

EGYMOLEKULA BIOFIZIKA

Kellermayer Miklós

az MTA doktora, egyetemi tanár,
Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
kellermayer.miklos@med.semmelweis-univ.hu

„Hiszem, ha látom”, tartja a hétköznapi logika. Valóban, a látható érvék mintha mindenél meggyőzőbbek volnának. Nincs ez máshogy a természettudományokban sem. Egyedi molekulák közvetlen megfigyelése, továbbá manipulálása és mozgatása tudományos elméletek egyértelmű bizonyítékául szolgál, de egyúttal olyan jelenségek és folyamatok felfedezését is lehetővé teszi, amelyek a molekulasokaságban rejtve maradnak. A hagyományosan alkalmazott biokémiai és szerkezeti eljárásokban ugyanis molekulasokaságot vizsgálunk, melyek a vizsgált tulajdonság vagy kísérleti paraméter átlagértékéről adnak információt. Ezzel szemben egyedi molekulák vizsgálata lehetőséget ad a vizsgált paraméter molekulák szerinti eloszlásának megismerésére. A módszerrel eddig soha nem tapasztalt bepillantást nyerhetünk a biomolekuláris szerkezet és működés különböző aspektusaiba, és bizonyos tulajdonságok, például a mechanikai jellemzők, csupán ilyen módszerekkel vizsgálhatók. Az utóbbi két évtizedben egyrészt a technikai fejlődésnek, másrészt izgalmas, újonnan felmerülő és különösen biológiai jellegű problémáknak köszönhetően az egyedi molekulakutatás fejlődése nagy sebességgel történt. Egy új diszciplína jött létre, amely *egymolekula biofizikaként* vált ismertté. Az alábbi összefoglalóban első-

sorban saját eredményeken keresztül mutatjuk be az egymolekula biofizikát, ezen belül is koncentráva az egymolekula mechanikára.

Az egymolekula biofizika rövid története

A molekulák megragadása és egyenként történő manipulálása alig egy emberöltővel ezelőtt még szinte a tudományos fantasztikum világába tartozó, hihetetlennek tűnő álom volt. Bár egyedi DNS- és fehérjemolekulákról már az 1960-as években is készültek képek elektronmikroszkóp segítségével, ezekben az esetekben a molekulák vizualizálása kémiai fixálás, dehidráció, és festés vagy más kontrasztnövelő eljárás után történt. Ezzel szemben az egymolekula biofizikai módszerekben a molekulákat vizes közegben, lehetőség szerint a fiziológiás viszonyoknak leginkább megfelelő körülmények között vizsgáljuk. Néhány mérföldkő az egymolekula biofizika történetéből (Kellermayer, 2005): 1976-ban egyetlen antitest-molekuláról készítettek fluoreszcencia mikroszkópos felvételt; 1986-ban egyedi, fluoreszcensen jelölt aktin filamentumok motilitását követték miozinnal borított felületen; 1991-ben sikerült megmérni egyetlen miozinmolekula mechanikai lépését, majd 1994-ben egyetlen kinezinmolekuláét; 1996-ban a DNS rugalmasságát írták le egyedi molekulák manipulációja alapján; 1997-

ben leírták a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) pislogási folyamatát; 1997-ben került sor az első fehérjemolekula-manipulációs kísérletekre; 1998-ban kimutatták az F1Fo ATP-áz rotációs viselkedését; 2001-ben egyedi RNS-molekulákat sikerült kitekerni mechanikai erő segítségével; végül 2008-ban egyedi riboszómák mechanikai manipulációjával kimutatták, hogy maga a riboszóma is egy bonyolult mechanoenzim komplex (Wen et al., 2008). Az egymolekula biofizika látványosan fejlődő, élénk érdeklődéssel kísért tudományterület. Bár bonyolult és nehéz kísérleteket igényel, fejlődését és elterjedését mégis jól mutatja, hogy amíg az 1990-es évek elején az évente publikált néhány cikk mindegyike szenzációsámba ment, addig 2011-ben az ezret is meghaladta az egymolekula tudománnyal foglalkozó megjelent cikkek száma.

Miért vizsgáljunk molekulákat egyenként?

Fizikai, kémiai és biológiai tudásunk nagy része molekulasokaságon végzett kísérletekből származik azzal a feltételezéssel, hogy azonos körülmények között az azonos összetételű molekulák többé-kevésbé ugyanúgy viselkednek. Az utóbbi évek egymolekula kísérletei azonban rámutattak, hogy ugyanazon kémiai összetételű molekulák különböző utakat járhatnak be egy adott folyamat során. Véletlenszerű, úgynevezett sztochasztikus jelenségek léphetnek fel, melyek rejtve maradnak a molekulasokaságban. Bonyolult kaszkádfolyamatokban, mint például a biológiában oly jelentős jelátviteli utak, gyakran kisméretű a térbeli és időbeli szinkronizáció, ami elfedi a lépések részleteit. Ezért, jöllehet, különböző állapotok lehetnek jelen egyidejűleg, a vizsgáló csupán ezek átlagát érzékeli. Ezzel szemben az egymolekula módszerek lehetőséget adnak az adott molekuláris folyamatban

fellelhető különböző térbeli és időbeli állapotok azonosítására és jellemzésére. Ezek az állapotok lehetnek molekulaszervezeti állapotok (konformáció, konfiguráció), elektronenergia állapotok (szingulett, triplett, alap-, illetve gerjesztett), és kölcsönhatási, interakciós állapotok (kötött, disszociált). Bizonyos területeken az egyedi molekulaeljárásoknak nincsenek alternatívái: biomolekulák mechanikai tulajdonságait (rugalmasság, erőgeneráló átmenetek) csak molekulák egyenkénti manipulálásával mérhetjük meg pontosan. Négy terület azonosítható, melyek esetében az egymolekula módszerek olyan információval szolgálnak, amely nem elérhető molekulasokaságon végzett kísérletekben: 1) időbeli állapotok azonosítása véletlenszerű vagy egyéni mintázatú folyamatokban, 2) térbeli állapotok azonosítása párhuzamos útvonalakon futó folyamatokban, 3) biomolekulák mechanikai tulajdonságai, és 4) egyedek követeése heterogén molekulasokaságban.

1. Molekuláris állapotok időbeli eloszlása • Könnyen belátható, hogy egy maratoni futóverseny sokaságának megfigyelésével nem tudjuk felfedni az emberi futómozgás mechanizmusainak finom részleteit. Bár a startpisztoly eldördülésének pillanatában a futók szinkronban indulnak el, néhány lépés után deszinkronizáció lép fel, és a távoli szemlélő csak a futómozgás átlagát észleli. A finom mechanizmusok felfedezése érdekében tehát az egyént kell vizsgálni. Ugyanez a helyzet molekulák esetében is. A molekulában idő függvényében fellépő változások pontos megismeréséhez egyetlen molekula viselkedését kell követnünk. Ilyen időbeli változások a véletlenszerű vagy sztochasztikus állapotváltozások, a memóriaeffektussal járó folyamatok, és a többlépcsős kaszkádfolyamatok. A sztochasztikus állapotváltozás érdekes példá-

ja a fluoreszcens molekulák milliszekundumos időskálán zajló pislogása (blinking), amely ismeretlen volt mindaddig, amíg nem sikerült egyedi molekulákat idő függvényében közvetlenül követni (Dickson et al., 1997).

2. *Molekuláris állapotok térbeli eloszlása* • Reggelente többszer autót kel át a Dunán Pest és Buda között, hogy munkába juttassa utasait. Természetesen jól tudjuk, hogy a közlekedés a budapesti hidakon keresztül történik, a puszta átlagszám erről mit sem árul el. Ahhoz, hogy a térbeli útvonalakat, idegen szóval trajektóriákat megállapítsuk, lehetőleg egyedek mozgását kell követni. Ehhez hasonló, párhuzamos útvonalakon haladó molekuláris folyamatoknál még tökéletes időbeli szinkronizáció esetén is egyszerre több állapot van jelen a sokaságban. A párhuzamos útvonalakon haladó folyamatok legfontosabb példája a fehérjetekeedés vagy gombolyodás, amely során a polipeptidlánc felveszi háromdimenziós térszerkezetét. Bár a fehérje elsődleges szerkezete (aminosavsorrendje) tartalmazza a térszerkezethez szükséges információt, az a folyamat, amely során a lineáris polipeptid lánc eljut a háromdimenziós szerkezetéig, még nem ismert pontosan. Egy fehérjemolekula lehetséges konformációinak száma elképesztően nagy, ezért a gyors feltekeedés során nem teljesen véletlenszerűen, hanem bizonyos vezérlés szerint választódnak ki a konformációs állapotok, amelyekre keresztül a fehérje eljut végső térszerkezetéhez. Ugyanazon fehérje különböző egyedei más és más utat járhatnak be a folyamat során. A molekula különböző intermedier állapotokba, sőt, akár kinetikai csapdába is kerülhet. A fehérjetekeedés vizsgálatának fő céljai közé tartozik a különböző intermedierek azonosítása és végső soron a tekeredési útvonal lehető legpontosabb feltérképezése. Egymolekula

tekeredési kísérletekben valamilyen szerkezeti paramétert (például intramolekuláris távolságot) követünk idő függvényében, mialatt a fehérje kémiai, termikusan vagy mechanikailag vezérelt módon a denaturált állapotból a natívba, vagy megfordítva, a natívból a denaturált állapot felé halad. Erővezérelt egymolekula kitekerési kísérletekben a molekulát külső mechanikai erővel denaturáljuk. A rendszer ilyenkor nincs termodinamikai egyensúlyban, a molekula nem tudja kipróbálni az összes lehetséges szerkezeti állapotot, és a mechanikai erő mintegy átrángatja a molekulát a konfigurációs tér egy részén. Az erővezérelt fehérjetekekerési kísérletek rendkívül fontossá váltak a gombolyodás folyamatának és a mechanikai stabilitás tényezőinek megismerésében.

3. *Mechanikailag aktív fehérjék* • Mára rengeteg olyan fehérjét ismerünk, melyek biológiai szerepe valamilyen mechanikai hatás gyakorlása. Az ilyen fehérjék képesek mechanikai erőt kifejezni és irányított elmozdulást létrehozni azáltal, hogy a kémiai energiát nagy határfokkal mechanikai munkává alakítják. Bizonyos fehérjék, úgynevezett motorfehérjék vagy mechanoenzimek, nagy távolságokat tesznek meg biopolimer molekulák (például citoszkeletális filamentumok vagy DNS) mentén, vagy éppen rotációs mozgást hoznak létre (például az F₁F₀ ATP-áz vagy a bakteriális flagellum rotorja). Más fehérjék (például kondenzinek) a DNS-molekula aktív összecsomagolásában, tömörítésében játszanak fontos szerepet. A mechanikailag aktív biomolekulák ideálisan tanulmányozhatók egyedi molekula módszerekkel, és az általuk kifejtett mechanikai hatás megmérése csak így lehetséges.

4. *Egyének követése molekuláris sokaságban*

• Az élő sejt belseje rendkívül koncentrált,

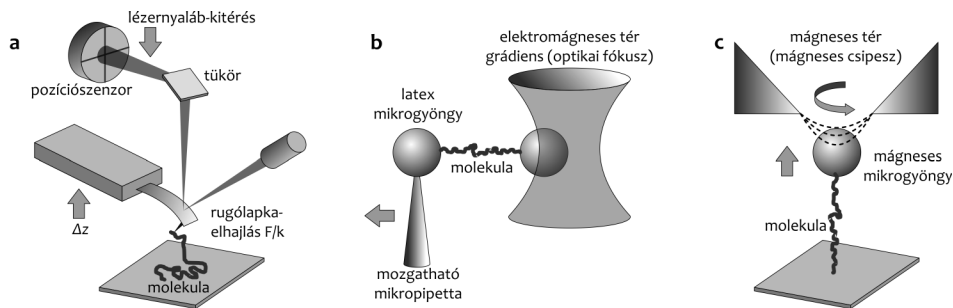
molekulák által sűrűn benépesített heterogén környezet. Olyan fehérjék esetében, melyek önmagukban is nagy lokális koncentrációban vannak jelen (például aktin, 2–8 mg/ml), a sokaság elfedi a molekuláris mozgásokat, fluxusokat, kölcsönhatásokat. Más esetben csupán néhány partikulum van jelen (például vírusok), ám ezek térbeli és időbeli követéséhez ugyancsak egymolekula módszerek szükségesek.

Hogyan ragadjunk meg egyetlen molekulát?

Az egymolekula manipulációs módszerek két fő csoportba sorolhatók: mechanikai transzducerek és külső mező manipulátorok (Bustamante et al., 2000). A mechanikai transzducerek közvetlen kontaktusban vannak a vizsgált molekulával, legismertebb fajtájuk az atomerő-mikroszkóp. A külső mező manipulátorok távolról és közvetett módon, többnyire egy fogantyún keresztül hatnak a vizsgált molekulára. Ezek közé tartozik a lézer-

csipesz és a mágneses csipesz. A megfelelő módszer kiválasztása több tényezőtől függ, mint például a geometriai elrendezés, a releváns erőtartomány, a konjugációs kémia és az oldatcsere igénye. A különböző egyedi molekula manipulációs módszerek sémája az 1. ábrán látható.

1. Atomerő-mikroszkóp • Az atomerő-mikroszkóp (atomic force microscope – AFM) egy nagy felbontású pásztázó tűszondás mikroszkóp, melyben egy rugalmas lap végén levő tűvel pásztázzuk végig a minta felszínét. A felszín és a tű atomjai között fellépő vonzó és taszító kölcsönhatások a rugólapkát vertikális irányban kitérítik alaphelyzetéből. A rugólapka parányi elmozdulásait a rugólapka hátlapjára vetített és onnan egy helyzetérzékelő fotodiódára vetülő lézernyaláb segítségével mérjük meg (1.a ábra). Az AFM segítségével nagyfelbontású képek készíthetők egyedi molekulákról. Egyúttal a molekulák mechanikai manipulációját, megnyújtását is meg-



1. ábra • Egyedi molekula manipulációs technikák. A nyilak az elmozdulás irányát jelzik. **a.** Egyedi molekula manipuláció atomerő-mikroszkóppal (AFM). A rugólapkát elmozdítjuk a mintahordozó felülettől; a megragadott molekula megfeszül. • **b.** Molekulanyújtás lézercsipeszsel. A vizsgált molekula két mikrogyöngy között feszül ki. Az egyik mikrogyöngyöt a lézercsipeszsel, a másikat egy mozgatható mikropipettával ragadjuk meg. • **c.** Molekulamanipuláció mágneses csipeszsel. A molekula egyik vége szuperparamágneses mikrogyöngyhez kapcsolódik, amely a külső mágneses tér irányába igyekszik fordulni és mozdulni. A mágneses csipeszben lehetőség adódik a mikrogyöngy forgatására, így a molekula megcsavarására is.

valósíthatjuk, ha a rugólapkával nem pásztázzunk, hanem a hordozó felületre merőlegesen mozgatjuk. A felület és az AFM-tű közé fogott molekula ilyenkor megfeszül, benne erővezérelt szerkezeti változások léphetnek fel, amelyeket a módszerrel pontosan azonosíthatunk és követhetünk.

2. *Lézersípész* • A lézersípész (*i.b. ábra*) működésének alapja impulzuskiecsérlődés egy fókuszált lézernyalámban haladó fotonok és egy fénytörő mikrogöngy között. A mikrogöngyre ható különböző optikai erők egyensúlya esetén a göngy térben rögzített helyzetbe, csapdába, potenciálgödörbe kerül. A lézersípész egyfajta virtuális rugóként viselkedik és felhasználható erőmérő transzducereként a pikonewton ($\text{pN} = 10^{-12} \text{ N}$) erőtartományban. A vizsgálni kívánt molekulát különböző konjugációs eljárásokkal kapcsoljuk a mikrogöngy felületére. Különböző lézersípész geometriák léteznek a kísérlet által megkívánt feltételeknek megfelelően.

3. *Mágneses csipesz* • A mágneses csipeszben szuperparamágneses mikrogöngy lép kölcsönhatásba külső mágneses térrel (*i.c. ábra*). A mikrogöngy fogantyúként működik, melyen keresztül az adott molekula végét meg lehet ragadni, és a molekulára erővel lehet hatni. A kifejtett erők igen alacsonyak, akár femtonewton nagyságrendűek lehetnek ($\text{fN} = 10^{-15} \text{ N}$). A mágneses csipesz használatakor különösen nagy jelentőségű, hogy a külső mágnes elforgatásával a manipulált mikrogöngy is elfordul. Ha a megragadott molekula vége szilárdan rögzül a mikrogöngy, illetve a szubsztrát felszínéhez, akkor a molekulára torziós erőt fejthetünk ki.

4. *Molekulák rögzítése* • Annak érdekében, hogy egyedi biomolekulákat mechanikailag manipuláljunk, a végeit megfelelő módszerrel meg kell fognunk. A lézersípészben a

molekula végeit különböző felszíni reaktív csoportokat hordozó mikrogöngyökhöz kapcsoljuk. Ezután az aktivált mikrogöngy fogantyúként viselkedik, mellyel a vizsgált molekulát manipulálni tudjuk. Az AFM-ben a molekula a tű és a felszín között feszül ki, melyek mindegyike kémiaiilag aktiválható. Az egyedi DNS-molekulák manipulálására alkalmas technikák széles skálája megteremtette annak lehetőségét is, hogy magát a DNS-molekulát mint fogantyút alkalmazzuk. Az utóbbi években különösen nagy érdeklődés irányul a kémiaiilag funkcionizált szén nanocsövekre, melyek az AFM-ben alkalmazhatók fogantyúként.

Mire lehet következtetni egy molekula manipulálásából?

Egyedi molekulák manipulációjából számos tulajdonságra, állapotra és folyamatra lehet következtetni: rugalmasság, szerkezeti állapotok, intramolekuláris kölcsönhatások, erőgeneráló folyamatok.

1. *Mért paraméterek* • Az egymolekula manipulációs kísérletekben nyert adatok a mechanikai erő, illetve a molekula felfüggesztési pontjai közötti távolság. Mindkét paraméter időbeli változásait is követhetjük nagy felbontással. Az erő a molekulában fejlődik ki a mechanikai perturbáció hatására. A felfüggesztési pontok közötti távolság láncszerű molekula esetében többnyire a molekula két végpontja közötti távolság.

2. *Mechanikai kalibráció* • Az egyedi molekula manipulációs eszközök parányi erők (fN – nN tartomány) mérésére alkalmas erőátalakító berendezések. Hogy a vizsgált molekulában kifejlődő erőt pontosan megmérhessük, ismernünk kell az erőtranszducer (például lézersípész vagy AFM-rugólapka) rugóállandóját. A rugóállandót kalibrációs

protokollok segítségével mérjük meg, melyek alapja ismert nagyságú (például viszkózus, termikus) erőhatásra fellépő elmozdulás vagy elhajlás megmérése.

3. *Molekularugalmasság* • Annak érdekében, hogy egy fehérjelánc rugalmasságát megmérjük, a molekulát végeinél fogva meg kell nyújtanunk. Lézercsipesz esetében például a molekula mindkét végére egy-egy mikrogönggy kapcsolódik. Az egyik mikrogönggyöt a lézercsipeszrel, a másikat egy mozgatható mikropipettával fogjuk meg (*I. b ábra*). A molekulát a mikropipetta lézercsipesztől történő eltávolításával nyújtjuk meg, majd a mikropipetta lézercsipesz felé történő visszamozgatásával relaxáljuk a molekulát. A nyújtás-visszaengedés ciklus során mérjük vagy kiszámoljuk a molekula két vége közötti távolságot és az ehhez tartozó rugalmas erőt. Más módszerek, például az AFM esetében (*I. a ábra*) a molekula végeit a rugólapka tűjével, illetve a szubsztrát felszín segítségével ragadjuk meg. Hosszú biopolimér-láncok esetében a rugalmas erő-molekulahossz függvény többnyire nemlineáris összefüggést mutat, utalva arra, hogy a rugalmassági mechanizmus elsősorban entropikus, és nem a merev testek rugalmassági törvényeit követi. Egy entropikus polimer összehúzódik, mert benne termikusan gerjesztett hajlító mozgások lépnek fel, melyek növelik a lánc konfigurációs entrópiáját. A konfigurációs entrópia csökkenthető a lánc megnyújtásával, azaz a lánc végeinek egymástól való távolításával. Ehhez külső mechanikai erőre van szükség. Ahogy a lánc vég–vég távolsága közelíti a kontúr hosszát, az erő aszimptotikusan nő. A molekula rugalmassági mechanizmusainak pontos megértése érdekében a kísérleti erő-megnyúlás görbére elméleti függvényeket illesztünk, így kaphatjuk meg az entropikus

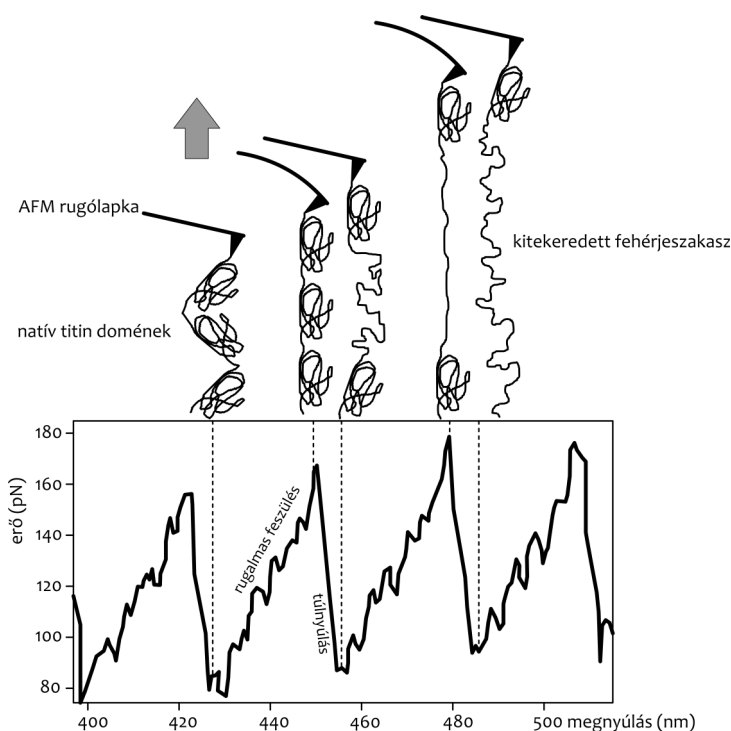
polimérlánc hajlítási rugalmasságát leíró úgynevezett perzisztenciahosszt.

4. *Erő hatására fellépő szerkezetváltozások* • Mechanikai erő hatására nem csupán reverzibilis, rugalmas alakváltozás lép fel a molekulában, hanem szerkezetváltozások is. Éppen a szerkezetváltozások detektálása és jellemzése vezet el az adott molekula tulajdonságainak és működésének pontos megismeréshez. Az alábbiakban konkrét példán, a titin óriás izomfehérjén mutatjuk be az erővezérelt intramolekuláris szerkezetváltozásokat.

A titin volt a legelső fehérje, amely egyedi molekulamanipulációs technikákkal manipulálásra, megnyújtásra került (Rief et al., 1997; Tskhovrebova et al. 1997; Kellermayer et al. 1997). A harántcsíktolt izom összehúzódásán kívül rugalmas tulajdonságokkal is rendelkezik, melyekért elsősorban épp ez a különleges, hatalmas méretű filamentális fehérje a felelős. Az izomrostban megnyújtásra fejlődő erőt *passzív izomerőnek* nevezzük, és fontos szerepe van az izomszarkomer szerkezeti integritásának fenntartásában, illetve a nyújtási erő megszűnte után az izom nyugalmi hosszának helyreállításában. A titinről ma már tudjuk, hogy mérete, a szarkoméren belüli elhelyezkedése és egyéb fehérjékkel való kölcsönhatásai miatt egyfajta organizáló, rendező szerepet játszik az izomban. A titin közel 4 MDa tömegű, láncszerű fehérje, amelyet mintegy 300, sorbakapcsolt globuláris fehérjedomén és a közöttük itt-ott elhelyezkedő egyedi szekvencia épít fel. A globuláris domének hét, antiparallel irányban futó béta-láncból épülnek fel, amelyek, mint a hordó dongái, egy hordó alakú szerkezetet építenek fel. Érdekes, hogy a fehérjeszerkezet alapján a titin globuláris doménjei hasonlítanak bizonyos extracelluláris fehérjék, az immunoglobulinok és a fibronectin doménjeihez.

Ha egy titinmolekulát végeinél fogva megnyújtunk, benne rugalmas erő ébred (2. *ábra*). A titin rugalmassága jól jellemezhető entropikus polmérmodellek segítségével. Ha azonban az erő meghalad egy bizonyos értéket, az erőgörbe hirtelen eltér a rugalmas modell szerint várható lefutástól, és a molekula túlnyúlik, mintegy megfolyik. A titin túlnyúlásának oka a molekulát felépítő globuláris domének erő hatására fellépő kitekeredése. Az egymást követő egyedi doménkitekeredési események fűrészfog alakú erőgörbét eredményeznek.

5. *Erőspektrum* • A bonyolult szerkezeti átmenetek sorozatát tartalmazó erőgörbét erőspektrumnak nevezzük. Az erőspektrumban észlelt pillanatnyi erőváltozások intravagy – a kísérleti geometriától függően – intermolekuláris kölcsönhatások mechanikailag vezérelt felszakadására vezethetők vissza. A kölcsönhatások ennek megfelelően lehetnek például fehérje térszerkezetet összetartó kötések, antigén/antitest kötések, vagy ligandum/kötőhely kölcsönhatások (például biotin/sztreptavidin). Ha egy láncszerű molekulában erő hatására felszakadó kölcsönhatá-



2. *ábra* • Rugalmasság és kitekeredés a titinben. AFM segítségével regisztrált erő-megnyúlás görbe. Fűrészfog alakú átmenetek sorozata figyelhető meg. Az erő-fűrészfogak háttérében húzódo molekuláris események sémás magyarázatában három globuláris domént nyújtunk, melyek mindegyike natív, feltekeredett állapotban van a nyújtás kezdetén. Az erő-fűrészfog csúcán a molekulaszakasz megfeszült állapotban van. Az ezt követő hirtelen erőesés egy-egy domén kitekeredése által okozott hirtelen kontúr hossz-növekedés miatt lép fel.

sok diszkrét, lépésszerű megnyúlást okoznak, az erőspektrumban fűrészfogak jelennek meg (2. ábra). Egy molekula vagy molekulakomplex szerkezetét a benne fellépő kölcsönhatások egyensúlya és így az asszociációs és disszociációs reakciók relatív sebességei határozzák meg. Könnyű belátni ezért, hogy az erő hatására fellépő szerkezetváltozás attól is függ, hogy milyen sebességgel terheljük a molekulát. Az erőspektrum terhelési sebesség függvényében történő analízist dinamikus erőspektroszkópiának nevezzük. A dinamikus erőspektroszkópia segítségével gyakran nehezen hozzáférhető termodinamikai és kinetikai paraméterek válnak megmérhetővé.

Perspektívák

Az utóbbi években az egyedi molekulák vizualizálásában és mechanikai manipulálásában látványos fejlődésnek lehettünk tanúi. Fontos felfedezések történtek, és a módszerek egy része széles körben alkalmazásra került. A tudományterület fejlődési irányát nehéz megjósolni. Valószínű azonban, hogy további technikai fejlődés (például érzékenyebb szenzorok, egyre gyorsabb adatvétele) és különböző egymolekula módszerek kombinációi meghatározó tényezők lesznek. Bizonyos módszerkombinációk már jelenleg is léteznek. A képkötő AFM ötvözése molekuláris erőspektroszkópiával egyedi információval szolgál a lokális szerkezetről, dinamikáról, mechanikáról. Egmolekula manipulációs módszerek kombinációja fluoreszcencia mikroszkópos és spektroszkópos technikákkal széles térbeli és időskálán történő méréseket tesz lehetővé. Egy különösen látványos kísérleti elrendezésben a lézercsipesz és egyedi

molekula fluoreszcencia kombinálásával sikerült a miozin mechanikai működését és enzimátikus funkcióját egyszerre vizsgálni (Funatsu et al., 1995). Számos törekvés történik az AFM és fluoreszcencia mikroszkópia kombinálására (Kellermayer et al., 2006). Ezek a kombinációk gyakran szekvenciálisak (vagyis időben egymást követik a mérések) a bonyolult geometria, az igen eltérő adatvételei sebességek és az egyedi fluorofór detektálására elégtelen érzékenység miatt. Egyedi, mechanikailag manipulált fehérjemolekulák fluoreszcenciájának követésével lehetőség nyílik nagyfelbontású intramolekuláris szerkezeti és dinamikai vizsgálatokra. Figyelembe véve, hogy keveset tudunk a mechanikailag perturbált molekulák nagyfelbontású pillanatnyi szerkezetéről, ezek a fejlesztések és törekvések igen nagy jelentőségűek. A nemrégiben kifejlesztett szuperrezolúciós mikroszkópos technikák újabb kapukat nyitnak egyedi molekulák viselkedésének pontosabb megismerésére (Huang et al., 2008; Lippincott-Schwartz – Manley 2009). Végső soron az sem reménytelen, hogy megfelelő kémiai, genetikai és mechanikai manipulációk segítségével olyan erőérzékelő fluoreszcens molekulák fejleszthetők, amelyek mintegy láthatóvá teszik az élő sejtben állandóan működő, eddig alig ismert molekuláris erőhatásokat, útnak indítva ezáltal egy újabb, már a laboratóriumaink bejáratánál kopogtató tudományterületet, a mechanobiológiát (Lim et al., 2010).

Kulcsszavak: *lézercsipesz, atomerő-mikroszkóp, nanomechanika, fluoreszcencia, titin, molekuláris rugalmasság, fehérjegombolyodás*

IRODALOM

- Bustamante, C. – Macosko, J. C. – Wuite, G. J. (2000): Grabbing the Cat by the Tail: Manipulating Molecules One by One. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1, 2, 1 November, 130–136. DOI:10.1038/35040072.
- Dickson, R. M. – Cubitt, A. B. – Tsien, R. Y. – Moerner, W. E. (1997): On/Off Blinking and Switching Behaviour of Single Molecules of Green Fluorescent Protein. *Nature*. 388, 6640, 24 July, 355–358. DOI:10.1038/41048.
- Funatsu, T. – Harada, Y. – Tokunaga, M. – Saito, K. – Yanagida, T. (1995): Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual ATP Turnovers by Single Myosin Molecules in Aqueous Solution. *Nature*. 374, 555–559.
- Huang, Bo – Jones, S. A. – Brandenburg, B. – Zhuang, X. (2008): Whole-Cell 3D STORM Reveals Interactions between Cellular Structures with Nanometer-Scale Resolution. *Nature Methods*. 5, 12, 1 December, 1047–1052. DOI:10.1038/nmeth.1274.
- Kellermayer Miklós S. Z. – Smith, S. B. – Granzier, H. L. – Bustamante, C. (1997): Folding-Unfolding Transitions in Single Titin Molecules Characterized with Laser Tweezers. *Science*. (New York, NY) 276, 5315, 16 May, 1112–1116.
- Kellermayer Miklós S. Z. (2005): Visualizing and Manipulating Individual Protein Molecules. *Physiological Measurement*. 26, 4, 1 August, R119–R153. DOI:10.1088/0967-3334/26/4/R02.
- Kellermayer Miklós S. Z. – Karsai Á. – Kengyel A. – Nagy A. – Bianco, P. – Huber T. – Kulcsár Á. – Niedetzky Cs. – Proksch, R. – Grama L. (2006): Spatially and Temporally Synchronized Atomic Force and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for Imaging and Manipulating Cells and Biomolecules. *Biophysical Journal*. 91, 7, 1 October, 2665–2677. DOI:10.1529/biophysj.106.085456.
- Lim, Chwee Teck – Bershadsky, A. – Sheetz, M. P. (2010): Mechanobiology. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 7 Suppl 3, 6 June, S291–S293. DOI:10.1098/rsif.2010.0150.focus
- Lippincott-Schwartz, Jennifer – Manley, Suliana (2009): Putting Super-Resolution Fluorescence Microscopy to Work. *Nature Methods*. 6, 1, 21–23. DOI:10.1038/nmeth.f.233.
- Rief, M. – Gautel, M. – Oesterhelt, F. – Fernandez, J. M. – Gaub, H. E. (1997): Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science*. (New York, NY) 276, 5315, 1109–1112.
- Tskhovrebova, L. – Trinick, J. – Sleep, J. A. – Simmons, R. M. (1997): Elasticity and Unfolding of Single Molecules of the Giant Muscle Protein Titin. *Nature*. 387, 6630, 15 May, 308–312. DOI:10.1038/387308a0.
- Wen, J. – Lancaster, L. – Hodges, C. – Zeri, A. – Yoshimura, S. – Noller, H. – Bustamante, C. – Tinoco, I. (2008): Following Translation by Single Ribosomes One Codon at a Time. *Nature*. 452, 7187, 9 March, 598–603. DOI:10.1038/nature06716.

