

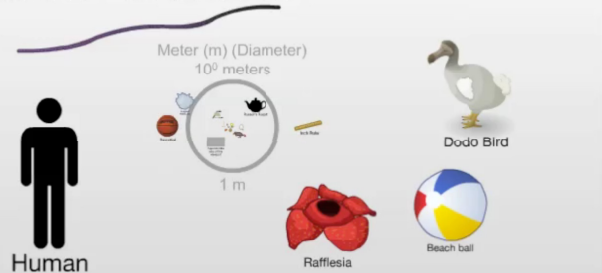
EGYEDI MOLEKULA VIZSGÁLATOK

KELLERMAYER MIKLÓS

Egyedi molekula vizsgálatok

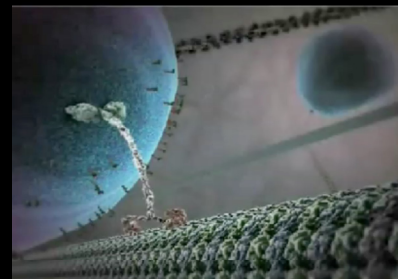
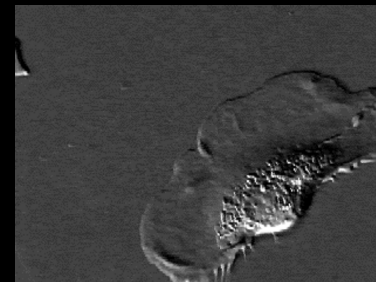
- Miért vizsgáljunk egyedi molekulákat?
- Az egyedi molekula tudomány rövid története
- Vizsgálható paraméterek (topográfia, fluoreszcencia, erő)
- Egyedi molekulák vizsgálati technikái (fluoreszcencia, mechanika, molekuláris fogantyúk problémája)
- A molekuláris szingularitás (egylépcsős bleaching, erőgörbe)
- Folyamatok az egyedi molekula skálán (fluktuációk, átmenetek)
- Szabadentalpia, aktivációs energia, reakciósebesség, reverzibilitás
- Mechanikai erő hatása az aktivációs kinetikára; mechanokémia
- Példák (fehérjeterjedés, RNS tekeredés, thioredoxin, motorfehérjék)

Giant Earthworm



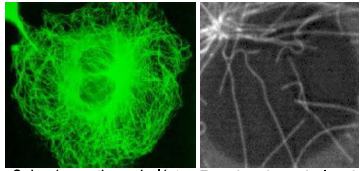
Copyright © 2004 Huang (http://www.huang.net)

Élő sejtben: nanoskálájú gépezetek sokasága



Molekulák - miért egyenként?

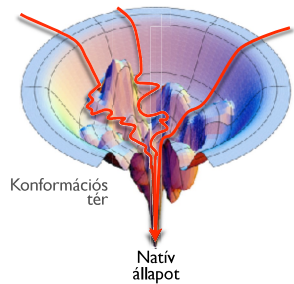
1. Egyéneket (tér- és időbeli trajektóriák) azonosíthatunk sokaságban



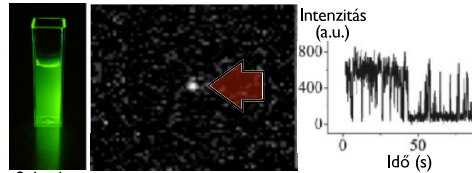
Sokaság - mikrotubuláris rendszer
Egyedi mikrotubulusok - treadmilling

3. Párhuzamos útvonalakon zajló folyamatokat azonosíthatunk

Kigombolyodott állapot

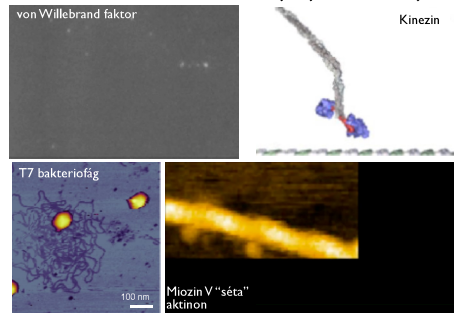


2. Sztochasztikus folyamatokat ismerhetünk meg



Sokaság - intenzitás
Egyedi kvantumpont - pislogás ("blinking")

4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük



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)

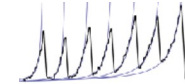
1998: Kinosita, F1F0 ATPase lépési kinetika

1998: J. Fernandez, genetikai poliprotein mechanika

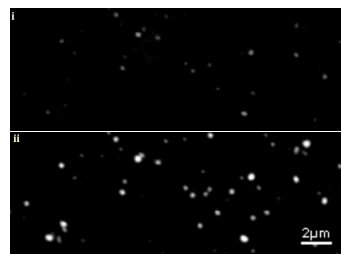
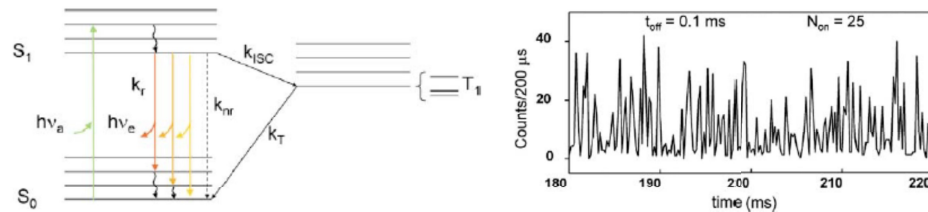
2001: J. Liphardt, C. Bustamante, RNS megnyújtása

2004: J. Fernandez, egyedi fehérjemolekula folding

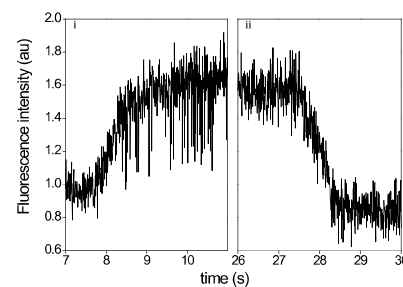
2008: Bustamante, Tinoco: riboszóma mechanika



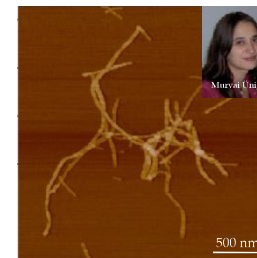
Vizsgálható paraméterek: Fluoreszcencia



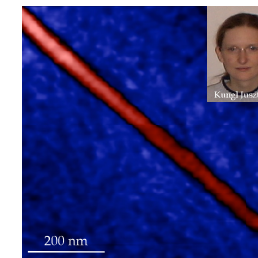
TRITC-jelölt titinmolekulák



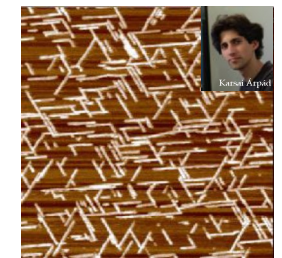
Vizsgálható paraméterek: topográfia



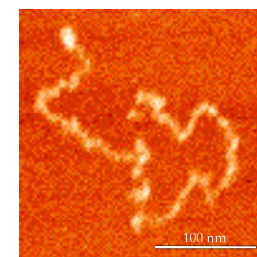
Amyloid β 1-42



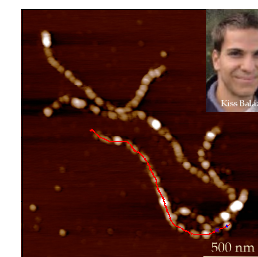
Fibrin protofibrillum



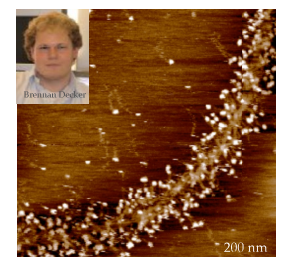
Amyloid β 25-35



Titinmolekula

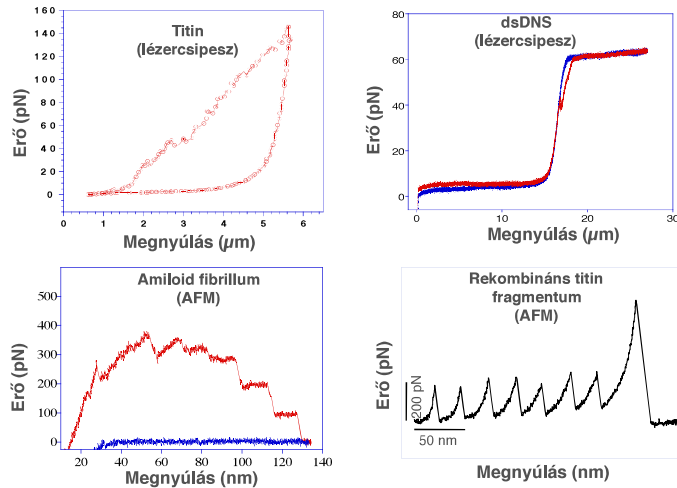


Desmin filamentum



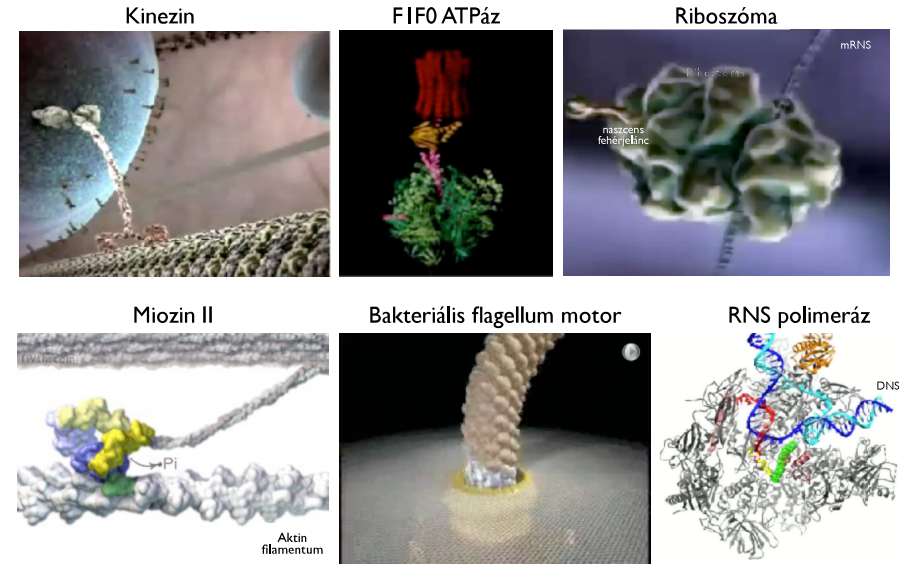
Miozin vastag filamentum

Vizsgálható paraméterek: erő



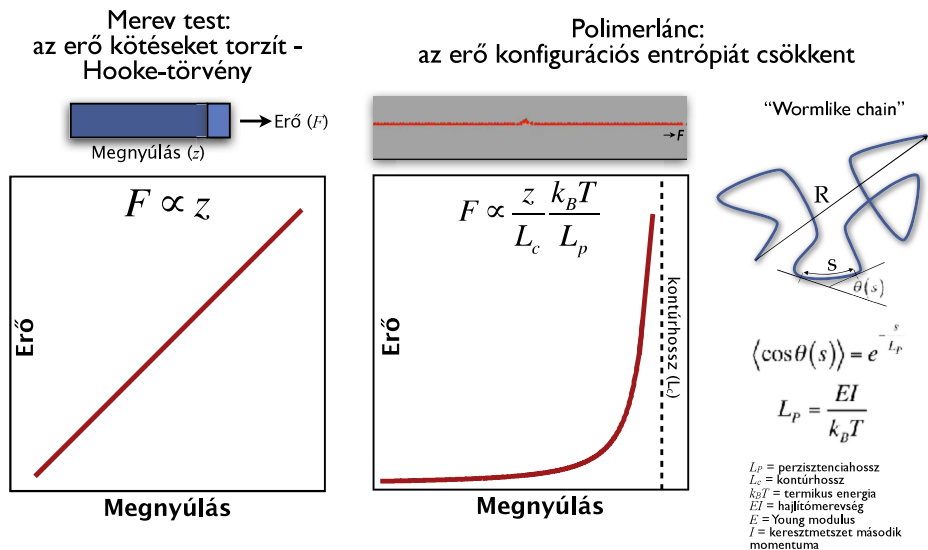
RUGALMASSÁG + SZERKEZETI VÁLTOZÁS ("ÁTMENET")

I. Erő: kifejlődik



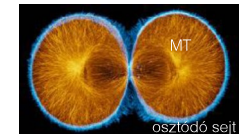
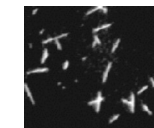
2. Erő: deformálja a szerkezetet

A polimerlánc lánc alakja és rugalmassága között összefüggés van



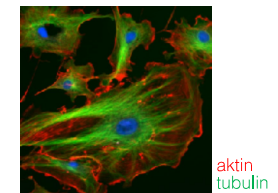
Merev lánc
 $L_p \gg L_c$
(mm \gg 10 μm)

Mikrotubulus



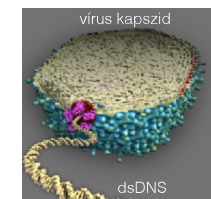
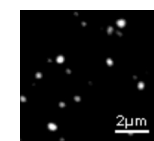
Szemiflexibilis lánc
 $L_p \approx L_c$
(μm \approx μm)

Mikrofilamentum (aktin)



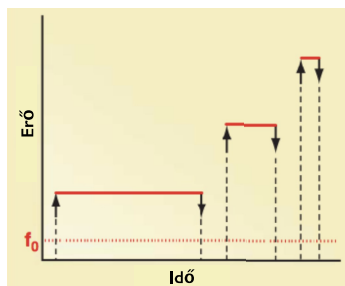
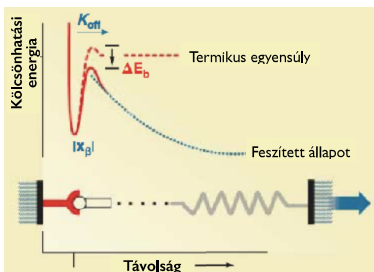
Flexibilis lánc
 $L_p \ll L_c$
(50 nm \ll cm)

DNS



L_p = perzisztenciahossz
 L_c = kontúrhossz

3. Erő: befolyásolja a reakciósebességet



Evans F. Evans and David A. Calderwood Science 316, 1148 (2007)

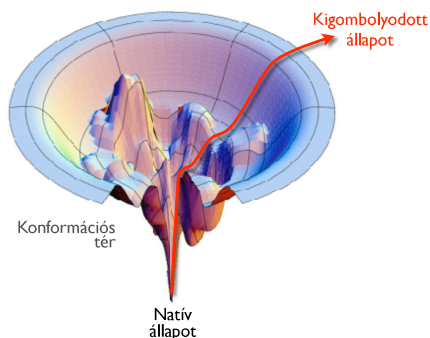
Termikus aktiváció: $\tau(0) = \omega e^{\frac{E_a}{k_B T}}$

Mechanikai terhelés: $\tau(F) = \omega e^{\frac{F_0 - F \Delta x}{k_B T}} = \tau(0) e^{\frac{F \Delta x}{k_B T}}$

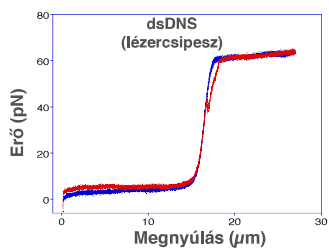
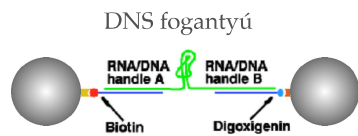
ω = karakterisztikus idő

E_a = aktivációs energia

Δx = távolság a kötött és tranzíciós állapotok között

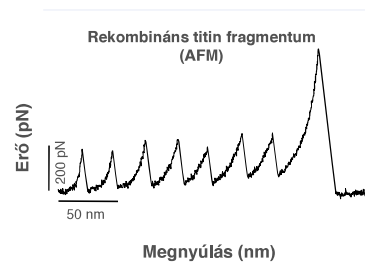


Molekuláris szingularitás: nanomechanikai ujjlenyomat



Kooperatív átmenet 65 pN-nál
DNS-RNS hibrid

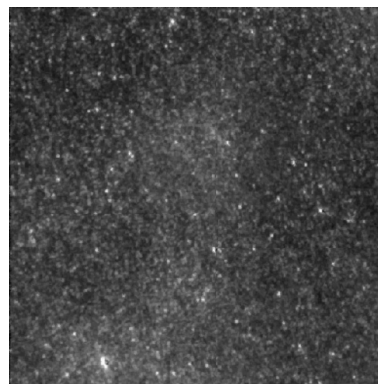
Rekombináns poliprotein



Fűrészfog alakú átmenetek
Egyenlő távolság a fogak között

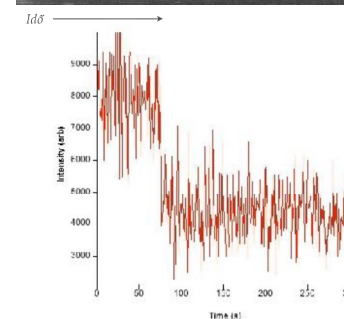
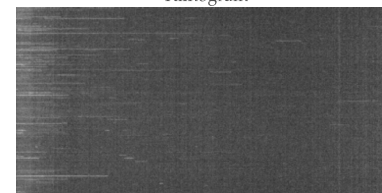
Molekuláris szingularitás: egylépcsős photobleaching

TIRFM



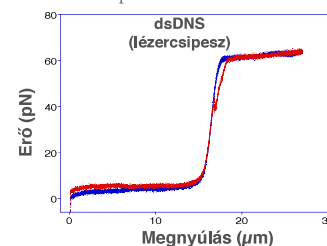
Alexa-488-PGK

Kimogram



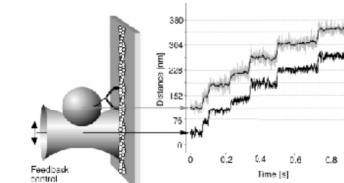
Folyamatok az egyedi molekula skálán

Kooperatív erőátmenet

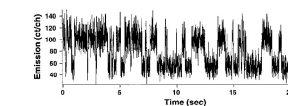
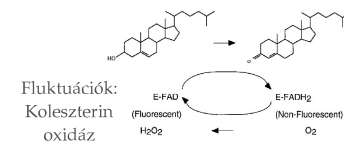
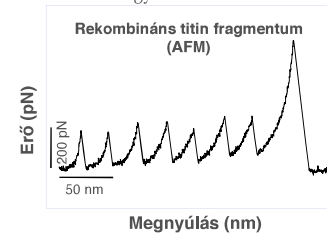


Diszkrét lépések:

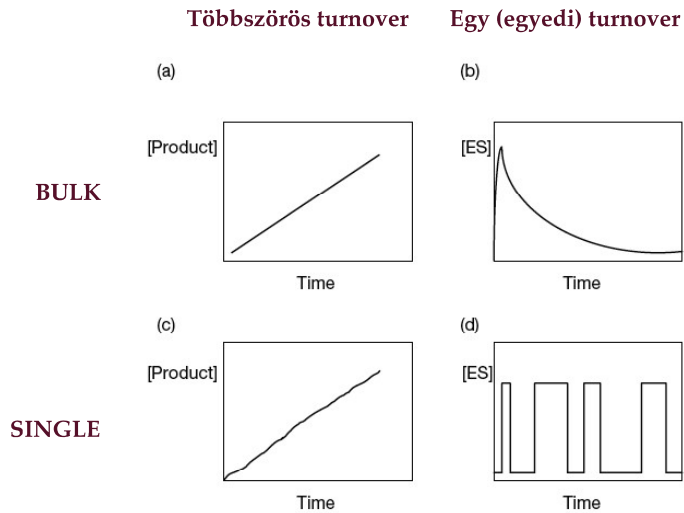
Miozin V - processzív motor



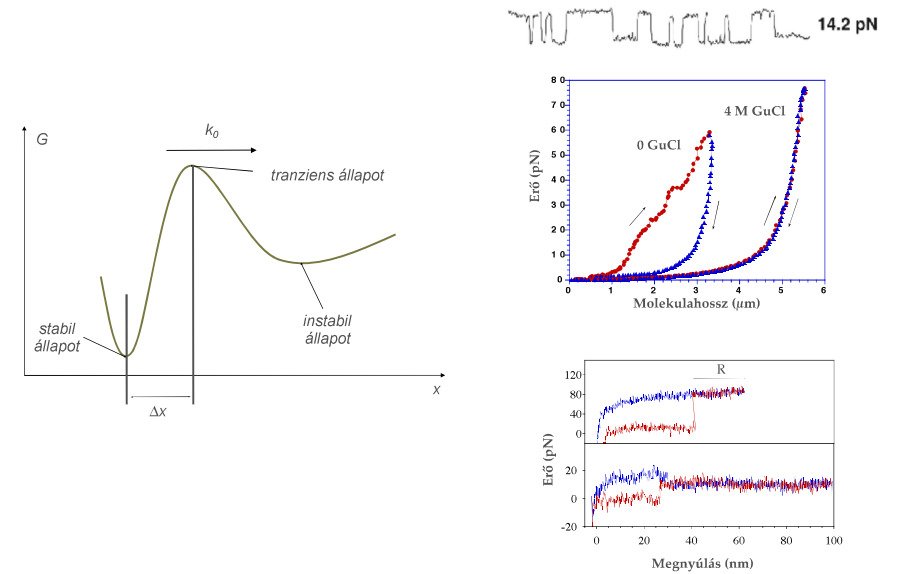
Minden-vagy-semmi erőátmenet



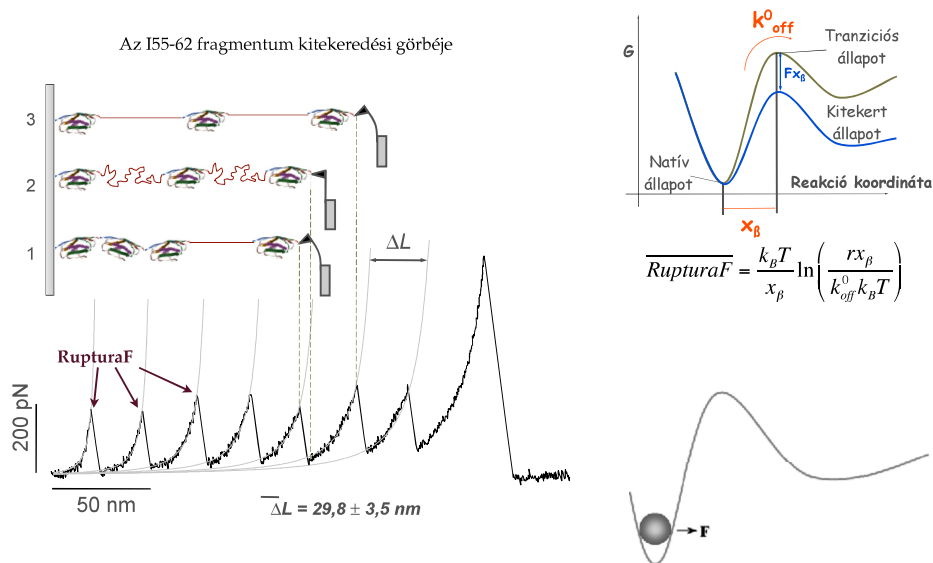
“Bulk versus single”



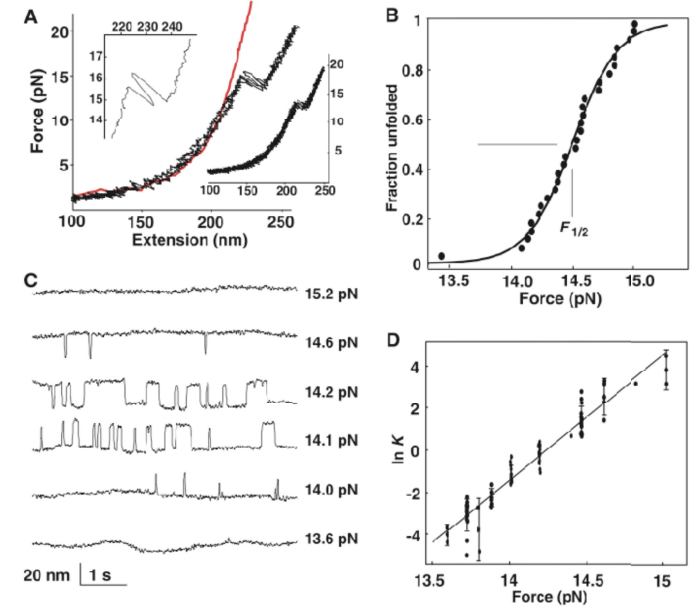
Aktiváció, sebesség, reverzibilitás



Erő hatása az aktivációra: titin irreverzibilis kitekerése

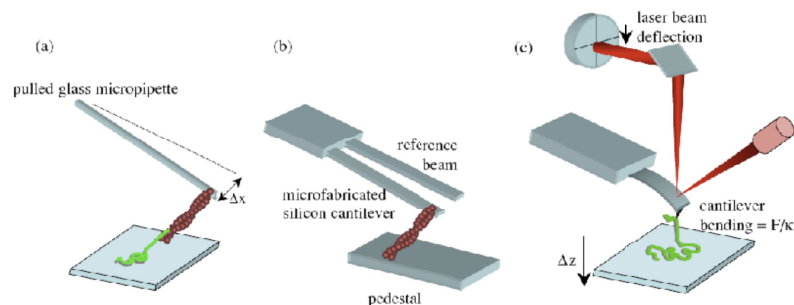


Erő hatása az aktivációra: RNS hajtú egyensúlyi kitekerése

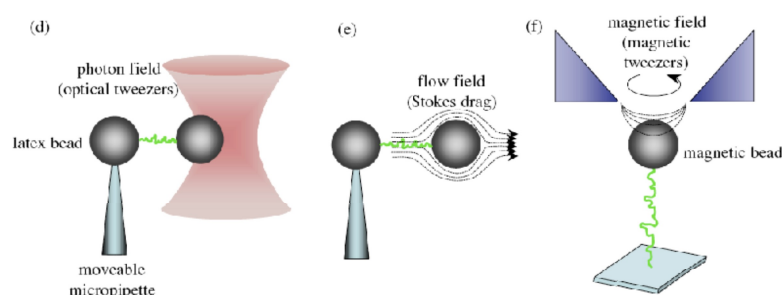


Nanomanipulációs módszerek

Laprugó módszerek:



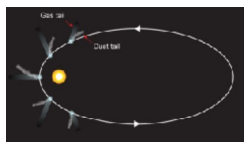
Mező alapú módszerek:



Kölcsönhatásai során a foton impulzusa megváltozik



Johannes Kepler (1571-1630)



Ustökös farka a nappal ellentétes irányba áll: a napfény mechanikai hatása

Einstein: tömeg-energia ekvivalencia
 $E = mc^2$

Planck: sugárzási törvény
 $E = hf$

Maxwell: fény terjedési sebessége
 $c = \lambda f$



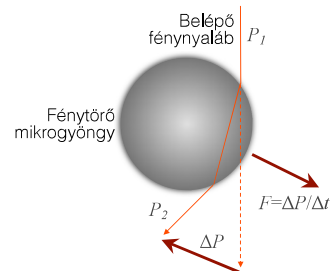
Louis-Victor-Pierre-Raymond, 7th duc de Broglie (1892-1987)

$$mc^2 = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

A foton impulzusa:

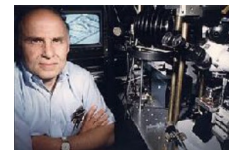
$$P = \frac{h}{\lambda}$$

A refrakció fénymomentum-változással (ΔP) jár:



Az optikai csipeszben a fotonok és a fénytörő részecske között impulzuscseré lép fel

A lézercsipesz fontosabb történeti állomásai



Arthur Ashkin



C. Bustamante



J. Molloy

1970: Arthur Ashkin: Lézercsipesz

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

1997: S. Chu, W.D. Phillips és C. Cohen-Tanoudji (Nobel-díj): lézeres atomhűtés.

1997: M. Keller, M. Rief, L. Tskhovrebova, titin megnyújtás (első fehérje)

2000: Galajda P., Ormos O., Mikrofabrikáció lézercsipeszsel, optikailag hajtott gépek

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

2002: Holografikus lézercsipesz (spatial light modulator, SLM)

2008: Bustamante, Tinoco: riboszóma mechanika



J. Spudich



J. Finan



S. Chu



W.D. Phillips



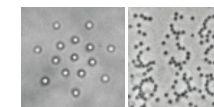
C. Cohen-Tanoudji



S. Block

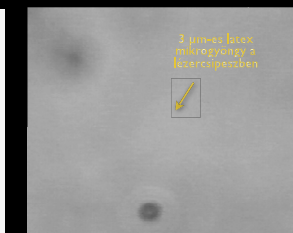
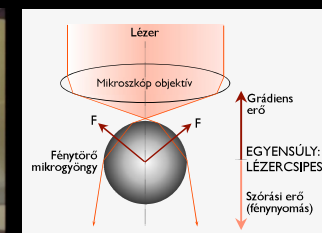


Mikrofabrikált propeller



Sok részecske egyidejű manipulálása holografikus lézercsipeszsel

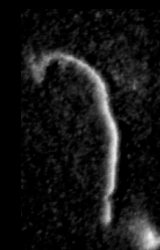
Nanomanipulálás fénnel



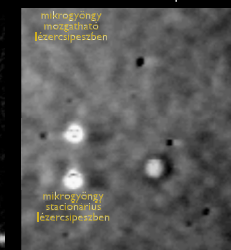
E. coli baktériumsejt



Aktin filamentum

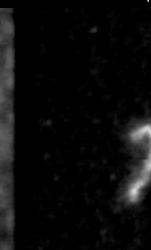


Fáziskontraszt kép



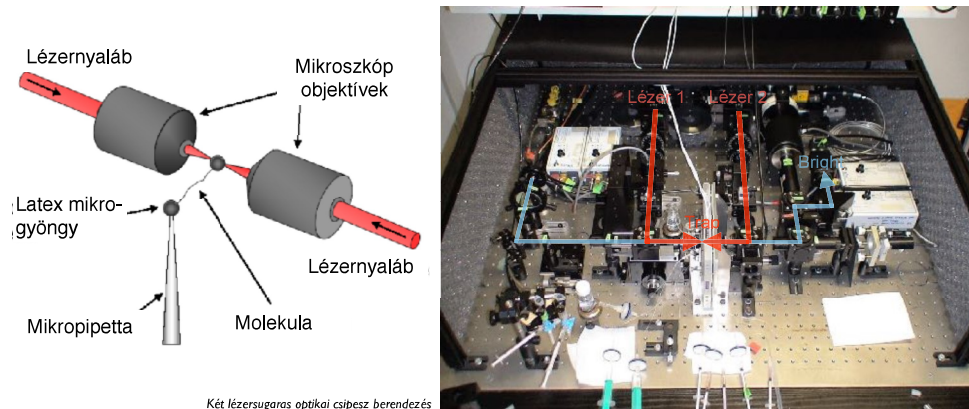
DNS

Fluoreszcencia kép



Arai et al Nature 399, 446, 1999

A lézersípesszel erőt is lehet mérni



Két lézersugaras optikai csipesz berendezés

Erőkalibráció

- Fényimpulzus-változás közvetlen megmérése
- Ismert erővel való kalibrálás (Stokes erő)
- Ekvipartíció tétele

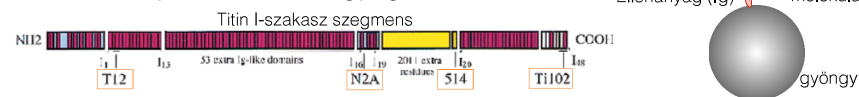
Molekula - fogantyú geometria

mikrogöngy $\sim 1 \mu\text{m}$

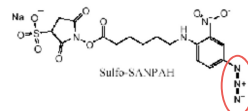
molekula $\sim 10 \text{ nm}$

Molekula fogantyúhoz rögzítése

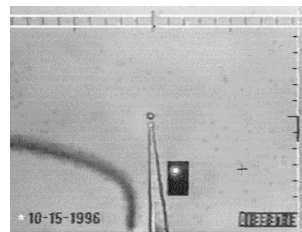
Szekvensspecifikus ellenanyagok



Fotoreaktív keresztkötő - molekulahegesztés

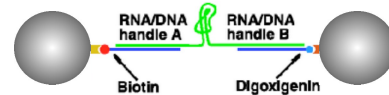


- Nem specifikus
- Fotoreaktív N_3^- (azido) csoport (amino-csoportokkal reagál)
- UV megvilágítás



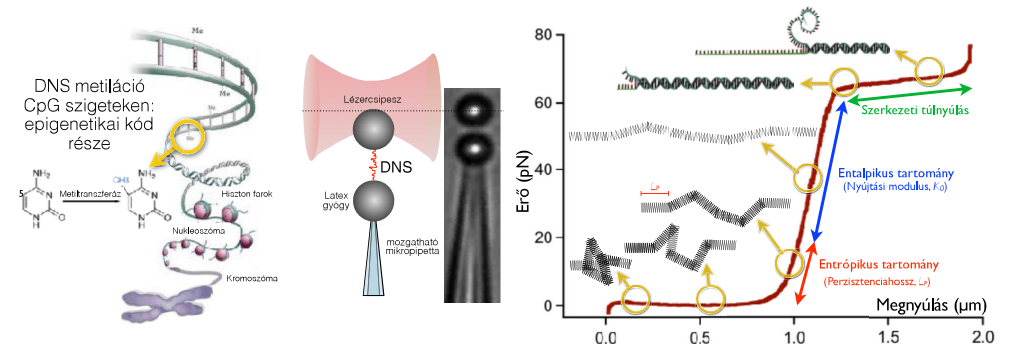
DNS fogantyú

- Molekuláris dimenzió
- Klónozási technikákkal specifikussá tehető
- Mechanikai ujjlenyomatot ad

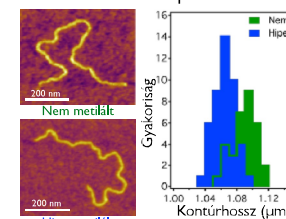


Lézersípesszel demonstráció!

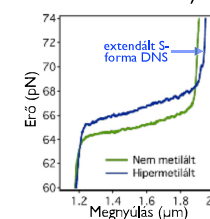
1. Hipermetilált DNS nanomechanikája



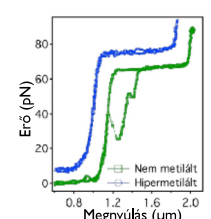
dsDNS kompaktabb



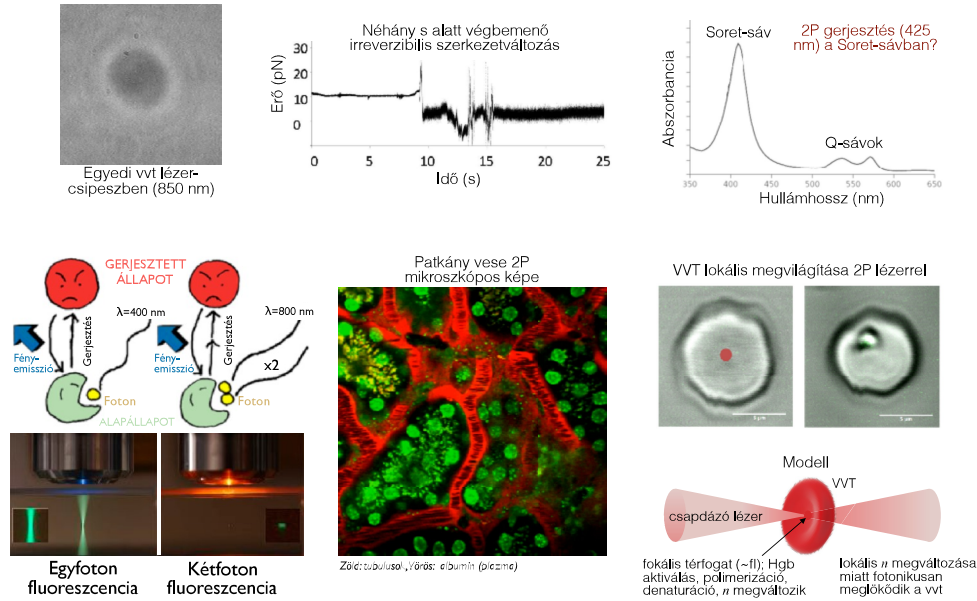
Szerkezeti túlnyúlás nagyobb erőnél



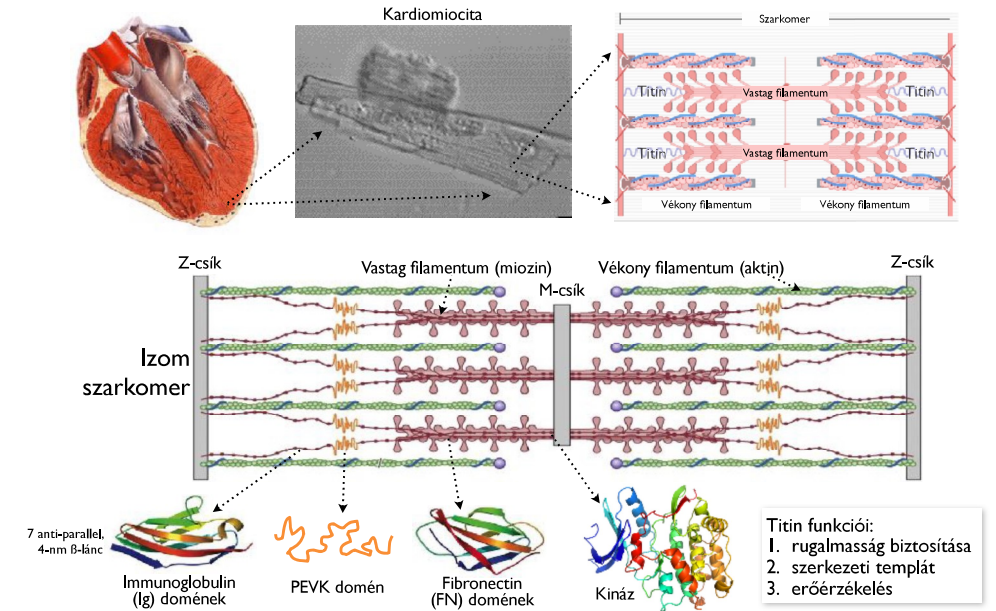
Erőhiszterézis eltűnt



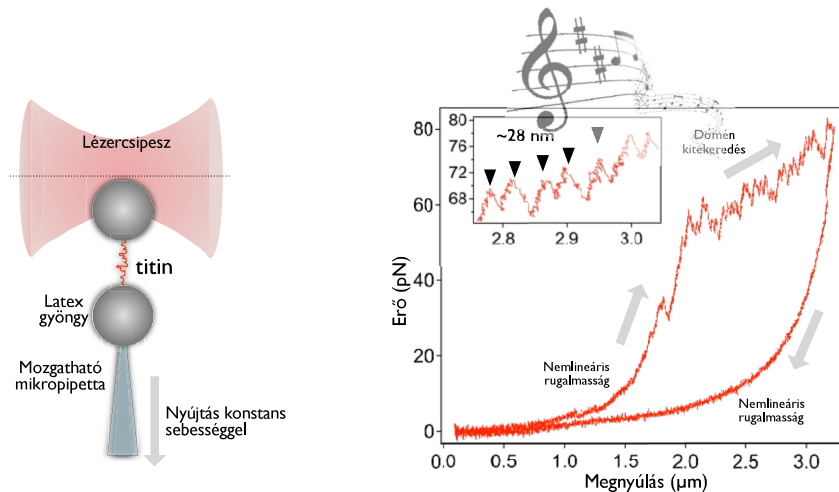
2. Egyedi vörösvértestek csapdázása



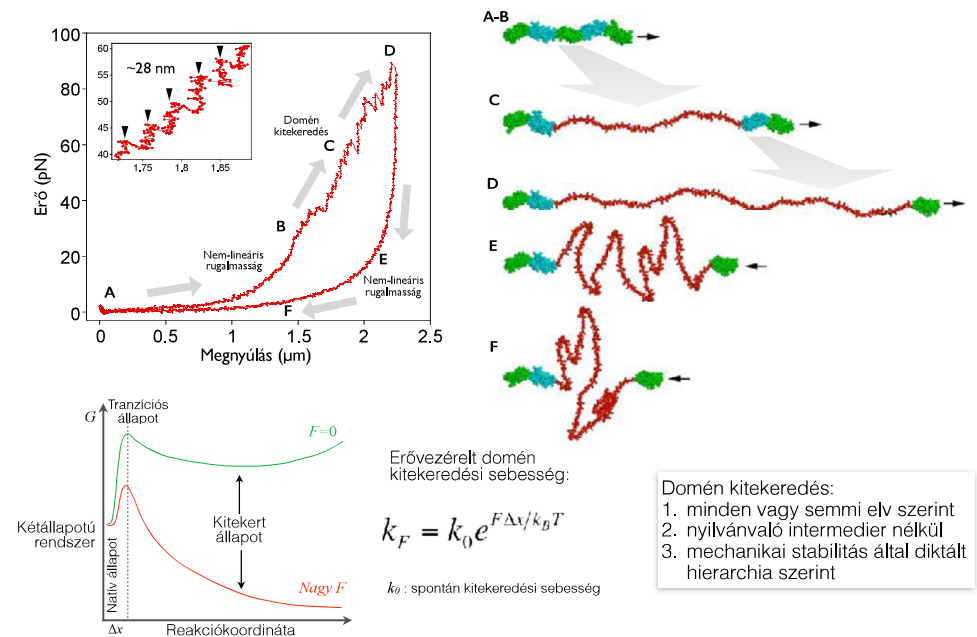
3. A titin óriás izomfehérje nanomanipulálása



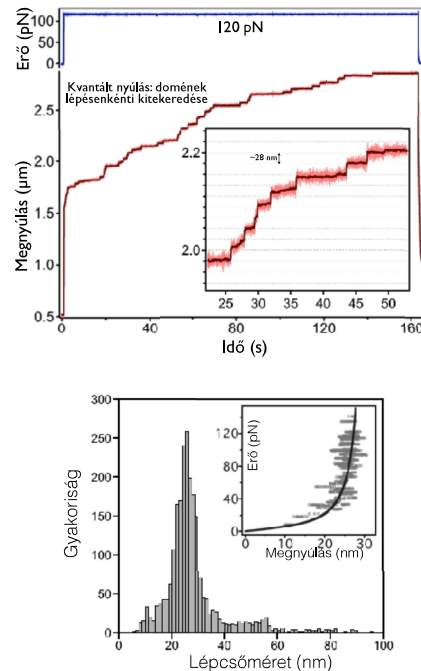
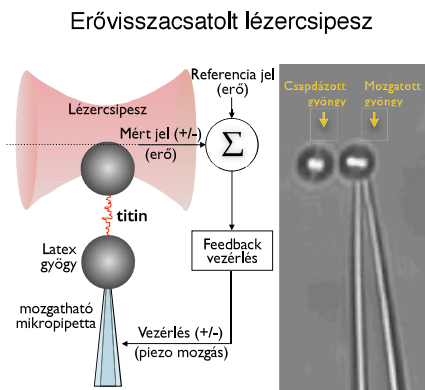
A titin nanomuzsikája



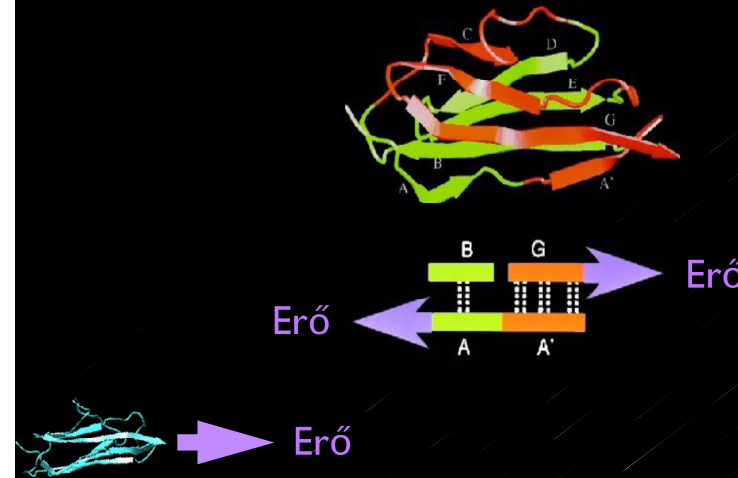
Erőhatásra a titin kitekeredik



Titin kitekerés konstans erővel

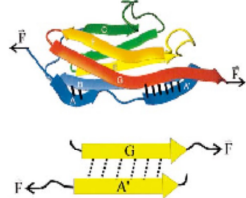


A titin doméneket párhuzamosan csatolt H-hidak stabilizálják

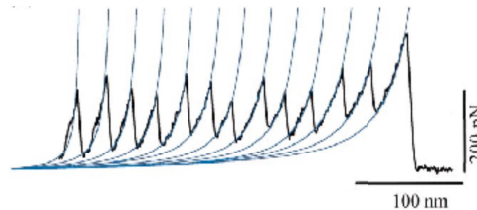


A mechanikai stabilitás biológiai logikája

Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása



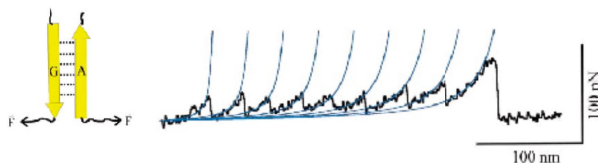
Nagy kiterjedési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

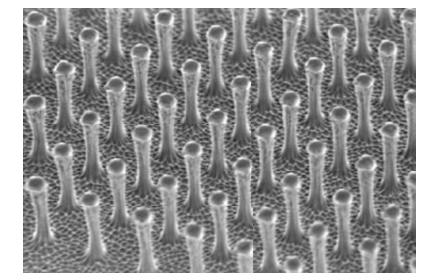


Alacsony kiterjedési erő



Makroszkópikus mechanikai stabilitás

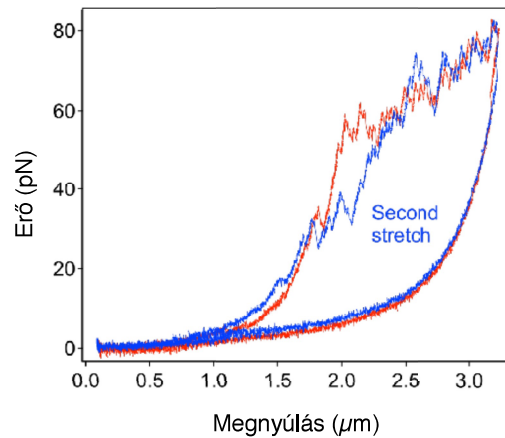
Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



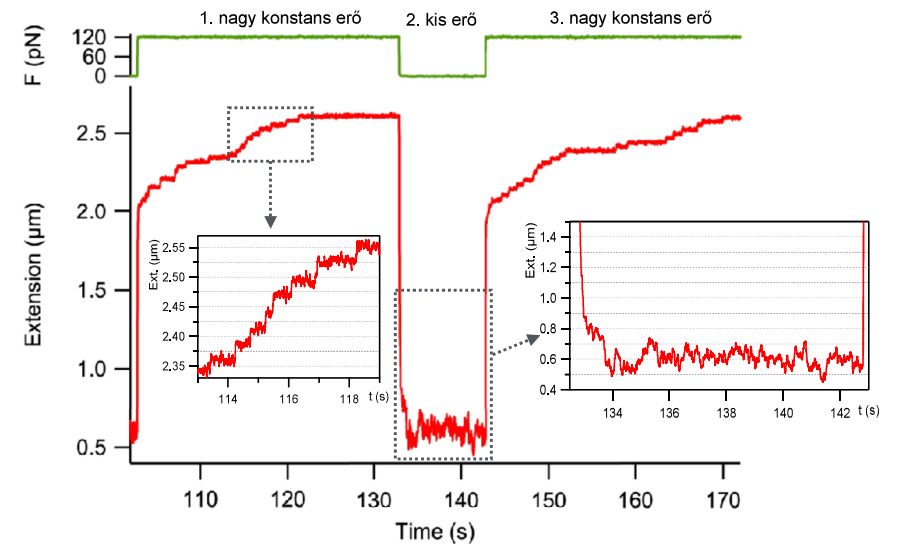
Mesterséges gecko talp
Nanotechnológiával készítve

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

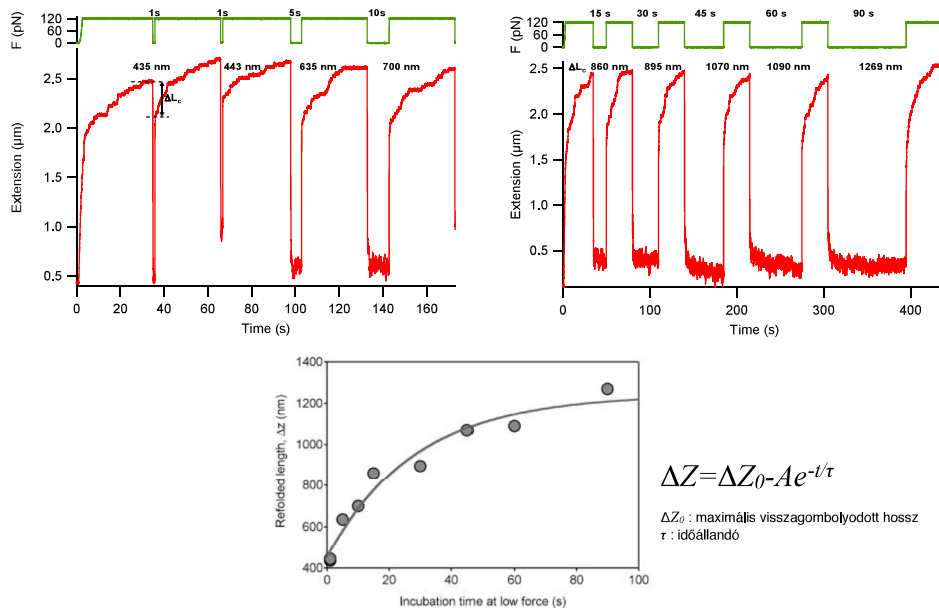
A titin feltekeredik, ha hagyjuk rövidülni



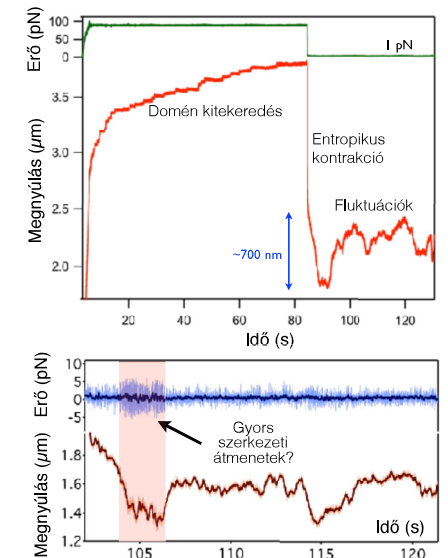
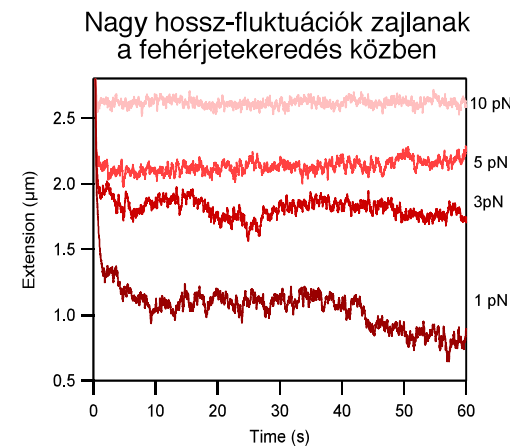
Nanomechanikai gombolyodási teszt



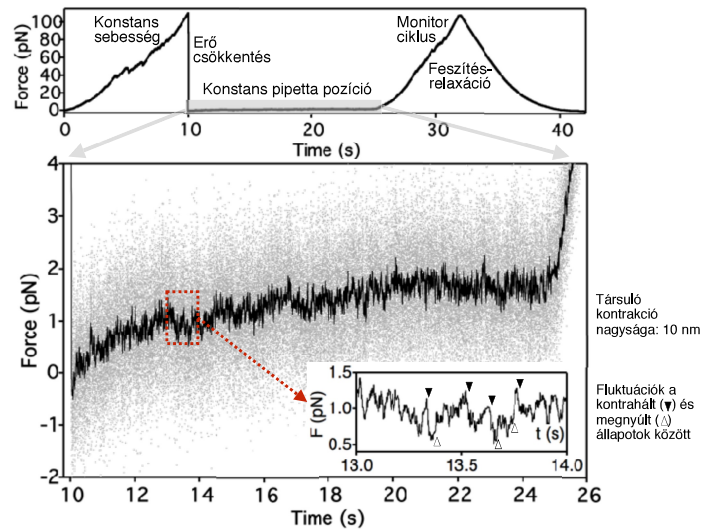
A gombolyodás elsőrendű kinetikát követ



A titin erő ellenében is visszatekeredik

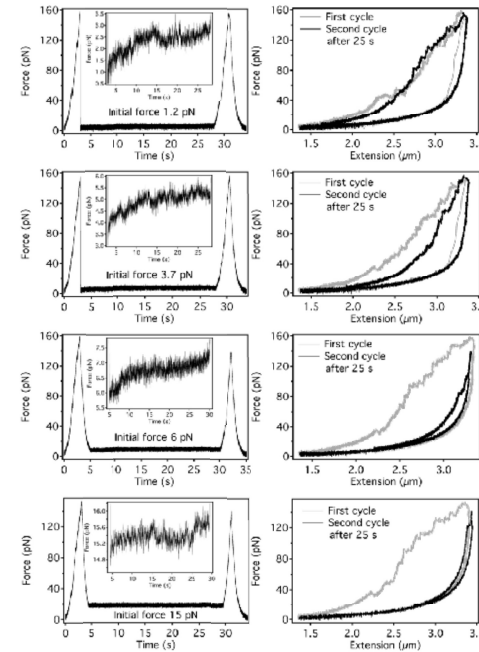
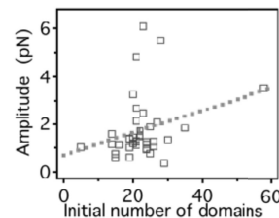
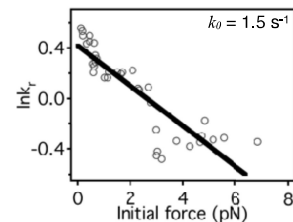
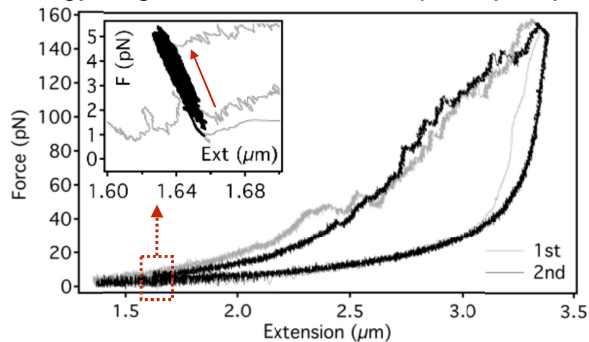


Gombolyodás közben a titin erőt fejleszt

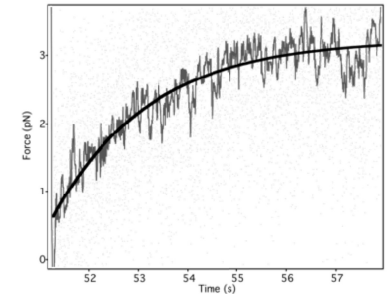


Az erő kifejlődés sebessége és amplitúdója

Az erőgeneráló szerkezeti átmenet a titint egy megrövidült szerkezeti állapotba juttatja



A gombolyodással vezérelt erőgenerálás a kezdeti paraméterektől függ

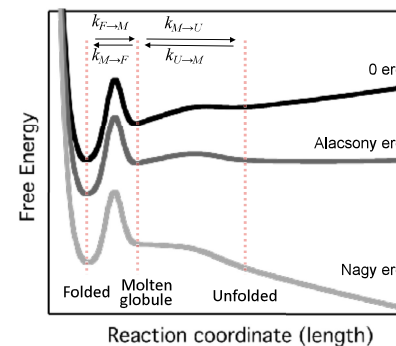


$$F = F_0 - A e^{-kt}$$

F_0 : maximumális erő
 k : sebességi állandó

A fluktuációk megmagyarázhatók egy molten-globule (olvadt gombóc) köztes állapottal

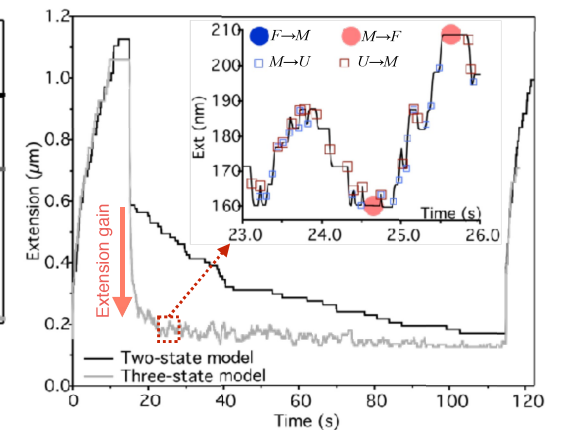
Háromállapotú rendszer



$$k_F = k_0 e^{\pm F \Delta x / k_B T}$$

k_0 : spontán ki/feltekeredési sebesség

Monte-Carlo szimuláció



Mi lehet az olvadt gombóc szerkezete?

