

# Nagyfelbontású mikroszkópos módszerek

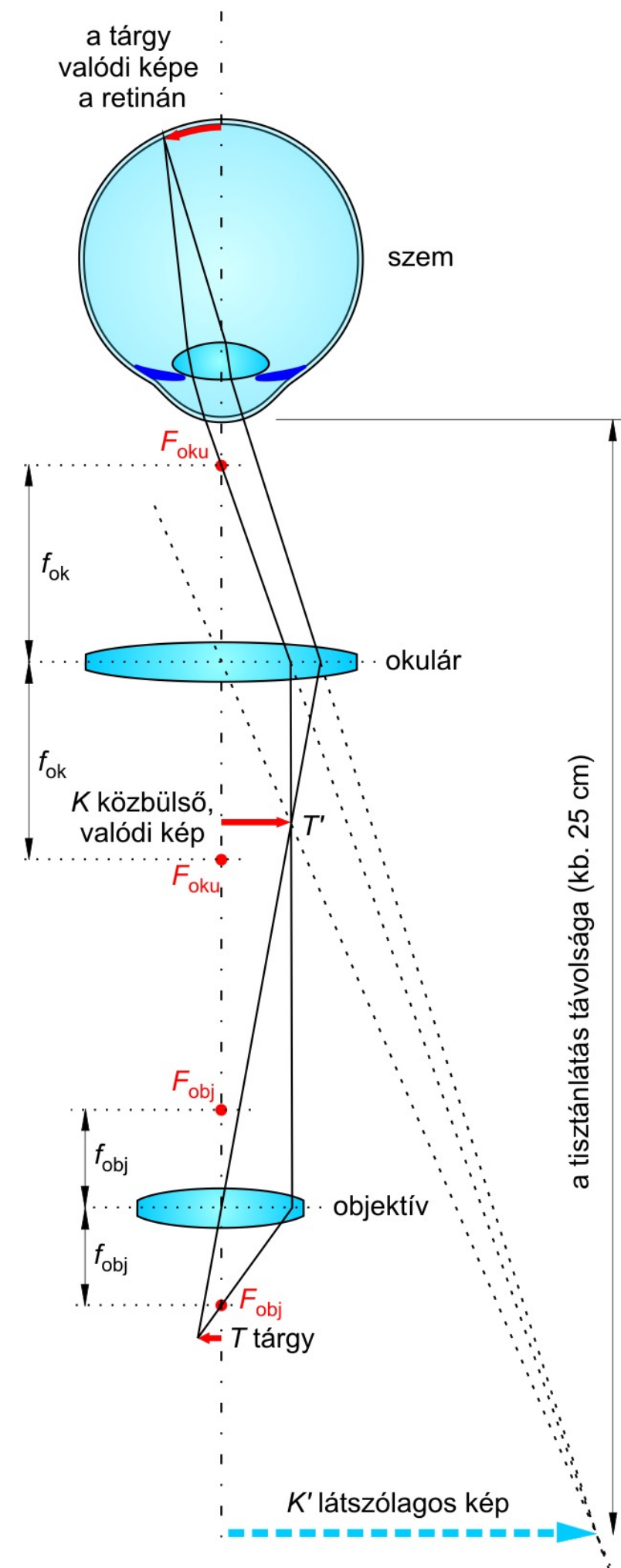
## Egymolekula biofizika

Kellermayer Miklós

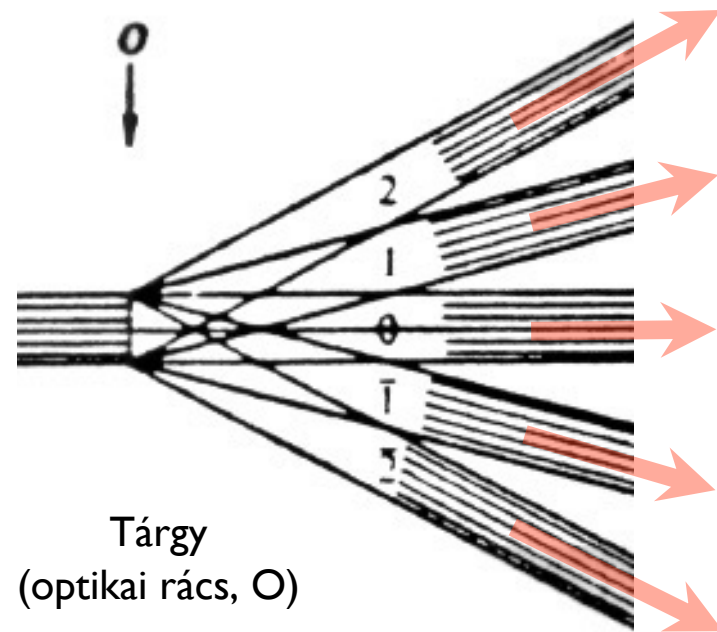
Semmelweis Egyetem  
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

# 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

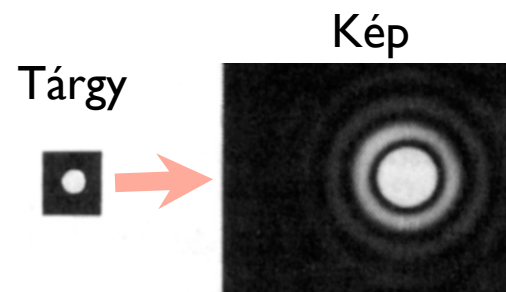
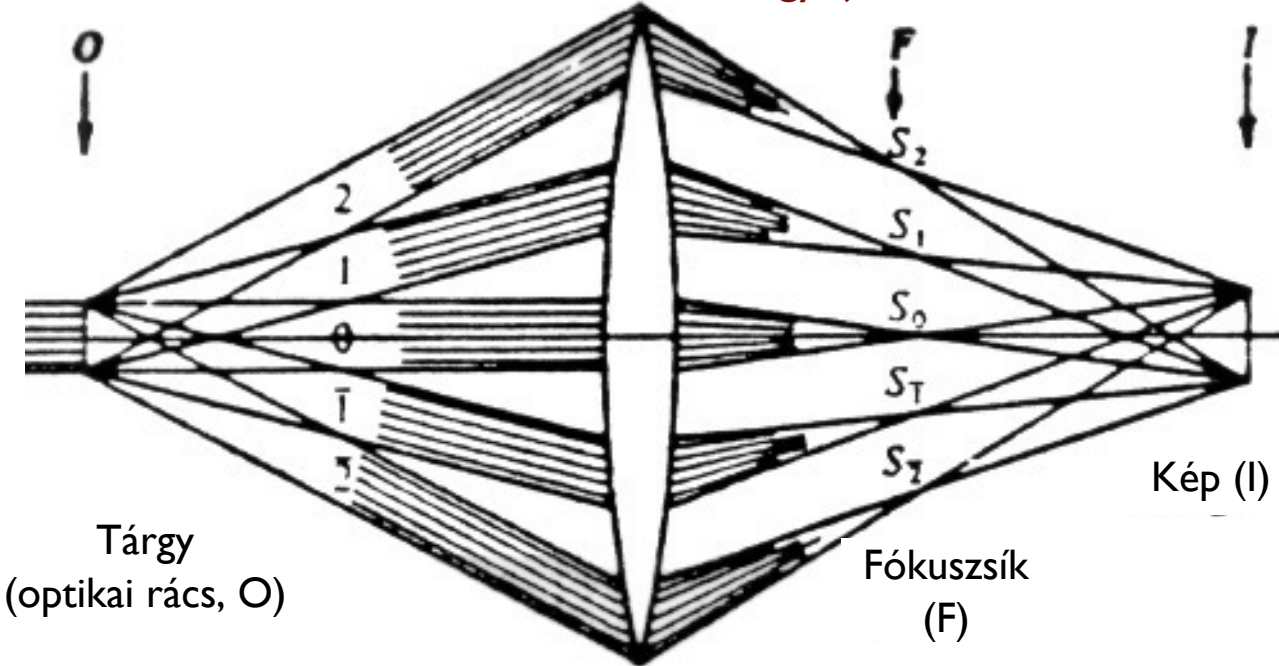


**Mellék-  
maximumok:**  
szerkezeti  
információ



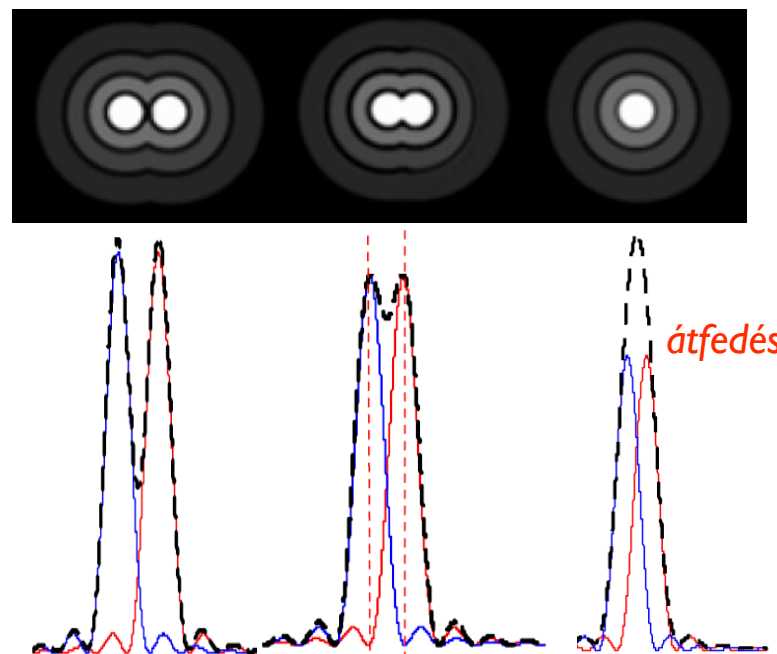
**Főmaximum:**  
fényelnyelési  
tulajdonság  
(exponenciális  
sugárgyengítés)

Diffrakciólimitált képalkotás: feltétele legalább az első  
mellékmaximum összegyűjtése



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

Rayleigh feltétel



Legkisebb feloldott  
távolság (Abbé-képlet):

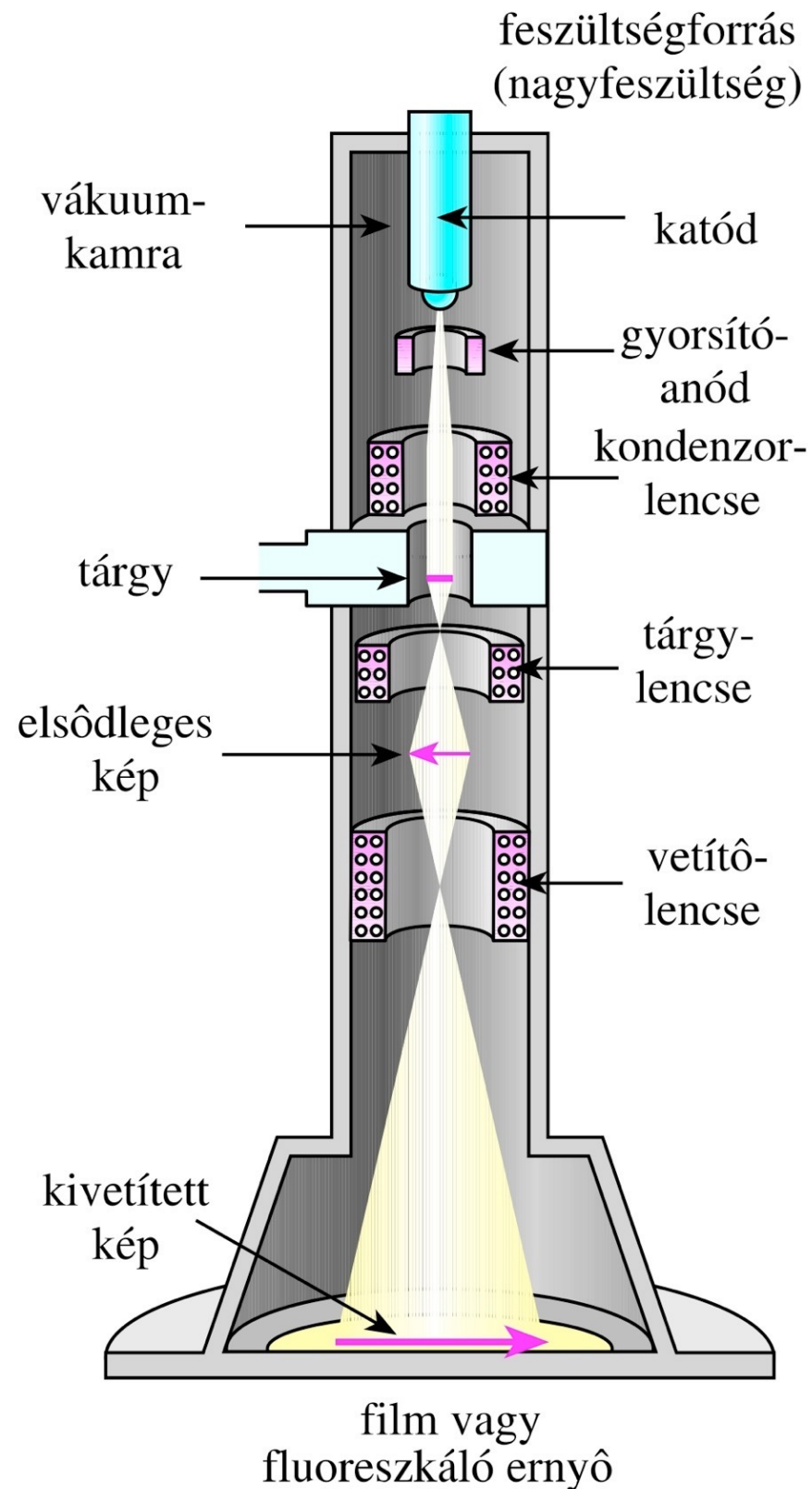
$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$$

$\lambda$  = hullámhossz

$n$  = közeg törésmutatója

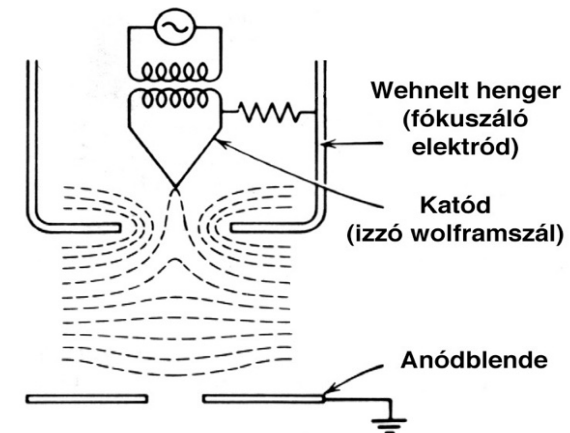
$\alpha$  = optikai tengely és legszélső  
nyaláb által bezárt szög

# Elektronmikroszkóp



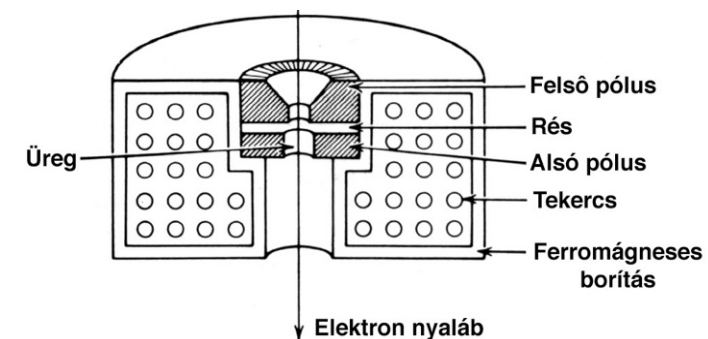
Transmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

**Sugárforrás:**  
elektronágyú



Ernst Ruska  
(Nobel-díj 1986)

**Fókuszálás:**  
elektronnyaláb  
kitérítése  
mágnestlencsével



$$F = eBV_e \sin \alpha$$

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

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

d=legkisebb feloldott távolság  
 $\lambda$ =„de Broglie” hullámhossz  
 $\alpha$ =optikai tengely és a mágneses tér  
iránya által bezárt szög

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



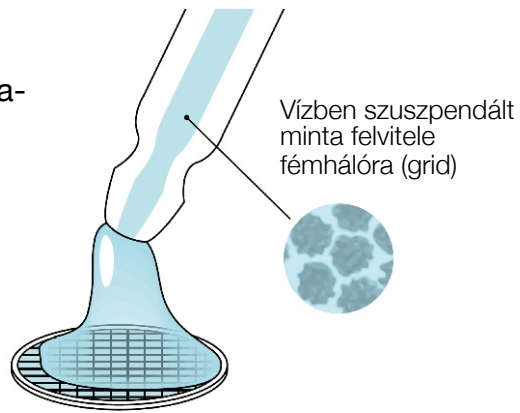
# Kémiai Nobel-díj 2017: Krioelektron mikroszkópia



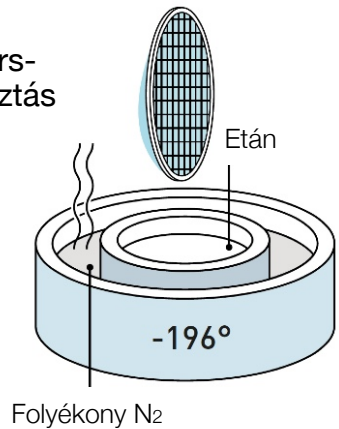
Jacques Dubochet, Joachim Frank, Richard Henderson

## Mintapreparálás

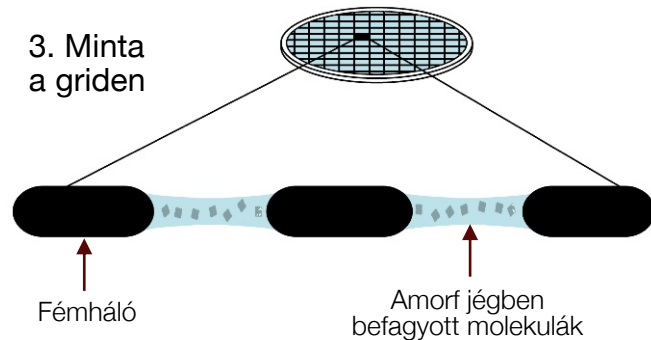
### 1. Minta-felvétel



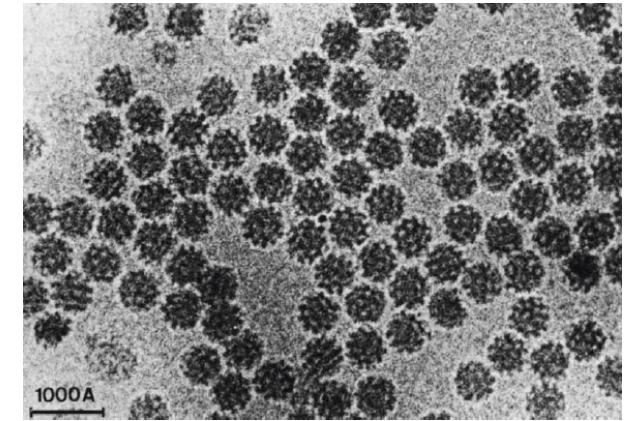
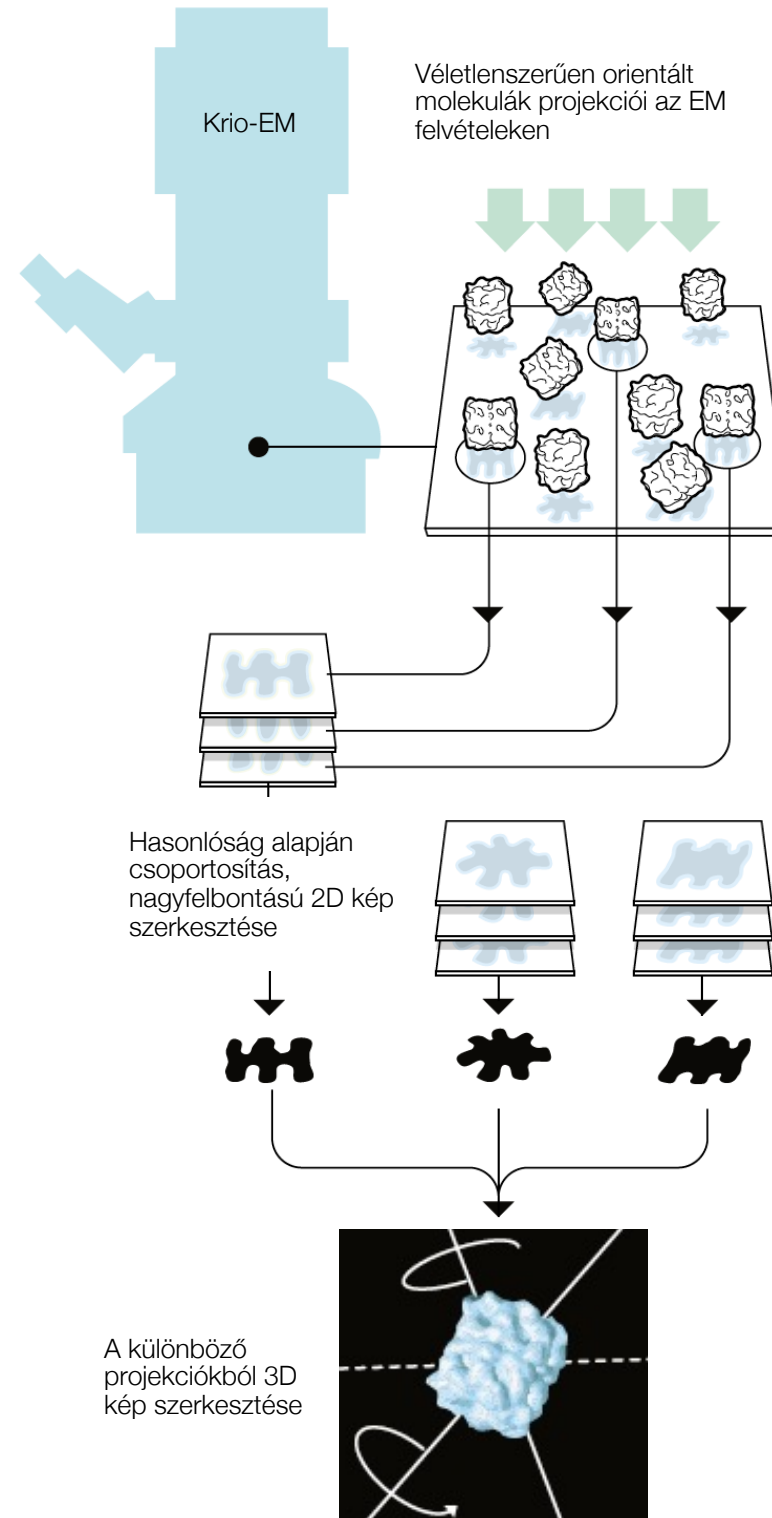
### 2. Gyors-fagyasztás



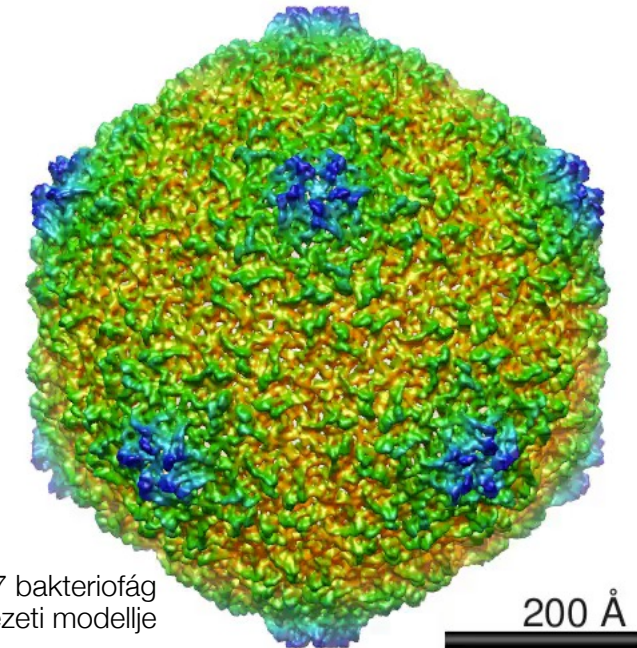
### 3. Minta a griden



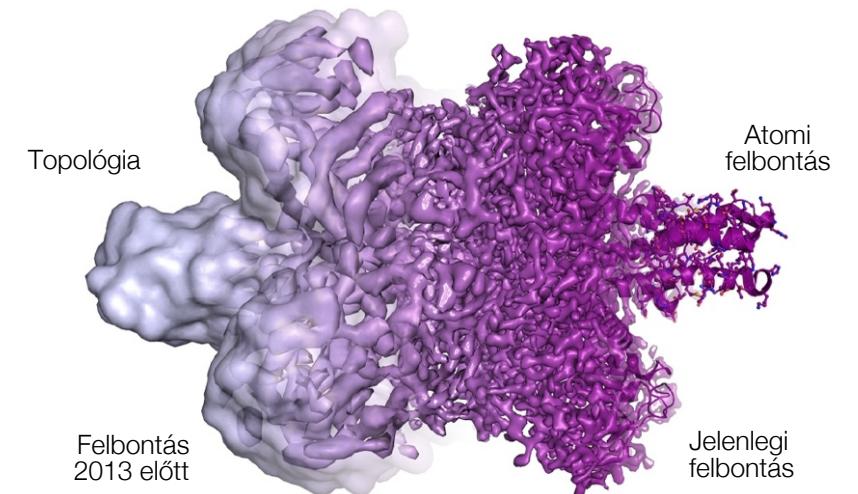
## Krio-EM felvétel és képrekonstrukció



Első krioelektron mikroszkópos felvétel vírusokról (Dubochet, 1984)



T7 bakteriofág szerkezeti modellje





# Szuperfelbontású mikroszkópia

Pointillizmus (George Seurat, Paul Signac, Vincent van Gogh, Maximilien Luce)



George Seurat: Vasárnap délután Grand Jatte szigetén

Adatgyűjtési  
folyamat

(d) Bekapcsolt fluorofórok 3

(e) Bekapcsolt fluorofórok 4

(f) Pozíciókból számított kép

(b) 500 nm

(d) 500 nm

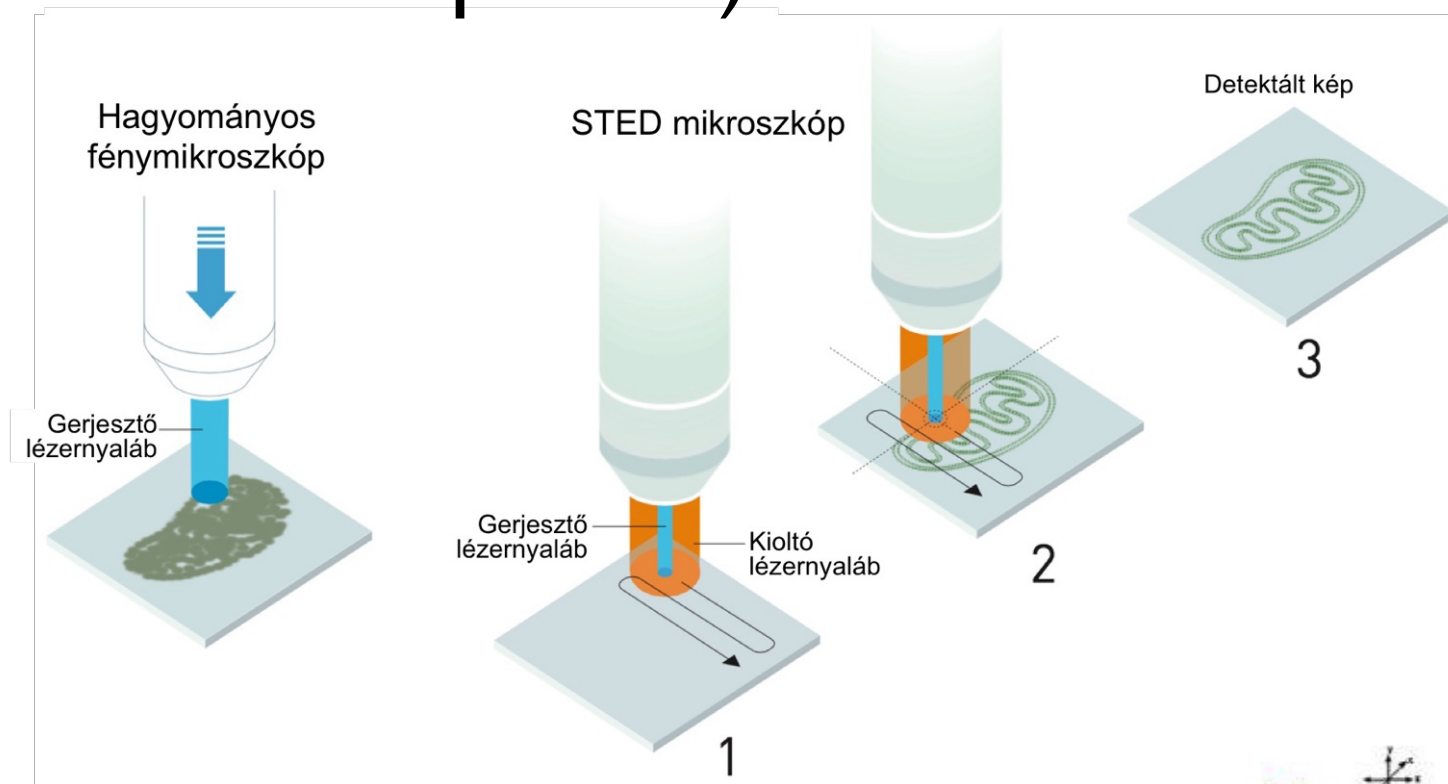
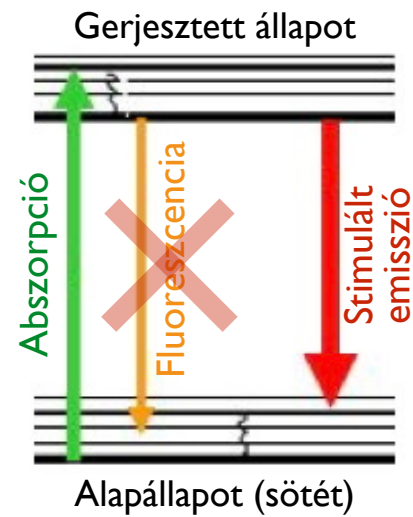
Mikrotubuláris  
rendszer



# STED mikroszkópia (STimulated Emission Depletion)



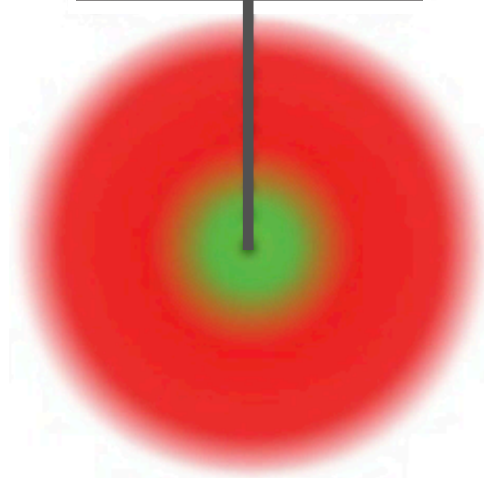
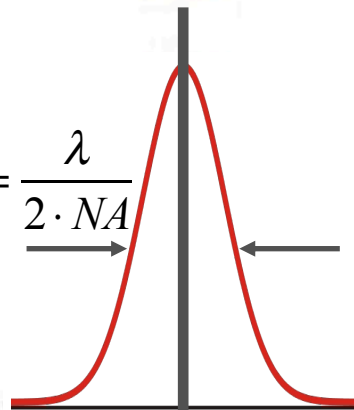
Stefan Hell  
(Nobel-díj 2014)



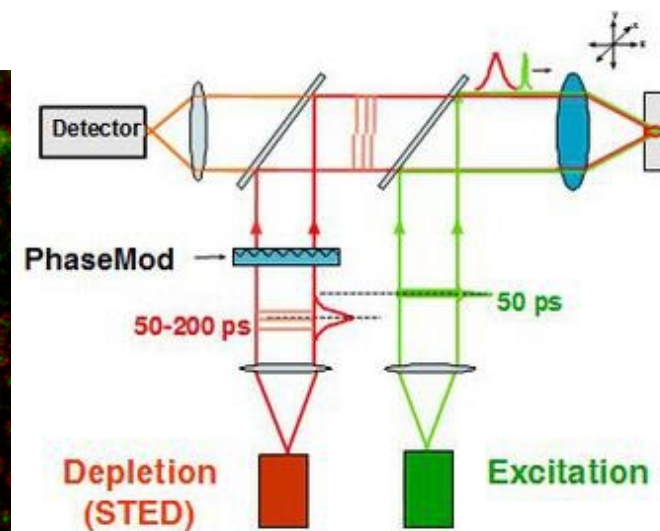
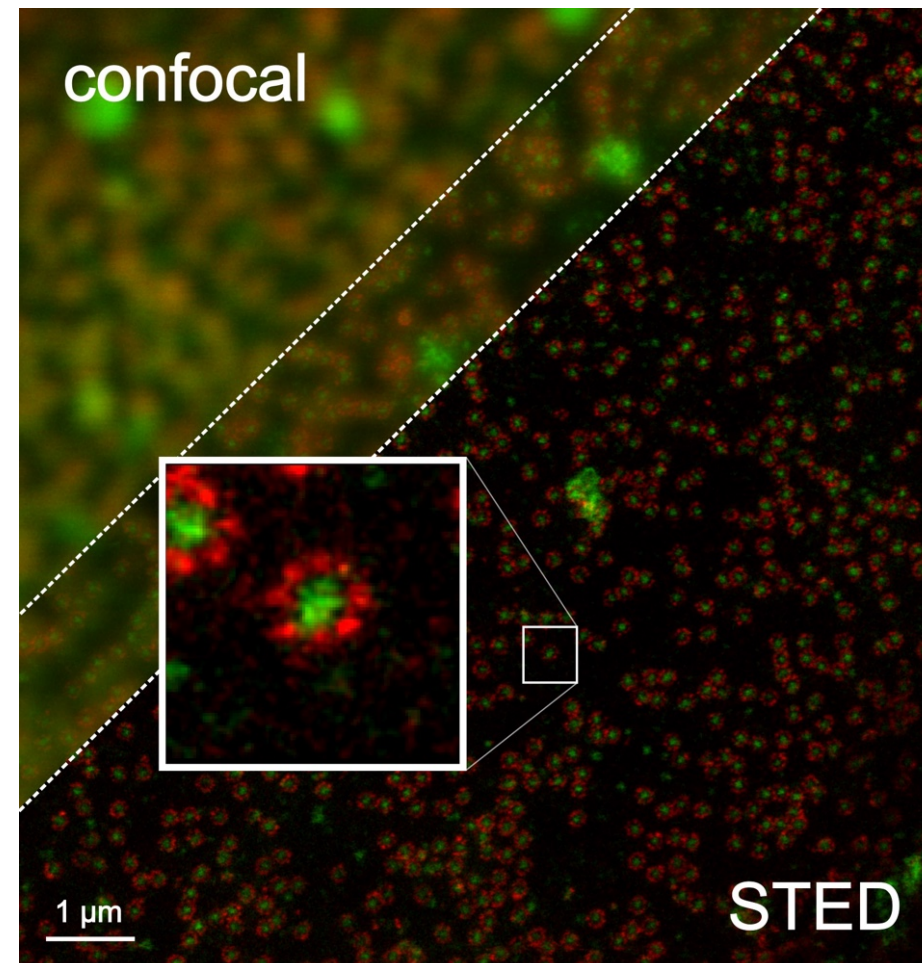
Hell:  $d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA \sqrt{1 + I/I_s}}$



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

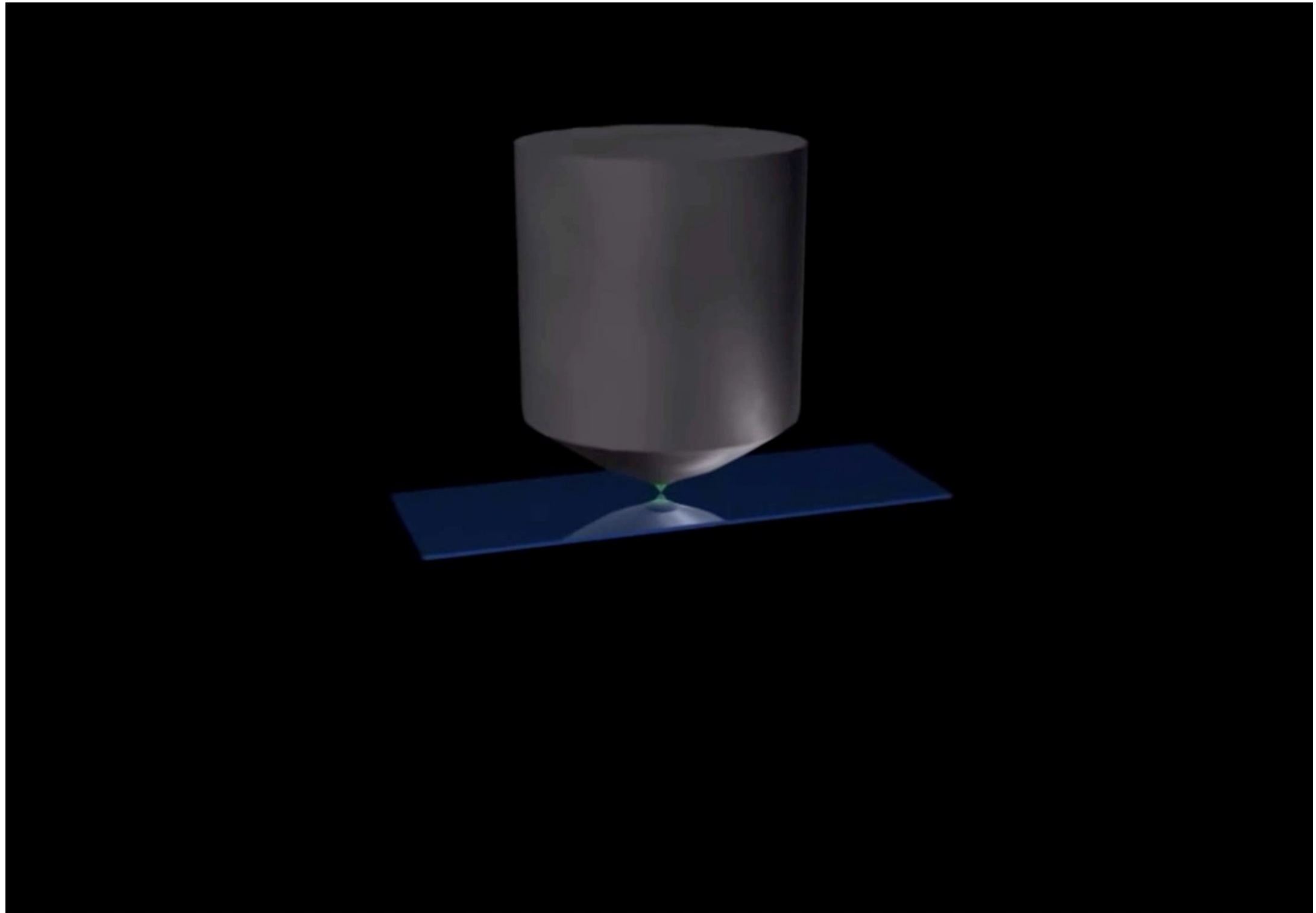


Depletáló lézer intenzitás ( $I$ ) növelése



Maghártya pórus  
komplexek STED  
mikroszkópos képe

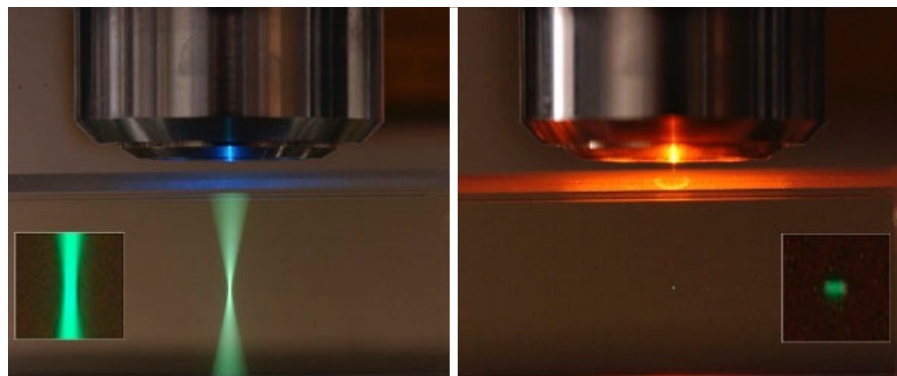
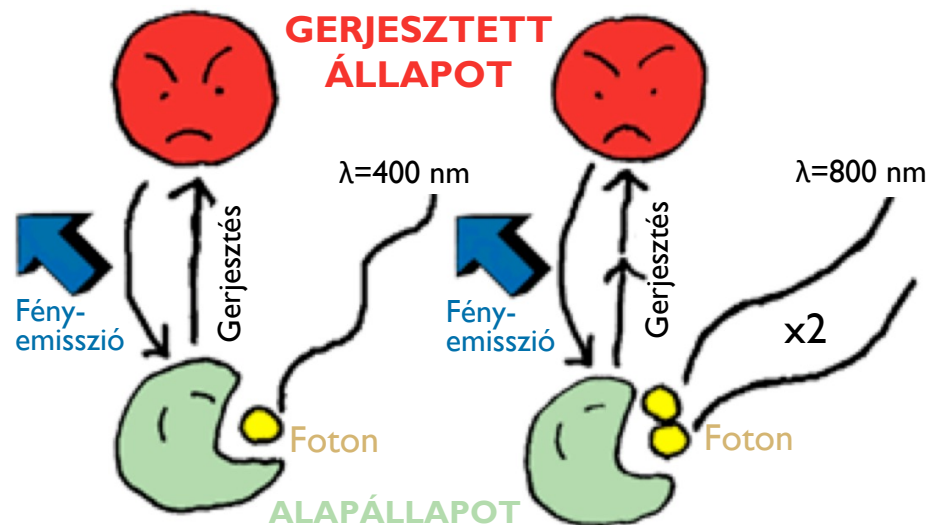
# STED mikroszkópia





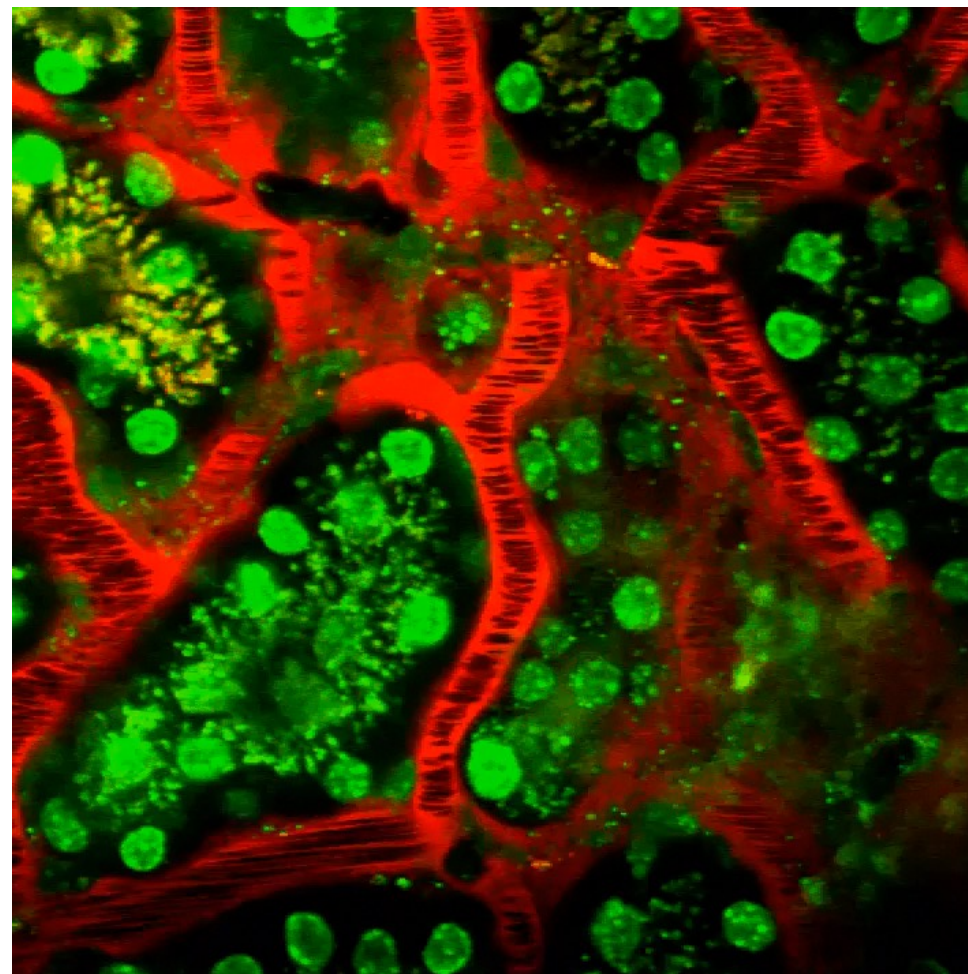
# Multifoton mikroszkópia

- 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

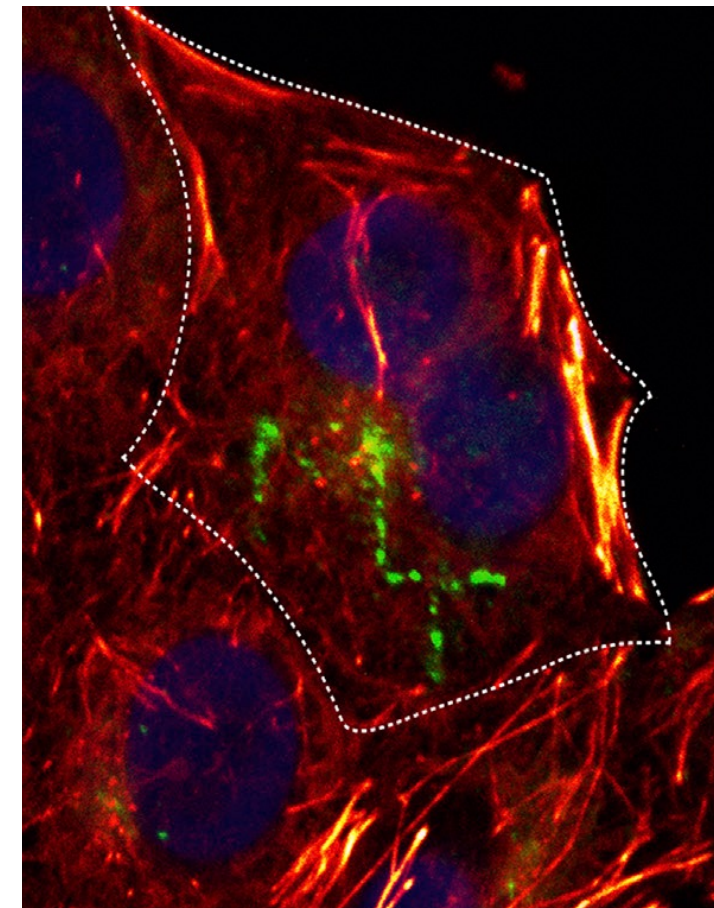


Egyfoton  
fluoreszcencia

Kétfoton  
fluoreszcencia



Zöld: proximális vesetubulusok; Vörös: albumin (plazma)

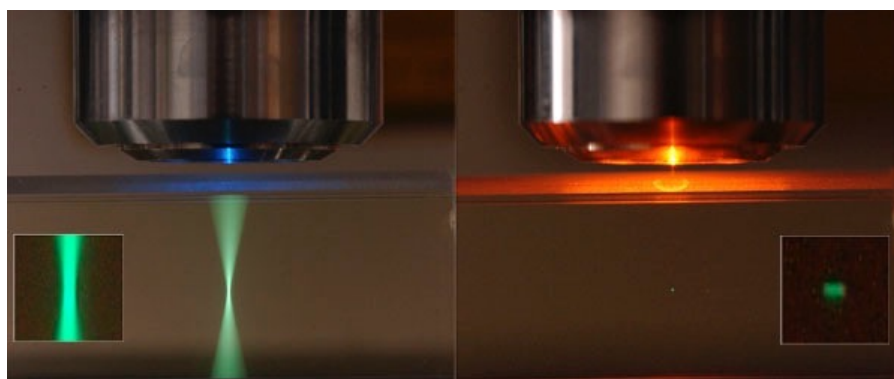
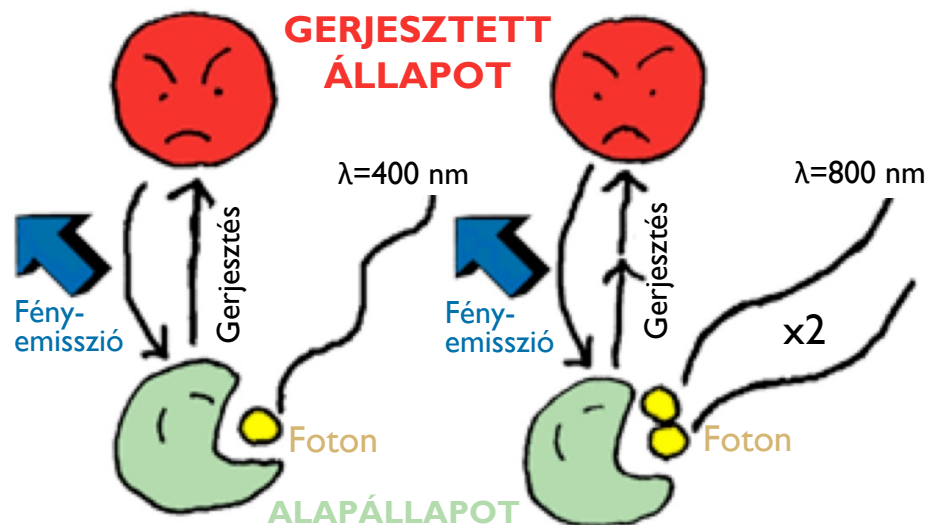


Molekuláris tetoválás:  
térben lokalizált módon fotoaktivált  
azido-blebbistatin (HeLa sejtben)



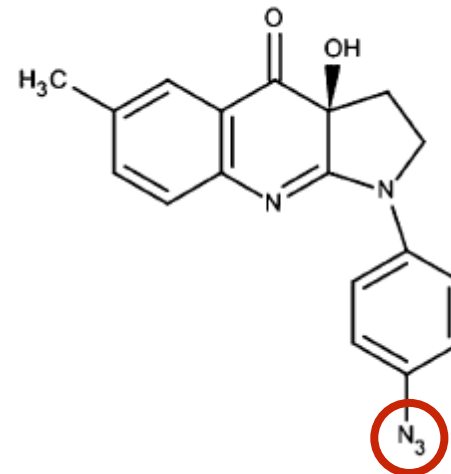
# Miozin II optofarmakológiai manipulálása

2P mikroszkópával: femtoliteres  
térfogatban fotokémiai reakciót  
indíthatunk



Egyfoton  
fluoreszcencia

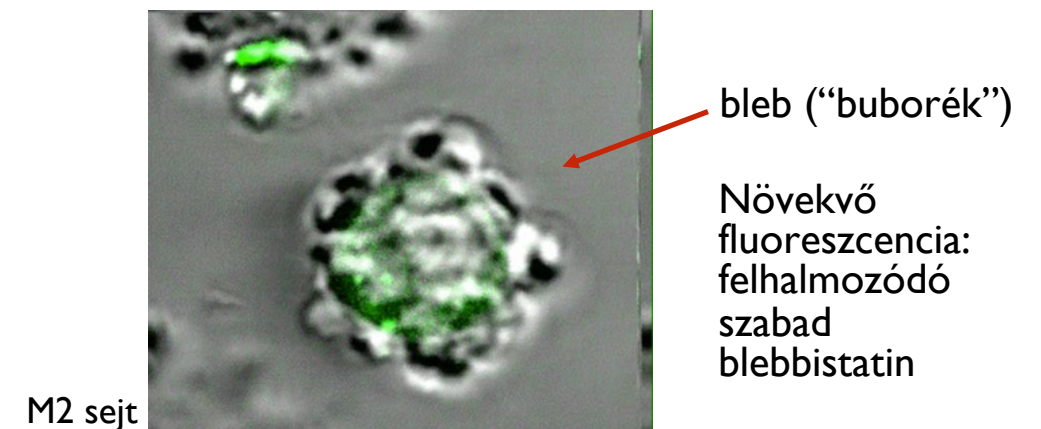
Kétfoton  
fluoreszcencia



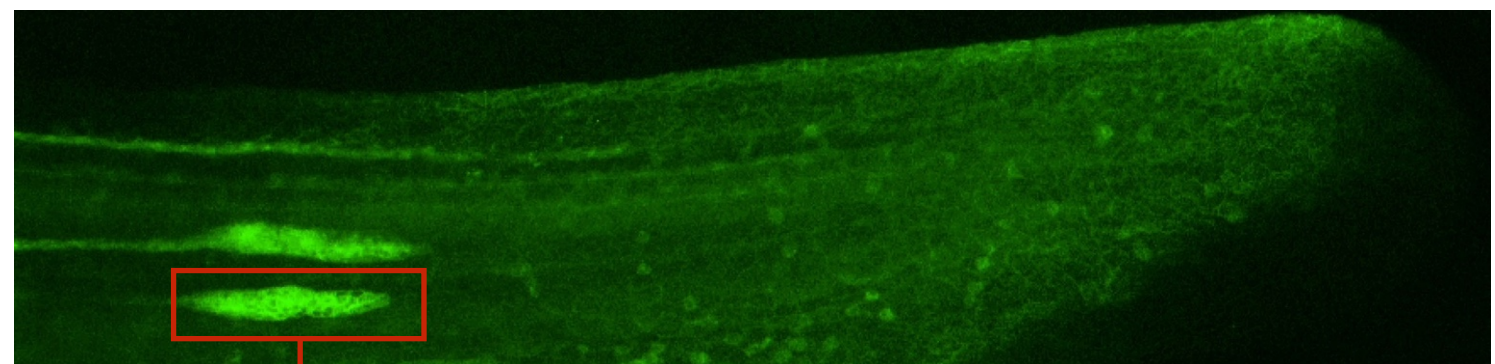
## Blebbistatin:

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

2P besugárzás hatására a miozin II-függő blebképződés leáll



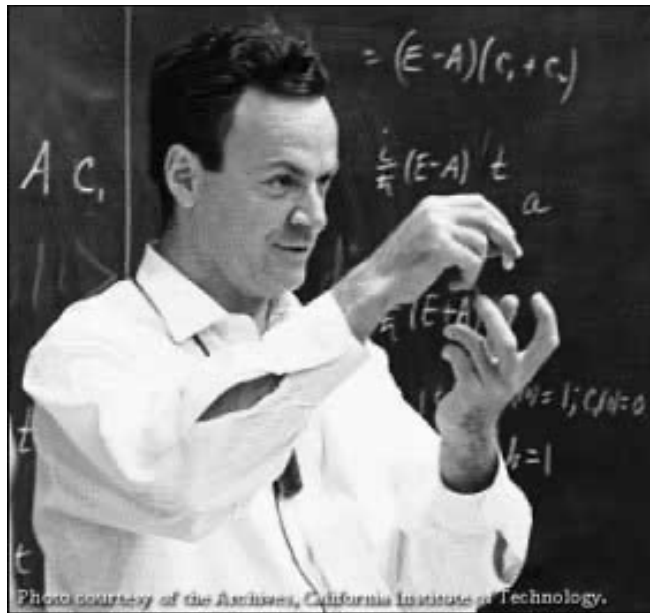
2P besugárzás hatására a zebradánió oldalvonalszerv fejlődése leáll



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.



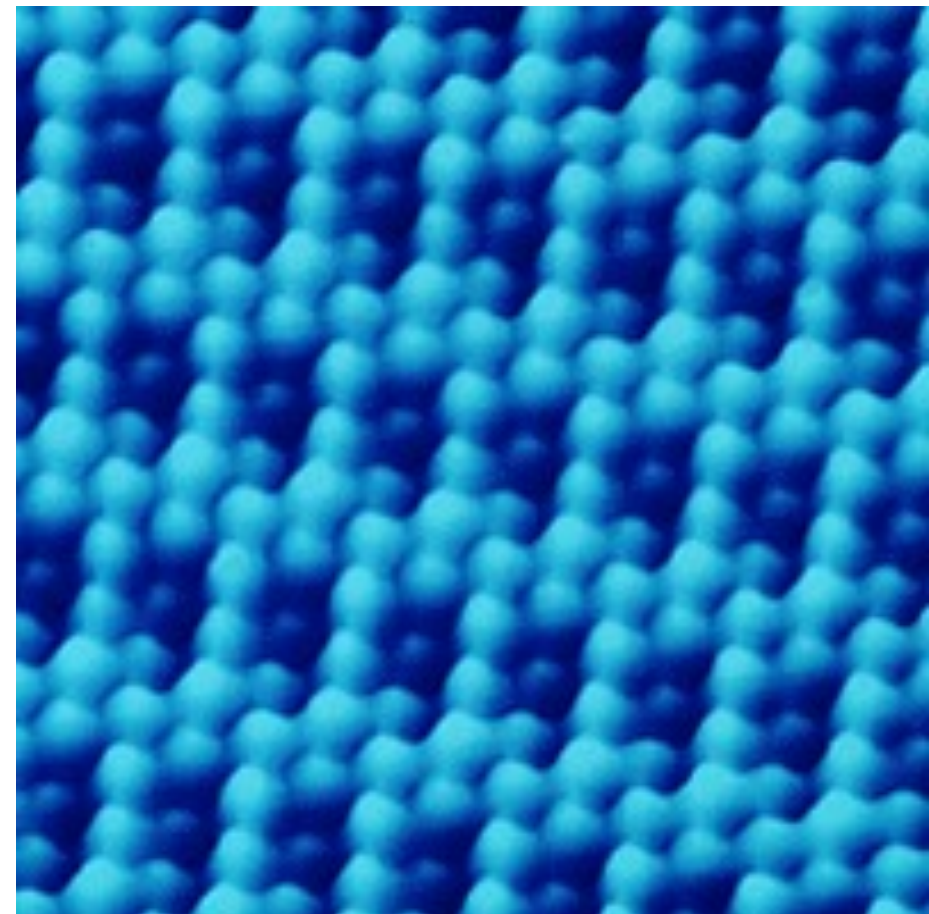
Gerd Binnig



Heinrich Rohrer

(Nobel-díj  
1986)

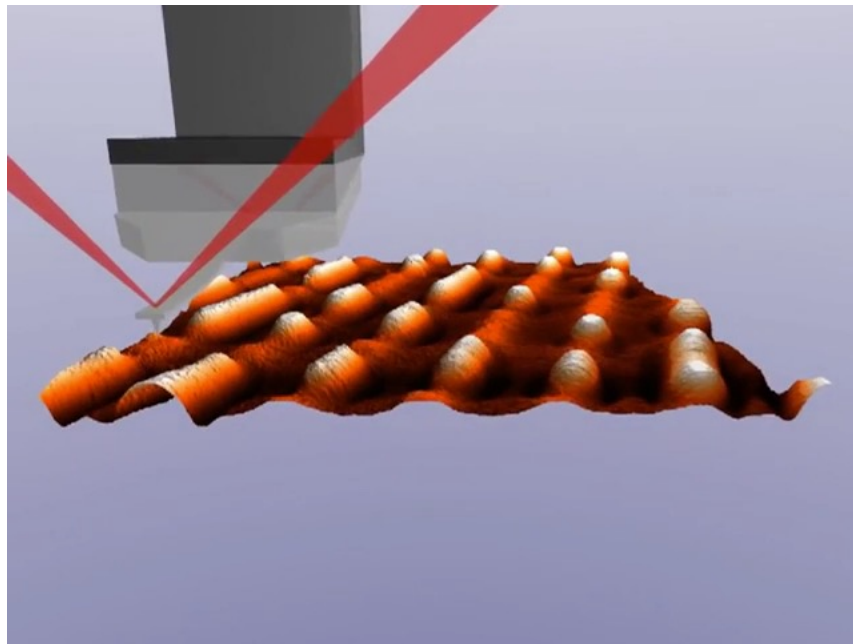
Oxigén atomok rhodium  
egykristály felületén



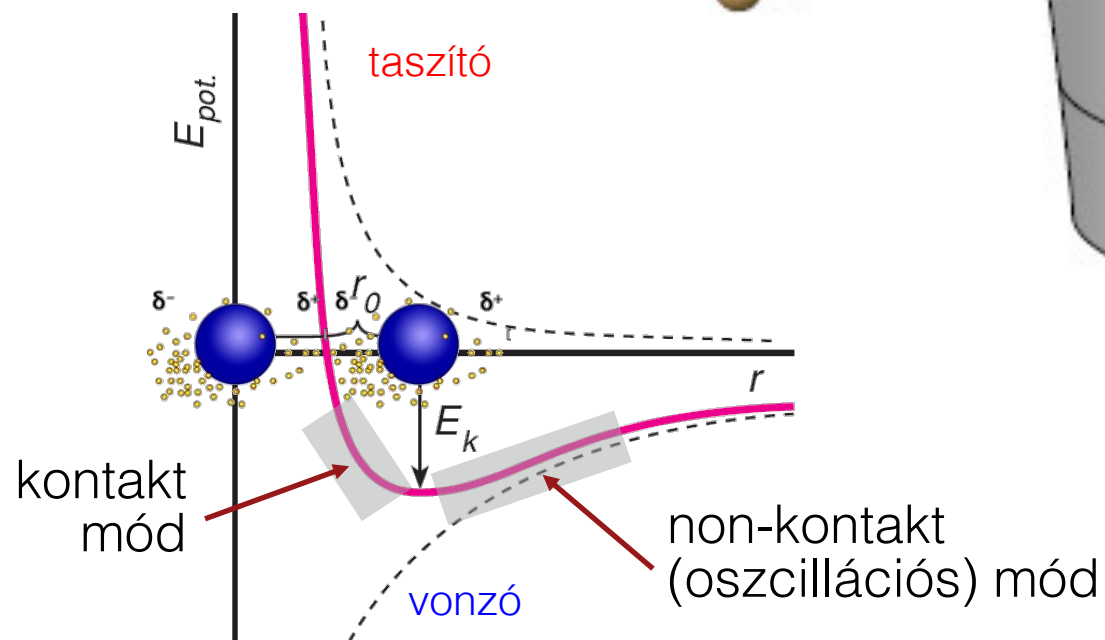
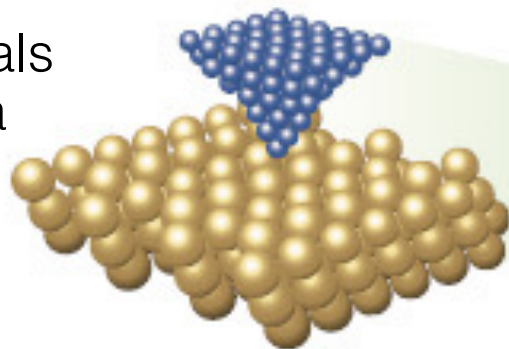
↔  
a "nanovilág" léptéke:  
1 nanométer



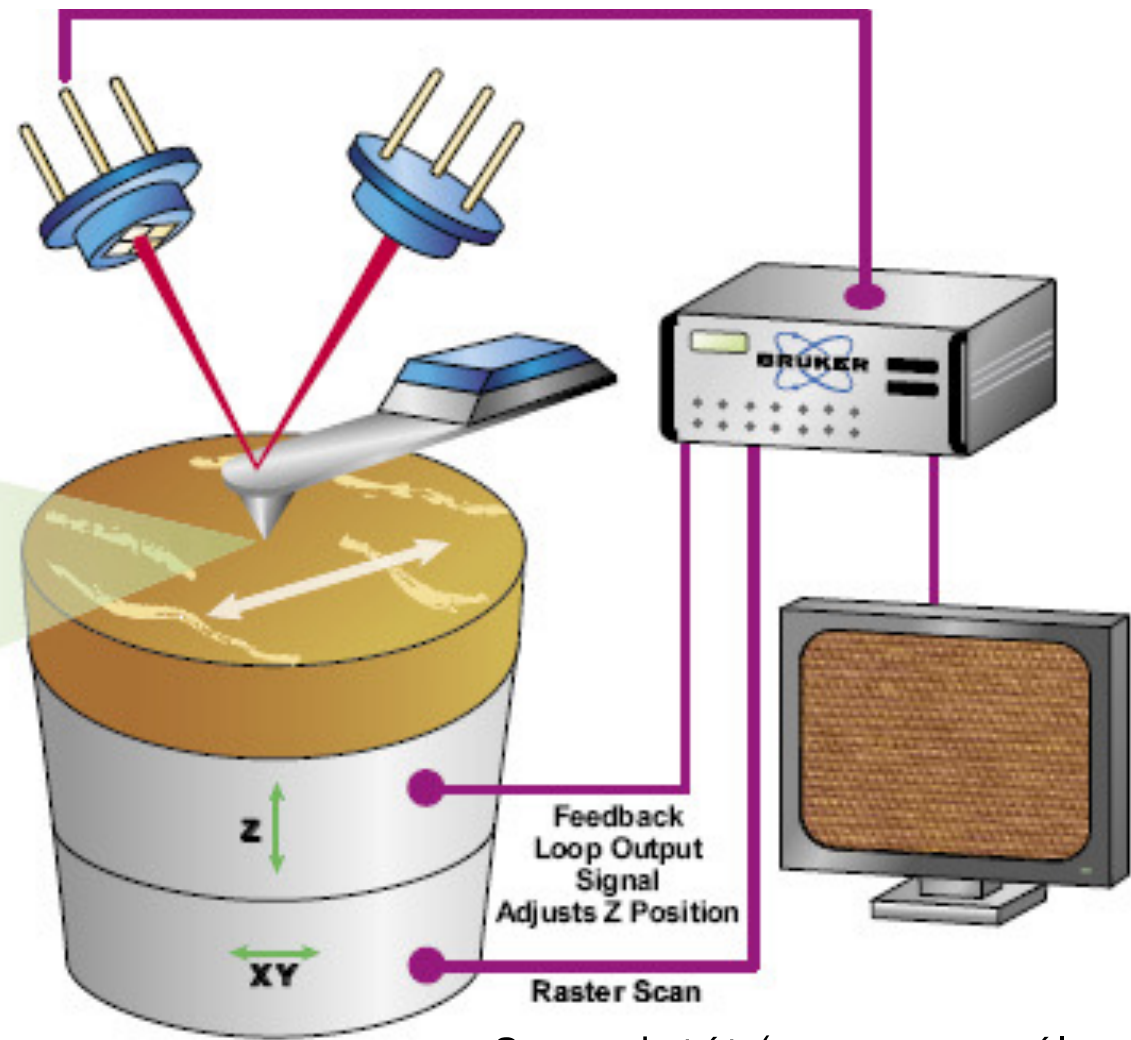
# Az atomi erőmikroszkóp (AFM)



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



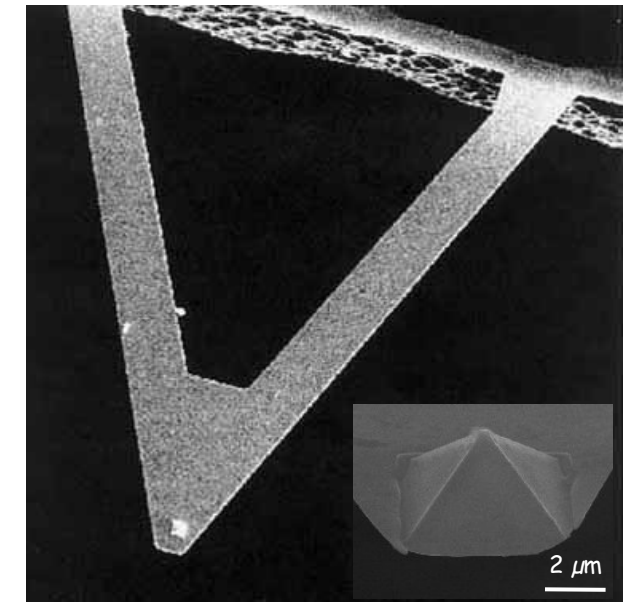
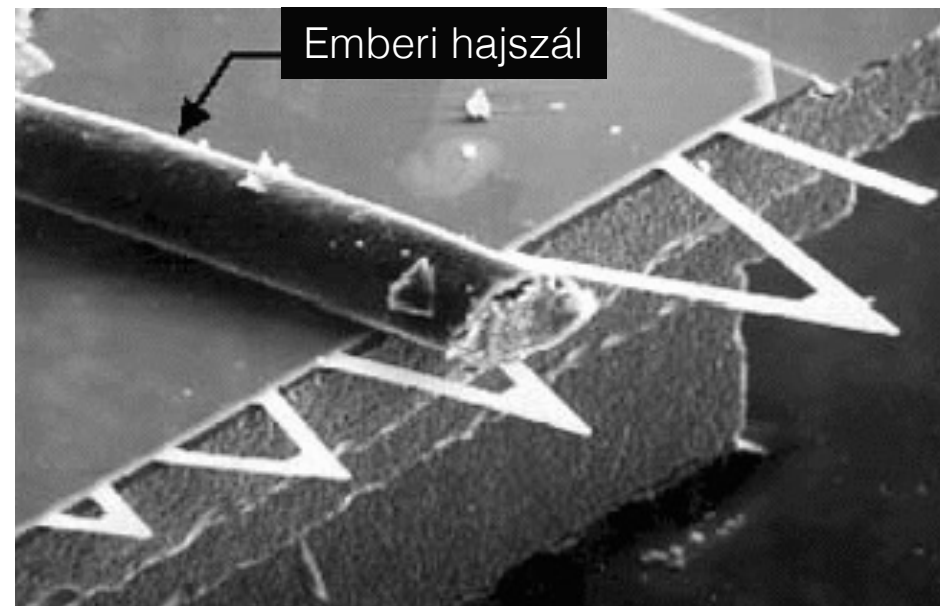
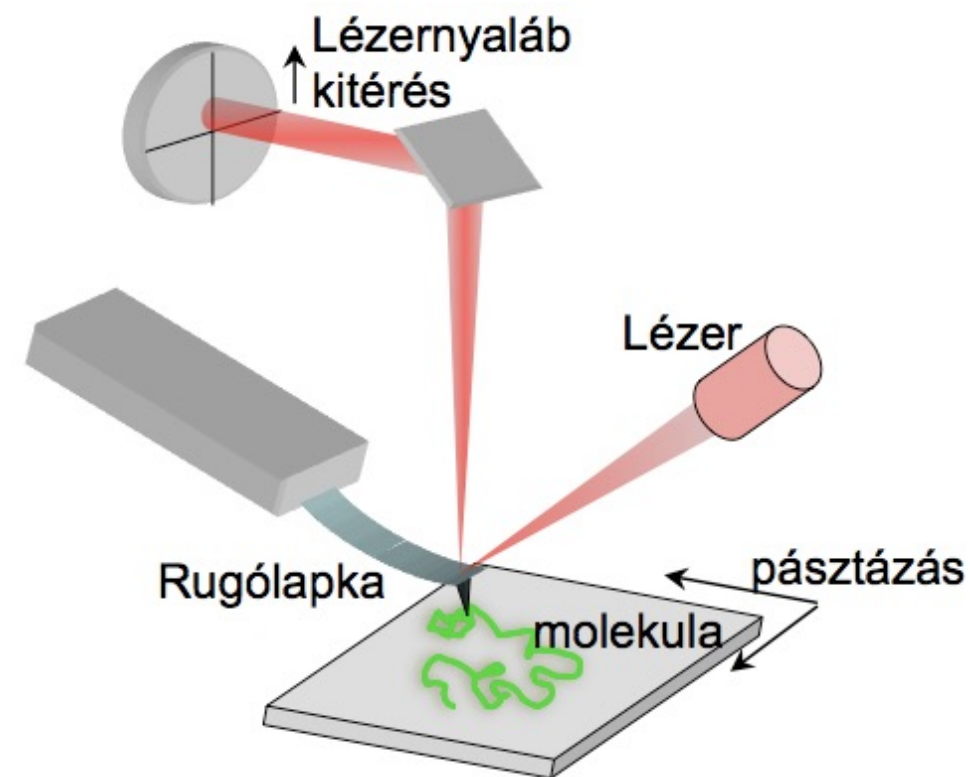
2. egy apró laprugó (rugólapka) elhajlását mérjük egy rávetülő lézerrel



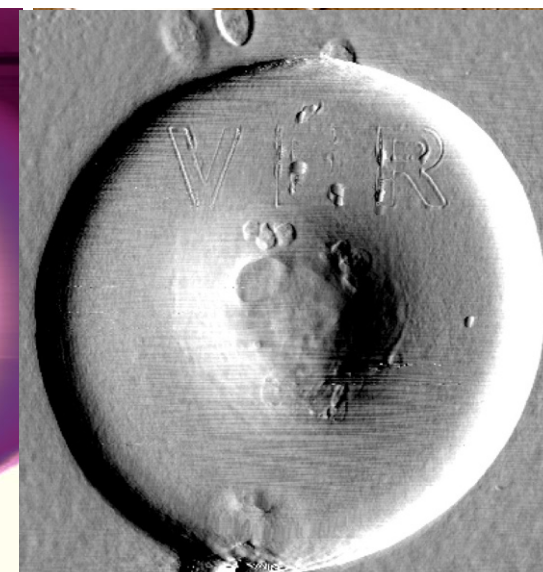
3. a mintát (vagy a rugólapkát) X-Y-Z irányokban mozgatva pásztázunk

# Atomi erőmikroszkóp (AFM)

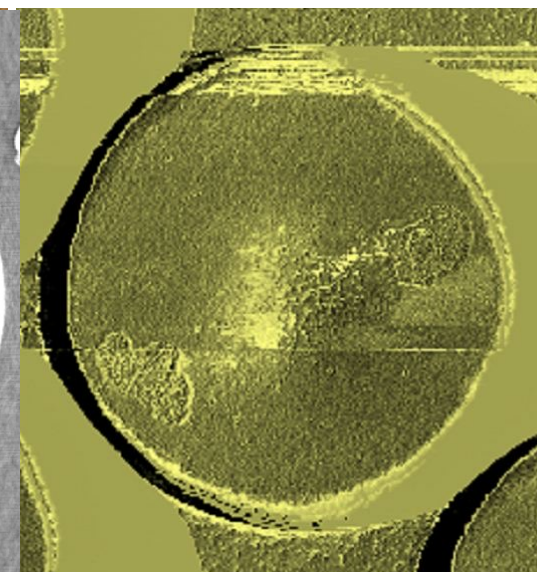
## AFM működése



Magasság kontraszt



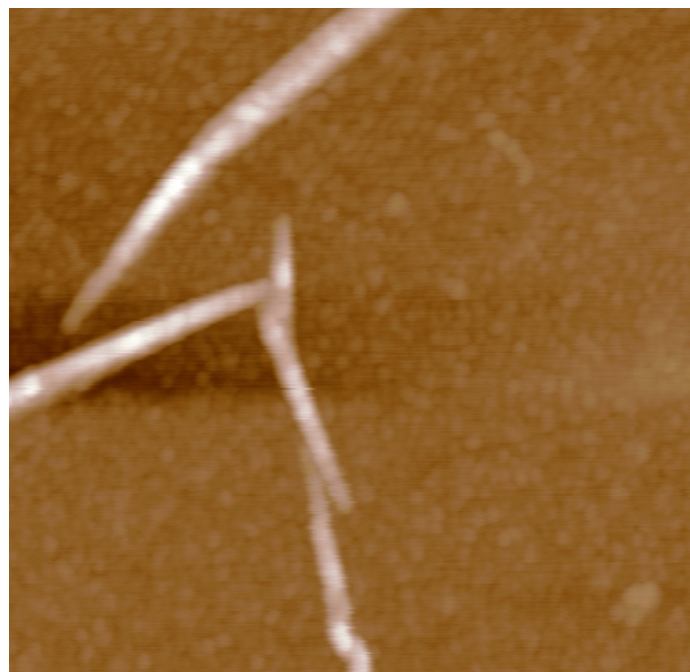
Amplitudó kontraszt



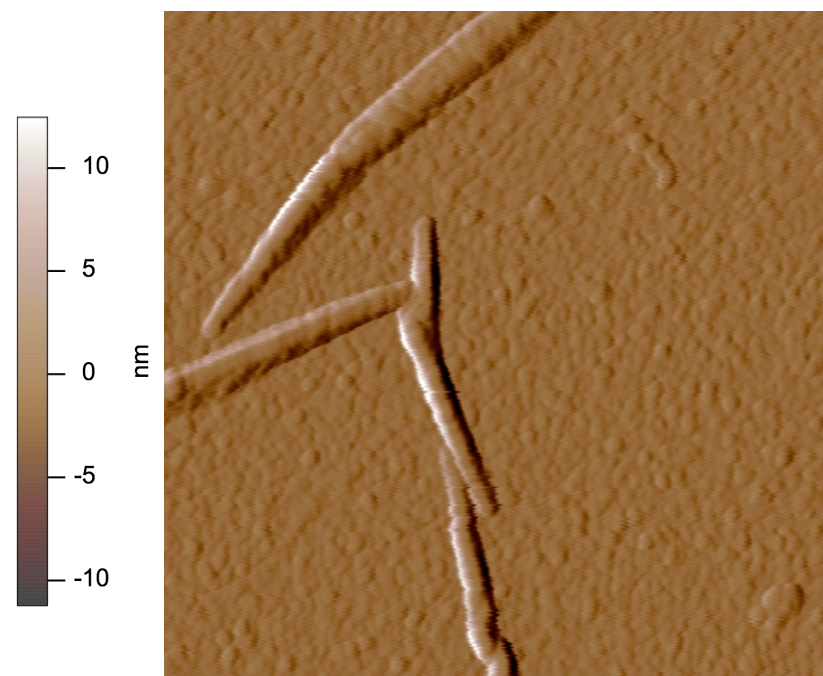
Fázis kontraszt



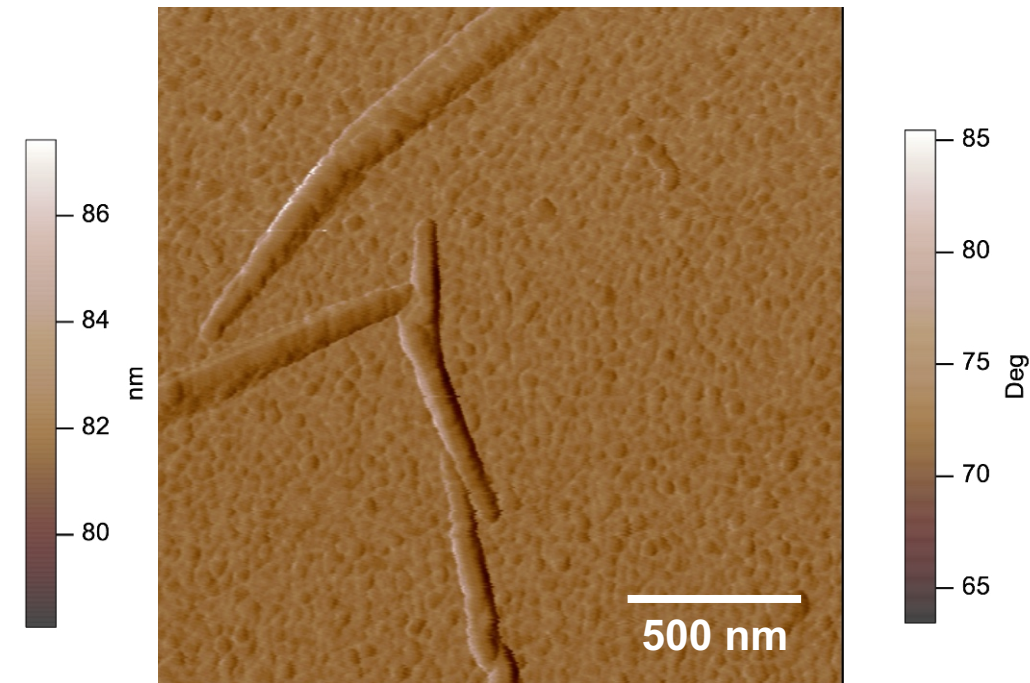
# Kontrasztmechanizmusok



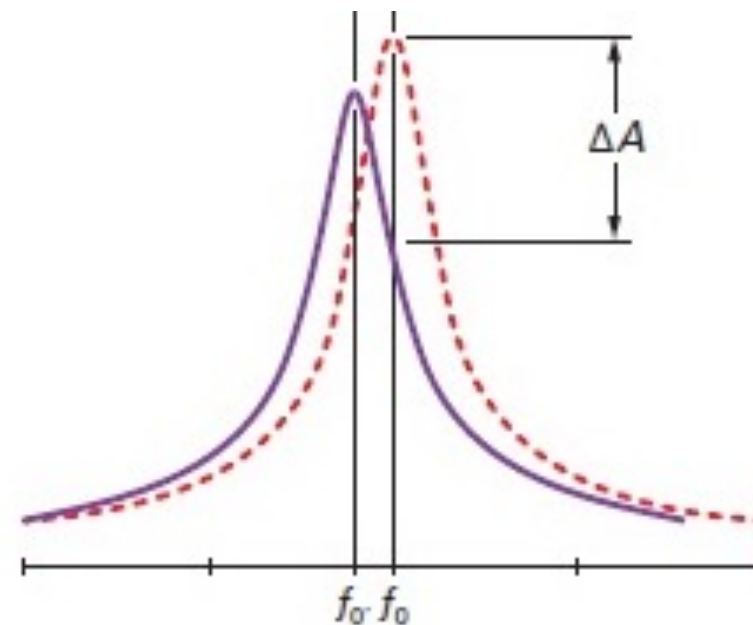
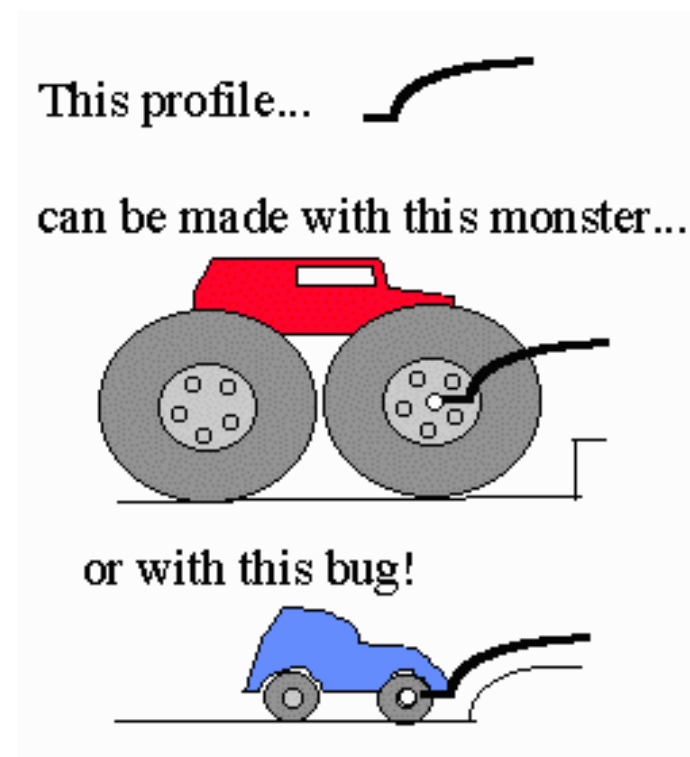
magasság kontraszt



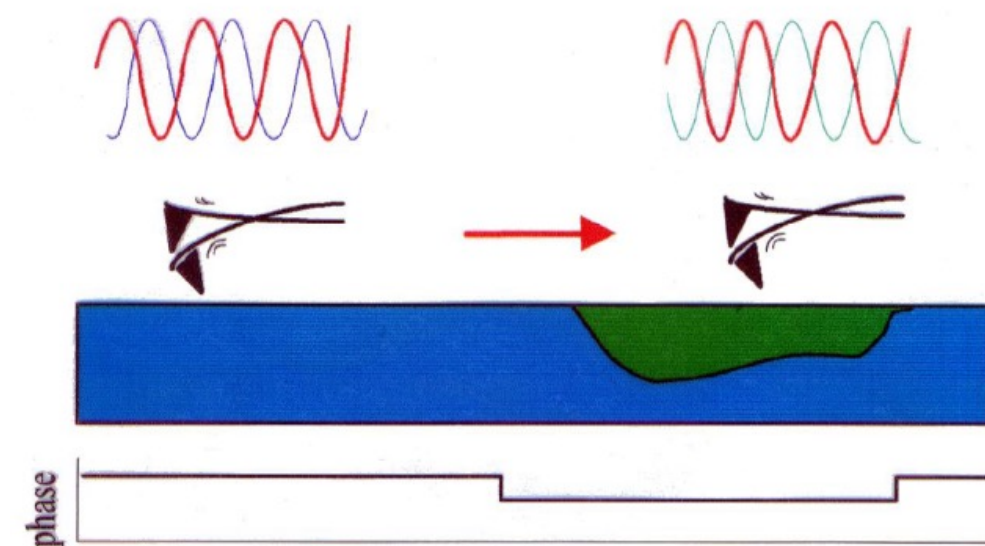
amplitúdó kontraszt



fázis kontraszt



külső erők jelenlétében  
„elhangelődő” rezonanciagörbe

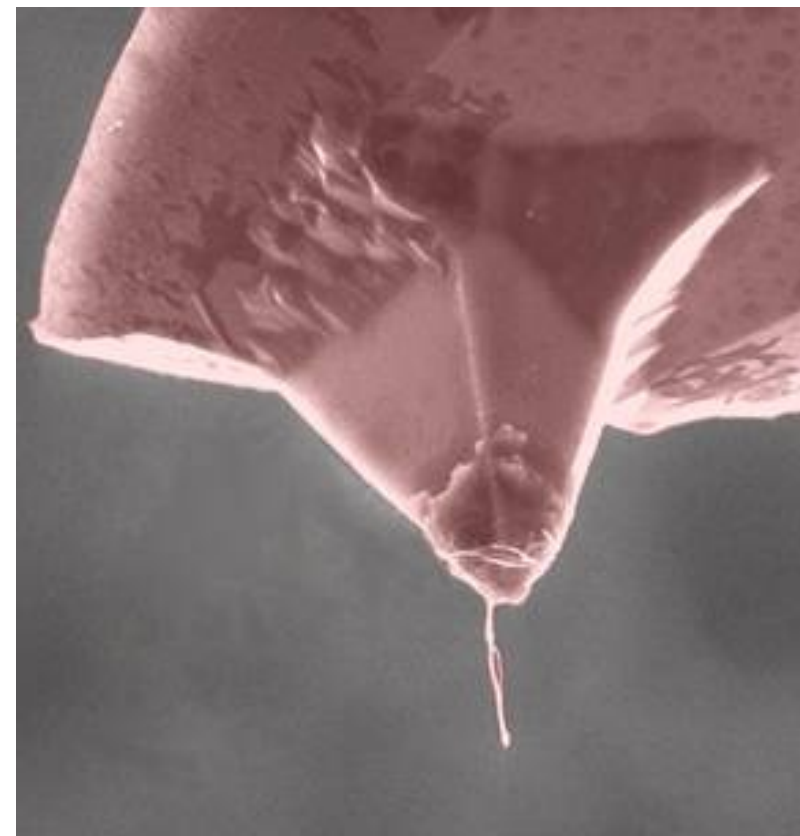
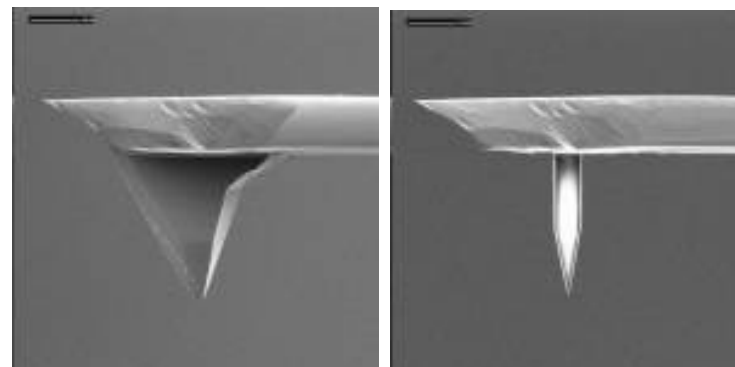
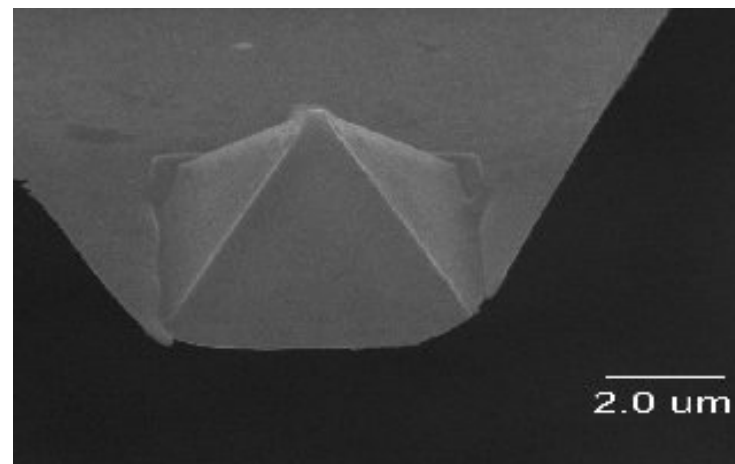
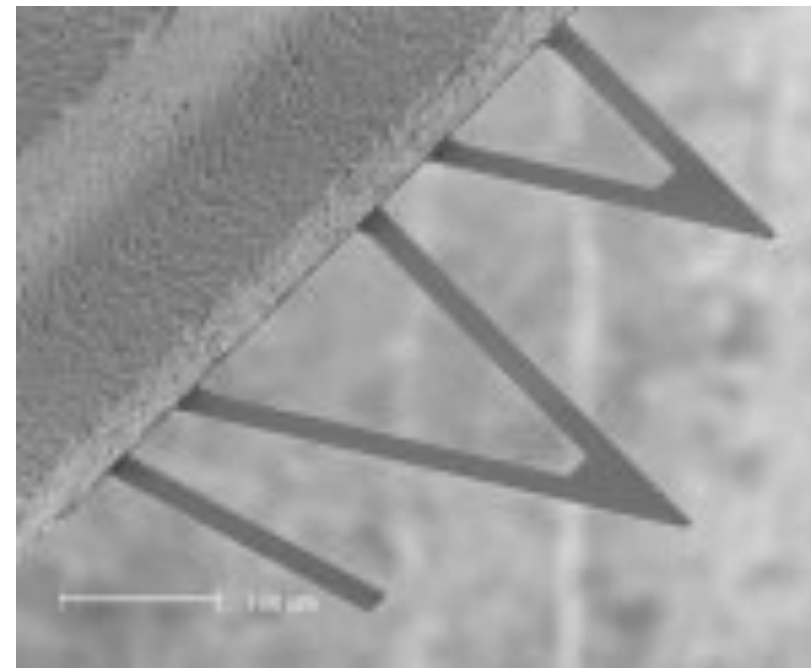
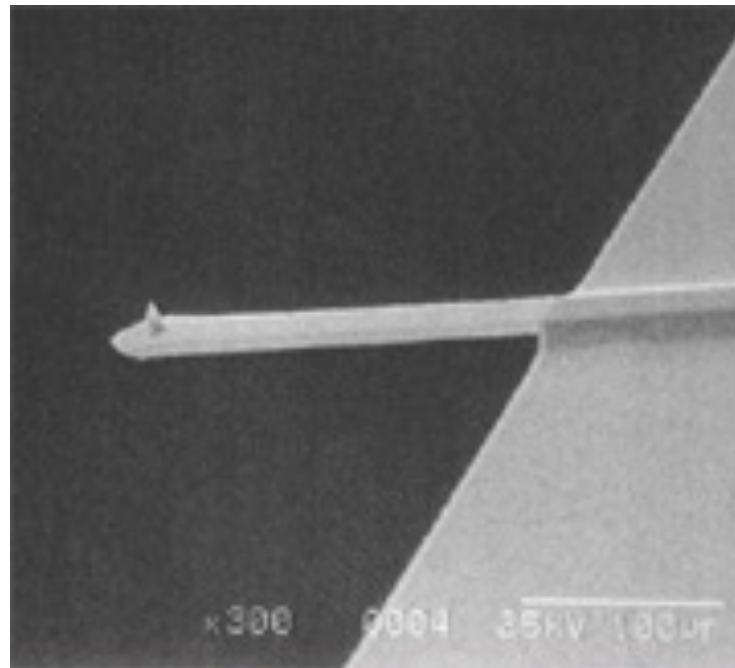


gerjesztő elektromos jel és a rugólapka  
sajátrezgésének fáziskülönbsége



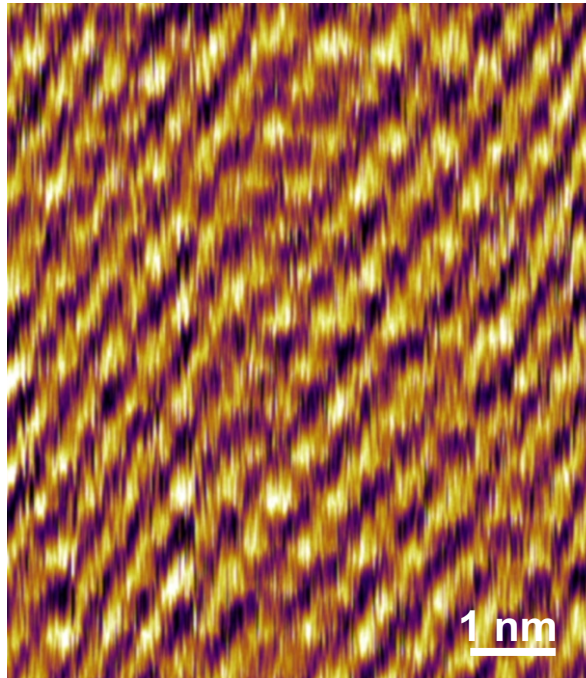
# AFM Rugólapkák és tűk

Az AFM kép térbeli feloldóképességét a tű görbületi sugara határozza meg

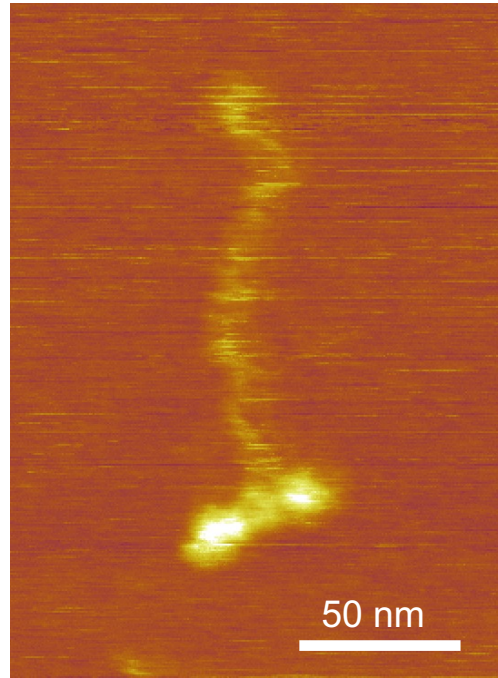




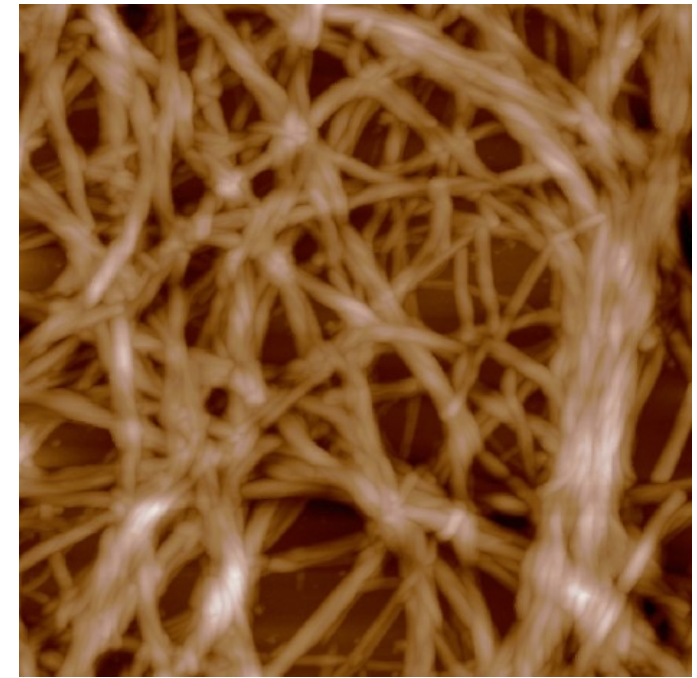
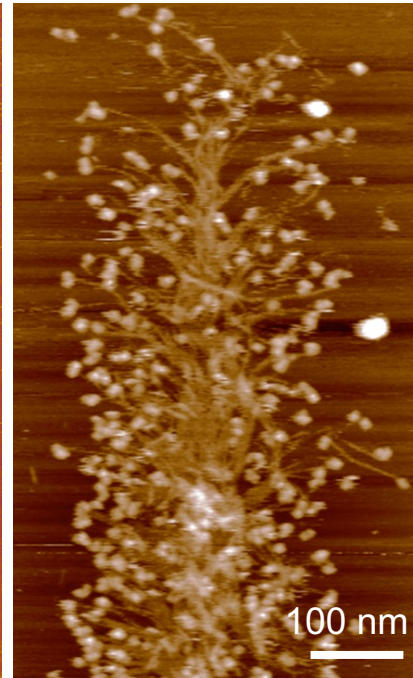
# Atomok, molekulák, komplexek AFM képe



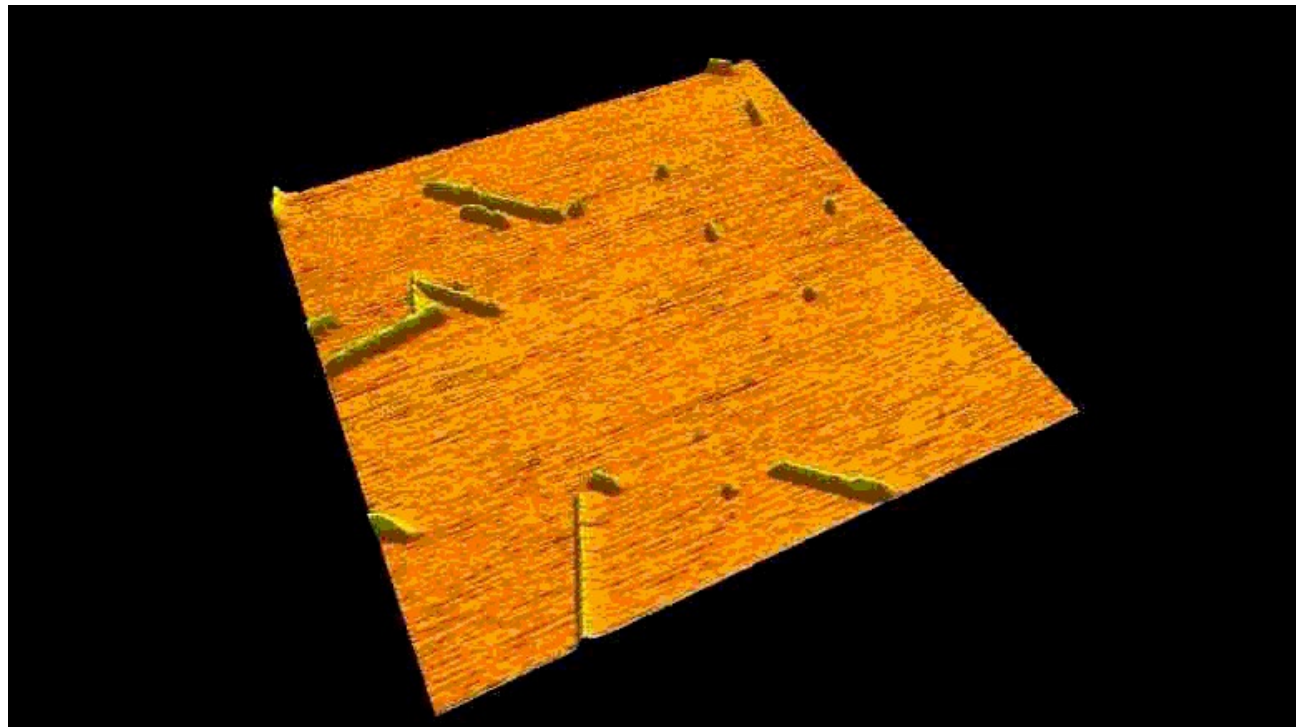
Csillám



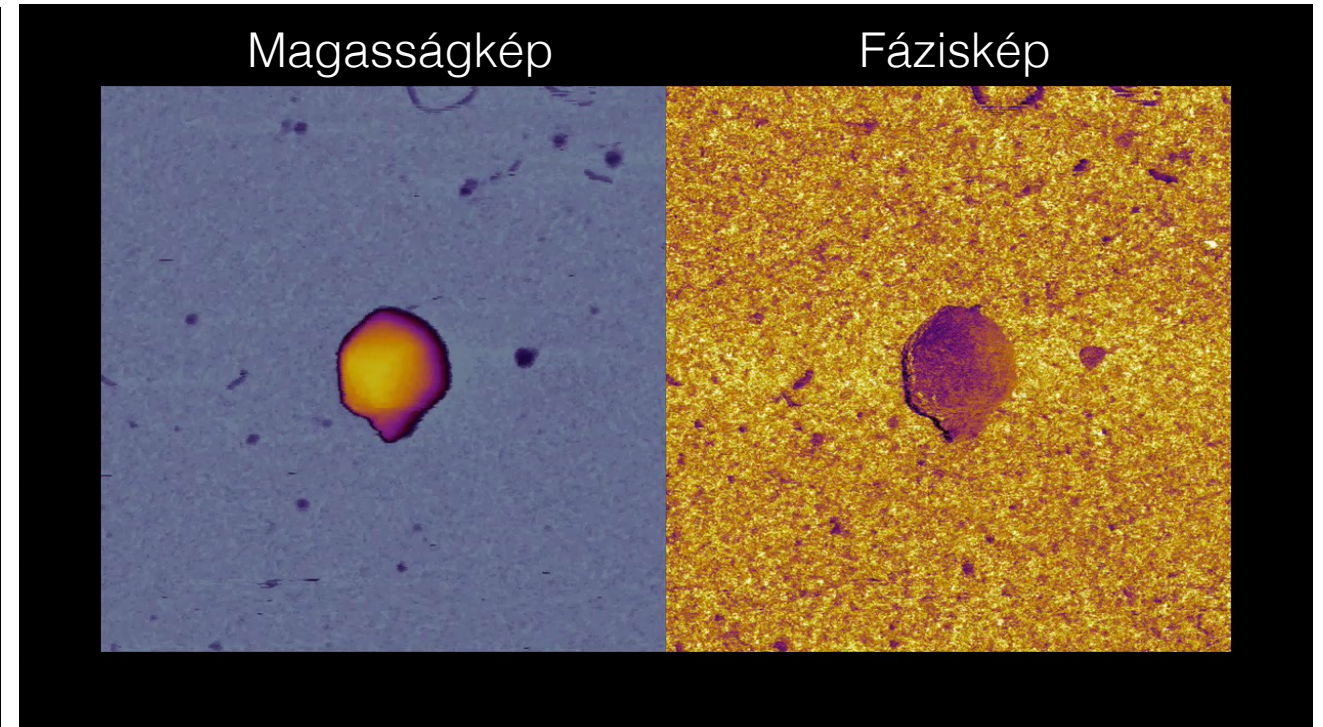
Miozinmolekula és filamentum



Amiloid  $\beta$ 1-40 fibrillumok



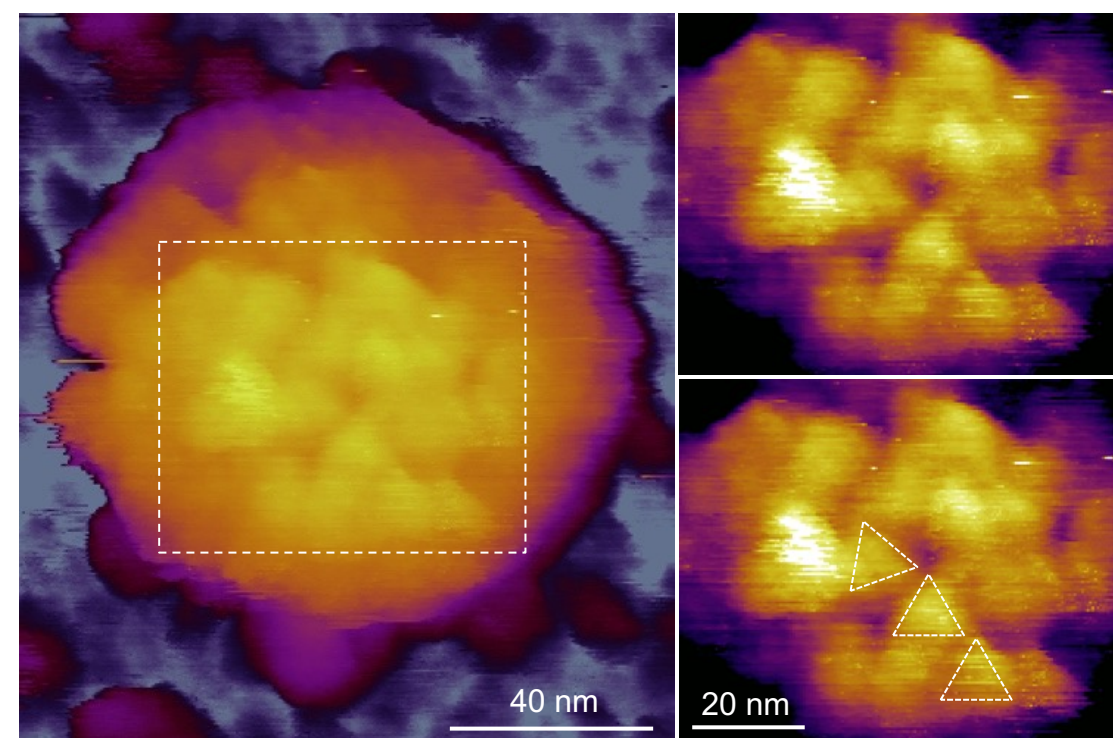
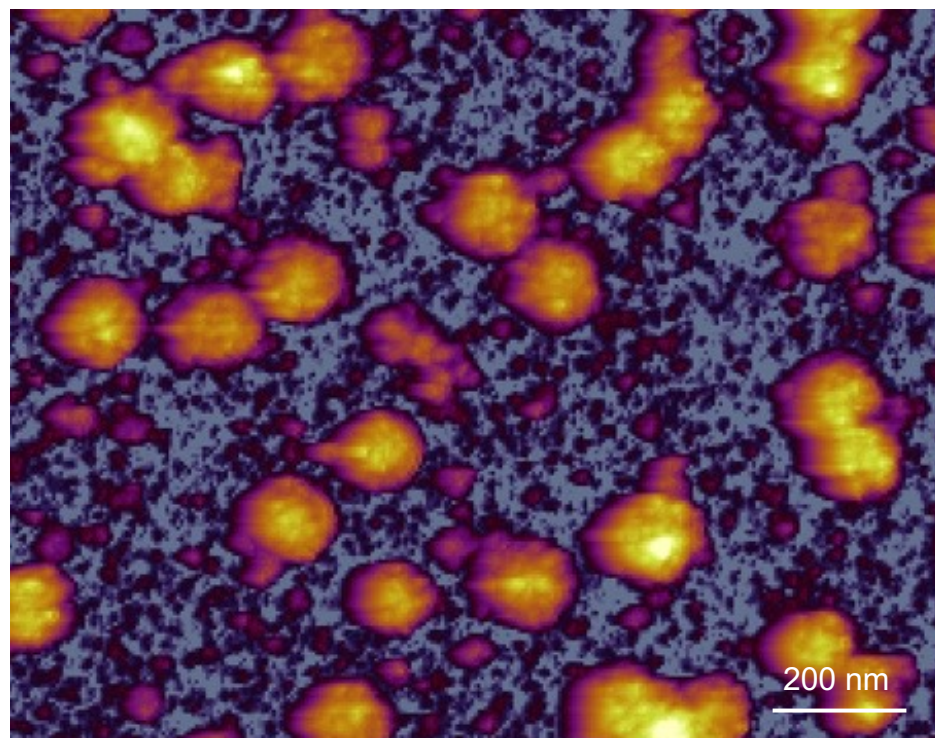
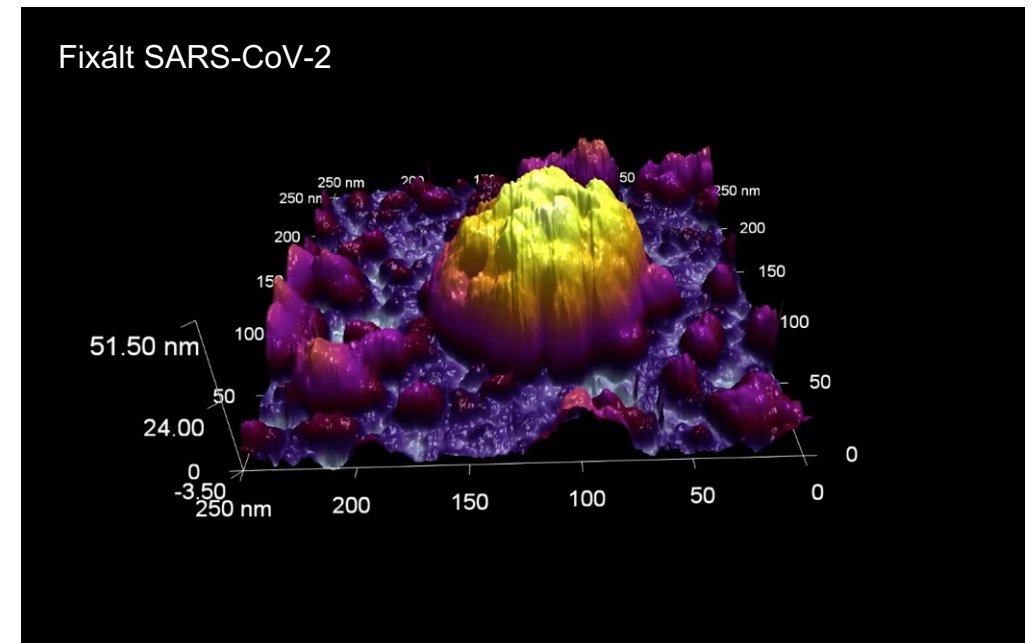
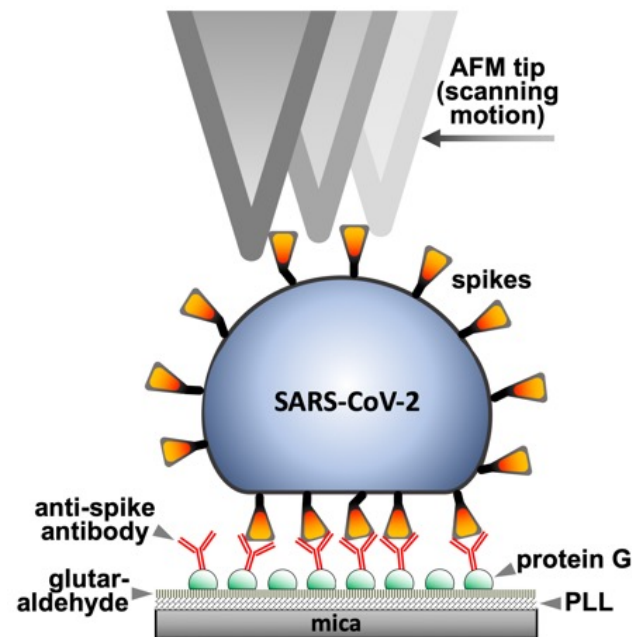
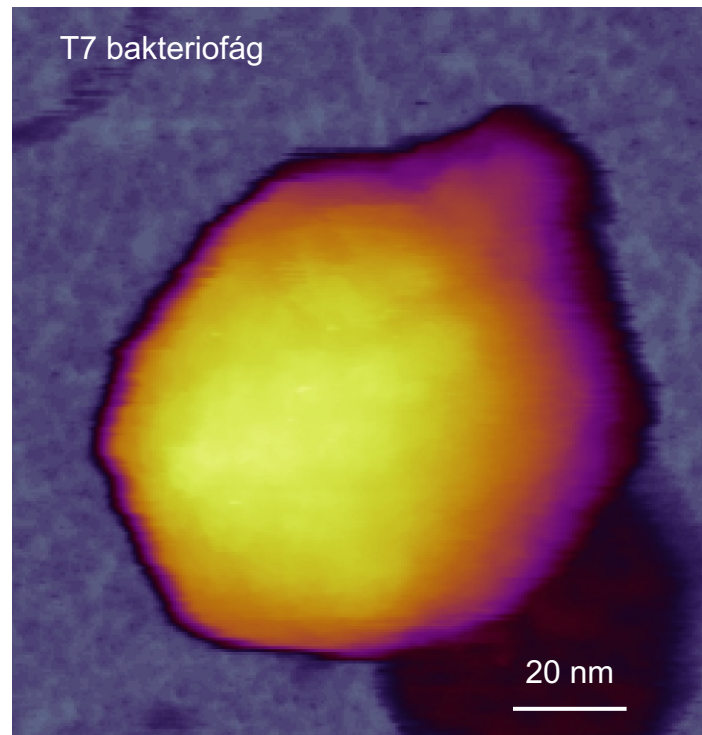
Amiloid fibrillumok növekedése



Vírus DNS kilökődése



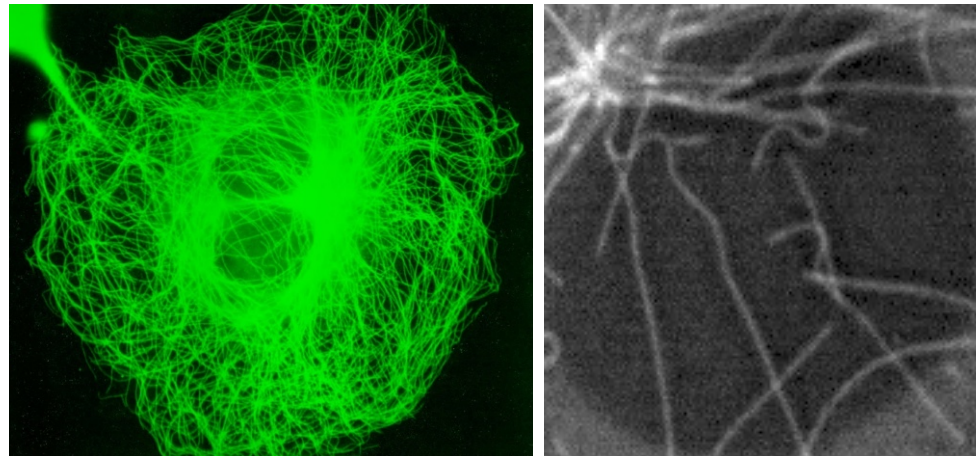
# SARS-CoV-2 vírusok AFM vizsgálata





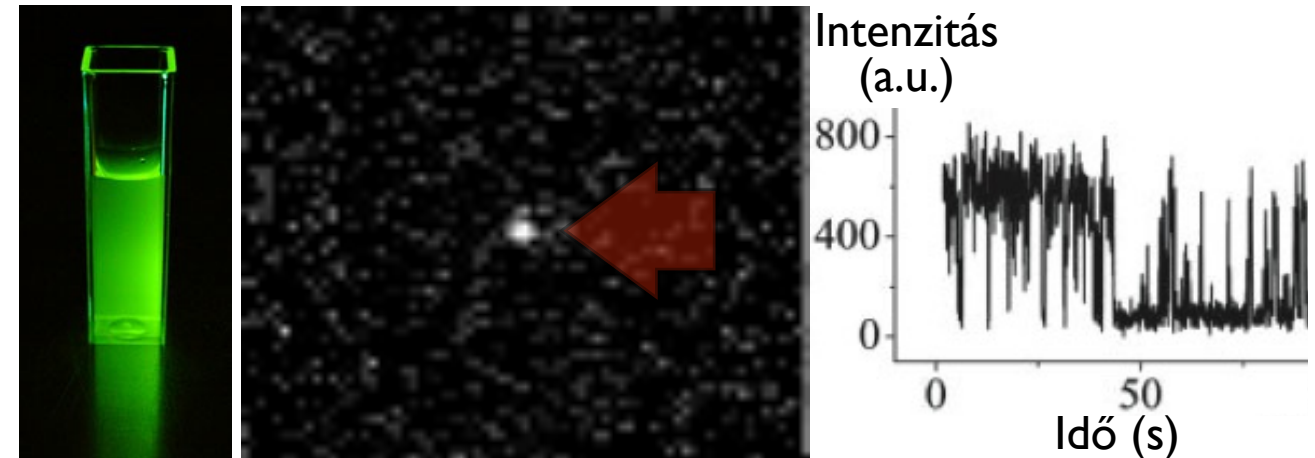
# Molekulák - miért egyenként?

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



Sokaság - mikrotubuláris rendszer      Egyedi mikrotubulusok - treadmilling

## 2. Sztochasztikus folyamatokat ismerhetünk meg

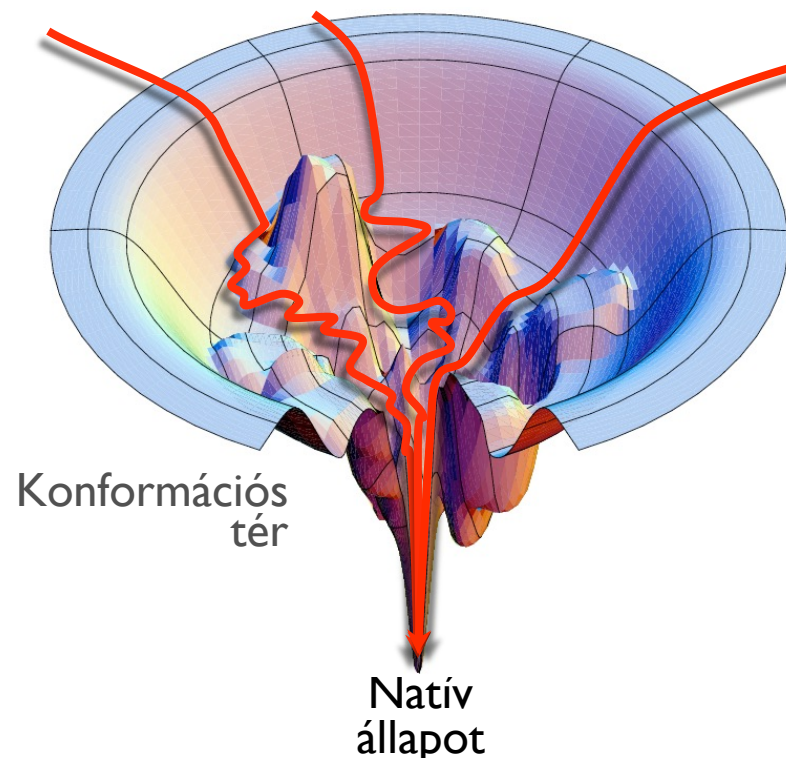


Sokaság - intenzitás

Egyedi kvantumpont - pislogás ("blinking")

## 3. Párhuzamos útvonalakon zajló folyamatokat azonosíthatunk

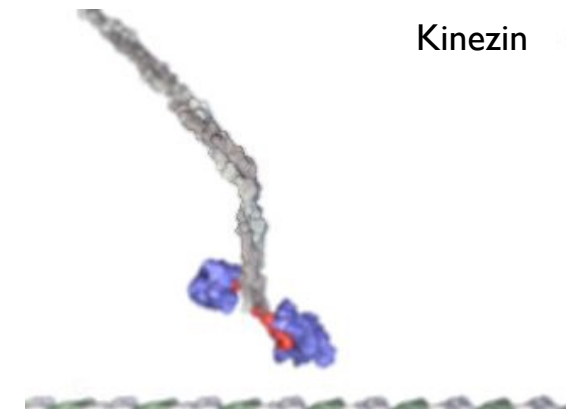
Kigombolyodott állapot



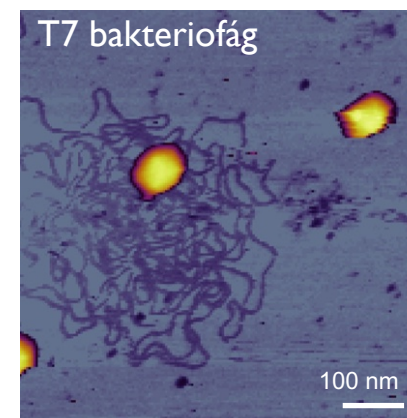
## 4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük



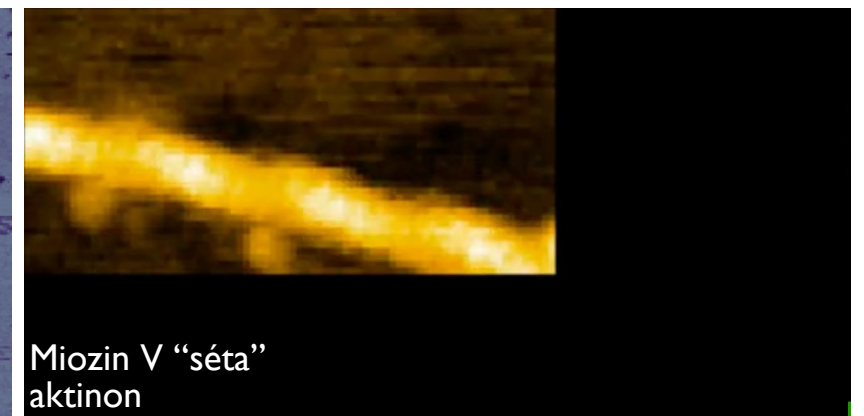
von Willebrand faktor



Kinezin



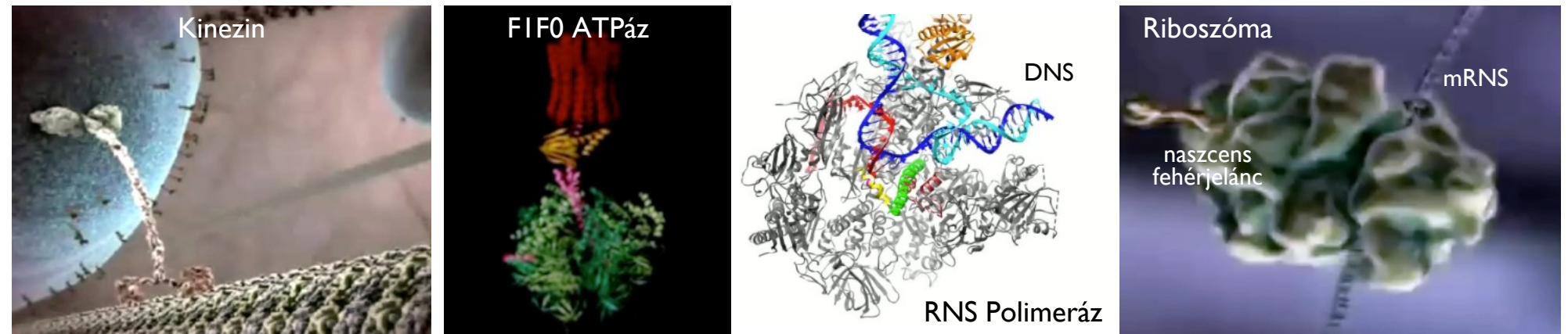
T7 bakteriofág



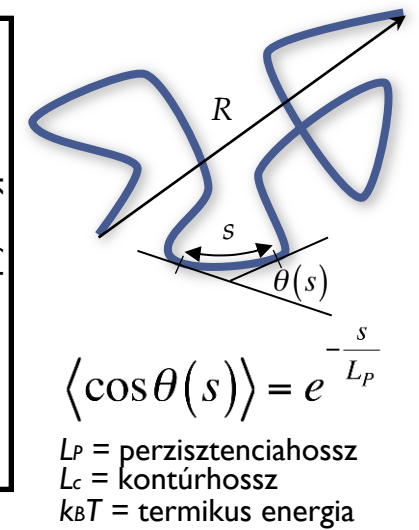
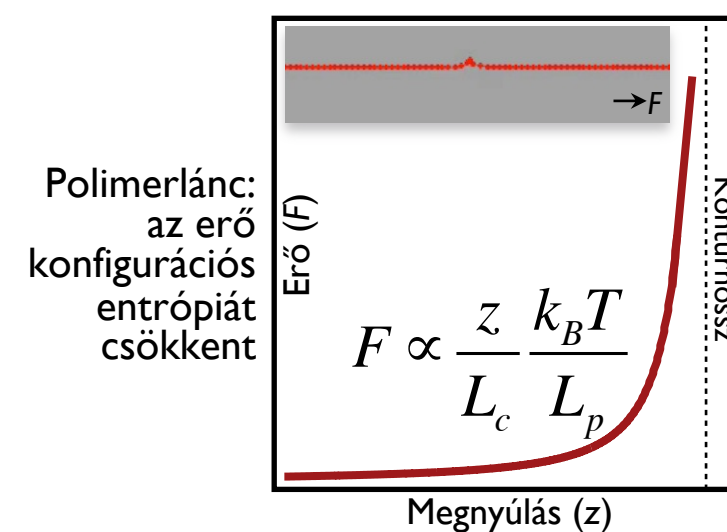
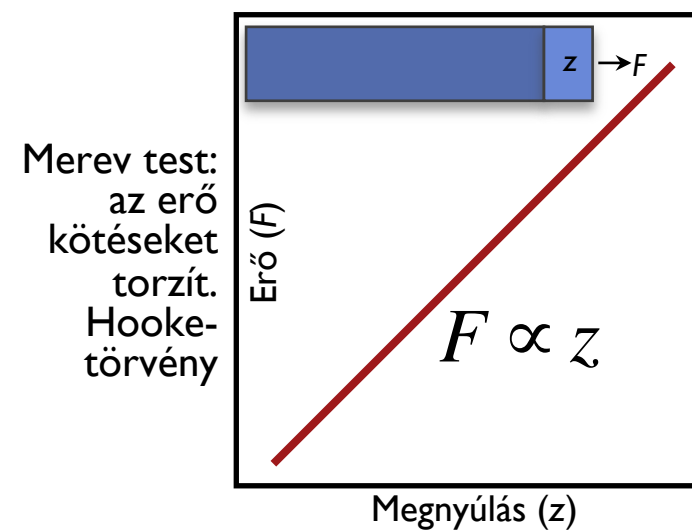
Miozin V "séta" aktinon

# A mechanikai erő...

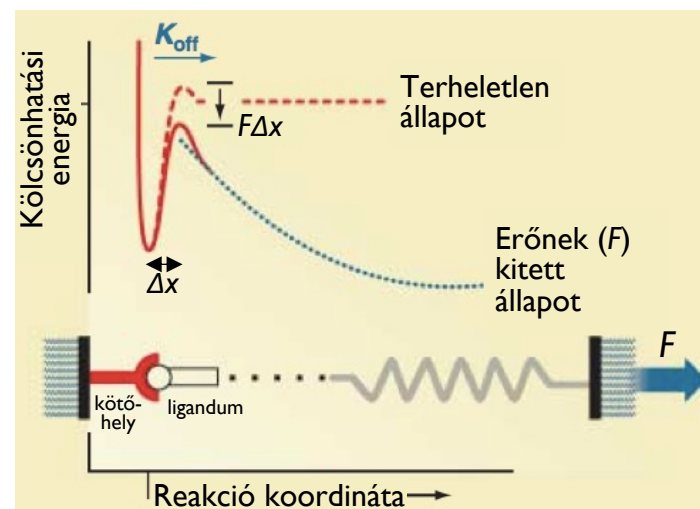
1) kifejlődik:



2) deformálja a szerkezetet:



3) kötéseket szakít fel:

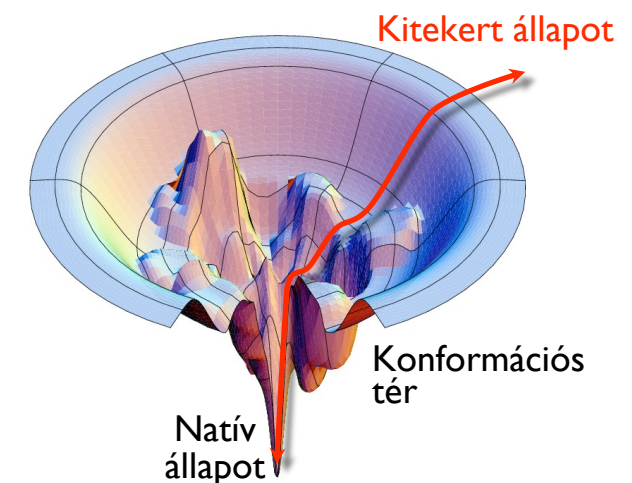


Terhelt kötés élettartama csökken:

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

$\omega$  = karakterisztikus idő  
 $E_a$  = aktivációs energia  
 $\Delta x$  = távolság a kötött és tranzíciós állapotok között

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



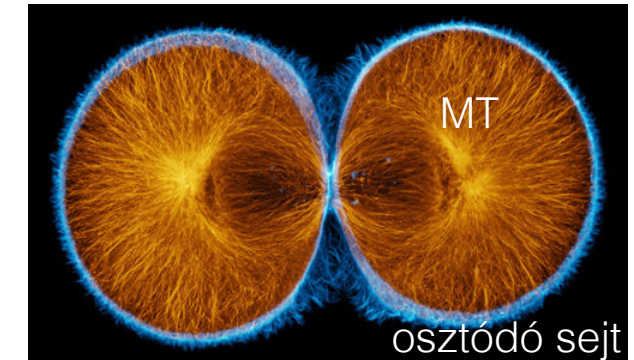
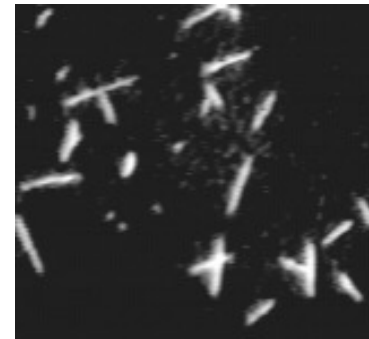


# A polimerlánc egyensúlyi alakja és rugalmassága összefügg

Merev lánc

$$l_p \gg L$$

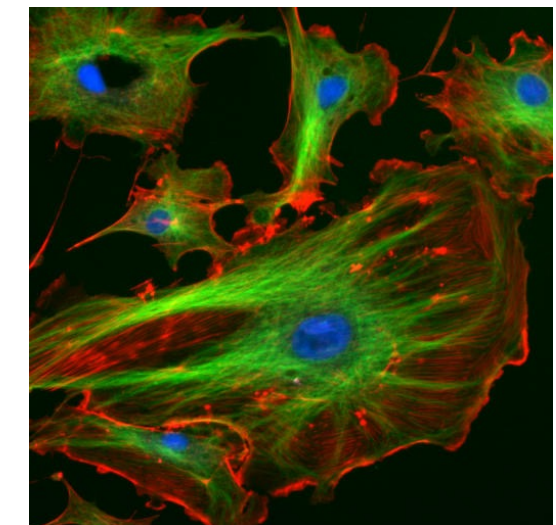
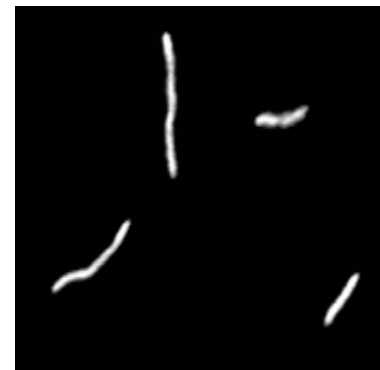
Mikrotubulus



Szemiflexibilis lánc

$$l_p \approx L$$

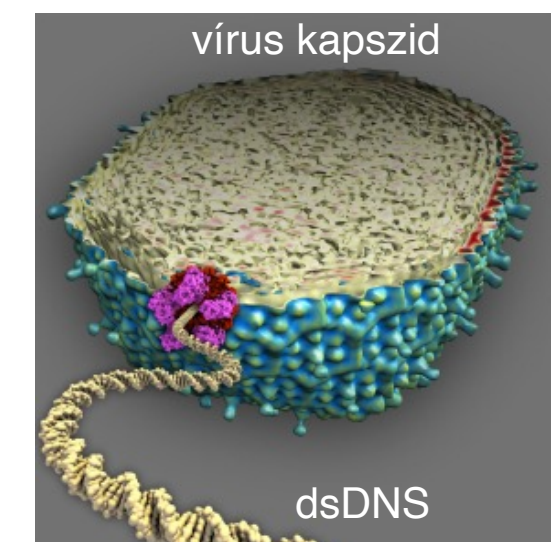
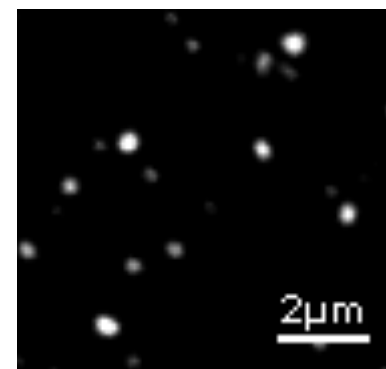
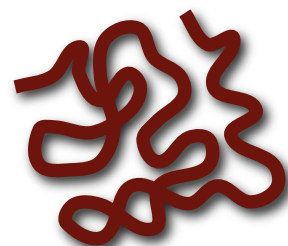
Mikrofilamentum



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

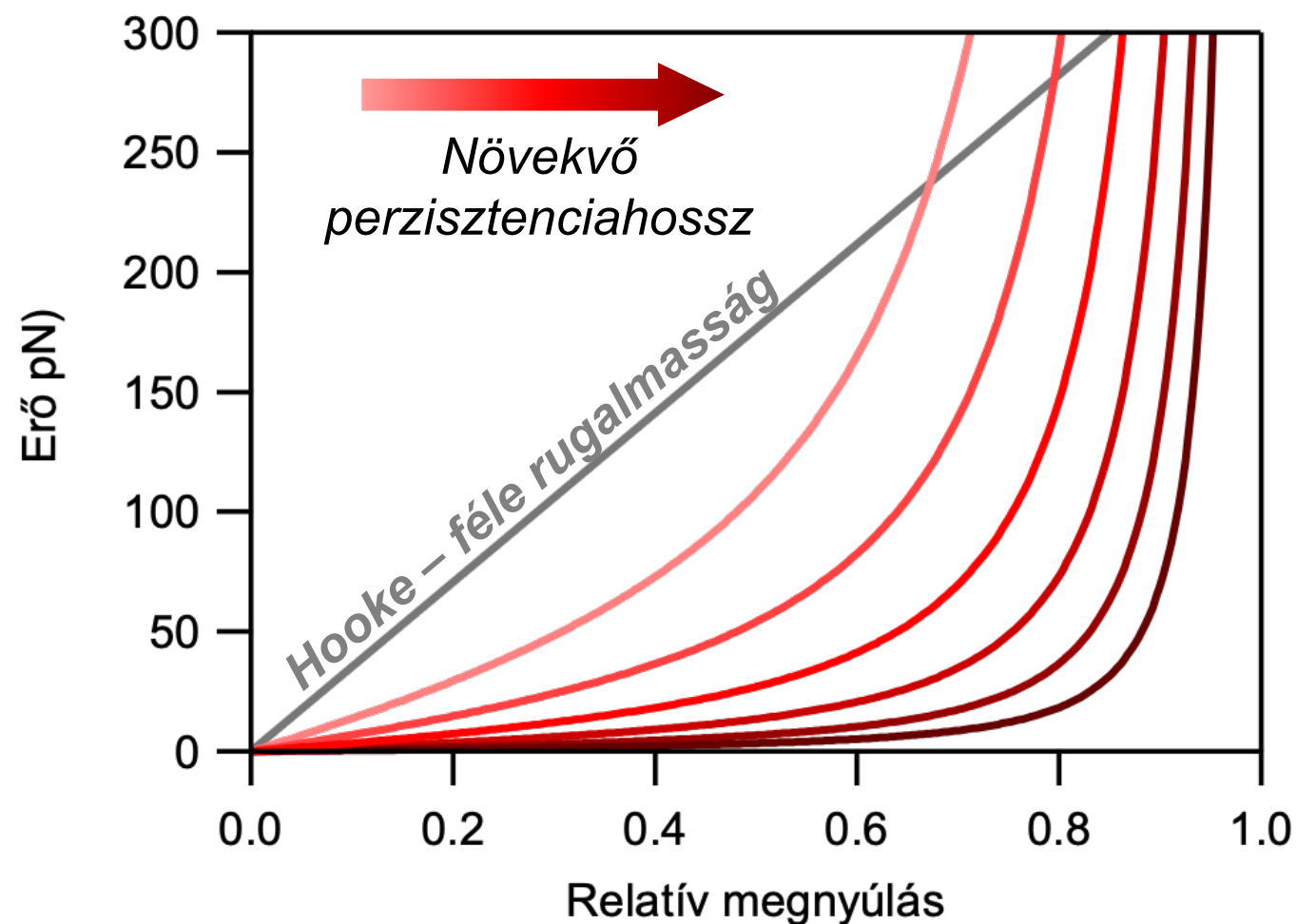
$T$  = abszolút hőmérséklet

$L$  = kontúrhossz

$R$  = vég-vég hossz

$R/L$  = relatív megnyúlás

## Nemlineáris erőválasz

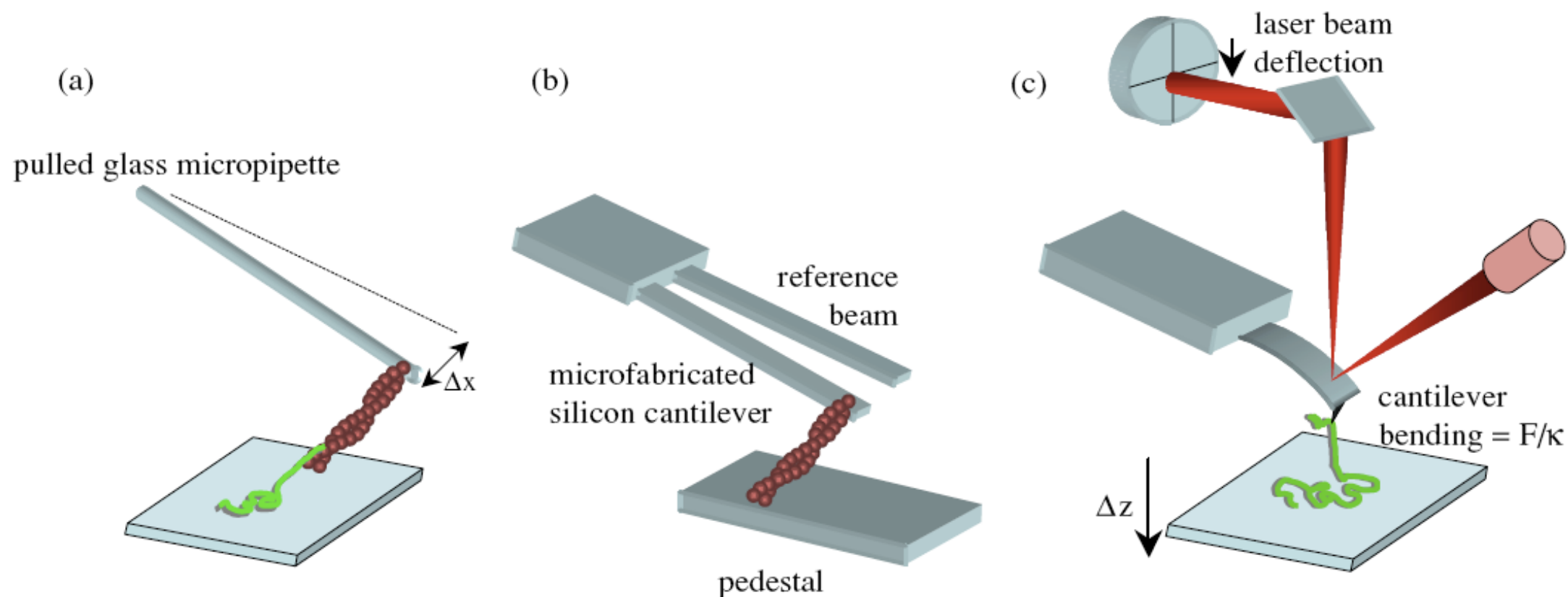


## Gough-Joule effektus

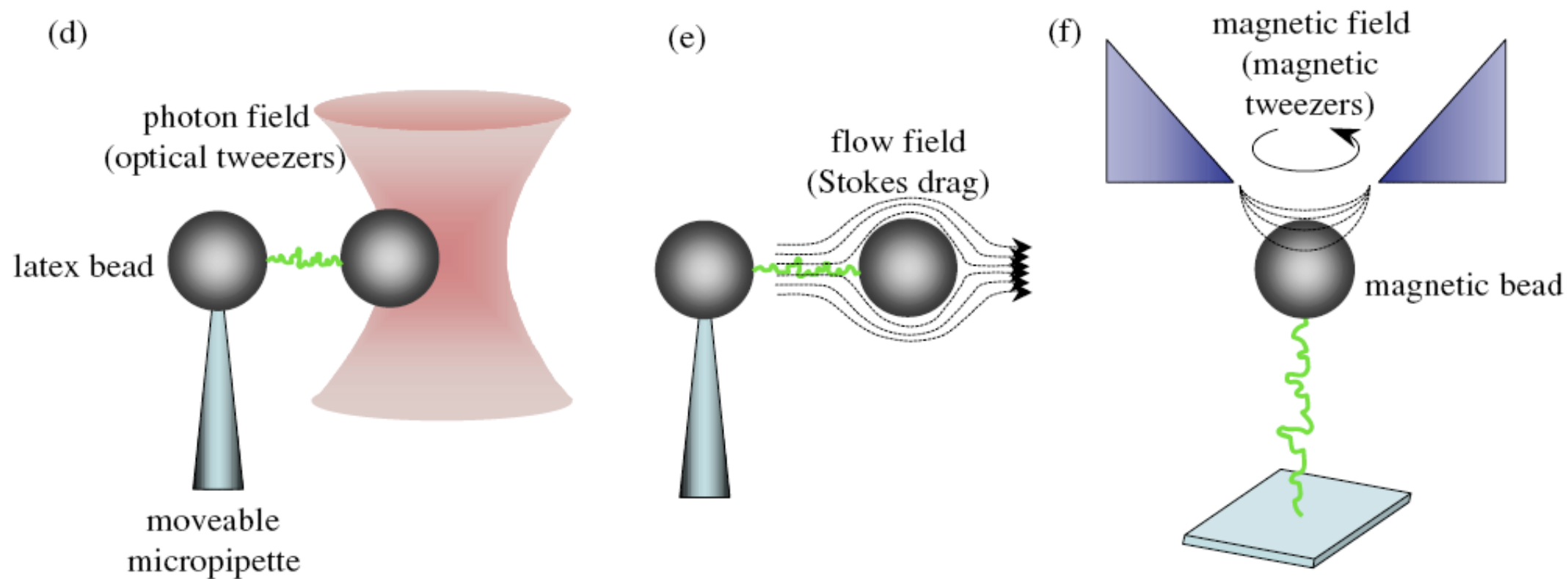


# Egyedi molekulák manipulálása

Laprugó  
módszerek:

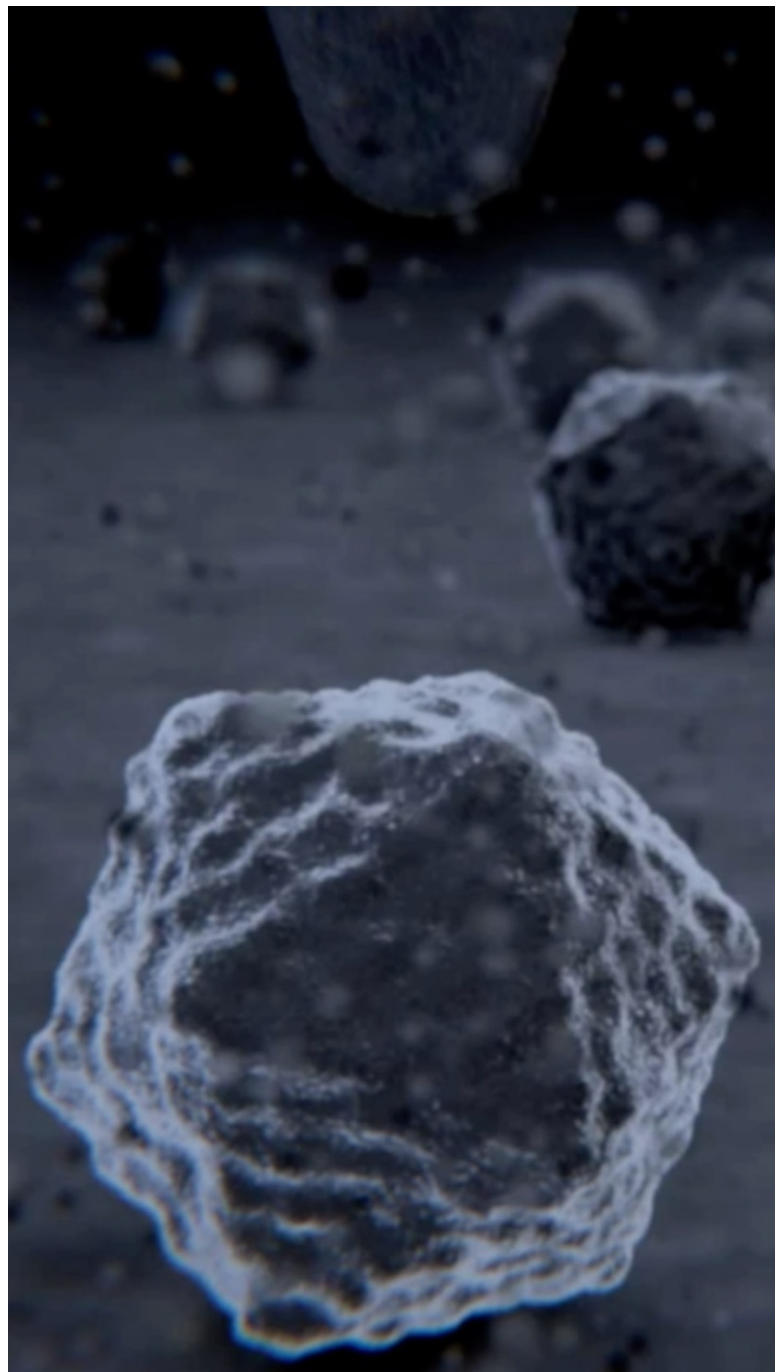


Mező alapú  
módszerek:

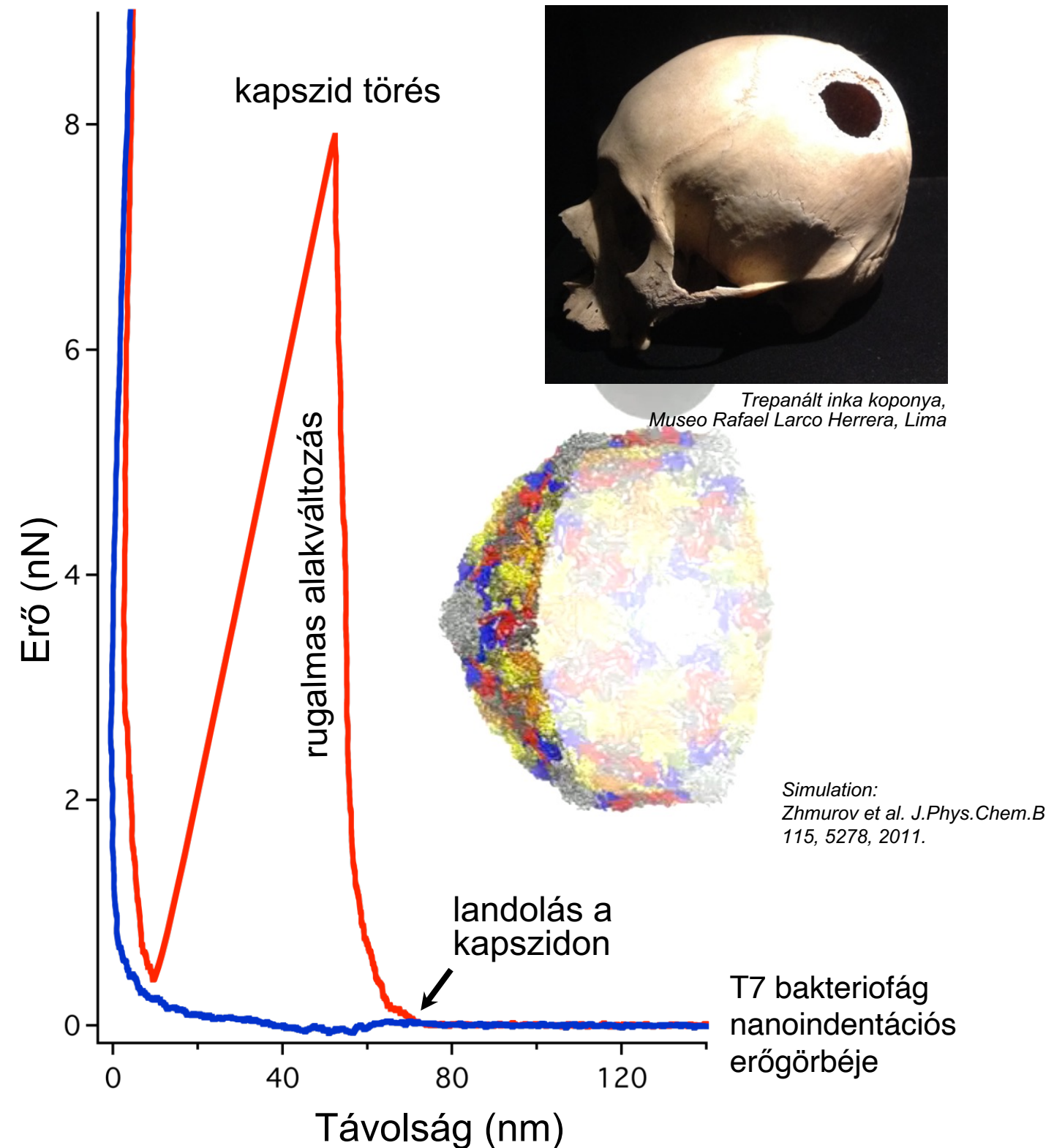




# Egyedi vírusrészecske nanoindentáció AFM-mel

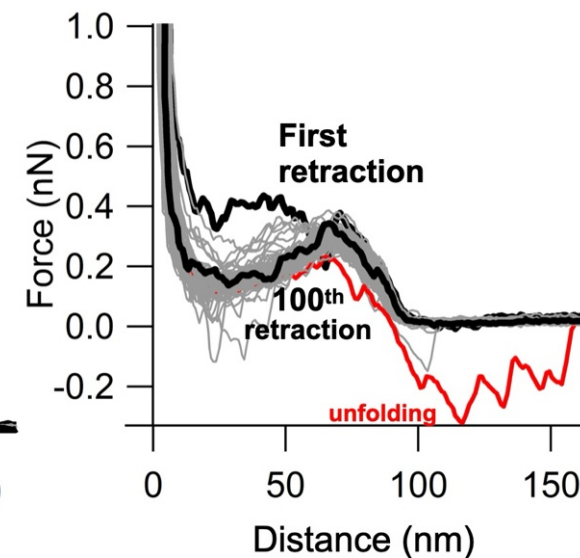
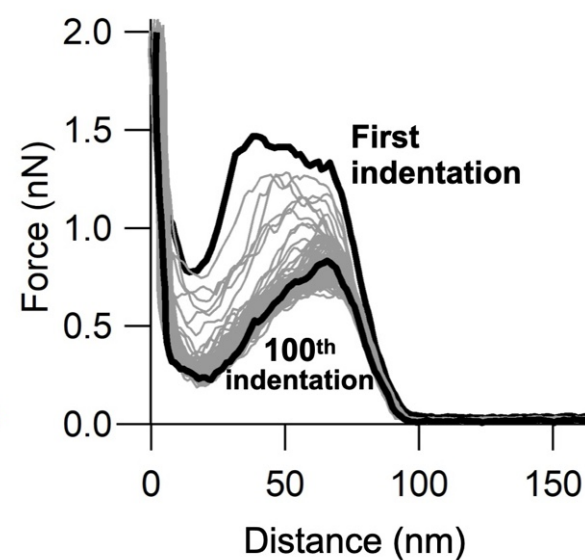
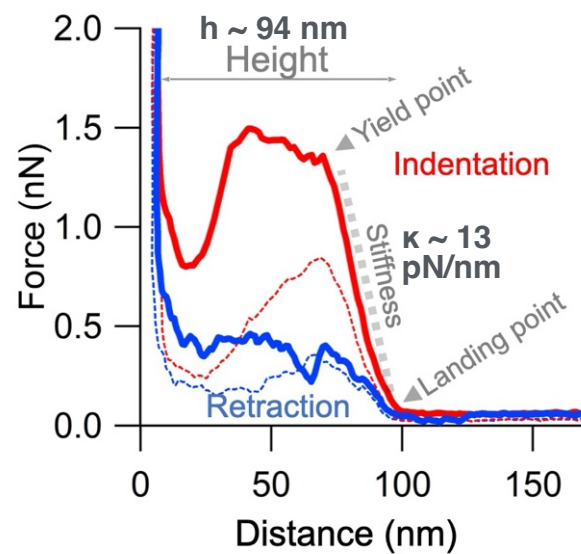
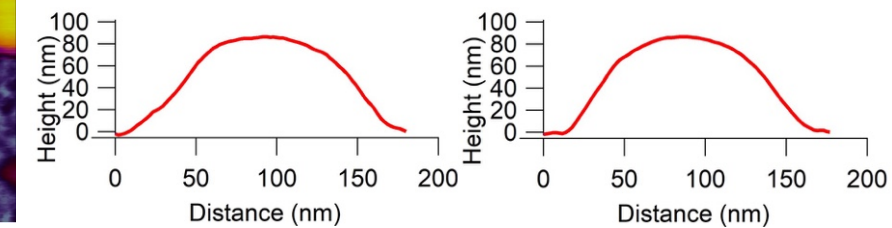
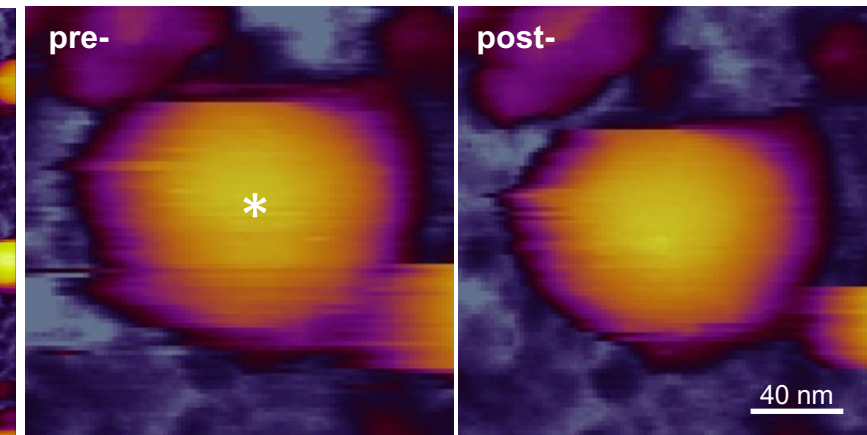
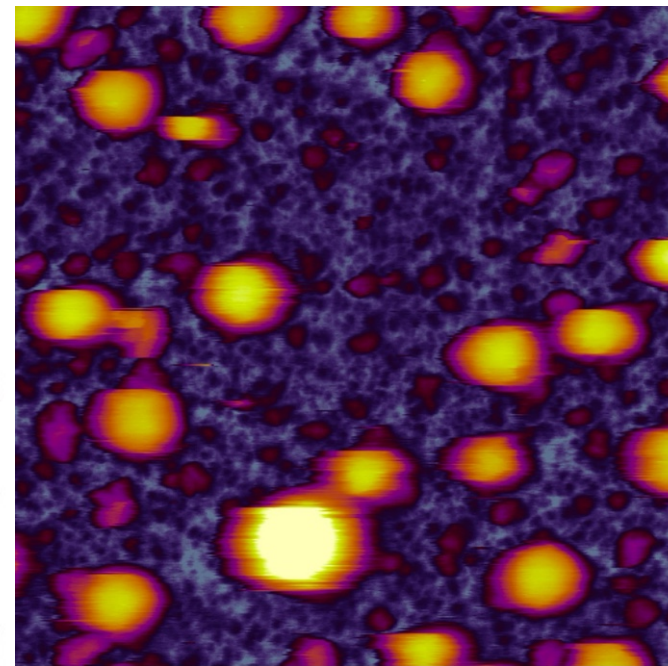
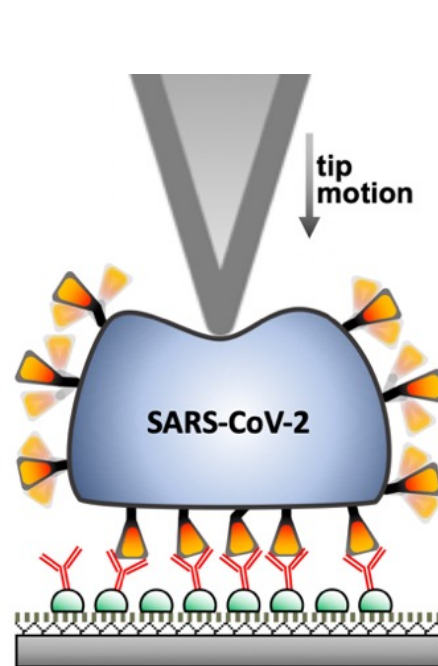
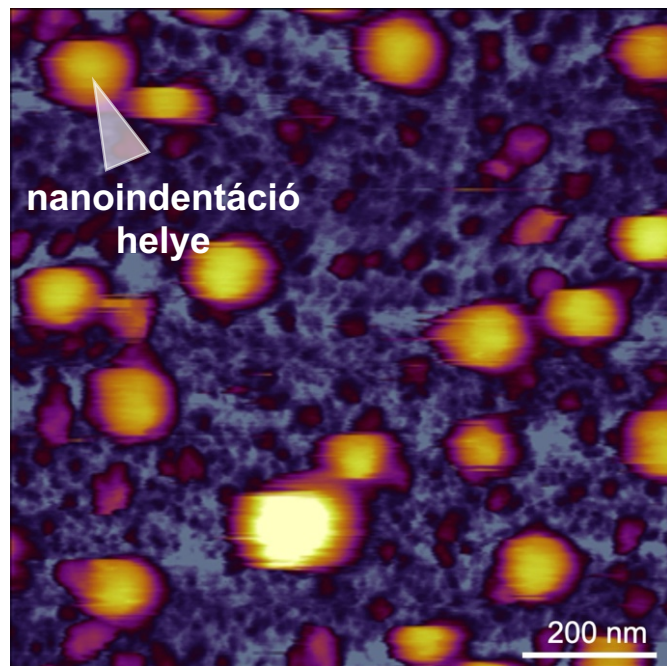


Video by Scixel for Pedro de Pablo, Madrid

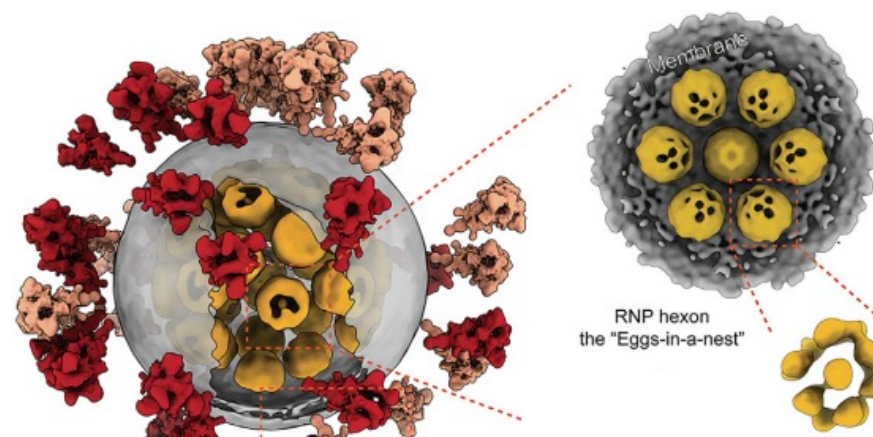




# SARS-CoV-2 nanomechanika



Video by Scixel

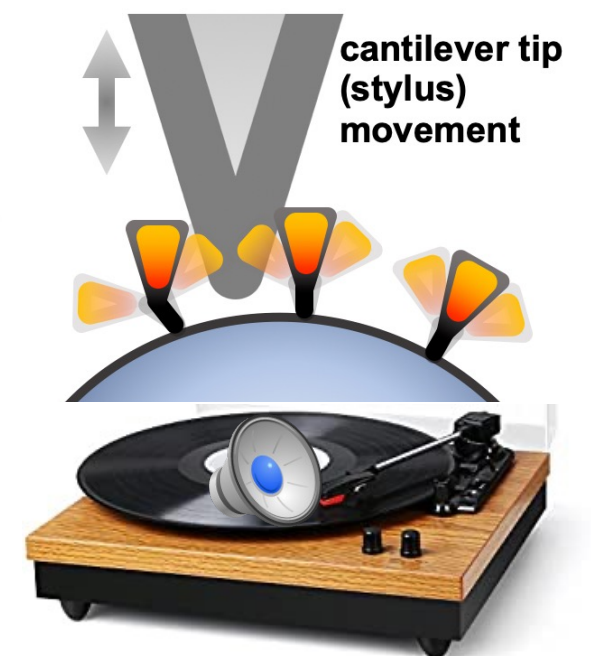
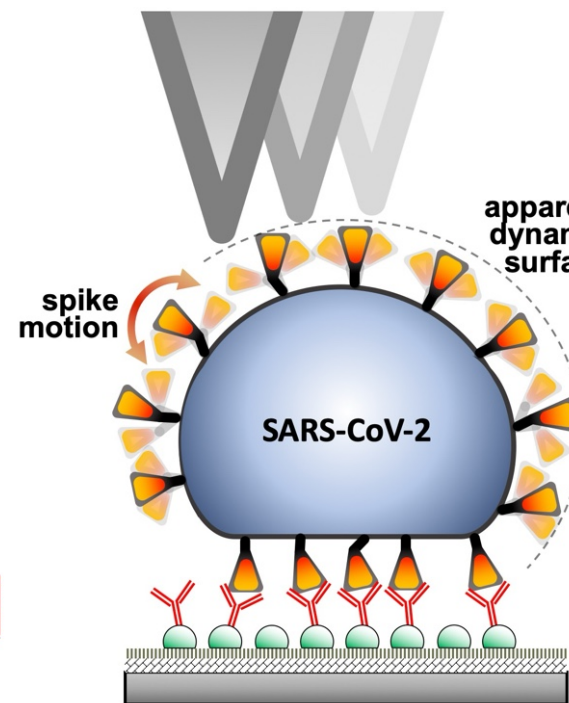
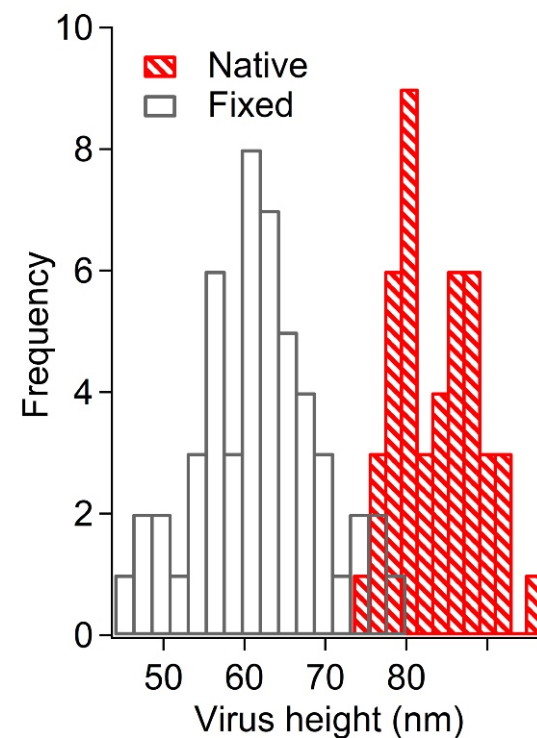
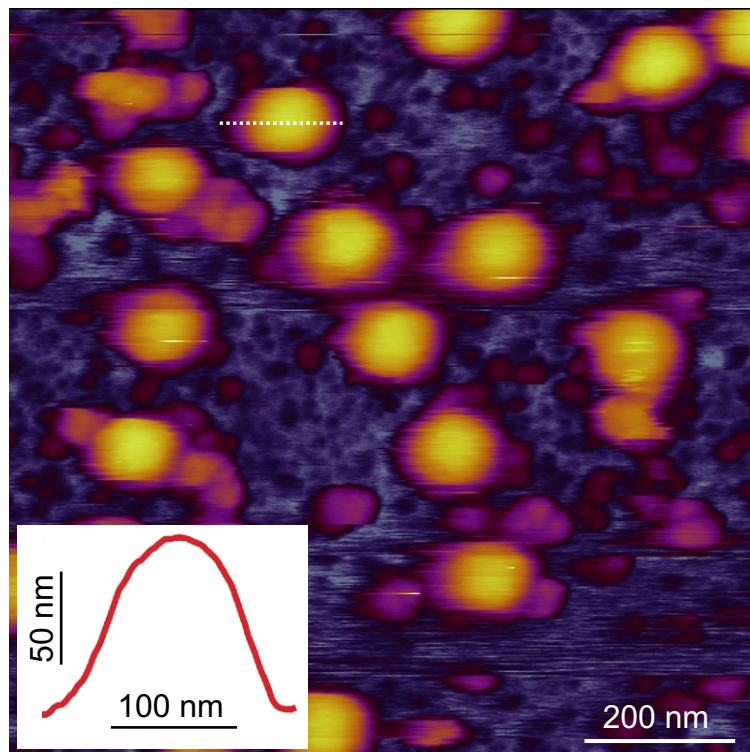


Yao, et al. Cell, 2020

Az RNP fészekszerű elrendeződése a SARS-CoV-2 virionban ellenállhat a nanoindentációnak



# A koronavírus tüskék mozgágát ”meghallgathatjuk”



# Különleges mikroszkóp alkalmazás: lézercsipesz

Einstein:  
tömeg-energia  
ekvivalencia

$$E = mc^2$$

Planck:  
sugárzási  
törvény

$$E = hf$$

Maxwell:  
fény terjedési  
sebessége

$$c = \lambda f$$



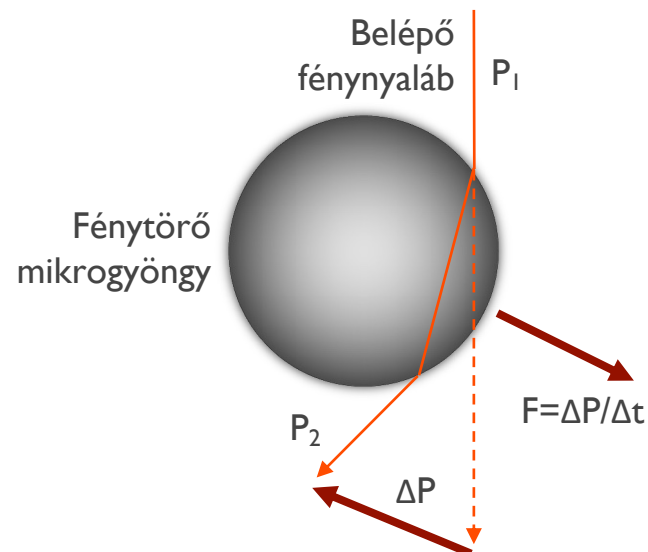
Louis-Victor-Pierre-Raymond, 7th duc de Broglie (1892-1987)

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

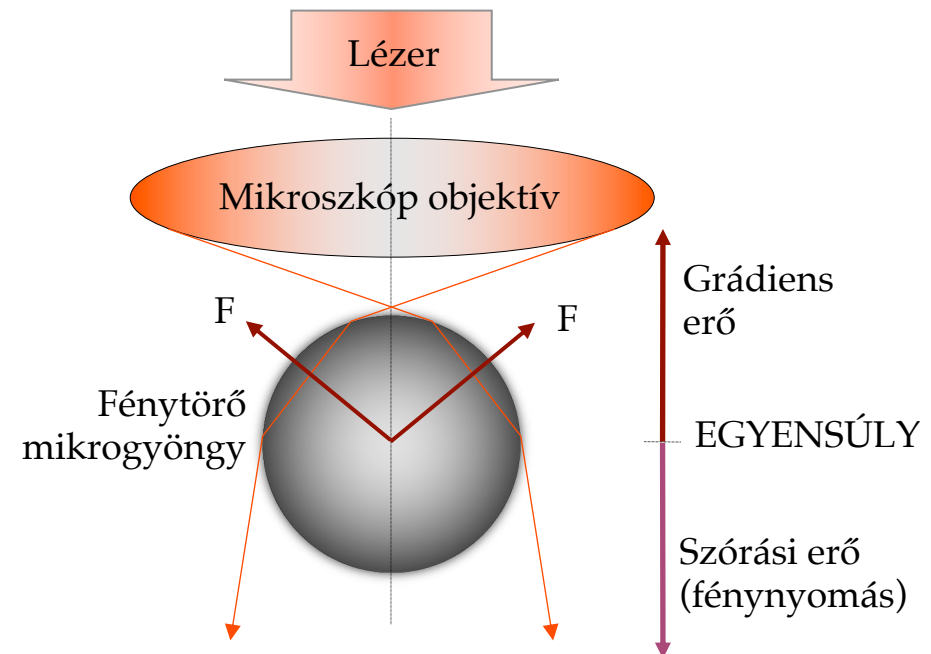
A foton impulzusa:

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

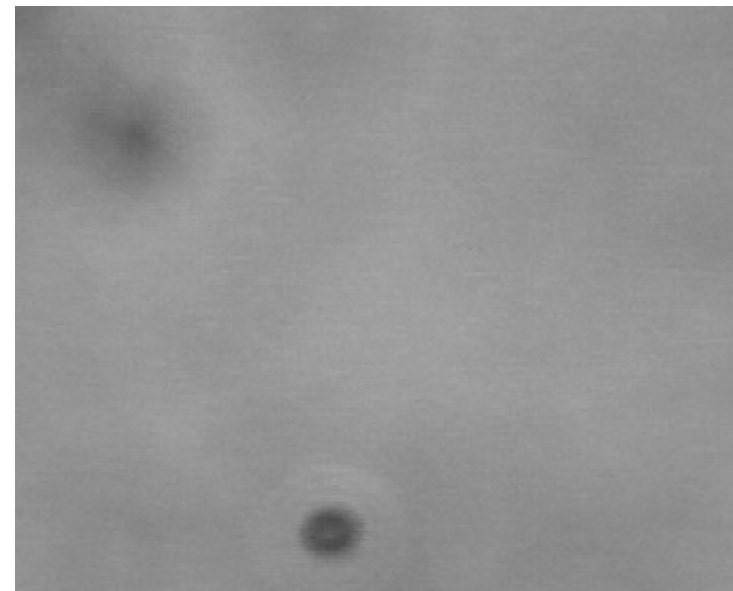
A refrakció fényimpulzus-változással ( $\Delta P$ ) jár:



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



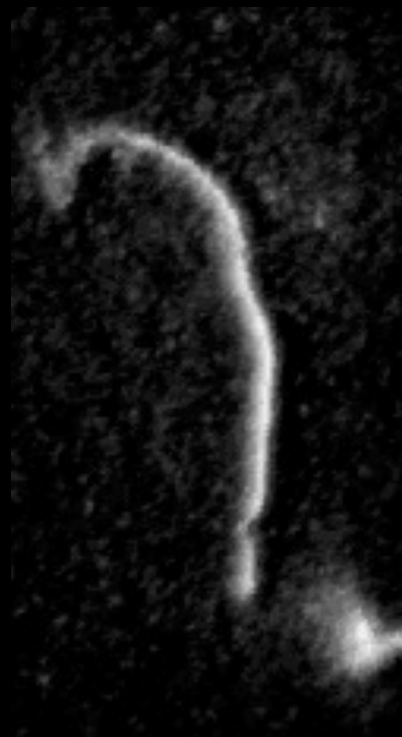
# Biomolekula manipulálás fénnnyel



*E. coli* baktériumsejt

Aktin  
filamentum

DNS



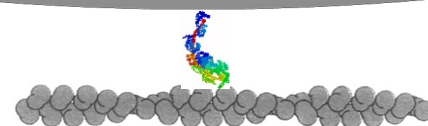
Fáziskontraszt kép

Fluoreszcencia kép



# MOLEKULA - FOGANTYÚ GEOMETRIA

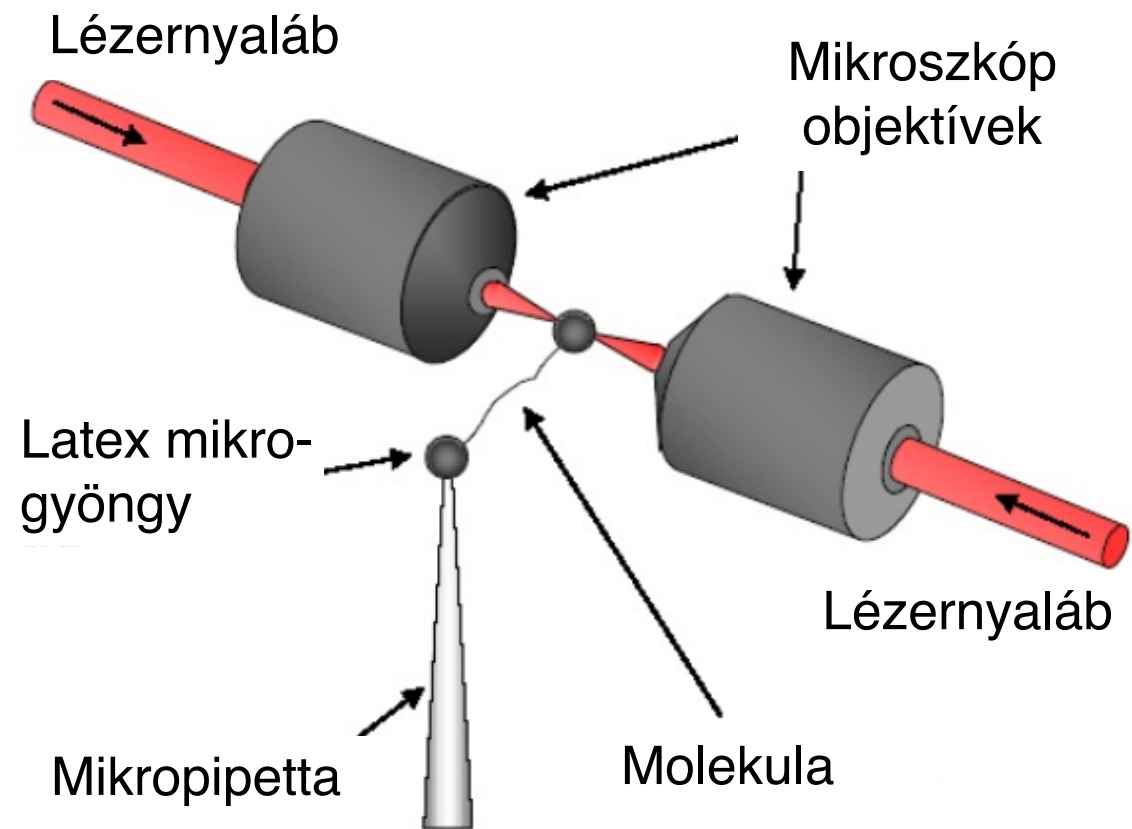
mikrogyöngy ~ 1  $\mu\text{m}$



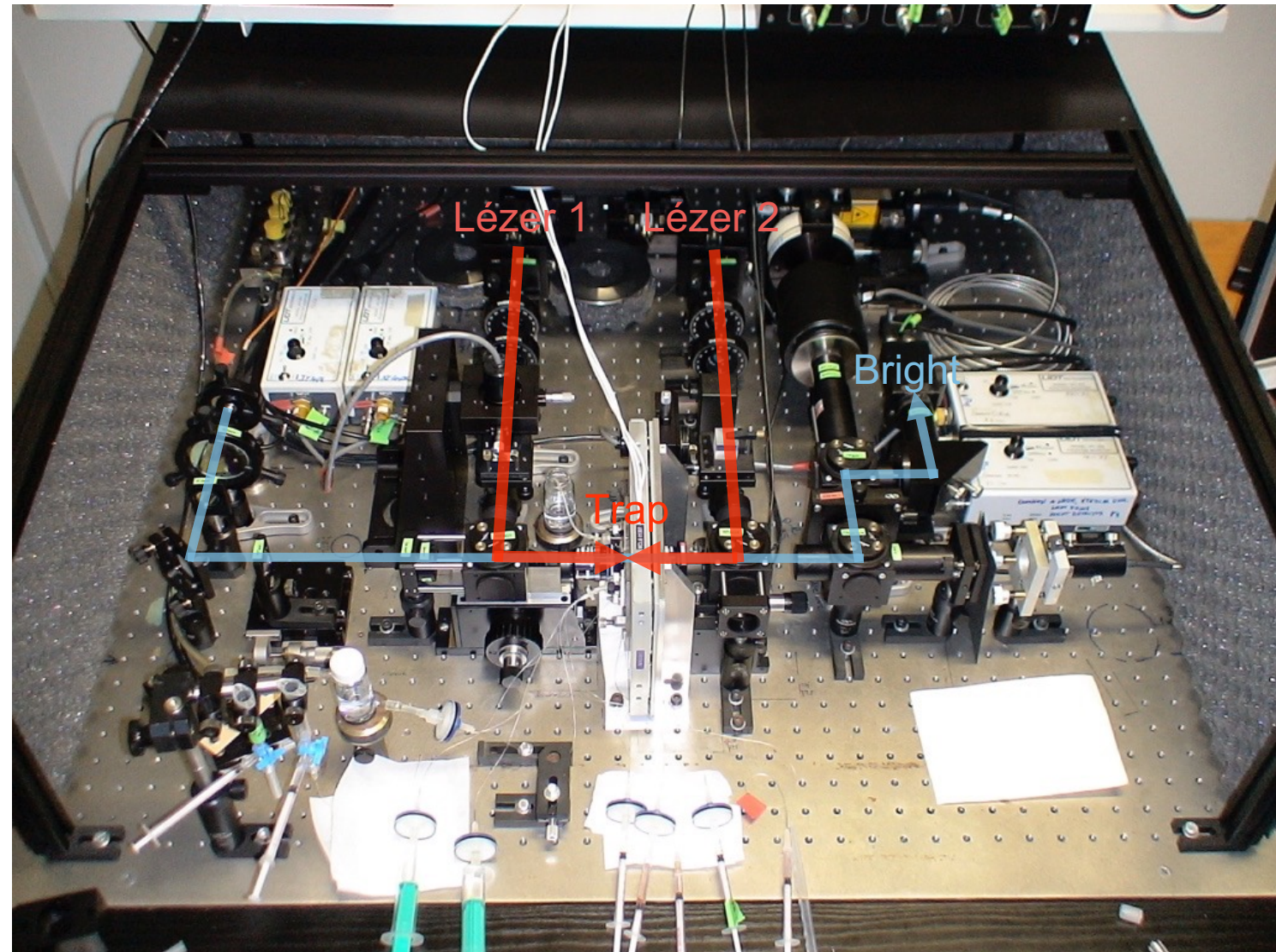
molekula ~ 10 nm



# A lézercsipeszel erőt is lehet mérni



*Két lézersugaras optikai csipesz berendezés*

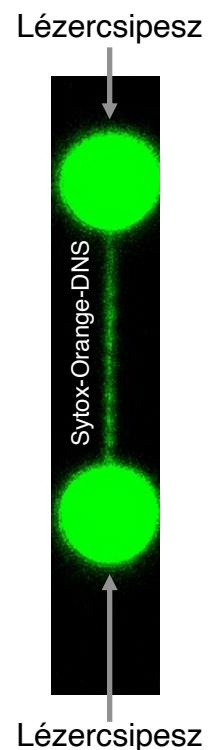
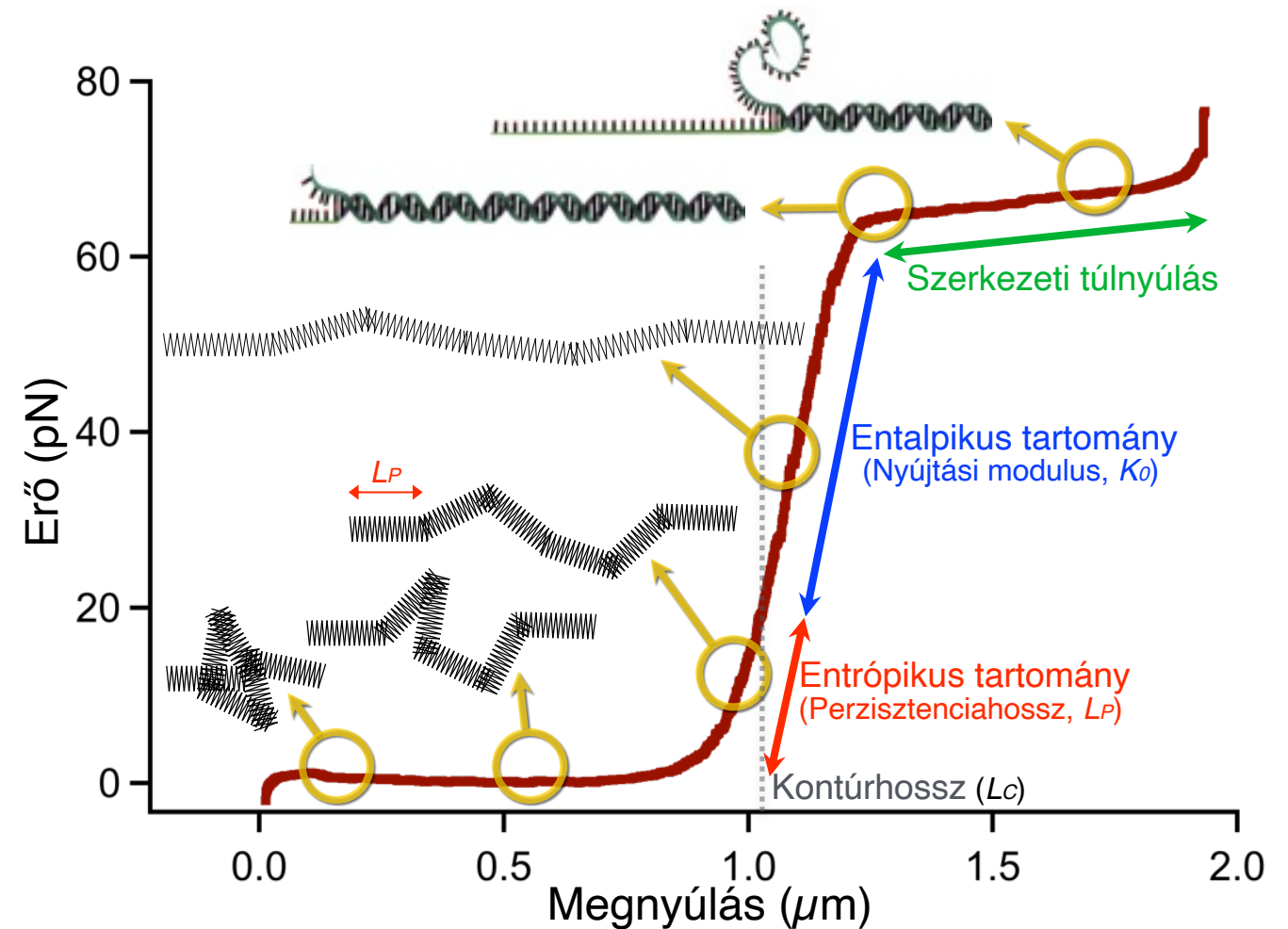
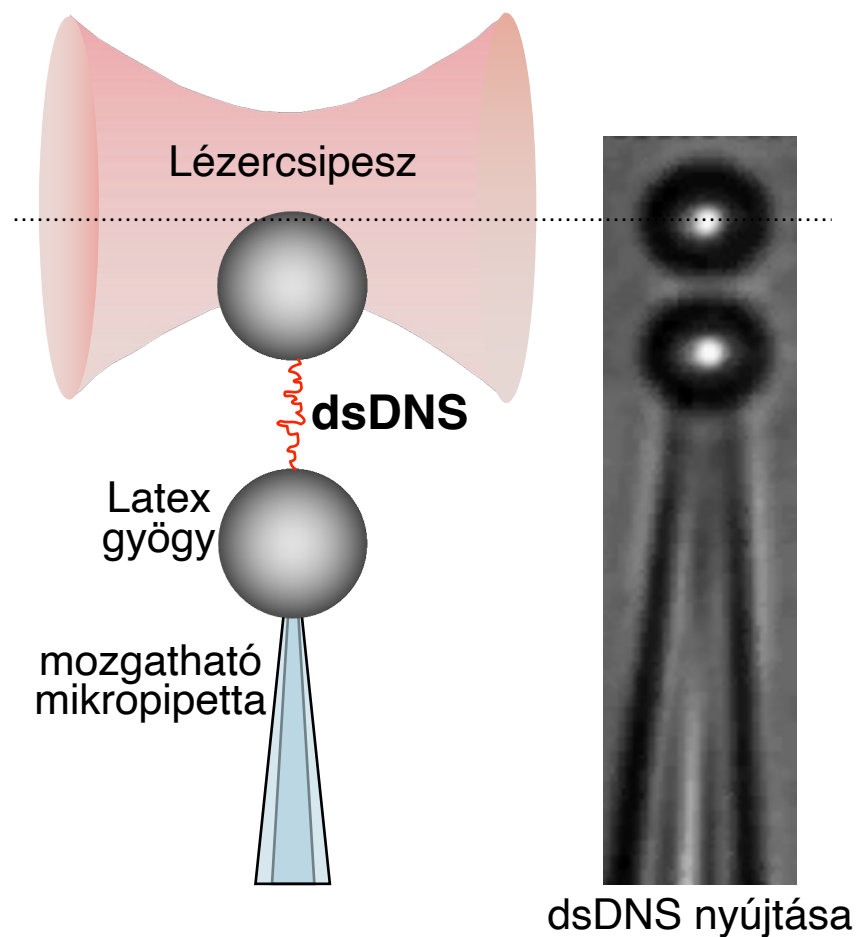


## Erőkalibráció

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

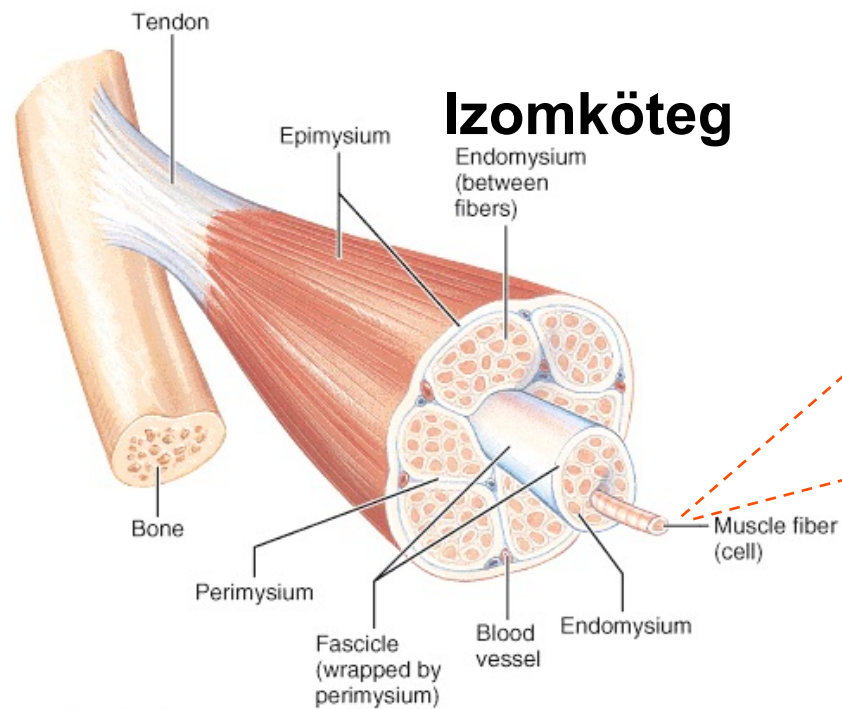


# dsDNS mechanikai túlnyújtása

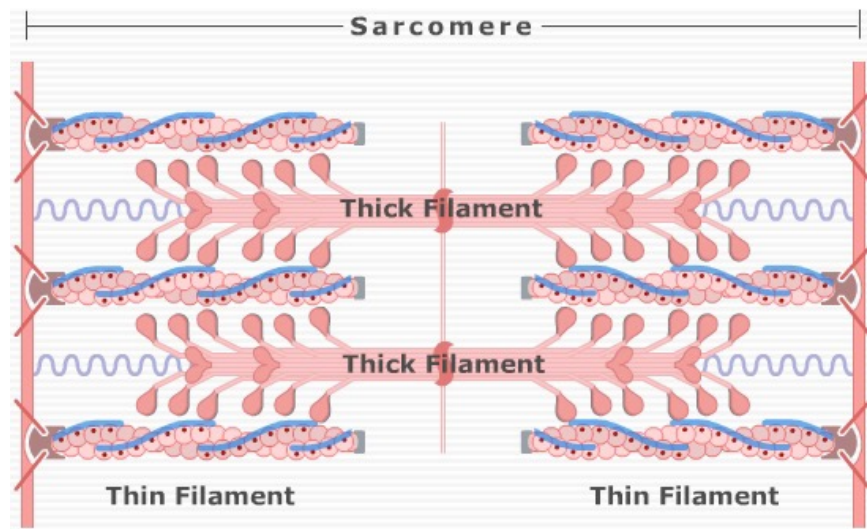
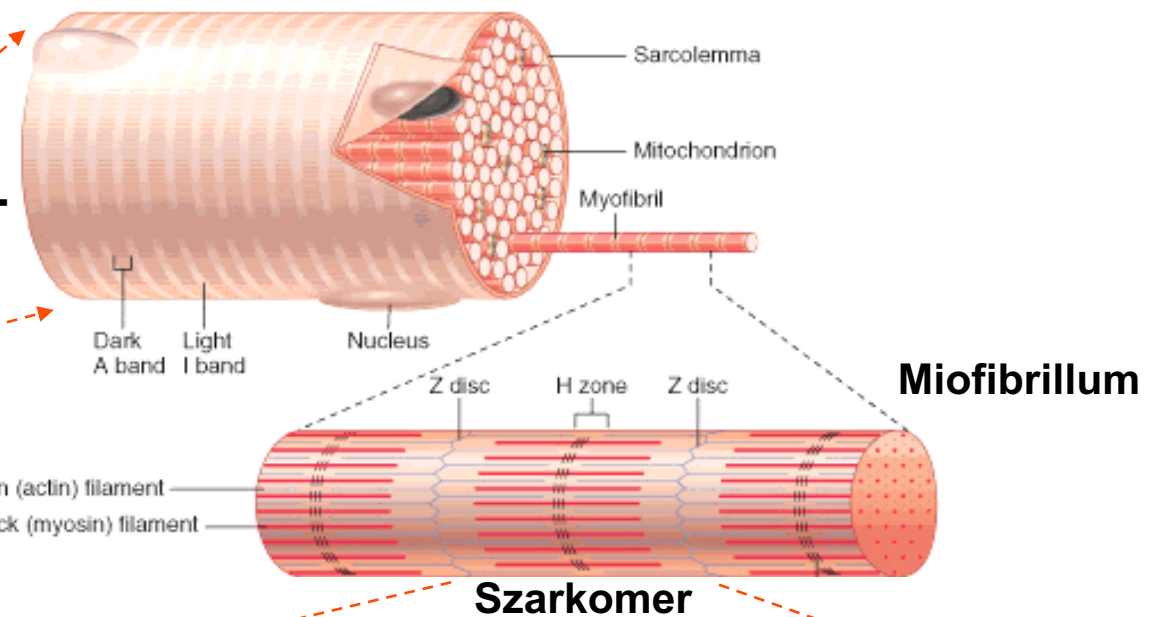




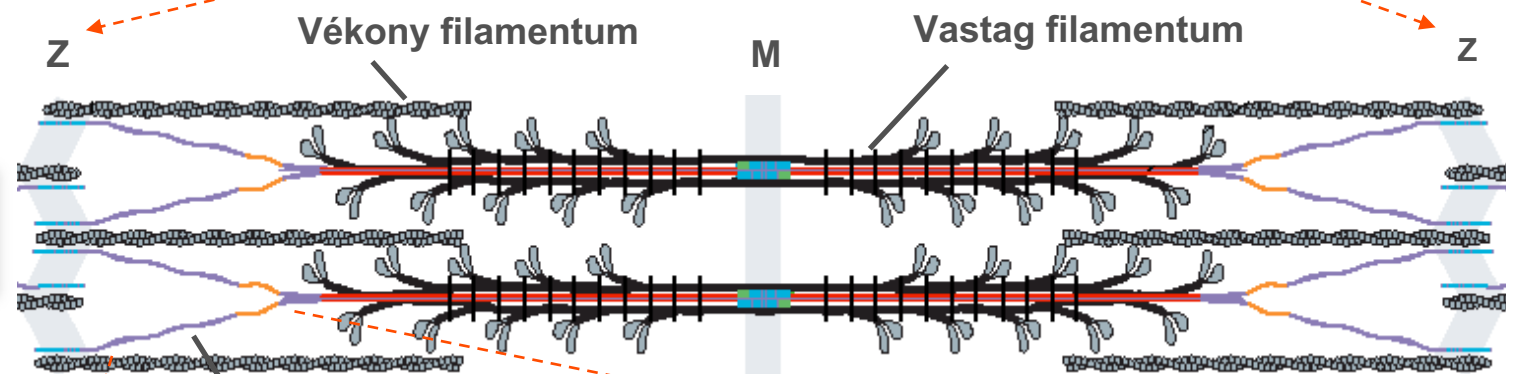
# Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfüzér”



**Izomrost**

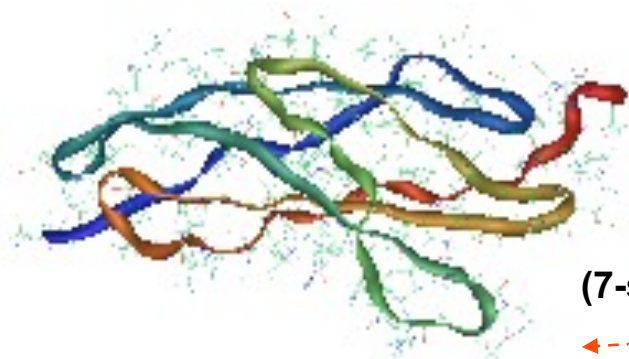
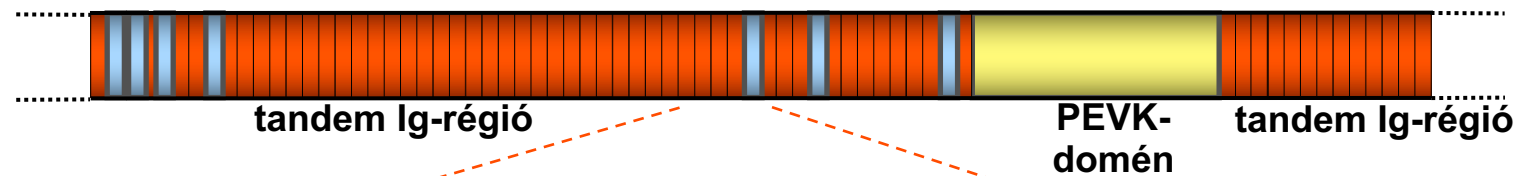


Összehúzóda



**Titin**

I-szakaszbeli szegmens

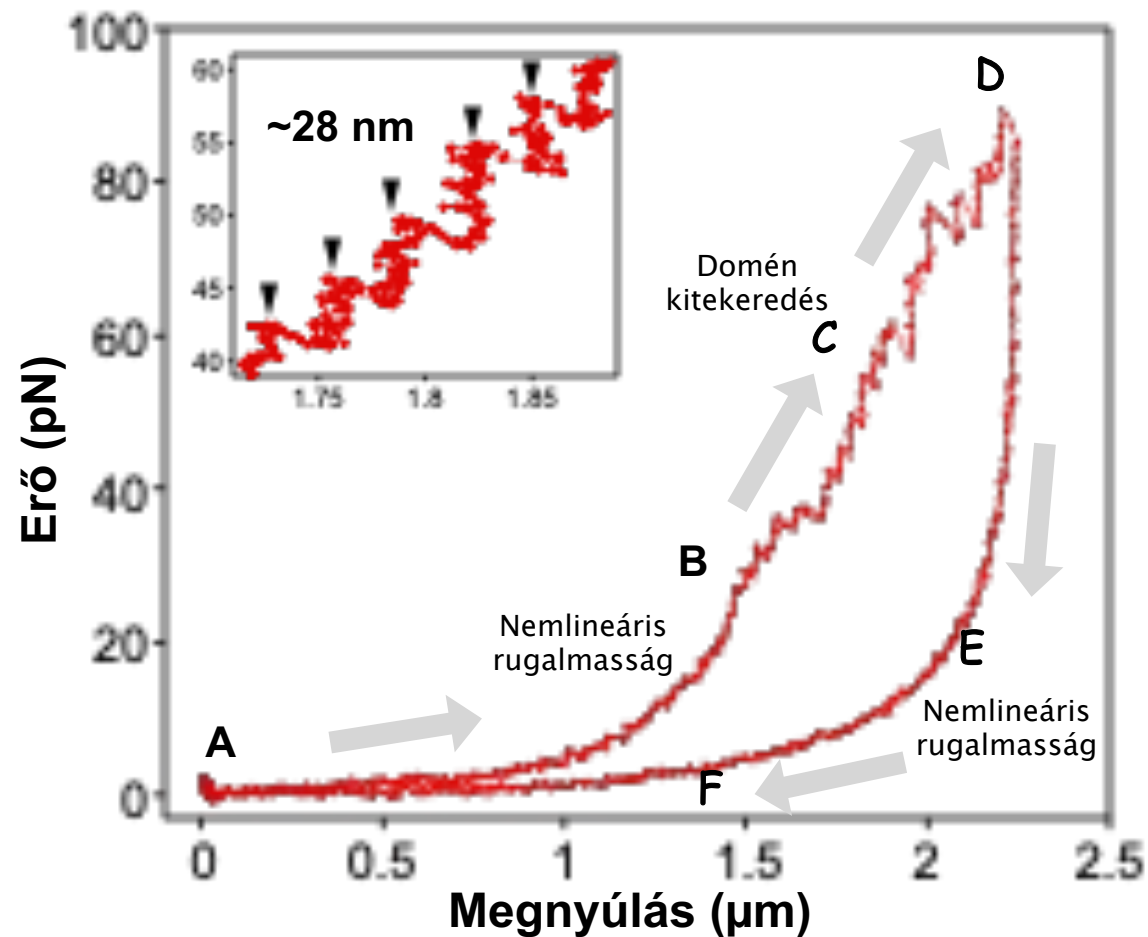


**Ig-domén**  
(7-szálú  $\beta$ -hordó)



# Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesssel

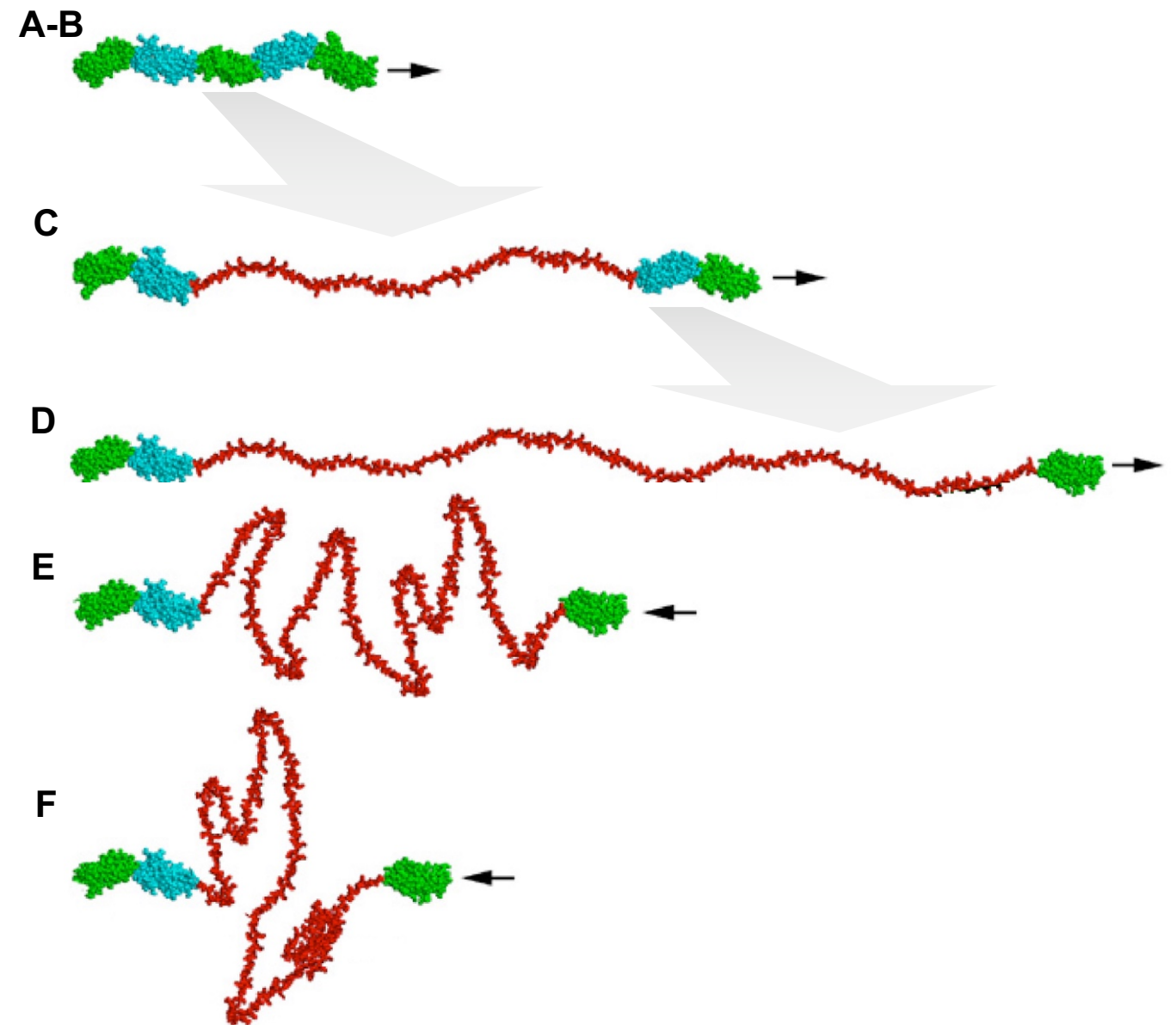
## Erőválasz



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

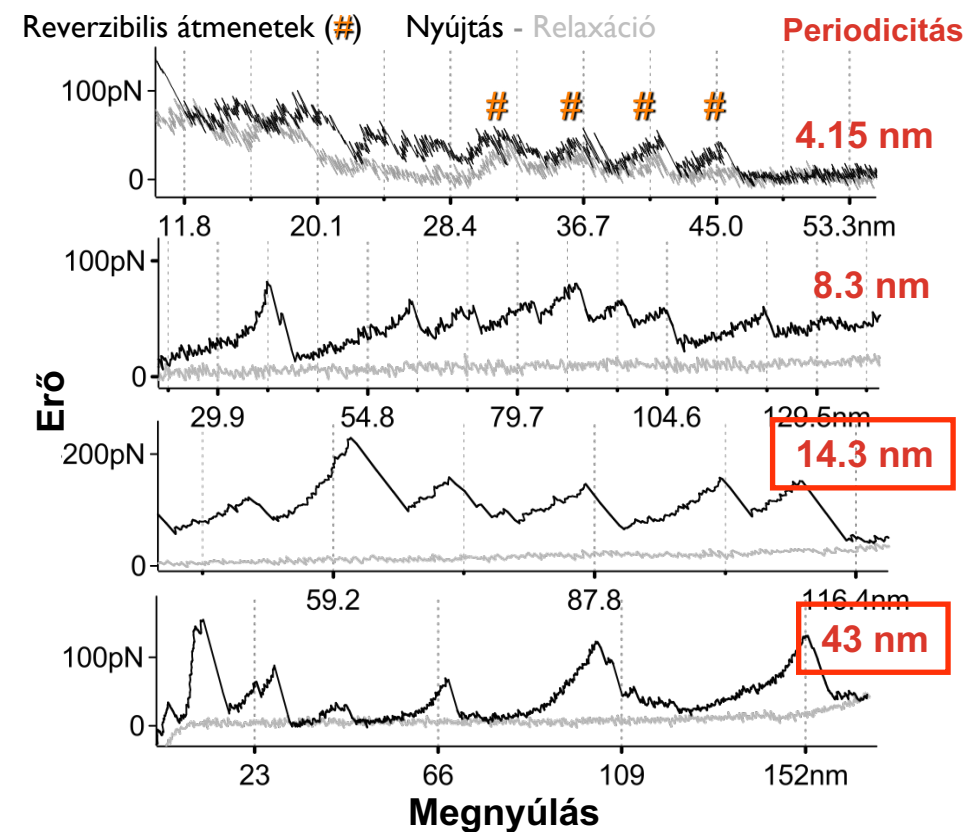
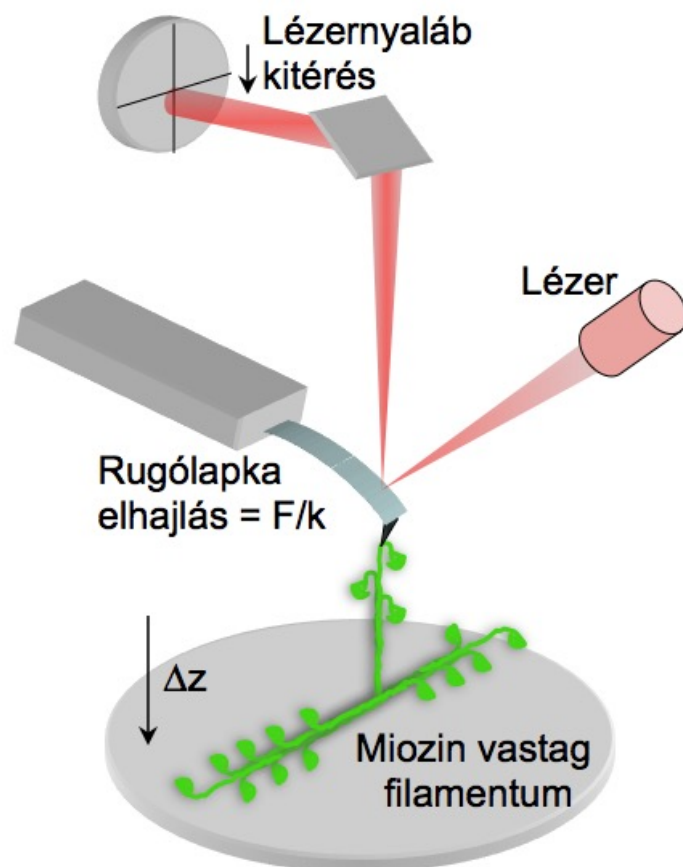
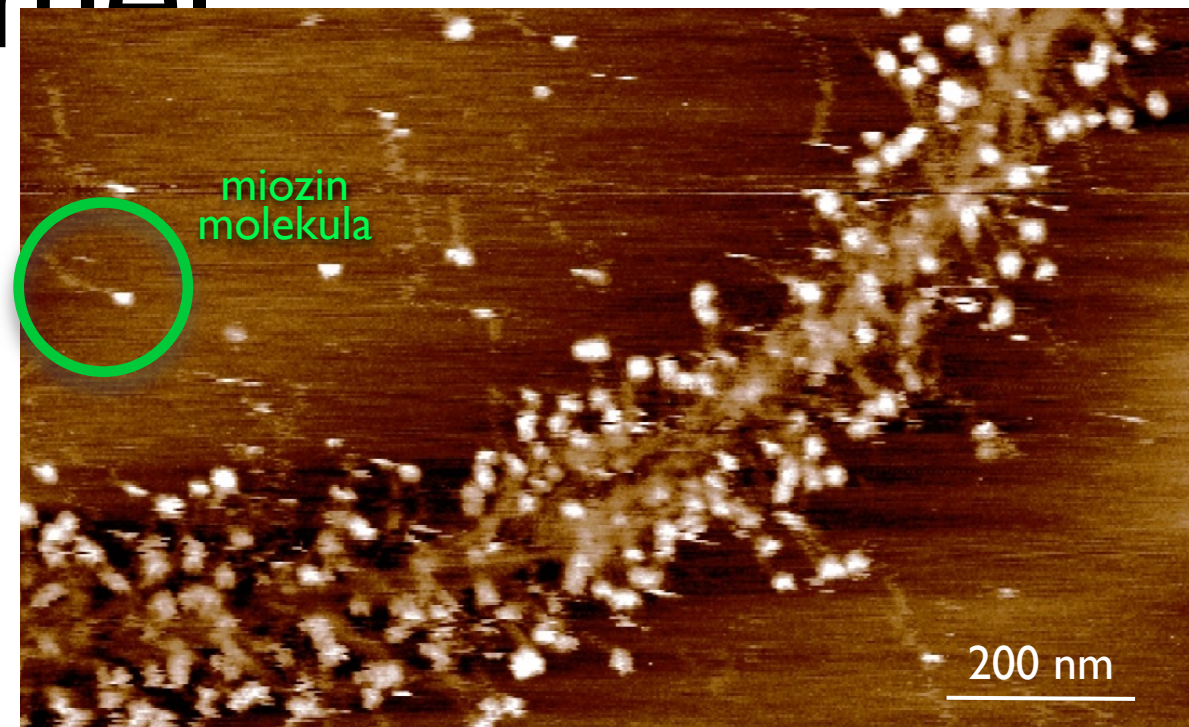
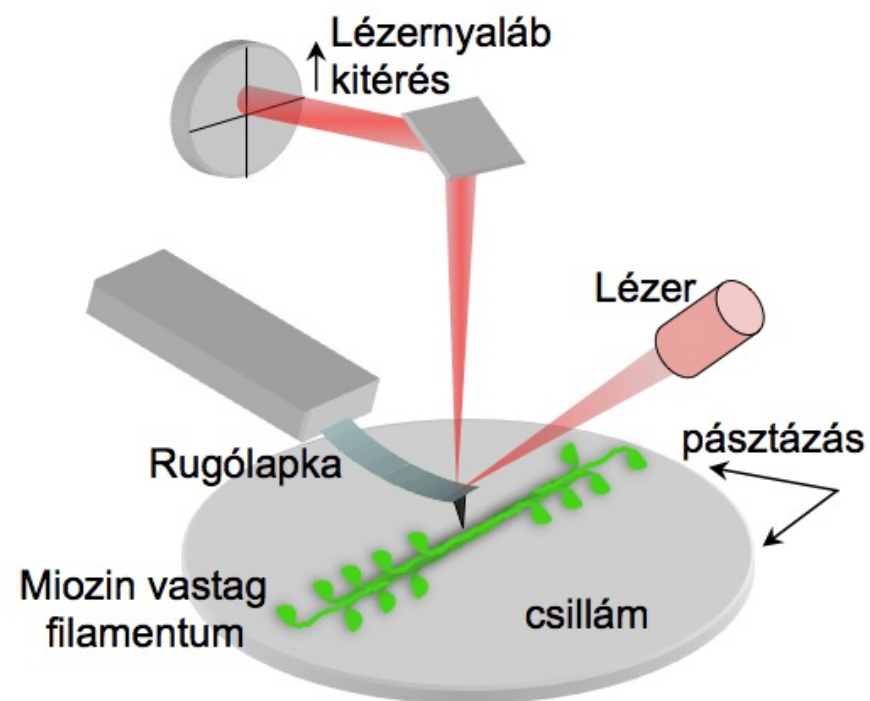
## Erővezérelt szerkezetváltozások:

Nemlineáris rugalmasságra szuperponált domén kitekeredés

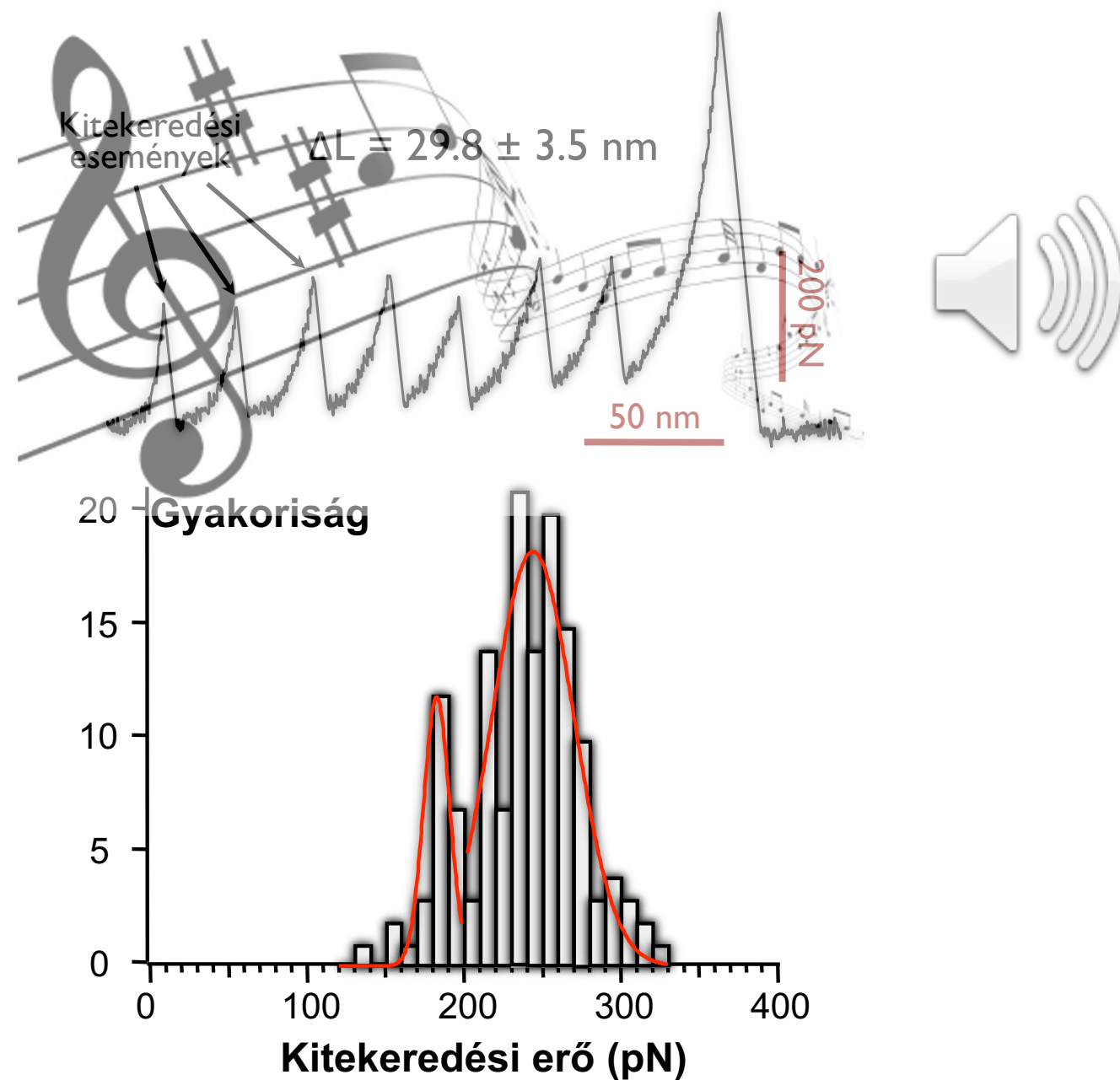
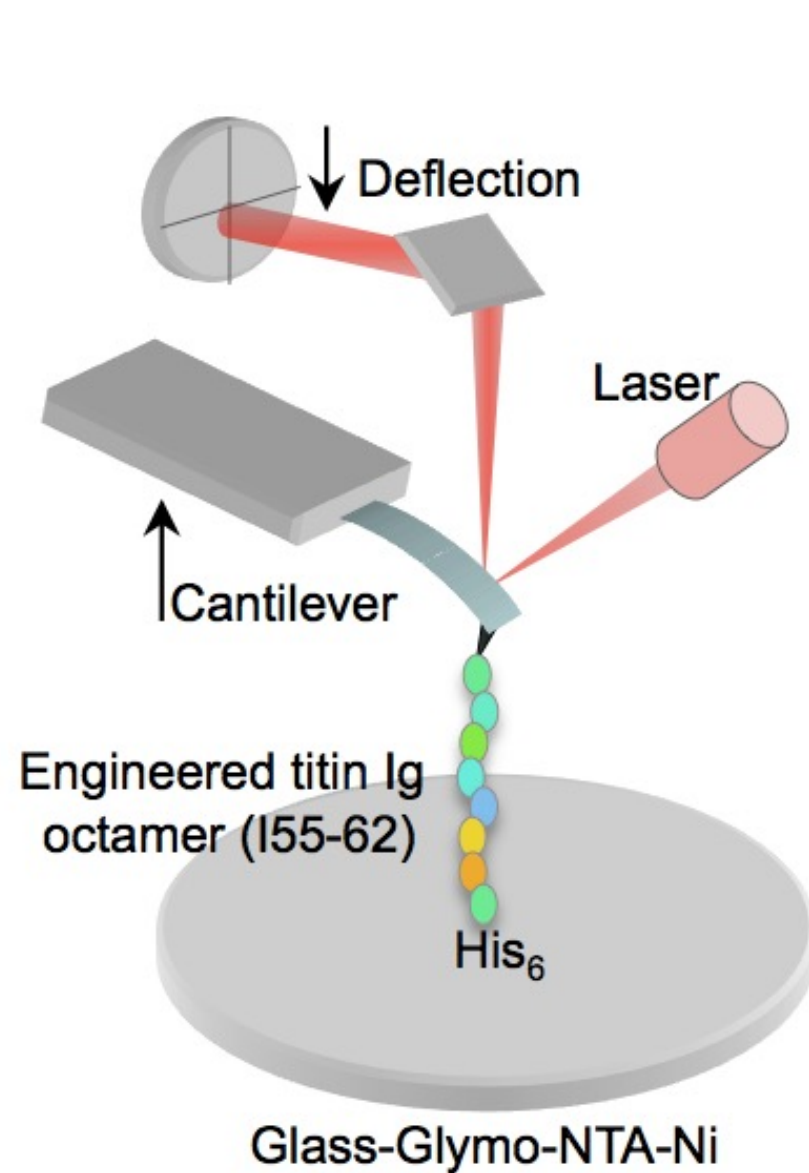




# Molekulamanipulálás AFM-mel

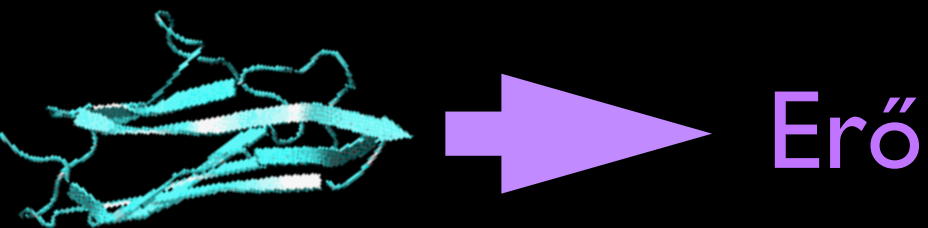
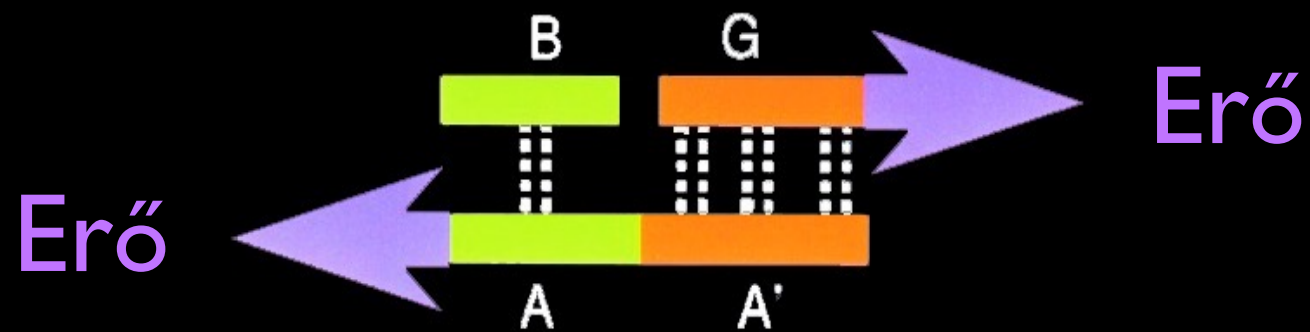
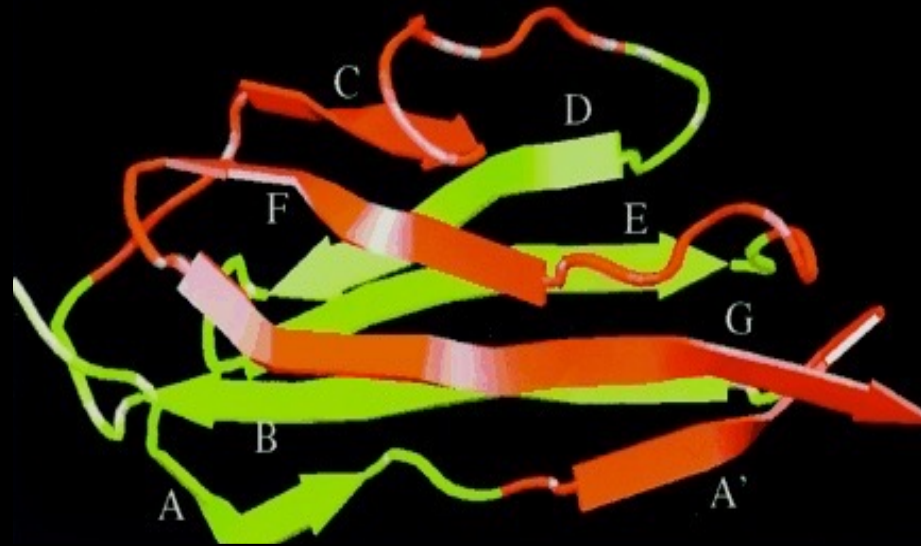


# Rekombináns titin fragmentum (Titin I55-62) nanomechanikája





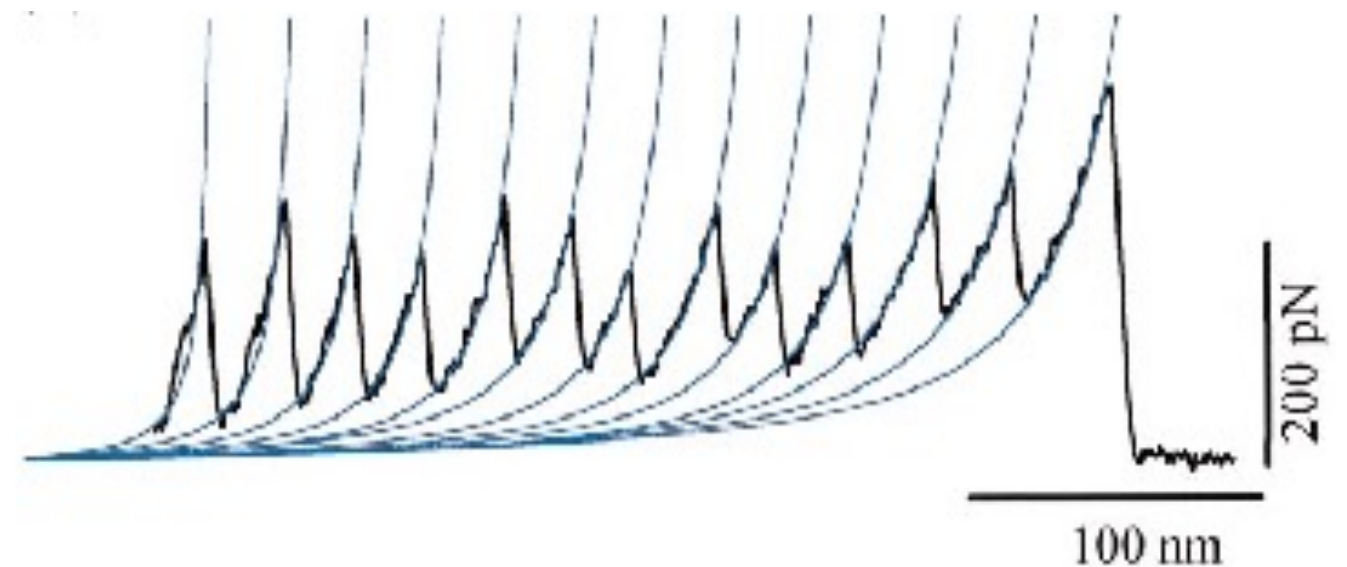
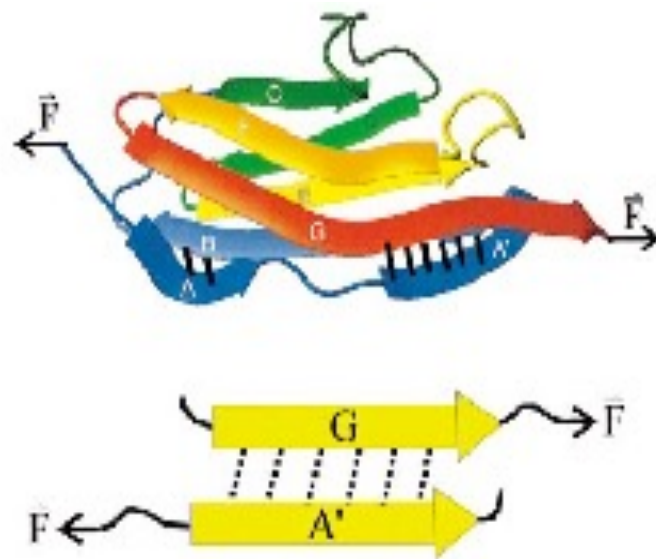
A titin doméneket párhuzamosan  
csatolt H-hidak stabilizálják



# A mechanikai stabilitás biológiai logikája

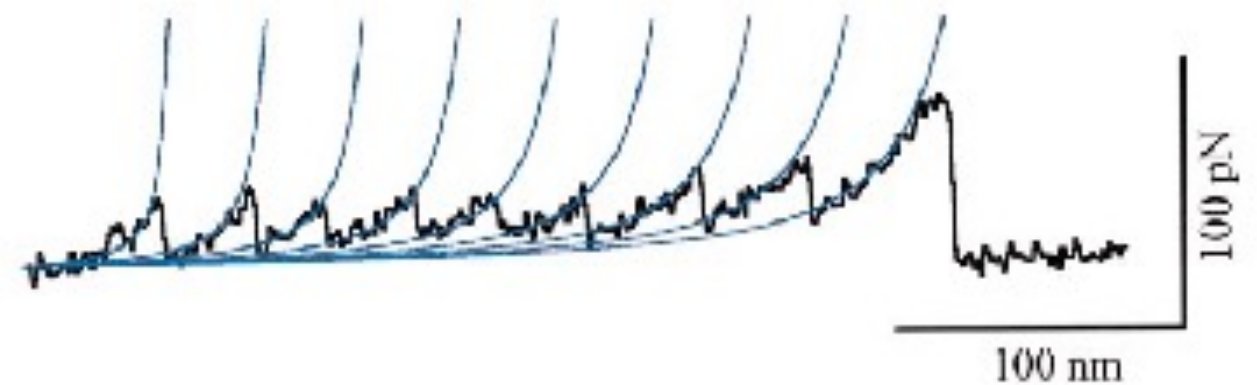
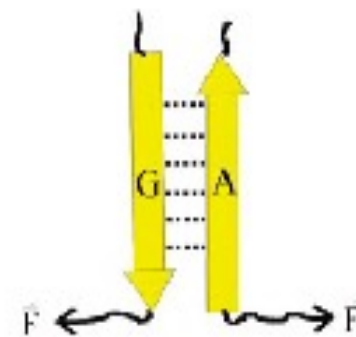
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kitereredési erő



Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

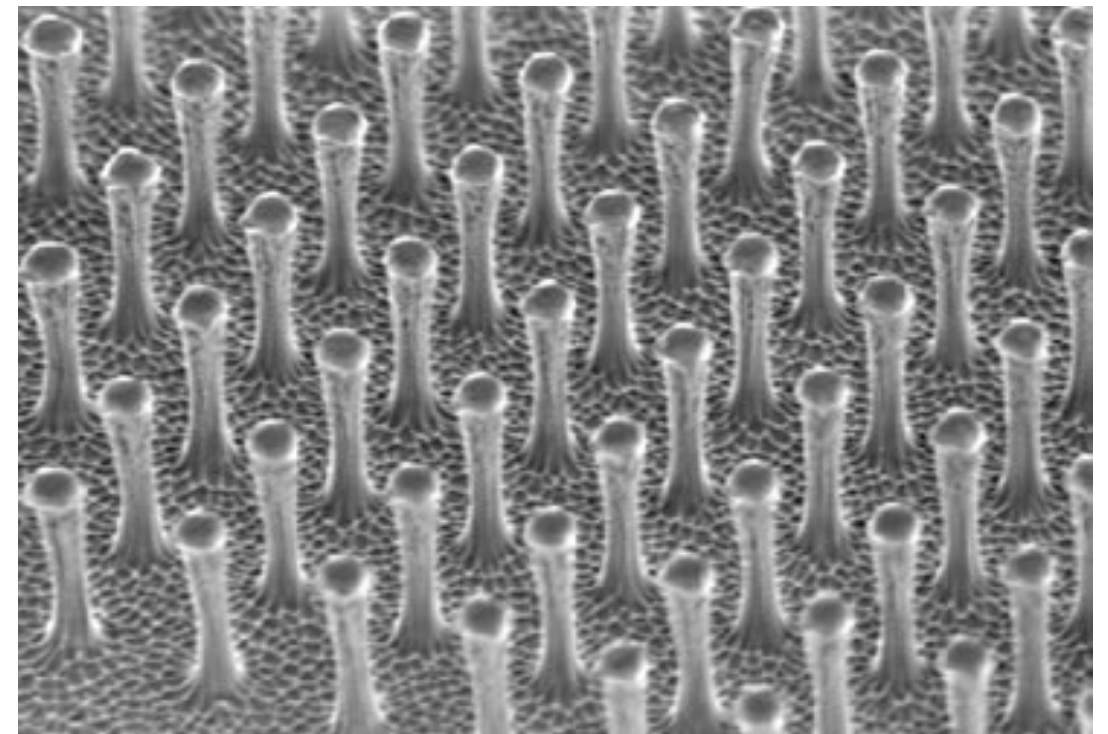
Alacsony kitereredési erő





# Makroszkópikus mechanikai stabilitás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



Mesterséges gecko talp  
Nanotechnológiával készítve

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