

A biológiai anyag vizsgálatainak mikroszkópi módszerei

Kis Péter Kéblin

látni szeretnénk a dolgot - akkor hisszük el

→ ha a kisebb méretet felismerjük el ...

10^{-3} m - ig szem (CT, MRI, UH, PET ...)

$10^{-6} - 10^{-7}$ m - ig fénymikroszkópok

$10^{-7} - 10^{-8}$ m - ig biológiai mikroszkópok, fényt használó módszerek

10^{-9} m - ig elektronmikroszkópok

10^{-10} m - ig pontszerű módszerek (AFM, STM ...)

A fénymikroszkópnál a fény hullámhossza a határ

Szét és szövet ~ 200 nm $\sim 10^{-7}$ m

Molekulák ~ 2 nm $\sim 10^{-9}$ m

A fénymikroszkóp

- egyszerű: nagyító, lupa

- összetett: objektív és okulár

- speciális technikák:

- sötét látás

- fázis kontraszt

- polarizáció

- fluoreszcencia

- differenciál interferencia kontraszt

- modern: optikai "szekelkő" (konfokális, multifókális)

- még újabb: superfelbontás

Antoni van Leeuwenhoek (Thomas Philipszoon) 1632 - 1723

1674-ben egyxeni mikroszkópot készített

→ mikróbilákat figyelt meg

pozitíveskedő volt, aki jól tudott lencsét készíteni

Ernst Karl Abbe (1840 - 1905)

Fizikus és kereskedelmisreformner is volt

Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte

a felbontóképesség határa $d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$

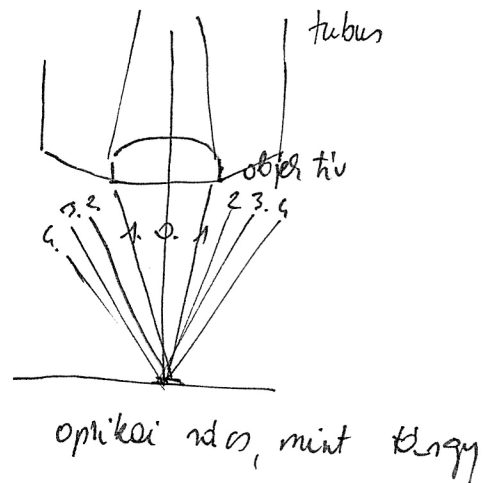
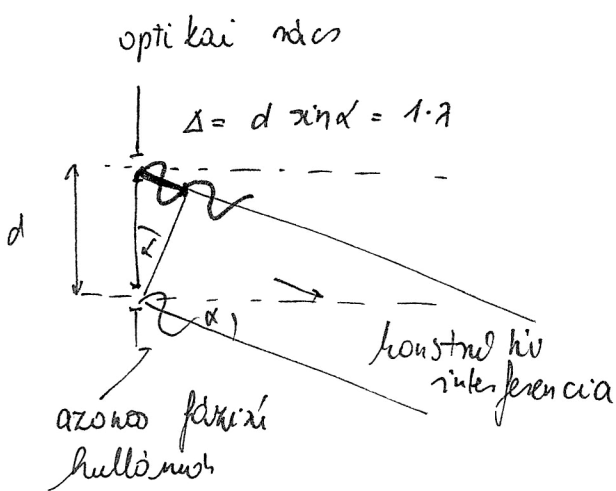
A Zeiss-művelhez ment dolgozni

Kísérletekkel a lencse csiszolásához sürgősszerűen mehetett

A fény hullámtermésze miatt → felbontóképesség határa

→ Abbe-elv

A fény hullámtermészeinek hatására a képre



elhajlás optikai récsen → interferencia képet képzés

$d \cdot \sin \alpha = \lambda$

Abbe-elv:

A mikroszkópban akkor és csak akkor tudunk feloldani két tárgypontot, ha a diffraktálódott fényhullámokból a β maximumon kívül legalább az első rendben elhajlott fény is részt vesz

a képalkotásban

$$\delta = 0.61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin u}$$

Airy-csörgők
point spread function



Hallgatolagor feltételek:

a minde Jünlönböző részéről egyse me alkotul képet

a minde részektét úgy Jünlönböztekük meg, hogy a róluk pőw fény a lehepőő képbén megkülönböztekűő képponbket (pbbket) ad

w: aperture szög

n · sin w : numerikus aperture - a lencse paramétere

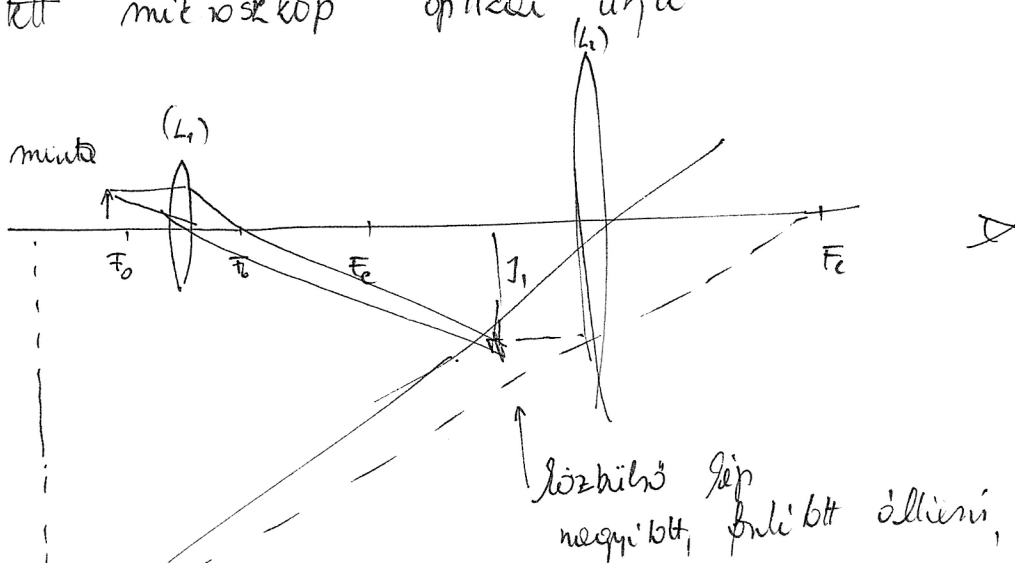
o: a lefűselt kvadrág

A mikroszkópnek van ábrtkli függpe'nye

→ a pontból nem pont, hanem Airy-korongnak nevezett differenciós képet csinál

- ha a korongok túl közel vannak, nem tudjuk elkülöníteni

Összetett mikroszkóp optikai úja



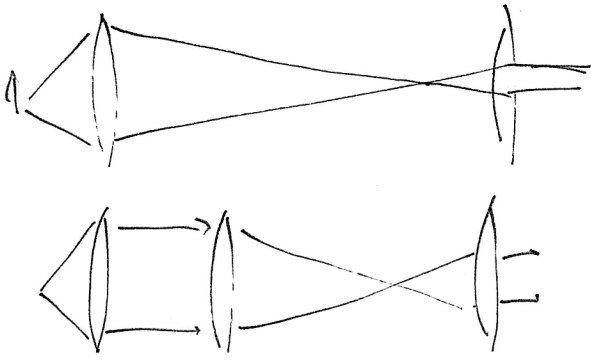
virtuális kép nagyított, egyenes állású

Nagyítás: a kép és a tárgy nagyságának aránya

Egy látólagos kép

- de lehet úgy is állítani, hogy valódi képet kapjunk → ezt lehet fényképezni

"Végtelenre kényszerített" optika



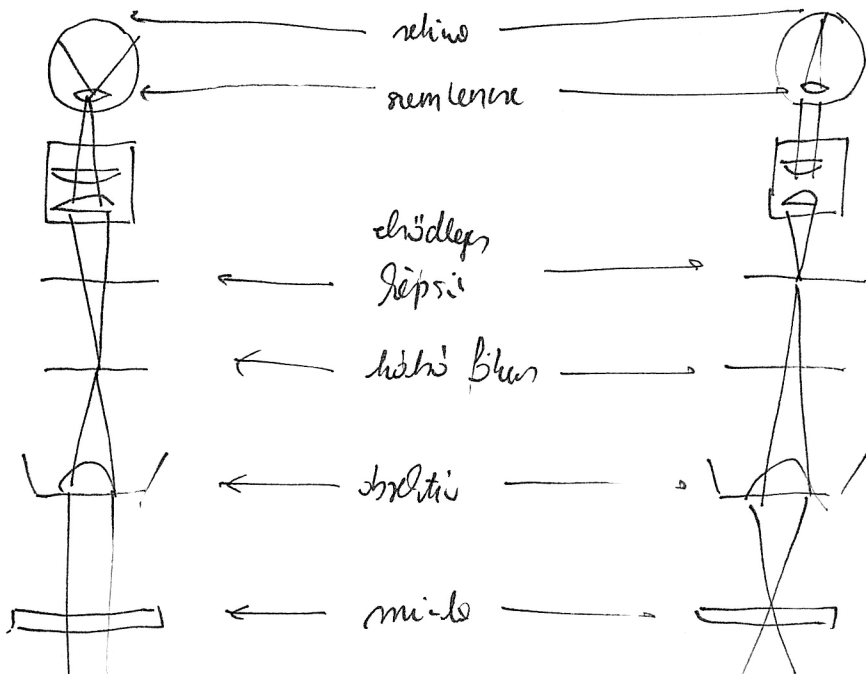
Köhler-féle megvilágítás

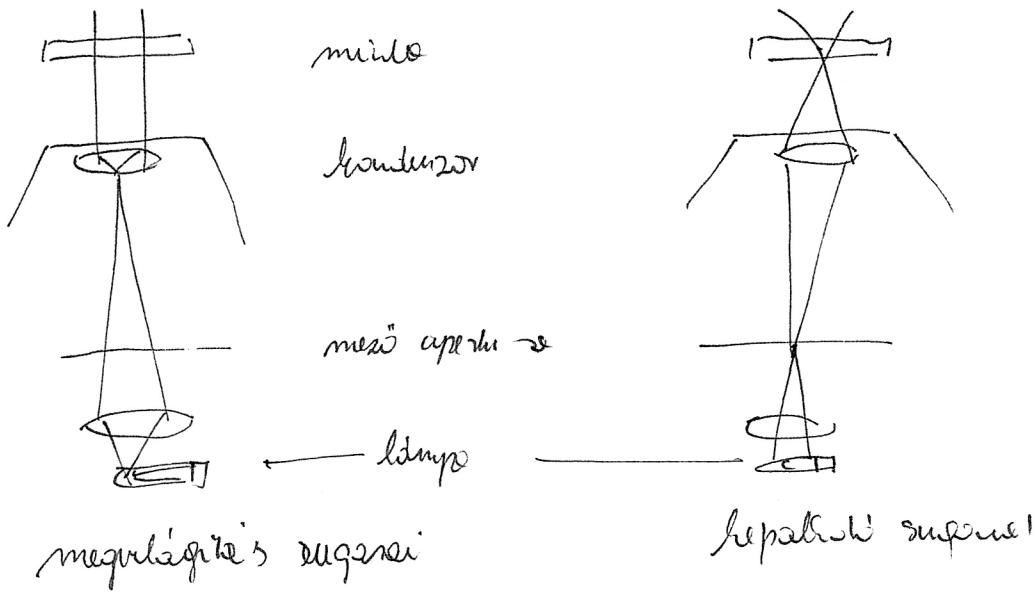
Szükséges, hogy a tárgyat egyenletesen világítsuk meg
 hogy ne legyen árnyék
 ne legyen se túl sötét, se túl kevés fény
 Ma szinte minden fénymikroszkópos alkalmazással ezt használják

A (pontszerű) fényforrásból a sugár a kondenzor apertúrára fókuszál

→ a mérő apertúra síkjában szétterjed, egyenletes megvilágítás
 a következő fókusz: objektív hátsó fókuszára
 a tárgy síkjában szétterjed, egyenletes megvilágítás

Jövetlen fókusz: szemlencse





kondenzor apertúra: a kondenzor numerikus apertúrája

mező apertúra: a megvilágított terület nagysága

A cél az, hogy a minta helyett ne a lámpa struktúráját lássuk

- a hirt: a kondenzor apertúrája van fókuszálva a lámpa feje

Mikroszkóp objektív lencse

numerikus apertúra: $n \sin \omega$

immersionis öngy. általában olajt használunk, hogy nagyobb legyen a felbontás

nagyítás

milyen fedőlemez vastagságra számított

milyen roncsolásokat alélmozhat → sőt nem tökéletes - sőt lencsét károsít

húzó adódhatna abból, hogy fókuszáló síkára más helyre fókuszál

húzó adódhatna abból is, hogy a tárgyatól dupláé másodszor fókuszál

úgy a látómező nem képez senk

Értelet a hibát Jittert lenserendszerrel példák (6)
revizor.

Numerikus apertura

ha nagy a numerikus apertura, a mikroszkóp
szűkebb lencse

$$\mu = 7 \quad NA = 0,12$$

$$\mu = 20 \quad NA = 0,34$$

$$\mu = 60 \quad NA = 0,87$$



nem tudunk elég közel menni az anyaghoz

A numerikus apertura határozza a PSF-t

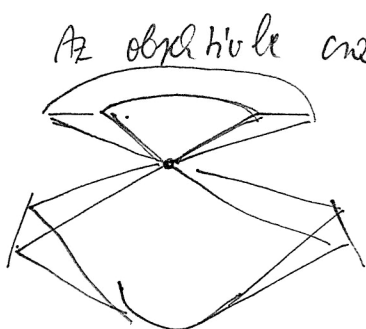
PSF: fényeloszlás f



Sötét látókör

egy speciálisabb módszer
alkalmazás mikroszkóp

A sötét látókörű mikroszkópban a tárgyat egy speciális
paraboloid-kondenzátorral érkező fénysugarakkal világítjuk meg,
így, hogy a fénysugár Jittert energiát az objektív
nyílásközeiben, így a látókör sötét marad



Az objektívbe csak azok a fénysugarak jutnak be, amelyek,
amelyek a tárgy korpuskuláris részeken
örvényszerűen. Így módon a sötét
látókörben korpuskuláris rész (pl. bakteriumok)
erőteljesen mutatnak (Tyndall-jelenés)

A szék lótként mikroszkóp kifejezetten alkalmas a víz (7)
alós eleminek vagy akár a kationok mozgásának
vizsgálatára

Fázis kontraszt

egy speciális kondenzortól és egy ún. fáziskontraszt objektívól áll

→ ezekkel van készült a Jászai György mikroszkóp

- a készített kép igen kontrasztos

→ sötétanyagokban az alapozó lepedőn, elikonyosított rétegek
v. nagyon vékony $\frac{1}{2}$ (0,1 - 1 μm) vastagságú rétegek
vizsgálatára

A fázis kontraszt a szék nem érzékeny

→ a mikroszkóp ezt intenzitási különbséggel alakítja át

A kondenzorlencze alá olyan átlátszó lemezt helyeznek,
amelyen a fényáramot vékony gyűrű alakú ólmosított
tartalmaz - „gyűrű diafragma”

- A kondenzorlól a preparátum felé lépő sugár ezért
henger- v. tüppelést mentén halad át a tárgyon
mely lepedőre le az objektív gyújtópontjában
(egy bizonyos sugár engedélyez le a fényt)

Az objektív felett gyűrű alakú rétegű ólmosított réteget
tartalmazó lemezt van → amely a hengerpalást mentén
jár (összehasonlítva) fény-sugarat a hullámhossz megegyezésével
fázisban elbolya („fázislemez”)

A vizsgálható preparátum optikai lag kisebb részleteitől jár,
fázis- és sötétített fókusz sugarak nem haladnak át a
fázisgyűrűn és a lepedőben egyenlően az összehasonlítási
sugarakkal, interferáló rétegekkel

(8)
Ez akkor vezet, hogy a sugár szelődik,
(vagy vastagabb struktúrák esetén erősítik) egymást, mivel
a nagy fülönközű körszűrő és vastagabb komponensei
fülönközű merleiben sötétnek (erősej veldősej) látnak

Polarizációs mikroszkóp

az optikai anizotrópiát leni látható

kelő körs felismerésére hasonló

közös mikroszkóphoz hasonló lencserendszerben kívül
egyebek közt két

az egyik a polarizátor, a másik analízátor

a polarizátor a kondenzor lencse alatt, az analízátor
az objektív felett helyezkedik el

az analízátor a fénypálya, mint tengely körül
elforgatható és ezáltal a polarizáció síkját a polarizátorhoz képest a párhuzamos és a keresztirányú helyzet
között változtathatjuk

a mikroszkóp tárgyalata is jól forgatható és felcsatlakoztatva
van ellátva

a tárgyat közelebbre és a nagyított körül forgatva
a kelő körs részletek bizonyos helyzetekben
megvilágosodnak ...

Differential Interference Contrast (DIC)

polarizációs és fizikális kombinációja

elő, festetlen preparátumok

kepalakósi „műkermek” mentes, vastagabb preparátumokon
is alkalmazható

törésmutatókülönbséget intenzitáskülönbségek
érezhető: először a kórhátszínű kiemelése

Éleg kvalitatív elemzés: utasításgal, törésmutató nem ad
kvantitatív képet - 3D-szerű, térhatású kép nem bps-
grafikus

4 fő komponens:

- polarizátor
- kondenzor - Wollaston vagy Nomarski prizma
 - a síkban polarizált fényt egymásra merőleges kom-
ponensekre bontja
- objektív (Nomarski) prizma
 - objektív mögött, a szétválasztott hullámfrontok recombálódnak
- analízátor
 - az objektív mögött és az okulár előtt - lineáris
polarizátor
 - a beérkező centrális és ellipszis polarizált fény
interferenciája - E/D meztávolság (polarizátor merőlegesen)

Előjele a fázist is és a polarizációt
olyan, mintha drujkát lenne a képe

Fluoreszcencia mikroszkóp

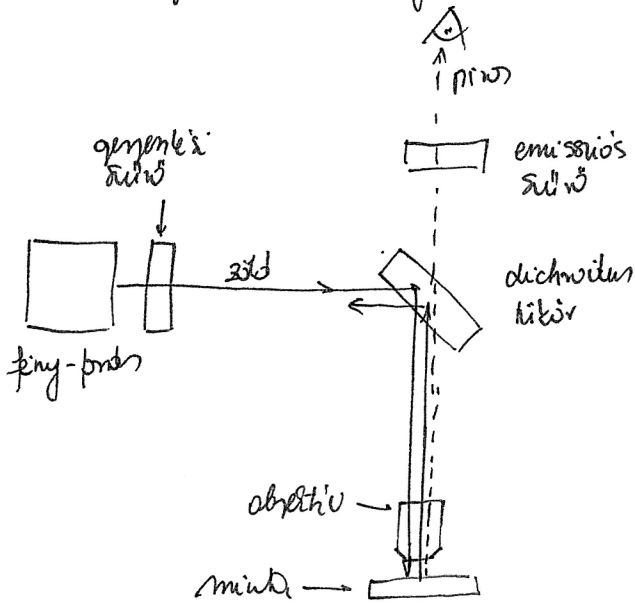
A fluoreszcencia egy relaxációs folyamat, mely a fény
abszorpciójával kezdődik, és emisszióval végződik
az emisszió fény energiája (hossza) kisebb, mint az
abszorpcióé

Fluoreszcencia mikroszkópban adott abszorpció és emisszió
maximálisra rendelkező fényeket használunk

A fények molekula-hoz specifikusan köthet, ezáltal a

monomolekulát vizsgáláshoz nyílik lehetőség.

Az egyik alkalmas epifluoreszcencia mikroszkópot használunk



Fény útja:

- forrás (Hg v. Xe)
 - szűrő
 - dichroikus tükör
 - nagyobb hullámhosszaknál reflektál, hosszabbul átenged
 - objektív
 - minta
 - objektív
 - emissziós szűrő
 - fluoreszcencia mikroszkóp
- fel

Az epifluoreszcencia mikroszkópban interferencia szűrőket lehet használni, melyek specifikusak egy adott fluorofor

száma felé, azaz → molekuláris jelzőkönyv

A módszer nagyon érzékeny, és segítségével kis molekulák is kimutathatók.

Az ideális fluorofor (jelző)

- kicsi
- hidrophil
- megfelelő helyen nyel el és emittál
- nagy Stokes-eltolódás
- specifikus kötődés
- fényes (abszorpció + fluoreszcencia hatásból)
- nem vagy csak nagyon kevés kötődik
- nem okoz fotokémiai reakciókat
- nem mérgező

Egy különösen sok helyen használható módszer az
immundefés, melynek során egy fluoreszcens molekulát
(fluorokrom) kapcsolnak antitestekhez
ilyen fluorokrom pl: fluorescein, rodamin

Antitestek specifikussá lehetnek egy bizonyos molekulára
A fehérjével nyulást immunizálva, ahogyan a fehérjéhez
költődő antitestek képződnek
Ezekhez az antitestekhez fluorokromot csatolva, és így követni
tudjuk az útjukat.

Ujabbán a zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
és hasonló fehérjék használata kezd.
Ezen fehérjék genjét a vizsgálendő fehérjékkel költözött DNS
szekvenciához költik.

A lehejtő fluoreszcens fehérjék nem mérgezők, és általában
nem gátolják a fehérje eredeti funkcióját.

A genetikailag módosított ~~sejt~~ sejtek maguk járulnak
el ezeket a fluoreszcens fehérjéket, és így funkcionális
in vivo (az élő sejtben) vizsgálható.

Mivel a fluoreszcencia során kibocsátott fény hullámhossza
(színe) eltér a megvilágító fénytől, a fluoreszcens mikroskóppal
alábbá képen általában csak a fúdat (megfestett) rész látható.

GFP (Green Fluorescent Protein)

2008. év Jémiái Nobel-díj

Kvantum pontok (Quantum Dot)

A kvantum pontok nanométeres nagyságú félvezető részecskék

A nanorészecskék felületére olyan molekulák csatolhatók, melyek
jeladás-hálót alkotnak a célpont szövetben.

Kvantum pontok: néhány nanométeres átmérőjű félvezető

fluoreszcencia gómbok. Minthát lehet a látható fény hullámhosszával összehasonlítani, és méretükkel függő méretű képernyőre fényt juttatni. Kvantumpötty nanokristályokat erős fluoreszcencia aljából, molekulákhoz és LED-ekhez fejtik ki.

A kvantum pöttyök meglehetősen nagy arányban emittálják a fluoreszcenciát

Fluoreszcencia kvantum pöttyökkel jelölt réteg használata

Fluoreszcencia fehérjék

Acropora victoria (medúza) } belső réteg ki a fehérjék
Acropora millepora (korall) }

+ GFP

TIRF Total Internal Reflection Fluorescence

csak egy vékony réteg, azaz mint a látható

Alulról megvilágított üveg felület

- a réteg olyan, hogy teljes visszaverődés történik
visszat a fény a felülethez legközelebbi rész
releget behatol, mellette teljesen visszaverődne

- egyenlő az ott lévő molekulákhoz

- vékony réteget lehet vele vizsgálani
(a többi rétegből jövő fényt eliminálják)

FRET Förster Resonance Energy Transfer

~~Donor~~ Donor és akceptor molekulák közötti közel van

- őt tudják adni az energiát

- kvantumot lehet vele mérni

Az energiaátvitel hatékonysága: $K_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$

ahol τ_D és R_0 a fénnyel páros jellemző állandók,

a fókusz közti távolság

Toucastrone nyha v. cukor van

→ egyedi molekulákkal → fluoreszcenciájuk alapján meg lehet mérni

→ Toucastrone működés a helyi koncentráció mérés alapján

koncentráció és kompozíció eltérések egyidejű mérés

FIM - fluoreszcencia életciklus kép

nemcsak a fluoreszcencia intenzitását, hanem az életciklust mérjük meg

- idő alapú mérés

- mikor jelenik meg a fluoreszcencia

- minden időpillanatban megmérjük a lecsengést

- Gyűrűhöz lecsengési molekulák elvitelével

- életciklus kép

- referencia alapú mérés

- referencia és minták közötti fluoreszcencia

Ko. próba és multifokális mikroszkóp

felbontás határa - Abbe-jelölés

→ diffrakció miatti elmosódás nemcsak az x-y síkban van jelen, hanem a z-tengely mentén is

→ azaz nemcsak a mintával egy síkban lévő, hanem a vele szembe fordított síkból eredő fénynyelők is részt vesznek a kép kialakításában

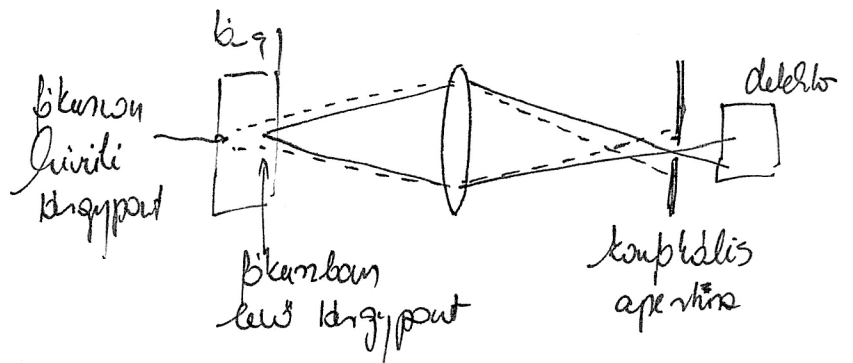
- felbontás javítása érdekében hi kellene járni:

1) optikai tengely mentén szembe fordított síkból is.

2) a képsíkból a rész területekről érkező fény nyelődhet

1) A nem fókusz síkból érkező nyelődés kiküszöbölése:

Jonokódás elv



Egy apertúra (kompatibilis apertúra) segítségével kerülni a nem fókusz síkból érkező nyelődést, így a fény detektorba csupán a fókusz síkból érkező nyelődés jut be.

2) A tárgysík rész területeiről érkező nyelődés kiküszöbölése:
póntkódás

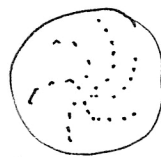
Az egész minta helyett a minta egy pontját vizsgáljuk meg

Megoldási lehetőségek

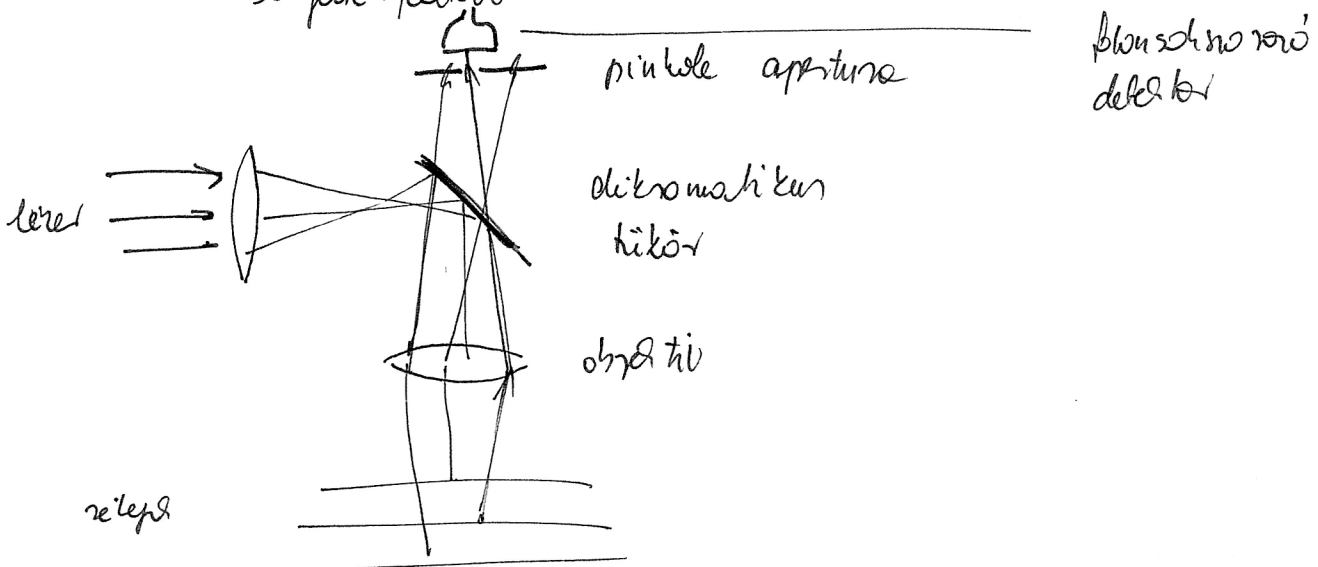
- mechanizmus mozgatása - lassú, pontosan, nem károsítja

DE: visszacsatolt PET tárgypontok értéken jó

- Nipkow - körug



- póntkódás lézer nyelődéssel - manapság ez a leggyakrabban



Ki lehet udvarolni, ami egy síkból jön

(összes löbbint Judoból)

- vagy lehet menni a másik oldalról a kerekig

(a pinhole aperturát megjelöl)

-> 3D képet lehet készíteni

Két foton generálás

- egyenre két foton generálásával emisszió

-> ennek nem túl nagy a valószínűsége -> nagy
intenzitású fény kell hozni

előny: jele akkor energiájú foton is jó

pé. 300 nm-es nyal el az anyag

- ez az UV tartomány

600 nm-es megvilágítás is jó -> könnyebb előállítani

A fluoreszcenst vizsgáljuk

-> mivel ilyen a valószínűsége -> csak a fókusz

területen közelében történik meg

nagyban ilyen területeket tudunk generálni

-> csak a fókuszban

Beépített szűrőket -> nem kell ilyen

aperturával szűrőket

Nem elegendő a generáló fény rövidítésre

Mint jobban a képfokozás generálás?

- csak a fókuszban generál (fokozás: képfokozás!)

- kevésbé rövidít a hosszabb hullámhosszú generálás

(a rövidítés helyén)

- létezik szelcső, optikai szelcső, 3D rekonstrukció
- a rövid fluoreszcencia fényt is össze lehet gyűjteni (csak a fókuszálósugarakat)
- kevesebb a minta
- autofluoreszcencia (festék nélkül is látni)
 - ebben a körülményben az molekulák van, ami magától (festék nélkül) is fluoreszkál
- UV helyett látható körülményben lehet gyűjteni
- szimultán gerjesztés

Élő sejt látni!

funkciót lehet tanulmányozni in vivo

kb. 100µm mélyre bele lehet látni a sejtbe

Élő élő állati sejtben lehet sejtkezelet tanulmányozni

→ röntgen, cryo röntgenekkel áll - bele lehet látni,

hogy mi történik benne

Többféle festék lehet beírni → színt is lehet mérni

→ hamis színreléssel egyenlő lehet lenni az egyes

festéssel eredményeit

3D képet lehet rekonstruálni

Verősejtben sejtkezelet mérés

az élő állatban a verősejtben sejtkezelet is meg lehet mérni

pl. keratinok-e az állatok?

Egy wond mentén sejtkezelet → több időpontban

mérés → dőlésszög: sejtkezelet

Fel lehet venni mozgó képet is

Élő sejtben fluoreszcencia mikroszkóp tanulmányozás, megsejtkezelet

nanosekunder: mikroszkopikus méreken udsmit elrakik

pl. egytlen egytlen neuron elndiktse
- urgdlni lehet, hogy helyzllt

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Nagy intenzitási lézernyéláttal berugózzuk a mint egy
fönd határolt részt.

A molekulák kiferulnak a berugított területen belül, azaz
elentik a fluoreszcenciájukat

Mivel a molekulák mozgékonyak - diffúzió, aktív transzport -
a kiferult, nem fluoreszáló molekulák kicserélődnek
a nem kiferult, azaz fluoreszáló molekulákkal

Így a berugással kiferított helyen a fluoreszcencia
intenzitása növekedni fog.

Az urgdlni, hogy a zyt többi résznél mennyi idő
alatt kinek urzó a fluoreszcens molekulák

+ Udu-e olyan rész, ahol nem tér vissza ...

Konelációs módszerek

FCS

diffúziós állandó

fényerő - aggregáció

fluktuációból konelációs függvényt lehet számítani

hason mozgó - gyorsan mozgó molekulák ...

Ranter képen is van információ

mind mentén, így mentén is lehet számítani

Superrezolúció (nanoszkóp)

LOKALIZÁCIÓ akár nm pontosan

hoqgyan lehet megkérni az Abbe-elvet?

- nm-es skálán a molekulák helyzetét meghatározni

Megismerjük az ábrák jót

Szóró mérés - a közepes a helyet pontosabban

határozzuk meg

Ha egyszer nem elég az önmé -> Sp. meghatározás

Jutóabban rövidek képviselik le a populáció egy részét

- nm-es pontosság

STORM - Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

- véletlenszerűen megvilágított sub populáció

PALM - Photoactivated Localization Microscopy

- fotaktivált sub populáció, mérés, inaktív állapot

STED (Stimulated Emission Depletion)

- emissió stimulált gátlása

reversibilis photo-switching a fluoreszcencia "on" és a stát "off" állapot között

S_0 és S_1 singlet gerjesztési állapot

$S_1 \rightarrow S_0$ "kikapcsoláshoz" igen nagy energia kell

ket lézert fokozóval egyszerre - a gerjesztés után kiöket
kiszűti a másik lézert

Bioelektromika

Der Ándrás

Két értelműre van a bioelektromika.

- Milyen elektromos jelek jönnek a biológiai szövetekből?
- A biológiai anyagokat miként lehet használni az elektromikában?

Elő értelműre: Milyen elektromos jelek jönnek a biológiai szövetekből?

EEG, EKG → mennek a biológiai szövetekből jövő elektromos jeleket → diagnosztikai célra használatuk

Biológiai membránok szintén

→ a membránok elválasztásuk és összekötésük

A membrán elektromos állapot → DE: pumpák v. csatornák vannak benne → ez oldja meg a leparázást a Jólutóval.

A membrán Jólutó oldala Jólutó elektromos asszimmetria van.

→ ezt úgy hívjuk el, hogy elektromos arány

A sejtmembrán Jólutókatörkeint vonaladik

→ ezt az asszimmetriát a Na-K pumpa teszi fenn ATP segítségével adópot energiával
($2K^+$ ki $3Na^+$ ki)

→ ennek hatékony elektromos potenciálkülönbség keletkezik
 $\approx 100\text{ mV}$ (nagy nagyságú)

→ Ennek az energiája mind a Jólutó transzport folyamatokhoz van szükséges

Az idegsejten belül az elektromos asszimmetria

→ lokálisan feltöltött depolarizáció → átvitt a szomszédokra

→ az idegsejten impulzus terjed végig

1963-ban exakt Nobel-díjat adtak → Hodgkin, Huxley, Katz (2)

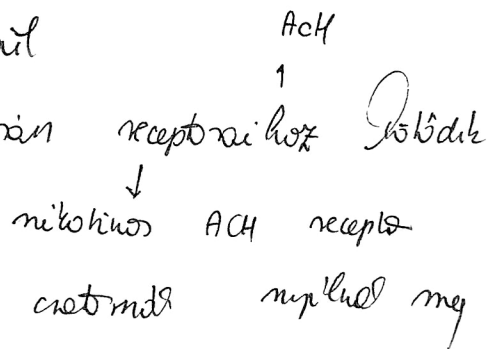
izom működés

→ ideg-izom szinaptikus

A szinaptikus transzmisszió lépése:

- 1, Transzmitter szintézisére és töltése a vezikulában
- 2, Akciós potenciál elterjedése a preszinaptikus terminálhoz
- 3, Depolarizáció kinyitja a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornákat
- 4, Kalcium beáramlása
- 5, Kalcium határolja - vezikula membránja egybeesik a szinaptikus membránnal
- 6, A transzmitter a szinaptikus része körül
- 7, A transzmitter a postszinaptikus membrán receptoraihoz kötődik

~~8, Ioncsatornák nyitása~~ →



→ ligand receptor → Na^+ és K^+ csatorna nyitja meg

→ depolarizáció → végleges potenciál egybeesik a saroklemme felé, ahol feszültségfüggő Na^+ -csatorna nyitja meg

→ akciós potenciál

terminális csateműködésben részt vesz a Ca^{2+} beáramlása

→ feszültség határolja ezáltal drámát Ca^{2+}

- Ca^{2+} diffúziója a vékony és vastag filamentumokhoz

→ Ca^{2+} kötődése a troponin C-hoz → az aktin-miozin kötéshelyén szabaddá válik

→ az aktin és a miozin közötti keresztmunkák kialakulása és a vékony filamentumok közötti eredményes elmozdulás a vastag filamentumokon

Minden ATP jelenléte szükséges

Az ATP a növekedés és illeti energia elvezetését folyamatosan egyrészt legfontosabb végtelme.

Biológiai energiaátvitel

→ Az élőlények nyitott rendszer: energia és anyagok átáramolnak a környezetükkel

autóhófejt / heteróhófejt → mindegyik szintézis ATP-t

↓
növekedés

↓
fény ~~szintézis~~ energiaszintézis az átvitelhez

→ fény vezérelt proton pumpa

Mitchell → Nobel-díjat kapott érte (miután felfedezte a protonpompát)

→ kalcíniumból kumparalól a protonpompát → fényvel megvilágítja ATP szintézisét

→ azóta többféle módszerrel sikerült megállapítani, hogy hogyan működik a proton ATP szintézis

(bátykós kengyel fog - ugyan - kinyit egy részt...)

→ az meggyőző bizonyíték molekuláris szinten is

→ az élőlények energia átvitelében a proton pumpa szintézis történik

Miért mérjünk élő hamos jeleket?

- Közvetlen információ a kinetikáról és az ion specificitásról

- A transzport folyamat molekuláris mechanizmusainak részleteire lehet következtetni.

- Fizikusi megközelítés: atomi szintű leírás

- Lehetőleg mesterséges fehérje molekulák használata

Hogyan mérjünk élő hamos jeleket?

Patch-clamp - Nobel-díj, 1991: Neher és Sackmann

- A mikroelektroda technikák pumpa fehérjék vizsgálata nem ideális

→ Alternatív módszer: élő hamosan asszimmetrikus működés

1) Felületi módszerek

BLM módszer, SOM módszer

Előny: nonspecificitás

Hátrány: időfelbontás, membránhatás

2) Térfigurali módszerek

- Szuszpenziós módszer

- Cél módszer

- Száraz minták

- Fénygradiens módszer

Előny: gyors kinetikai és abszorpciós mérési lehetősége

Bakteriódopozin

→ legegyszerűbb moton pumpa

E - Kalibrációban - 0 lépéselő telep → labor szintű a víz

→ mikroorganizmus (~~a bakteriódopozin~~ úszóval lenne

a bakterióm oldatban van egy labor szintű sziget

- 0.5 μm átmérőjű - kristályos szerkezetű labor membrán

→ ez fény hatására protonokat pumpál

a bakteriódopozin - hexagonális kristály - γ α helix

szegmens

fényelnyelő rész a fehérjében

in vivo nem éri szét

A szemben lévő dopozin hasonló felépítésű

→ fény hatására szétér - egy enzim rész a része

→ nem lehet in vivo vizsgálni

A motonpumpa fényenergia felhasználásával juttatja a protonokat a szigetmembránon át ki a sziget. A folyamat eredményeképpen létrejövő protonkoncentráció - diffúzióval végül a energiát alakul

A membrán kijelen átér, azaz integráns membránfehérje.

A retinamolekula konformációja a β on elnyelésével megváltozik, ami a baktériorodopszin molekula konformációját is megváltoztatja, így jutnak végül a protonok a membrán egyik oldaláról a másikra.

A baktériorodopszin ~~lila~~ színű, és legjobban a köd fényt nyeli el (500-600 nm)

A proton közvetlen abszorbeálós dít.

Energiaállapotok: az alap állapotból a β on egy magas energiájú állapotba uszik \rightarrow ebből több állapotba hirtelen jut vissza az alap állapotba \rightarrow fotociklus

A baktérium neve: Halobacterium salinarium

\rightarrow ennek a sztimembránjában van a baktériorodopszin. (BR)

Oxigén jelenlétében a halobaktérium oxidatív foszforilációval termeli az ATP-t

Ha kevés az oxigén, a baktérium anaerob foszforilációs módot használ. Fényenergia felhasználásával a BR a fotociklus során protonokat pumpál át a sejtől. Az így felépülő pmf segítségével meg az ATP-t az ATP szintézishez.

A retinál regeneráció után a BR-ben egy új molekuláris változás zajlik le. Egy β on regeneráció után a retinál ill. a BR regenerált állapotba jut. Innen kb. 0,4 valószínűséggel visszavált az alapállapotba \rightarrow az energia a komplexnek adódik át \rightarrow elektronikus szempontból az az energia elvész

A BR kb. 0,6 valószínűséggel az ún. fotociklusba lép.

Dobshörmérsékletén a hőmérséklet néhány 10 ms

\rightarrow viszonylag jól megkülönböztethető szilenső állapotok
K, L, M, N, O

A BR a ciklus végén visszatér az alapállapotha.

A Jözbenst állapotok Jözöthi átmenetek termikusán alakult felismeretek, így ebben Jöme'ne'lettel függő.

A floculus Jösszikun e'letbeni módra való nem tudós teljes rezeletességel lémi

De lehet vizsgálni az elhomonos jellet → ez Jöveletbe van az atomi szintű leírásához

Az elhomonos jellet általában mikroszkopikus dökkel menik → ez itt nem működ

Kipropagálódik a biton membrán - verde tele az osztrikus nyomas felvételje (mert amúgy töllett st oldatban el)

A ze'letett membrán rezelet elhomonoson asszimmetriku sz → ez az elhomonos térle helyzetbe nagy jöböl egy irányban állnak le

Ezt az orientációt poliarilamid gel polimerizálásával permanense' lehet kenni ... → gel módszer

Az orientált bio membrán rse-en rövid je'mp'impulzus hatására a BR molekuláiban nagyjöböl egy irányban veglemend polionhanszoktációk eredményként előb'dán' ftonó'sam me'leté'.

Öz az elhomonos gel előállítható olyan exponen uó'izok összegeként, amelyeknek időállandói mepteláhatók a bitonikus időállandói Jözöth. Az időállandók egykex alapján az elhomonos gel komponensei a floculus lépe'eihez rendelhető. A floculus alatti optikai és elhomonos bit'ne'el Jözöth fellet kinetikai Jönelé'is van.

Spektrális és elhomonos utközöné me'leté' a miutiban - Jözöthük Jönelé'is van

Dipólmomentumok

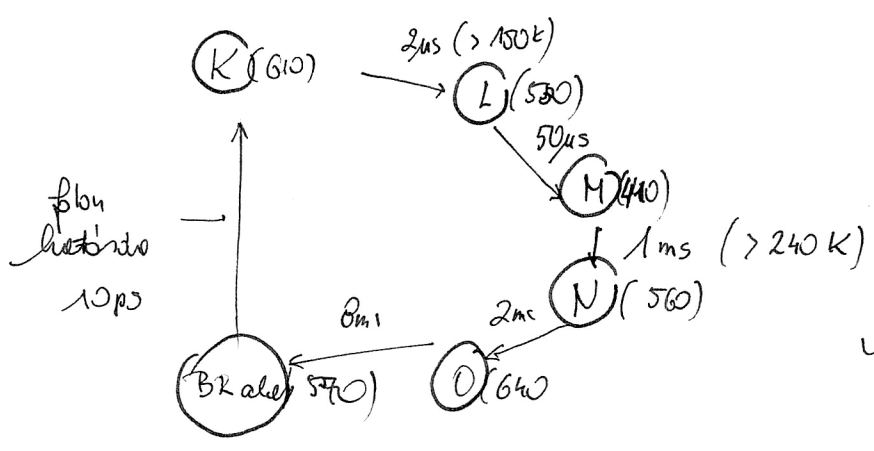
- töltés nem egy lépésben megy át az egyik helyről a másikra
- molekulaeni dipól momentumra lehet letele u.s.s.r.o. (szimmetria)

Hogyan használhatjuk ezt fel?

a mérés során a fényfelvétel után az előződdin
főváramot mérjük - ennek alapján lehet számolni a
molekulaeni dipól momentumot (μ_i^E)

És más módszerrel is meghatározható (pl: röntgen diffrakció)

-> a felvét össze lehet hasonlítani



← o fotóadás

Meghatározható a "közbenes" állapotok szerkezetét (ot nem egyértelmű -> több lehetőség)

A hagyományos röntgen-diffrakció módszerrel az egyes állapotok szerkezetét a meghatározás nem egyértelmű

-> többféle állapot szerkezet is valószínűsíthető

Élethossz mérésért is felhasználva a többféle lehetőség
Gyorsul hi lehet utántámi a legvalószínűbbet...

3D elhossz jelöl mérés (Der-módszer)

Az alap mérésnél gyors a szimmetria

-> megeladólpxre a szilban btkiú utboránk mérésit

(a heterodis irányú töltésudatorlánsket nem lehet a hagyományos módszerrel mérni)

Polarizált fényfel használunk a gyorsítás hoz -> ezzel szelvévelhatunk

a molekulák között, ha vízszintes irányú eltolódást
helyezünk el
→ lokális irányú aszimmetriát hozunk létre

Molekulán dinamikai (MD) modellrel kezelés

A molekulán dinamikai modelleket lehet kezelni
az elhanyagolt méretekkel

Bioelektronika II

A bioelektronika másik értelmezése

→ Hogyan segíthet a biológia az információtechnológiában?

Max-törvény → 1.5 évente megduplázódik az elhanyagolt

berendezés sűrűsége → miniaturizálás az elektronikában

100 nm alatt van már az elvárt felbontás az IC-ben

→ lenni kell a molekulák méretét

Kérdés: Jövőre mit-e a max-törvény feloldása?

A miniaturizálás eddig a bp-down megközelítést használta

vegyis azt, amit a robotronika → elkövetik a felbontás

A molekulán orientált elemek ez már nehézszögbe ütközik

Felmerül az ötlet, hogy várjuk össze a két világot az elektronikai

elemeket → bottom-up - alulról építkezés

→ molekuláris elektronika

A jelen nanoelektronika jó vezető → dróttal jól lehet kezelni

A biológiai anyagok ön-organizáló képessége van

→ esetleg ezt fel lehet használni

Kommunikáció fénnyel

→ Egy másik ág

fibrika → a fény hordozza az információt, nem az elektronos áram
optikai kábelrel valószínűleg meg → a teljes visszaverődés
önereje miatt a fény az üvegcső oldalán nem lép ki,
vél a végén → Jóllel megjon Jón a fényintenzitás
gyengülése

dehet-e ezt licenken is csinálni?

→ Ezzel próbálkozik az integrált optika

Ma ott tartunk, hogy ~20 elem fér el 1 cm²-en

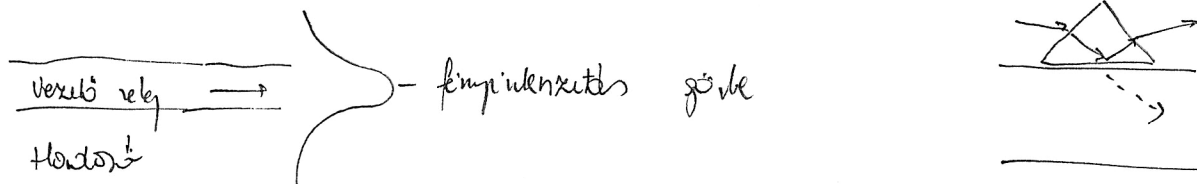
→ ezt lehet fokozni

A zűk keresztmetszet az aktív elemek, amelyek a tranzistoroknál
felülnek meg - ezek a nem lineáris elemek

→ Valamilyen határhoz megközelítve a közmunkát
→ ez a fény hirtelen nagyon hirtelen lefolyik

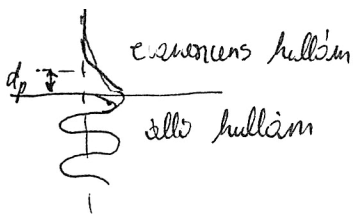
Az "evaneszans" fény

a központi központi fény eléri azt is, ami a központi
határhoz túl van - az a fényintenzitás görbe a
központi határhoz túl is mutat nem nulla értéket



→ ezért, ha próbálunk közelebbi - nagyon közel a
központi központi határhoz, az is lehet a központi
fény központi

Evaneszans hullám: teljes visszaverődésnél → a fény lehet a
központi központi központi, → belől, mellet visszaverődés
→ A teljes visszaverődésnél lehető fény az evaneszans hullám



A teljes visszaverődésnél bekötés fény
az esmerőcsés hullám

Exponenciális lecseng az interakciónál
→ lehetséges mélység: 100 nm

Ezen az éven alapozik az integrált optikai fejlesztés
és lenne kívánólag fényvezetelt áramkörök készítése.

ú. jelenleg a nem lineáris elemeket elektrooptikailag tudjuk
megvalósítani, vagyis kell jóval előrehaladottabb
és → az lenne jó, ha nem kellene átvezetni

Hát az én a ~~szóval~~ hálókörök

A BR modell szerepet játszik az 100 nm pumpáló membránok felépítésében
Közel vagyunk az atomi szintű leírásnak

Genetikai, kémiai, fizikai módosítással készíthetjük.

A BR a fotokéret Jólben változhat az optikai tulajdonságai
szerepe → ezt elvileg genetikai módosítással meg lehetne változtatni

A cél: fényel programozható anyag

A BR okán az állapotban stabil

a BR filmet holográfia készítésére lehet használni → ez a

film 20 év múlva is ugyanolyan jól, mint fiatalon

Kérdés, hogy a nem lineáris optikai tulajdonságai
ugyanolyan jól-e

A gyorsan is Jólben → a BR-vel az a fotokéretben
van gyors átmenet

A bismutát 4 kéredes pontba meg lehet mérni

Fehérjék szerkezetének modellezése, szerkezeti adatok felhasználása
 adatkészlet segítségével, a számítógépes molekuladinamikai
 modellezés alapjai

Hegedűs Tamás

Mai témák:

- Bevezetés - szimulációk és a fehérje dinamika jelentősége
- Fehérjék jellemzőe konformacionai entalpiával
- Informatikai eszközök - biológus szempontból
- Fehérjék dinamizmusának modellezése
- Fehérjék feltételezéseinek szimulációja

Fehérjék dinamizmusának jelentősége

A biológus molekuláris szintű oka?

A gyógyászati - Első körbe alakítás?

37°C-os oldatban nem egy szerkezet lehetnek, hanem egy konformációs sokaság

számítógépes modellezés jelentősége

Atomi szintű információt adnak mozgásokról

Kísérletes módszerek általában nem szolgáltatnak közvetlen információt az atomi szintű történésekről (De pl. NMR és MD igen)

pl. az utas filmozón - fenül ~~alább~~ bíródik a CFTR gének

→ ezt már x-ray is mutatja - amíg számítógéppel nem simulálta ezt a működést, nem tudták, hogy mi a hirtelen

A szerkezet kísérleti meghatározása nagy történet, hogy kudarcsalárd a felhívít → ez nem természetes kísérlet

→ egy pillanatnyi állapotot repedne meg
Aokban 37°C-on sokféle állapot lehetséges

NMR-vel is meg lehet határozni a fehérje szerkezetét

→ de csak max 20 aminosavé一直

akörben a valószínűleg ennél jóval nagyobb fehérjék is
lehetők

→ Kétségtelen nem tudja minden fehérje szerkezetét meghatározni

A szerkezet meghatározható → az ismert

→ ebből elméletileg megpróbálják "előírni" a szerkezetet

Fehérjék jellemzése bioinformatikai eszközökkel

Másodlagos szerkezeti elemek predikciója

A szerkezetből indulnak ki

Elődleges szerkezet: (kovalens szerkezet) → aminosavakban
megfelelő szerkezeti szint

Másodlagos szerkezet: polipeptid lánc rendezett, szabályos
szerkezeti elemei, felismerhetőség

→ a polipeptid lánc lokálisan rendezett szerkezeti elemek
foglaltak megadban

→ amikor egy polipeptid lánc felismeredik, az oldalláncoikat
nem tekintik egy periodikus térbeli szerkezet a
redvezményezett

→ ilyen szabályos szerkezet például az α -hélix és a
 β -red

→ adott szerkezet Szakaluláradmal jórlására keznel hetes
a Ramachandran diagramot

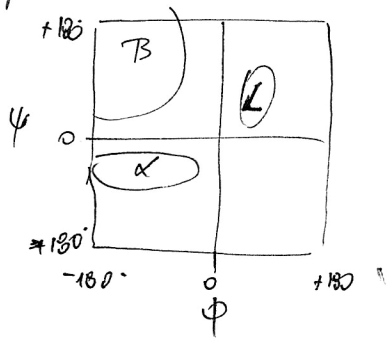
→ két egyszerű kovalens kötés közt a rotáció térszerkezeti
Jövedelményei alapján

→ a polipeptidlánc csak úgy tekinthető, ha az atomok

nem kerülnek egyaránt fedésbe - nem léphet fel a szterikus zavar

→ megengedett szögterületeket 3d dimenzióban ábrázolva lejjel az ún. Ramachandran-terület

α -helix - α karbanmágyú kötések elhelyezése megfelelő periodikus szerkezet



3,6 aminosavakat egy teljes körülforgás

stabil szerkezet a H-vidék miatt

- a helix ~~szélessége~~ tengelyével párhuzamosan

β -szerkezet - lánc szög 180° -hoz közel van

→ erősen nyújtott lánc konformáció - sokkal szelesebb

erősen nyújtott helikális szerkezetet is felzárható

egy β -szálban lehet minél H-vidék

lább ilyen lánc egymás mellett - stabilizált lemezes szerkezet

β -leplet - L-karbanmágy

→ polipeptid lánc 4 aminosav egyezése lehet jól

180° -ban vissza fordul

H-vidék stabilizálja

Supermárodlagos szerkezet

→ márodlagos szerkezeti elemek közötti kölcsönhatás

Jutókövetően egymáshoz fordulnak elő

pl. helikális köteg

Domain szerkezet

kompatibilitás: kb. 150 aminosavnál nagyobb felület

szerkezet több, egymástól többé-kevésbé független

szerepet egyezre, ún. domainek között

A szék üvege az előző alapon meg lehet jósolni, hogy (4)
a fehérje és a nukleus helye: hélix, β -redő v. coil
→ A jósolás valószínűsége 60%.

A jósolás ~~pot~~ valószínűségeit parikatur, ha aminos
megpublikáltak a lúttal segítve
eltérő függvények alapján hasonló ~~tesztet~~ szekenciát
- az egyiket is megadjuk a tesztet
- azt gondoltuk, hogy a másik fehérje is hasonló
a tesztet
→ ez el lehet érni akár a 80%-os ~~teszt~~ is
valószínűségeit is

Megelőzési lehetőségek:

- neurális hálózatok
- support vector machines
- rejtett Markov-modell stb.

Megírt határig értékek minden pozícióra

A számítógépes meg lehet tanulni, hogy ~~az~~ milyen
sokszor kb. milyen tesztet kell felírni meg
(milyen valószínűséggel)

GOR4, HNN, Prof, FPred / FNet

A GOR4: régi, már nem használják

FPred / FNet → ez inkább most a legjobbnak

Rendkívül fehérjék

→ Intrinsically Disordered Proteins

Ek fehérjében vannak szakaszok, amelyek rendkívül könnyen
Beckesel alapján a fehérjéknek akár 25%-a rendkívül lehet.

Mivel ~~ebb~~ komplexabb a fehérje, annál több ilyen
szakasz lesz.

→ Komplexi kórel nő a rendezetlen fehérjék uránya
Az emberi fehérjék felében van min. 30 a.a. hosszú
rendezetlen szakasz

Az aminosav összetétel nem véletlen szeml

Nem teljesen random a szerkezet Pl. hidrofób aminosavak
klaszterizációja

Strukturálisán igen flexibilis

Nincs kompart globuláris hajtógóerő, reziduális szerkezet
→ a szerkezet nem feltételt, hanem összegyűrt

Megdőlt a paradigma, mely szemint jól definiált 3D szerkezethez
kapcsolható fehérje funkció

Miért jó a rendezetlen szerkezet?

- Specifikus és adaptálódó
- Rendezetlen / rendezett reverzibilis átmenet
- Nagy felület
- Gyors kötés

(Ha két olyan fehérje kölcsönzik - mivel nem merev
→ könnyen megváltozhat az az állapot, amivel össze
tud kapcsolódni)

Mire jó?

Entropikus lánc: K- csatolás → van rendezetlen része
→ mozgog → be tud ülni a csatolás
szájába

Effektor: peptid inhibitorok

Scavengers: kazein

Össze szerződés: celmo desmon, F-aktin

Bemutató felület: foszforilálás és proteolitikus helyek
→ rendezett szerkezet egy bizonyos helyen

foszforátalmi jelleme \rightarrow nehéz hozzáférni (6)
ha az rendszeren helyen van - Jönnyen hozzáférhető
vált

Rendszeren ség jöklése (het lehető's)

- Tanuló algoritmusok

\rightarrow PDB-ben előforduló rendszeren fehének szekenciája alapján (Disopred2)

Van egy paradigma, ami szemint a nem előzőelő
regrók a rendszeren \rightarrow kuló algoritmus
ennel a feldeite'se're

- Kölcönhatás energiák becsise (IUPred. enzim.hu)

\rightarrow mánik módszer

\rightarrow a rendszeren sehasz Jözeliben minczen erő's

Kölcönhatás

- az algoritmus ezt jelzi előre \rightarrow megne'zi, hogy hol
minczen lehető'ség a Jözeliben erő's Jölcönhatás

DISProt adatházis: <http://www.disprot.org>

Funkcionális regrók axomosi'ise

Mintázet keres'se (pattern search) \rightarrow (regular expression pattern)

Velaminel tudjuk a szekenciát, de nem tudjuk a
se'reket

egy β_j : megállapít'jár a genom soru'det

\rightarrow megállapít'jár, hogy melyik sehasz melyik
fehére'x vonatkozik

Adott funkcióhoz kutru'adott mintázele

pl. fel lehet ismerni, ha egy ~~se~~ hely
ATP-t fog lótni

A mintákra egyszerűbb motívumokra bontás
de vannak hosszabb szakaszok

Konzenzus mátrix

tudják, hogy sok fehérjénél adott szakaszok ATP-+ Söt

→ ez kb 100 aminosav hosszú

Egy csomó fehérjénél ismerős az ilyen szakaszok

→ ezeket egymás alá helyezzük

→ megállapítjuk, hogy mi egyezik, és mi nem

→ ~~az ilyen mintákat~~

→ ebből lesz a mátrix

A mintákat és a konzenzus mátrixot
adatkészletben tároljuk el

A számítógép az ismeretlen szekenciát ezen adatkészlettel
hasonlíthatja össze.

Domain: szerkezettel és feladattal rendelkező önálló egysége
a fehérjénél

→ ma már a rendszeren ellátott és funkcionál
rendelkező szekenciák is rámondják, hogy domain

Harmadlagos szerkezet jelölés

harmadlagos szerkezet: lánc szerkezet - egyetlen polipeptid
lánc térbeli szerkezete

Ab ritikus feladat

- CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction)

- bizonyos feladatokra előrejeltek

szerkezeti + fizikai tulajdonságokhoz az ismerete

→ ebből határozzuk meg → helyigétek, CASP

A számítógép helyigétek jelölés lehet kenni

ha a kék'vörösök tudunk valamit \rightarrow ezt a hajtógásként E
mint jégy'vörös felkelt fel lehet használni

Homológia modellezés

- feltételezi: konzenált szekvencia == konzervált struktúra
- > 30% hasonlóság
- összehasonlítás pontos meghatározható

Az evolúciót hívja segítségül - hasonló szekvenciát jégy'vörös
már fejtett, ~~amit~~ ^{ismerjük} már ~~ismerjük a szekvencia~~
 \rightarrow feltehetőleg a hasonló funkció és hasonló szerkezet
között józós

Az egyezésnél el kellene érnie a 30%-os egyezést

A szekvenciában lévő aminosavakat egyenként lióznak az
új szekvencia \rightarrow minden esetben új számolja a
kiszármazékot

szekvencia illesztés

hasonlót keres a szekvenciában - felhasználom, hogy
van-e aminosava, amelyre néz hasonló a tulajdonságai
regxp - szerű jégy'vörös

BLOSUM (Blocks of Amino Acid Substitution Matrix) mátrix

\rightarrow helyettesítési mátrix

\rightarrow megmondja, hogy melyik eset mennyi birtokpontot ér
 \rightarrow a birtokpontot nem látja, hogy a kémiai tulajdon-
ságot alapján mondja meg,
hason már meglett aminosav funkciói felelnek
összehasonlításra is lehet

\rightarrow vagy gép a birtokpontot is birtokpontokat ér

Alignement - pl. ClustalW

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

Kísérleti a program az aminosavakat a kémiai tulajdonságuk alapján

Ugyanaz a helyzet

- több fehérje együtt nagyon unelődik

Több polipeptid láncát (alagregát) képviselő fehérjék és fehérjekomplexumok esetén lehetséges megpedigés szerkezetét, ami alatt az egyesek relatív elhelyezkedése révén lehetséges terleli struktúrákat építik.

Fehérje - fehérje doktróda - rendkívül nehéz feladat (felületek leírása, dinamika)

doktróda:

- his molekulák (ligandum, szubsztát, koenzim stb.) kötődési helyeinek megkötődése egy fehérje (receptor) felületén
- két fehérje egymáshoz való kötődési helyeinek megkötődése

Egyes körülmények: az egyik molekula mozgása és formája a másik felületén, közben az illeszkedés értékelése

Az illeszkedés értékelése módja

- egy része geometriai illeszkedés v.
- illeszkedés értékelése komplex energiákkal

Módszerek:

- mindkét molekula merev
- az egyik molekula (ligandum) flexibilis, másik merev
- mindkét molekula flexibilis → keresés általában időigényes

Algoritmusok:

- Molekula dinamika
- Monte Carlo módszer (pozíciók véletlenszerű generálása)
- Szimulált kihűlés (meghatározott hőmérsékleten lehűtve...)

PISA - Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies

Informatikai eszközök - biológus szempontból

(10)

Adattárak

Sok adatot össze kell gyűjteni

- internetes adattárak - másként össze gyűjtött és publikáltak
- lokális - saját adatok

Az adattárak lehetnek még:

- szöveg fájlok
- XML (emberi szemmel is olvasható, de nehéz benne keresni)
- relációs adattárak (RDBMS) - ez az igazi megoldás

Internetes adattárak előnyei:

- másként tartják karban (frissítés és annotálás)
- másként fájlok erőforrásokat
- általában több helyen elérhető (hiv. hiba toleráns)

Hátrányai:

- másként tartják karban - nem tudom parikani a kódot
- adott eszköztár - lehet csopok az ő eszközeihez
- semmi elérés - nagy letöltendő adatmennyiség - internetes
szerelesség problémája

lokális adattárak → ugyanígy lehetnek fájlok
vagy relációs adattárak

Előnyei:

- lokális
- gyors elérés
- adott verzió → megtehetem, hogy amíg nem fogadják el a cíkjüket, nem változtatok meg
- "okémmilyen" szoftverrel használható

Hát társai:

- lokális
- erőforrás igény
- hozzáférési igény

Internetes adatbázisok példák

NCBI, NIH

PubMed

Sok biológiai adatbázis van, sokféle formátum van az információk

+ komplexebb az adatok → sok a hierarchikus adat
→ egy személynél táblázattal nem lehet betenni

Integrálni kellene az adatbázisokat

Megtekinthetjük, hogy lokális adatbázisba kerül az egész
érintett adatokat szedem le

+ segít az információkhoz egyeztetéskor

Sequenencia fájl formátumok

FASTA

Ezek egyszerű rövidek fájlok

PIR

Strukturális fájl

→ PDB fájl formátum - ezt használják a leggyakrabban

Van még programok amelyek meg tudják ezt felcsinálni

Programok

- lehetnek - internetes
- lokálisok

- lehetnek még: - márcsak által megírta
- segít a kódolásiak

Saját programokhoz - programozási nyelvek

C/C++ lassú fejlesztés
 he sebesség jell - mégis néhan kánál

Szkript nyelv: igen gyors fejlesztés
 bizonyos feladatokhoz igen lassú

Java: lassú fejlesztés
 általában a másik igen csomag csak lehet üzemelő

GUI

- Könysű
- Olvashatóság, dokumentálhatóság
- Objektum orientált
- Több felet: üzemelés (pl: subversión)
- Egyéni rész

Fehérkő dinamikus modellezés

Hogyan modellez a fehérkő?

- Normál - módus elemzés
- harmonikus potenciál
- anodikus mozgásegyenletek
- normál módusok

Rugókkal kötött össze az elemeket

- analitikus mozgásegyenletek oldok meg
- egy aminosav me ne fő elemzés

csak jóllehet jól tudja leírni a mozgást

- Molekuláris dinamika (MD)

- teljes potenciál felület
- mozgásegyenletek idő- lépésenkénti numerikus megoldás
- hajtás

Ez egy komplexebb módszer

- felismer a valószínűségi eloszlást
- ezen keresztül energia minimumot

Vagy a mozgásegyenletet oldom meg numerikusan

- halmazt és vagy mozgás lépése
- minden időpillanathoz tartozik egy állapot
- (pl. PDB fájl)

A "force field":

$$U = \sum w_i E_i + \dots$$

általában az energiát külön-külön adják össze minden atomhoz tartozó potenciál, minden időpillanatkor U_i kell számolni

w : súlyozási tényező - ezt hívják potenciálnek

A molekuláris dinamika korlátai

- idő (CPU idő - valódi idő) - mindig tart
- nagy részecskeszám + sűrű időközökkel kell számolni
- a biológiai valódi idő - femto szekundum f_s ($10^{-15} s$)

kb 100 000 atomra a számítás

1GB processornal - 1 lépés \rightarrow 100 ns biológiai idő számításra elegendő

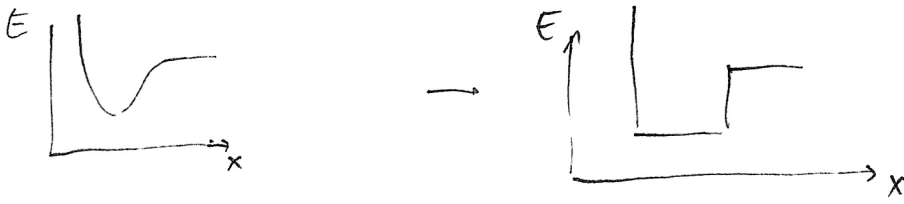
Ám a fehérvetken ms-os idő alatt történik a időközök

- potenciál kiszámolása a sűrű hálózattal
- numerikus integrálás hibája
- f_s -os integrációs lépések
- oldás (explicit/implicit)
- boundary conditions

Nagy méretű szimulációk esetén egyszerűsítést kell alkalmazni

Diszkrét molekuláris dinamika (DMD)

→ egyenlítősi energiák helyett az energia függvényét



diszkrétte' kell lenni

Egyszerűsített (Coarse Grain) modellek

A lipidben a legfontosabb oldalláncoz egyformán

4-5 atomot egynek lehet venni

→ 50 atomtól lesz 10-12 atom

→ részecské szám hamosodlása

→ gyorsabb lesz a számítás

pl: lipid szelvényeinek

→ pontosan nem tudjuk, hogy a membrán hol öleli körbe a membrán felületét

ha minden atomot lennének a számításba, több hónapig tartana a számítás

a coarse grain módszerrel gyorsabban lehet a számítás

→ minden lépést → all atomi rez-ze' alatti hűtés

→ így futtatás le, de még csak anno a rövid időre, ahol az értékes adatok kitérnek

amikor először az egyszerűsített modellt számítás először, azután a részleteket

→ multi-scale simulációval járjuk

pl. K-atomok, amit forlipid nélkül

nehéz leírhatóan vizsgálani → simulálni kell

a simuláció előtt nem tudták, hogy hova

Isődít le

azt is kipróbálják, hogy mutációt csinálva segít
→ ebben már nem tudott a fehérje aktiválódni

pl. Glikofonin A dimenziációja

→ hogyan kapcsolódnak össze a fehérjék?

→ egyszerre nézik a fehérjéket a számításhoz

Az α -helixek dimenziálódnak

- a módszer röszögét a megfelelő MR adatokkal
elő összehasonlítás ellenőrizhetjük

A mutációt is ki lehet próbálni → nem dimenziálódás
(o kísérletben sem)

pl. ATP Binding Cerek → ABC fehérjék

ATP "jó" szék

200 aminosav hosszú

vanne lenne rögzített szerkezetű rész - de nem az

episz
hidrofób transzmembrán résszel rendelkezik

általában v. milyen anyagot juttatnak át a
membrán egyik oldaláról a másikra

pl. A multidrog- rezisztencia és kelfüggesztése

sokféle mérgező anyagot felismer

→ a többi segít is hozzá ezt → ellenállás a
kemoterápiával

→ ez az egyik ok, amiért ungaságos

Fehérjék konformációinak stabilitása

→ ABC fehérjék konformációi

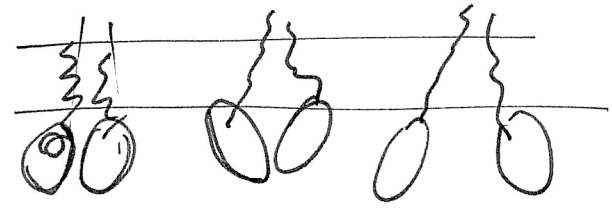
transzmembrán α -helixek

→ a két rész rendezését kell, hogy kölcsönözze az

ATP-t

Az ABC fehérjénél több konformációt is igényelt kristályosítani

- pl. alul-zárt holo
- alul-zárt apo
- alul-nyitott apo



Érdekes volt látni, hogy az alul-nyitott szerkezet nem stabil → rövid idő alatt szétesnek a hélix-ek - flexibilis - red-ode (alul so hidrofil rész van, ami amúgy lefele néz)

Útolsó sávon lágy az alul-nyitott konformáció, mert a kristályosított formában leterítik

Azért nem stabil az alul-nyitott szerkezet, mert hidrofil aminosavak kerülnek felszínre

Ese me'nyer modellekre

Hogyan befolyásolja az ATP hidrolízise a fehérje dinamikáját?

Pl. ~~stabil~~ steady state molekuláris dinamika (MD)

Hogyan történik az átmenet az alul-zárt konformációból az alul-nyitott konformációba?

Pl. large scale molekuláris dinamika (MD)

A legjelentősebb elmozdulásokat keressük

→ nem annyira szétnyitás, hanem alul-elcsúszás elmozdulás van

→ a működés rúd-ábrák csavarodás sora, mint szétnyitás

Fehéjék feltevése'nek szimulációja

denitral - paradoxon

A natív konformáció a polipeptid lánca szabadentálpia- minimum-
mánsz felé meg, azaz kinetikuslag az a
legstabilabb állapot az adott hőmérsékleten.
Tehát a felgyomolyodás kinetikuslag gyorsabb, mint a feloldás.

A fehérjék szerkezete ellipszoidális állapotban lehet fel.
Így a fehérjének még alig ugráló szar aminosavas polipeptidnek
is a hőmérséklettel fel nem fogható, 10^{30} -os nagyságrendű
átmeneti sebességre lehet.

Ha próbáljuk meg a legstabilabb energiájú
állapotot \rightarrow a leggyorsabb sebességre nem lenne elég

A szintetizált fehérje másodpercen belül megkötődik
az a szerkezetre, amin működni fog
 \rightarrow még egy molekula nélkül is megkötődik
 \rightarrow denitral - paradoxon

Ahhoz, hogy ezt az állapotot felvegye, a molekulának
gátlóan (magasabb energiájú állapotokon) kell átmennie

A fehérjék képződése során az egyes ~~szar~~ fehérjereszletek
együtt szar: a folyamat kooperatív

A nagy fehérjék igen gyorsan képződnek a képződés
korában. \rightarrow felhív fehérje - egy helyi energiámi minimummal
szar "átmeneti állapotban stabilizálódik"

\rightarrow a nagy, natív állapotból egy kisebb-nagyobb energiát
utánjár el \rightarrow "olvasztás" névű állapot

Gyorsan szar \rightarrow a hidrofób ~~felhív~~ szar \rightarrow felhív

maradnak → a fehérje helyettesítés során az
összetételére → ilyen pl. a neurodegeneratív
betegségek Alzheimer-kór, Parkinson-kór, prion betegség

Fehérje stabilitás:

Konformáció stabilitást elősegítik

- Hidrofób kölcsönhatások
- Intramolekuláris H-híd kötések
- Intramolekuláris ionos kölcsönhatások
- Intramolekuláris van der Waals kölcsönhatások
- Intramolekuláris diszulfid hidak

Destabilizáló tényezők

- H-híd az oldószerrel
- Van der Waals kölcsönhatás az oldószerrel
- Az ionos csoportok neutralizálása
- Entropia

A fehérje stabilitás nem mindig a maximális értéket
erre utalnak:

- termofil baktériumok fehérjei
- igen stabil, tervezett fehérjék

Ezzel szemben lehet:

- az evolúció nem igényel stabilabb fehérjét, mint a
funkció in magga
- a fehérjéknek le is kell bomlaniuk
- a funkcióhoz flexibilitás szükséges

Folding optimális esetben mindig az abszolút energiaminimumot
(maximális stabilitást) keresik.

→ de nem biztos, hogy a fehérje az e-minimumon van.
Van olyan fehérje, amelyik stabilabb, mint a mi

fehértől (pl. termofil baktériumok vagy kórokozó fehértől) (19)

Ha nagyon stabil a fehérje, nem tud leomlani.

Fehérje felkötés simulációja

All atom force-field:

Polen adal függvény számolása erőforrás rögnyes

Reprezentatív konformáció mintavétel problémái

Umbrella sampling, replica exchange.

összehajtogatás és egyike

simuláció egy adott hőmérsékleten → lokális minimumban

megakad →

eltérő hőmérsékleten hajtogatás vagy a simuláció

Ásztatás fibrózist okozó fehérjében egy anatómiai töredék

(508-aa) → nem lesz klorid ionok

→ lehet, hogy az összehajtogatás a polimer → ez megakad-
hat valahol

Coarse grained, Gō-model

- egy szelet ~~modell~~, szerkezeti információ, nem ábrázol polen adal

függvény

- egy szelet ~~modell~~ fehérje reprezentáció

A cfr fehérjét ~~modell~~ simulálják ezzel a módszerrel

→ a vad típus is és a mutáns fehérjét is

a mutáns sokkal kevésbé előgázó úton jutott el az

összehajtogatott állapotba, mint a vad típus

(várható az összehajtogatás gyors állapot)

a mutáns gyorsan jutott el a teljes összehajtogatott

állapotba

a vad típus ezt hamarabb lelte → volt lehetőség a konformációra

