

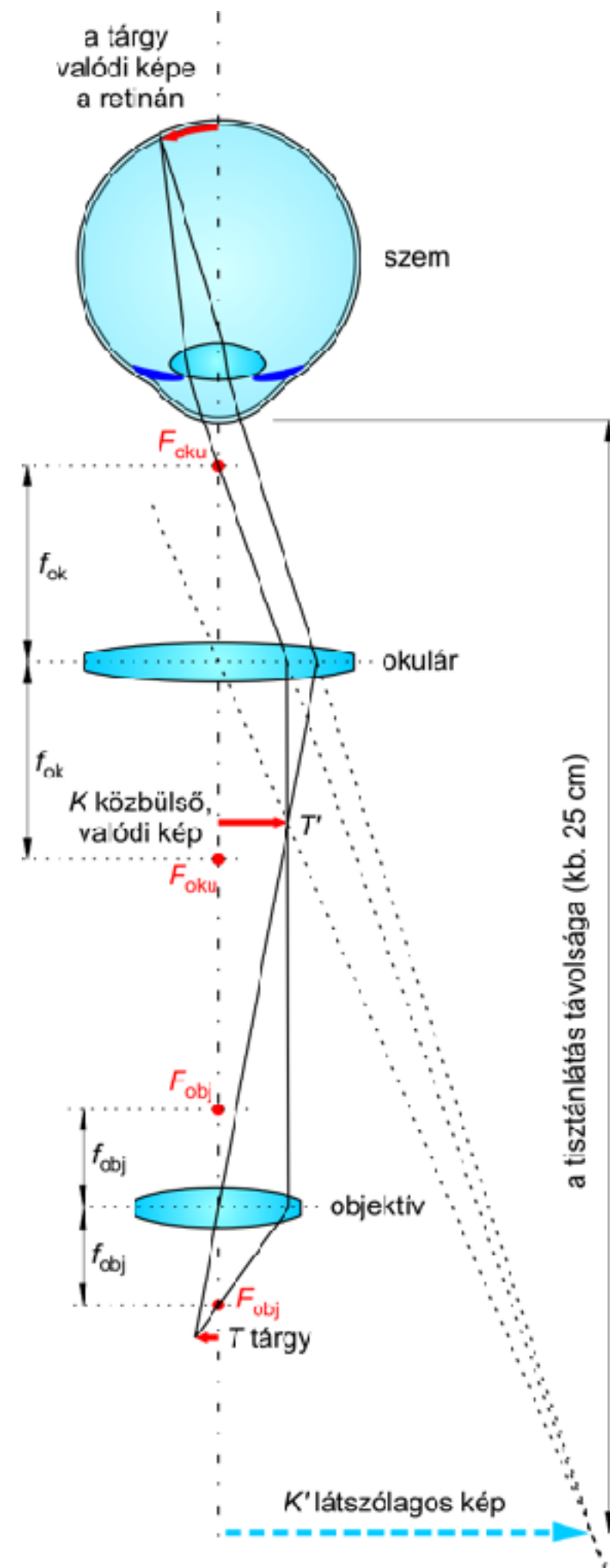
Nagyfelbontású mikroszkópos módszerek Egymolekula biofizika

Kellermayer Miklós

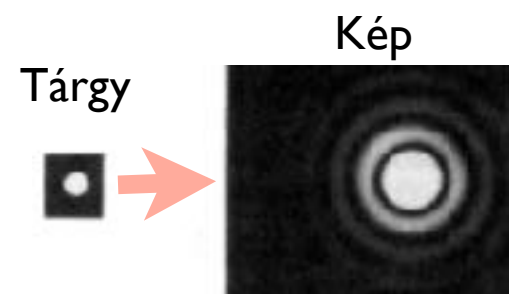
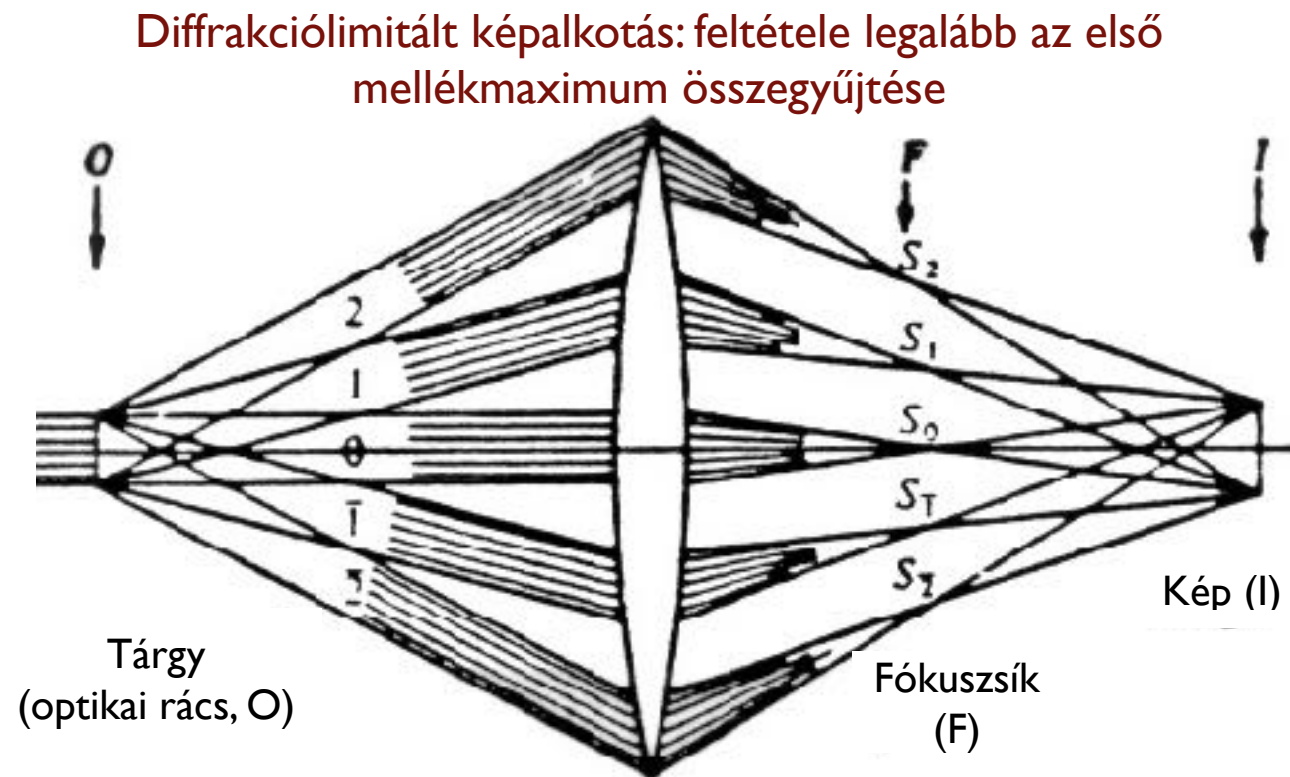
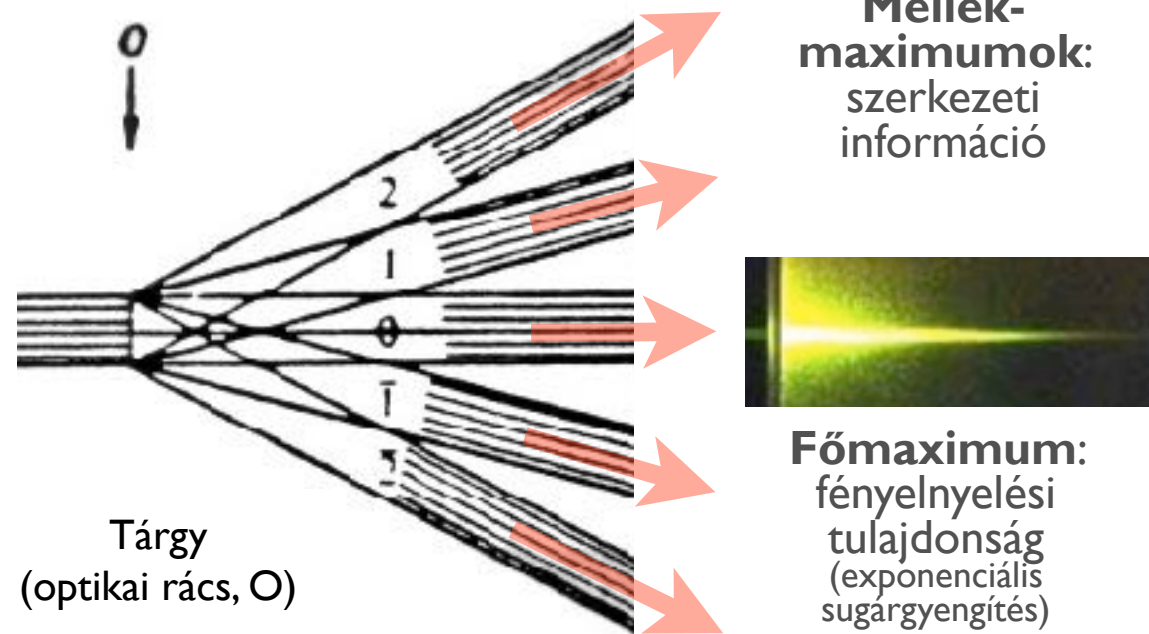
Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Képzalkotás az összetett fény-mikroszkópban

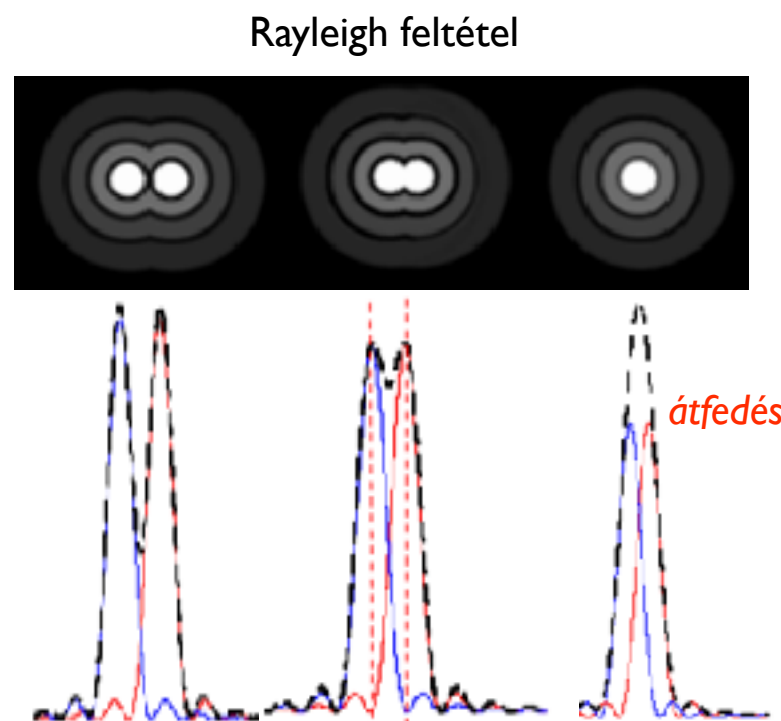
- Nagyított, fordított állású virtuális kép
- Leképezés feltétele: egy járulékos lencse (szemlencse) optikai útba helyezése



A fénymikroszkóp feloldóképeségét a hullámtulajdonság korlátozza



Diffrakció miatt: pontszerű tárgy képe elhajlási korong (Airy disk)



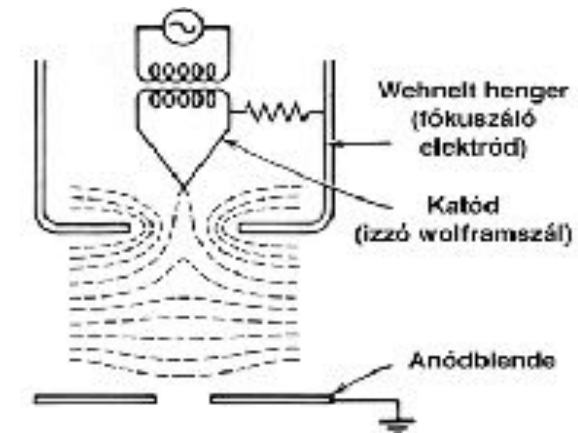
Legkisebb feloldott távolság (Abbé-képlet):

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$$

λ = hullámhossz
 n = közeg törésmutatója
 α = optikai tengely és legszélső nyaláb által bezárt szög

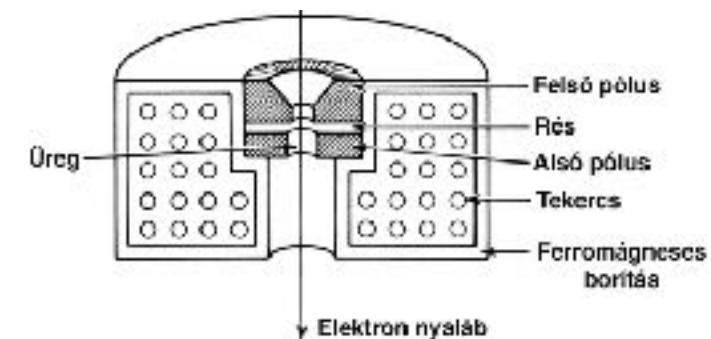
Elektronmikroszkóp

Sugárforrás:
elektronágyú



Ernst Ruska
(Nobel-díj 1986)

Fókuszálás:
elektronnyaláb
kitérítése
mágnestlencsével

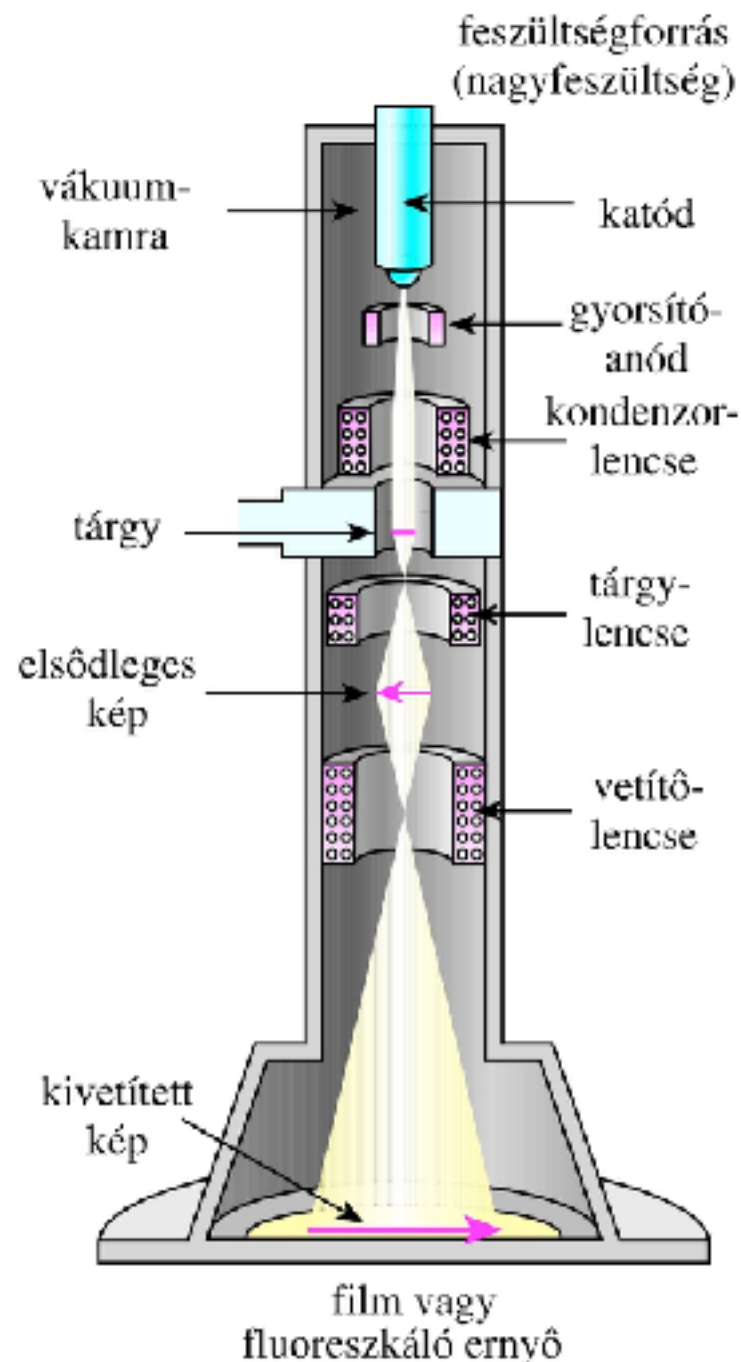


F =elektronra ható erő; e =elektron töltése; B =mágneses térerő; V_e =elektron sebessége; α =optikai tengely és a mágneses tér iránya által bezárt szög

$$F = eBV_e \sin \alpha$$

Feloldóképesség: $d = \frac{\lambda}{\alpha}$

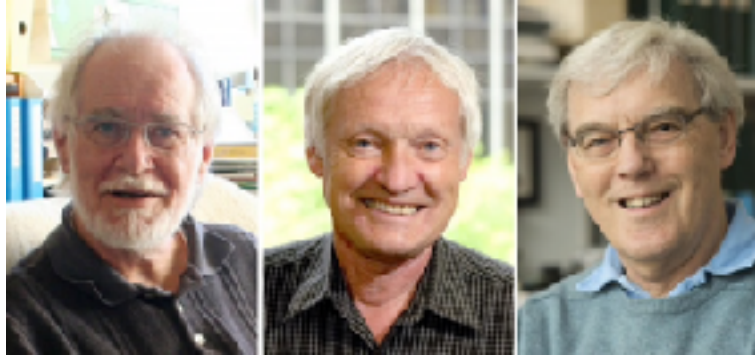
d =legkisebb feloldott távolság
 λ =”de Broglie” hullámhossz
 α =optikai tengely és a mágneses tér iránya által bezárt szög



Transmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

de Broglie hullámhossz alapján elméleti $d \sim 0,005 \text{ nm}$ ($=5 \text{ pm}$)

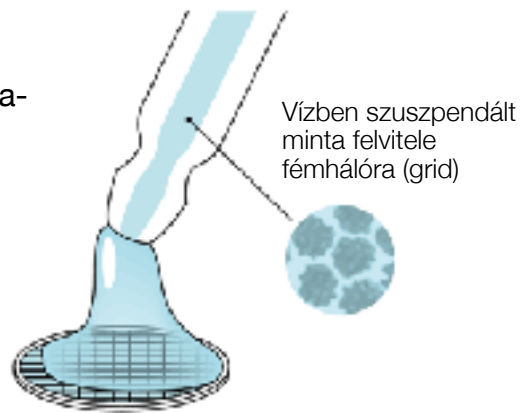
Kémiai Nobel-díj 2017: Krioelektron mikroszkópia



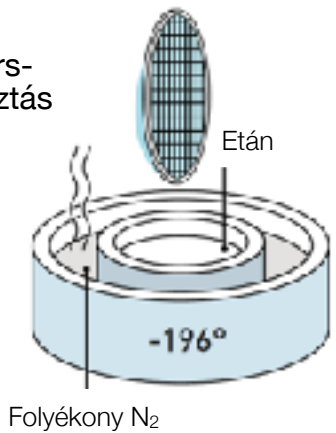
Jacques Dubochet, Joachim Frank, Richard Henderson

Mintapreparálás

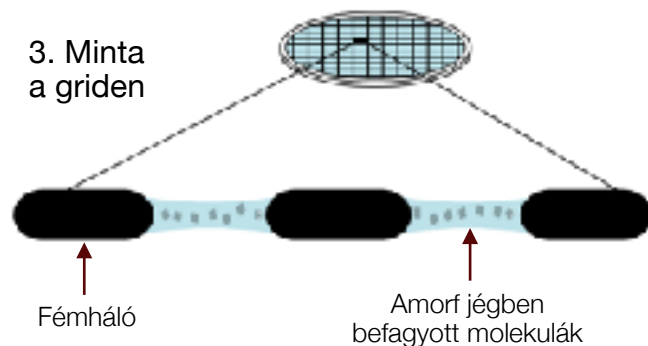
1. Minta-felvétel



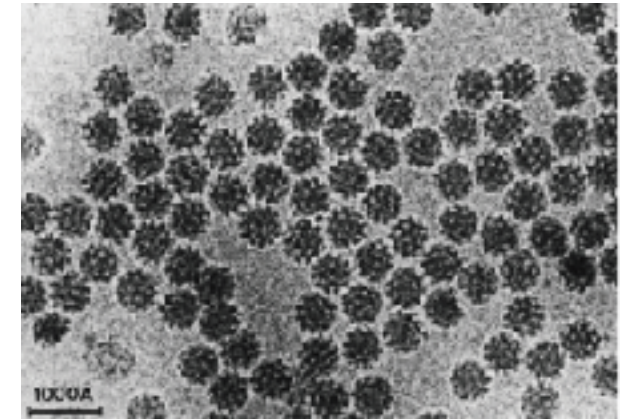
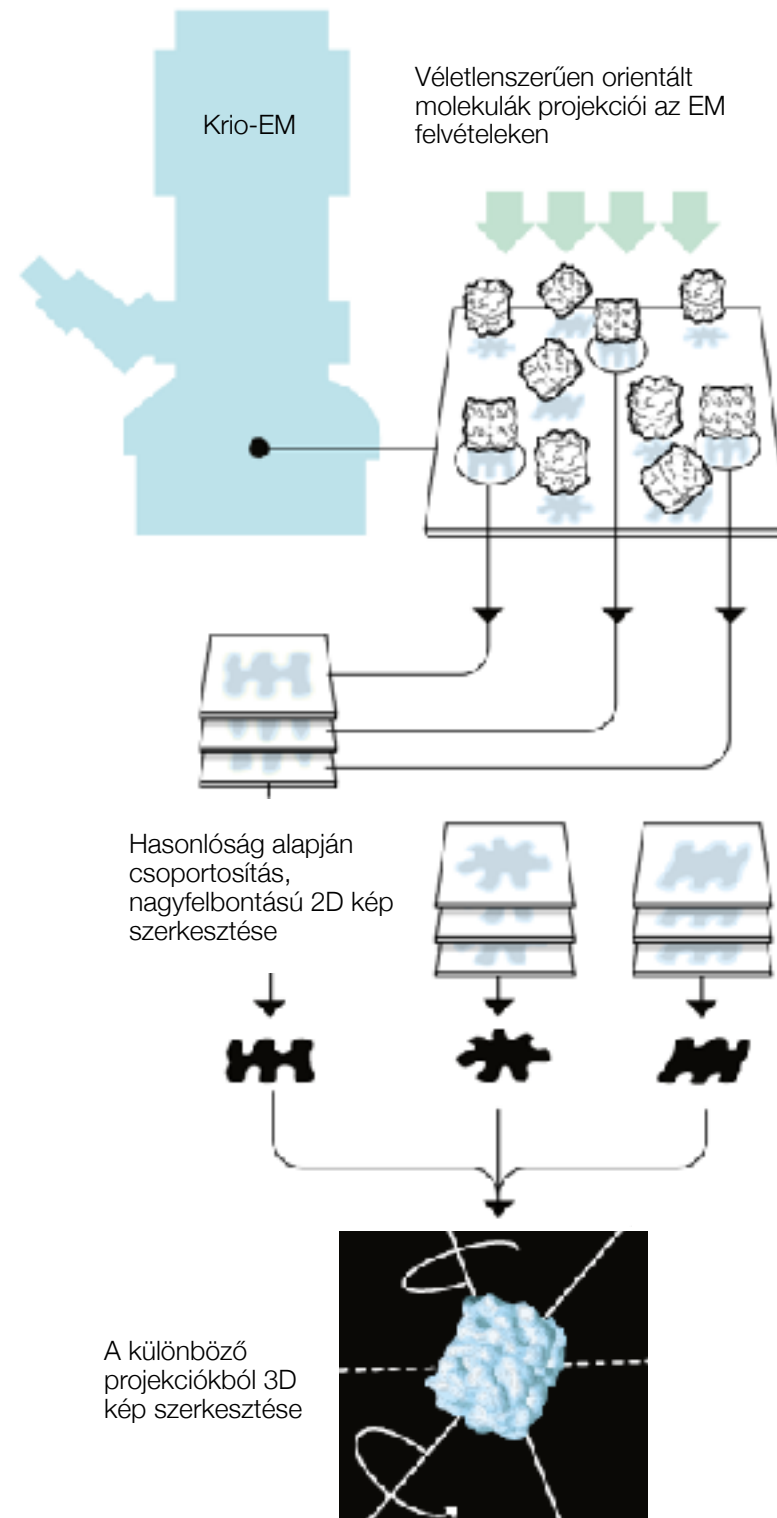
2. Gyors-fagyasztás



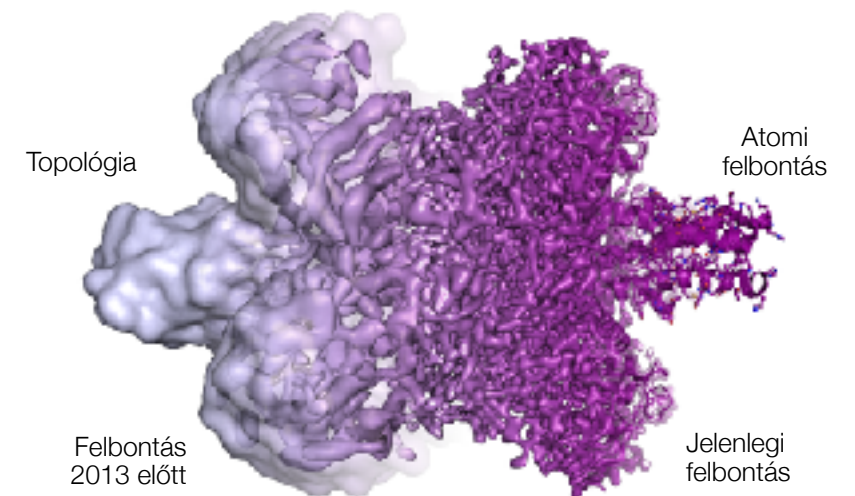
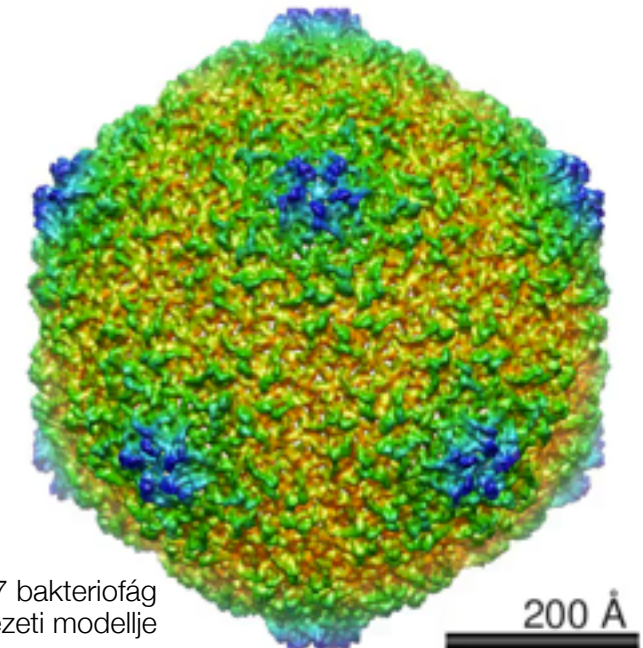
3. Minta a griden



Krio-EM felvétel és képrekonstrukció



Első krioelektron mikroszkópos felvétel vírusokról (Dubochet, 1984)



Szuperfelbontású mikroszkópia

Kémiai Nobel-díj, 2014



Eric Betzig

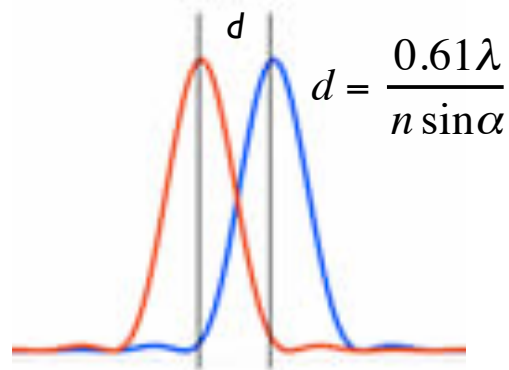


Stefan Hell

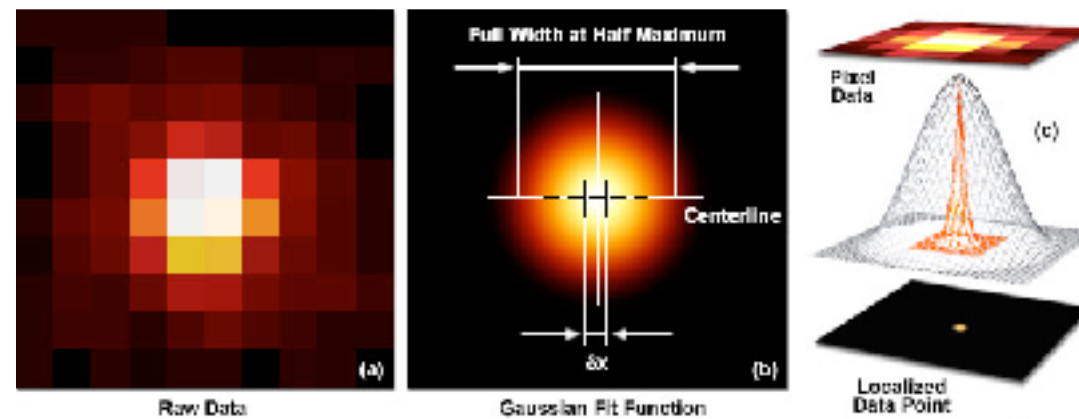


William E. Moerner

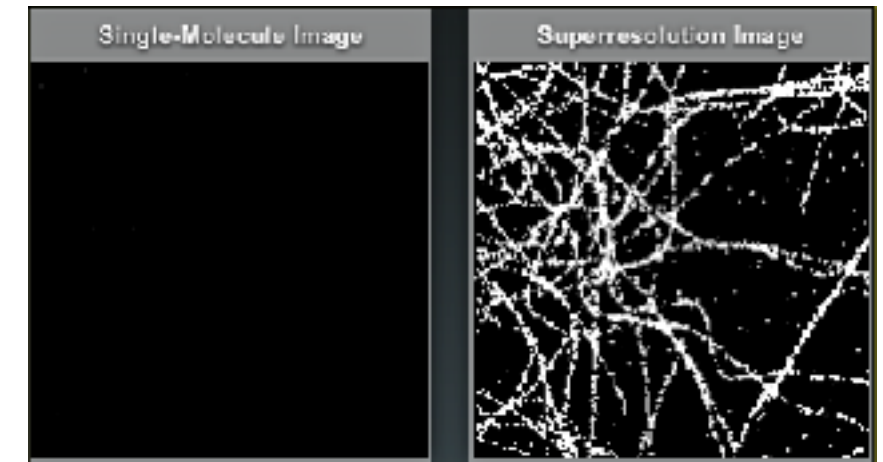
Feloldási probléma
(Abbé-elv)



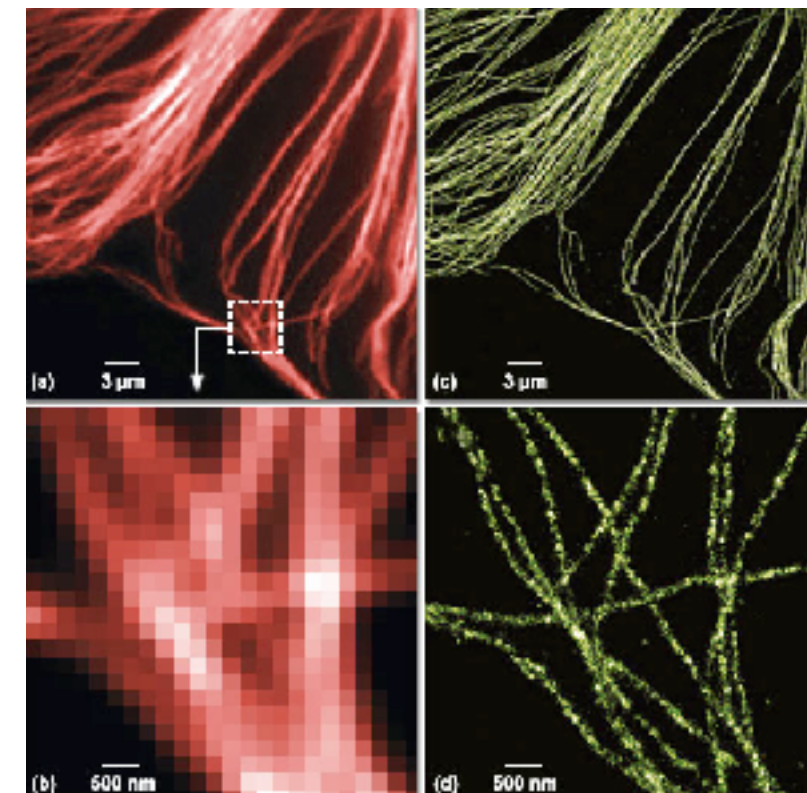
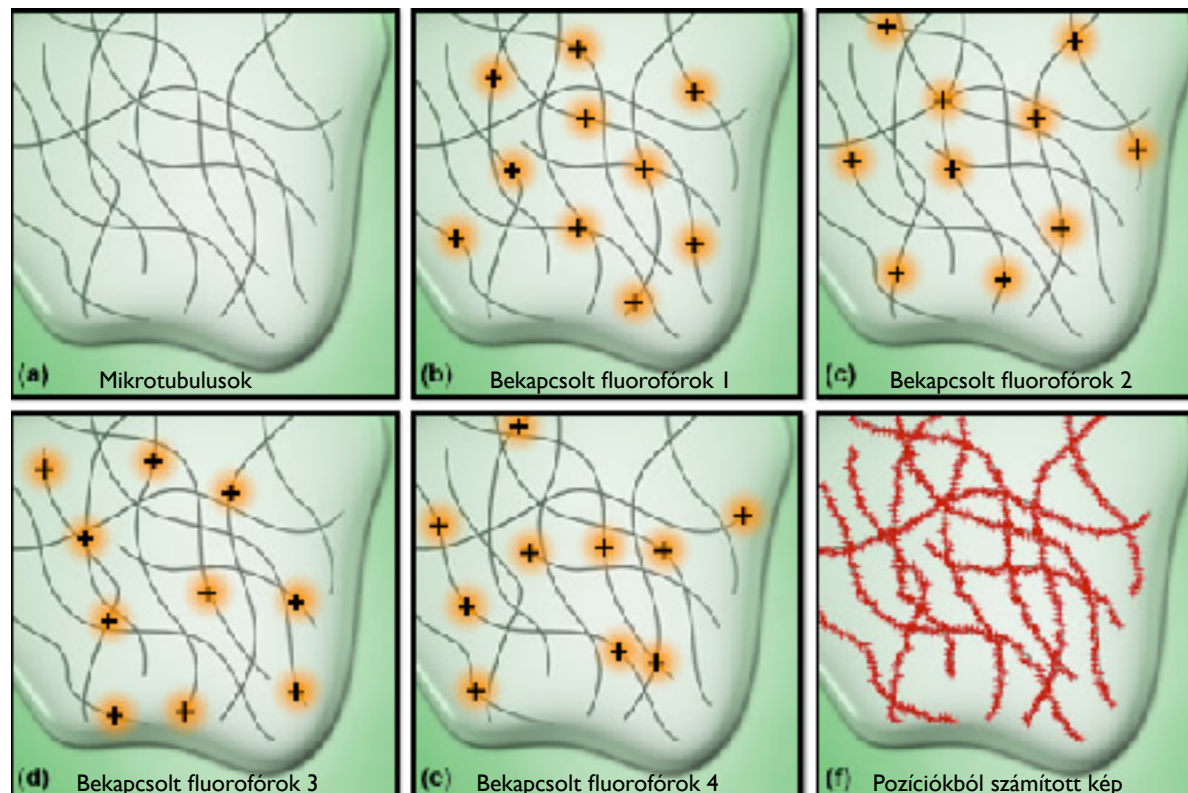
Pozíciómeghatározási probléma
(pontosság a fotonyszámától függ)



“Sztochasztikus” adatgyűjtés egyedi fluorofórokról



STORM (“stochastic optical reconstruction microscopy”); PALM (“photoactivated localization microscopy”)



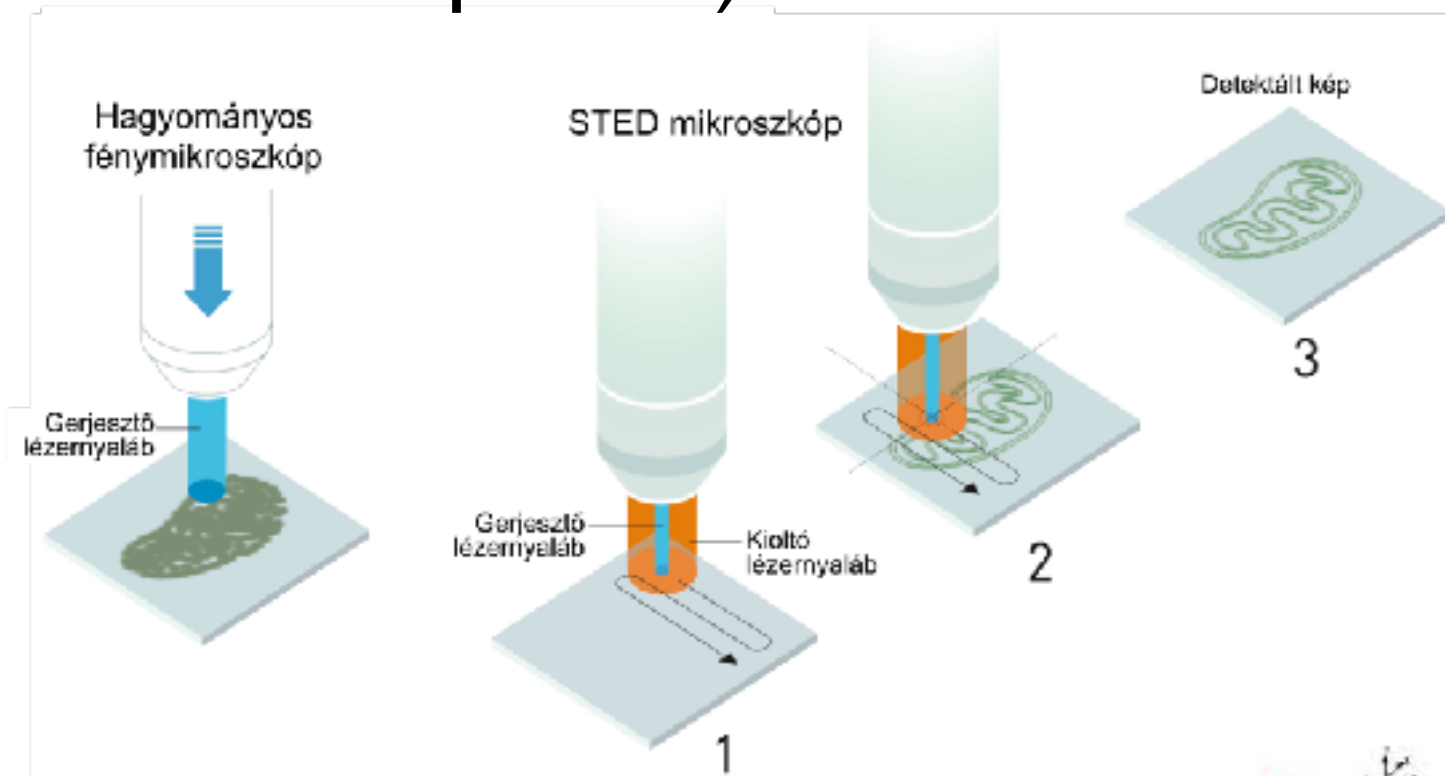
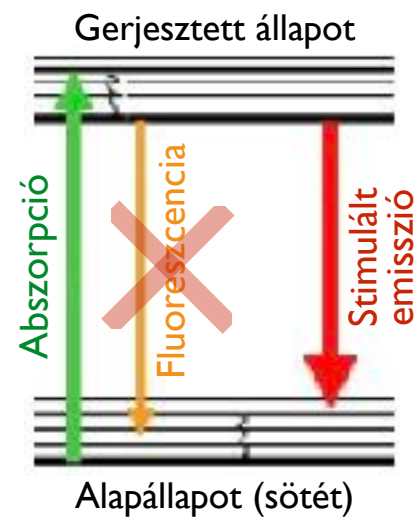
Adatgyűjtési
folyamat

Mikrotubuláris
rendszer

STED mikroszkópia (STimulated Emission Depletion)



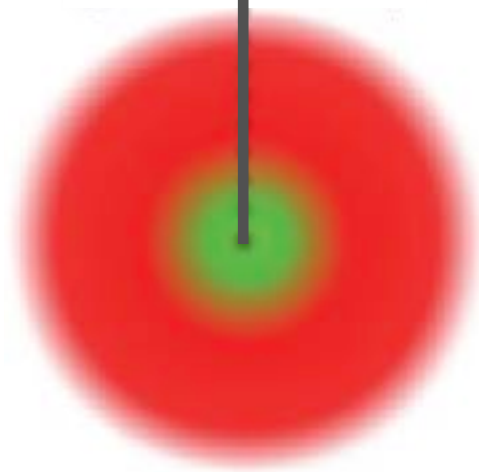
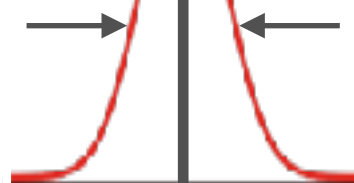
Stefan Hell
(Nobel-díj 2014)



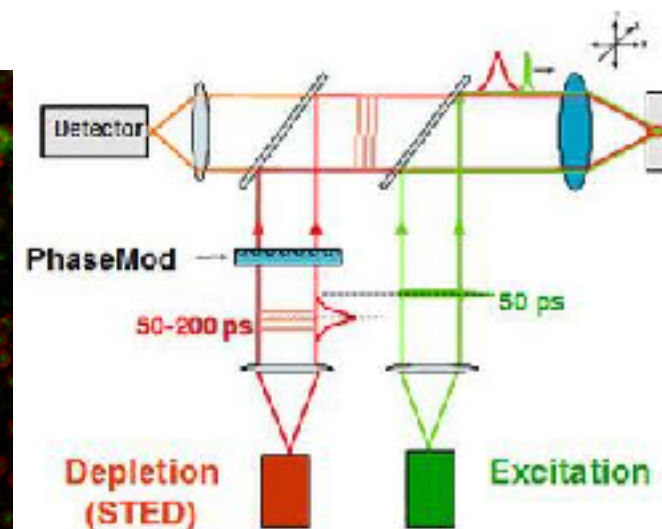
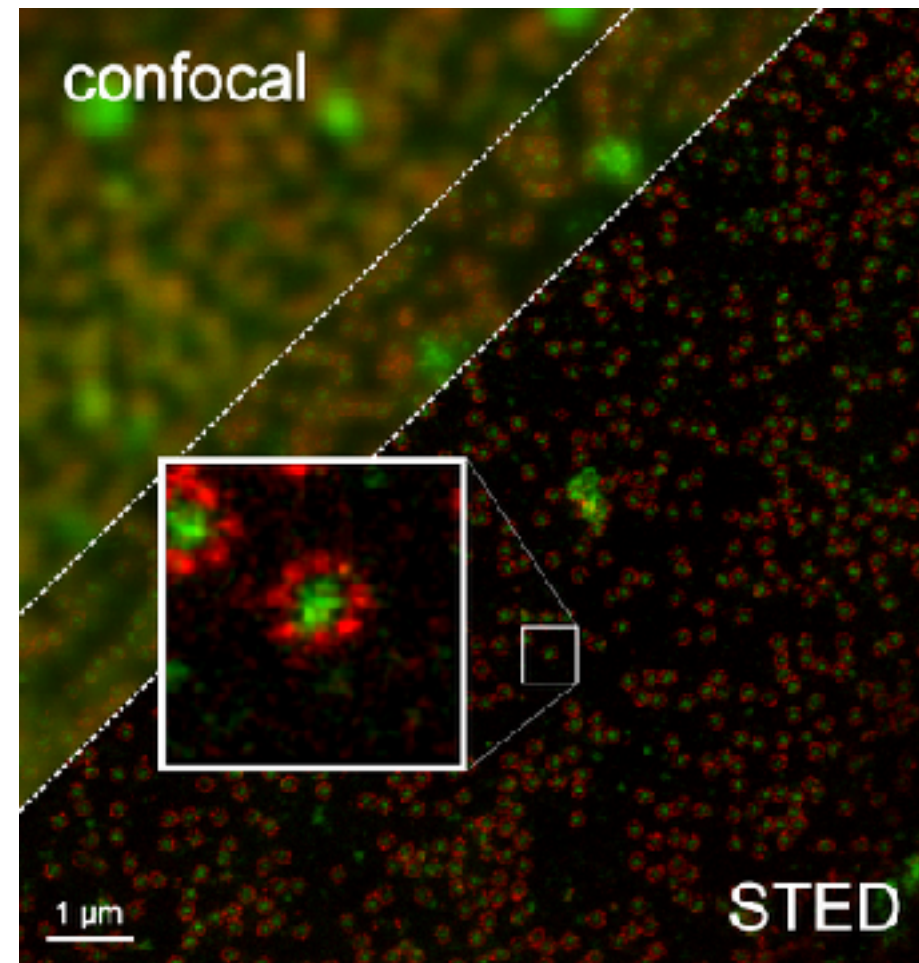
Hell:
$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA \sqrt{1 + I/I_s}}$$



Abbé:
$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$$

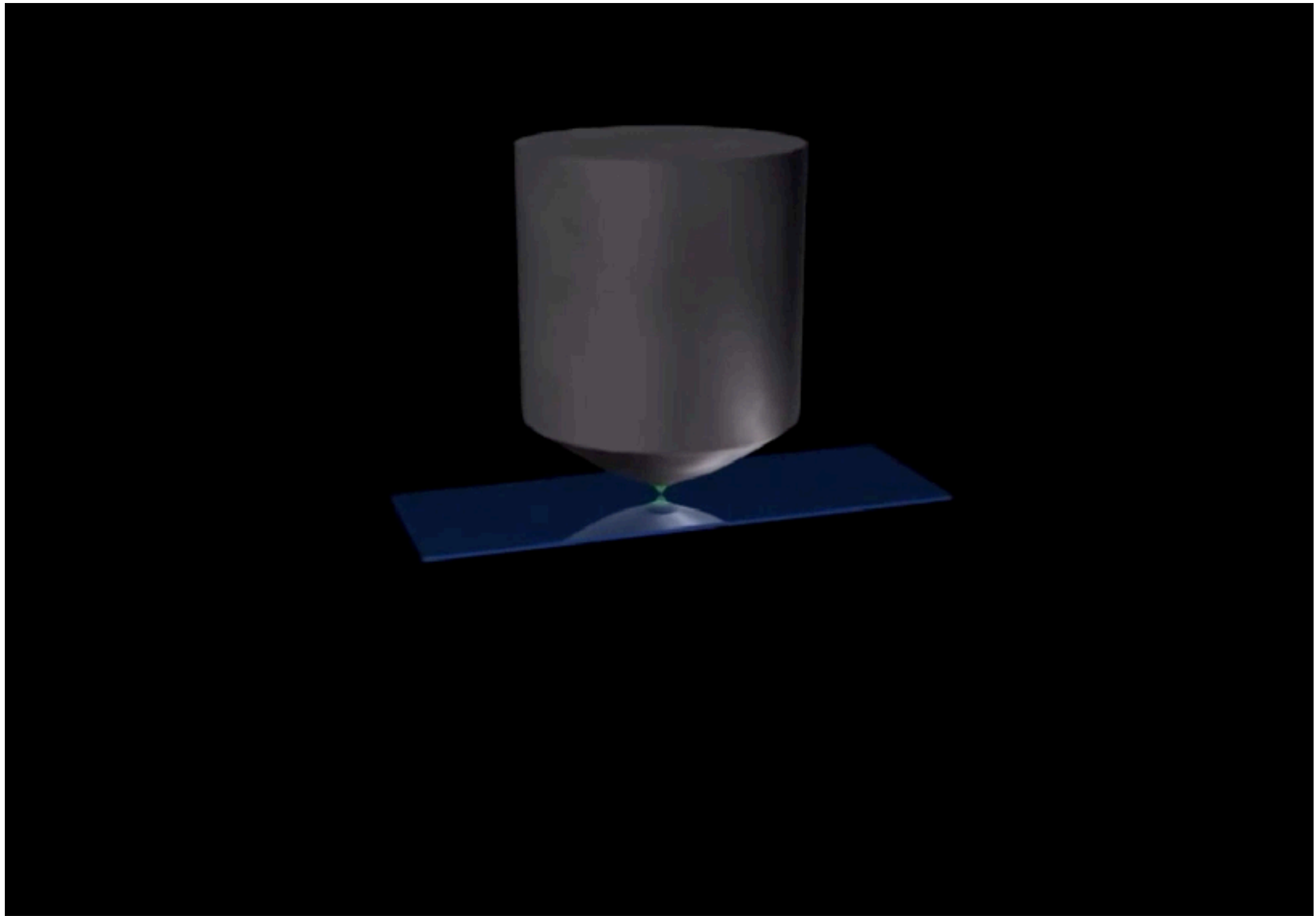


Depletáló lézer intenzitás (I) növelése



Maghártya pórus
komplexek STED
mikroszkópos képe

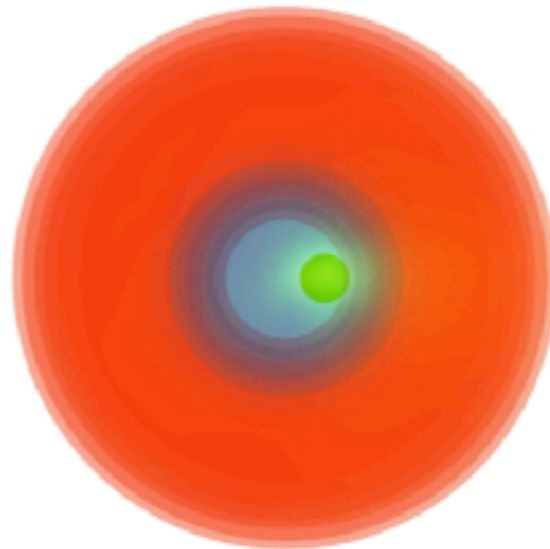
STED mikroszkópia



RESCue STED

RESCue-STED

Probléma:
a fluorfórra eső
intenzitás hatalmas
(~MW/cm²)

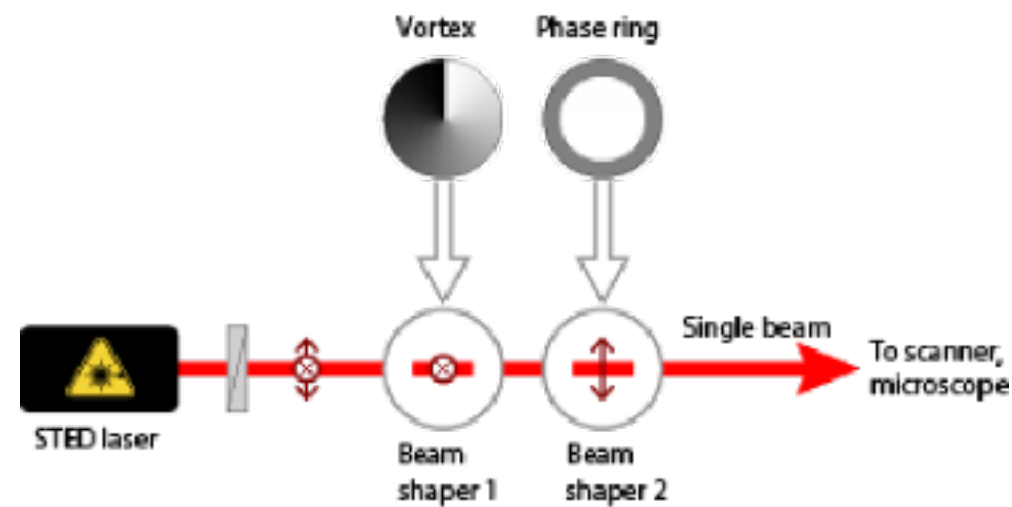


Laser beam duty cycles intelligently
adapt to sample structure

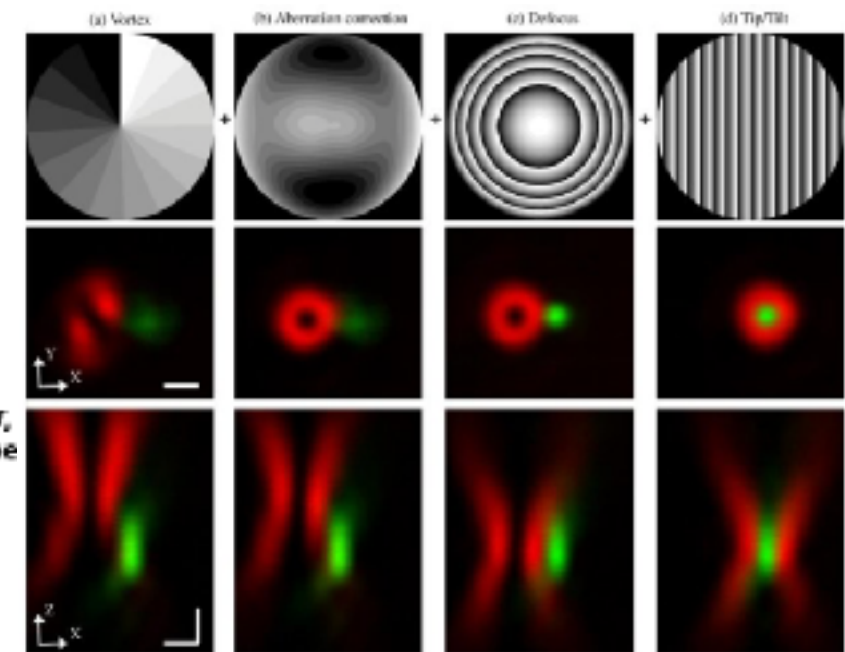
3D STED



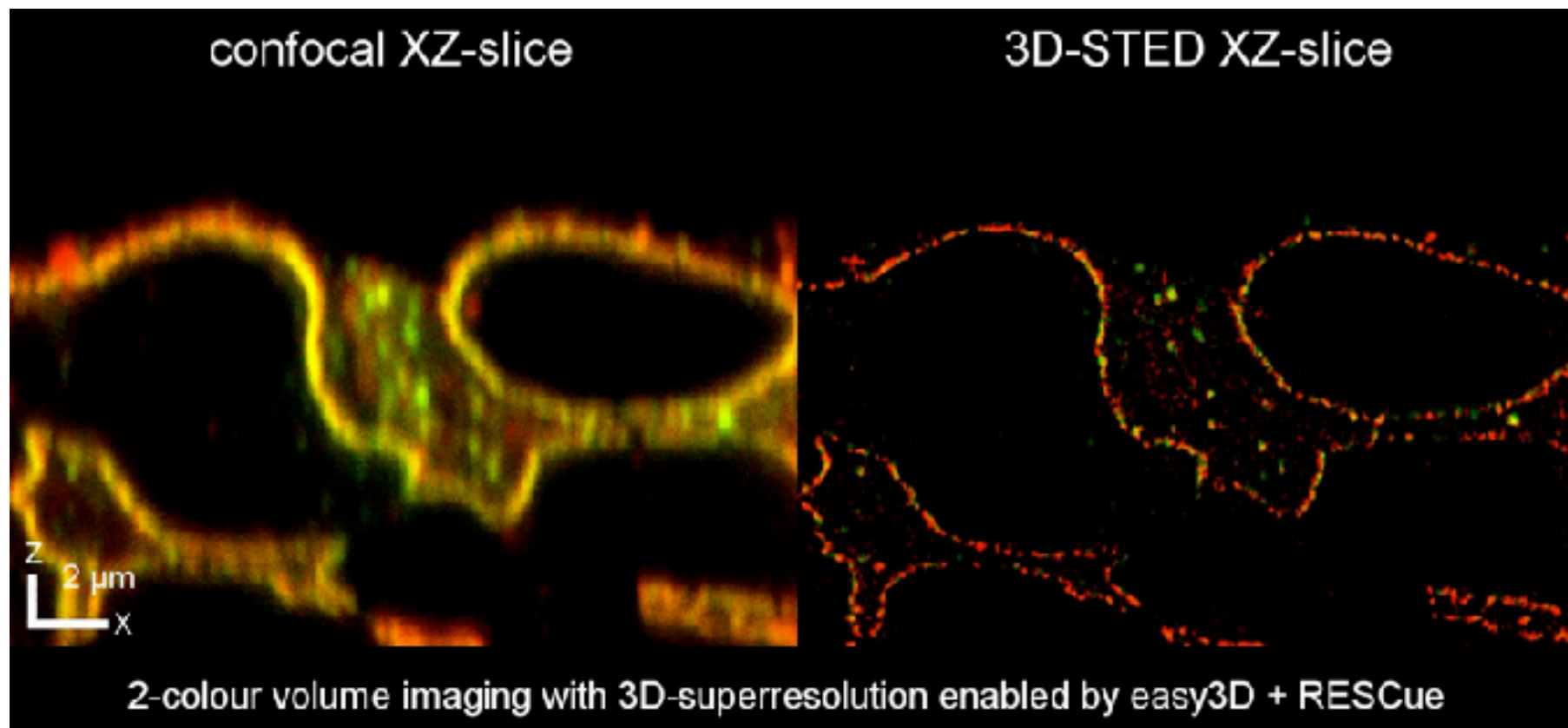
Programozható SLM (Spatial Light Modulator)



“Easy 3D STED”



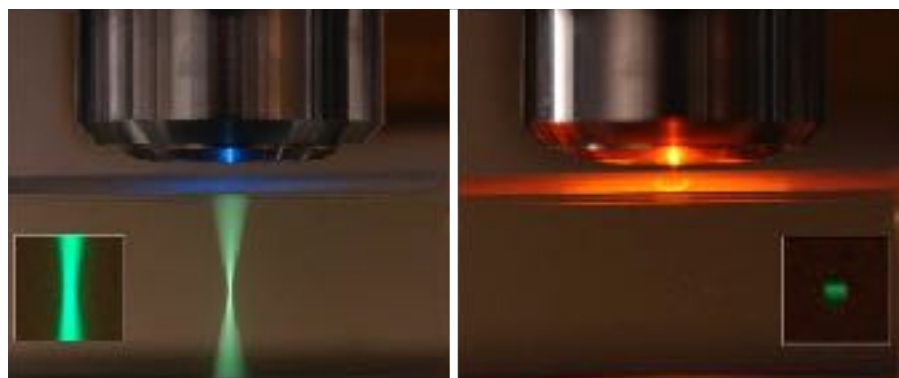
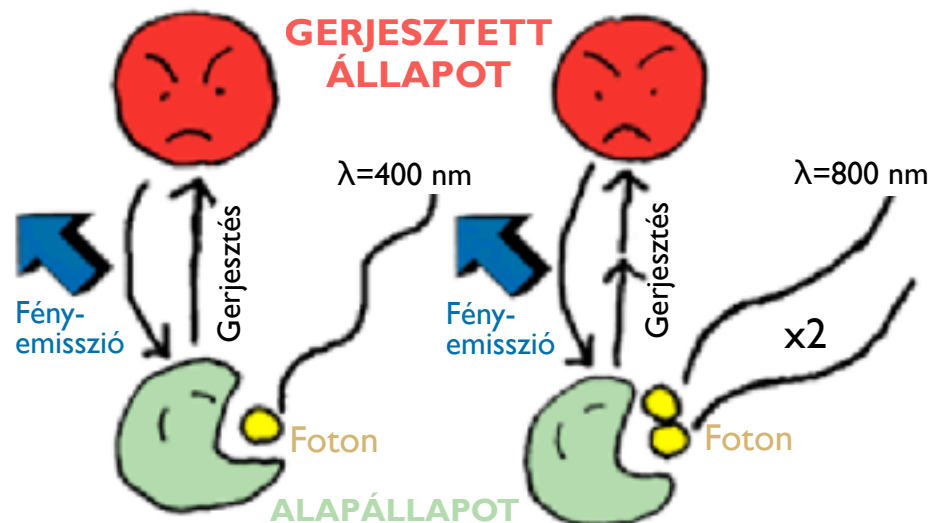
Aberráció korrekció



Nephrin (vörös), Podocin (zöld) (Abberior Instruments)

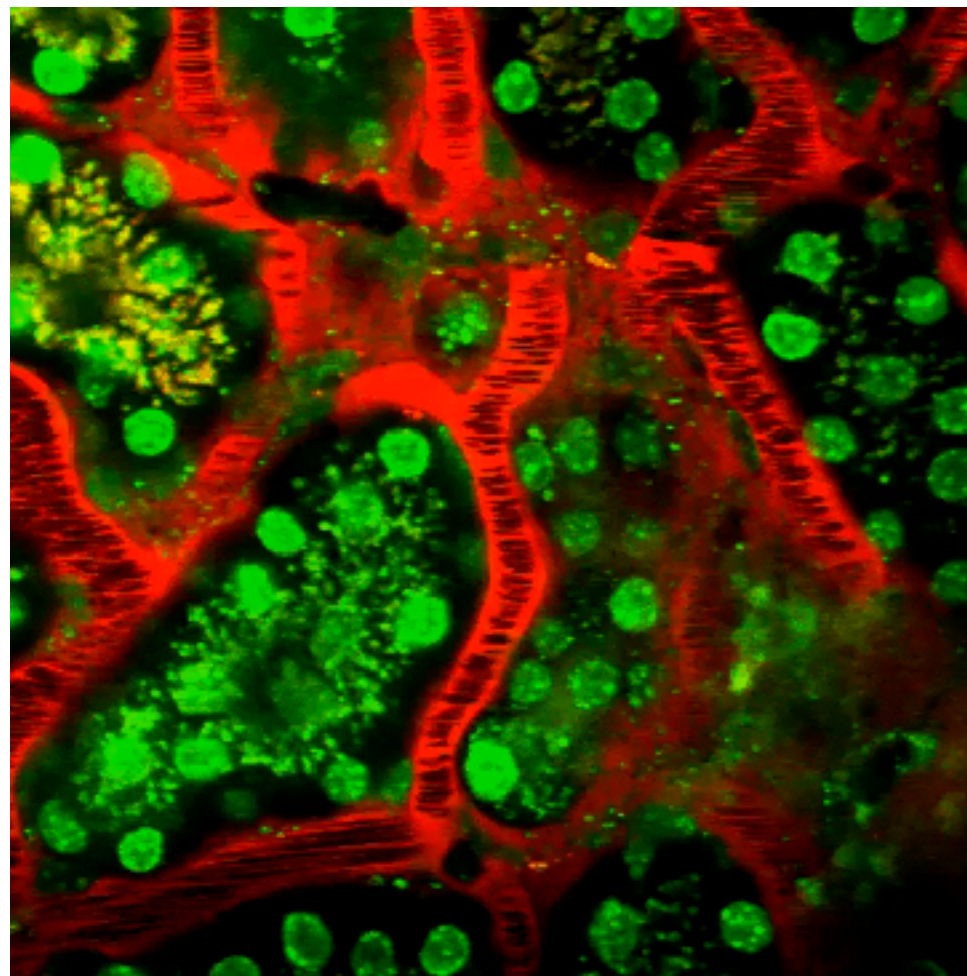
Multifoton mikroszkópia

- Két (vagy több) foton energiája összeadódik a gerjesztéskor
- Gerjesztés (következésképp emisszió) csak a fókuszpontban (limitált fotokárosítás)
- Gerjesztés nagy (közele IR) hullámhosszú, rövid (fs) fényimpulzusokkal
- Nagy hullámhossz miatt mély optikai behatolás (akár 2 mm)
- Lokálisan aktivált fotokémiai reakciók lehetősége

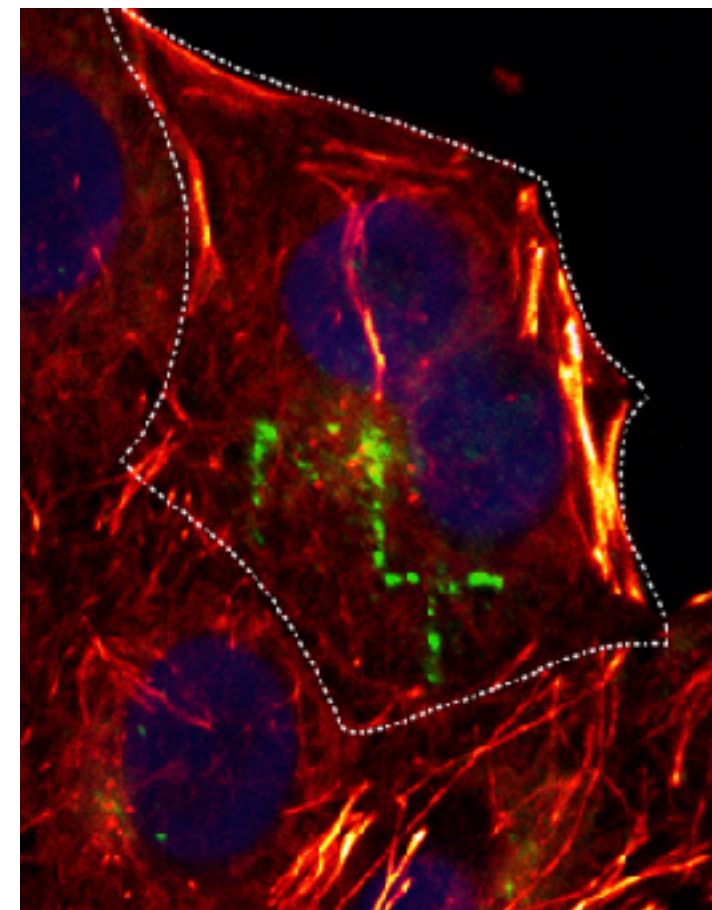


Egyfoton
fluoreszcencia

Kétfoton
fluoreszcencia



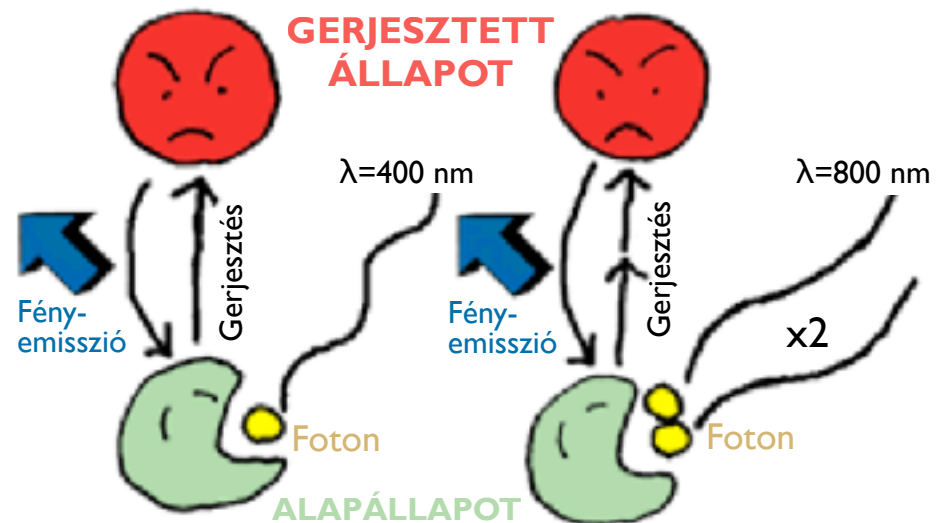
Zöld: proximális vesetubulusok; Vörös: albumin (plazma)



Molekuláris tetoválás:
térben lokalizált módon fotoaktivált
azido-blebbistatin (HeLa sejtben)

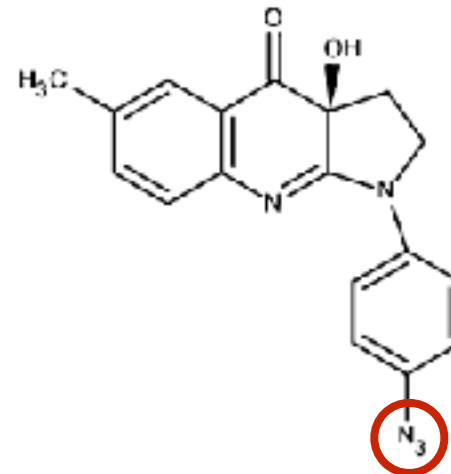
Miozin II optofarmakológiai manipulálása

2P mikroszkópával: femtoliteres
térfogatban fotokémiai reakciót
indíthatunk



Egyfoton
fluoreszcencia

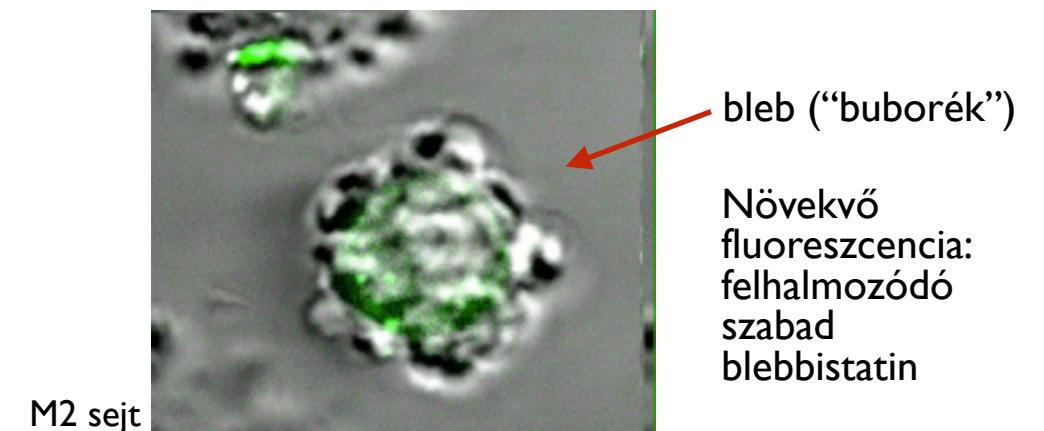
Kétfoton
fluoreszcencia



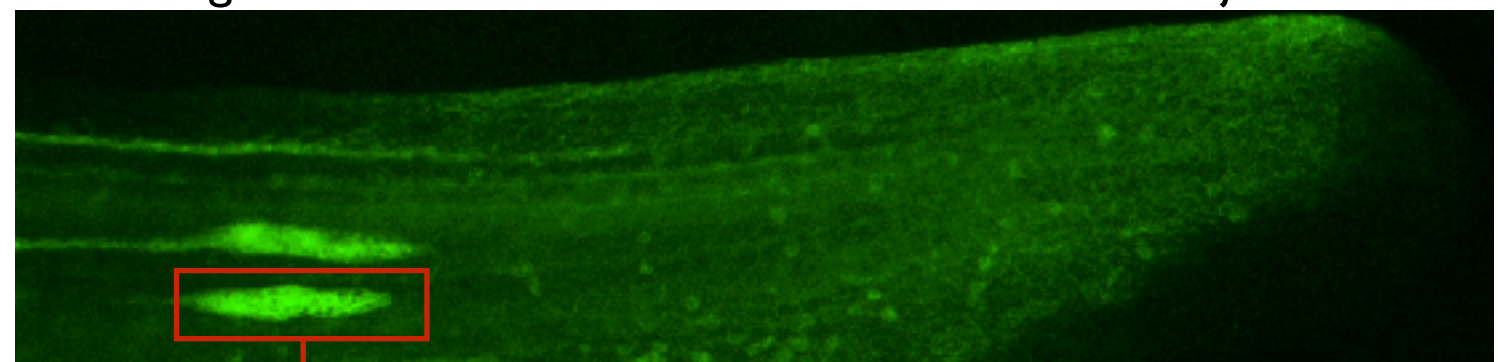
Blebbistatin:

- Miozin II specifikus inhibitor (ADP-P_i állapotban stabilizál)
- Excitáció-kontrakciót szétkapcsolja
- Azidált formája fényaktiválható, a szabad forma fluoreszkál

2P besugárzás hatására a miozin II-függő blebképződés leáll



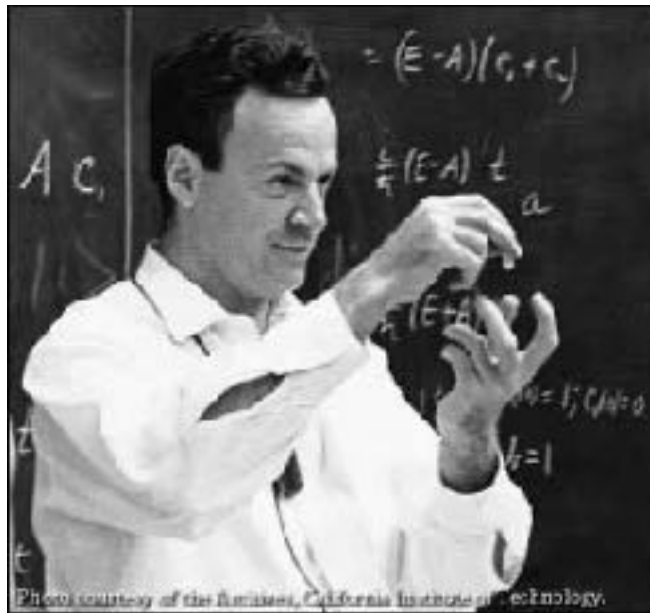
2P besugárzás hatására a zebradánió oldalvonalszerv fejlődése leáll



2P besugárzás

Pásztázó tűszondás mikroszkópia (SPM) Atomi erőmikroszkóp (AFM)

A nanotudományok "álomműszerei"



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



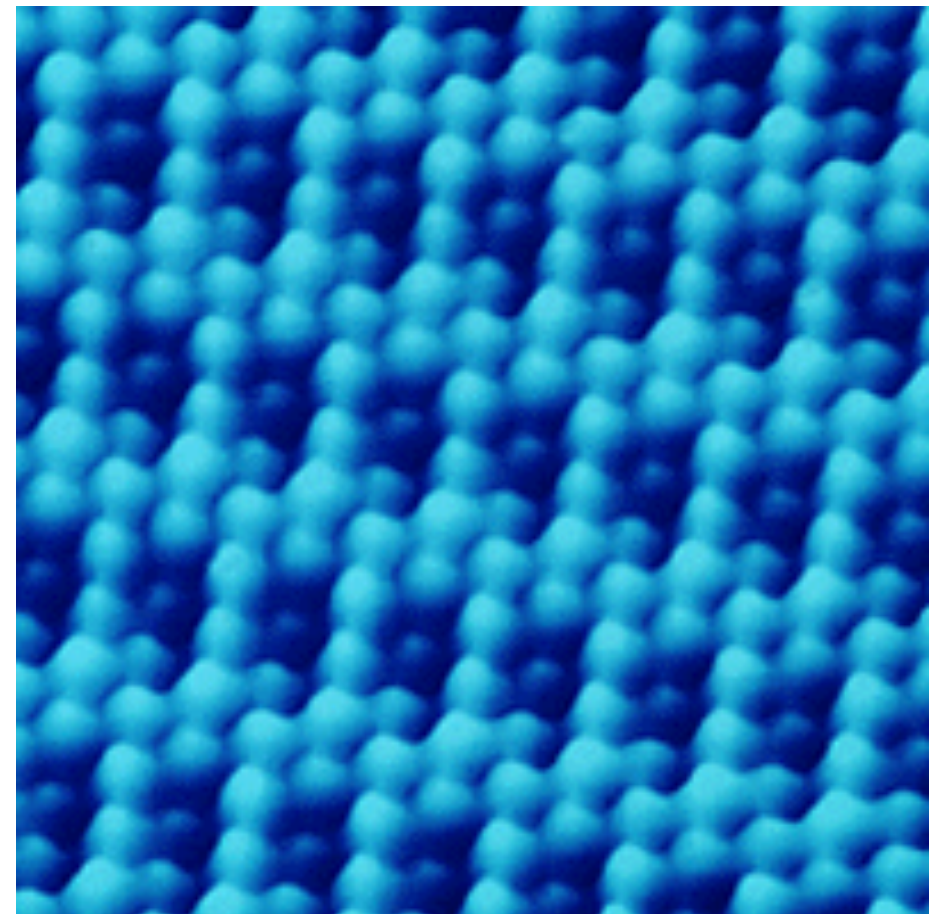
Gerd Binnig



Heinrich Rohrer

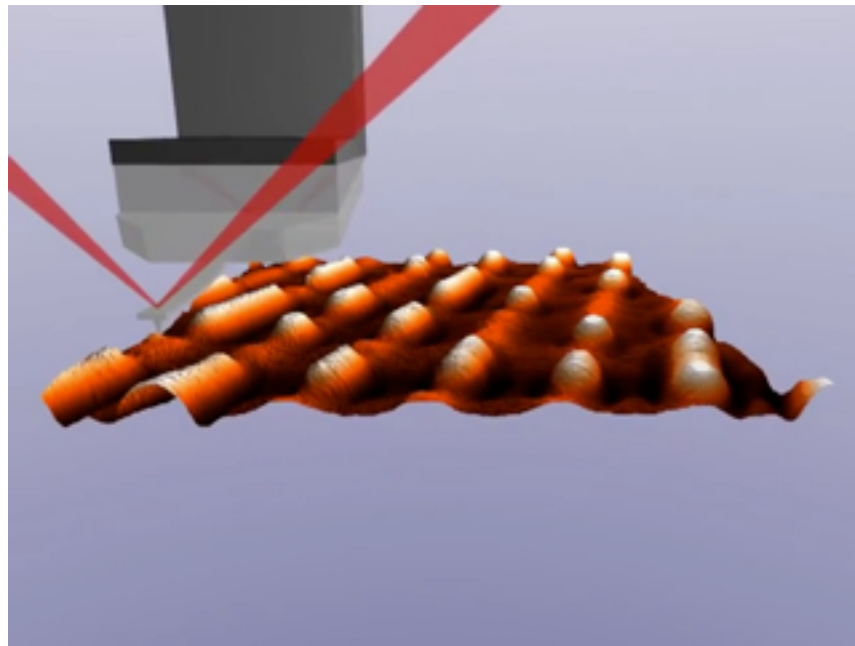
(Nobel-díj
1986)

Oxigén atomok rhodium
egy kristály felületén

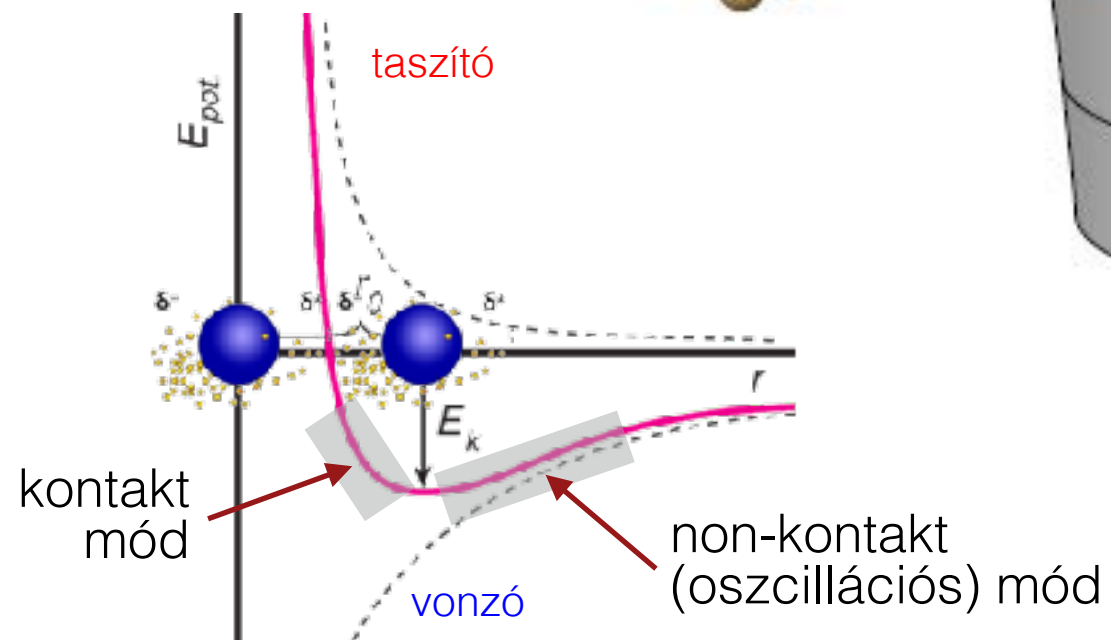


↔
a "nanovilág" léptéke:
1 nanométer

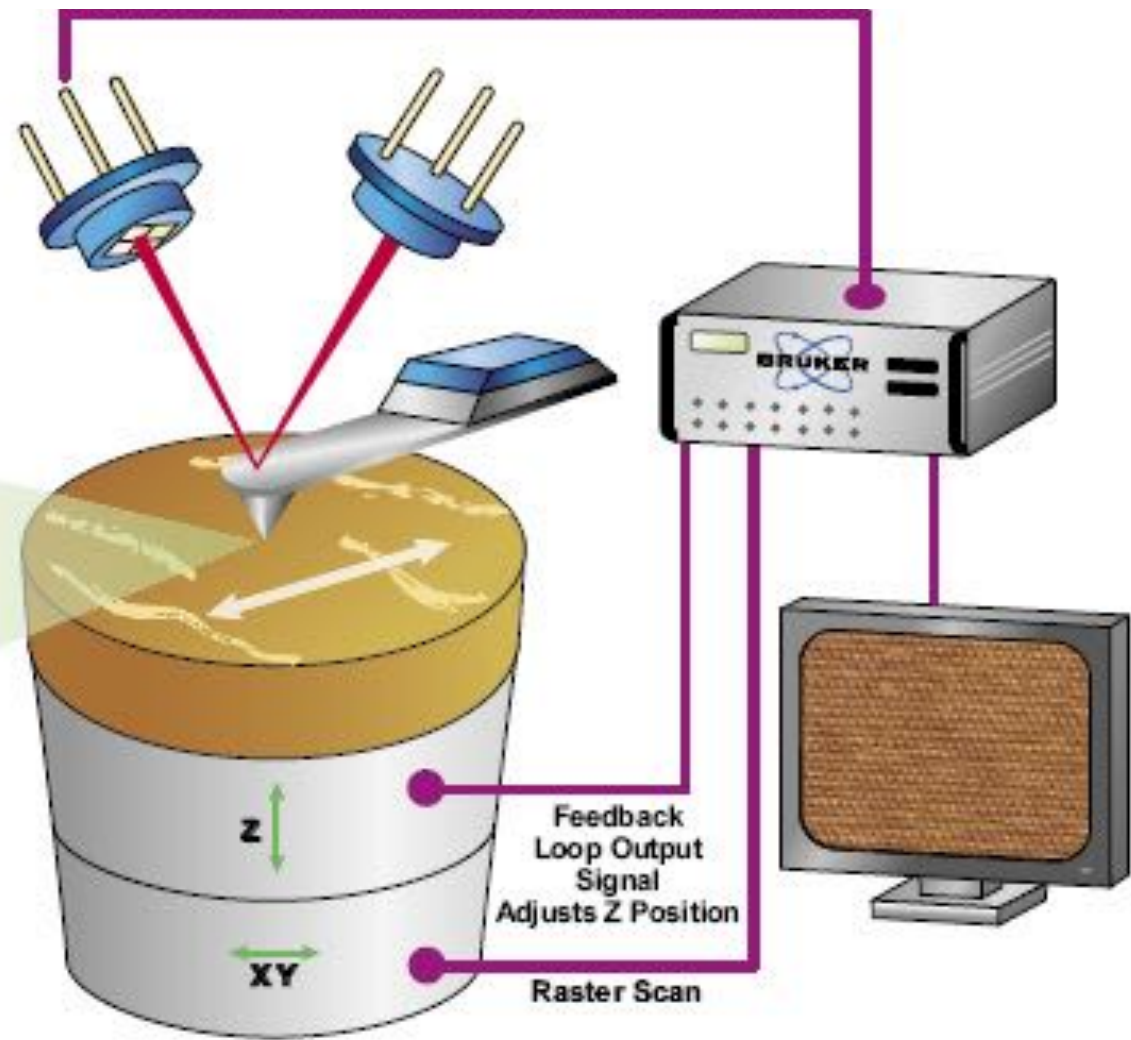
Az atomi erőmikroszkóp (AFM)



1. Van der Waals kölcsönhatás a tű és a minta atomjai között



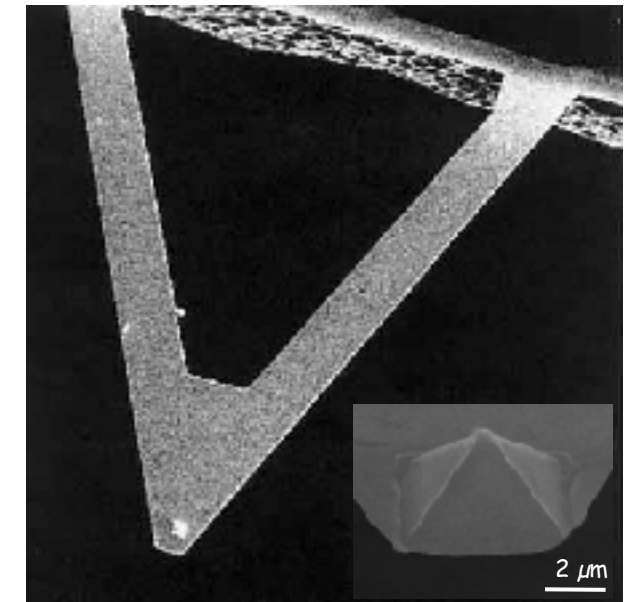
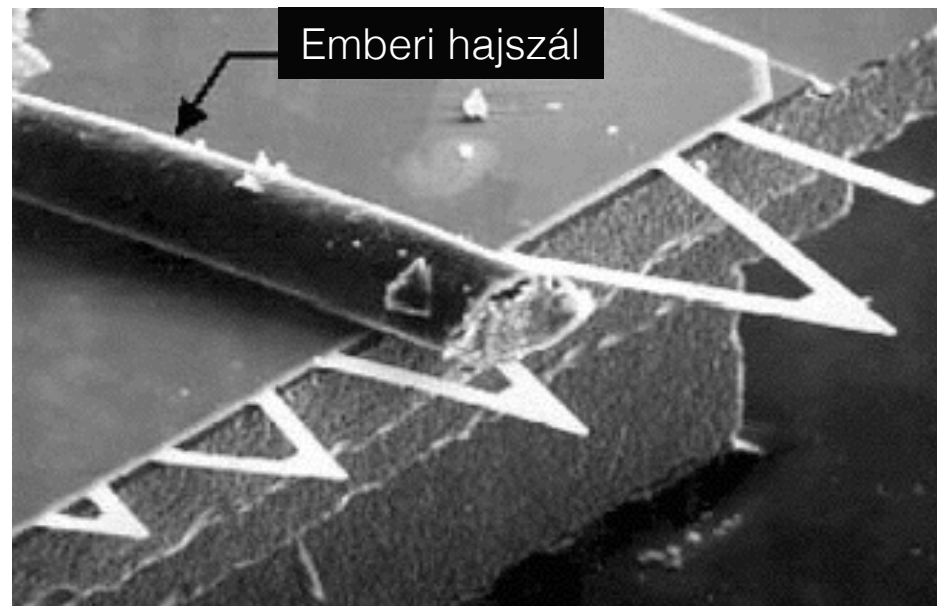
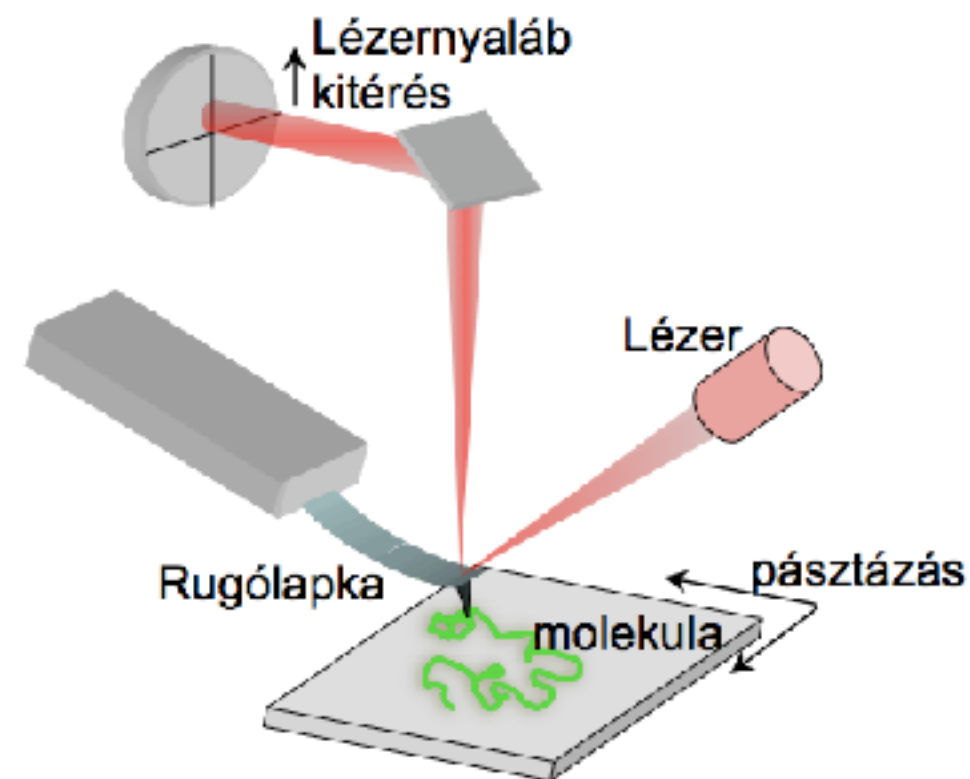
2. egy apró laprugó (rugólapka) elhajlását mérjük egy rávetülő lézerrel



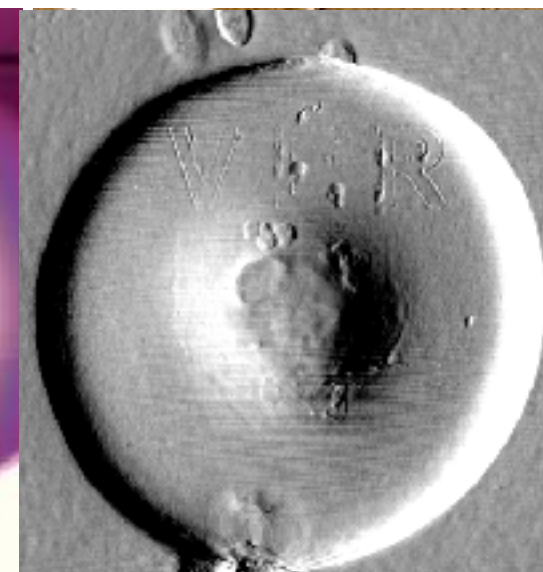
3. a mintát (vagy a rugólapkát) X-Y-Z irányokban mozgatva pásztázunk

Atomi erőmikroszkóp (AFM)

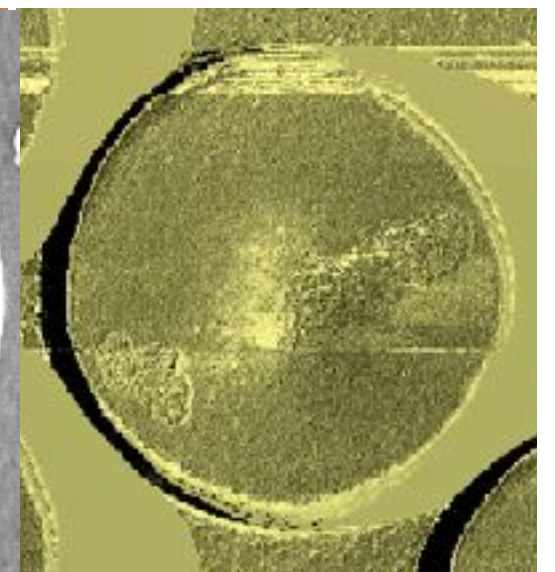
AFM működése



Magasság kontraszt

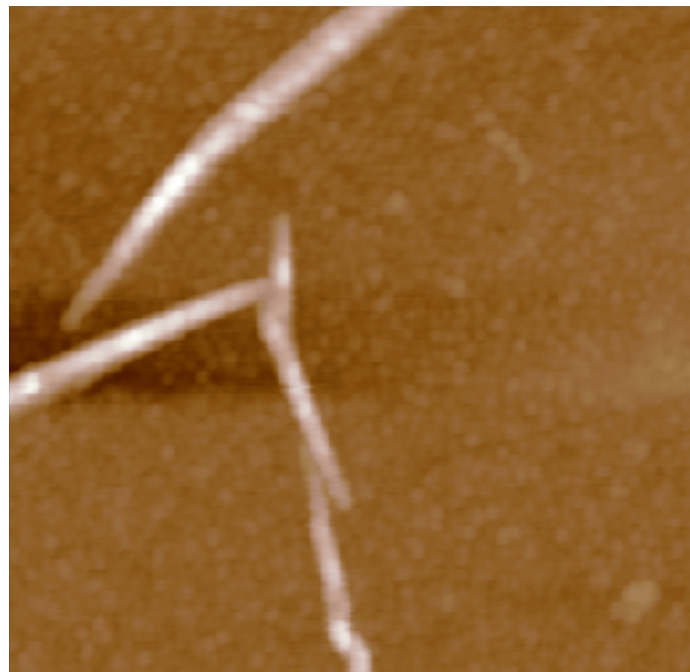


Amplitudó kontraszt

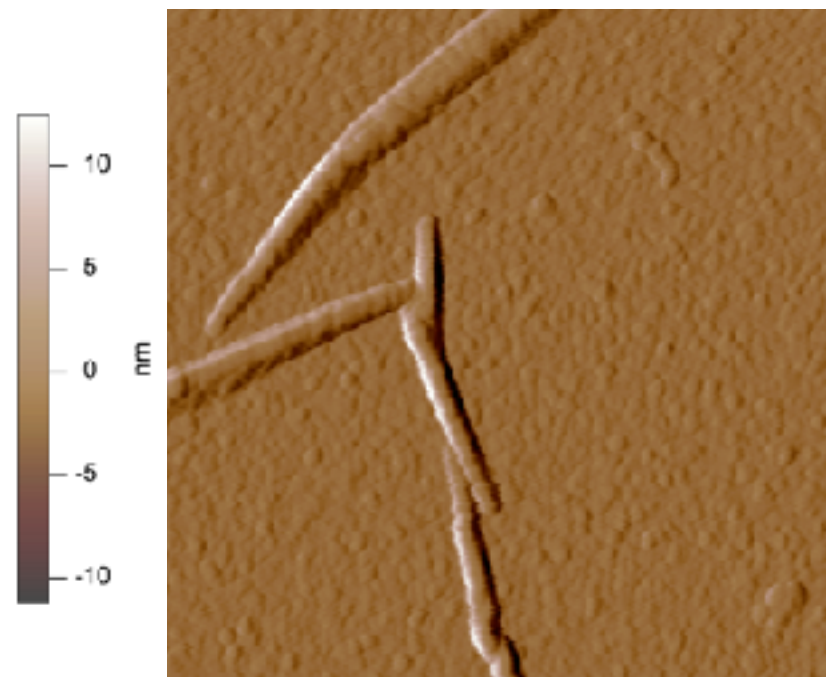


Fázis kontraszt

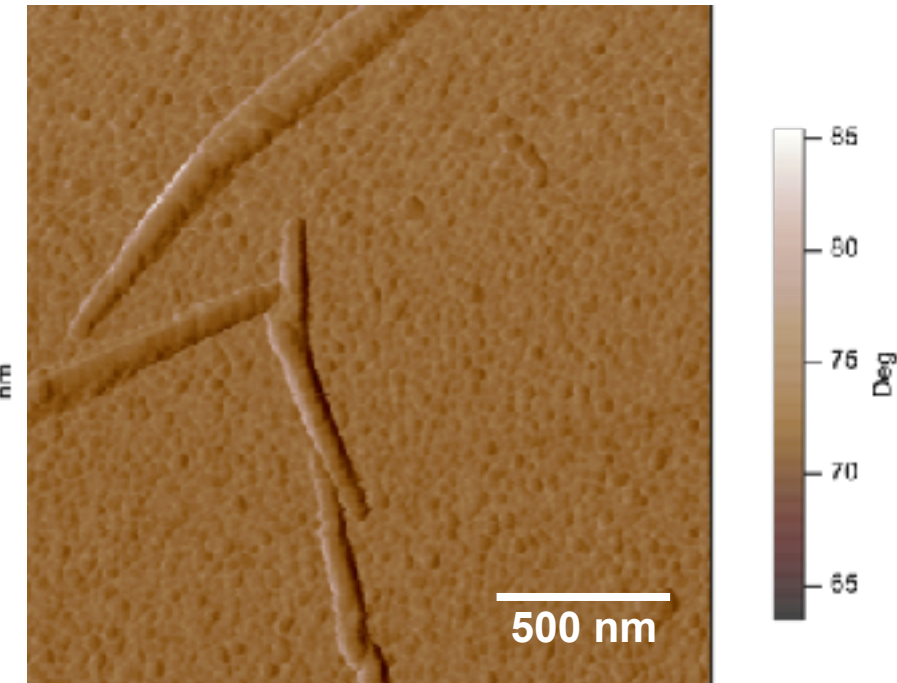
Kontrasztmechanizmusok



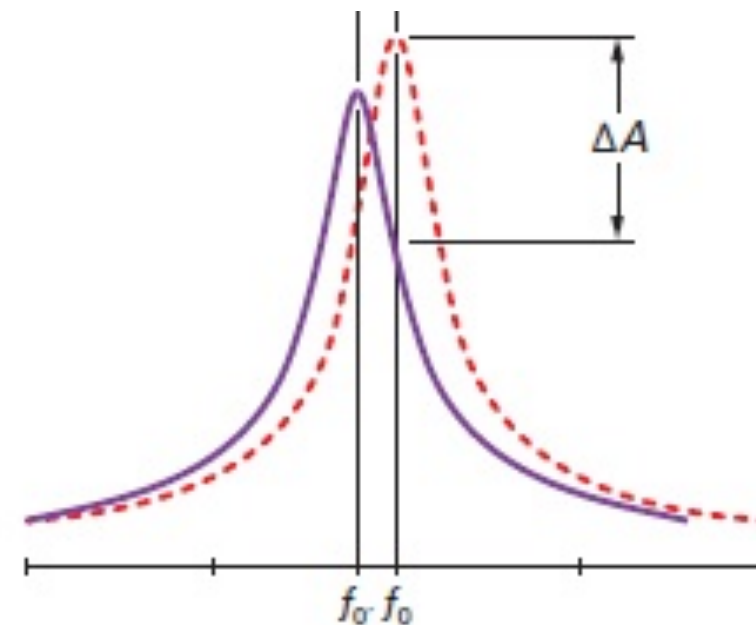
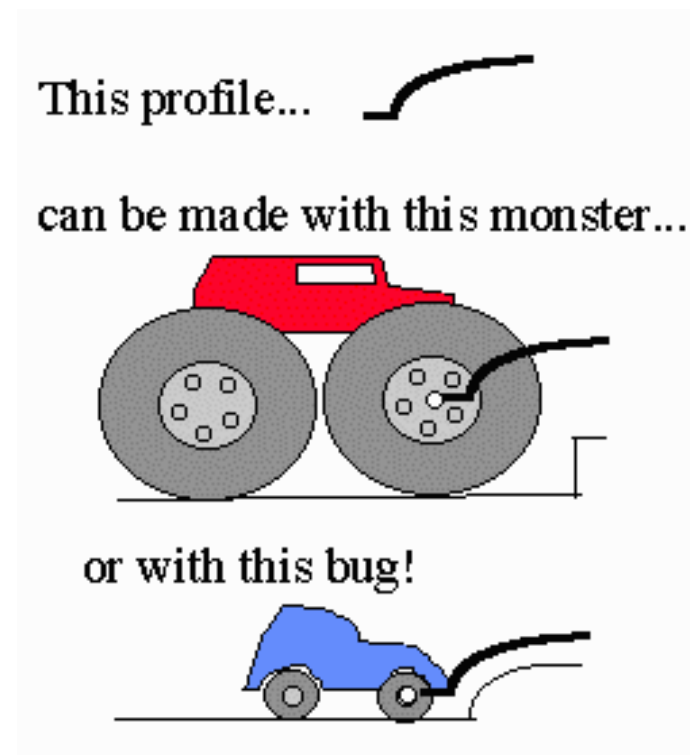
magasság kontraszt



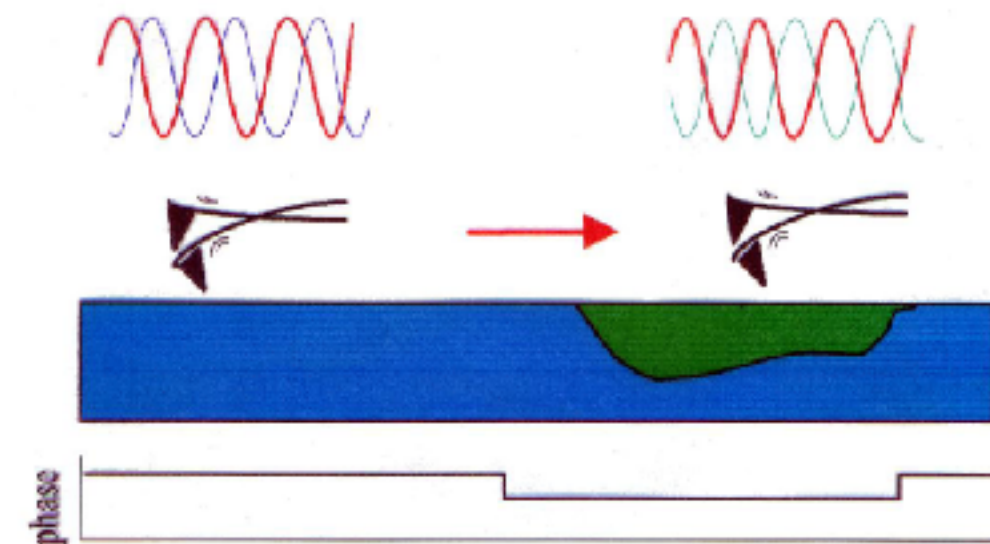
amplitúdó kontraszt



fázis kontraszt



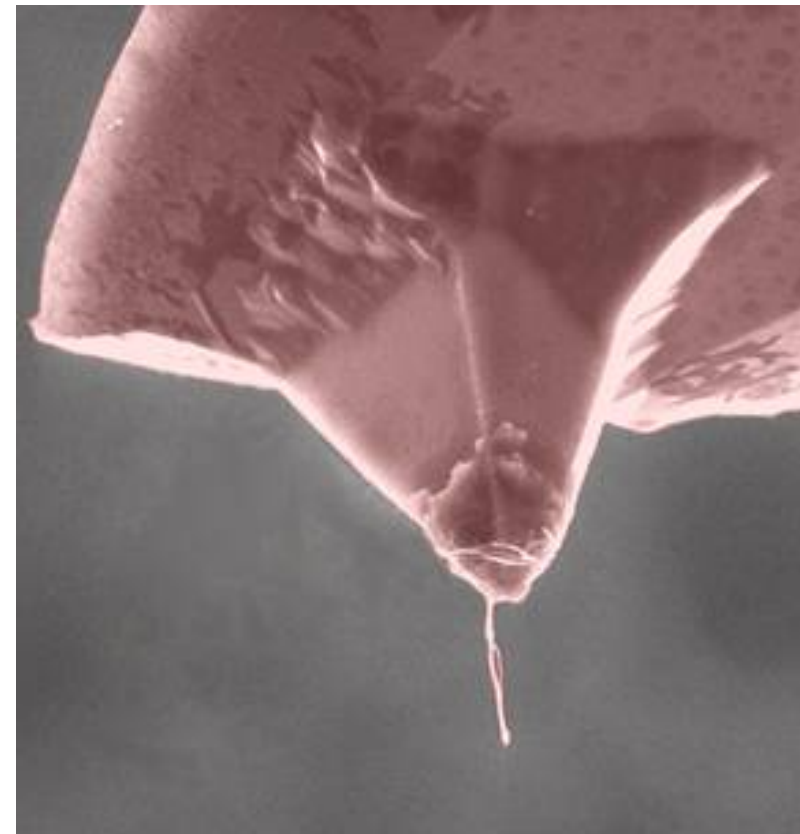
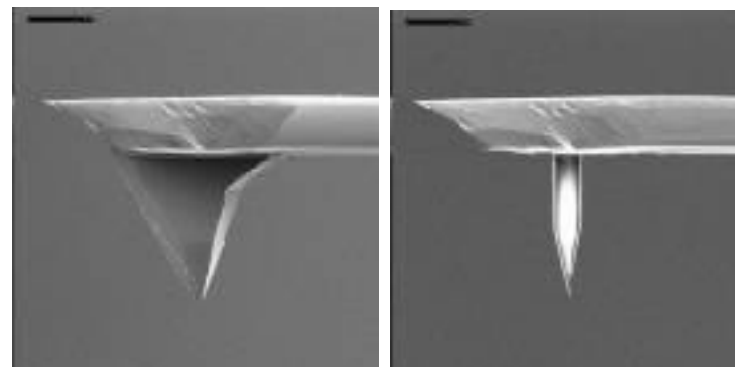
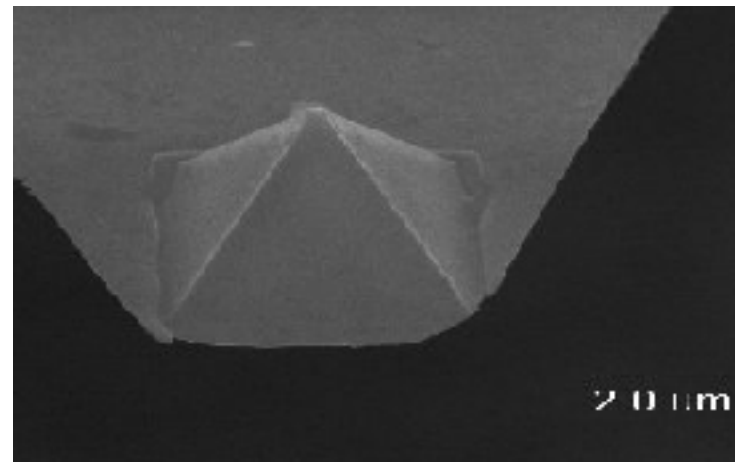
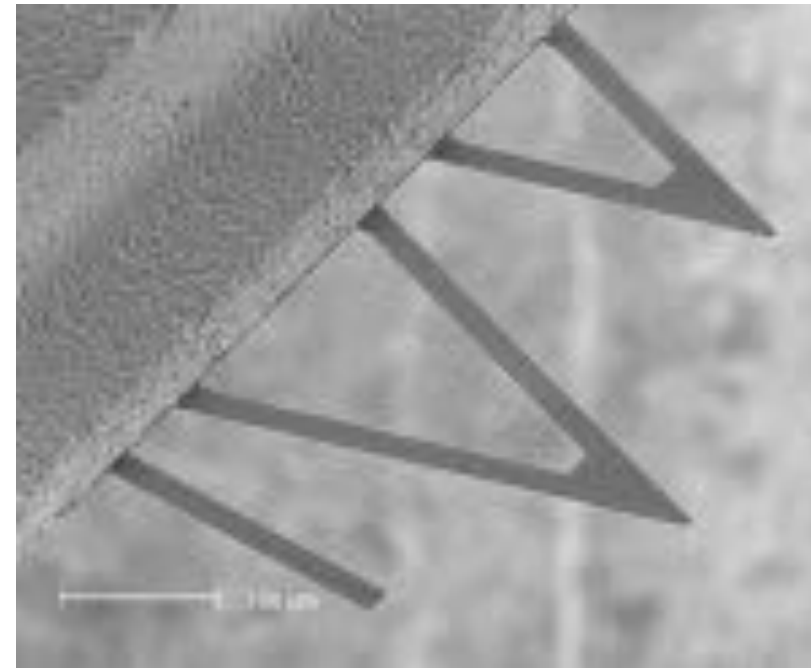
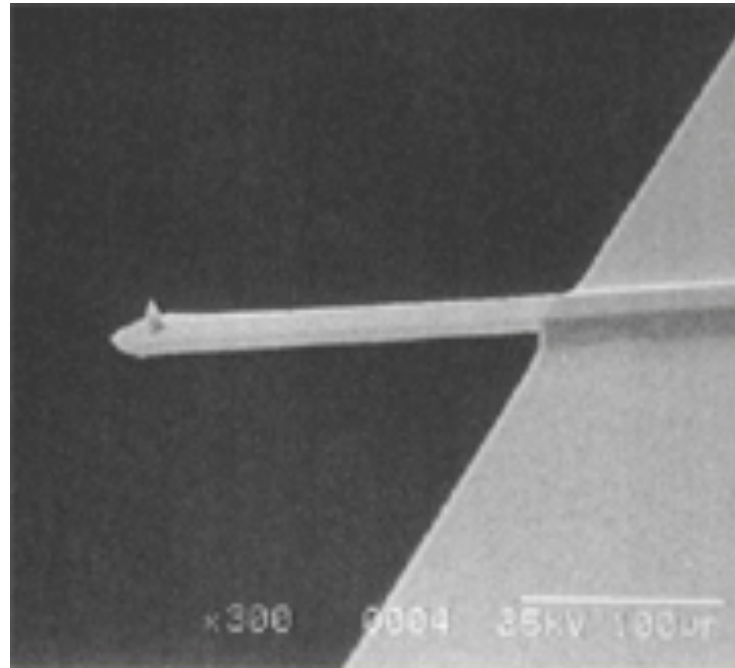
külső erők jelenlétében
„elhangelődő” rezonanciagörbe



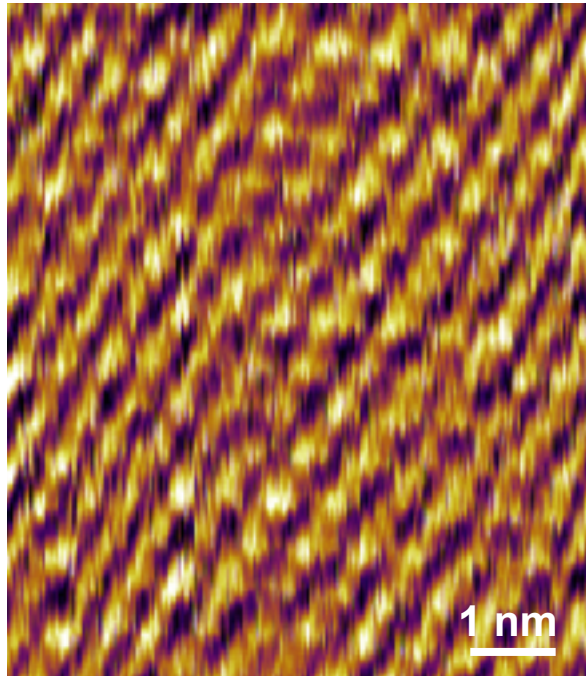
gerjesztő elektromos jel és a rugólapka
sajátrezgésének fáziskülönbsége

AFM Rugólapkák és tűk

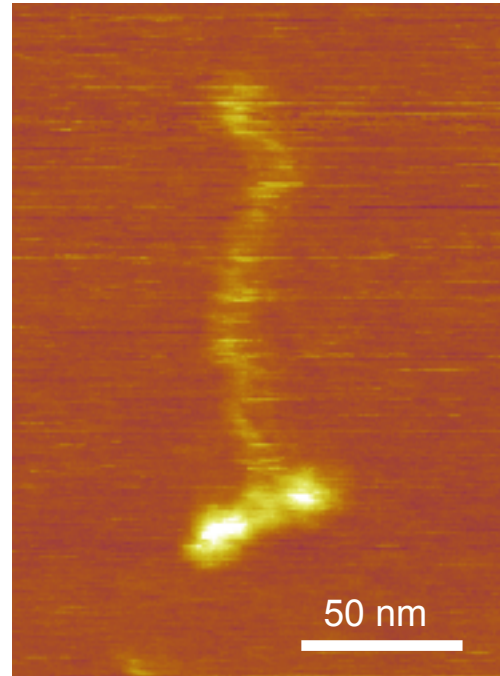
Az AFM kép térbeli feloldóképességét a tű görbületi sugara határozza meg



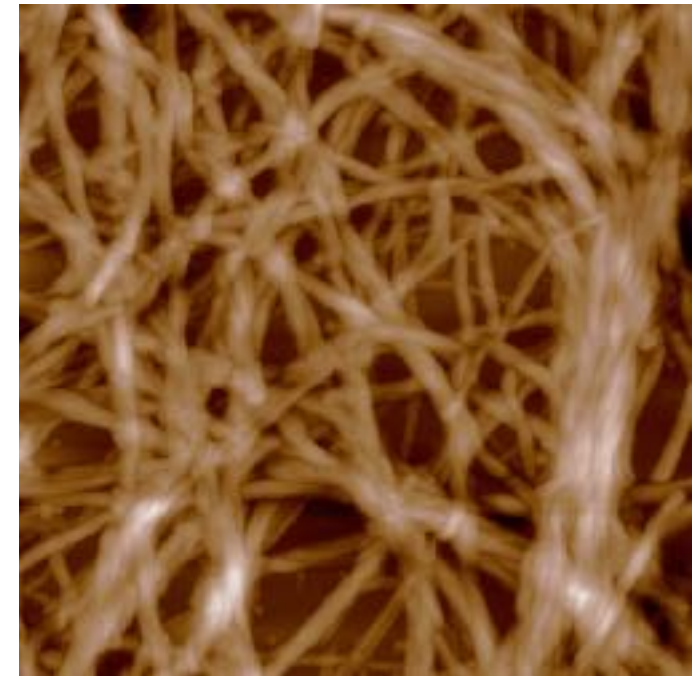
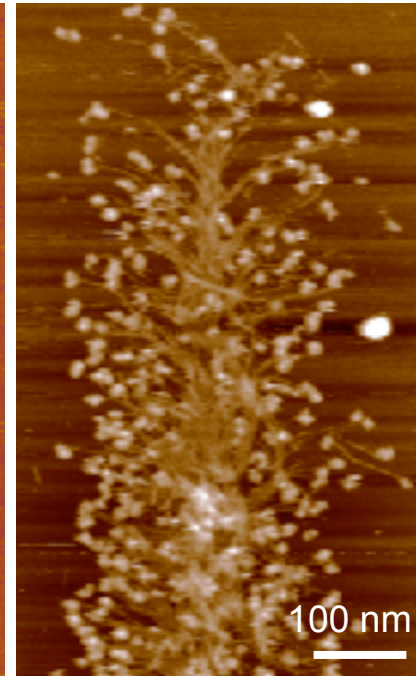
Atomok, molekulák, komplexek AFM képe



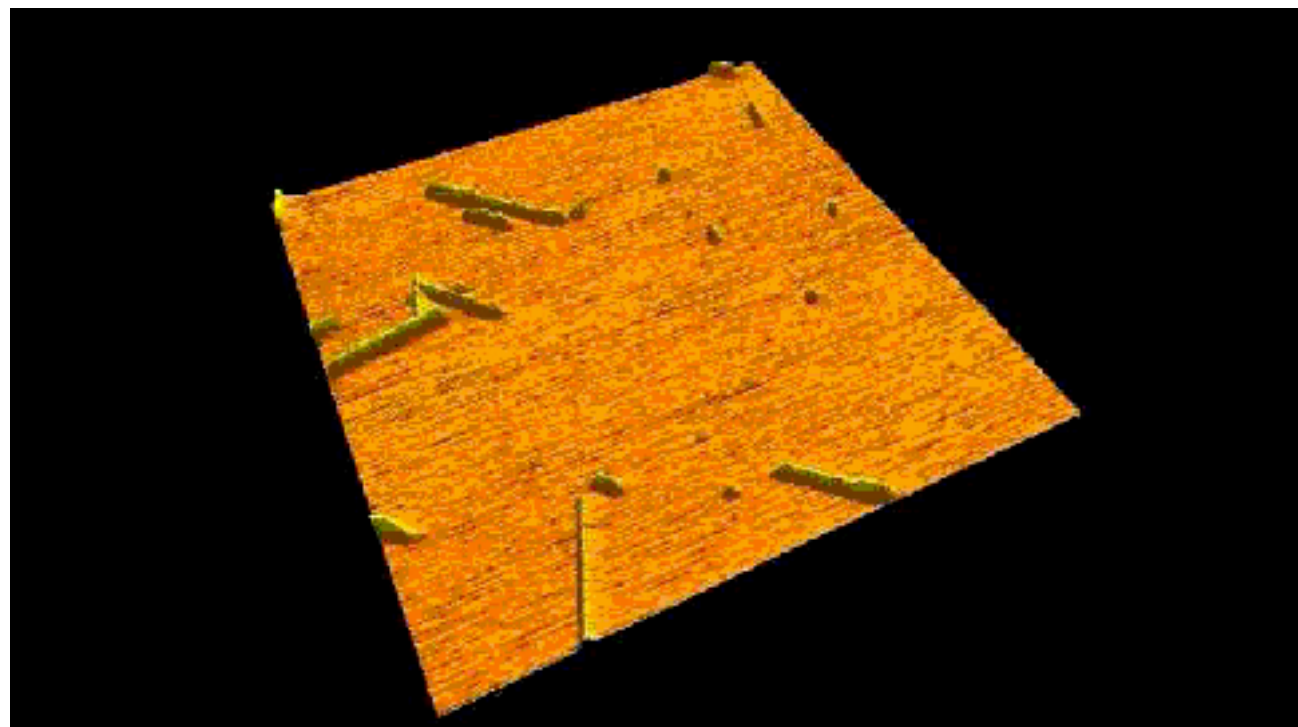
Csillám



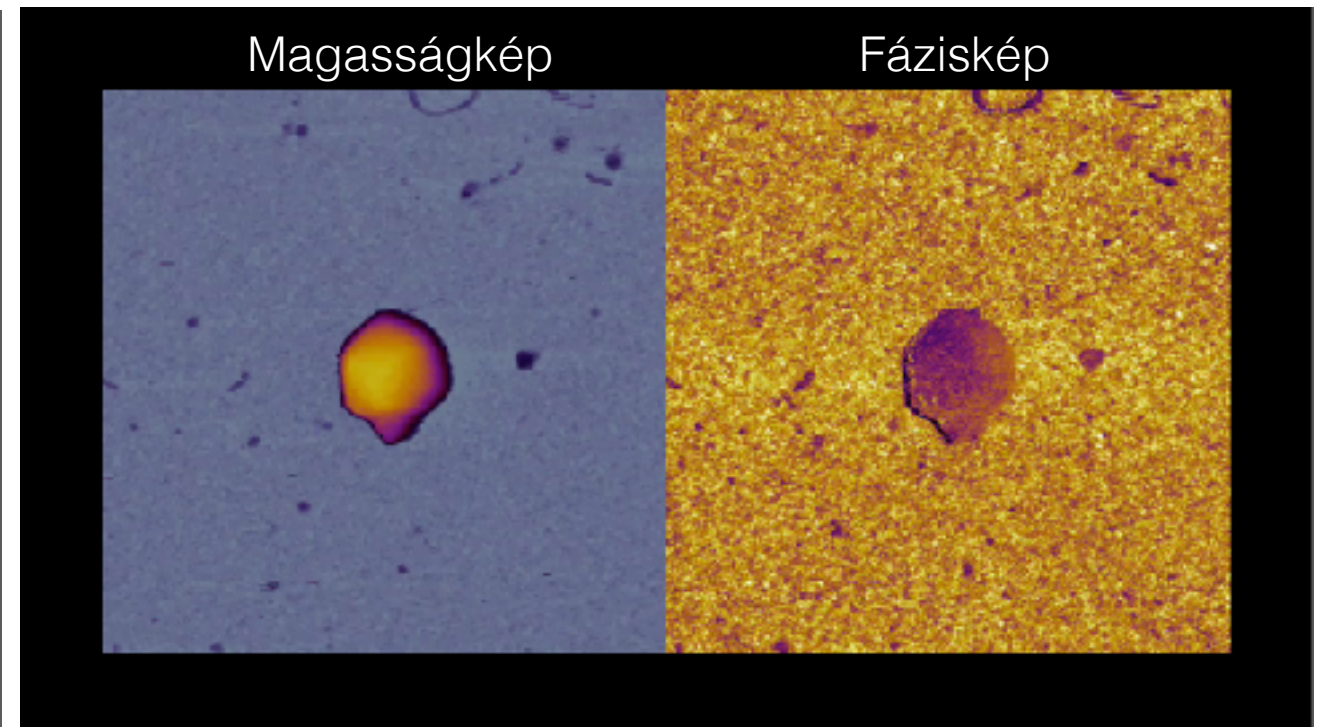
Miozinmolekula és filamentum



Amiloid β 1-40 fibrillumok



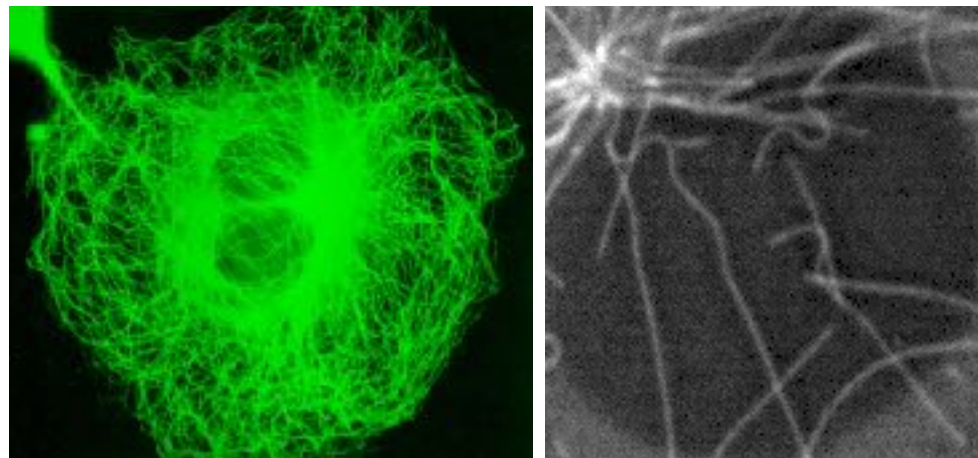
Amiloid fibrillumok növekedése



Vírus DNS kilökődése

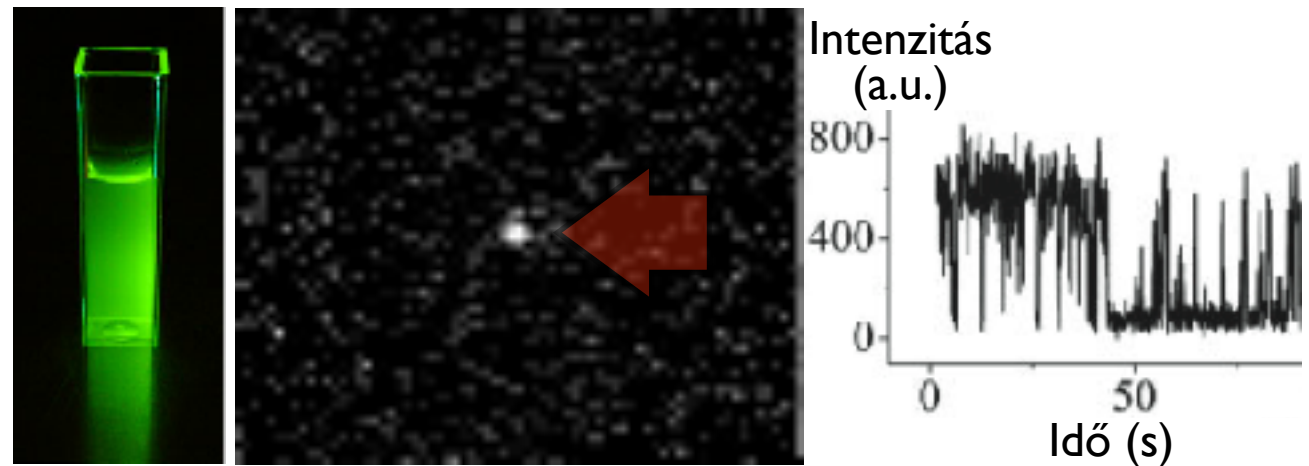
Molekulák - miért egyenként?

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



Sokaság - mikrotubuláris rendszer Egyedi mikrotubulusok - treadmilling

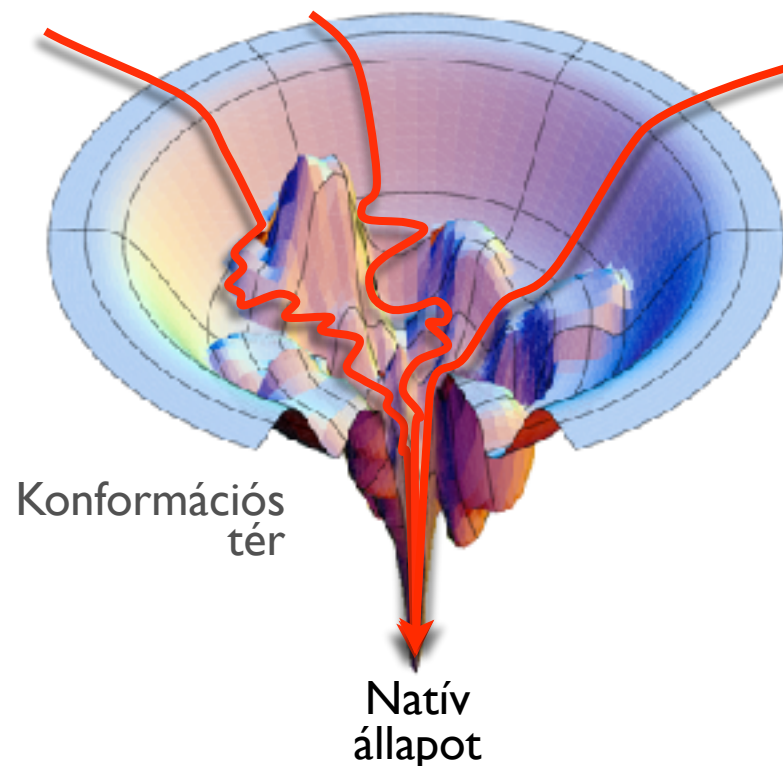
2. Sztochasztikus folyamatokat ismerhetünk meg



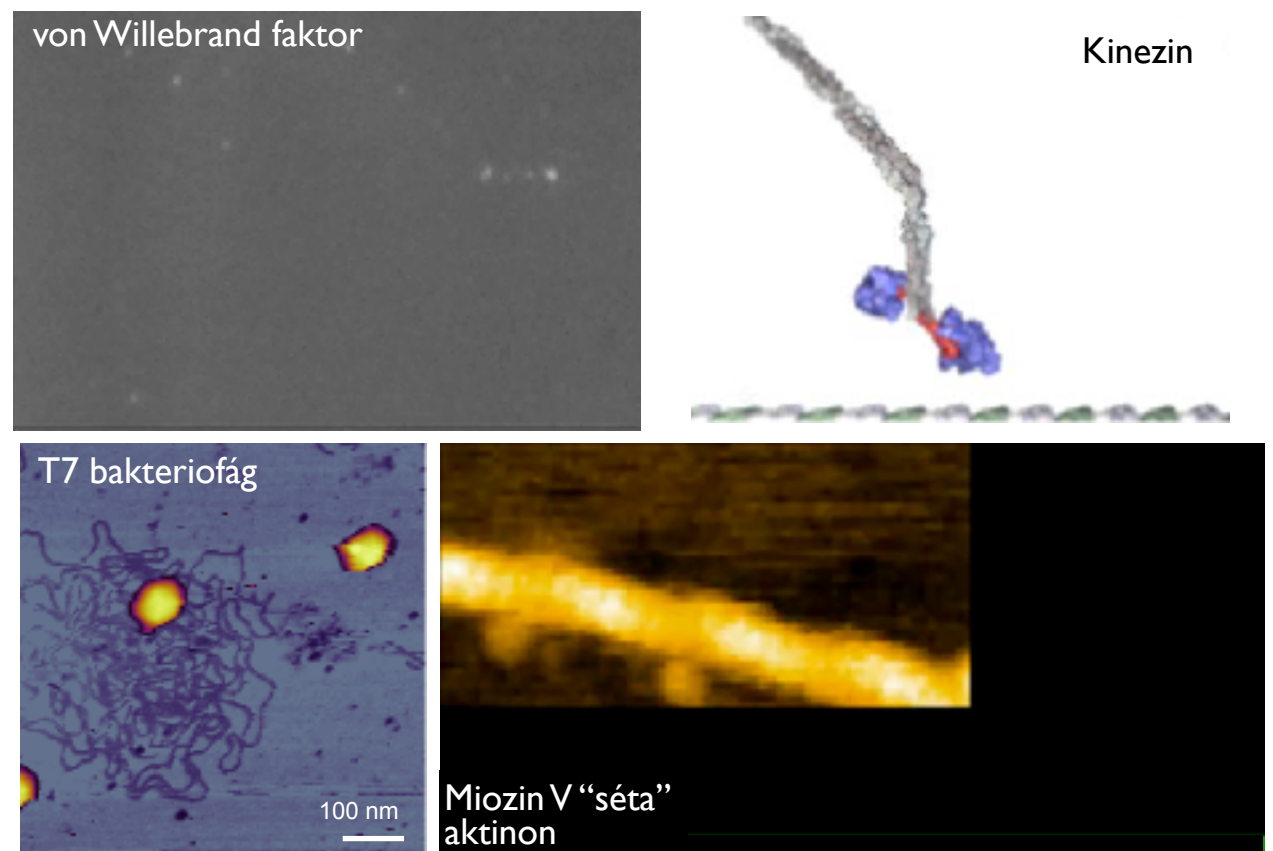
Sokaság - intenzitás Egyedi kvantumpont - pislogás ("blinking")

3. Párhuzamos útvonalakon zajló folyamatokat azonosíthatunk

Kigombolyodott állapot

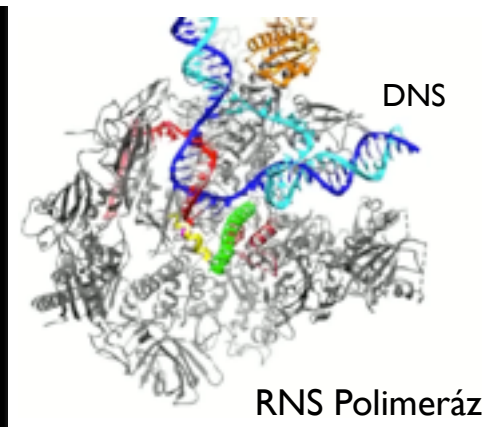


4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük

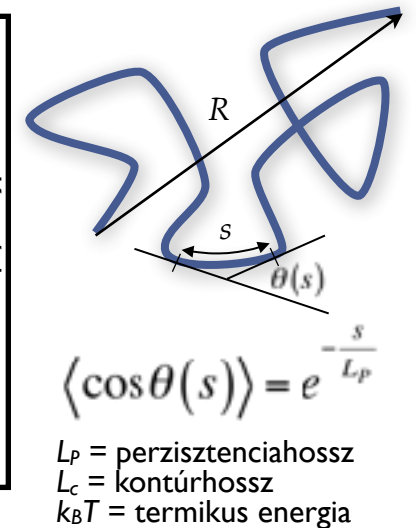
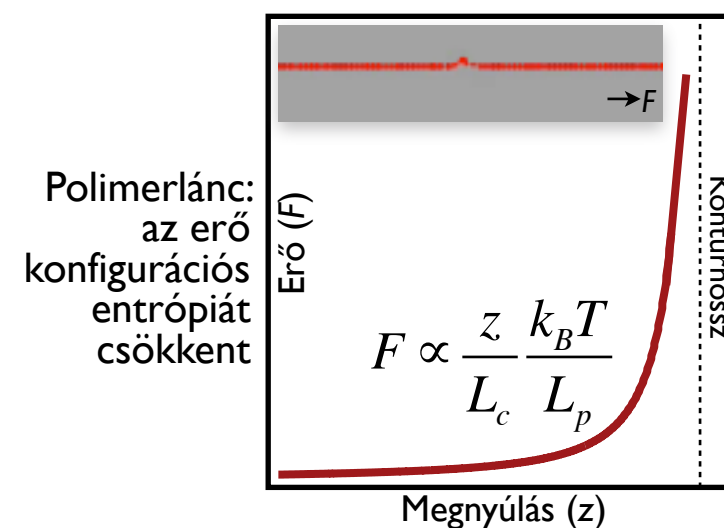
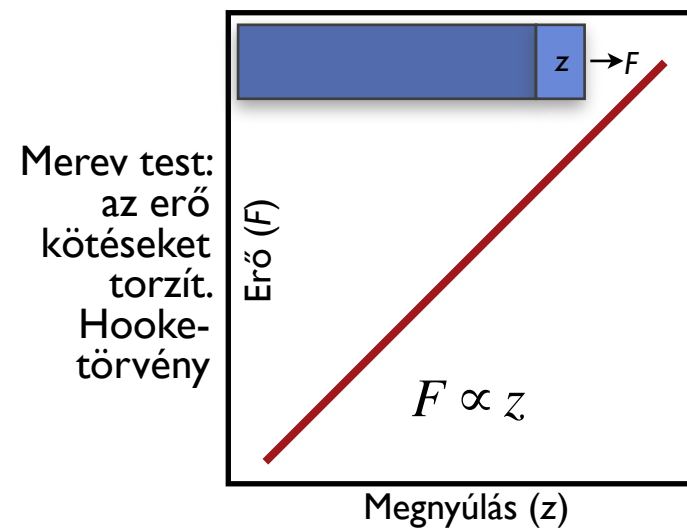


A mechanikai erő...

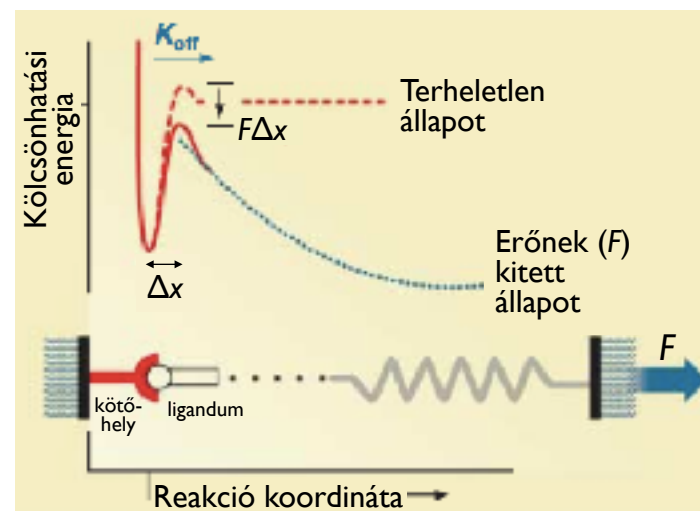
1) kifejlődik:



2) deformálja a szerkezetet:



3) kötések szakít fel:

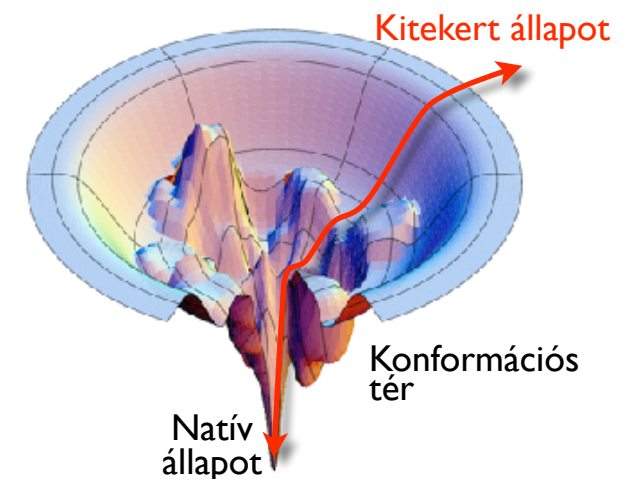


Terhelt kötés élettartama csökken:

$$\tau(F) = \omega e^{-\frac{E_a - F\Delta x}{k_B T}}$$

ω = karakterisztikus idő
 E_a = aktivációs energia
 Δx = távolság a kötött és tranzíciós állapotok között

Kötés	Kovalens	H-híd, elektrosztatikus
Szakítási erő	~nN	~néhány 10 pN

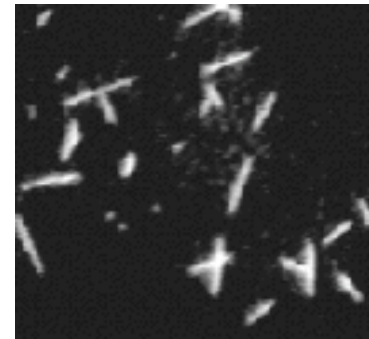


A polimerlánc egyensúlyi alakja és rugalmassága összefügg

Merev lánc

$$l_p \gg L$$

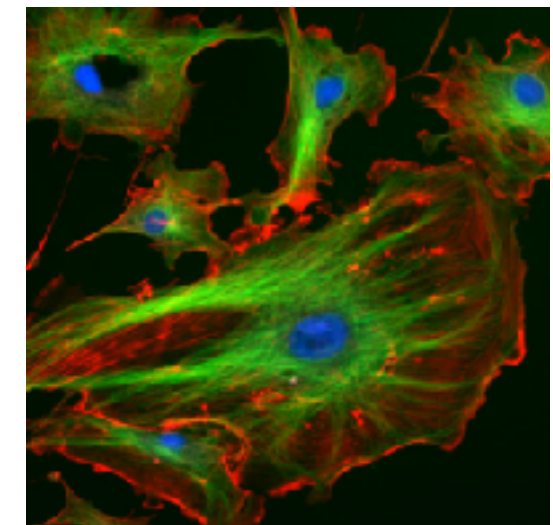
Mikrotubulus



Szemiflexibilis lánc

$$l_p \approx L$$

Mikrofilamentum

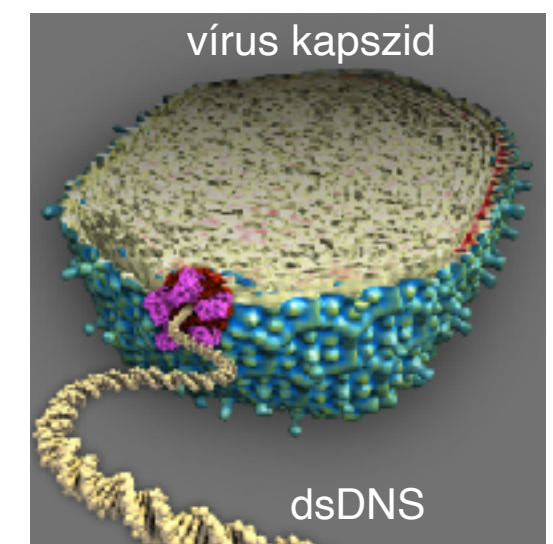
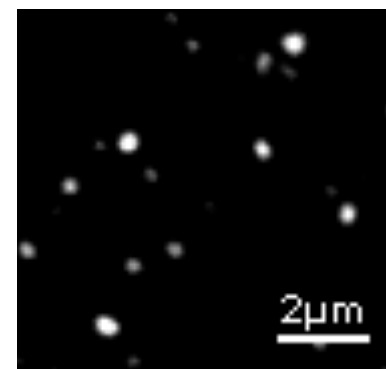
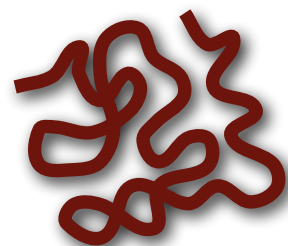


aktin
tubulin

Flexibilis lánc

$$l_p \ll L$$

DNS



l_p = perzisztenciahossz
 L = kontúrhossz

A polimerlánc erővel kinyújtható

$$F \propto \frac{R}{L} \frac{k_B T}{l_P}$$

F = erő

l_P = **perzisztenciahossz**

k_B = Boltzmann állandó

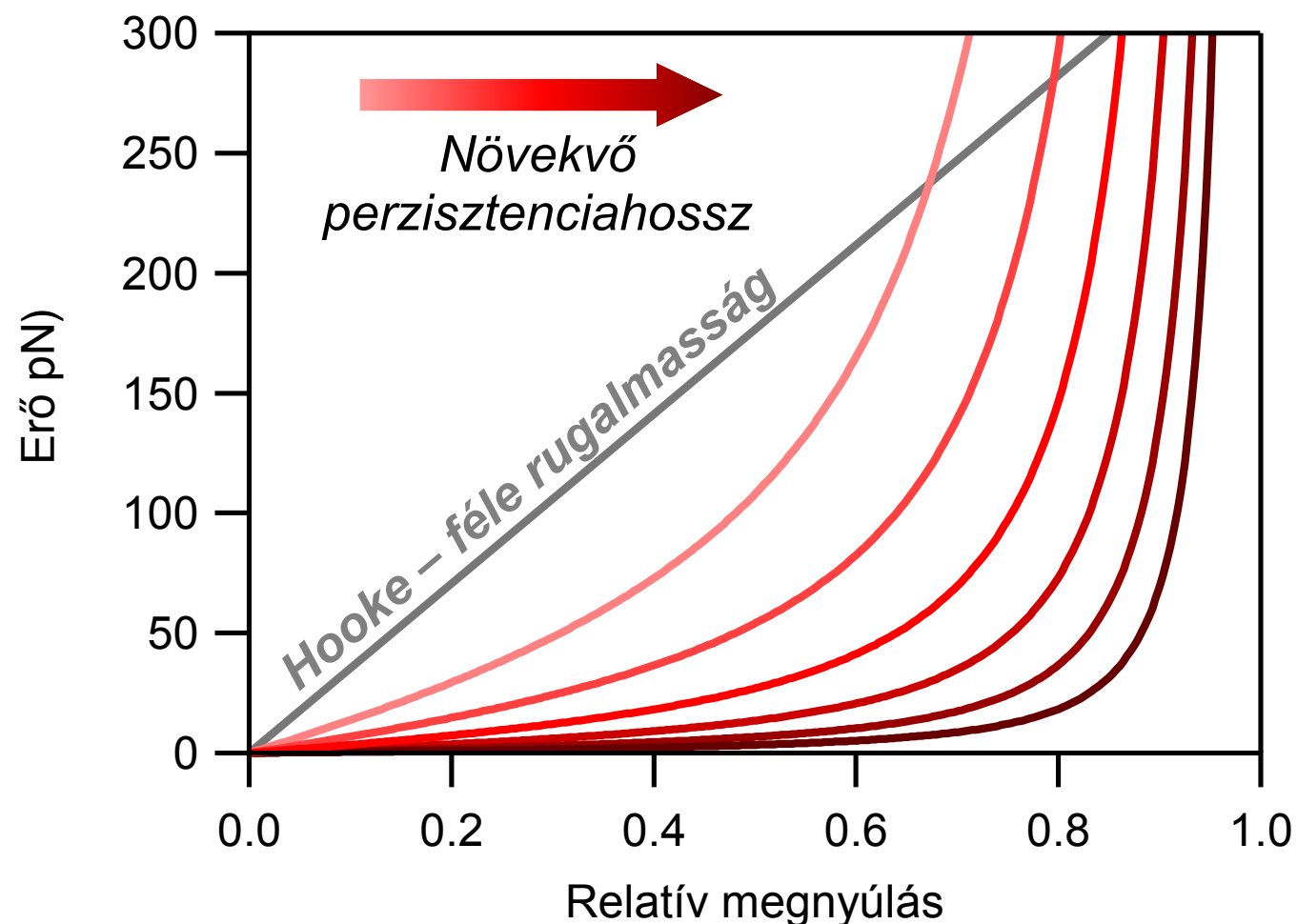
T = abszolút hőmérséklet

L = kontúrhossz

R = vég-vég hossz

R/L = relatív megnyúlás

Nemlineáris erőválasz

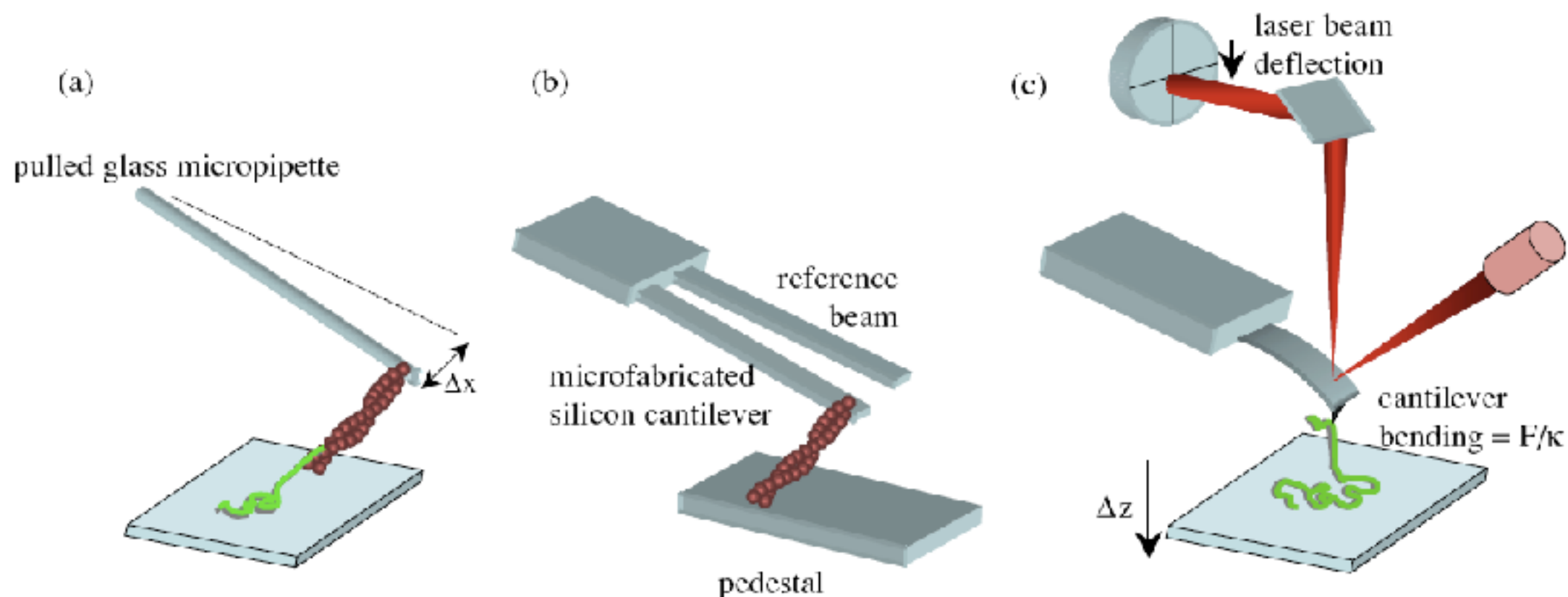


Gough-Joule effektus

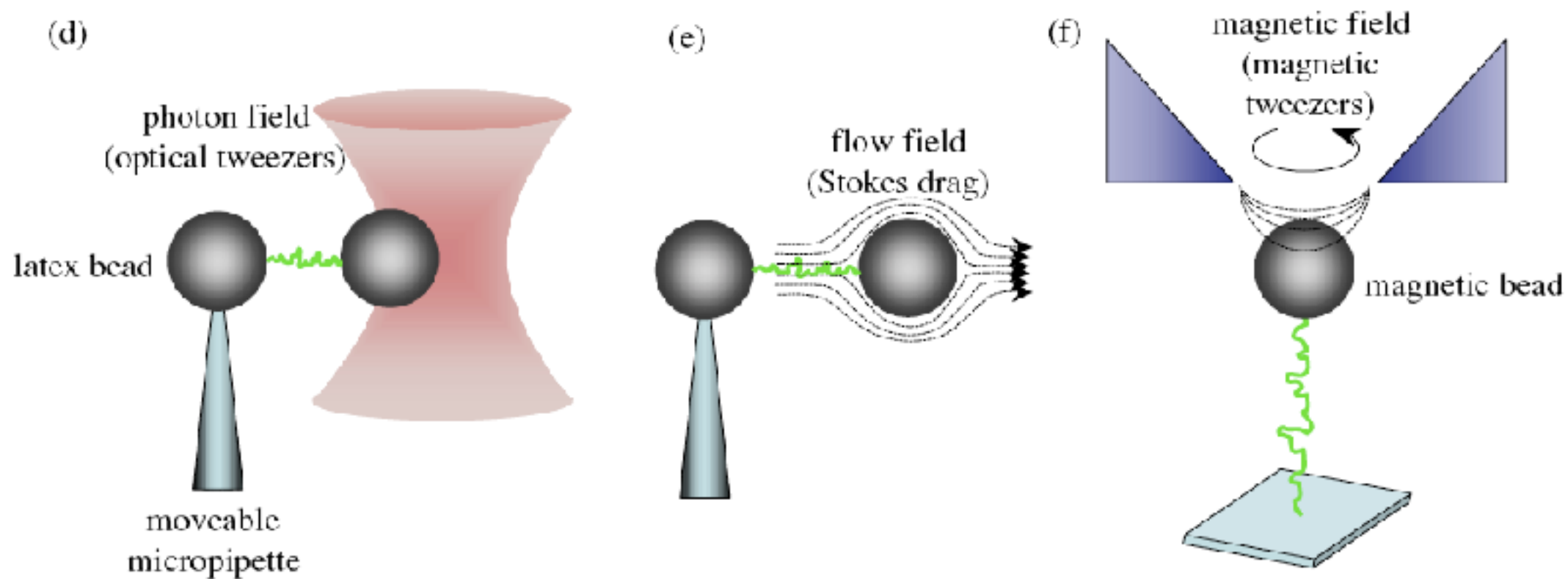


Egyedi molekulák manipulálása

Laprugó
módszerek:



Mező alapú
módszerek:



Különleges mikroszkóp alkalmazás: lézercsipesz

Einstein:
tömeg-energia
ekvivalencia

$$E = mc^2$$

Planck:
sugárzási
törvény

$$E = hf$$

Maxwell:
fény terjedési
sebessége

$$c = \lambda f$$



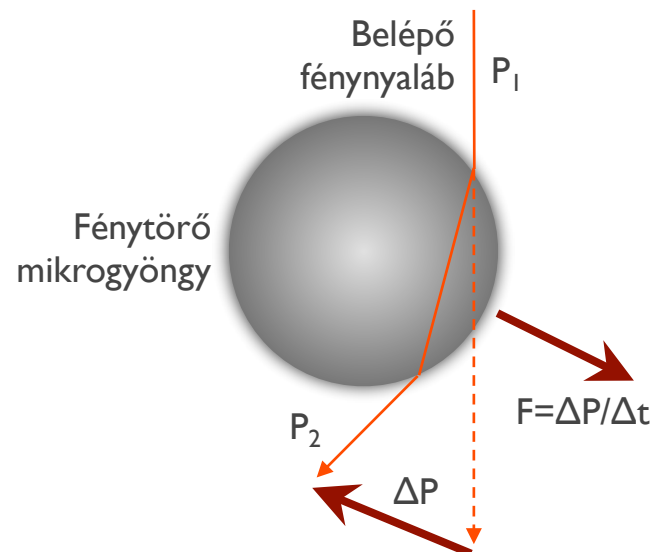
Louis-Victor-Pierre-Raymond, 7th duc de Broglie (1892-1987)

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

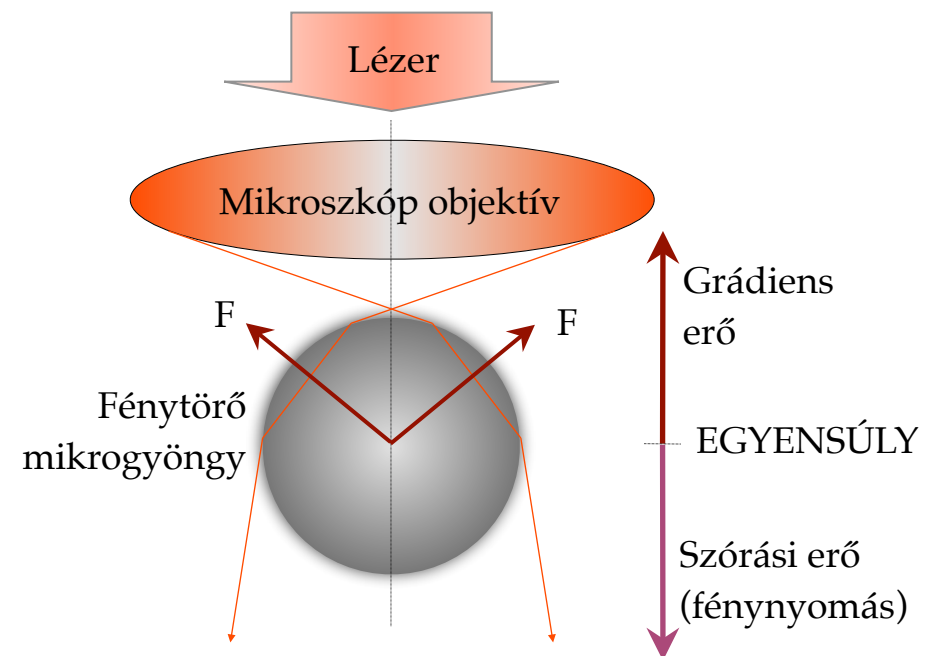
A foton impulzusa:

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

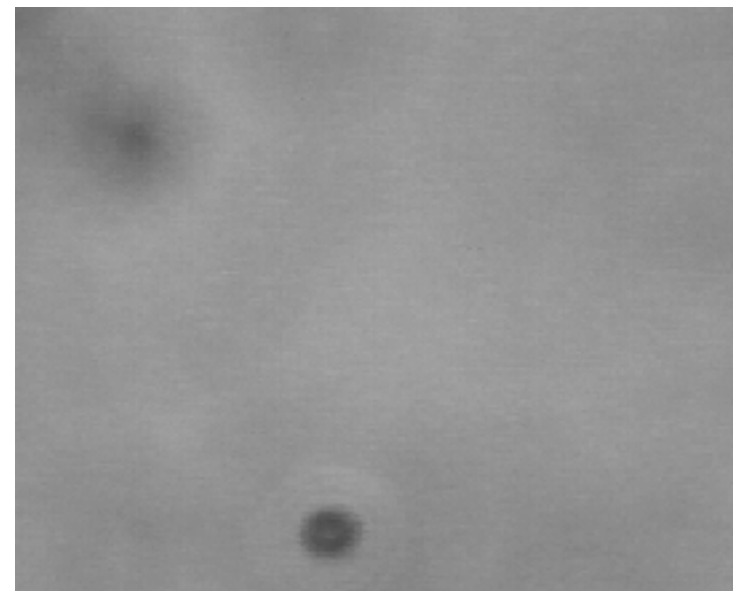
A refrakció fényimpulzus-változással (ΔP) jár:



Fénytörő részecskék “optikai erőkkel” megfoghatók:

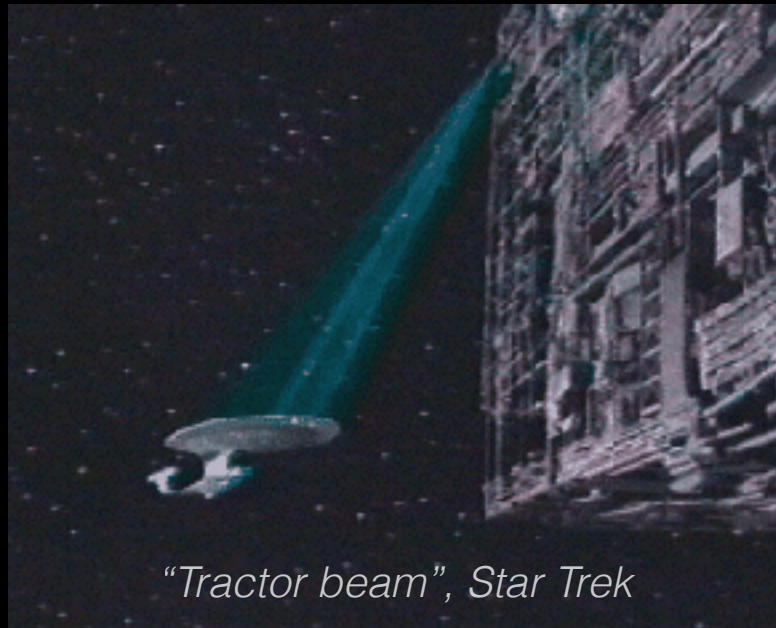


Az **optikai csipeszben** a fotonok és a fénytörő részecske között **impulzuscsere** lép fel



3 μm átmérőjű latex (polistírol) mikrogöngyök optikai csipeszben

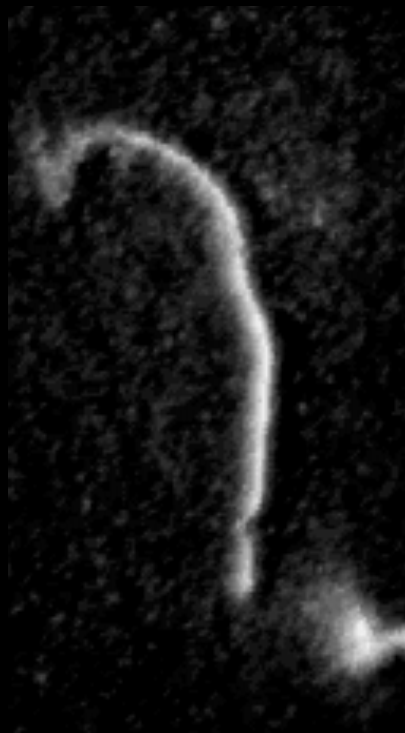
Biomolekula manipulálás fénnnyel



E. coli baktériumsejt



Aktin
filamentum



DNS

Fáziskontraszt kép



Fluoreszcencia kép



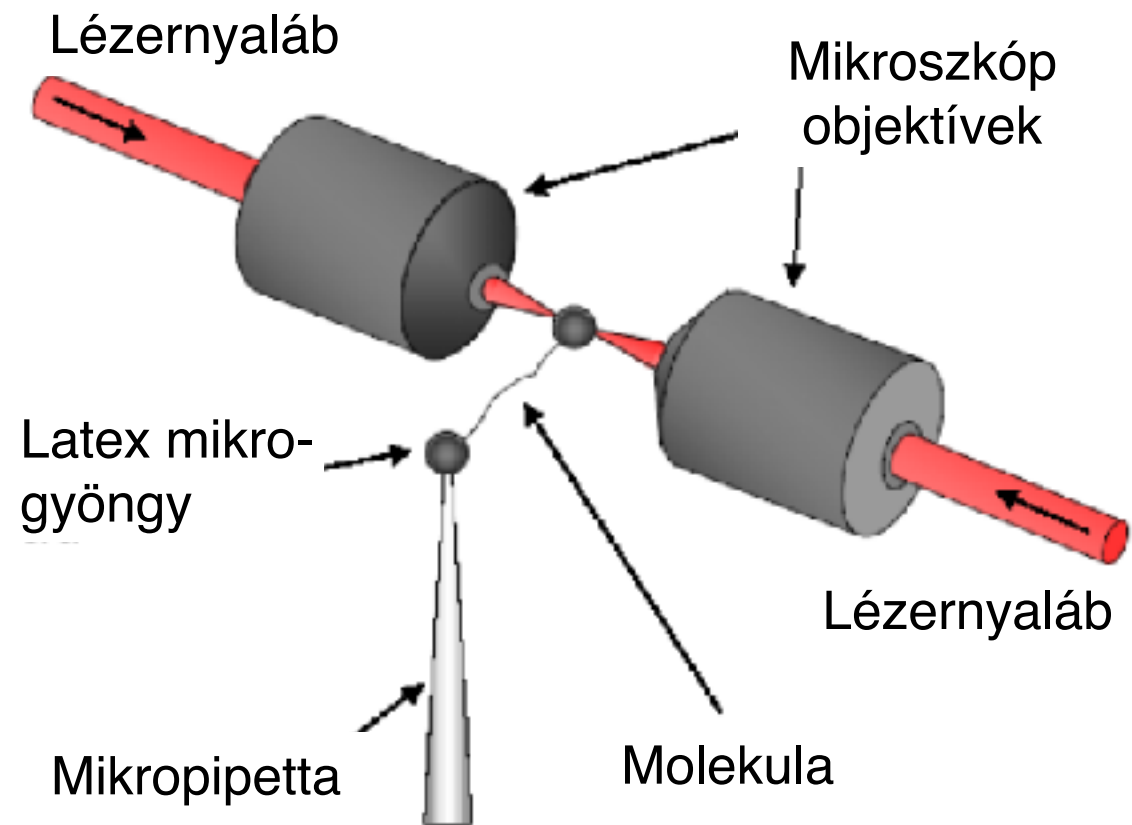
MOLEKULA - FOGANTYÚ GEOMETRIA

mikrogyöngy ~ 1 μm

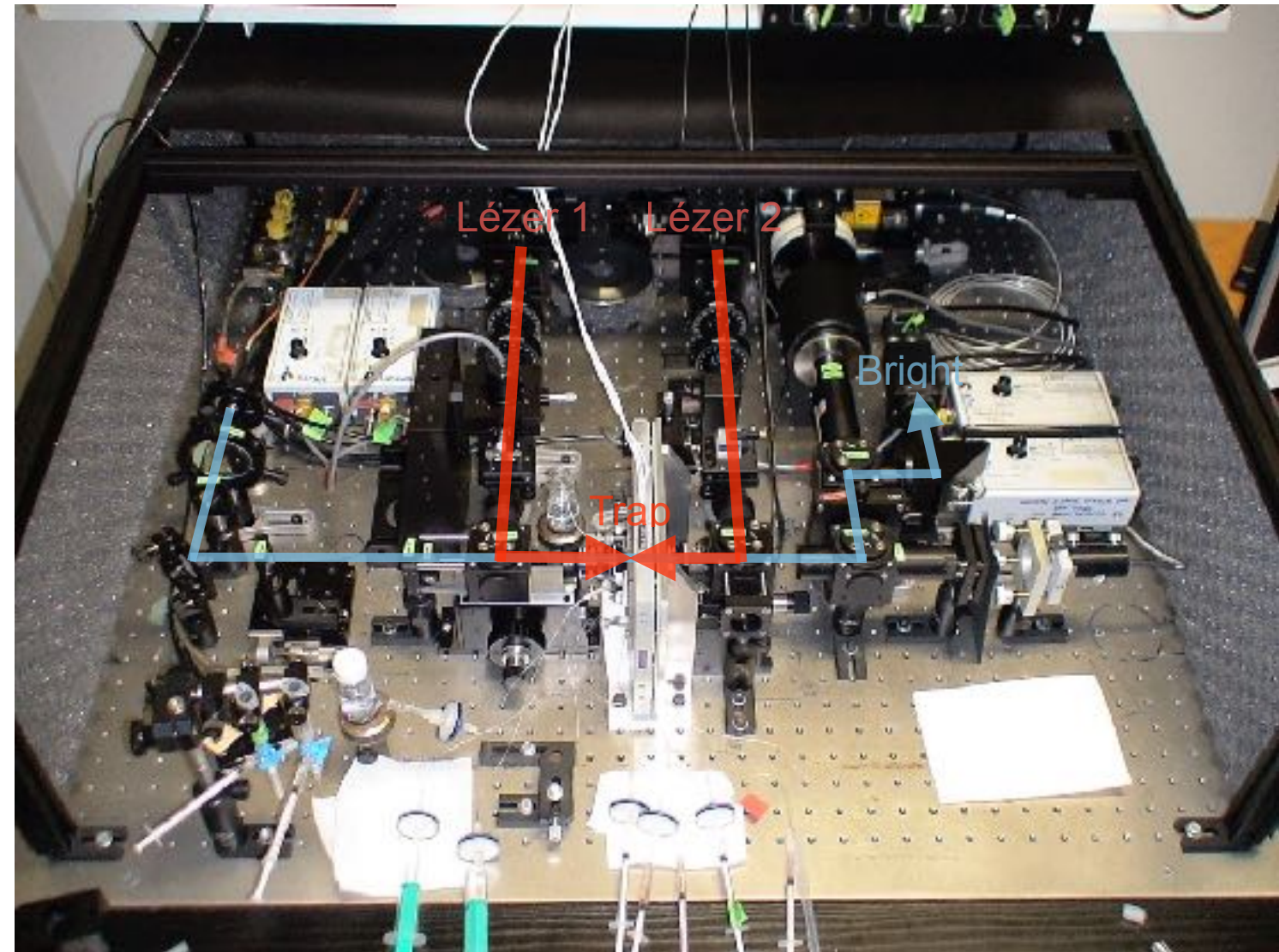


molekula ~ 10 nm

A lézercsipeszel erőt is lehet mérni



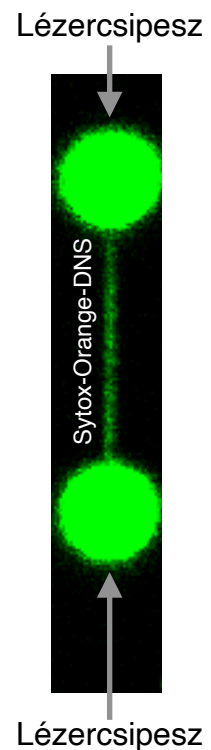
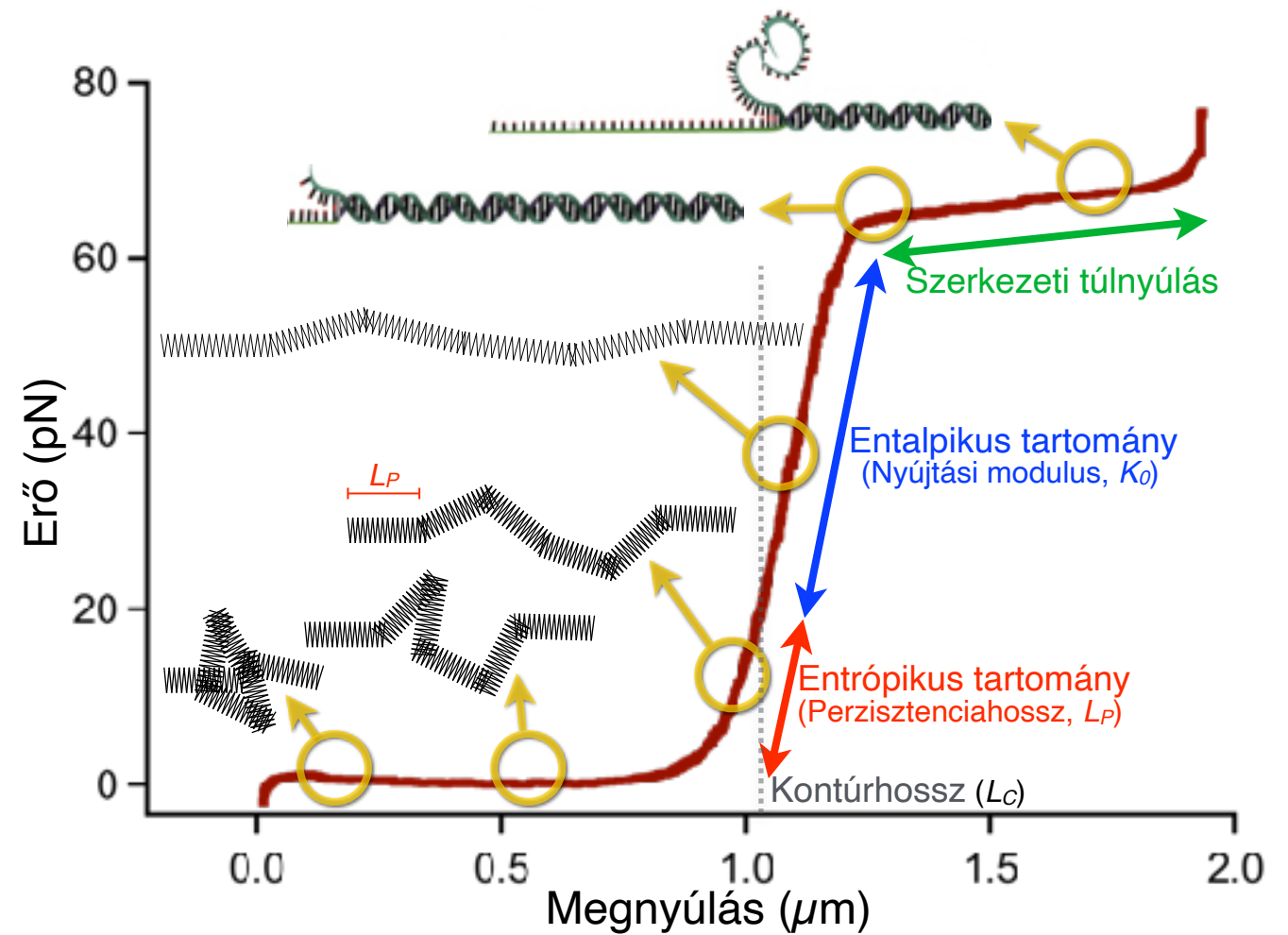
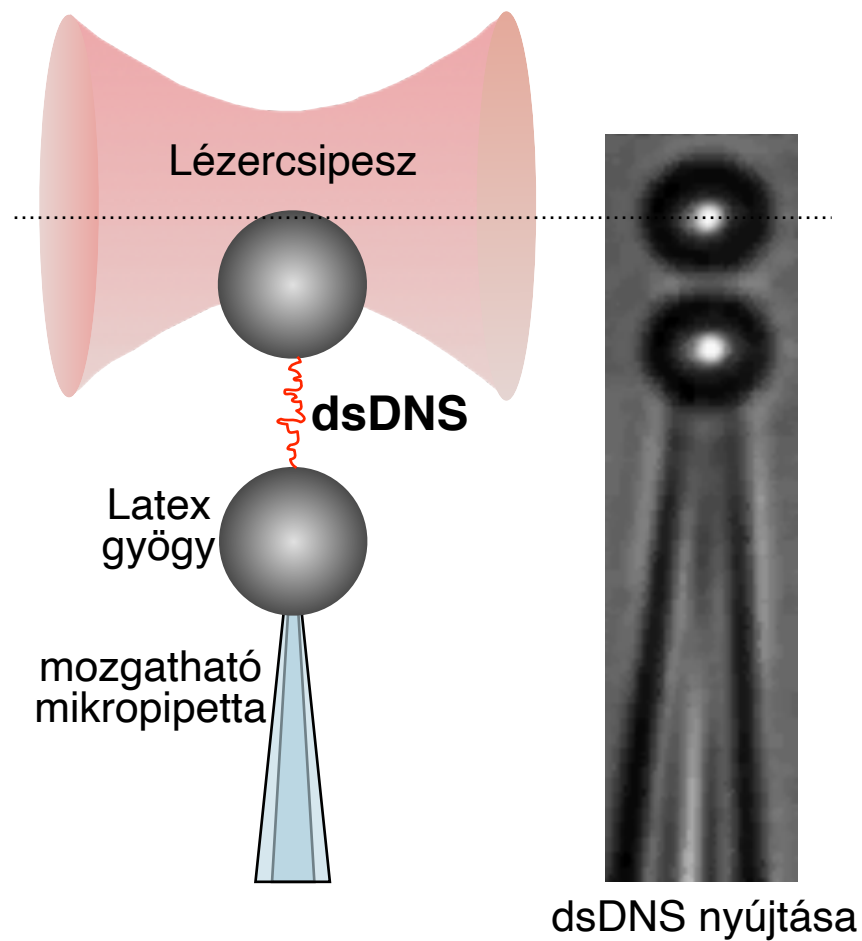
Két lézersugaras optikai csipesz berendezés



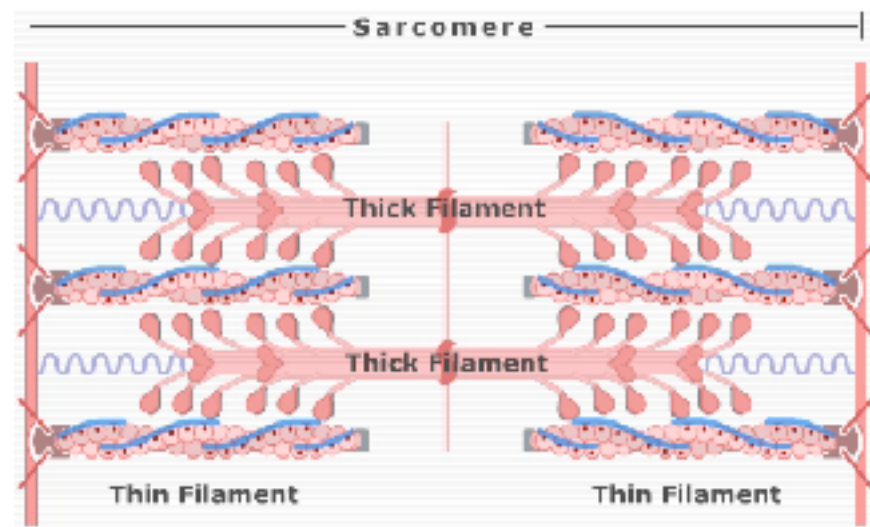
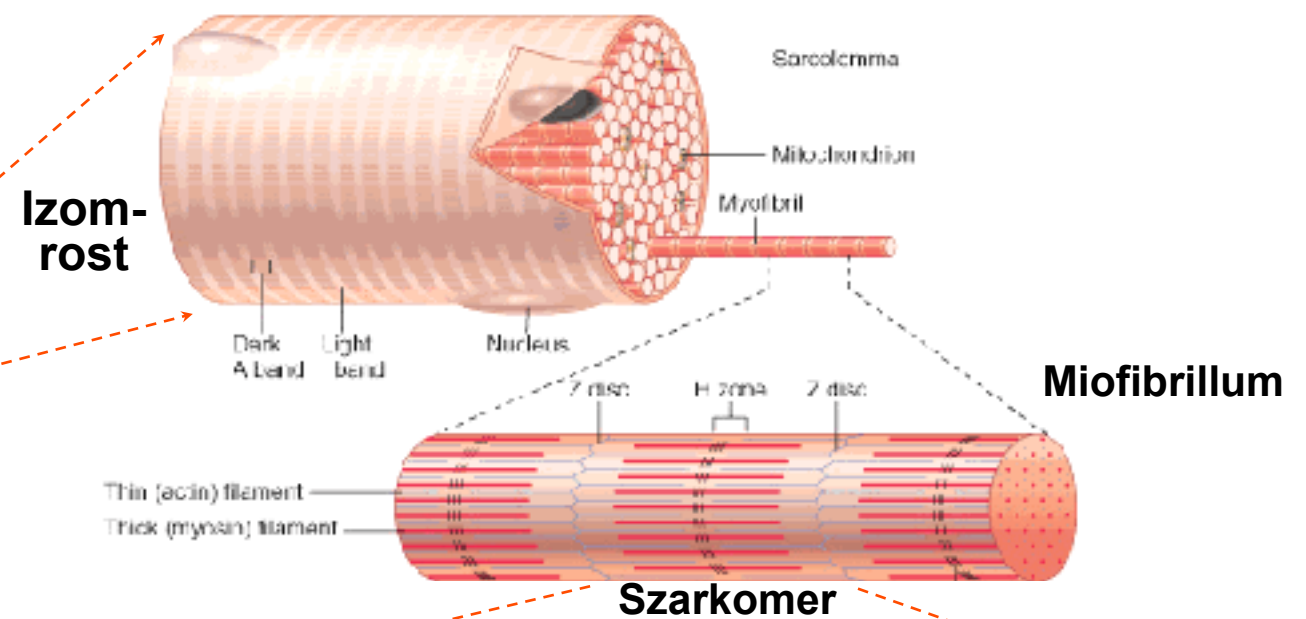
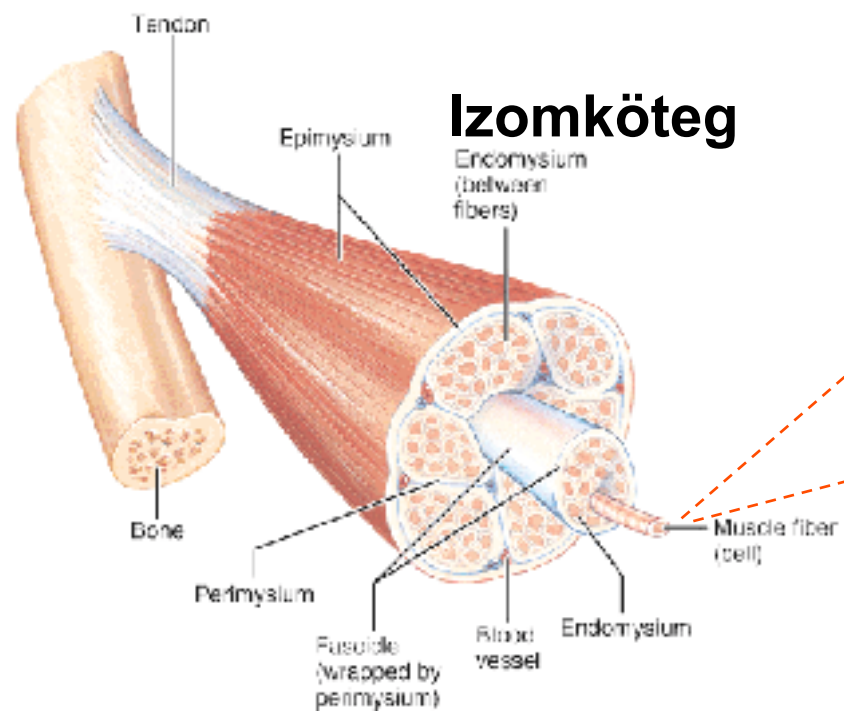
Erőkalibráció

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

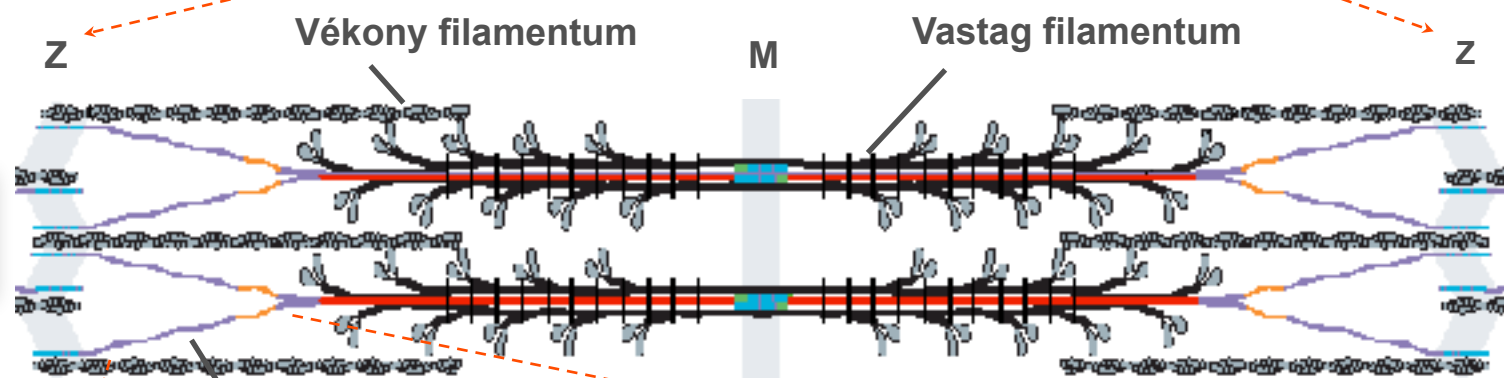
dsDNS mechanikai túlnyújtása



Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfüzér”

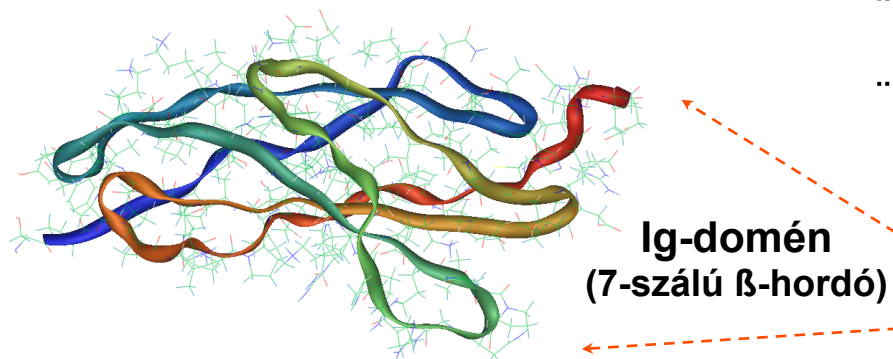
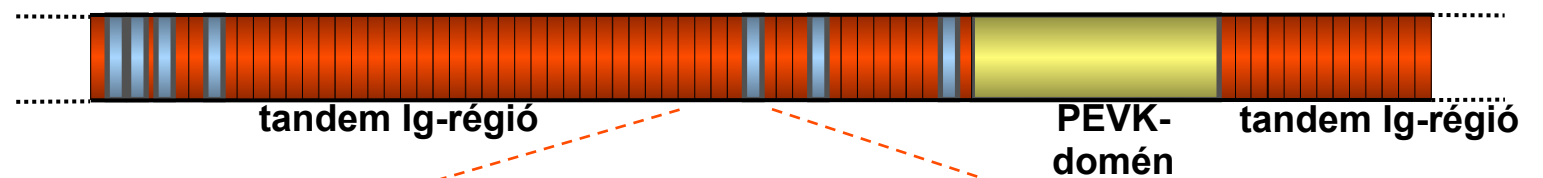


Össze-
húzó-
dás



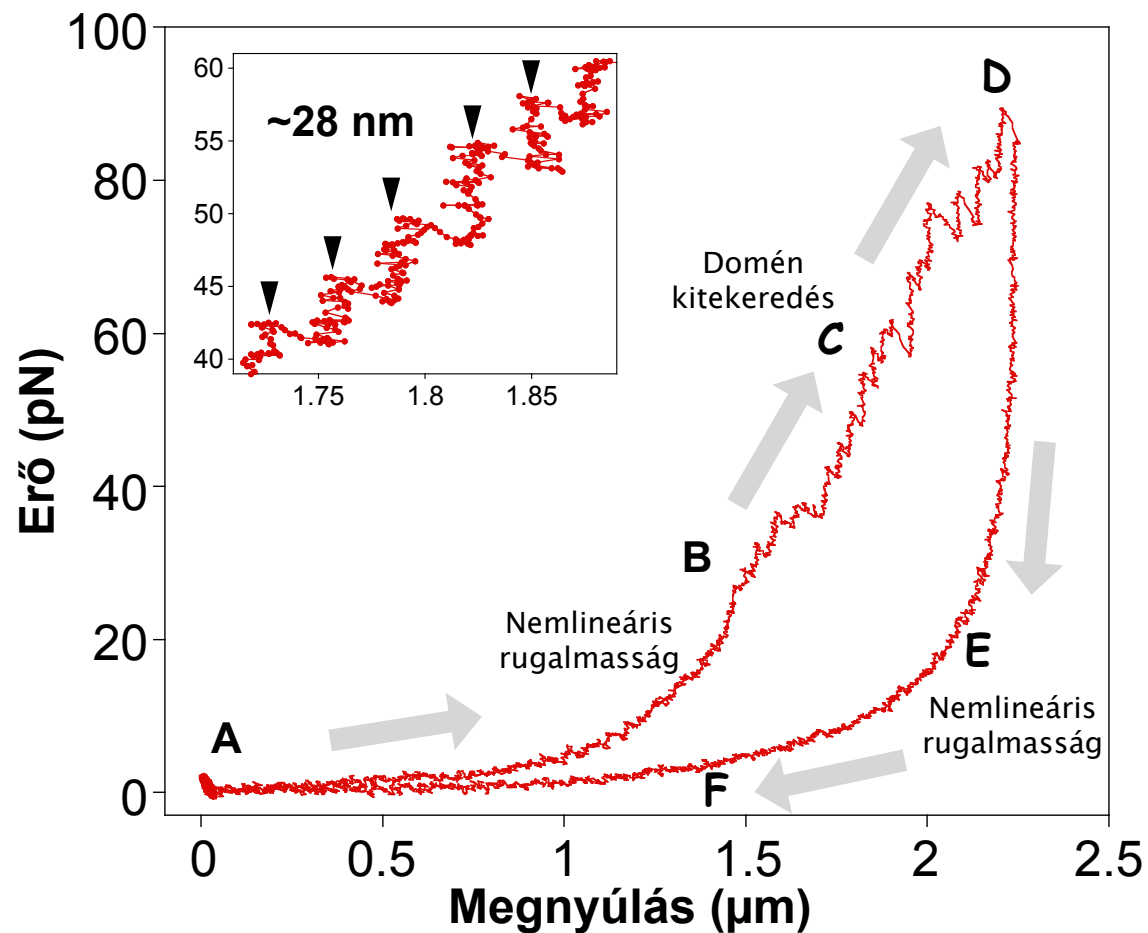
Titin

I-szakaszbeli szegmens



Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesssel

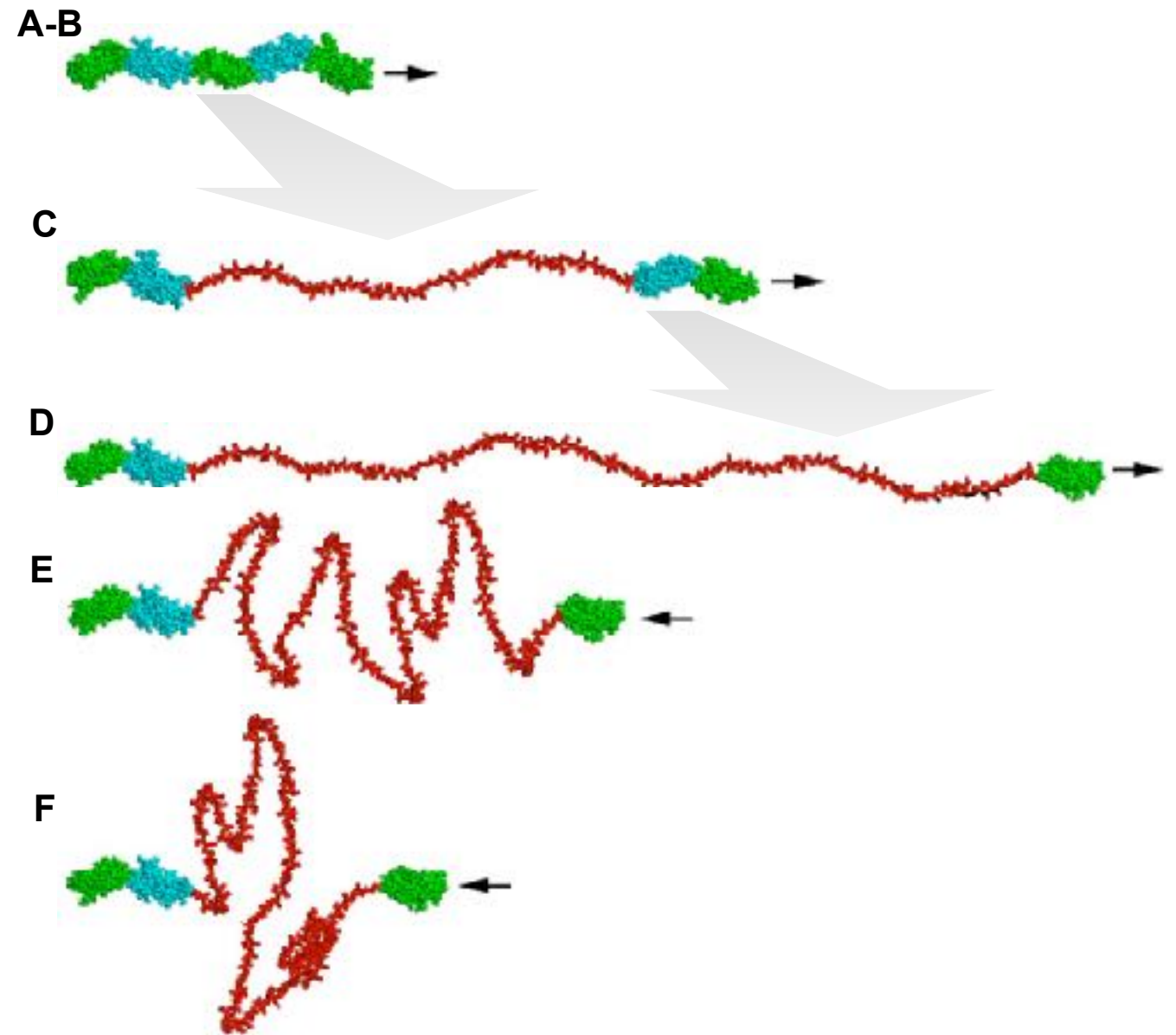
Erőválasz



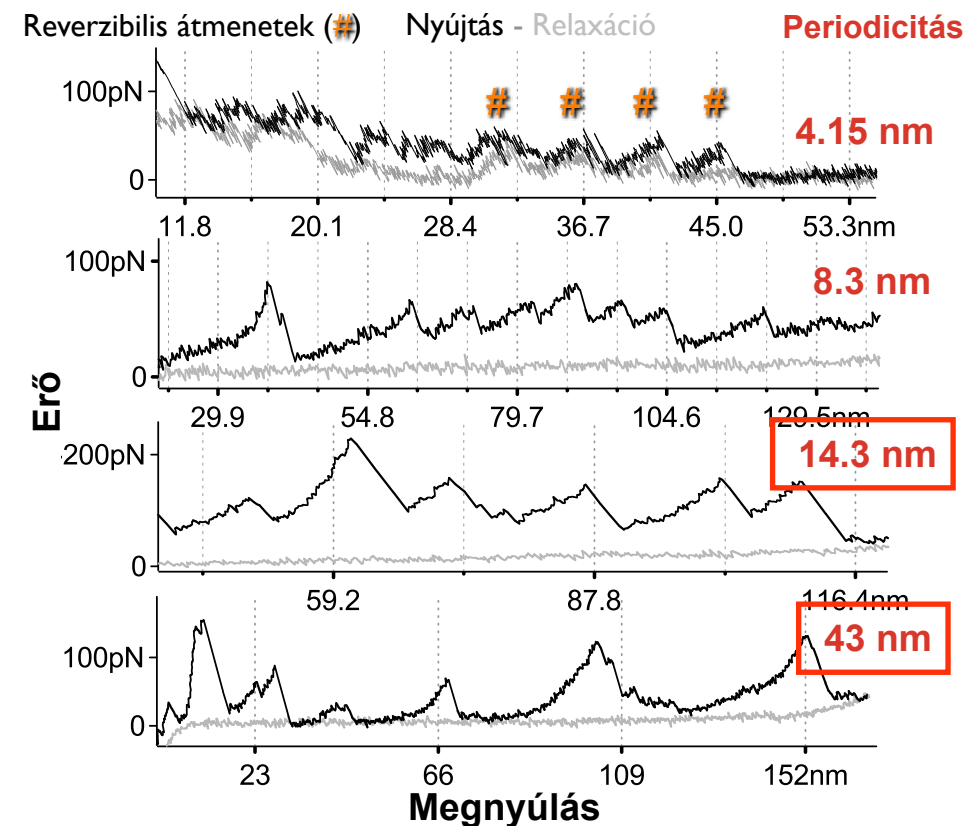
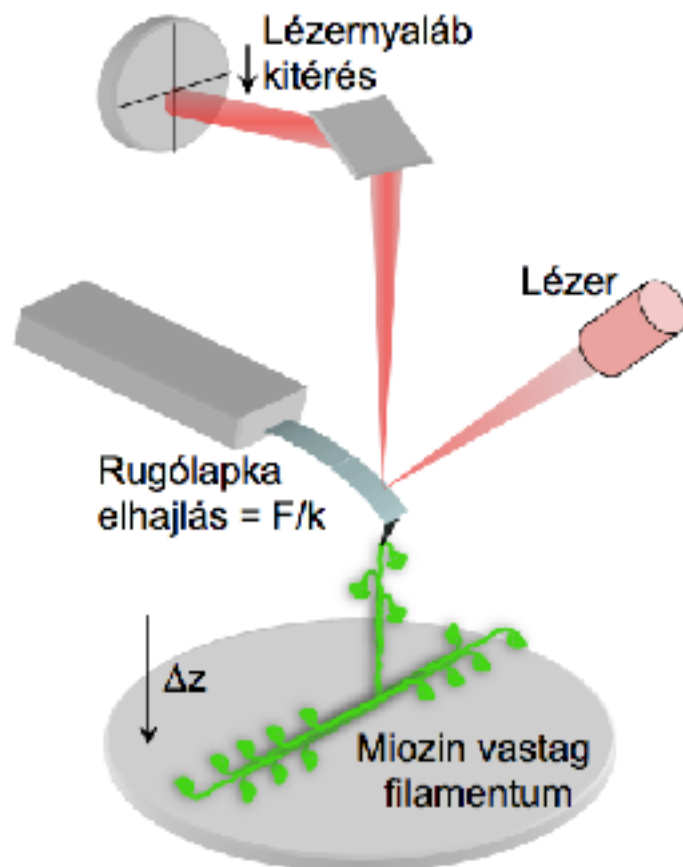
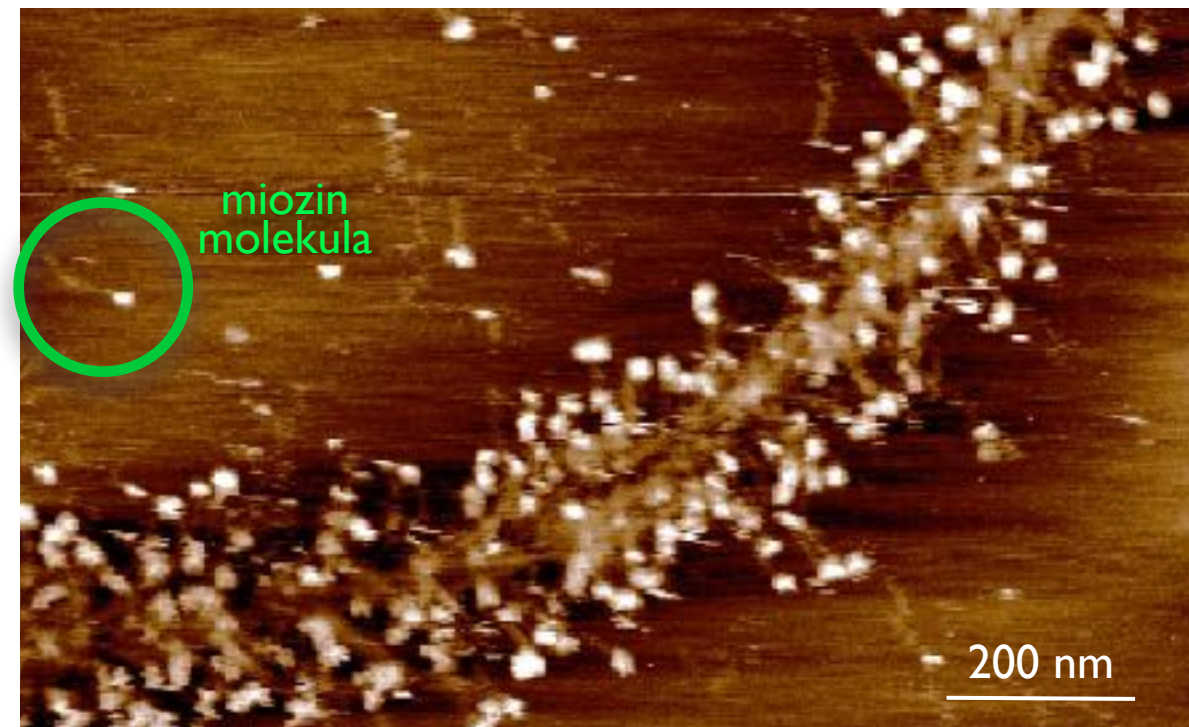
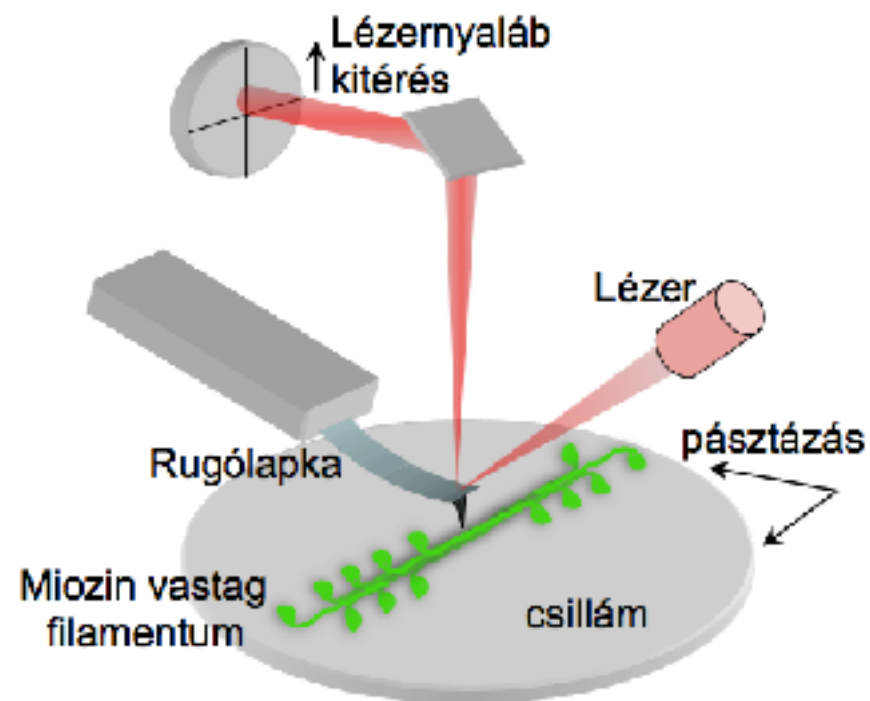
A domének egymás után, a mechanikai stabilitásuk növekvő sorrendjében tekerednek ki.

Erővezérelt szerkezetváltozások:

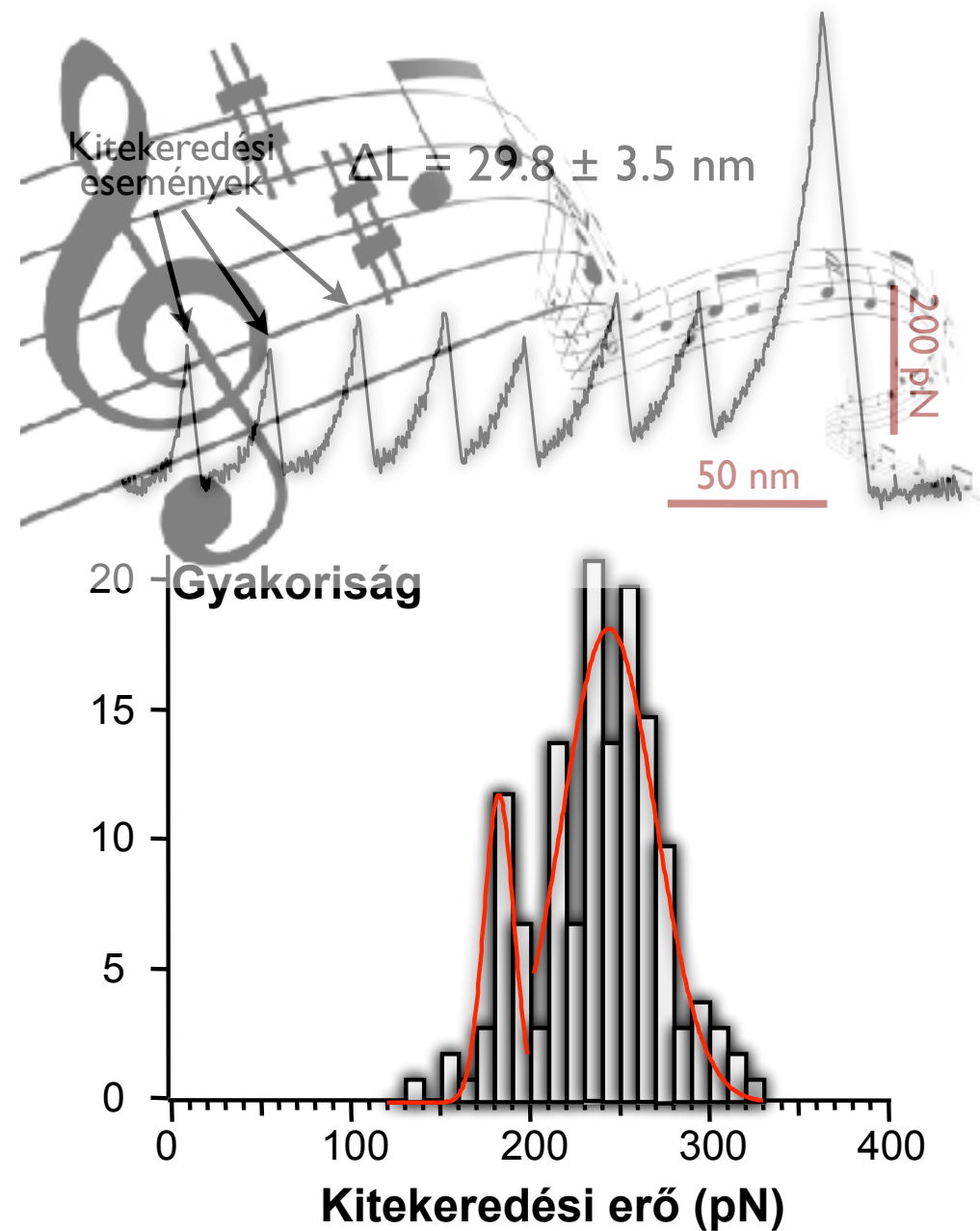
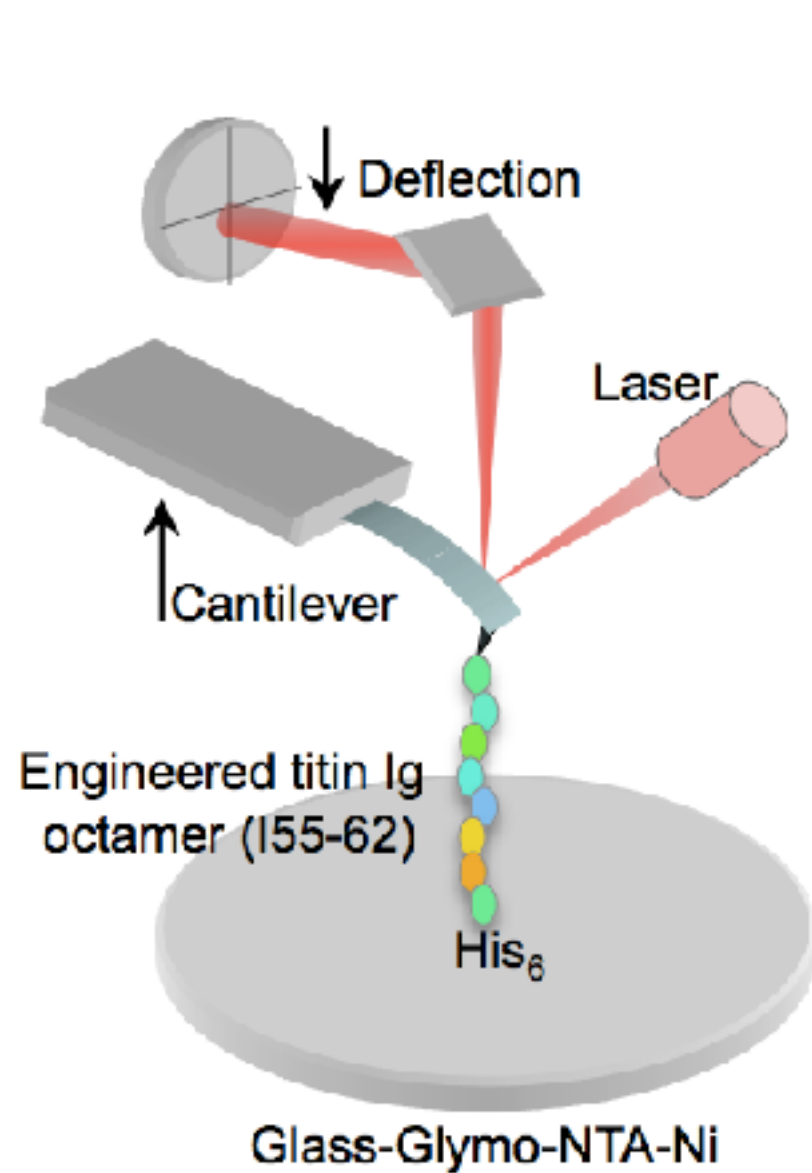
Nemlineáris rugalmasságra szuperponált domén kitekeredés



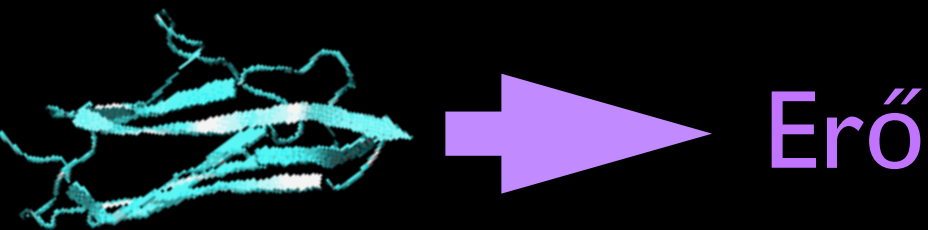
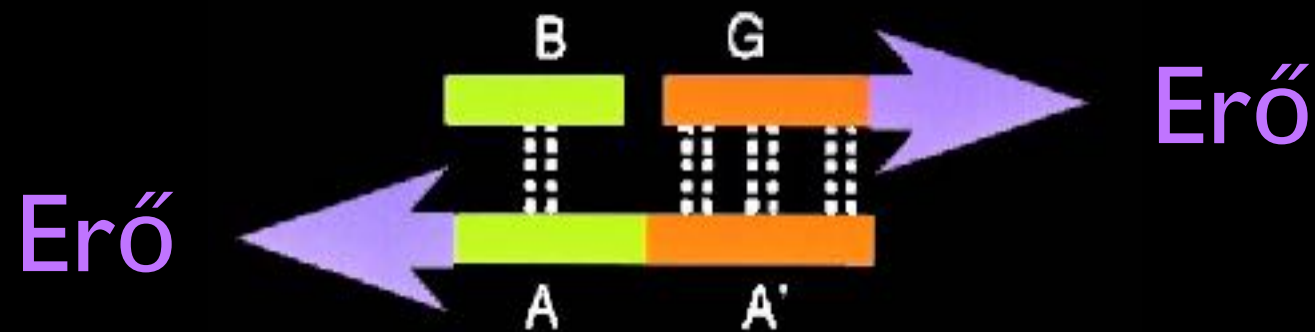
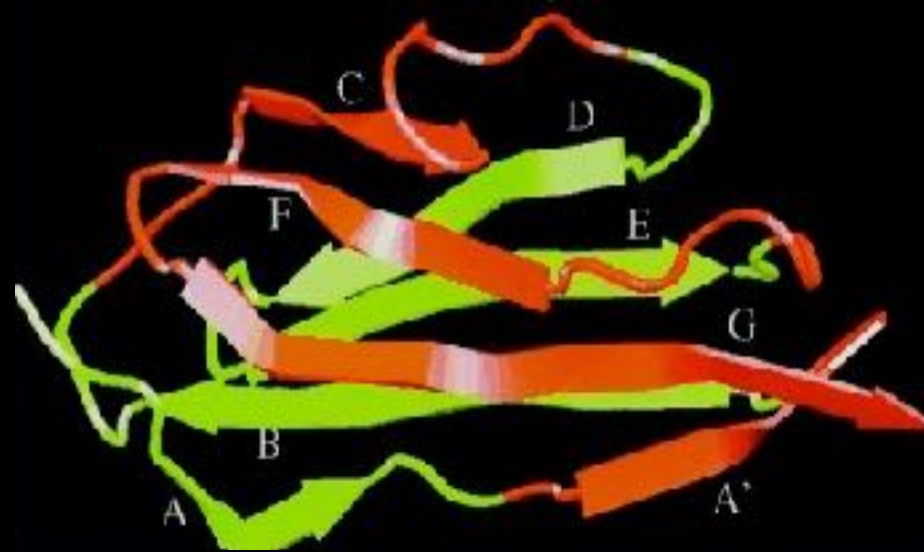
Molekulamanipulálás AFM-mel



Rekombináns titin fragmentum (Titin I55-62) nanomechanikája

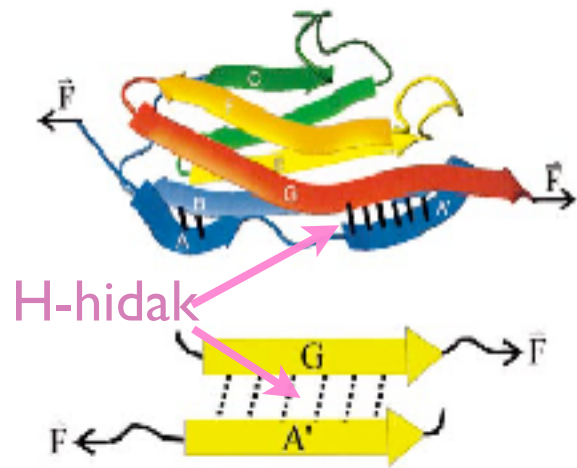


A titin doméneket párhuzamosan
csatolt H-hidak stabilizálják

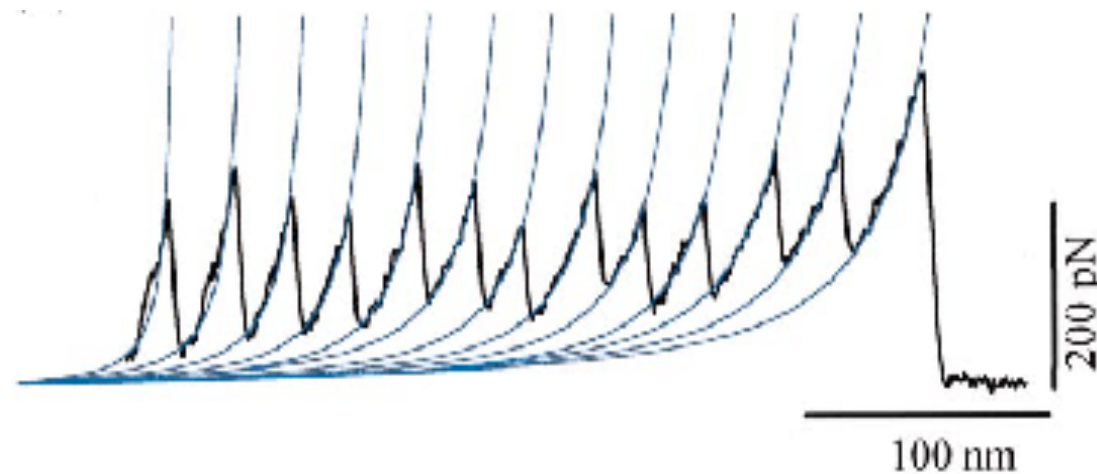


A mechanikai stabilitás biológiai logikája

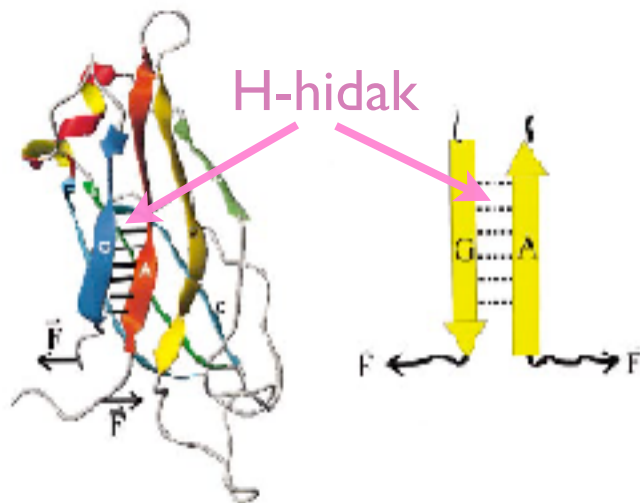
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása



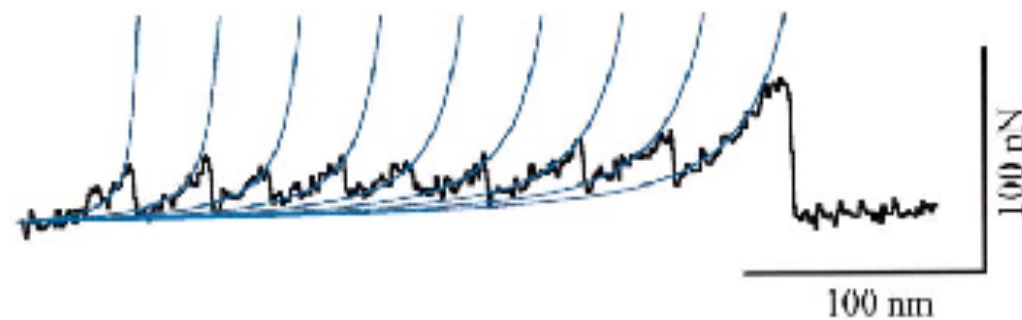
Nagy kitereredési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása



Alacsony kitereredési erő

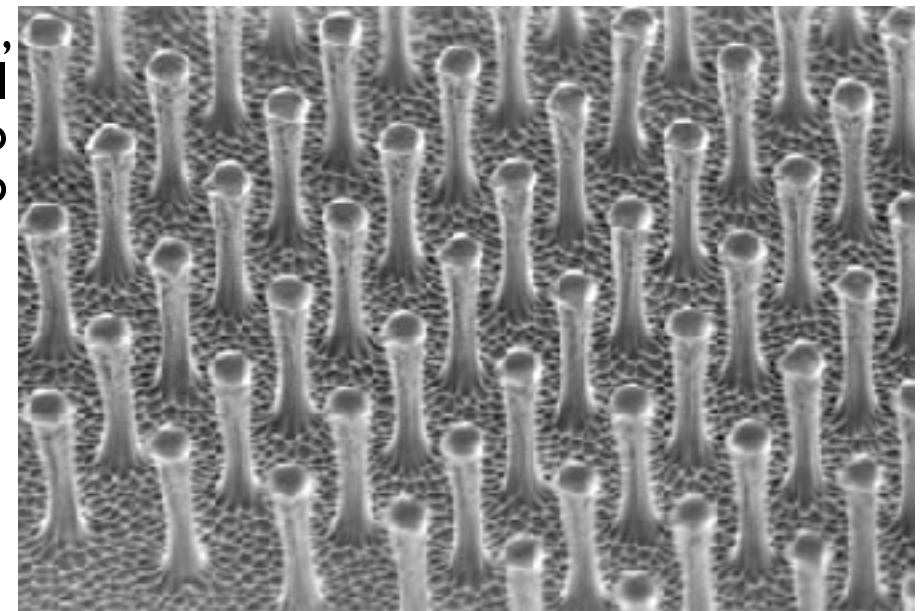


Makroszkópikus mechanikai stabilitás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



Mesterséges,
nanotechnológiával
készített gecko
talp



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

