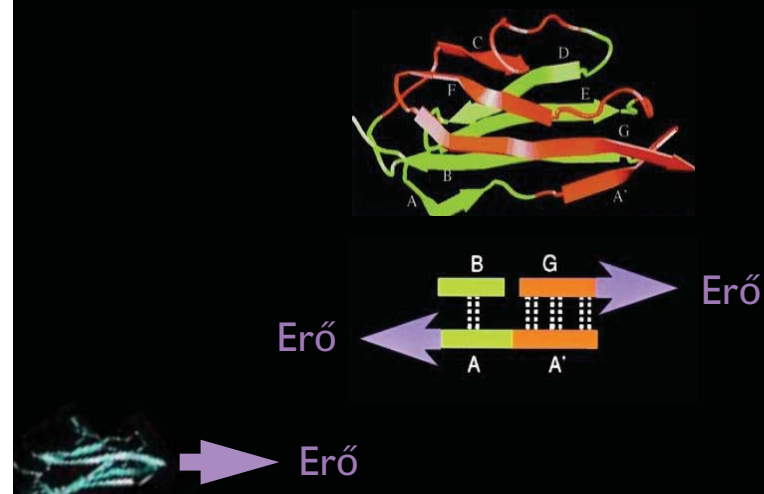
# Titin PEVK: hangolható rugó



# Titin I55-62: viszkoelasztikus elem



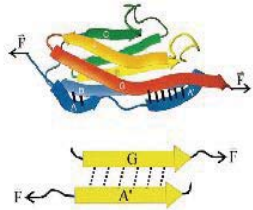
# A titin doméneket párhuzamosan csatolt H-hidak stabilizálják



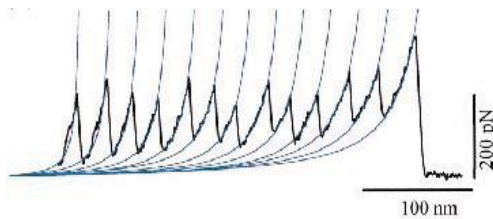


# A mechanikai stabilitás biológiai logikája

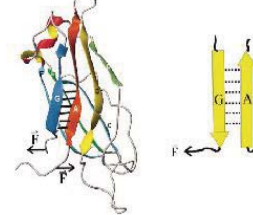
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása



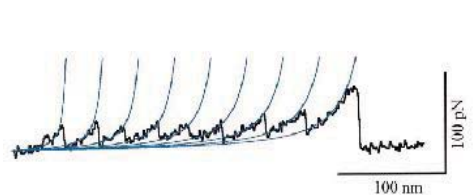
Nagy kiterjedési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

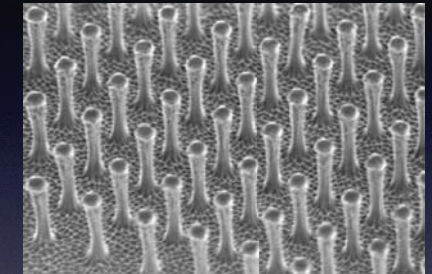


Alacsony kiterjedési erő



# Makroszkópikus mechanikai stabilitás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



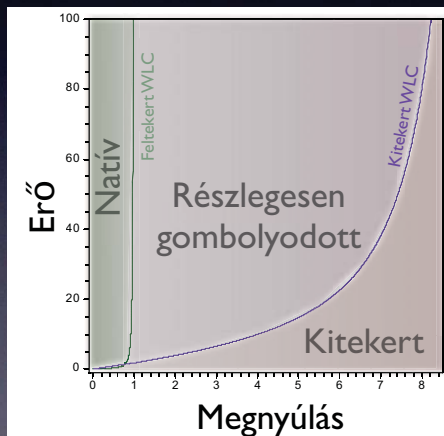
Mesterséges gecko talp  
Nanotechnológiával készítve



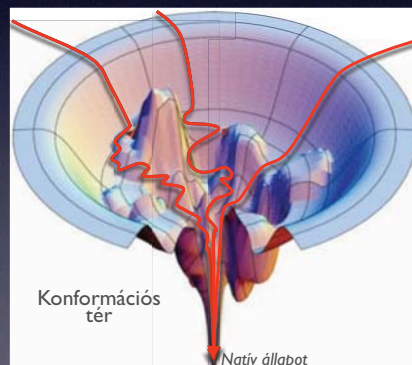
Gecko talp felületi tapadása:  
Párhuzamosan csatolt Van der Waals kötések a serték és a felület között

# A megnyújtott titin bejárja a gombolyodási fázisteret

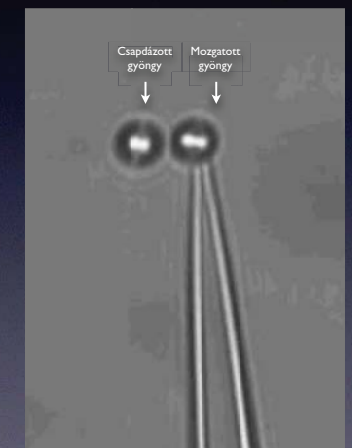
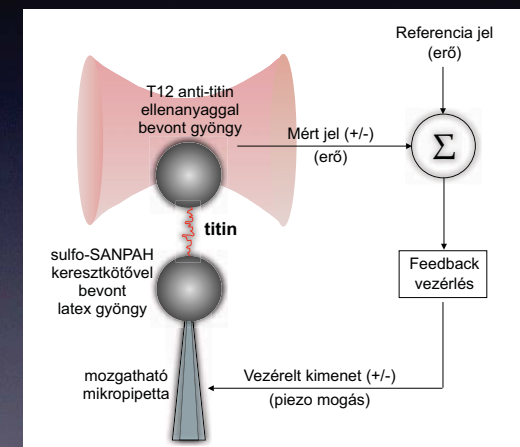
Vajon milyen útvonalon?



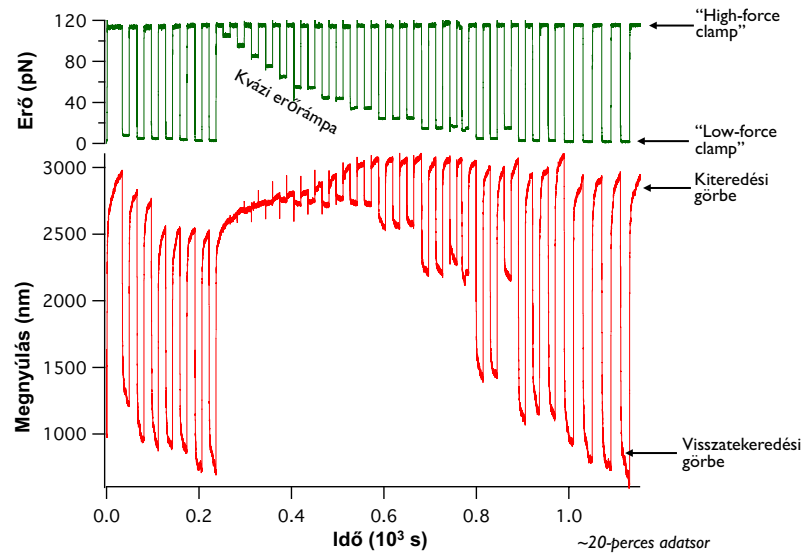
Spontán gombolyodási folyamat:  
Diffúzió az energiaprofilon?



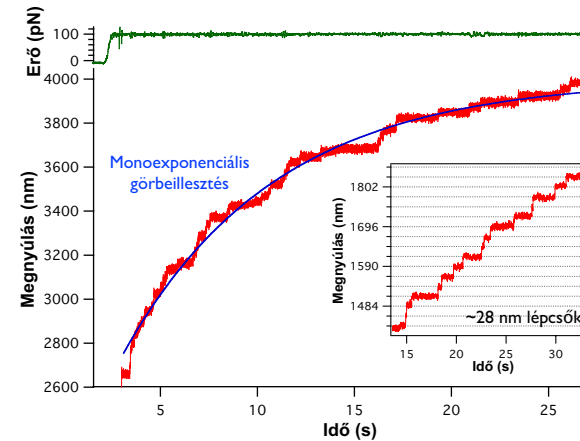
# Titin nanomanipulálás erővisszacsatolt lézercsipesszel



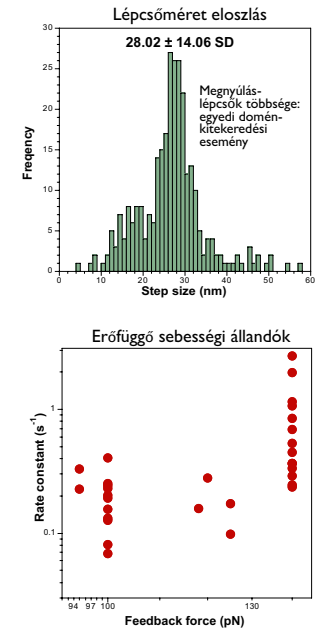
# Konstans-erő kísérlet egyetlen titinmolekulán



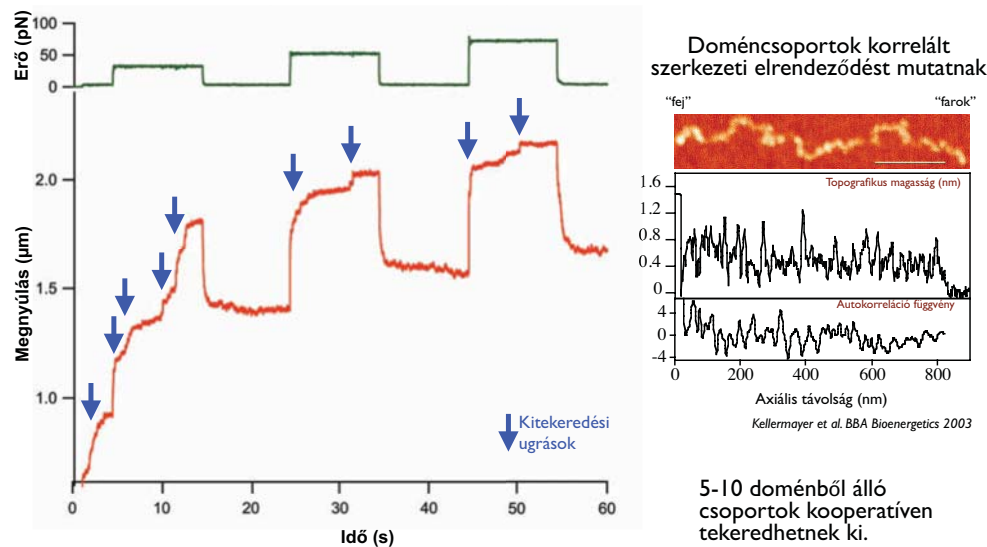
# Titin kitekeredés konstans erőnél



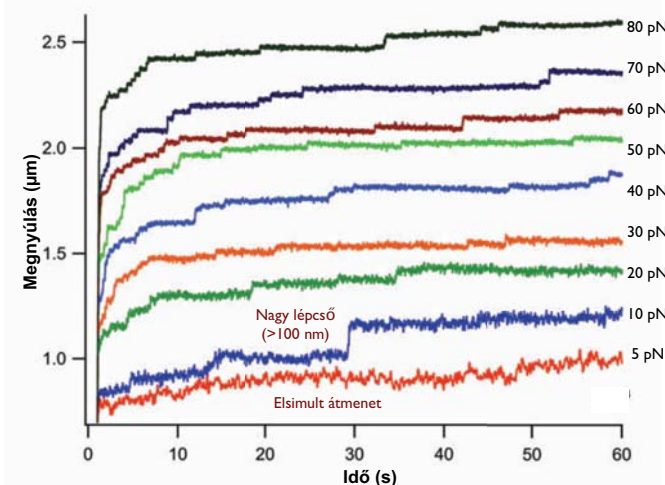
A várttól eltérések mutatkoznak a lépcsőméret eloszlásban, a monoexponenciális idő-megnyúlás görbe lefutásában és az erőfüggő sebességi állandó összefüggésben.



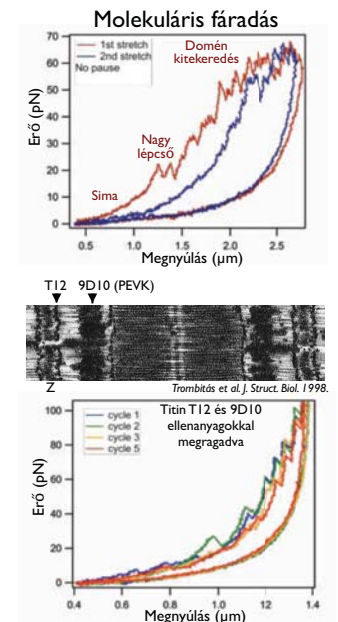
# Doménkitekeredés hirtelen ugrásokban



# Szerkezeti átmenetek alacsony erőnél

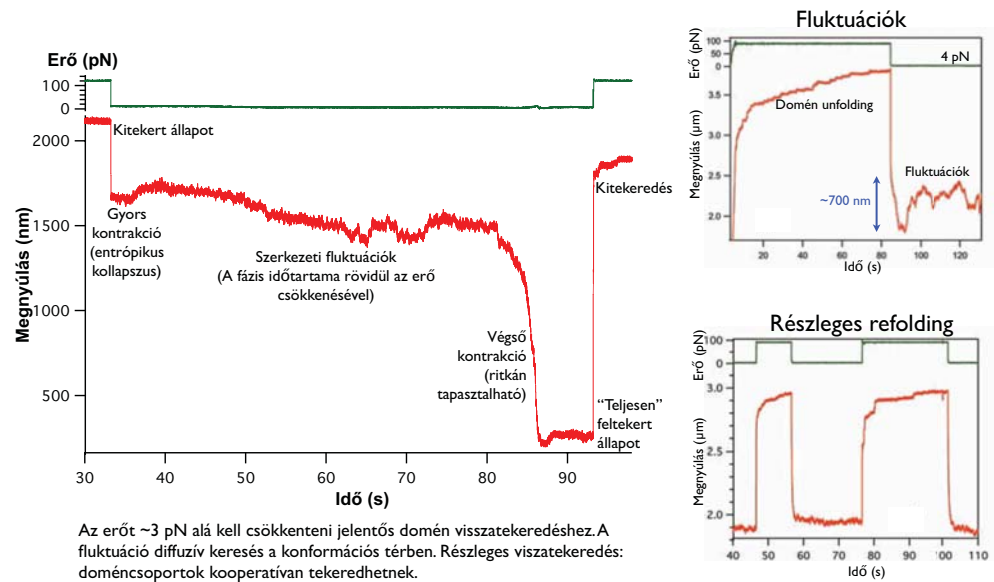


Az elsimult és nagy, lépcsőszerű átmeneteket a PEVK doménben kialakuló rövid- és hosszútávú elektrosztatikus kölcsönhatások okozhatják, amelyek a mechanikai fáradás alapjául szolgálnak.





# Titin gombolyodás konstans erőnél



# A visszatekeredési útvonal változatos még egyetlen molekula esetén is

