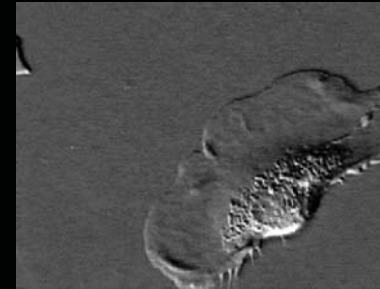


EGYEDI MOLEKULA VIZSGÁLATOK

KELLERMAYER MIKLÓS

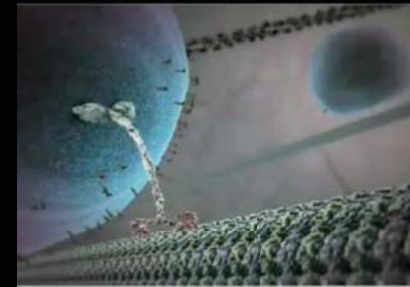
Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



Tovakúszó keratinocita



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transzport kinezzel



Fehérjeszintézis riboszómán

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

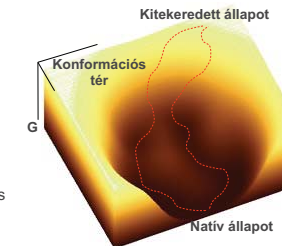
Egyedi molekula vizsgálatok

- 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?

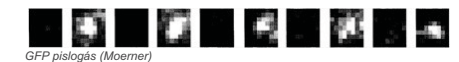
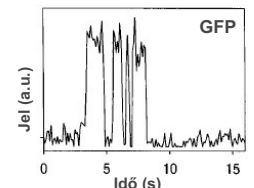
1. Térbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

párhuzamos útvonalakon haladó folyamatok, pl. fehérjegombolyódás



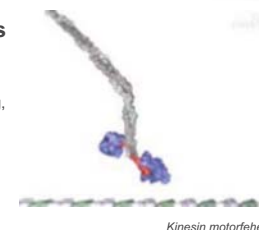
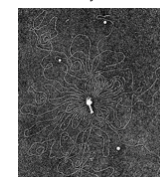
2. Időbeli kiátlagolódás kiküszöbölődik

Sztokasztikus folyamatok, pl. fluorofor pislogás



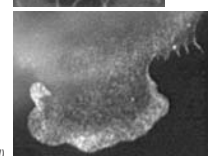
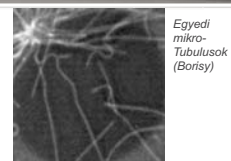
3. Biomolekuláris mechanika

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)

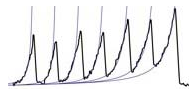
1998: Kinosita, F1F0 ATPase lépési kinetika

1998: J. Fernandez, genetikai polipeptid mechanika

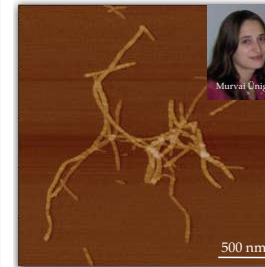
2001: J. Liphardt, C. Bustamante, RNS megnyújtása

2004: J. Fernandez, egyedi fehérjemolekula folding

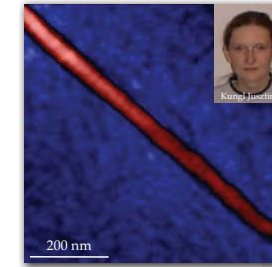
2008: Bustamante, Tinoco: riboszóma mechanika



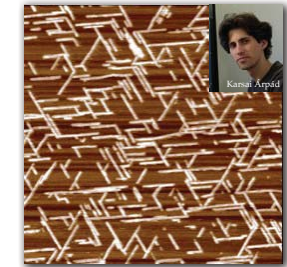
Vizsgálható paraméterek: topográfia



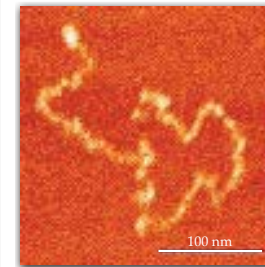
Amyloid β 1-42



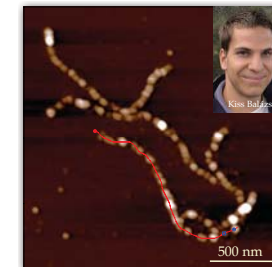
Fibrin protofibrillum



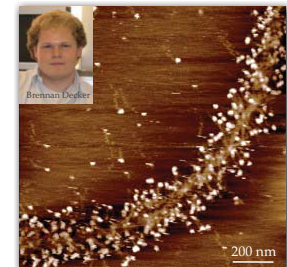
Amyloid β 25-35



Titinmolekula

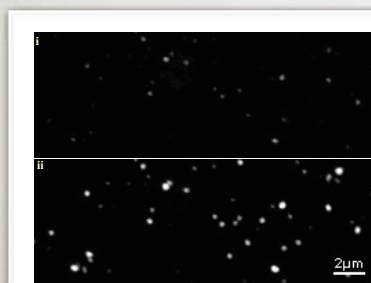
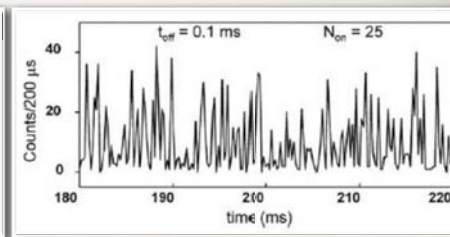
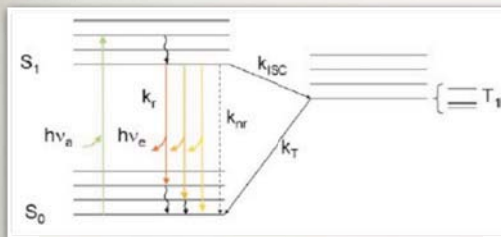


Dezmin filamentum

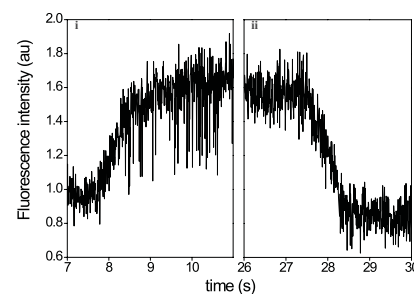


Miozin vastag filamentum

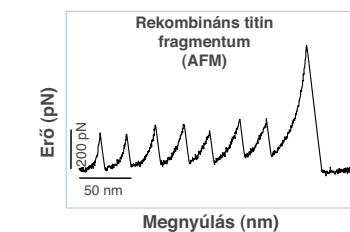
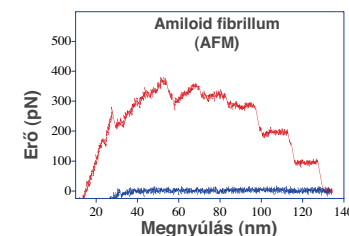
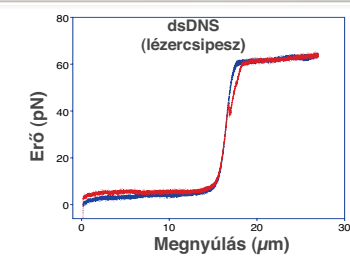
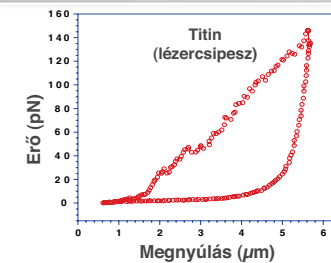
Vizsgálható paraméterek: Fluoreszcencia



TRITC-jelölt titinmolekulák



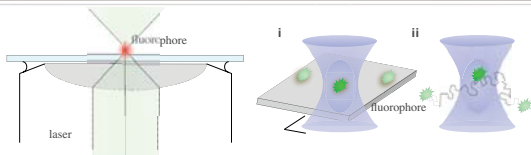
Vizsgálható paraméterek: erő



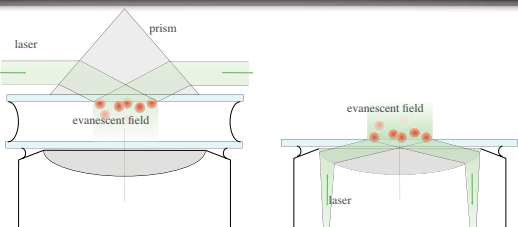
RUGALMASSÁG + SZERKEZETI VÁLTOZÁS ("ÁTMENET")

Egyedi molekulák vizsgálata: fluoreszcencia technikák

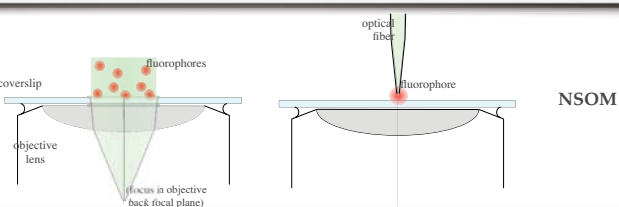
Konfokális
mikroszkópia



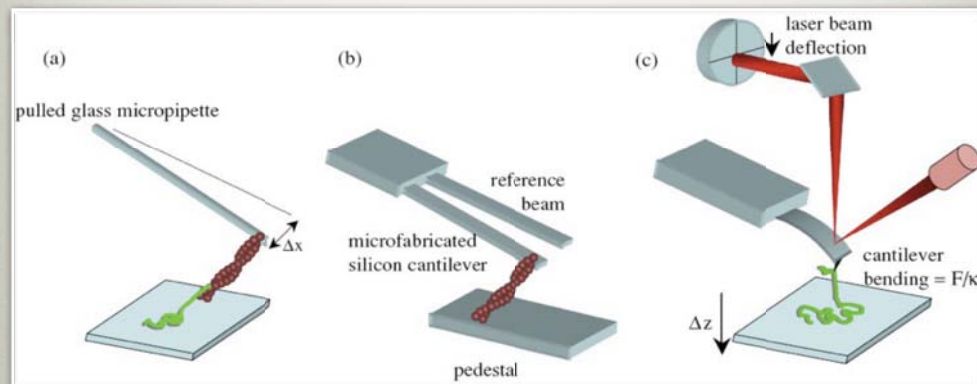
TIRF
mikroszkópia



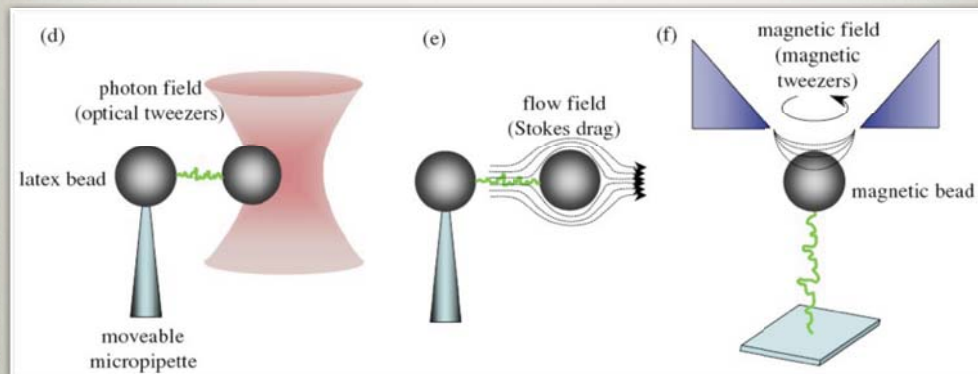
Epifluoreszcencia
mikroszkópia



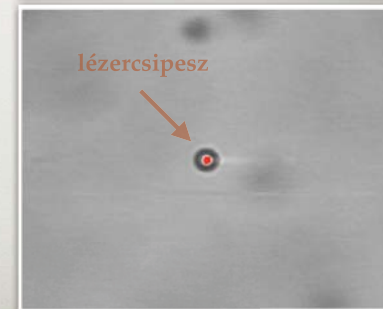
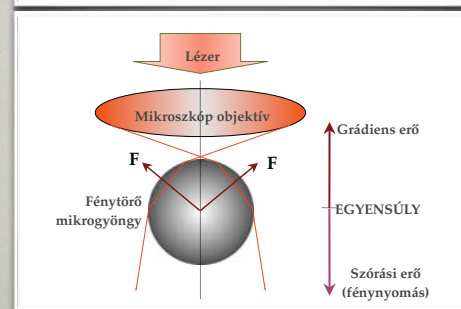
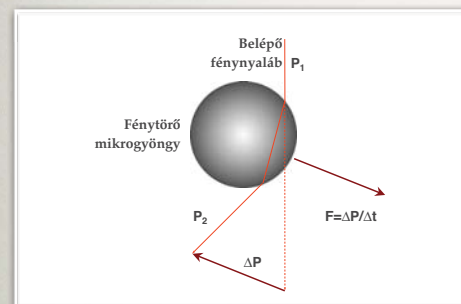
Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció rugólapka technikákkal



Egyedi molekulák vizsgálata: manipuláció mező alapú technikákkal

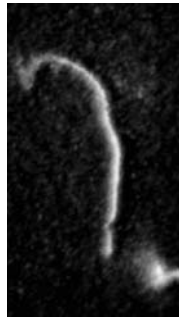


A lézercsipesz

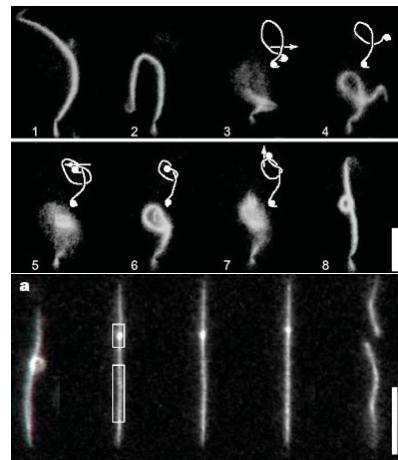


Csomókötés egyetlen aktin filamentumra lézercsipessel

Aktin filamentum
manipuláció



Arai et al. Nature 399, 446, 1999.

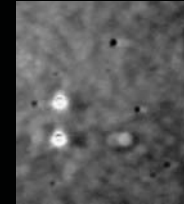


Csomókötés egyetlen DNS láncra

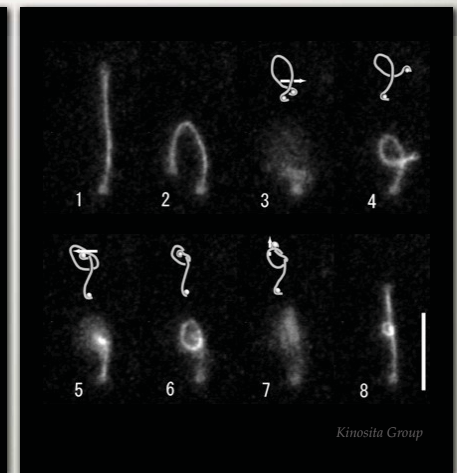
mikrogyöngy mozgatható
lézercsipeszben

Fáziskontraszt kép

Fluoreszcencia kép



mikrogyöngy stacionárius
lézercsipeszben



Kinosita Group

Molekuláris fogantyúk problémája

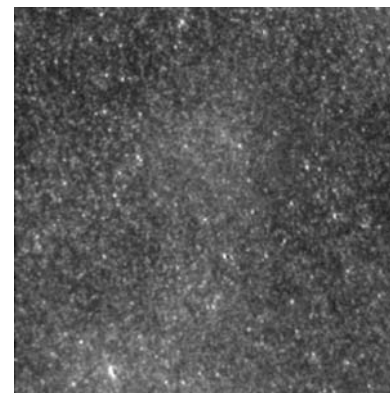
mikrogyöngy $\sim 1 \mu\text{m}$



molekula $\sim 10 \text{ nm}$

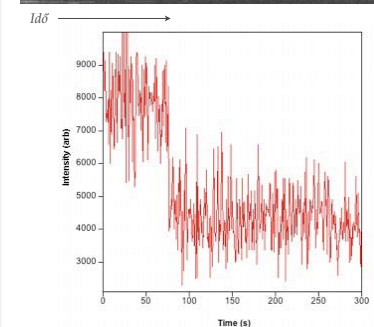
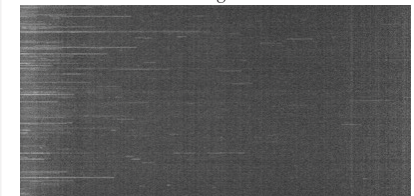
Molekuláris szingularitás: egylépcsős photobleaching

TIRFM

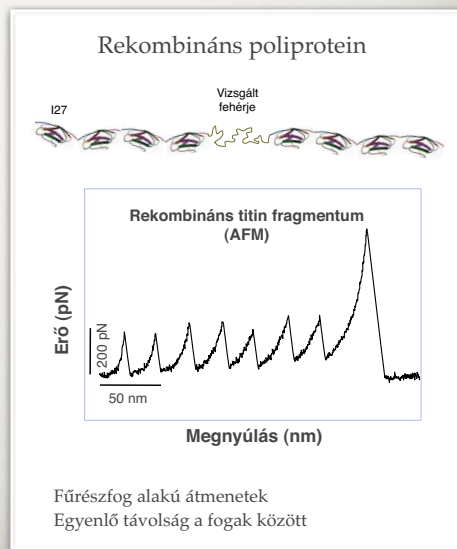
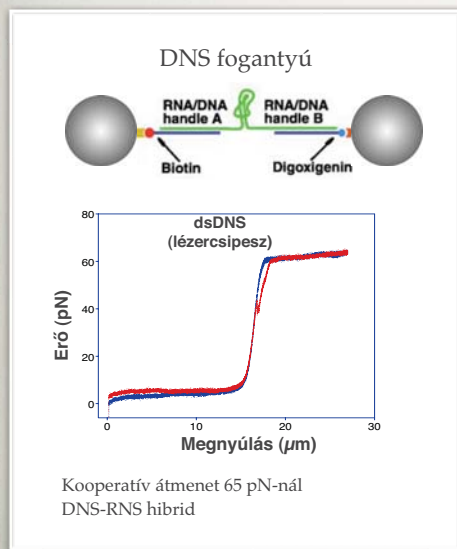


Alexa-488-PGK

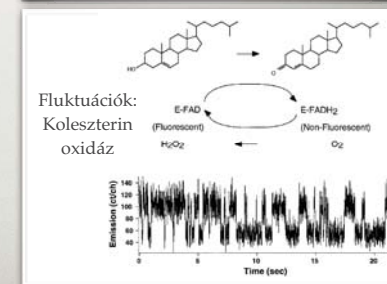
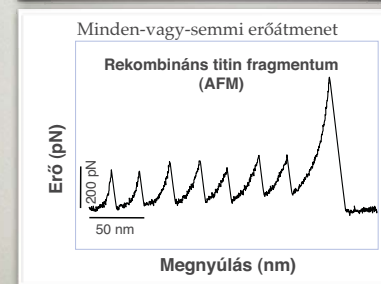
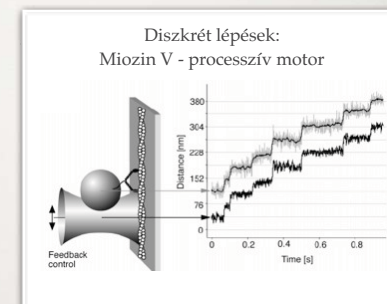
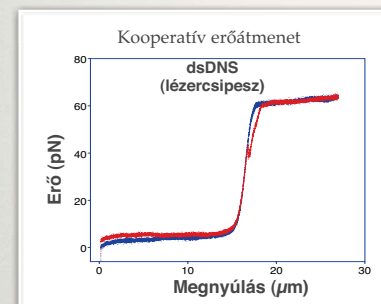
Kimogram



Molekuláris szingularitás: nanomechanikai ujjlenyomat



Folyamatok az egyedi molekula skálán

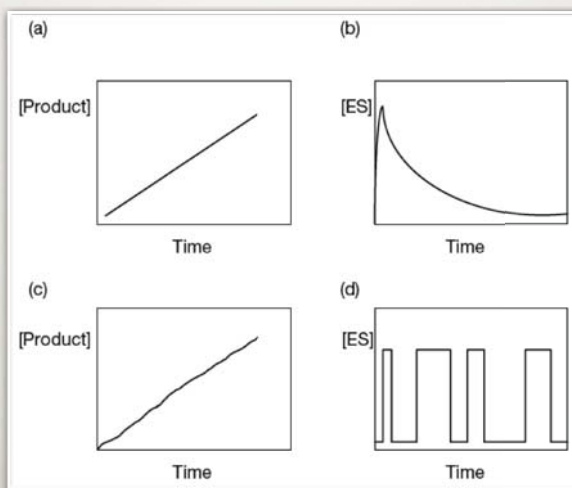


“Bulk versus single”

Többszörös turnover

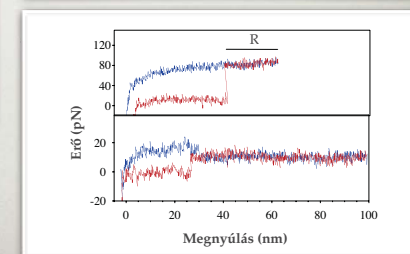
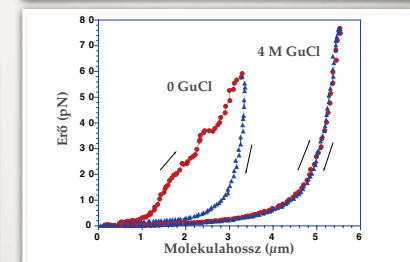
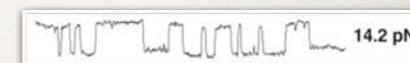
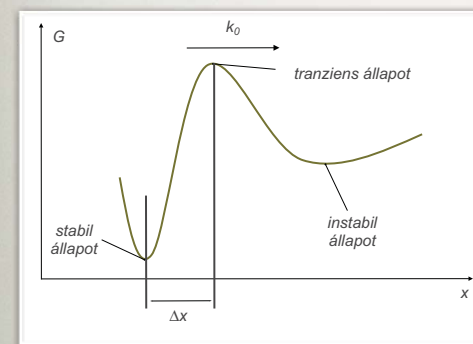
Egy (egyedi) turnover

BULK

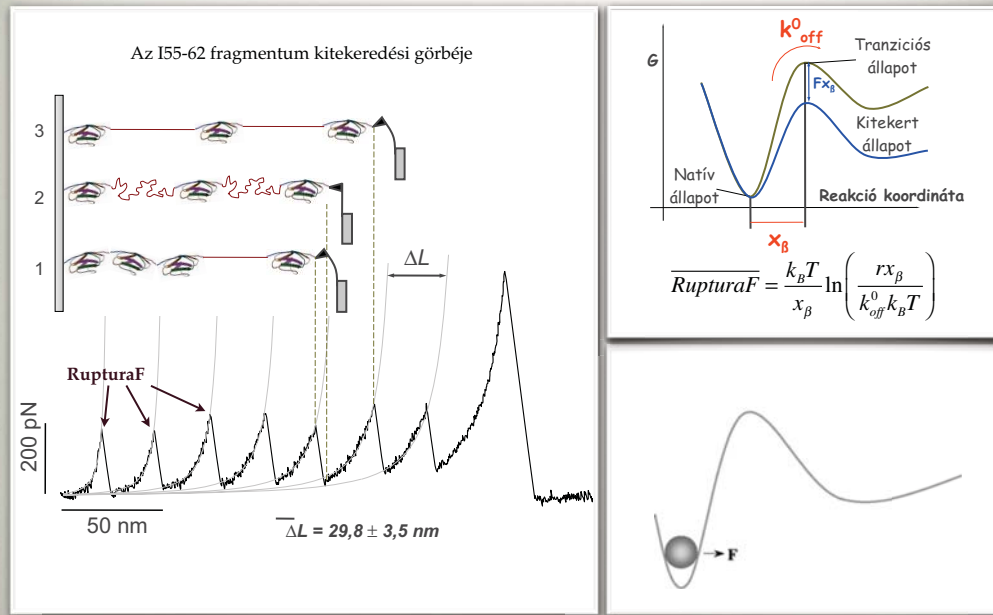


SINGLE

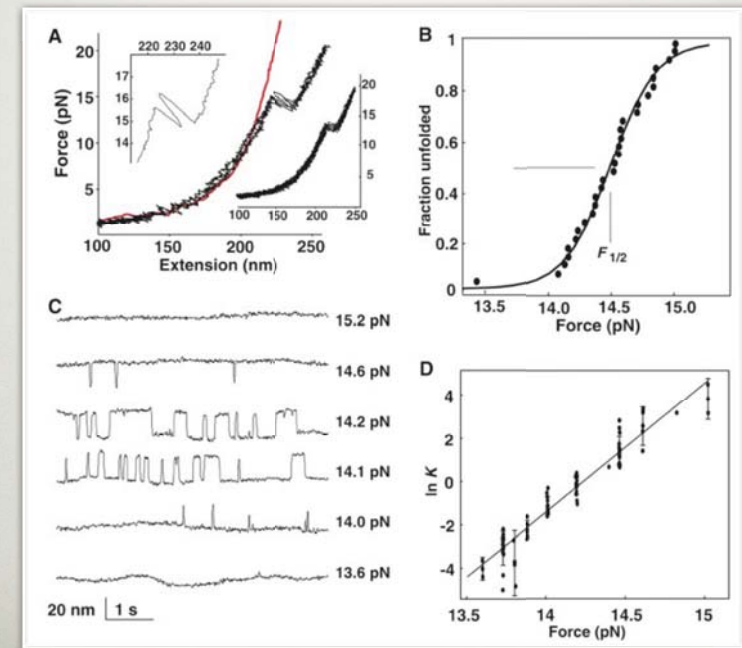
Aktiváció, sebesség, reverzibilitás



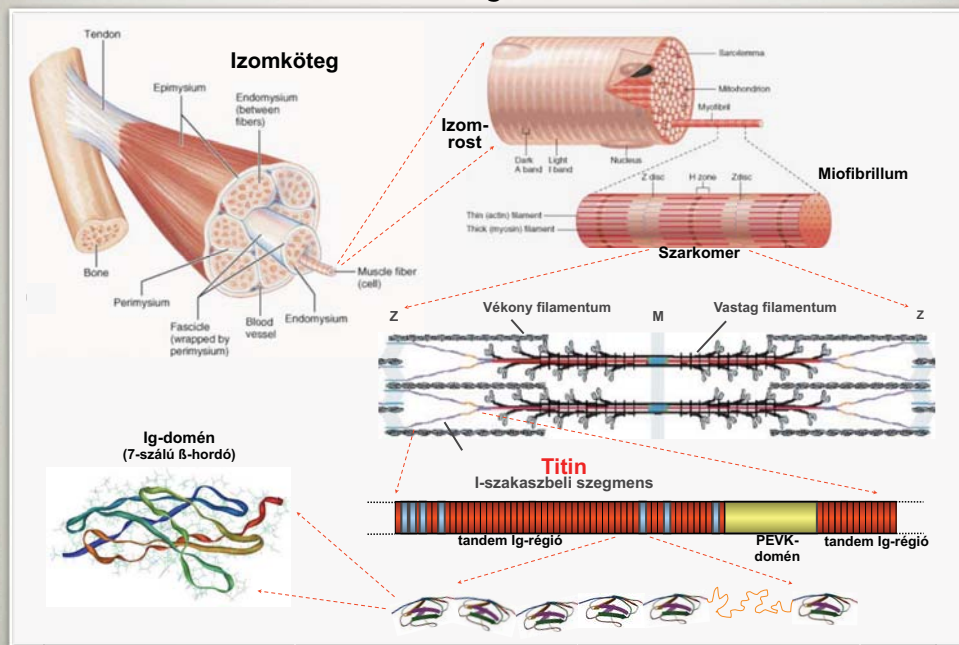
Erő hatása az aktivációra: titin irreverzibilis kitekerése



Erő hatása az aktivációra: RNS hajtú egyensúlyi kitekerése

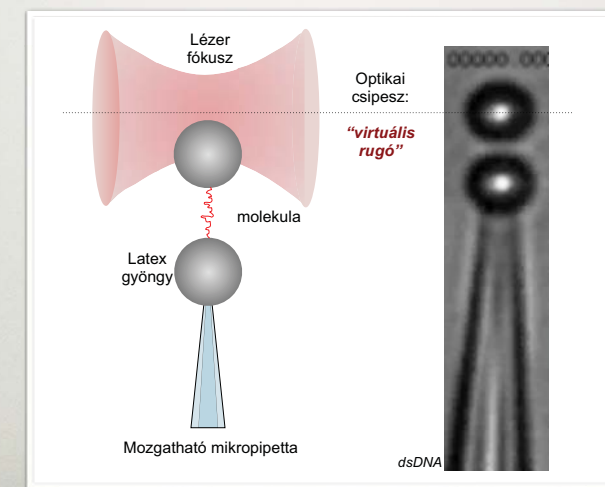


Példa: fehérjetekeredés



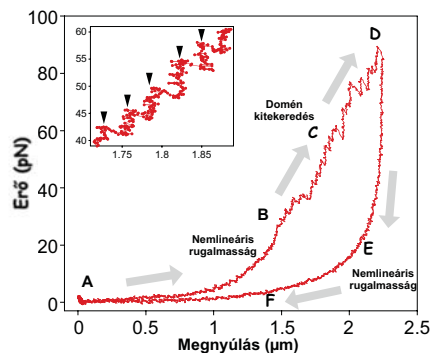
EGYETLEN MOLEKULA MEGNYÚJTÁSA LÉZERCSIPESSZEL

Molekuláris erők mérhetők a lézercsipesz **virtuális rugó** tulajdonságai miatt



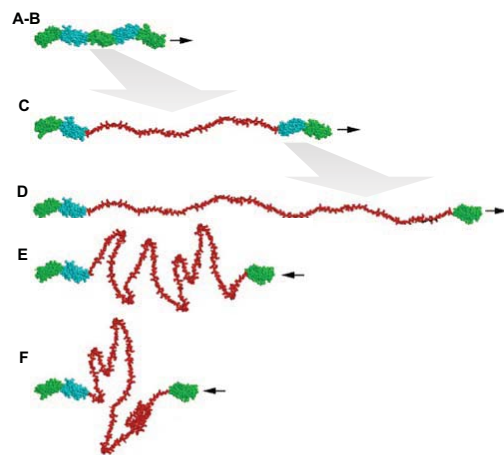
Natív titin nanomechanikája

Erőválasz

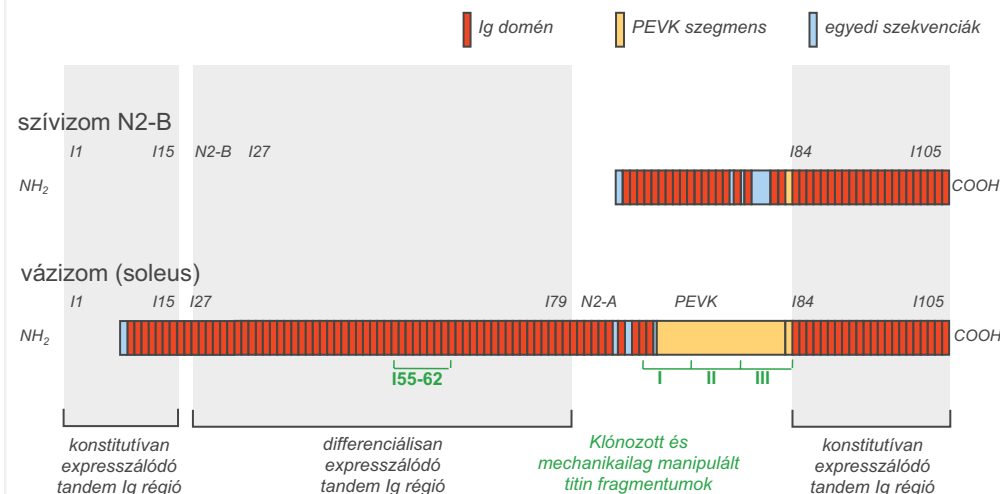


A mechanikai erő stabilizációs sorrendbe szervezi a titin doménjeit.

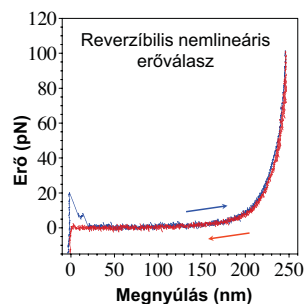
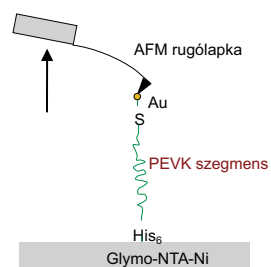
Erővezérelt szerkezeti változások



Titin doménszerkezet

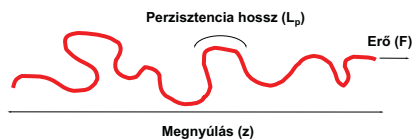


PEVK domén: elasztikus molekulaszakasz

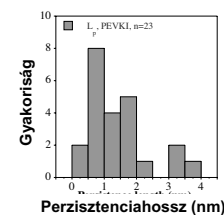


Féregszerű lánc (Wormlike chain) model

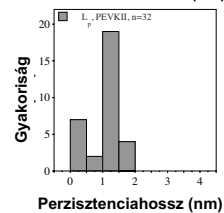
$$\frac{FL_p}{k_B T} = \frac{z}{L_c} + \frac{1}{4(1 - z/L_c)^2} - \frac{1}{4}$$



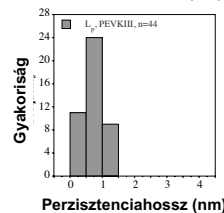
A PEVK domén elektrosztatikusan hangolható molekula-teleszkóp



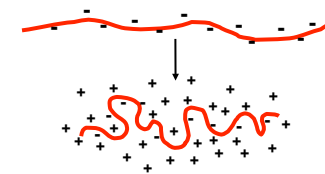
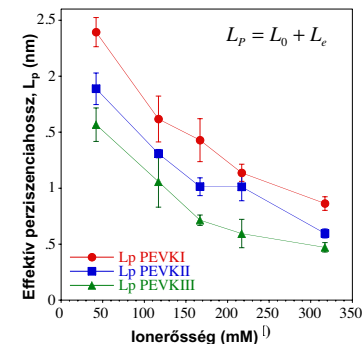
N-terminális szegmens



Középső szegmens

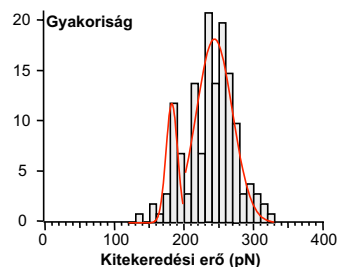
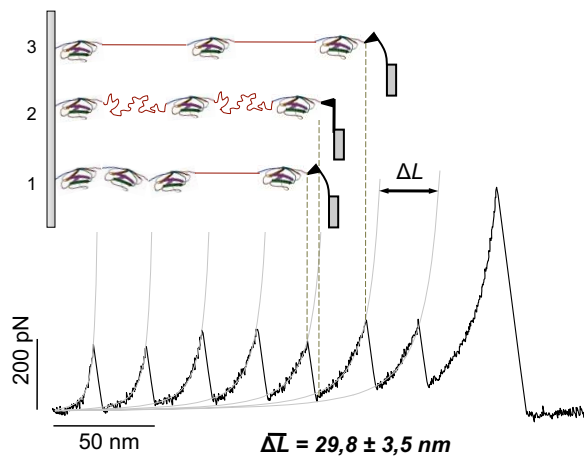


C-terminális szegmens



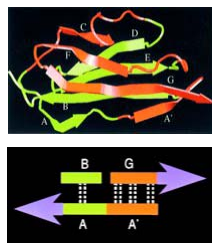
Titin I55-62: viszkoelasztikus molekulaszakasz

Az I55-62 fragmentum kitekeredési görbéje



Mechanikai stabilitás alapja:

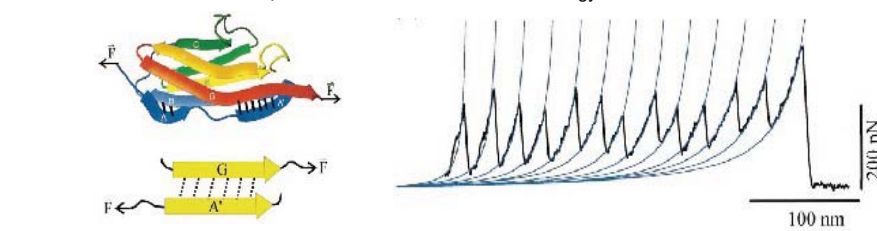
Az Ig domén első és utolsó β -láncait összetartó, párhuzamosan csatolt H-hidak



A mechanikai stabilitás biológiai logikája

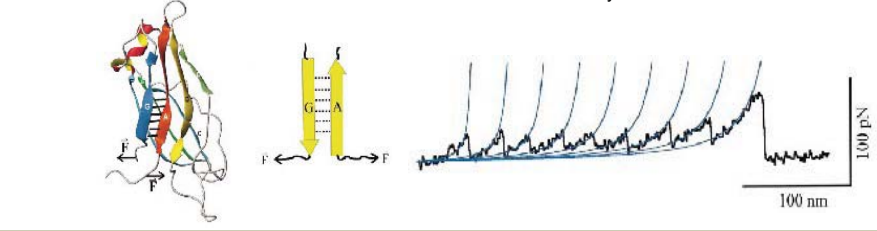
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kitekeredési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

Alacsony kitekeredési erő



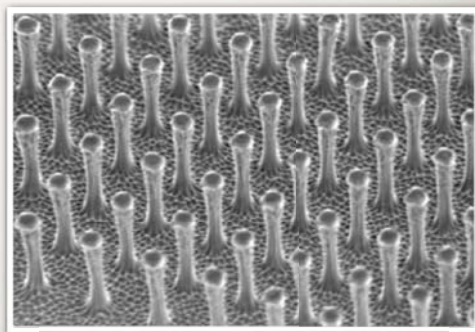
Nanotechnológiai alkalmazás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



Gecko talp tapadása:

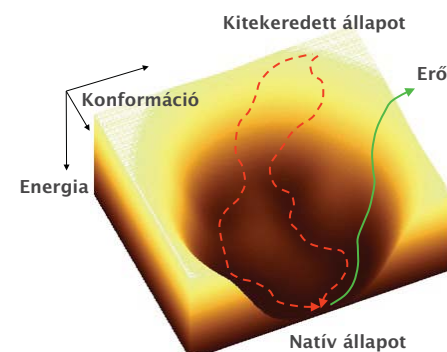
Párhuzamosan csatolt Van der Waals kötések a serték és a felület között



Mesterséges gecko talp

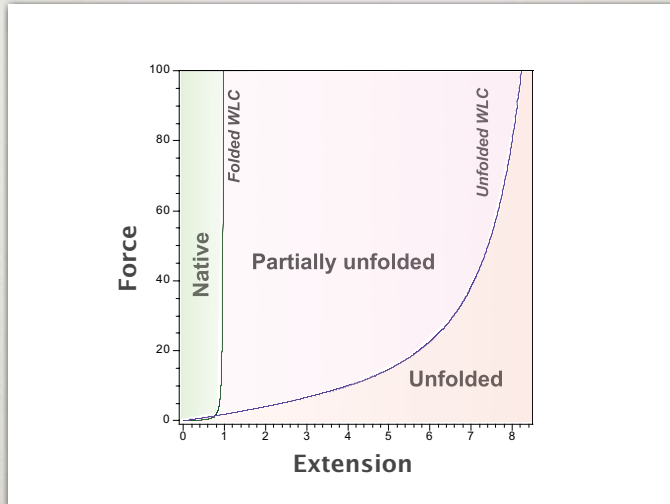
A FEHÉRJEGOMBOLYODÁS FÁZISTERÉNEK VIZSGÁLATA EGYEDI MOLEKULA MÓDSZERREL

Fehérje folding fázistér

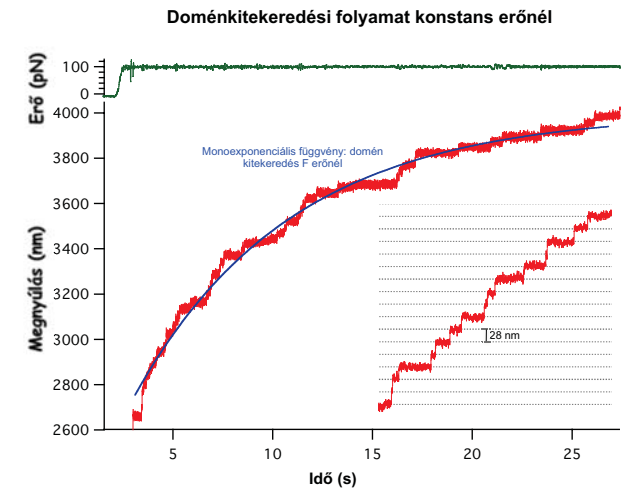
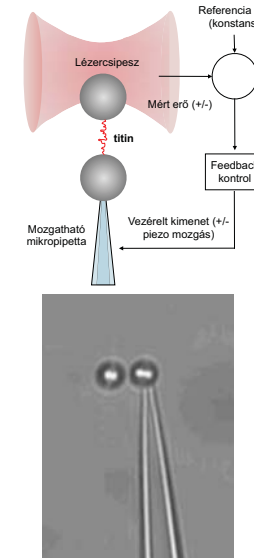


Mechanikai erő segítségével a konformációs tér kevésbé betöltött részei is vizsgálhatók.

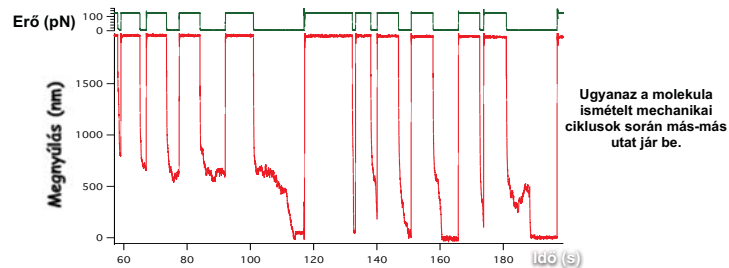
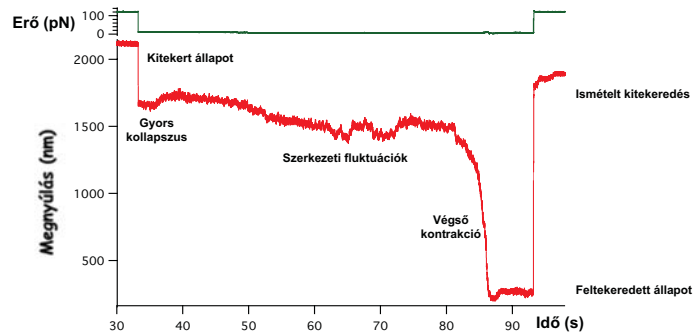
A TITIN GOMBOLYODÁSI FÁZISTERE



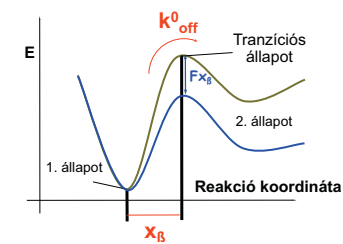
Titin nanomechanika erővisszacsatolt lézercsipessel



Titin feltekeredés konstans erőnél

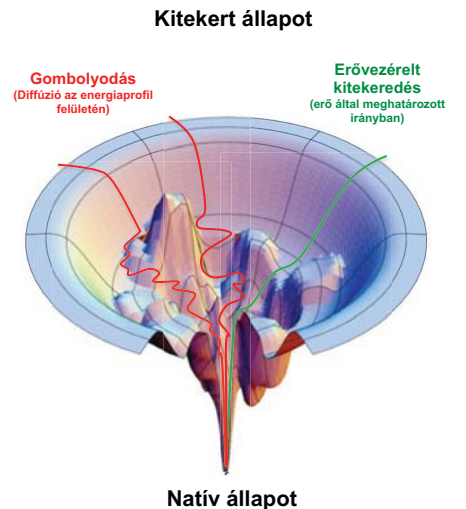
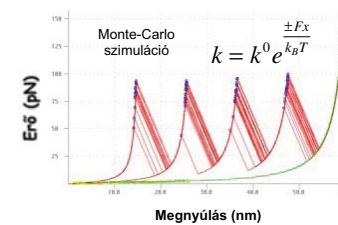


Biomolekuláris folyamatok mechanikai erőterben

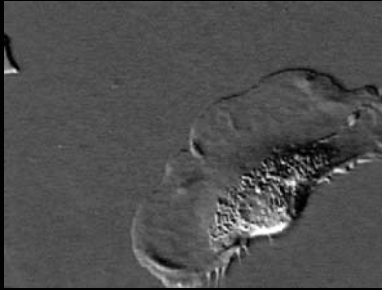


A pillanatnyi erő (F) a vezérelt folyamat (k_{off}) illetve terhelés (r) sebességeinek arányától és az energiaprofil alakjától (x_B) függ:

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



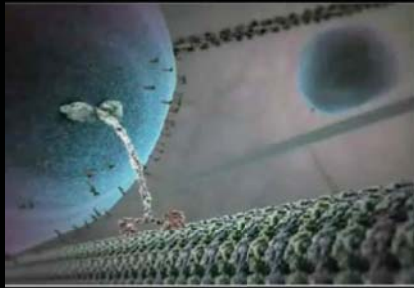
Élő sejtben: molekulagépezetek sokasága



Tovakúszó keratinocita



Mikrotubulus dinamikus instabilitás



Vezikulum transzport kinezinnel



Fehérjeszintézis riboszómán

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