

M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar
Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék

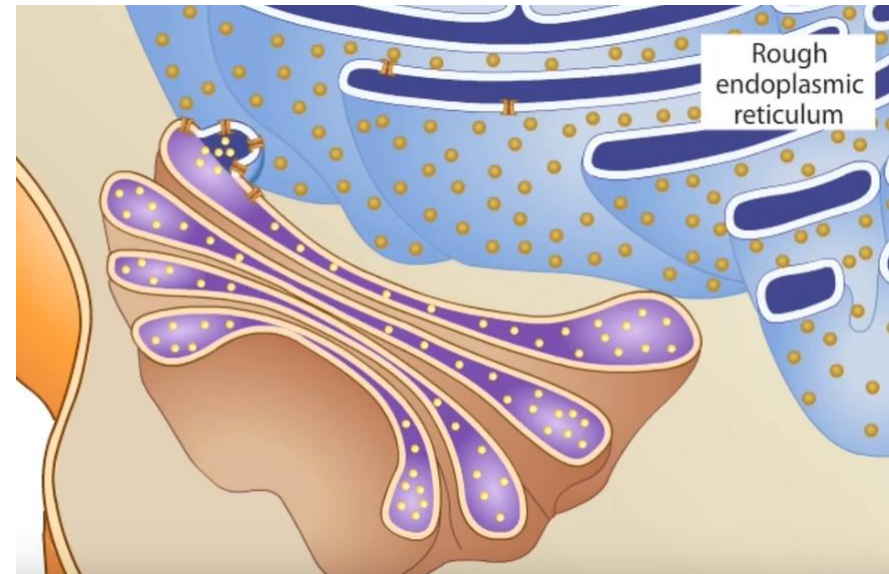
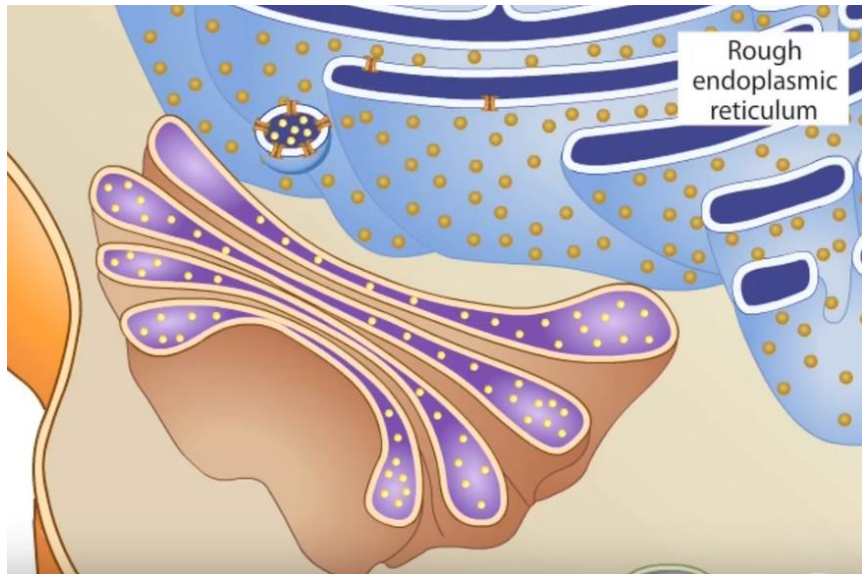
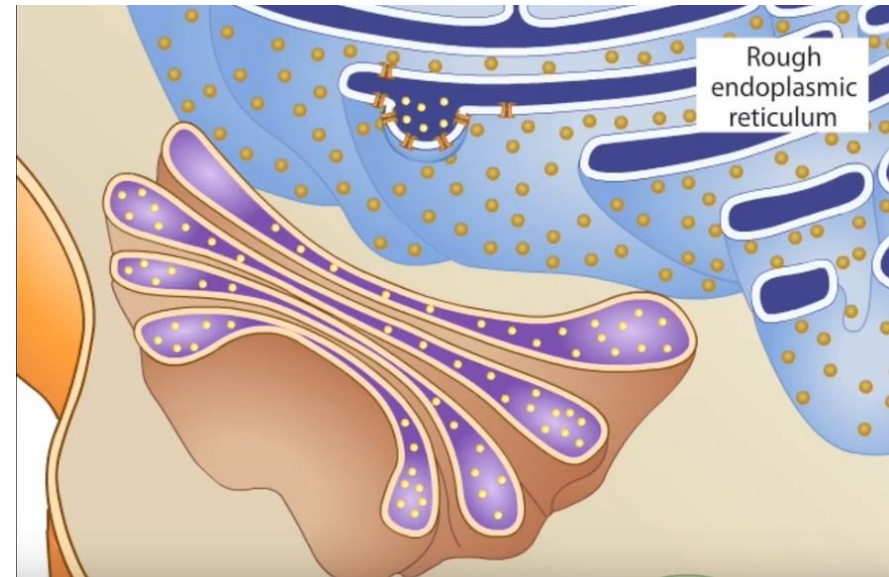
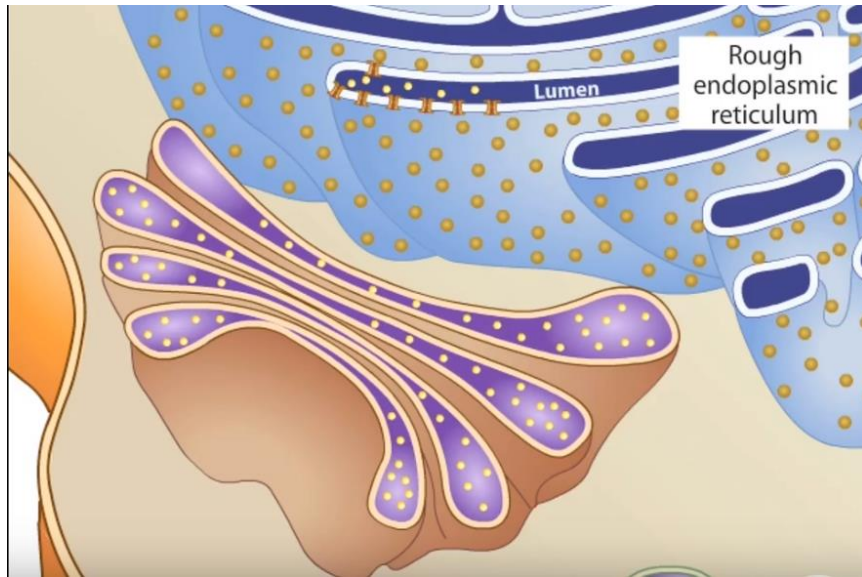
Biofizikai kémia

2. előadás

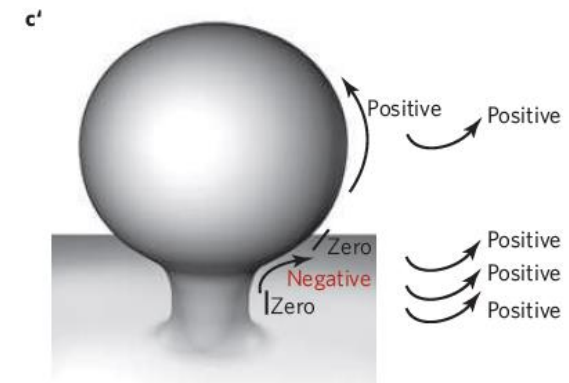
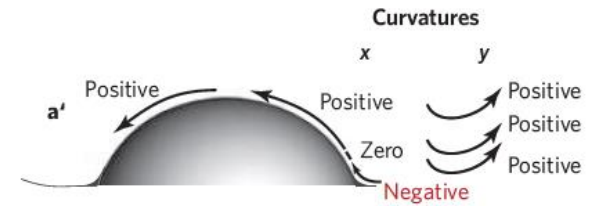
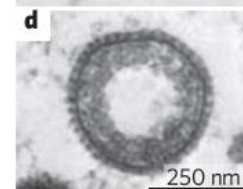
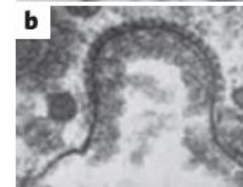
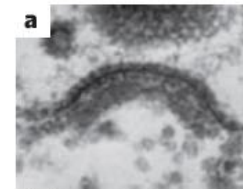
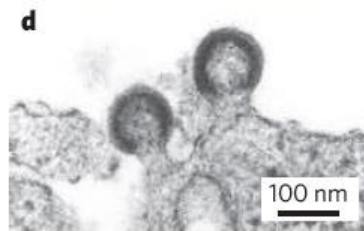
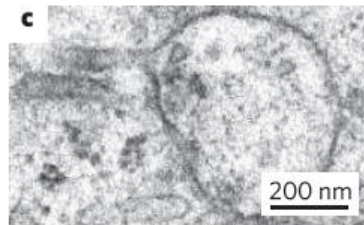
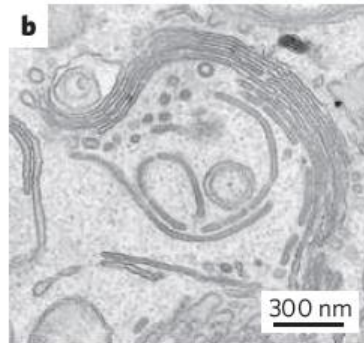
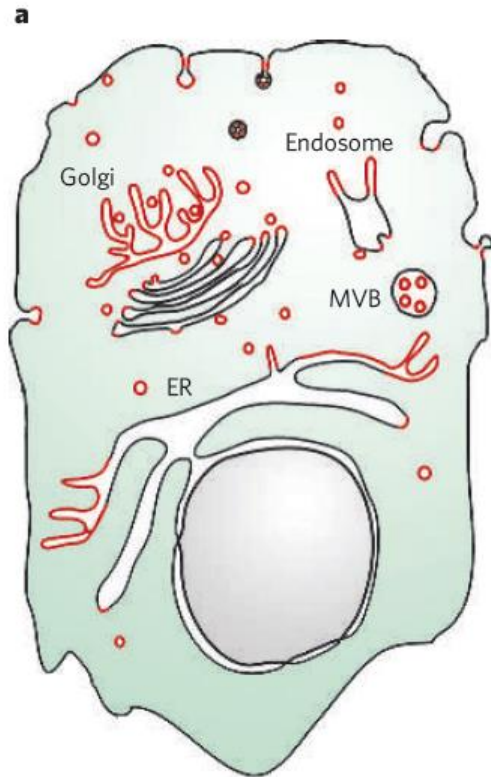
Gyarmati Benjámín

2019. október 11.

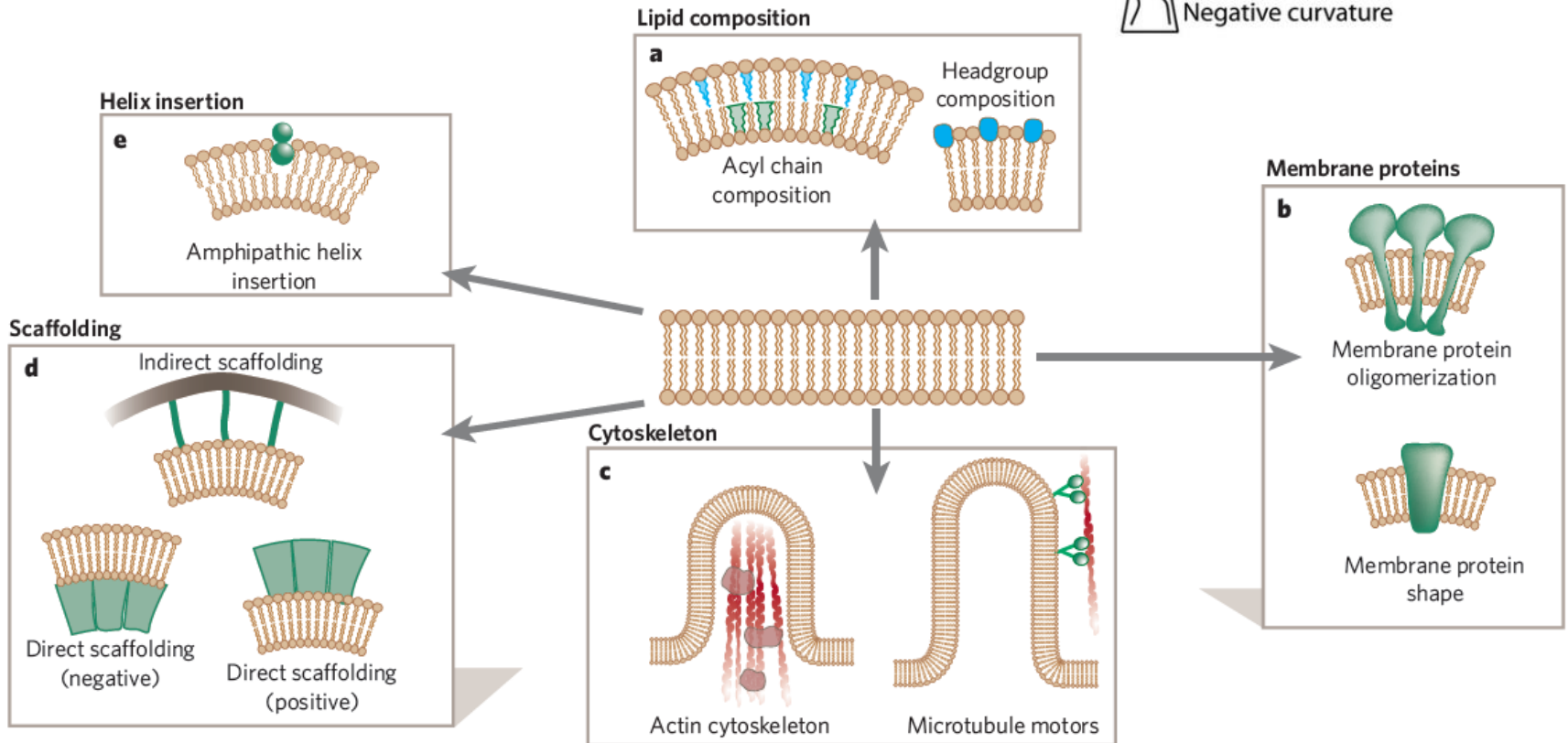
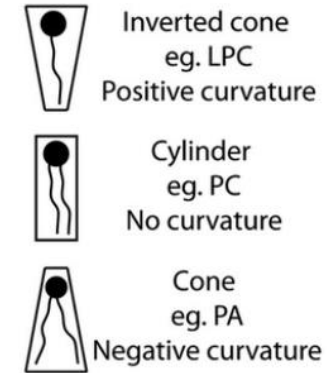
Emlékeztető: vezikuláris transzport



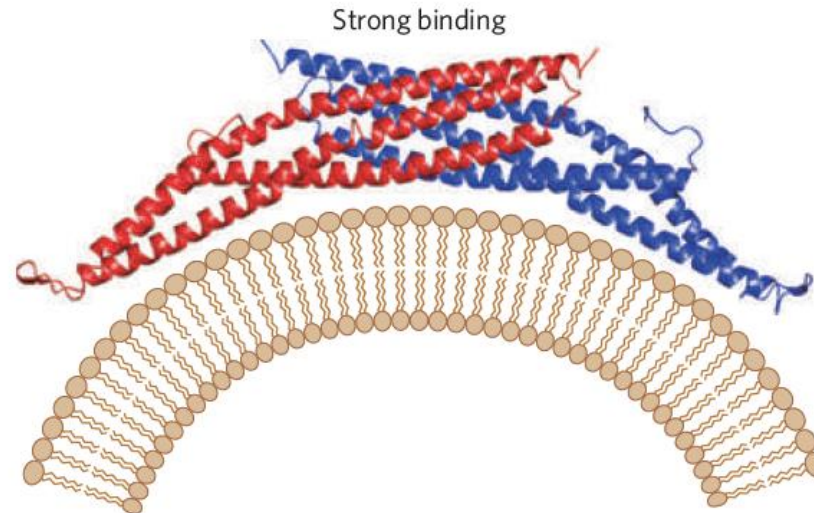
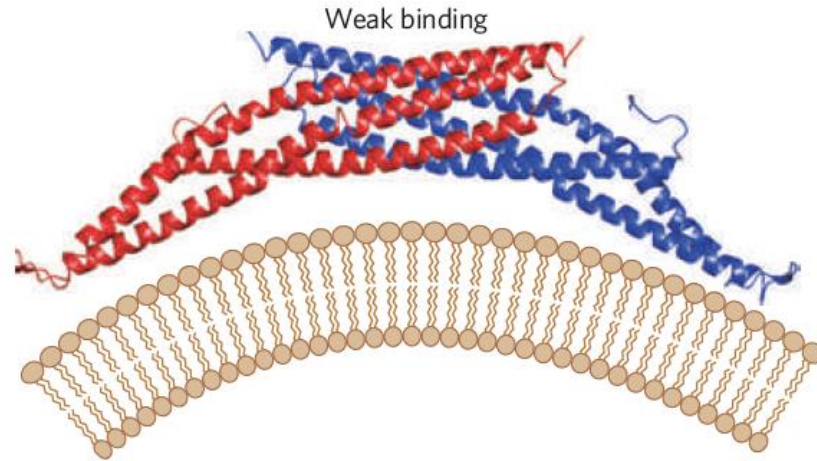
Membránok görbülete



A görbület kialakulásának mechanizmusai



BAR domént tartalmazó fehérjék I (Bin, Amphiphysin and Rvs)

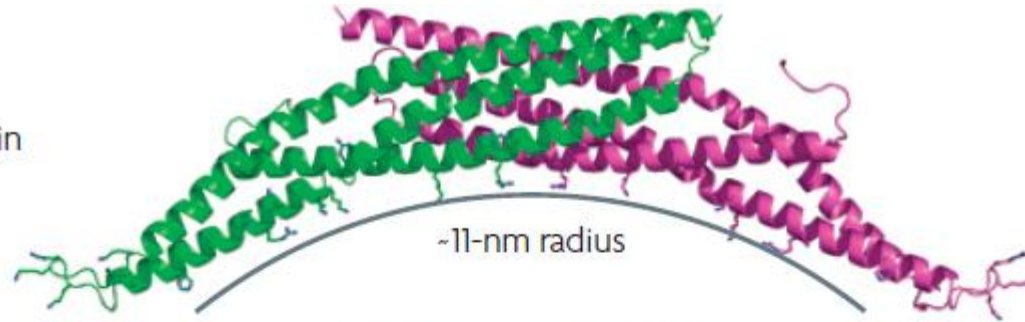


A kötődés erőssége függ a görbülettől (kölsönhatási pontok száma változik)

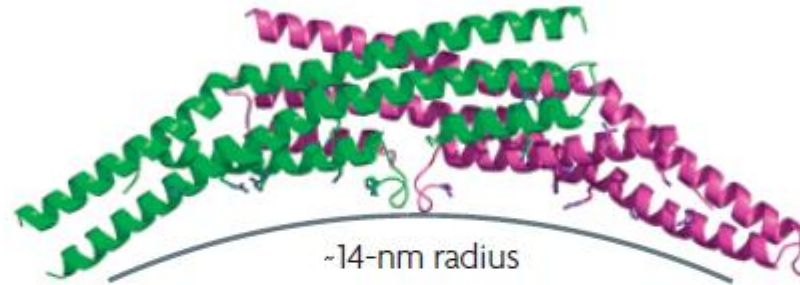
BAR domént tartalmazó fehérjék II

b

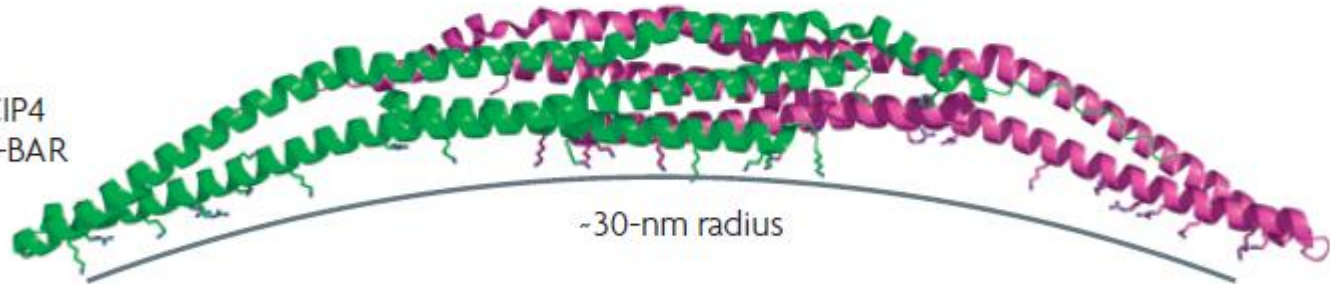
Amphiphysin
N-BAR



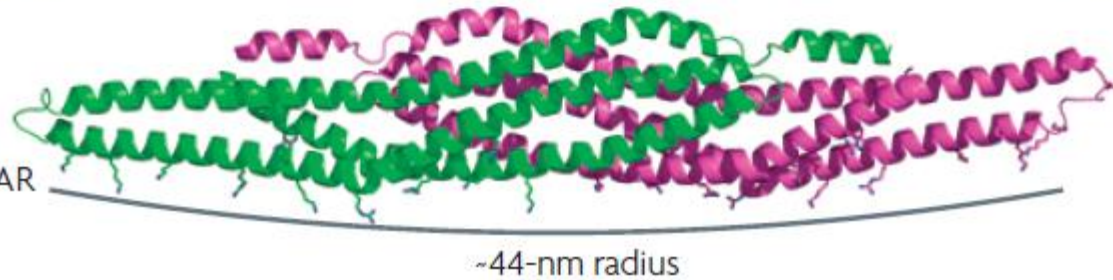
Endophilin-A1
N-BAR



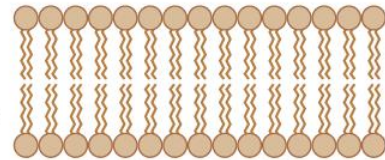
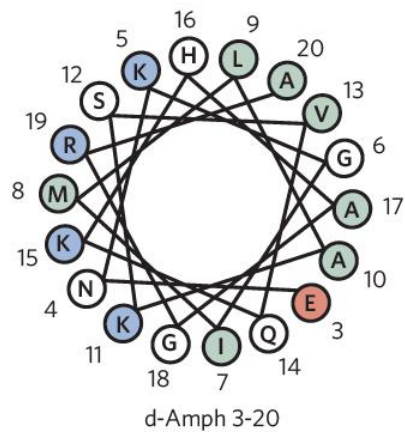
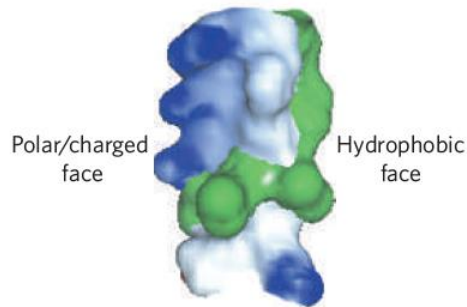
CIP4
F-BAR



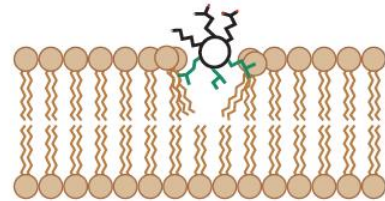
IRSp53
IMD/I-BAR



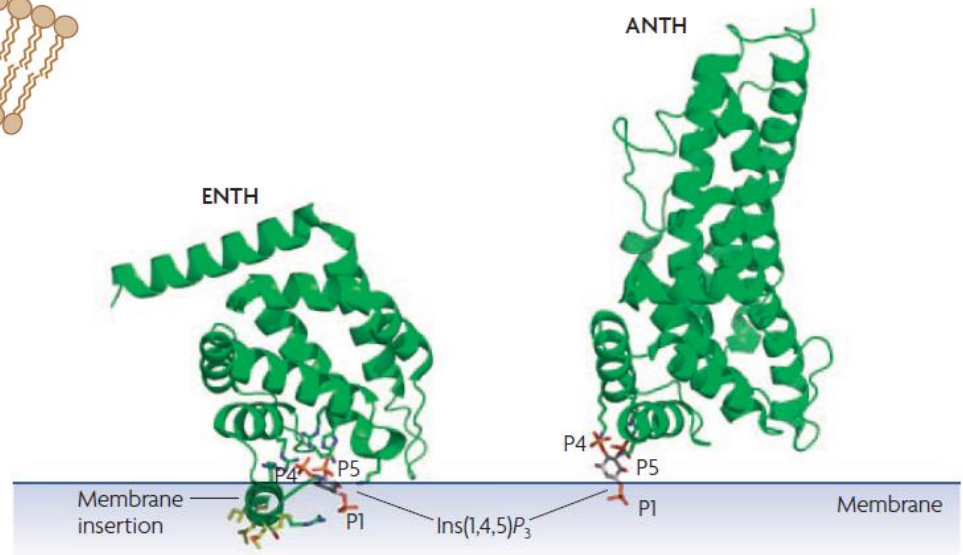
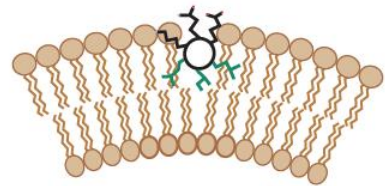
Amfipatikus hélixek membránba ágyazódása



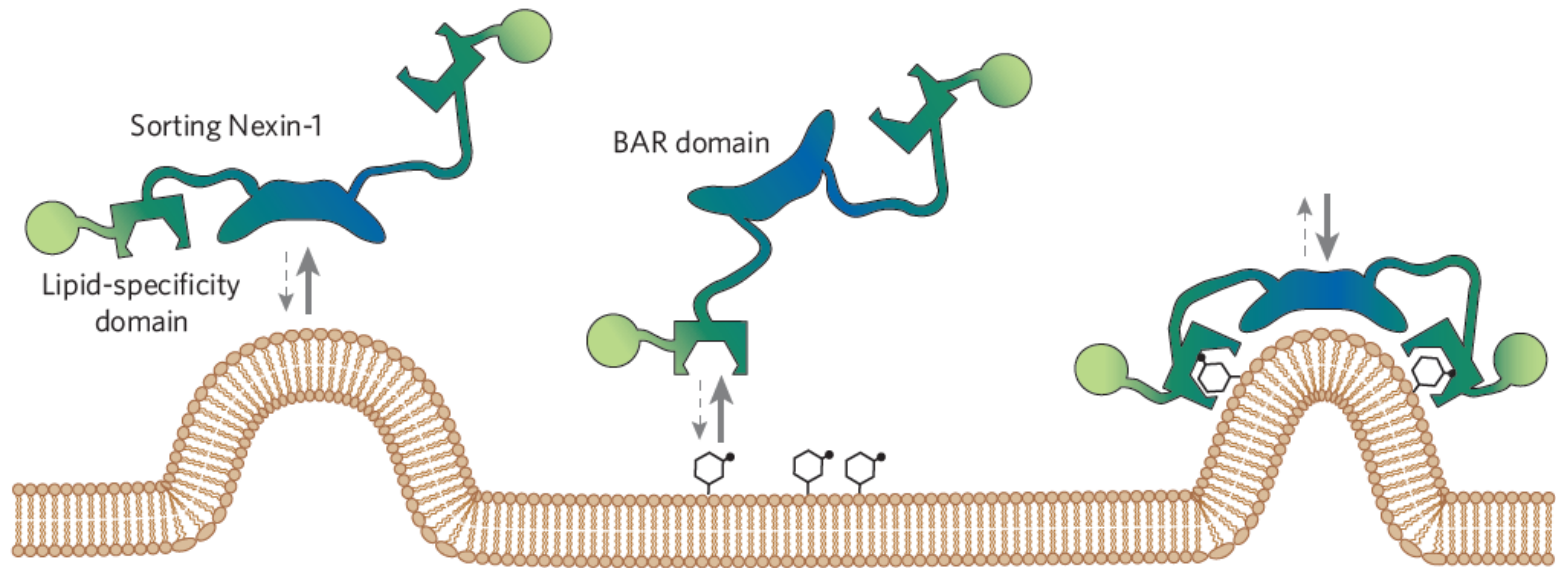
Initial stage of amphipathic helix folding and insertion



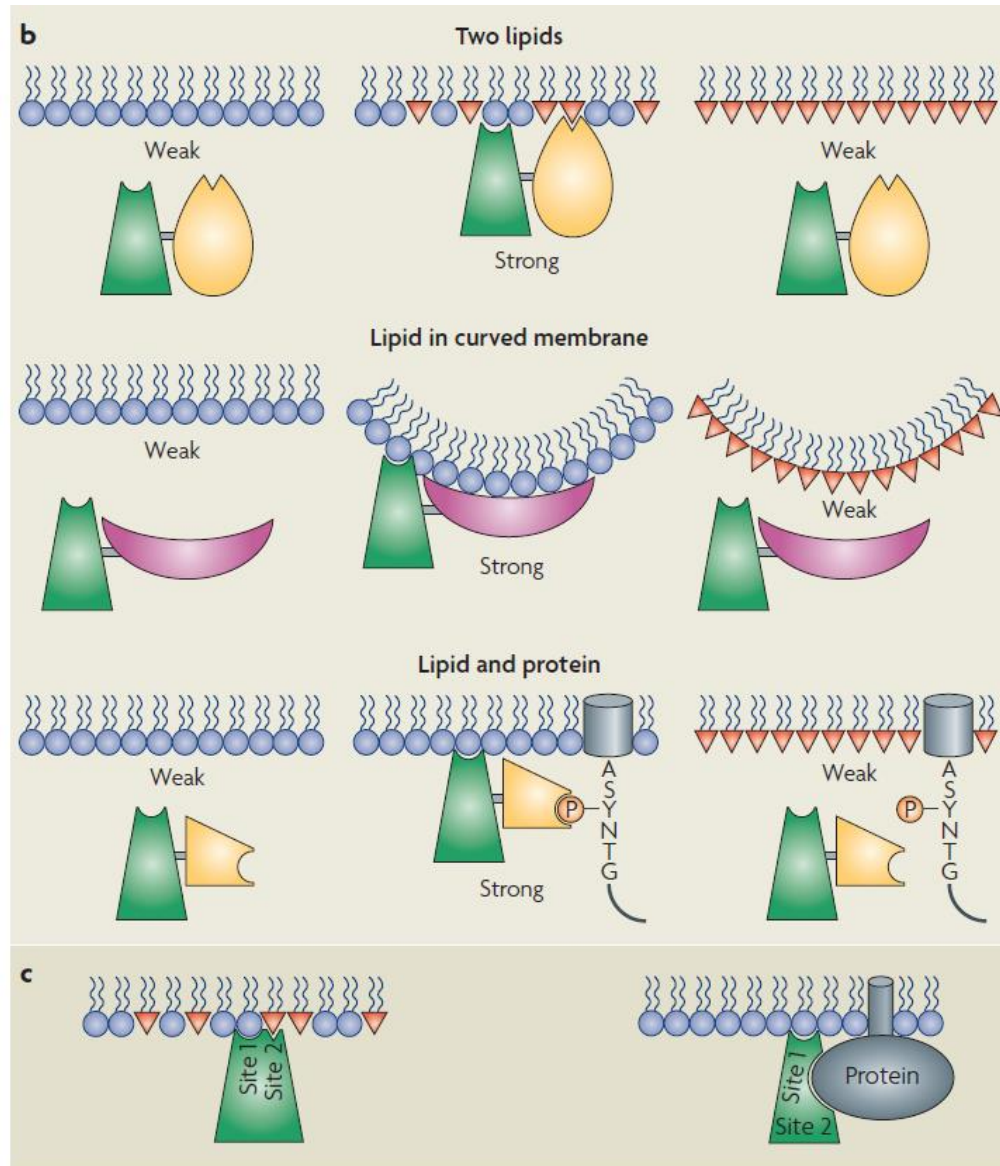
Membrane curvature response



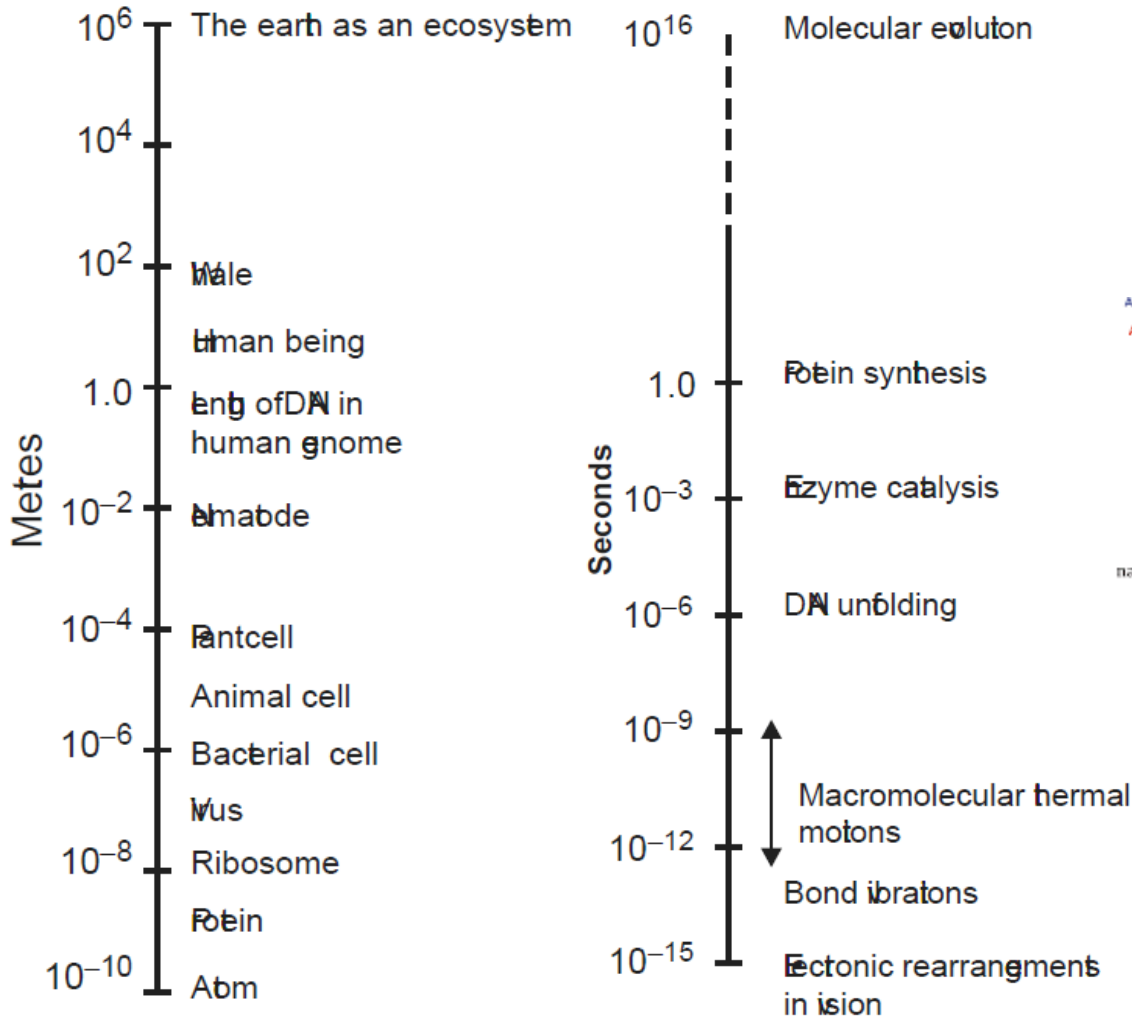
Membrán összetétel és görbület együttes érzékelése („coincidence detection“)



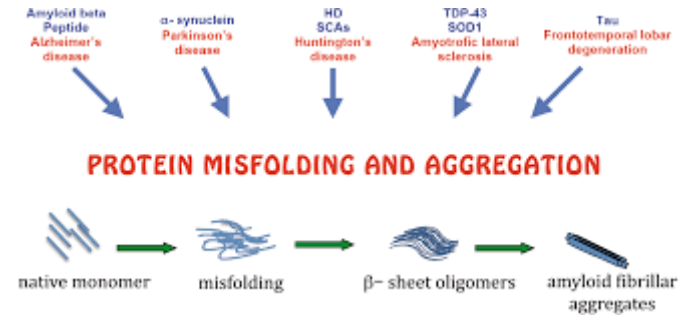
Membránfelismerés



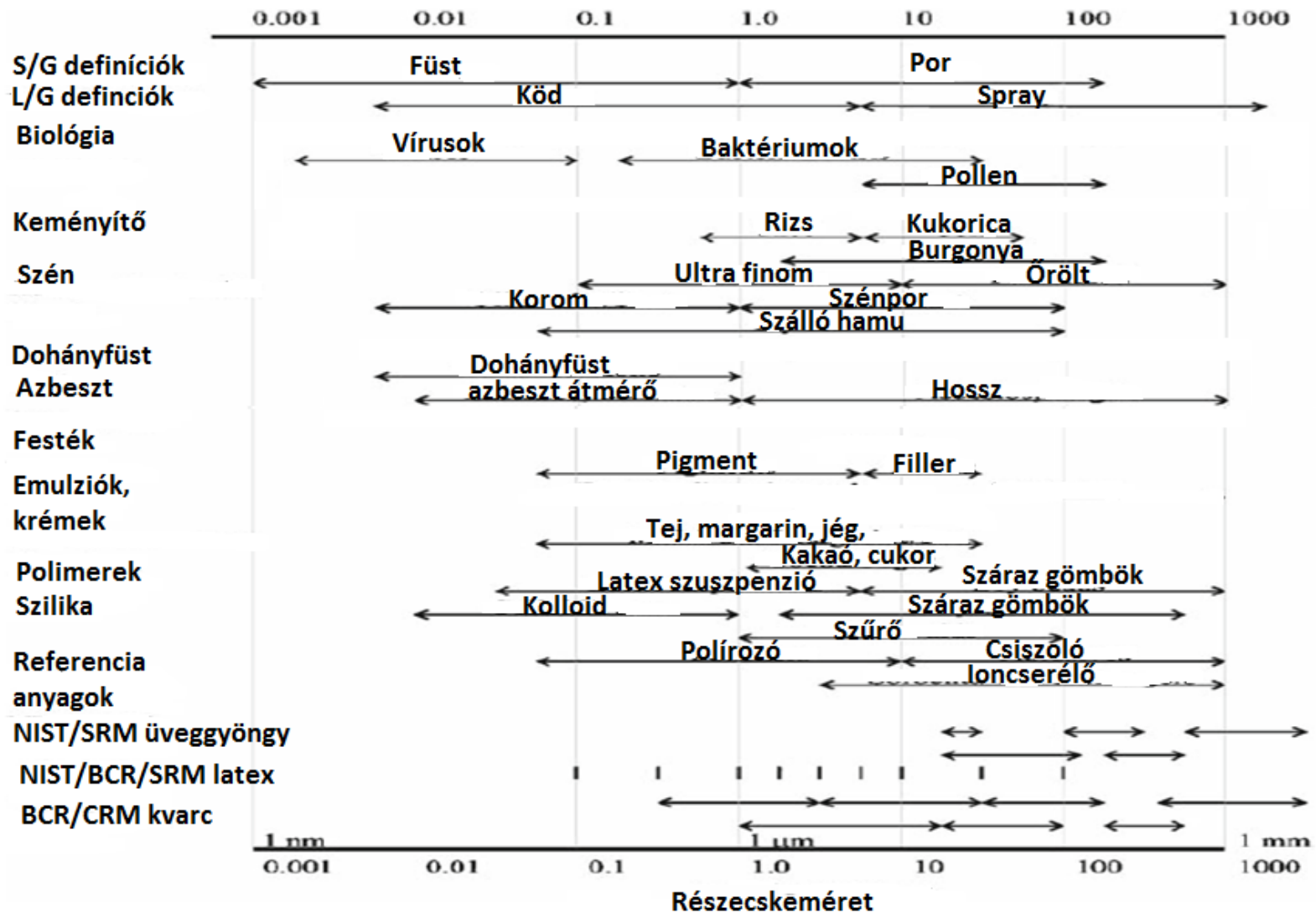
Biológiai méret- és időskálák



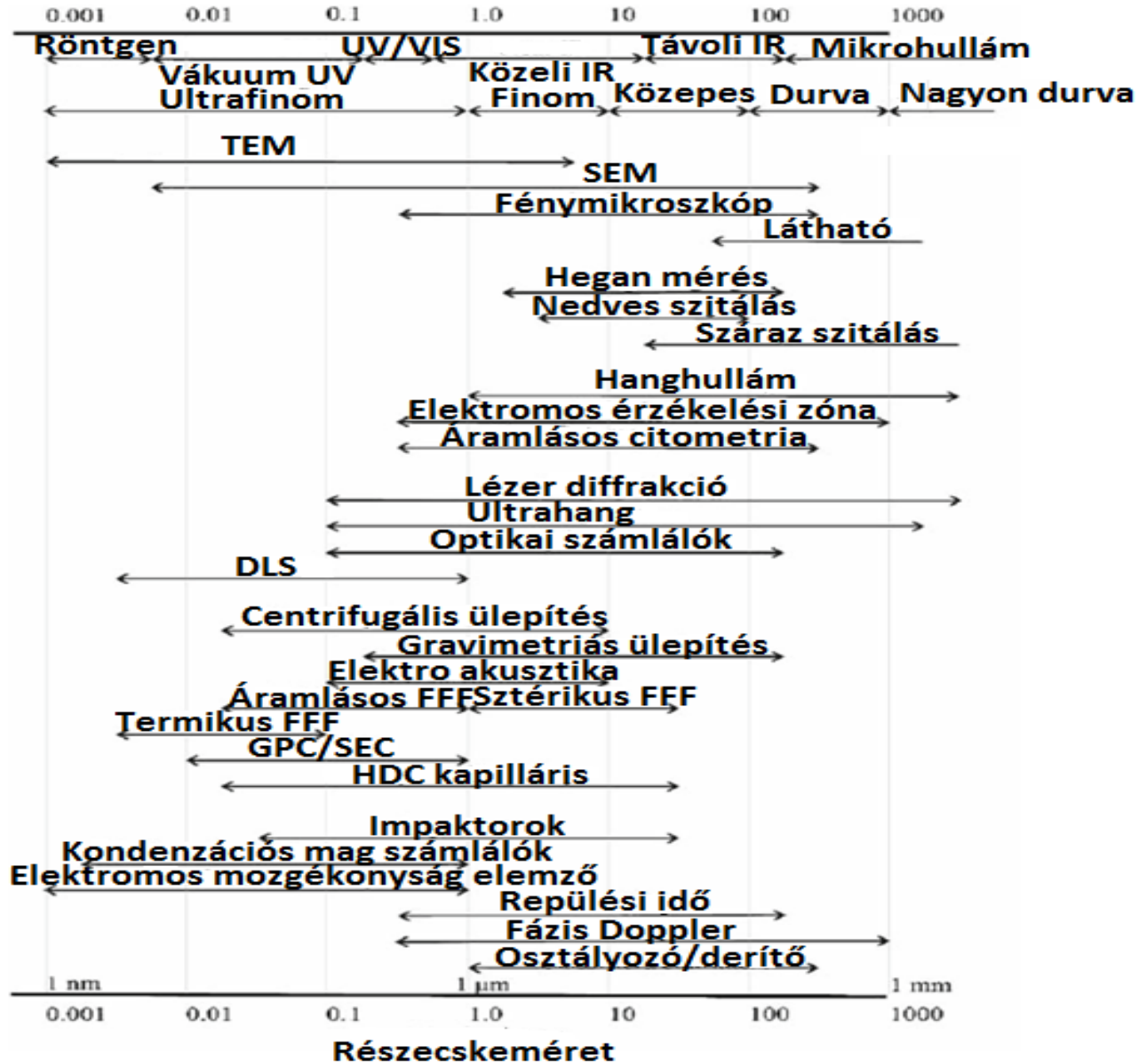
Alzheimer: hibás fehérjekonformáció (évek alatt)



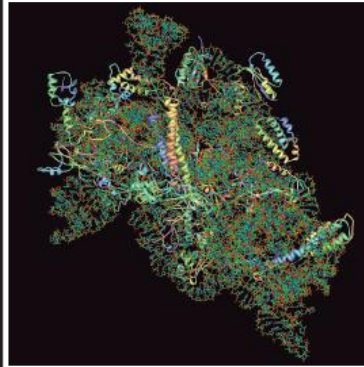
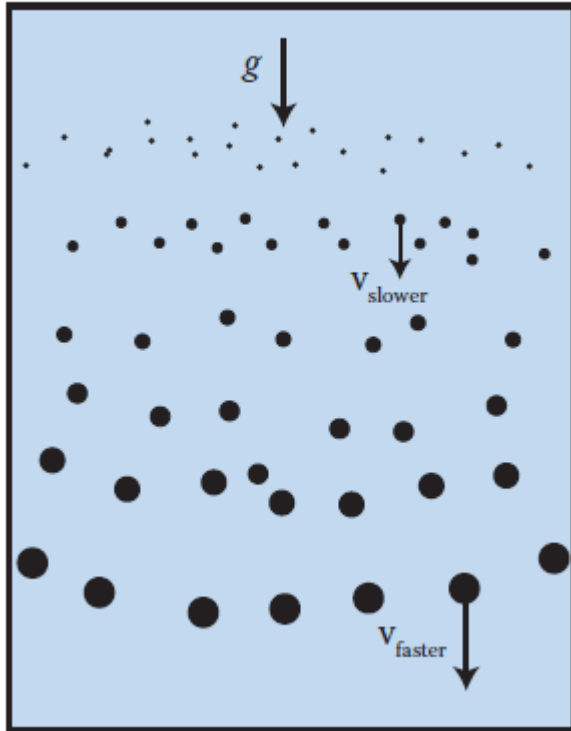
Részecskés rendszerek mérettartományai



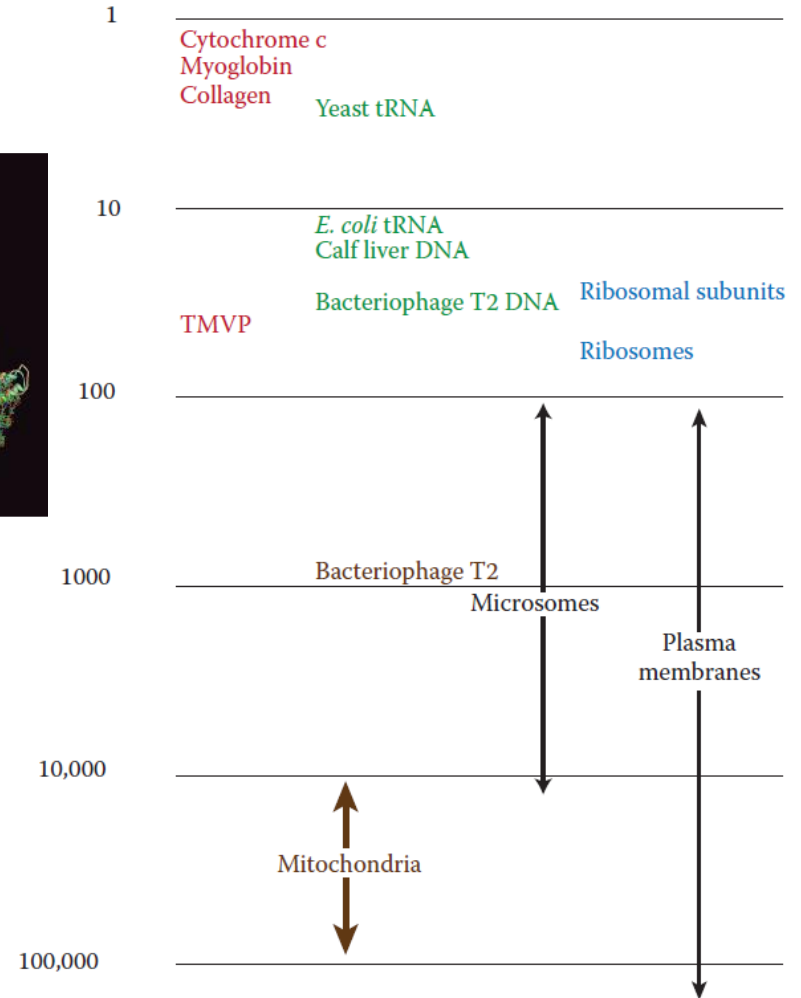
Méretmeghatározási módszerek



Méretmeghatározási módszerek - centrifuga



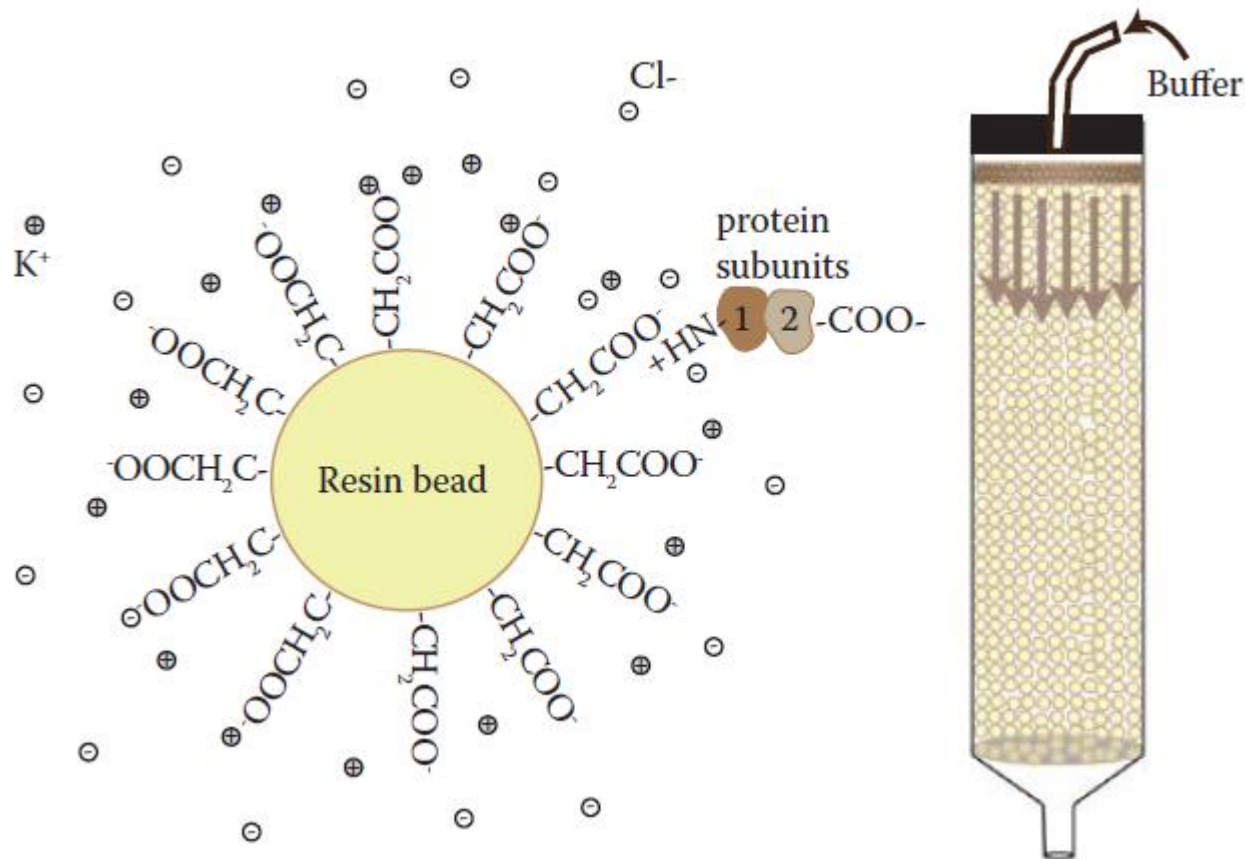
Svedbergs



$$v = s \cdot \frac{F_{\text{applied}}}{m} = s \cdot \omega^2 r$$

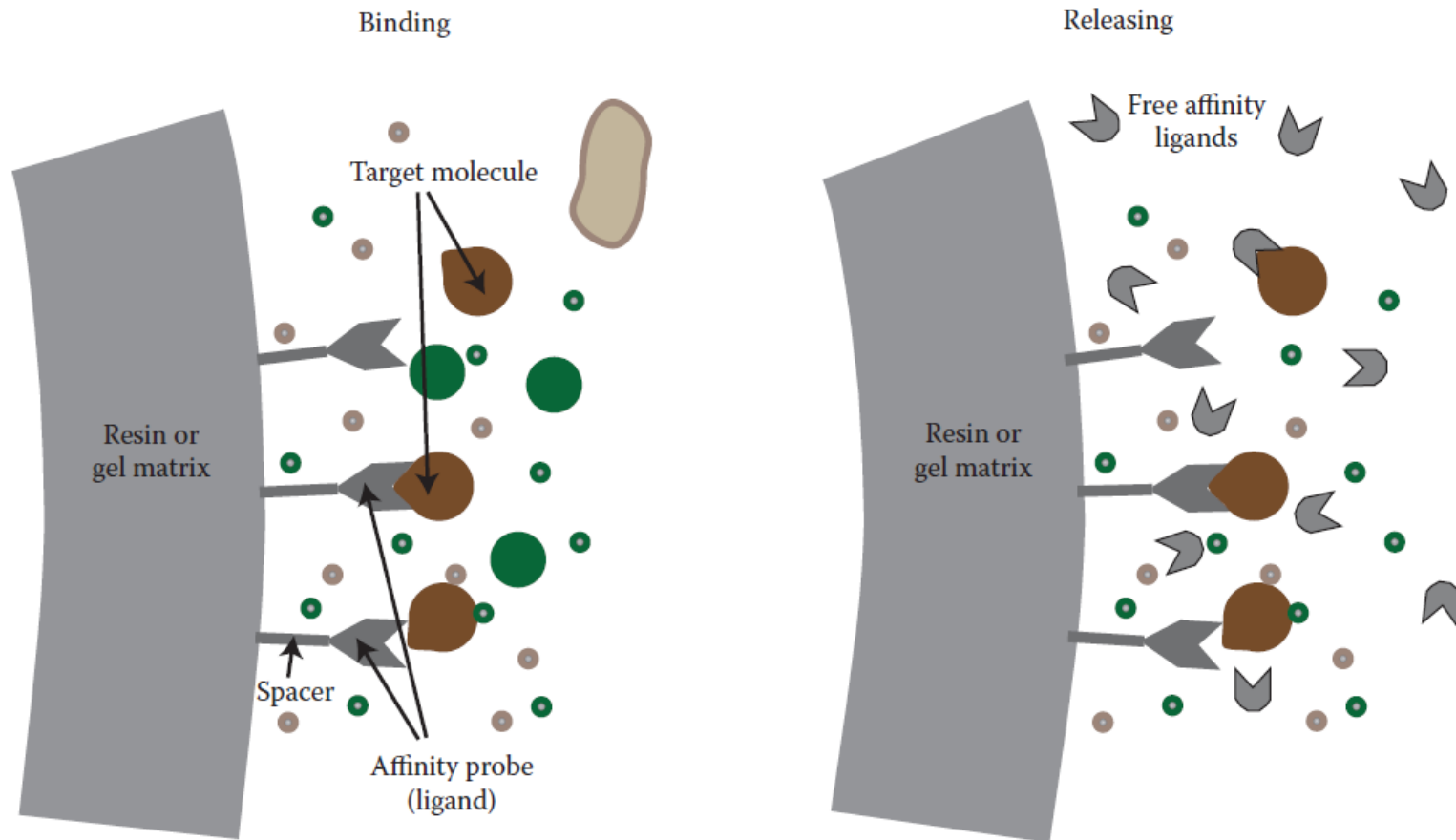
s: szedimentációs együttható (s vagy 10^{-13} s, svedberg)

Méretmeghatározási módszerek - ionkromatográfia



Ioncserés kromatográfia: fehérjék elválasztása, kölcsönhatások szabályozása pH-val, ionerősséggel – többféle komponens elválasztására

Méretmeghatározási módszerek – affin kromatográfia



Specifikus kölcsönhatáson alapszik, cél általában egy adott komponens (pl. fehérje elválasztása)

Méretmeghatározási módszerek – affín kromatográfia

Tipikus ligandumok

TABLE 6.1 Affinity Chromatography Probe Ligands

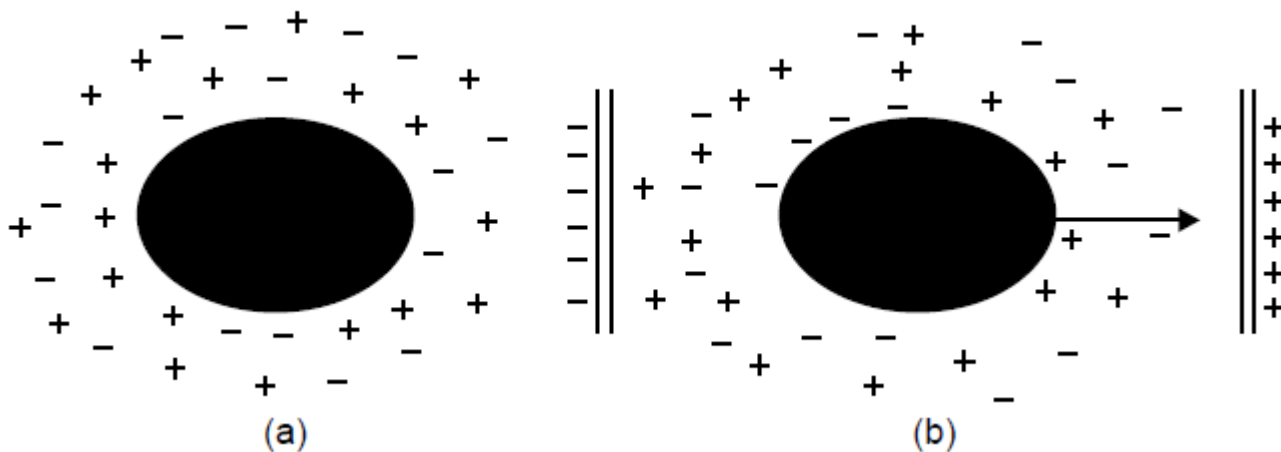
Probe Ligand	Target Molecule
Lectin proteins (e.g., concanavalin A)	Specific carbohydrate (sugar) molecules
Sugar	Lectin proteins
Metal ions (cobalt, nickel, copper, zinc, iron)	Proteins with exterior His amino acids
Amino acids	Any molecule (protein, RNA) that binds the amino acid
Avidin (a protein)	Any molecule with biotin (a protein) attached
Nucleic acid (ss)	Complementary strand, DNA-binding proteins
Any enzyme	The enzyme's substrate, cofactor molecules
Heparin (anticoagulant)	Coagulation factors

$$K_D = \frac{[L][T]}{[LT]} \cong 10^{-4} \text{ M to } 10^{-14} \text{ M}$$

Az eltávolításhoz legalább 0,1 M-ra kell növelni a disszociációs egyensúlyi állandót (ha nem sikerül, akkor is eltávolítható a célmolekula, idő és oldószer kérdése...)

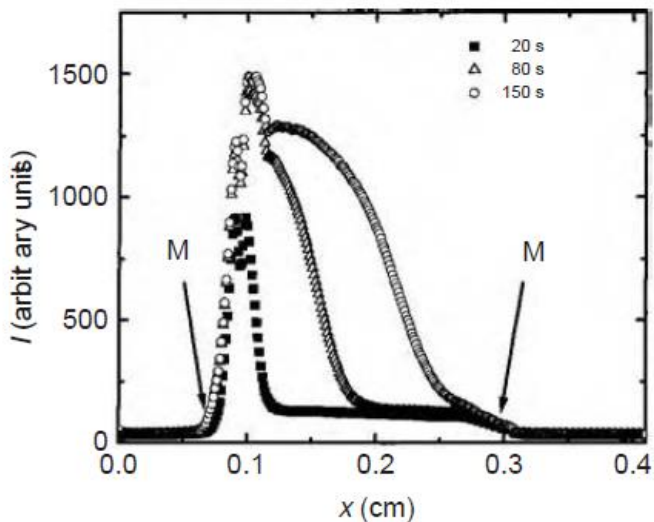
Kompetitív kötődés (szabad hisztamin hozzáadás)

Méretmeghatározási módszerek – elektroforézis I



Töltéssel rendelkező részecske elektromos tér nélkül (a) és elektromos térben (b)

Az elektroforetikus sebességet a részecske töltéssűrűsége, a tér és a súrlódási együttható (viszkozitás) határozza meg, gömb alakú részecskékre (Stokes):



$$u = QE/f$$

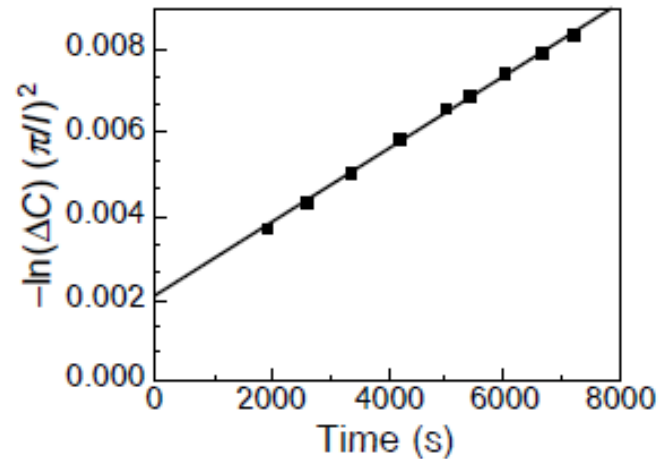
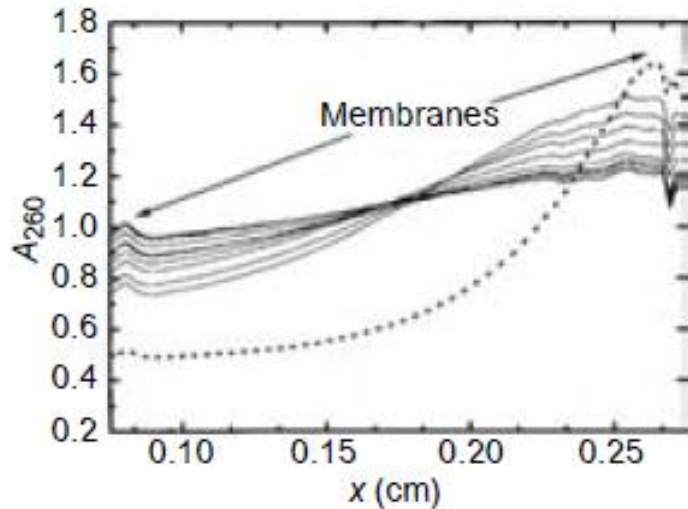
$$\mu = Ze/6\pi\eta_0 R_0$$

DNS molekula töltéssűrűségét is meg lehet határozni elektroforetikus mobilitás méréssel

Méretmeghatározási módszerek – elektroforézis

II

Steady-state elektroforézis: szemipermeabilis membránon keresztül végzett elektroforézis, a koncentrációgradiens hatására anyagáram indul, mely stacionáris állapotot eredményez

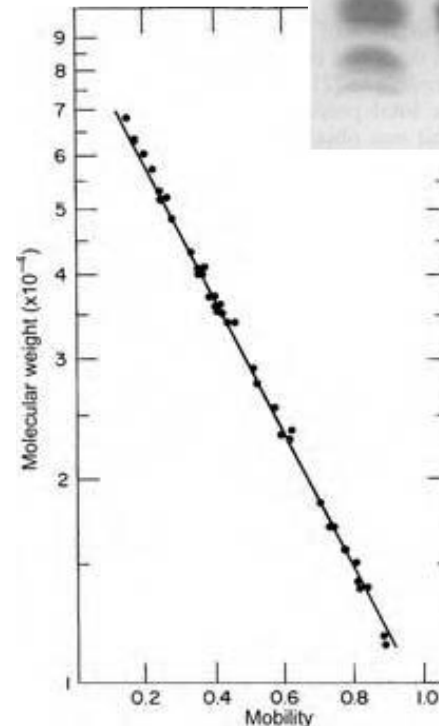
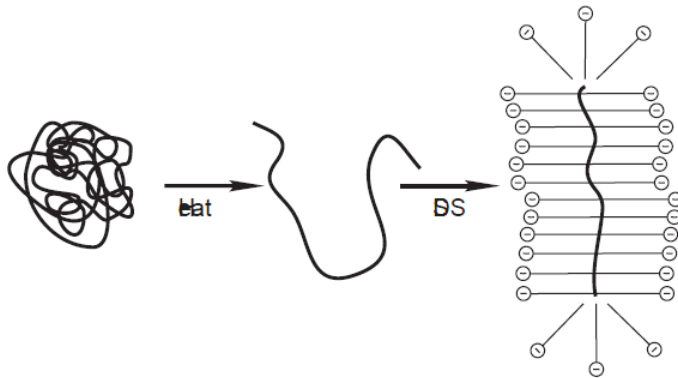
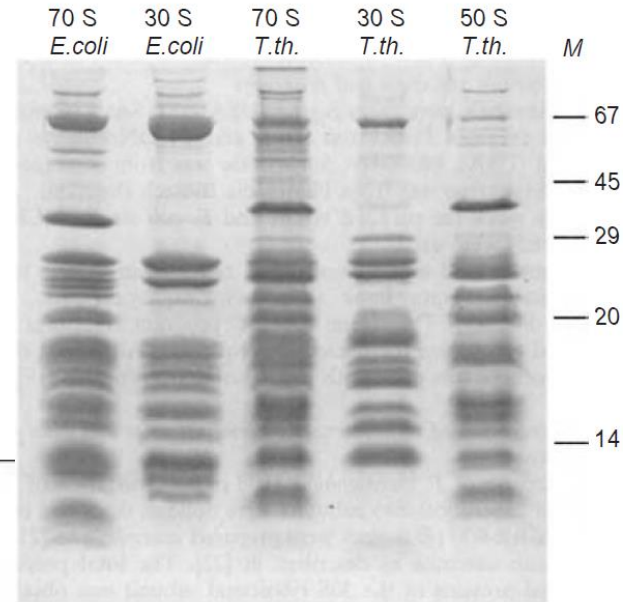


A gradiensből a DNS-molekula töltéssűrűsége becsülhető

Méretmeghatározási módszerek – SDS gélelektroforézis II

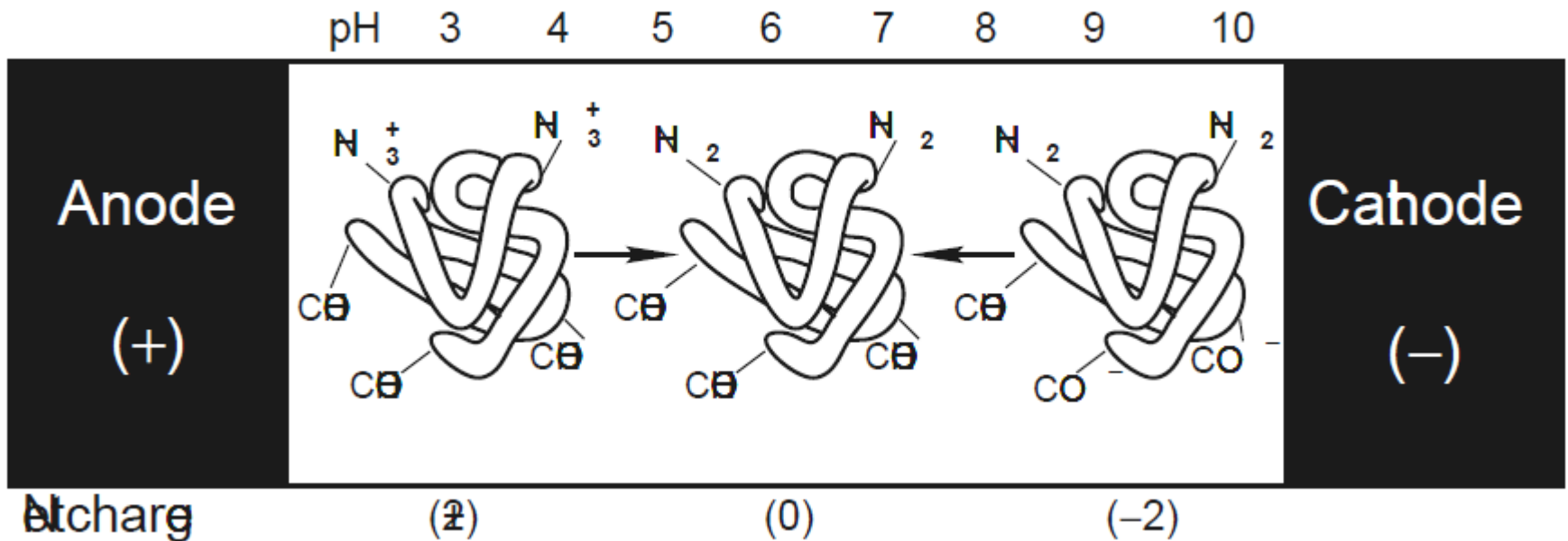
Másodlagos, harmadlagos, negyedleges szerkezetet SDS-sel (nátrium-dodecil szulfát) lebontják, a diszulfidhidakat redukálószerrel (merkaptoetanol) hasítják

A mérés során ténylegesen a molekulatömeg szerint történik az elválasztás (PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis)



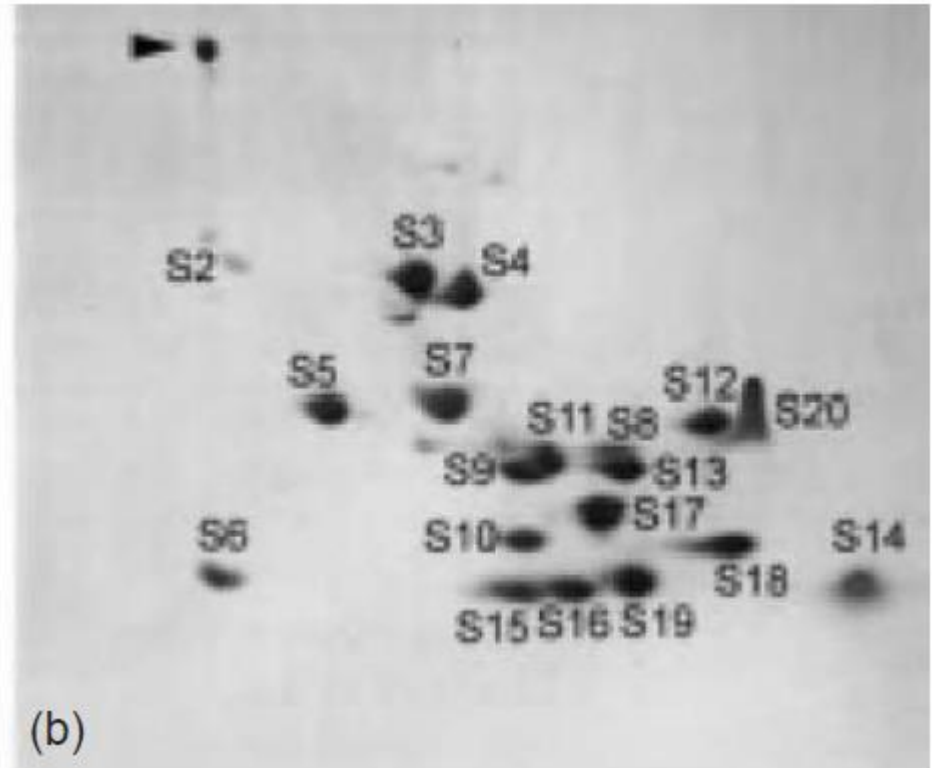
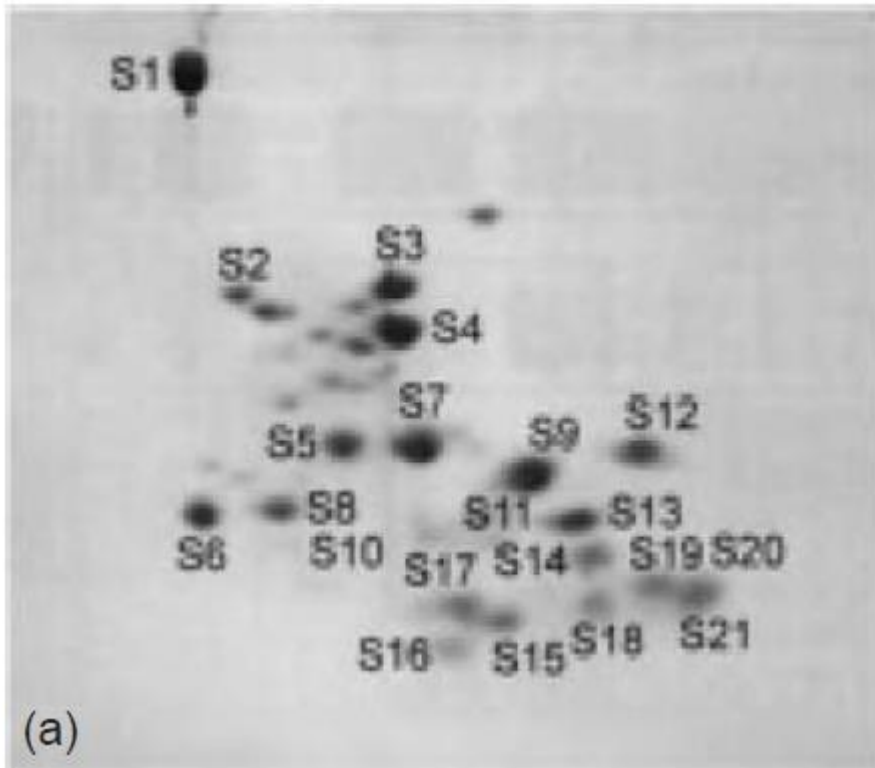
Méretmeghatározási módszerek – IEF (izoelektromos fókuszálás)

Precízen beállított pH-gradiensben bocsátják át a fehérjét, a nettó pozitív és nettó negatív töltés között egy pH értéken semlegesé válik, ekkor mobilitása 0

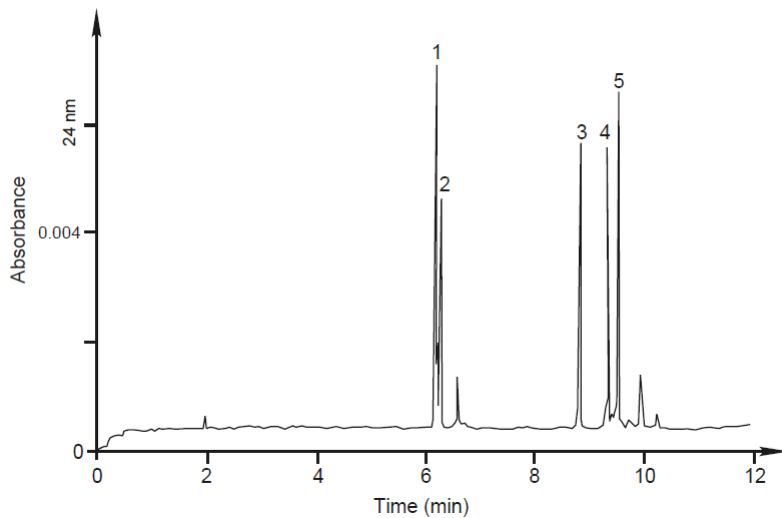
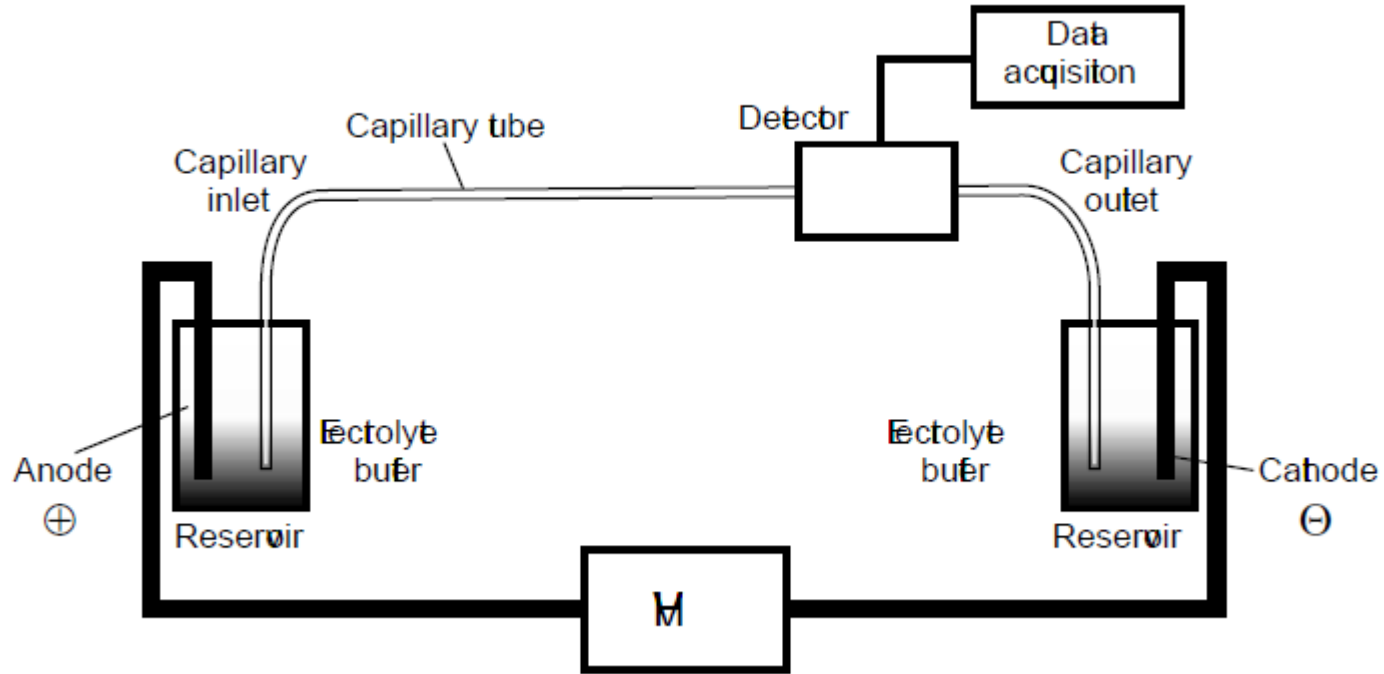


Kétdimenziós elektroforézis

SDS PAGE segítségével méret szerinti, IEF segítségével töltés pI szerinti elválasztás (egymásra merőleges irányokban)

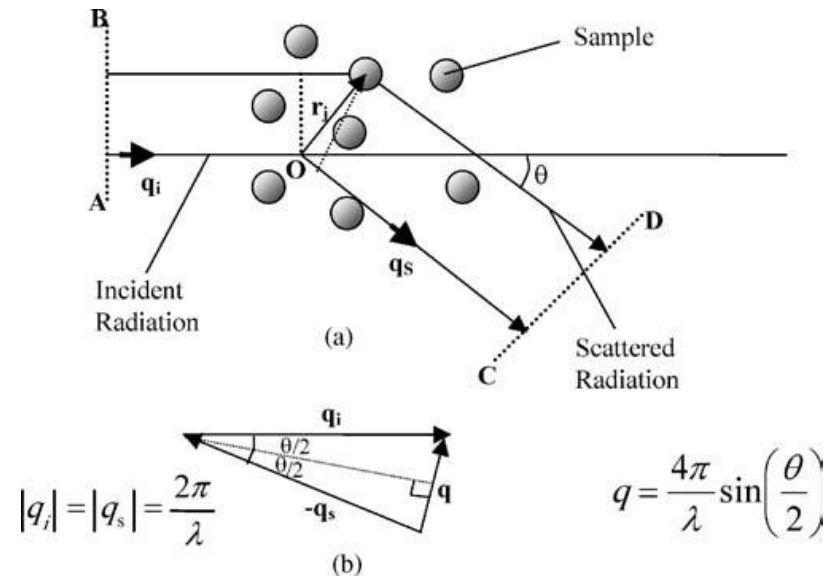


Kapilláris elektroforézis



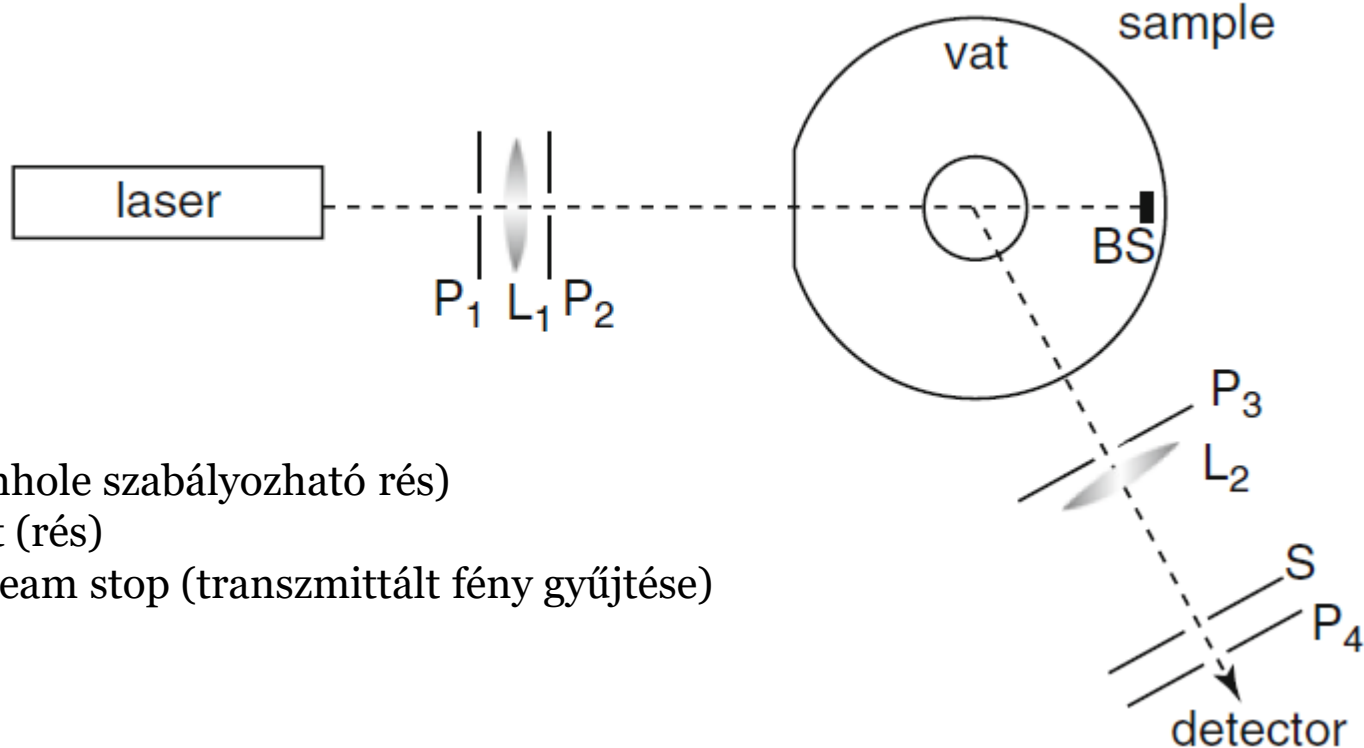
Gyorsabb, egyszerűbb mérés

Szórási technikák



Mérési módszer	Tipikus hullámhossz (nm)	Valós felbontás (nm)	Kontraszt
Kisszögű röntgenszórás (SAXS)	0,15	1-700	Elektronsűrűség
Kisszögű neutronszerzés (SANS)	0,4	1-200	Neutronszerzés-hossz-sűrűség
Fényszórás	450	50-2000	Törésmutató
Nagyszögű röntgenszerzés (WAXS)	0,15	0,1-1	Elektronsűrűség
Nagyszögű neutronszerzés (WANS)	0,4	0,1-1	Neutronszerzés-hossz-sűrűség
Elektronszerzés	0,0037	1-1000	Elektronsűrűség

Fényszórás



P: pinhole szabályozható rés)

S: slit (rés)

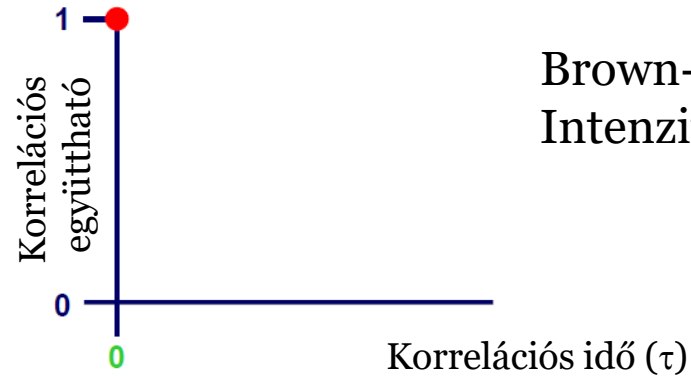
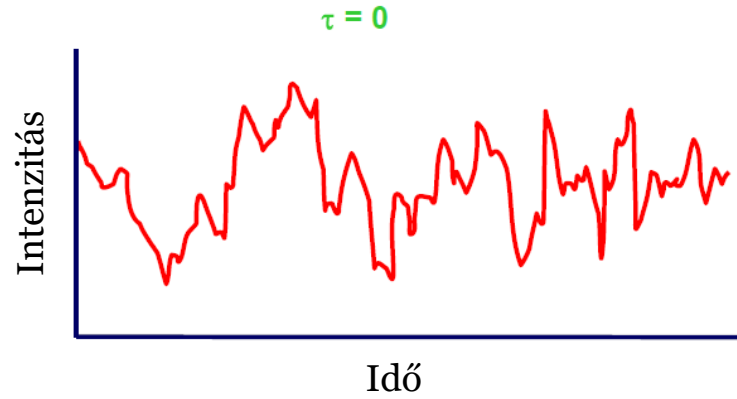
BS: beam stop (transzmittált fény gyűjtése)

- A fény és az anyag (elektronfelhő) kölcsönhatásán alapul
- Feltétele az elektronfelhő polarizálhatósága, arányos a dn/dc (törésmutató koncentrációfüggése) hányadossal

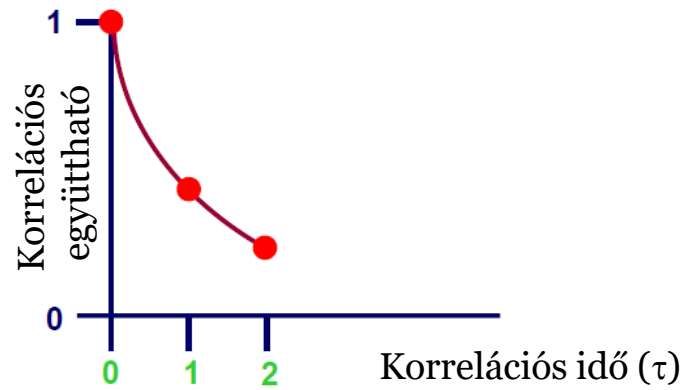
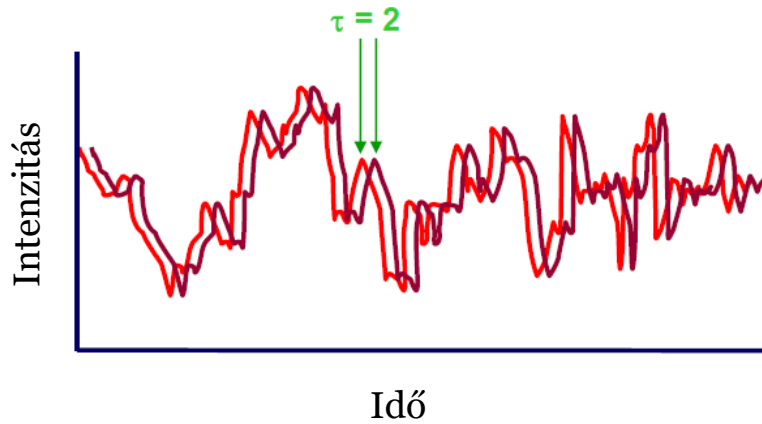
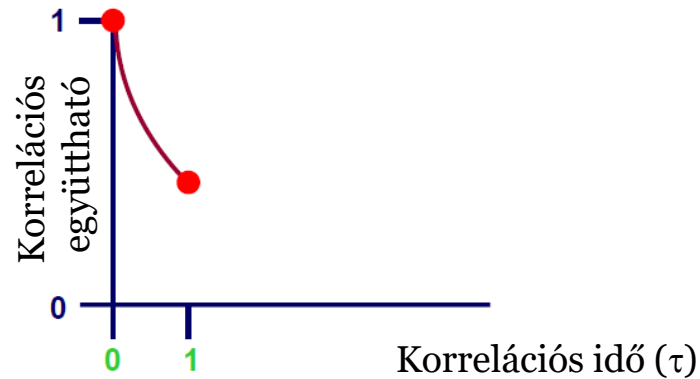
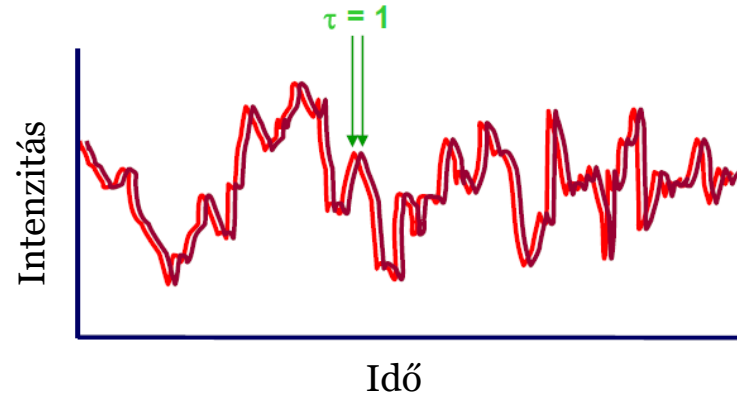
A mintával szemben támasztott alapkövetelmények:

- Az oldószer és anyag törésmutatója különböző legyen
- A minta elnyelése a lézer hullámhosszán kicsi legyen

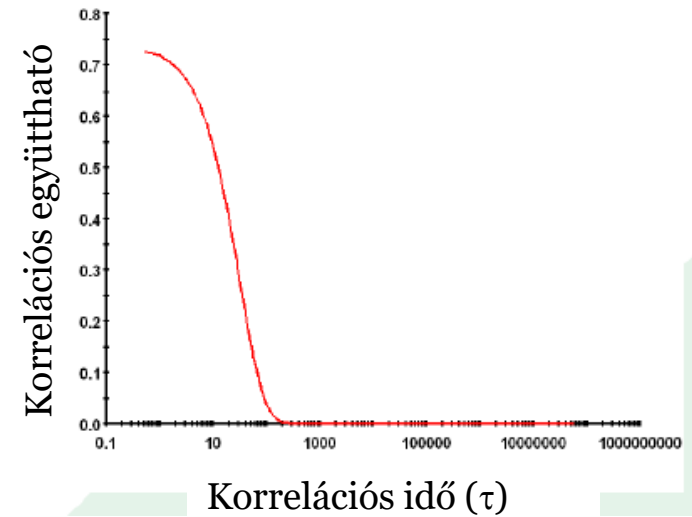
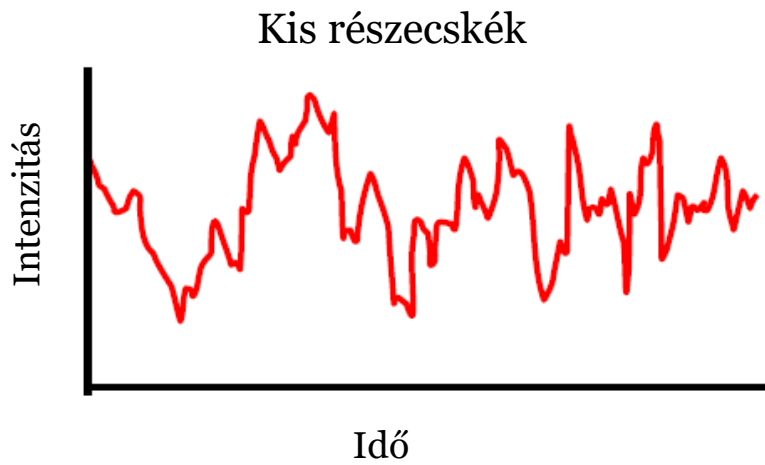
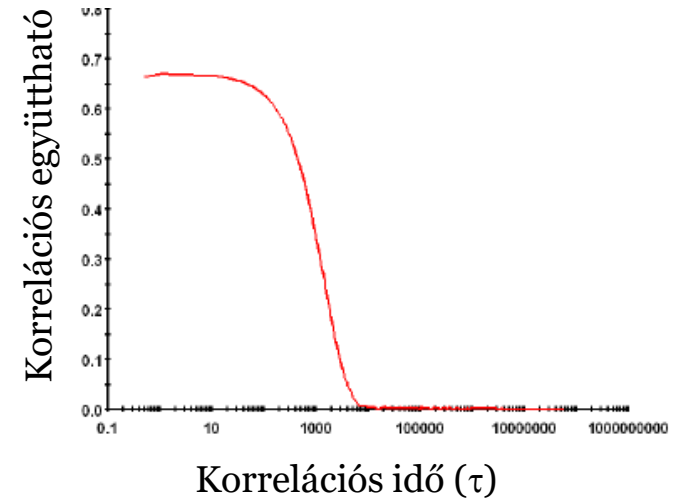
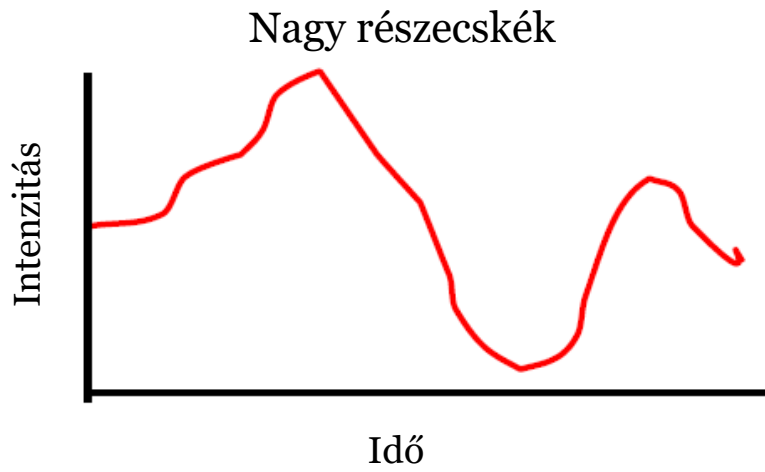
A dinamikus fényszórás elvi alapjai I



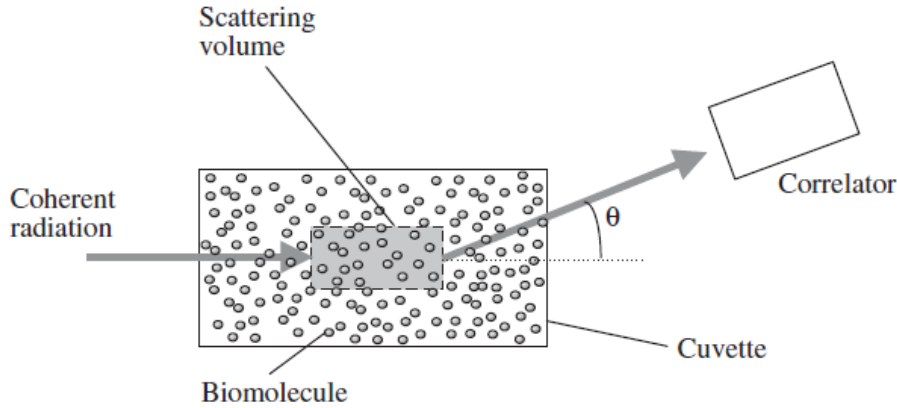
Brown-mozgás
Intenzitás fluktuáció



A dinamikus fényszórás elvi alapjai II

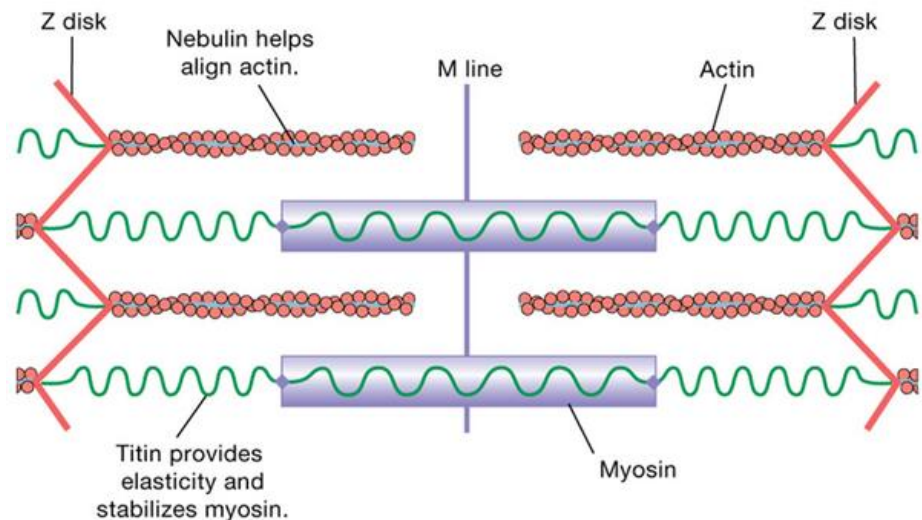
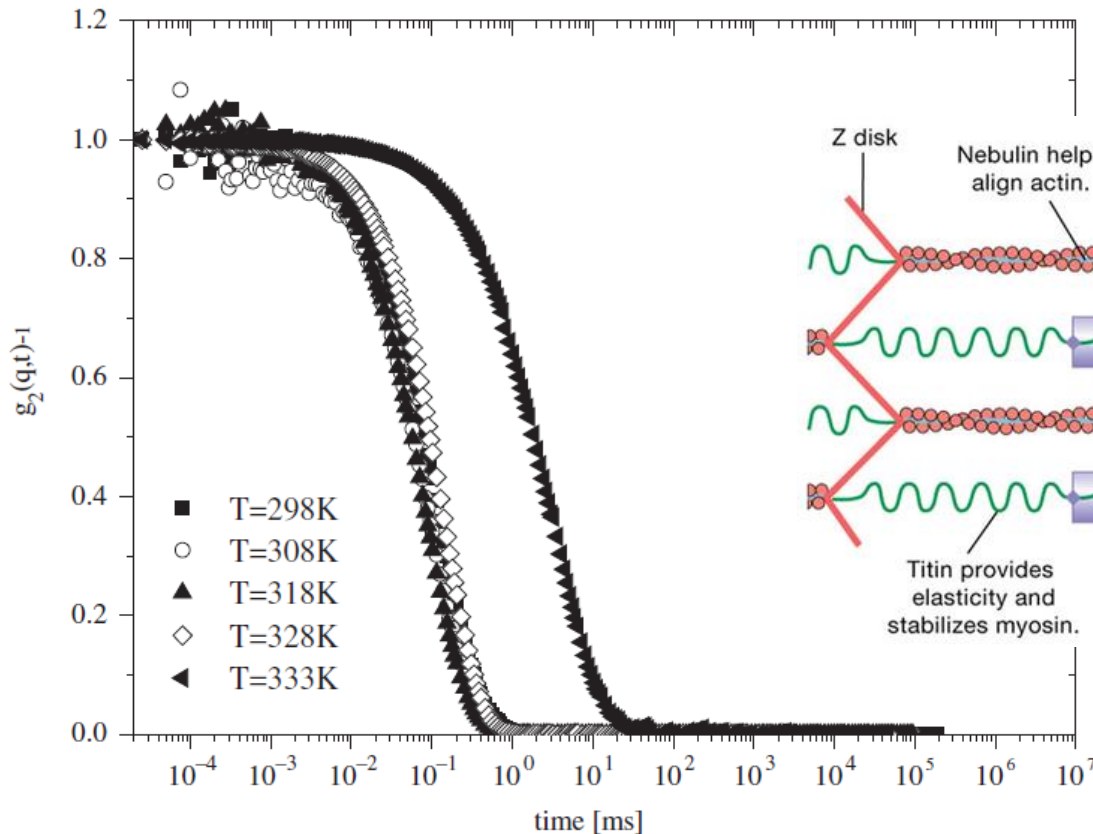
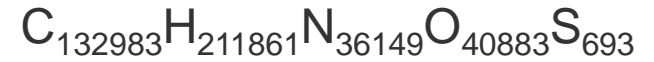


Kvázi-elasztikus fényszórás

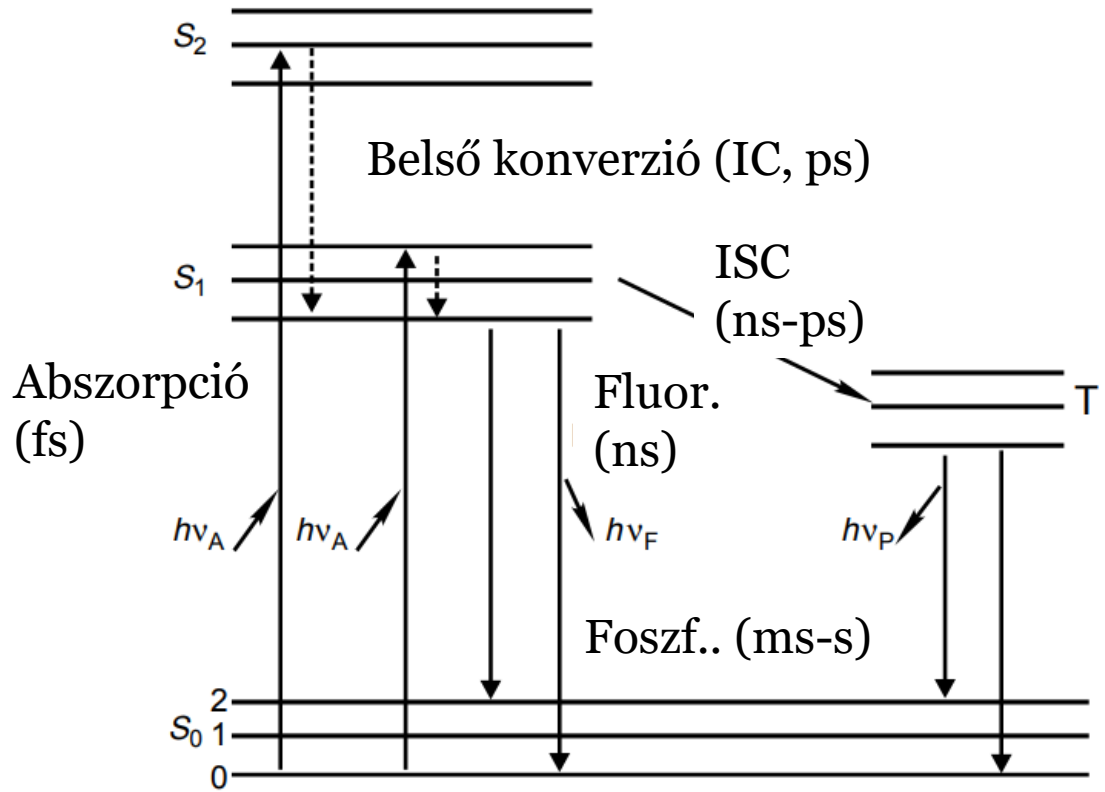
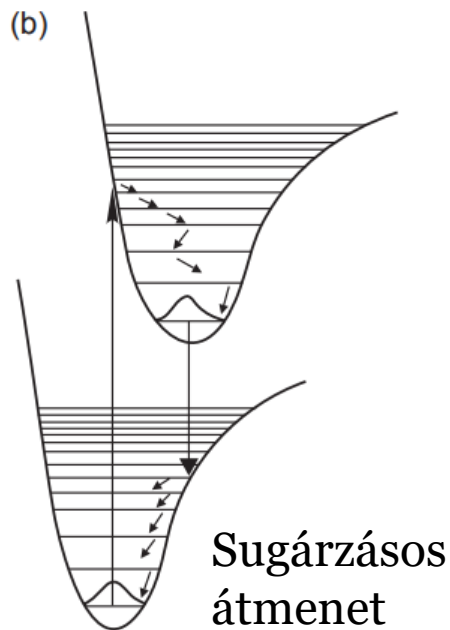
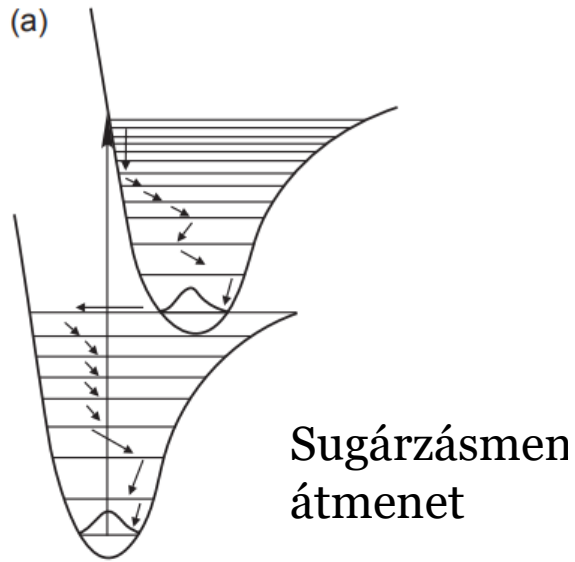


Titin

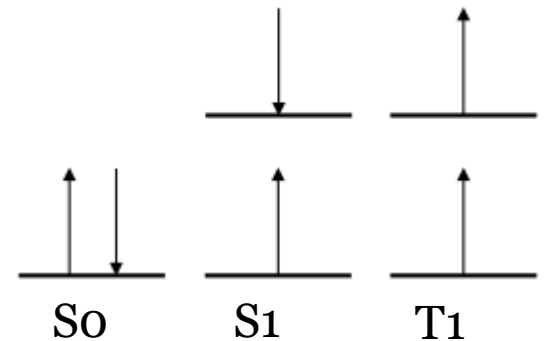
A leghosszabb fehérje, 1 molekula mérete kb. 1 μm
Molekulatömeg kb. 3 M Da



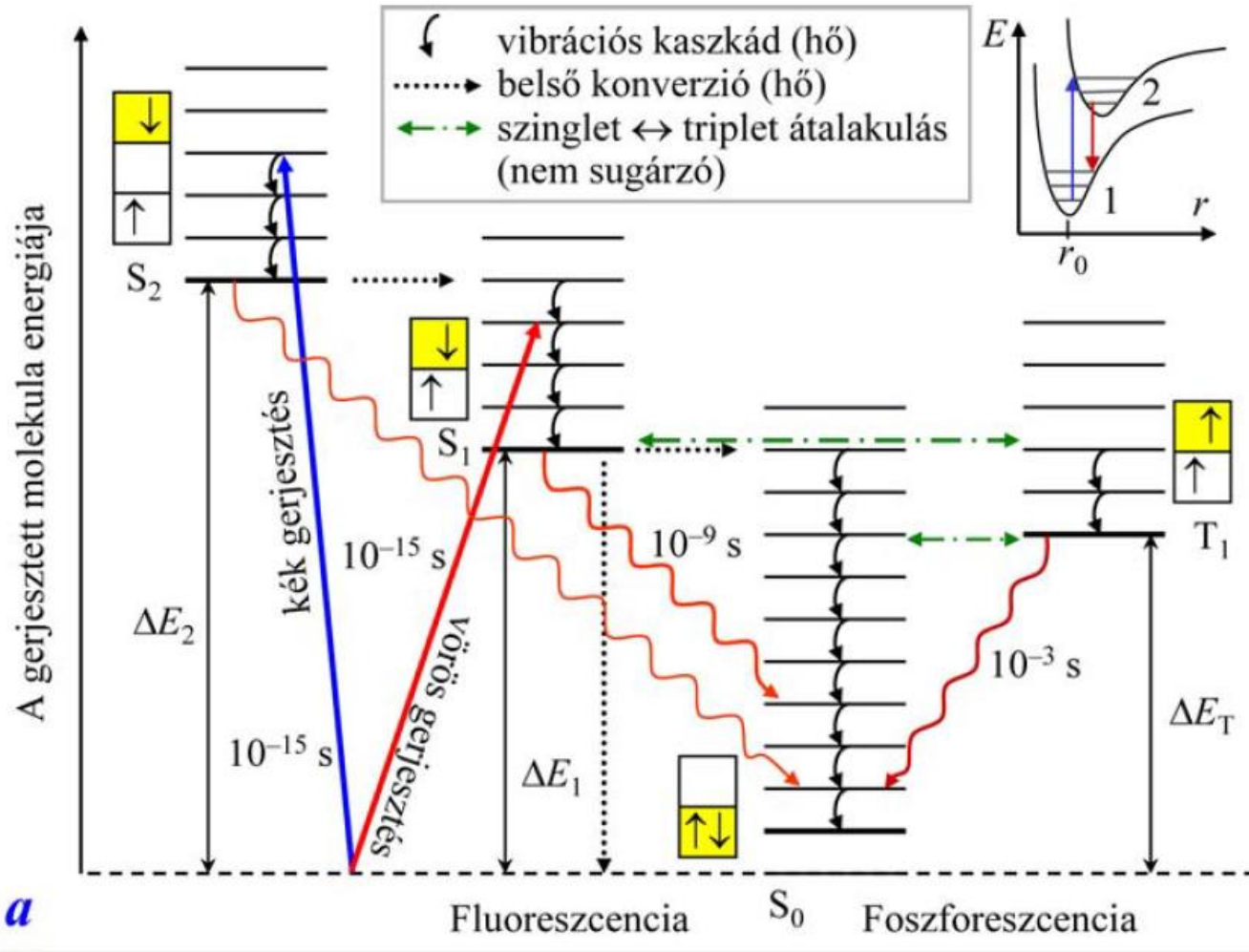
Szelektivitás növelése: fluoreszcencia alapok



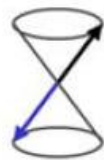
100-280 nm	UV-C (távoli)
280-315 nm	UV-B* (középső)
315-400 nm	UV-A (közeli)
400-760 nm	(látható, VIS)
760-1400 nm	IR-A (közeli)
1,4-3,0 μm	IR-B (középső)
3-1000 μm	IR-C (távoli)



Teljes Jablonski-diagram

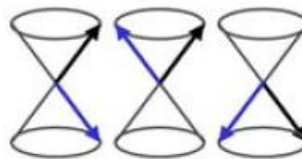


b



S, $\Sigma S = 0$

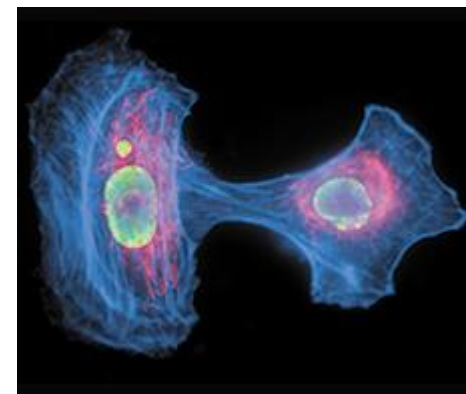
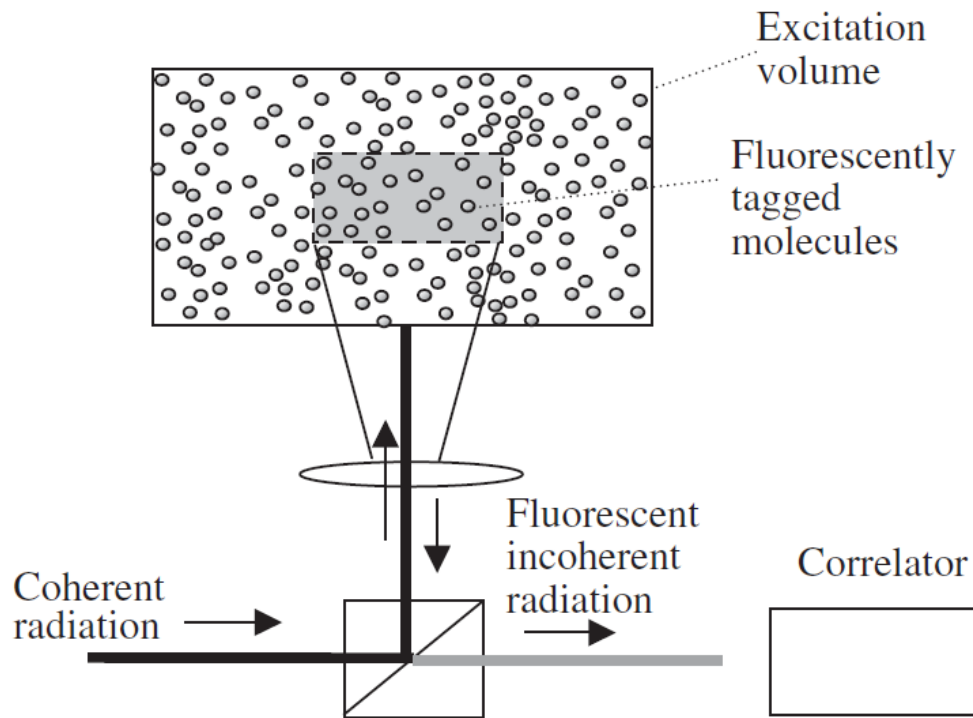
Szinglet állapotok



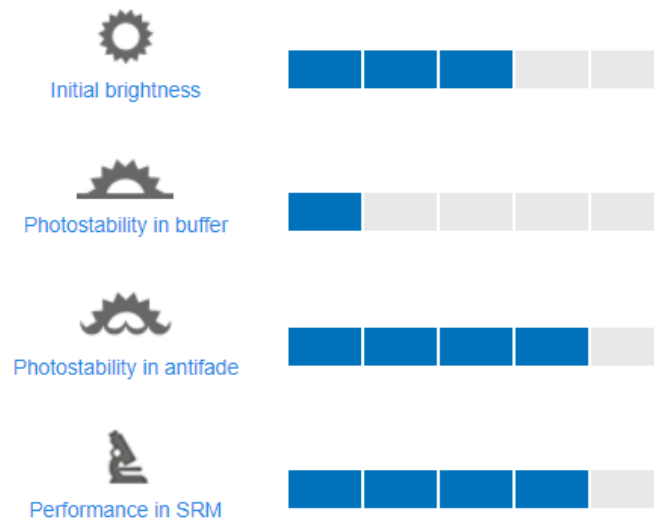
T, $\Sigma S = 1$

Triplet állapotok

Fluoreszcencia intenzitás korrelációs spektroszkópia I

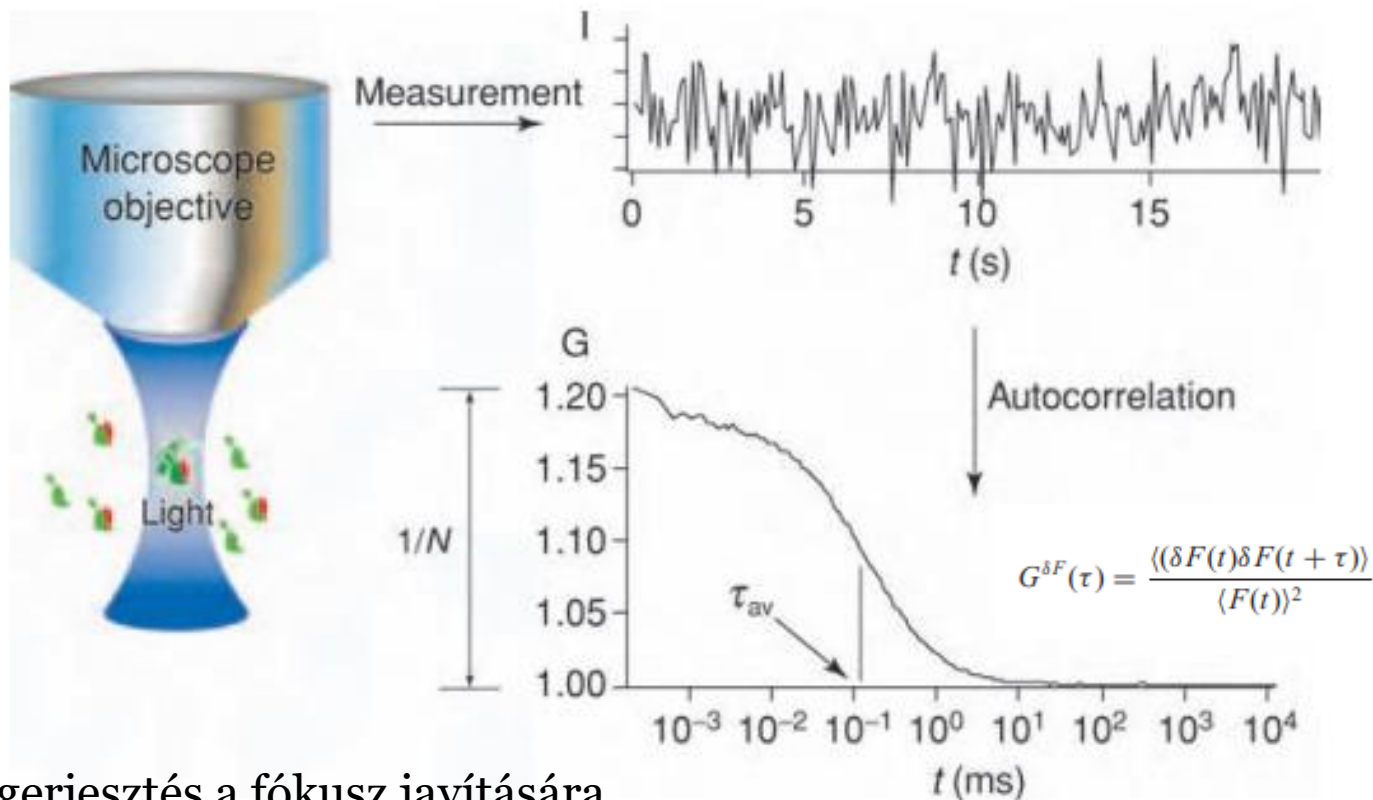


Alexa Fluor 405 dye dashboard



A vizsgálandó biomolekula fluoreszcens jelölését követően a dinamika követhető (membránkötődés/szabad molekulák azonosítása)

Fluoreszcencia intenzitás korrelációs spektroszkópia II

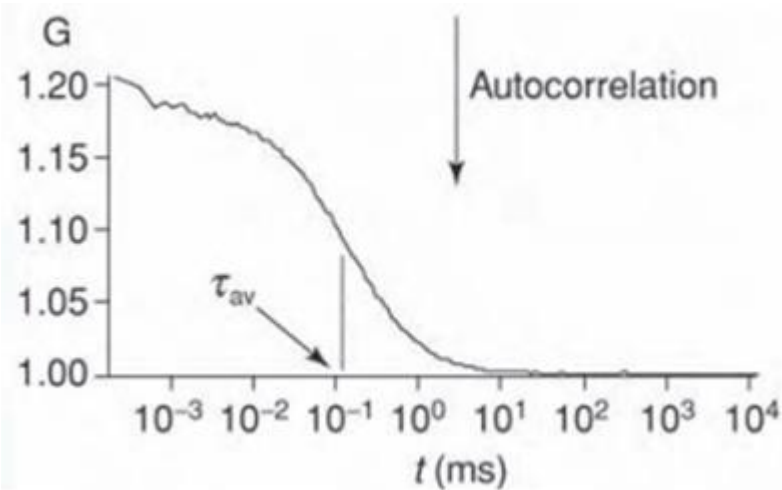


Kétfoton-gerjesztés a fókusz javítására

Intenzitás-fluktuáció két okból következhet be:

- Fluoreszcens molekulák diffúziója (elmozdulás)
- Fluoreszcencia változása (pl. reakció)

Nyugalmi idő, diffúziós tényező



$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{av}}} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{r}{l}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{av}}} \right)^{1/2}$$

$$\tau_{av} = \frac{r^2}{4D}$$

Planáris diffúzió (membránok):

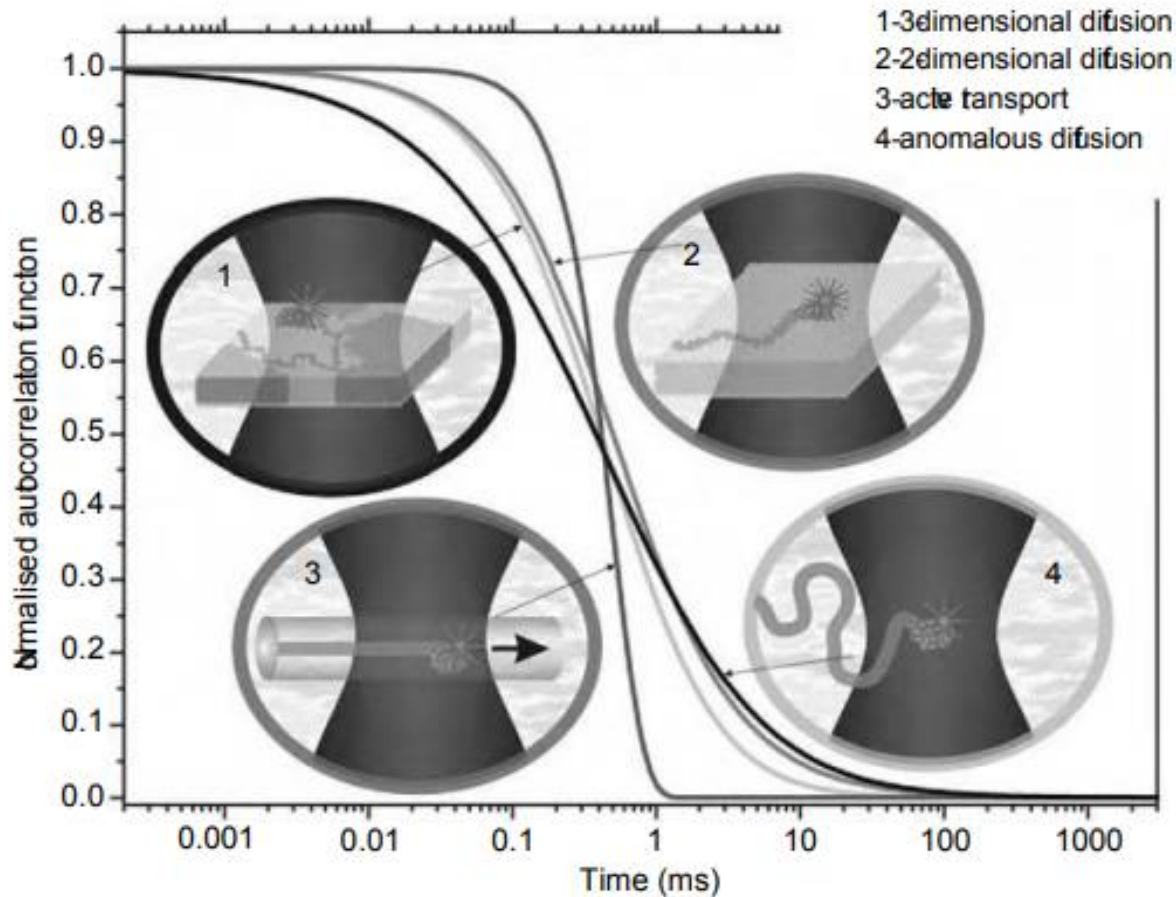
$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_{av}} \right)^{1/2}$$

Tipikus diffúziós időtartományok:

- $3 \cdot 10^{-6}$ cm²/s Szabad festékmolekulák vizes közegben
- 10^{-10} cm²/s Membránreceptor (photobleaching!)

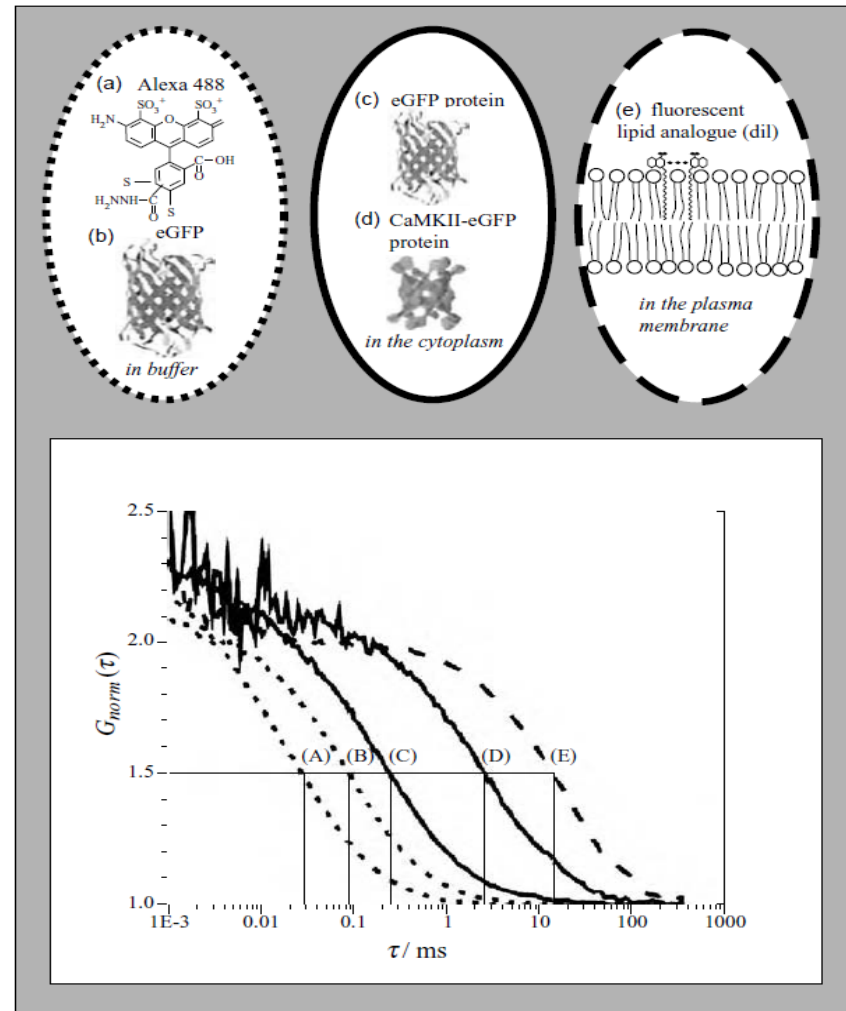
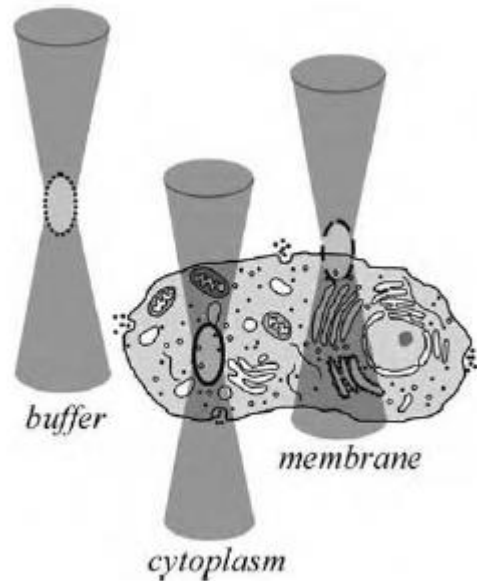
Korrelációs függvény, mozgásformák

$$G^{\delta F}(\tau) = \frac{\langle (\delta F(t)\delta F(t + \tau)) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

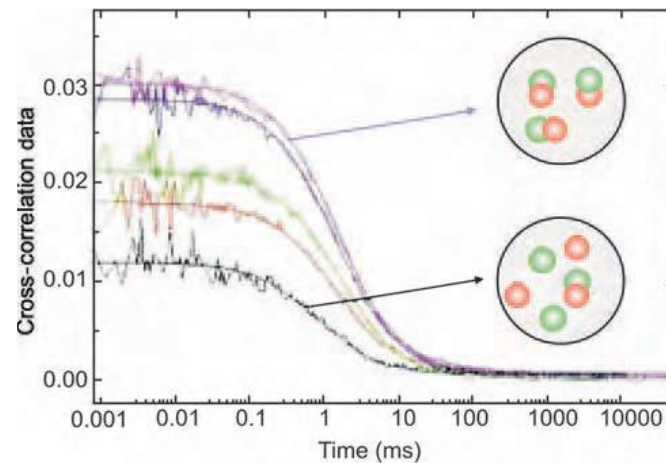
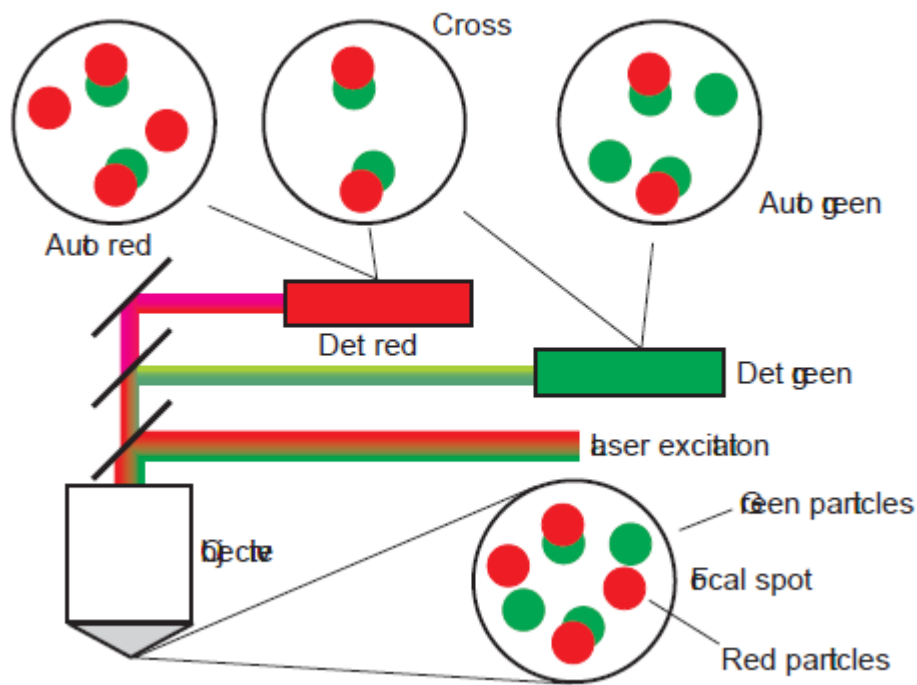


Autokorrelációs függvény értelmezése: tartózkodási idő a fókuszpontban

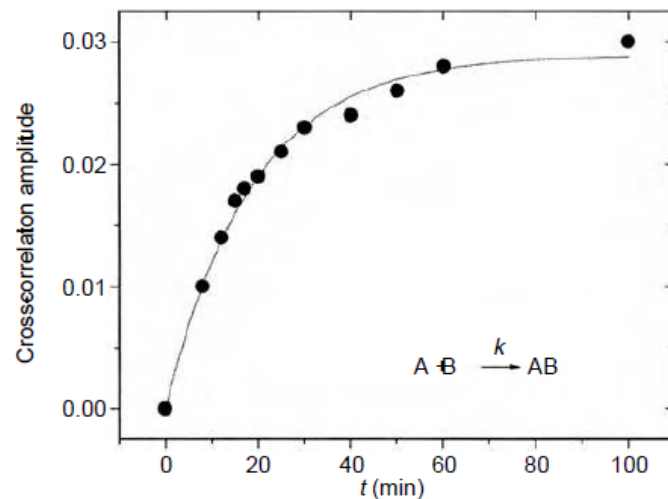
Méret – korrelációs időtartományok, több komponensű rendszerek



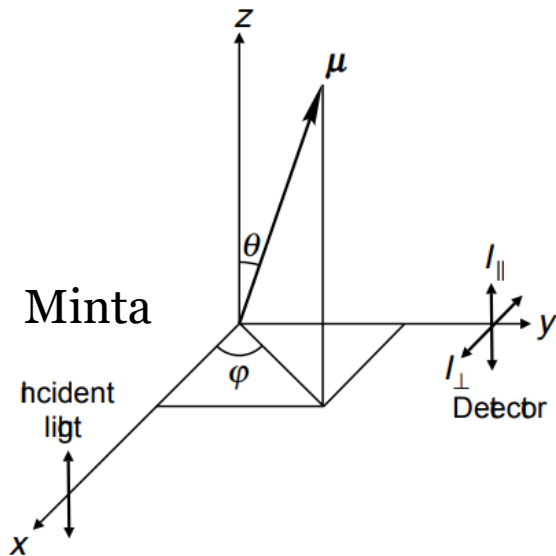
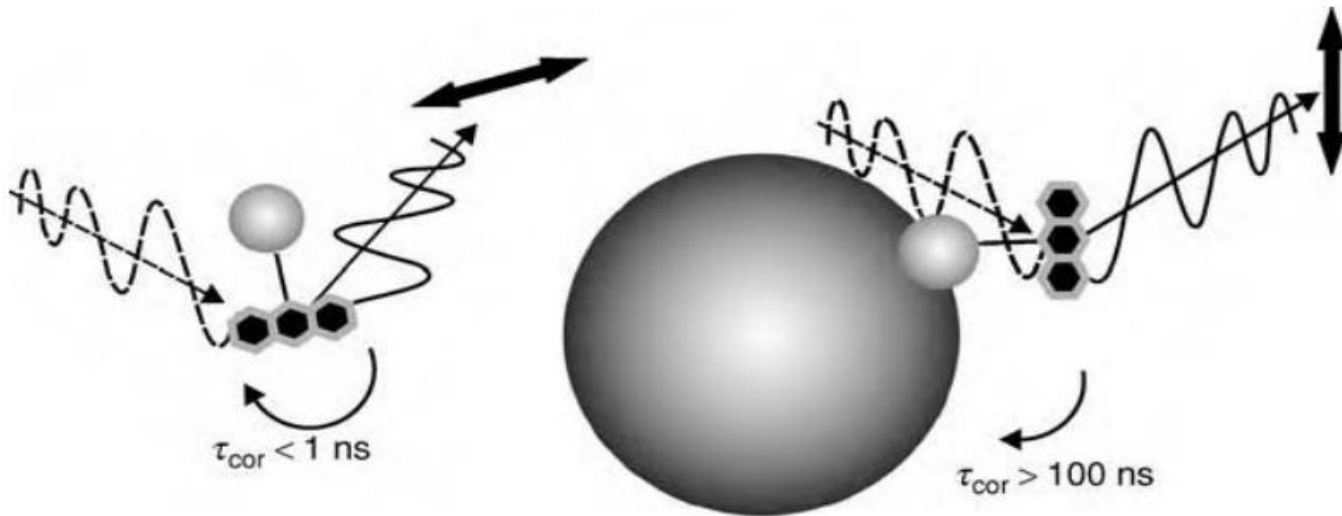
Keresztkorreláció – kölcsönhatások vizsgálata



Csak a kölcsönhatásban lévő részecskék adnak jelet, az amplitudó arányos a komplexek koncentrációjával



Fluoreszcencia depolarizáció elve



$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Anizotrópia

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Polarizáció

$$P_0 = \frac{3 \cos^2 \zeta - 1}{\cos^2 \zeta + 3}$$

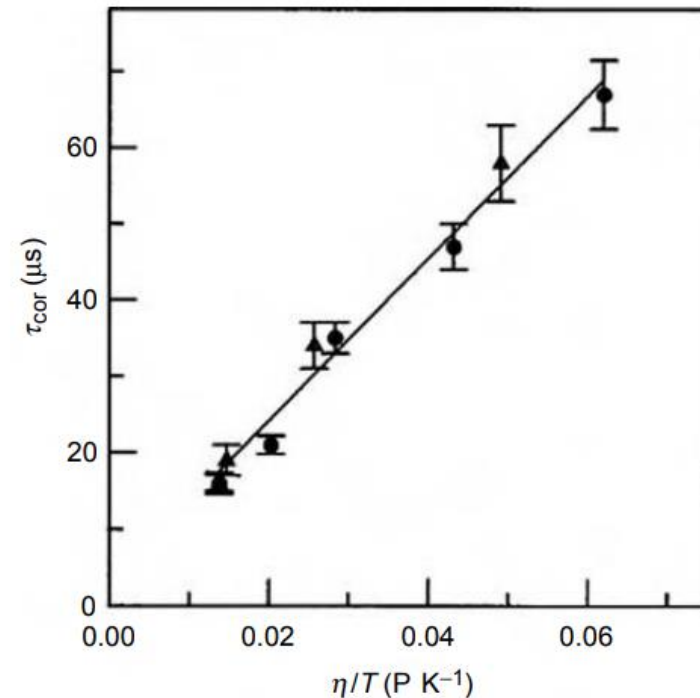
Teljesen merev molekulákra
(forgás jellemző ideje $> 100 \text{ ns}$)

$$A_0 = \frac{3 \cos^2 \zeta - 1}{5}$$

Mérési módszerek: steady-state

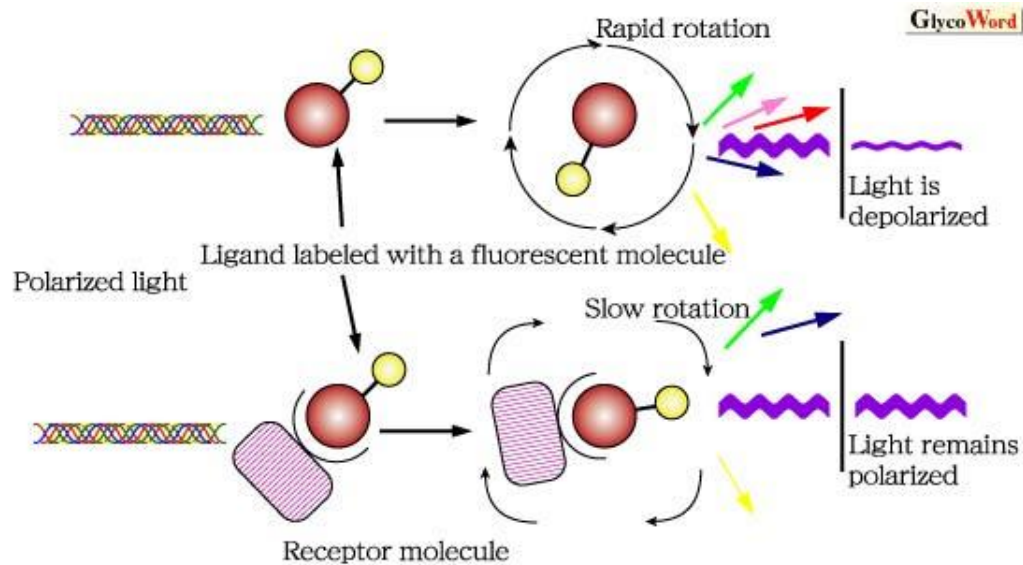
$$\bar{P} = \frac{3}{1 + 10(1 + \tau_F/\tau_{\text{cor}})(3 \cos^2 \zeta - 1)^{-1}}$$

$$\bar{A} = \frac{3 \cos^2 \zeta - 1}{5(1 + \tau_F/\tau_{\text{cor}})}$$



erythrosine-BSA komplex relaxációs
idejének meghatározása
(extrapoláció zéróra)

Gyors dinamika vizsgálata (fluoreszcencia depolarizáció)



Pikoszekundumos lézergyjtést követően polarizáció mérése
Lassan mozgó, merev ligandum esetén polarizált fényt kapunk →
receptorkötődésre lehet következtetni

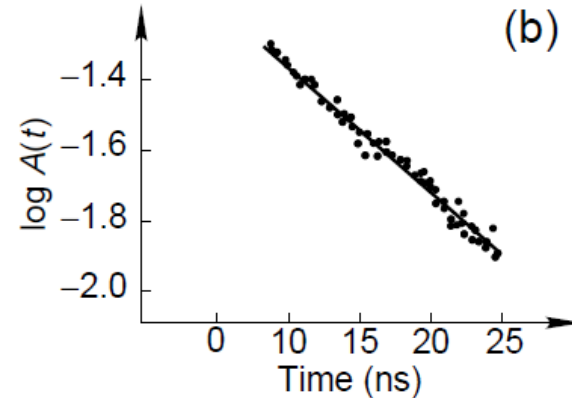
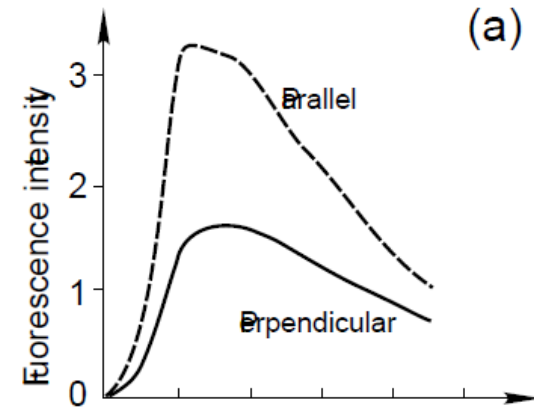
Mérési módszerek: anizotrópia lecsengés

Gömb alakú részecskékre:

$$A(t) = (2/5)e^{-t/\tau_{\text{cor}}} \frac{3 \cos^2 \zeta - 1}{2}$$

Ellipszoid alakú részecskékre:

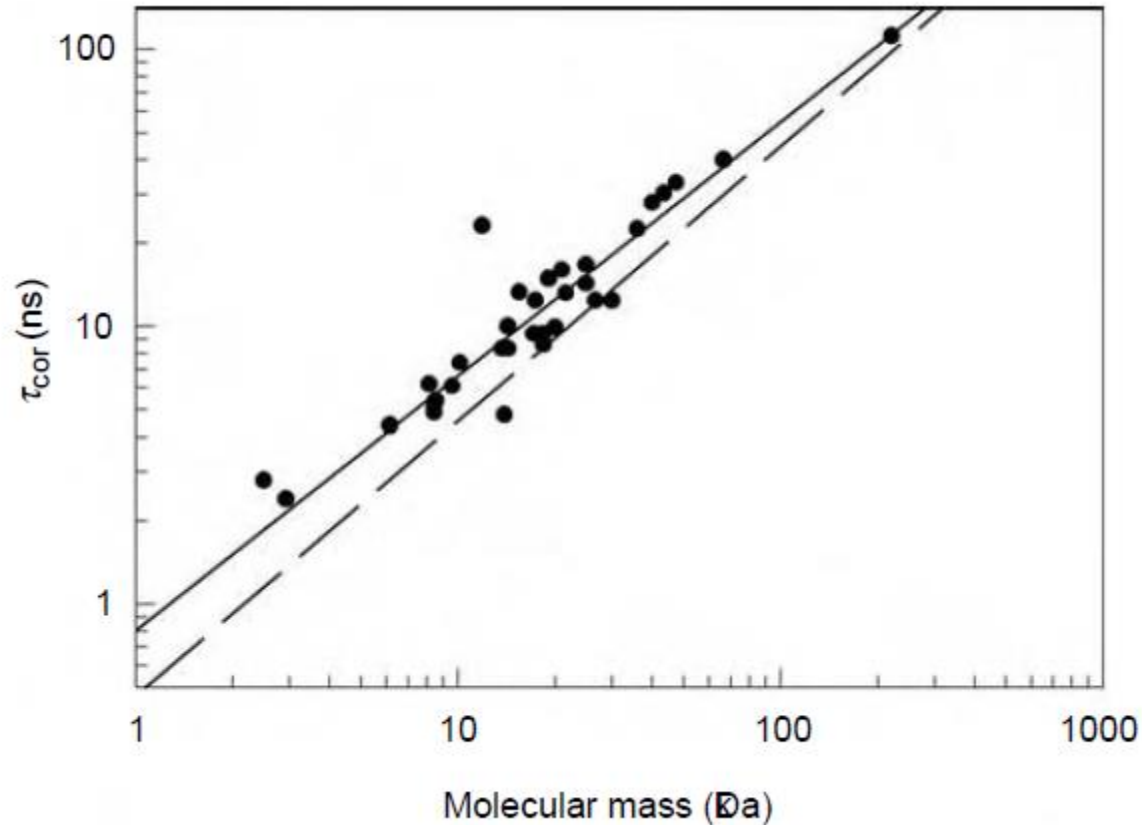
$$\frac{A(t)}{A_0} = \alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1\text{cor}}}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2\text{cor}}}\right) + \alpha_3 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{3\text{cor}}}\right)$$



Globuláris fehérjék jellemzése

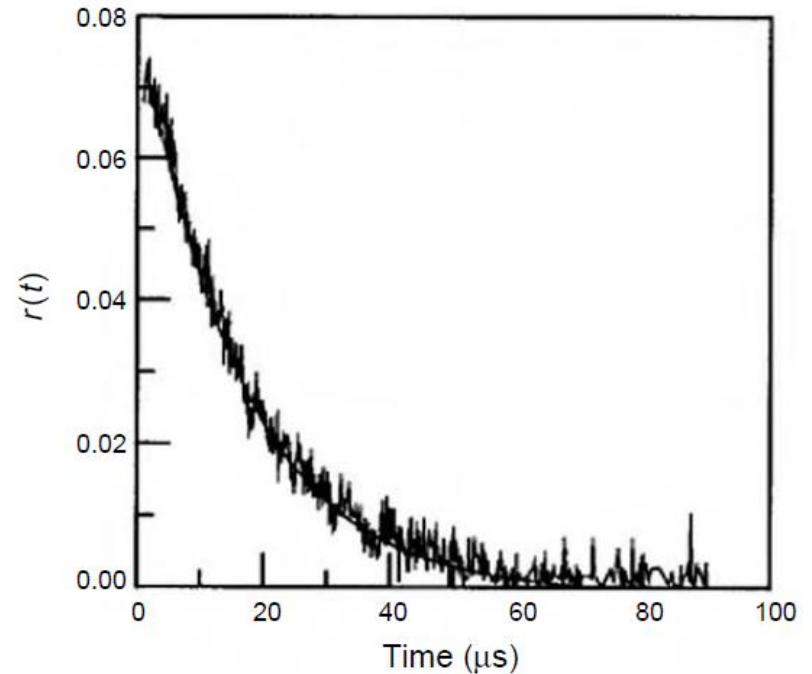
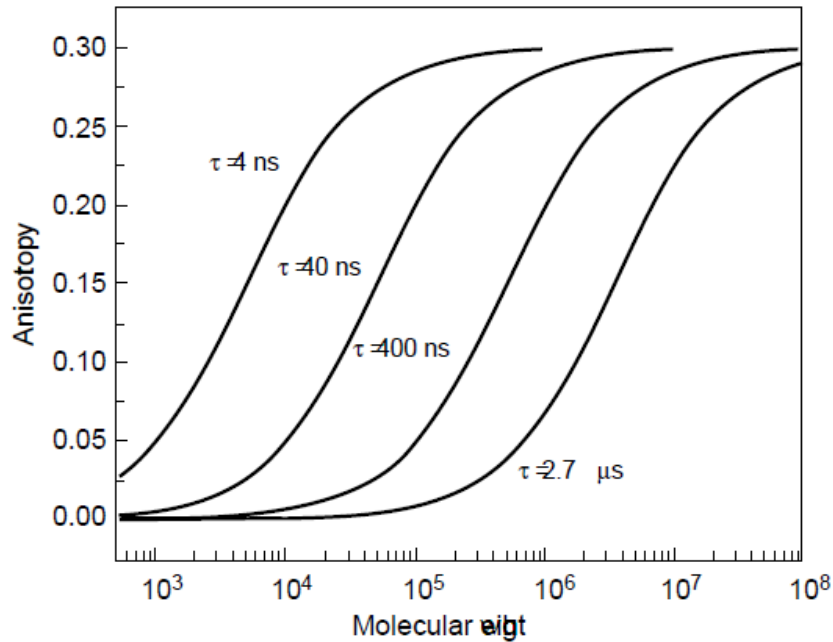
$$\tau_{\text{cor}} = \frac{1}{6\Theta} = \frac{V_h \eta_0}{kT}$$

$$\tau_{\text{cor}} = \frac{M}{2.55} \times 10^{-12} \text{ s}$$



Az eltérés a gömbtől eltérő molekulaalakból adódik

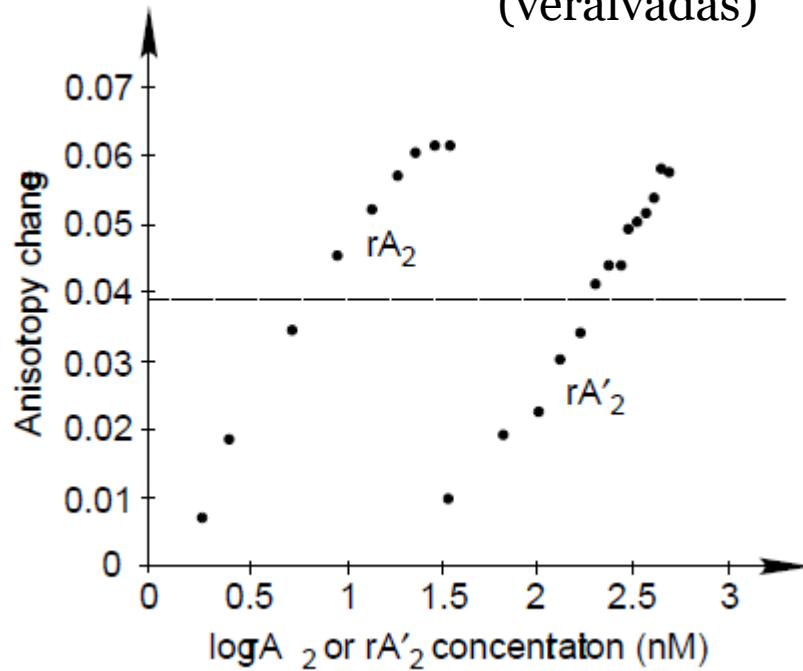
Nagy molekulatömegű fehérjék vizsgálata



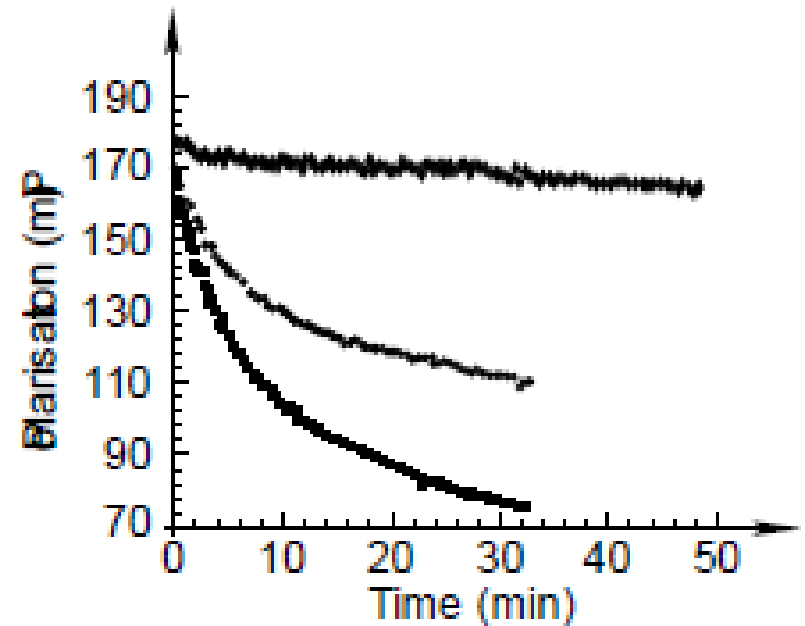
Nagy molekulatömeg esetén jelentős forgás nem következik be a fluoreszcens élettartam alatt \rightarrow nagyobb élettartamú próbamolekula szükséges (fém komplexek), foszforencia lecsengéssel is elérhető a mikro-s tartomány

Kölcsönhatások, degradáció vizsgálata

Tetramer fehérje
képződése
(véralkodás)



Enzimatisz bontás
(tripszin-kazein)



Anizotrópia (polarizáció) követésével a komplexképzés/molekulaméret változása érzékenyen követhető

Dinamika vizes közegben

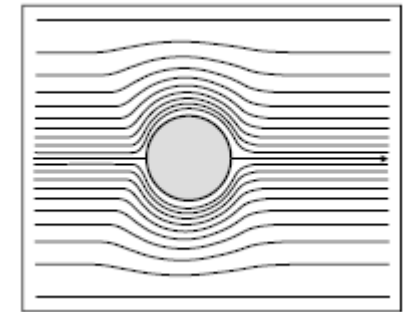
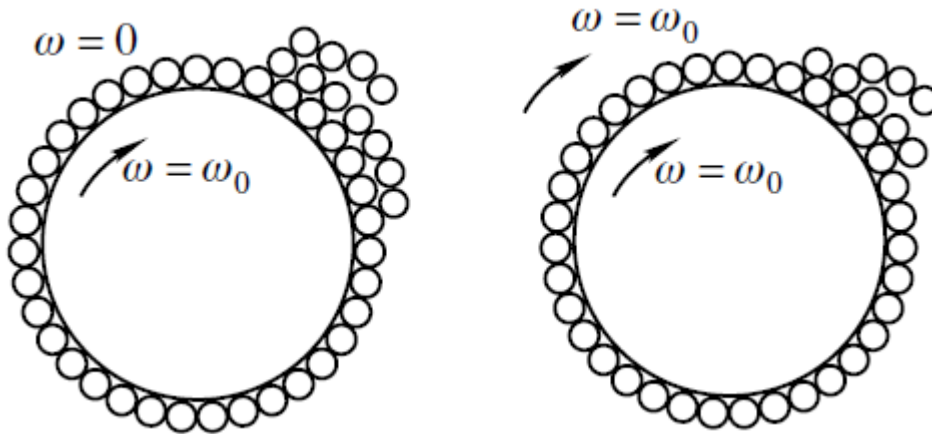
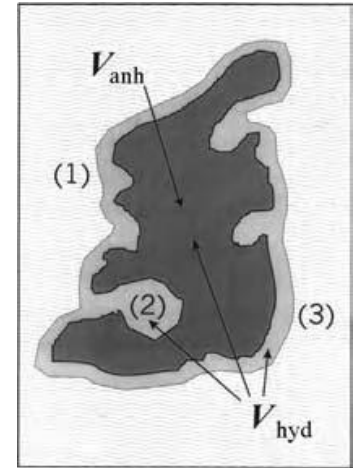
Reynolds szám, $Re = \rho v d / \eta$

egy baktériumra ($d = 10^{-4}$ cm, $v = 0,002$ cm/s) $Re = 10^{-5}$

egy halra ($d = 10$ cm, $v = 100$ cm/s) $Re = 10^5$

egy bálnára ($d = 10$ m, $v = 30$ km/h) $Re = 10^8$

A tehetetlenség („inertia”) mértékét adja meg.



Tökéletes csúszás (slip),
kis molekulatömeg
esetén

$$f = 4\pi\eta_0 R_0$$

$$\Theta = 0$$

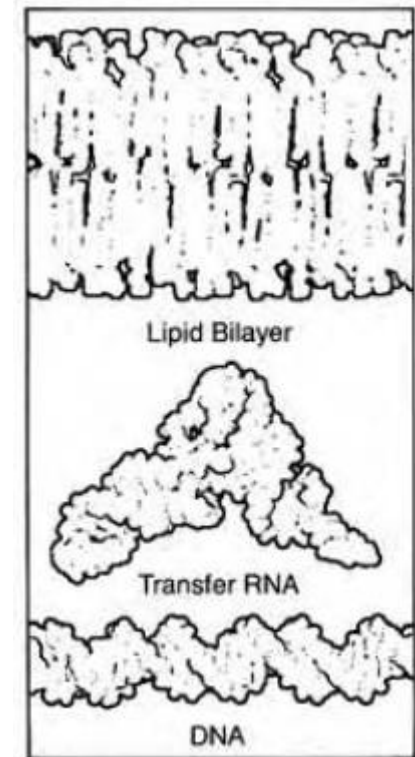
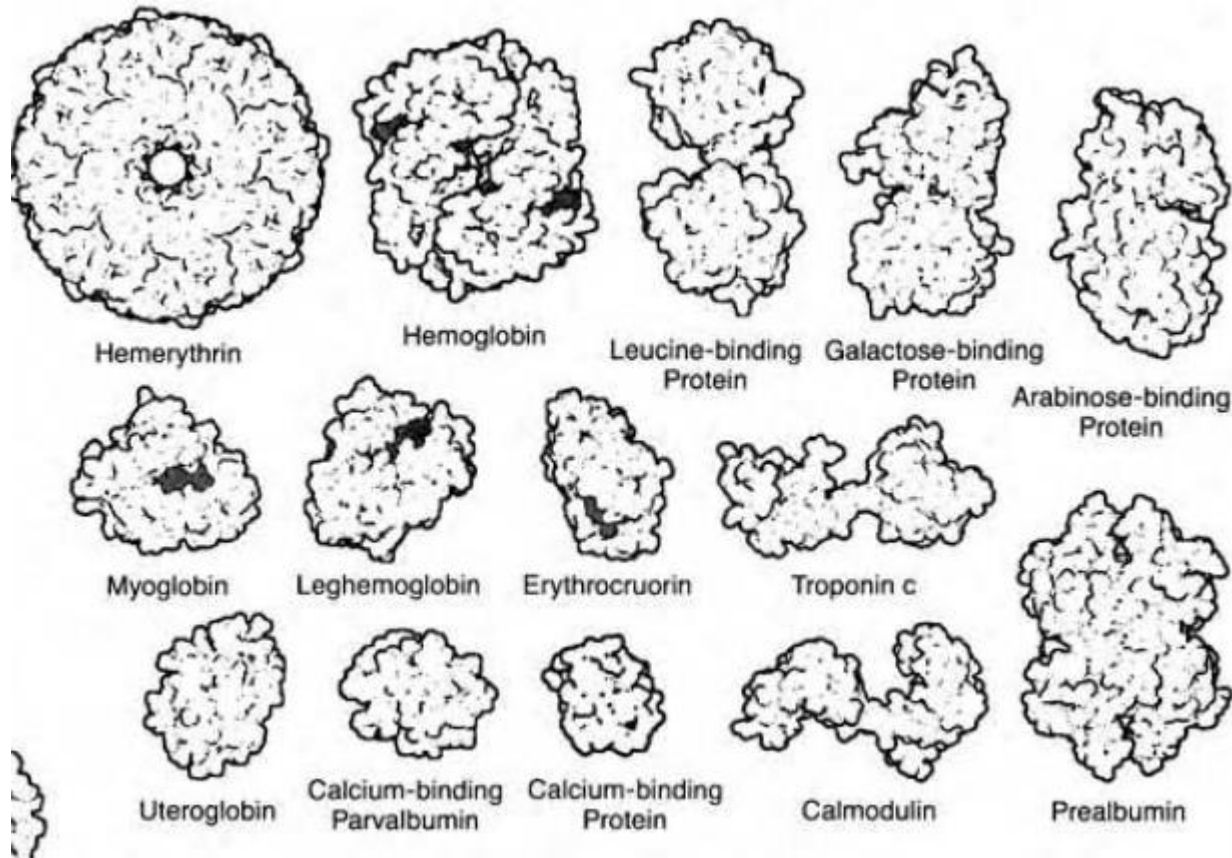
Tökéletes tapadás (stick),
nagy molekulatömeg
esetén

$$f = 6\pi\eta_0 R_0$$

$$\theta = 8\pi\eta_0 V$$

Stacioner állapotban:
Súrlódás, $F = \mu v = -F_{\text{külső}}$

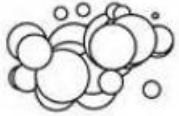
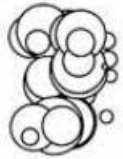

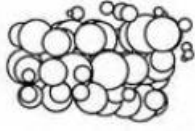

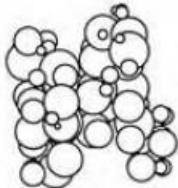
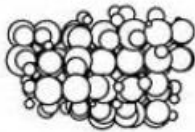

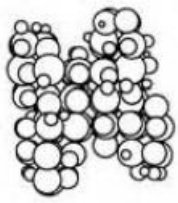

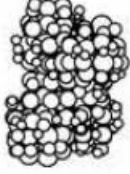

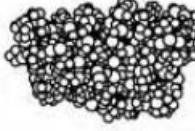
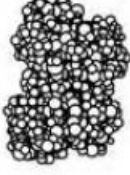

Gömb alakú részecskéktől a tetszőleges alakig – ekvivalens átmérő



Modellezés:

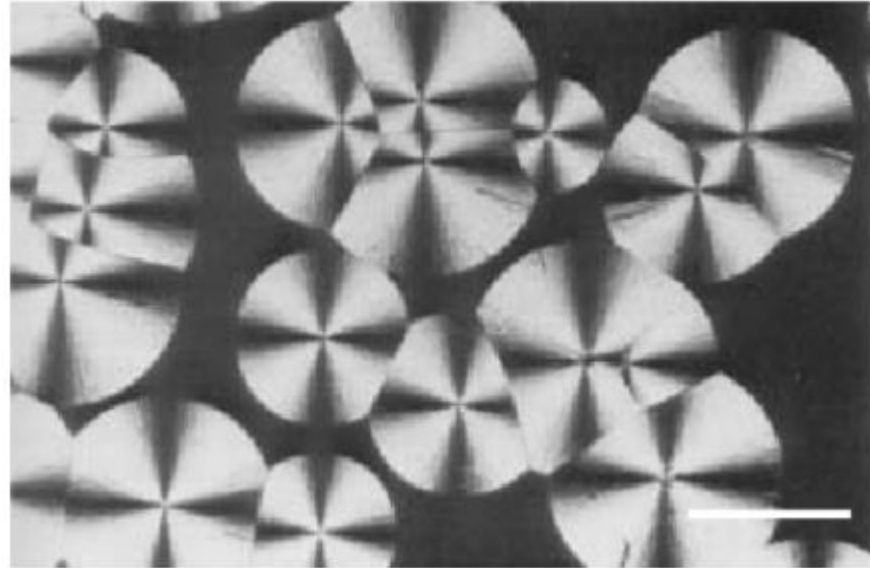
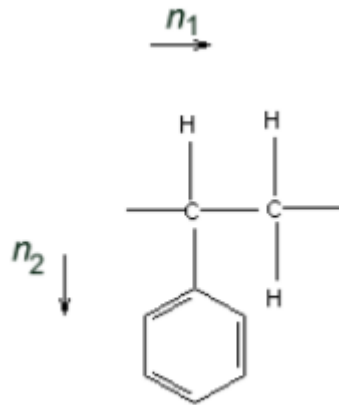
- Egyenlő sugarú gömbök
- Nem egyenlő sugarú gömbök
- Lemezkek

Összetett alak közelítése gömbmodellel

Resolution (Å)	No of beads	Plane of view		
		<i>xy</i>	<i>yz</i>	<i>zx</i>
30	26			
20	67			
15	125			
10	319			
5	1103			

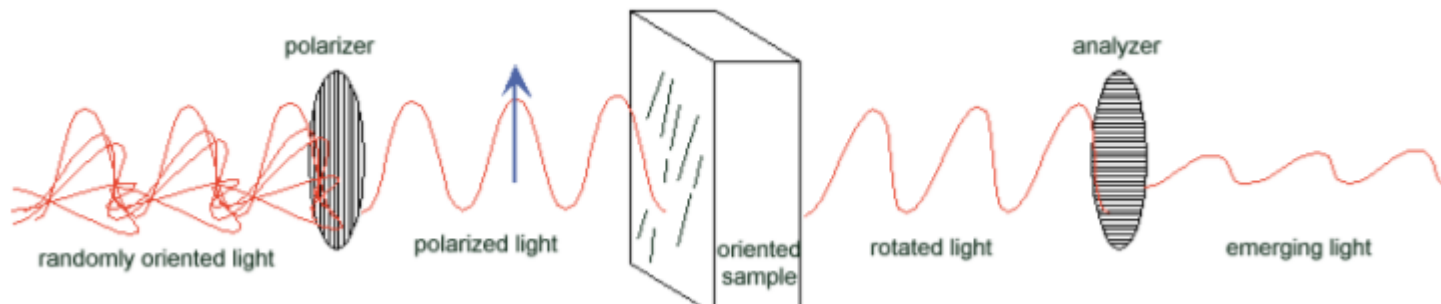


A kettőstörés alapjai



Szükséges feltételek:

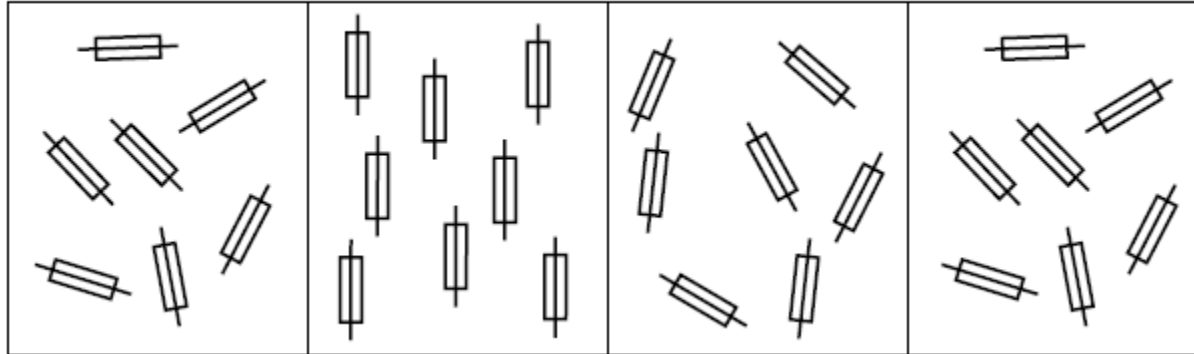
- Törésmutató (polarizálhatóság) különbség
- Rendezettség
- Polarizált fény



$$I = I_0 \sin^2(2\theta) \sin^2(\delta/2)$$

$$\delta = \frac{2\pi\Delta n' l}{\lambda}$$

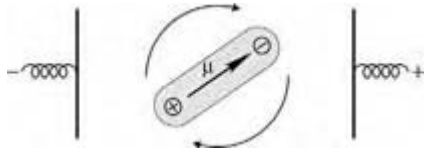
Relaxációs folyamatok



Makromolekula	Rotációs relaxáció (1/s)
Gramicidin (dimer)	60000000
Lizozim	16700000
DNS fragmens (104 bázispár)	172000
Tobacco mozaik vírus	330
Teljes DNS	0,41

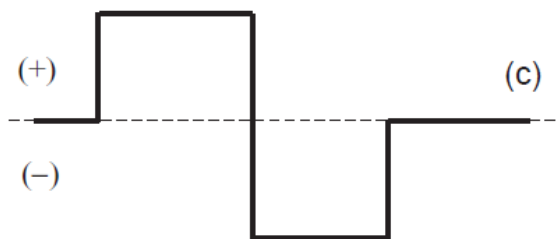
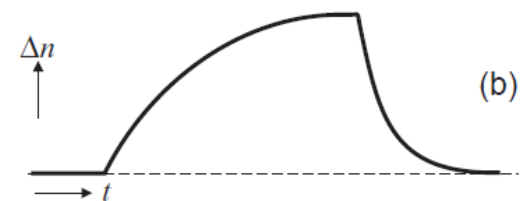
Elektromos kettőstörés I

Dipólusmomentum (állandó vagy indukált)

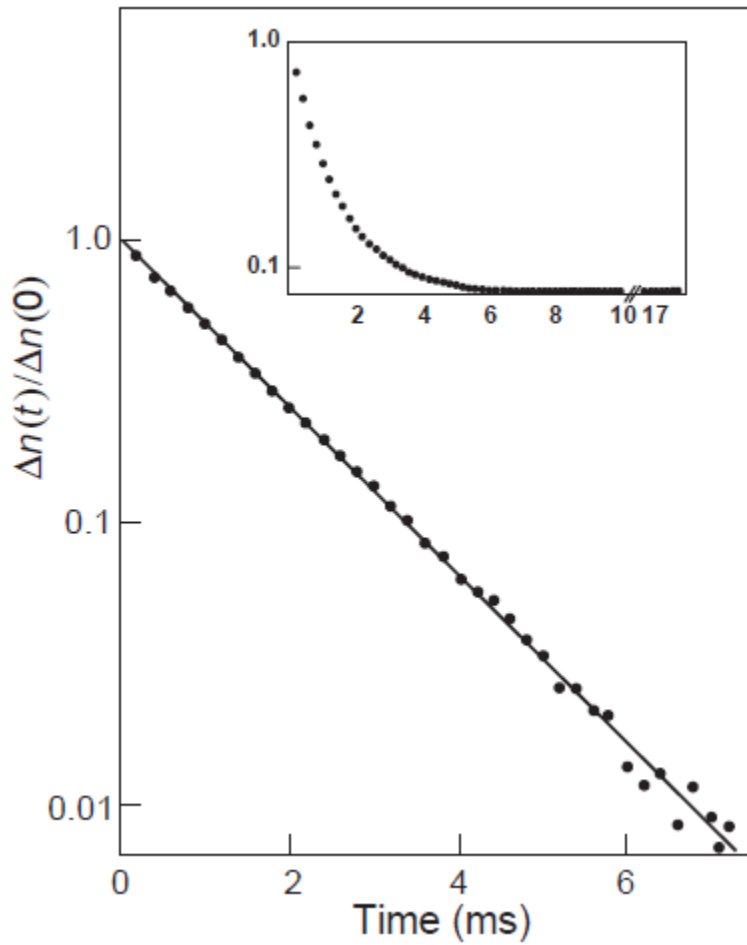


Elektromos térben transzláció nem, de rotáció indukálódik, a forgatónyomaték miatt

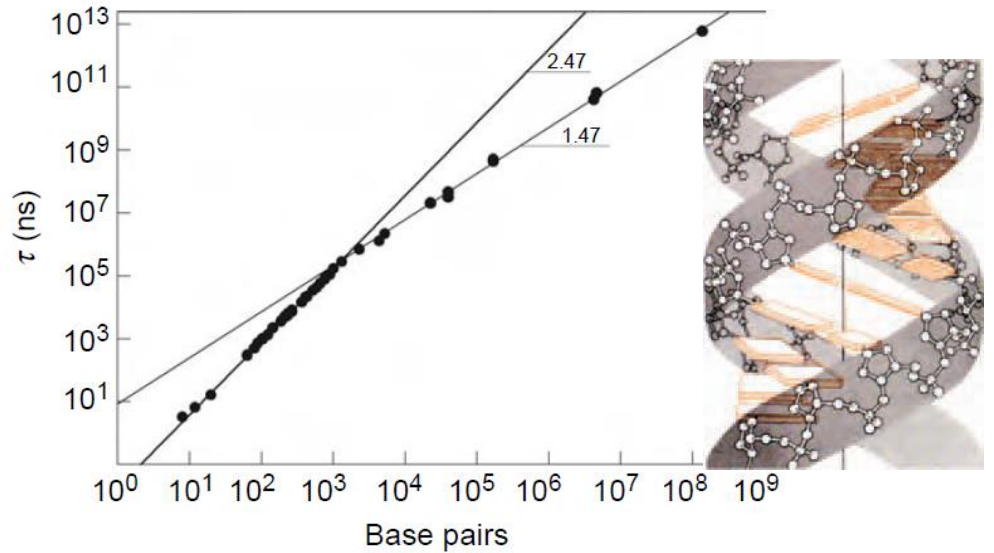
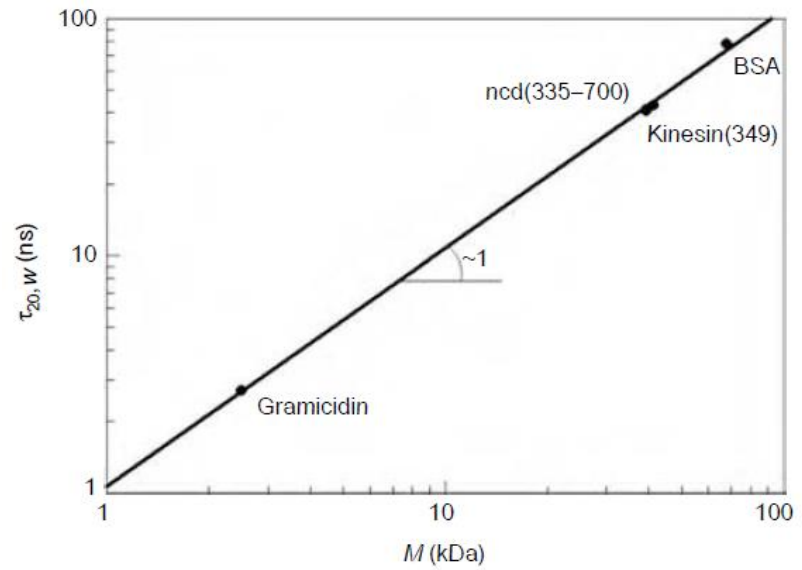
$$\Delta n = n_x - n_y$$



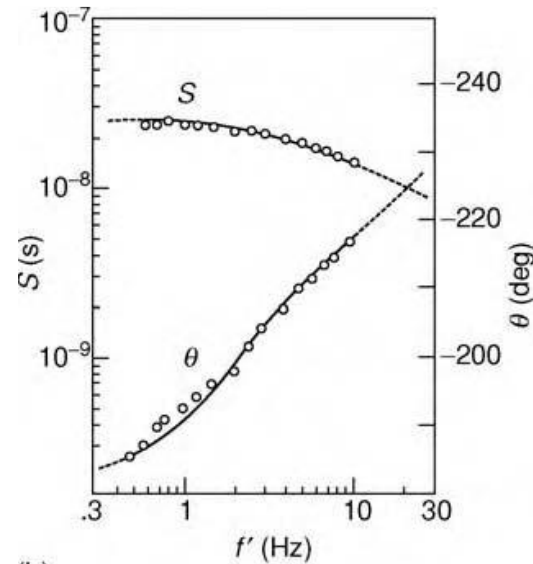
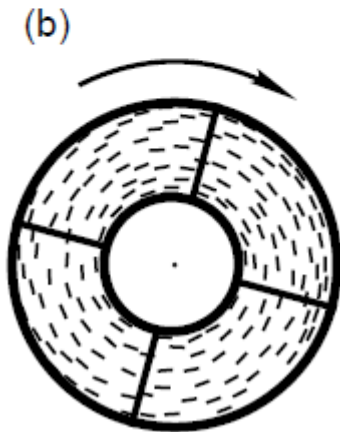
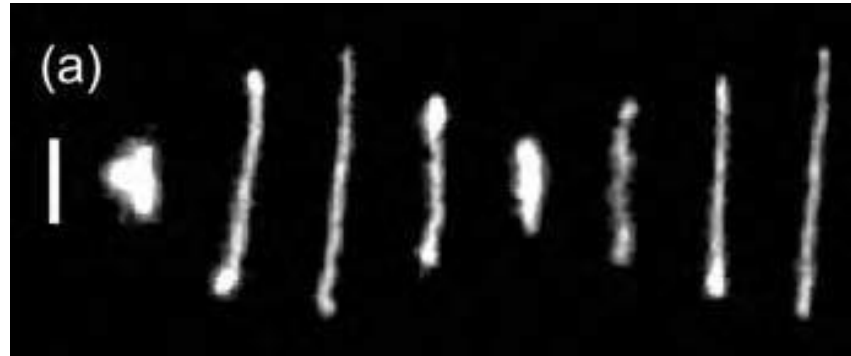
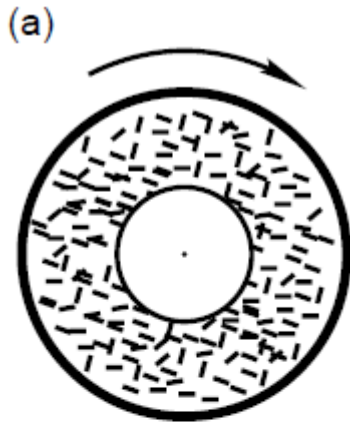
Elektromos kettőstörés II



$$\Delta n(t) = \sum_{k=1}^5 C_k \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right)$$



Nyírási kettőtörés



(b)

Frekvenciafüggő
mérésekből a molekula
lehetséges mozgás-
formáira lehet
következtetni

Nyírási kettőstörés

