

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΟΠΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΟΠΤΟΜΕΤΡΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Οπτικές λαβίδες : Θεωρία και εφαρμογές με έμφαση στη βιολογία

Σπουδαστές:

**Κελεπούρη Λυδία
Κελεσίδα Μαρία – Νικολία**

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Ιωάννης Θανόπουλος

Αίγιο - 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	4
Περίληψη	5
Summary	6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΠΤΙΚΕΣ ΛΑΒΙΔΕΣ ΚΑΙ ΠΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΟΥΝ

Εισαγωγή.....	7
Η οπτική παγίδευση βήμα-βήμα.....	8
Μέτρηση των δυνάμεων.....	13
Οπτικές λαβίδες διπλής δέσμης.....	15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Εισαγωγή.....	17
Δημιουργία πειραματικού μηχανισμού.....	18
Επεξήγηση βιολογικών όρων.....	22
DNA.....	22
Κύτταρο.....	24
Ριβοσώματα.....	26
Πειράματα.....	33
Πειράματα Svoboda.....	34
Πειράματα DNA και RNA.....	38
Πειράματα ριβοσωμάτων και πρωτεϊνών.....	39

Συμπεράσματα.....	45
Βιβλιογραφία.....	46

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία, με θέμα " Οπτικές λαβίδες: Θεωρία και εφαρμογές με έμφαση στη βιολογία " πραγματοποιήθηκε για το Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Δυτικής Ελλάδας, την Σχολή Επαγγελματών Υγείας και Πρόνοιας και συγκεκριμένα για το Τμήμα Οπτικής και Οπτομετρίας. Θα θέλαμε να αναγνωρίσουμε την πολύτιμη βοήθεια για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας που μας πρόσφερε ο επιβλέπωντας καθηγητής μας, ο κ. Θανόπουλος Ιωάννης, και να τον ευχαριστήσουμε για την στήριξη του με την παροχή γνώσεων, στοιχείων και εφοδίων που μας πρόσφερε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θέμα της εργασίας κινείται πάνω στις οπτικές λαβίδες με εστίαση στη βιολογική τους εφαρμογή. Η εργασία αποτελείται από δύο μέρη :

A) Οπτικές λαβίδες και πως λειτουργούν .Πρώτα θα αναφέρουμε κάποια εισαγωγικά στοιχεία καθώς και κάποια ιστορικά γεγονότα που κινούνται γύρω από την ύπαρξη και λειτουργία των λαβίδων. Στη συνέχεια, θα αναφερθούμε στις εμπλεκόμενες δυνάμεις προκειμένου να υπολογίσουμε τη μέγιστη δυνατή απόδοση του συστήματος και την καλύτερη πιθανή παγίδευση των αντικειμένων. Έπειτα αφού δούμε τη μέτρηση δυνάμεων στο σύστημα των οπτικών λαβίδων θα εξετάσουμε τις οπτικές λαβίδες διπλής δέσμης .

B) Βιολογικές εφαρμογές. Στις βιολογικές εφαρμογές έχουμε να εξετάσουμε τρία σημεία. Πρώτον θα εξετάσουμε το μηχανισμό οπτικών λαβίδων που συνηθίζεται στα περισσότερα πειράματα. Έπειτα θα αναλύσουμε κάποιες θεμελιώδεις έννοιες και στη συνέχεια θα παρουσιάσουμε κάποια ενδεικτικά πειράματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πειράματα είναι ενδεικτικά καθώς η εξαντλητική απαρίθμηση πολλών πειραμάτων θα κούραζε τον αναγνώστη και δε θα είχε ιδιαίτερο όφελος καθώς τα πειράματα κινούνται γύρω από συγκεκριμένο μηχανισμό.

Summary

It is crystal clear that optical tweezers is quite a contemporary topic. So we tried to make a severe approach on the issue mainly focusing on the optical tweezers and their biological use. The main body of this work consists of two parts:

A) The function of optical tweezers. First of all we present the historical facts that led to the discovery and use of the optical tweezers. We will proceed with the forces of the system and the maximum possible trapping effectiveness and accuracy. Finally we will examine the system of the double tweezers.

B) Biological uses of optical tweezers. In order to examine carefully the biological use of the optical tweezers we have to elucidate three specific issues. Firstly we will try to clarify the basic mechanism that is used to the most biological experiments. Secondly, we will illustrate some basic genetic and biological principles and finally we will describe some basic experiments. It is self-evident, that the experiments discussed cannot fully cover all categories of the biological experiments moreover the exhausting presentation of many experiments would be tiring and meaningless.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΠΤΙΚΕΣ ΛΑΒΙΔΕΣ ΚΑΙ ΠΩΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΟΥΝ

1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον ορισμό του Ashkin ,οι οπτικές λαβίδες, είναι τρισδιάστατες παγίδες, που χρησιμοποιούν μία εστιασμένη ακτίνα laser, για να παγιδέψουν και να χειριστούν μικροσκοπικά, ουδέτερα αντικείμενα [1].Ο Arthur Ashkin έδειξε, για πρώτη φορά το 1970, ότι μικρά διηλεκτρικά σφαιρίδια μεγέθους μικρομέτρων, μπορούν να επιταχυνθούν ή να παγιδευτούν χρησιμοποιώντας δύο εστιασμένες, αντίθετα διαδιδόμενες, ακτίνες laser. Όταν αργότερα ανακάλυψε , ότι μία έντονα εστιασμένη, απλή ακτίνα laser θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να παγιδέψει ένα σωματίδιο , δημιουργήθηκαν οι πρώτες σκέψεις για τις οπτικές λαβίδες. Μάλιστα σύμφωνα με έρευνες που διεξήγαγε το 1977 ανακάλυψε πως στην εστία της ακτίνας, εκτός από διηλεκτρικά σφαιρίδια , μπορούν επίσης να παγιδευτούν βιολογικοί οργανισμοί, όπως κύτταρα, ιοί και βακτήρια.[1]Από τότε έγιναν σημαντικές πρόοδοι στο χειρισμό μεμονωμένων βιολογικών μορίων. Για πρώτη φορά παρατηρήθηκε η μετατόπιση μεμονωμένων μορίων κινεσίνης το 1993 και αργότερα παρουσιάστηκαν οι πρώτες καμπύλες δύναμης σε συνάρτηση με την έκταση δίκλωνων μορίων DNA (dsDNA). Τα αποτελέσματα αυτά απέδειξαν ότι οι οπτικές λαβίδες έχουν μεγάλες δυνατότητες στη βιολογία και ιδιαίτερα στο χειρισμό μεμονωμένων βιομορίων.

Πολλές φορές είναι απαραίτητο , να χρησιμοποιηθεί laser με υψηλή χωρική συνοχή ως οπτική πηγή. Οι περισσότερες οπτικές λαβίδες χρησιμοποιούν laser φτιαγμένα από λυχνίτη, ύτριο και αλουμίνιο, καθώς φημίζονται για την ακρίβεια της ακτίνας τους και τη χαμηλή απορροφητικότητα των υπέρυθρων ακτινών από τα βιολογικά κύτταρα και τις ουσίες και τα συστατικά του οργανισμού. Για να δημιουργηθεί ένα σημείο εστίασης της ακτίνας με χαμηλό δείκτη διάθλασης, πρέπει να προτιμηθεί μεγεθυντικό κάτοπτρο μικροσκοπίου με υψηλή αριθμητική οπή (όπως θα δούμε και παρακάτω). Παραδοσιακά, ο οπτικός φακός του μικροσκοπίου είναι έτσι κατασκευασμένος ώστε να δημιουργεί λεπτομερή εικόνα του δείγματος το οποίο

βρίσκεται σε μέγιστη απόσταση 160 χιλιοστά μακριά απ' το φακό. Αυτή η δομή είναι εξαιρετικά χρήσιμη καθώς το μοναδικό επιπλέον εξάρτημα που χρειαζόμαστε είναι μια κάμερα ή ένα προσοφθάλμιο και οποιαδήποτε άλλη προσθήκη οπτικών θα οδηγήσει σε υπέρβαση του φυσικού περιορισμού (δηλαδή του μεγίστου αριθμού οπτικών μέσων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς σημαντική αλλοίωση των ακτινών) και ως εκ τούτου θα είναι προβληματική. Είναι σύνηθες να σχεδιάζονται οπτικοί φακοί για να μεγεθύνουν ή να σμικρύνουν μια εικόνα. Ωστόσο ένας επιπλέον φακός ένας διορθωτικός φακός μπορεί να προστεθεί για να τελειοποιήσει την κατεύθυνση της εικόνας. Για τις οπτικές λαβίδες είναι απολύτως απαραίτητος ένας τέτοιος φακός καθώς εστιάζει την παράλληλη δέσμη laser και εστιάζει με ακρίβεια στο δείγμα.[6]

Στις βιολογικές επιστήμες, η τεχνική των οπτικών λαβίδων χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση δυνάμεων στην κλίμακα των pN και μετατοπίσεις στην κλίμακα των nm, καταμέτρηση που είναι αδύνατη με τη χρήση συμβατικών τεχνικών, όπως η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM).

2. Η οπτική παγίδευση βήμα-βήμα

Βήμα 1^ο : Η εύρεση της πίεσης της ακτινοβολίας (radiation pressure)

Η πίεση ακτινοβολίας θα βρεθεί από την αλλαγή της ορμής των φωτονίων

Οπότε πρέπει:

α) να προσδιορίσουμε τα φωτόνια και την πίεσή τους

β) να προσδιορίσουμε την αλλαγή της ορμής των φωτονίων η οποία συναρτάται με τη διεύθυνση διάδοσης του φωτός (ανάκλαση, διάθλαση)

α) να προσδιορίσουμε τα φωτόνια και την πίεσή τους

Η δύναμη που ασκείται σε ένα αντικείμενο και οφείλεται αποκλειστικά στην αλλαγή της ορμής του φωτός που προσπίπτει πάνω του, ονομάζεται πίεση ακτινοβολίας (radiation pressure). Σε μακροσκοπικά αντικείμενα και με συμβατικές πηγές φωτός, η δύναμη αυτή είναι εξαιρετικά μικρή για να προκαλέσει κάποιο μετρήσιμο αποτέλεσμα. Σε μικροσκοπικά σωματίδια, όμως, με μία ισχυρά εστιασμένη δέσμη laser, η δύναμη αυτή μπορεί να έχει αξιοσημείωτα αποτελέσματα.

Αρχικά θα πρέπει να πούμε πως το φως μπορεί να περιγραφεί ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και ως έχων σωματιδιακή φύση η οποία αποτελείται από φωτόνια.

Το φως μπορεί να περιγραφεί ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκφράζεται από τη σχέση:

$$c = \lambda \nu$$

όπου, c η ταχύτητα του φωτός,
 λ το μήκος κύματος
και ν η συχνότητα.[2]

Το φως, όμως, έχει και σωματιδιακή φύση. Κάθε φωτόνιο έχει ενέργεια, που δίνεται από τη σχέση:

$$E = h\nu$$

όπου, E η ενέργεια των φωτονίων
 h η σταθερά του Planck,
 ν η συχνότητα .[2]

Ως σωματίδια, τα φωτόνια φέρουν επίσης ορμή, που δίνεται από τη σχέση:

$$p = \frac{E}{c} = \frac{h\nu}{c} = \frac{h}{\lambda}$$

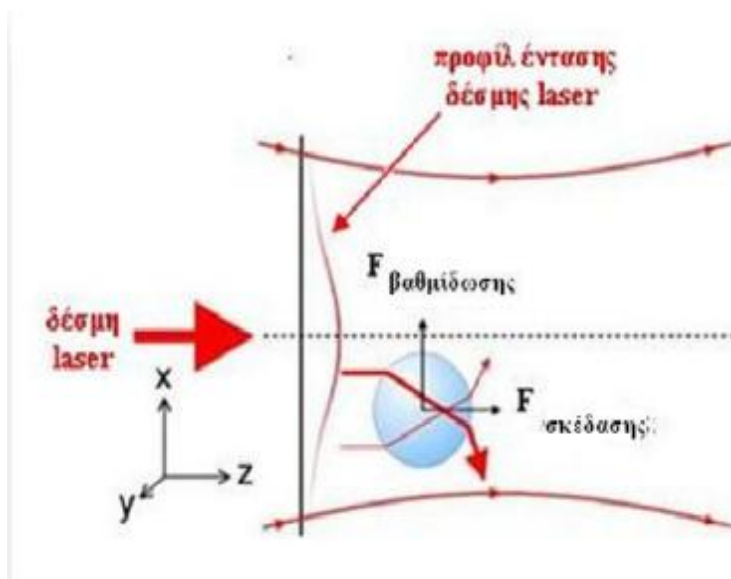
όπου p η ορμή.[2]

β) να προσδιορίσουμε την αλλαγή της ορμής των φωτονίων η οποία συναρτάται με τη διεύθυνση διάδοσης του φωτός (ανάκλαση, διάθλαση)

Όπως προείπαμε, η δύναμη που ασκείται σε ένα αντικείμενο και οφείλεται αποκλειστικά στην αλλαγή της ορμής του φωτός που προσπίπτει πάνω του, ονομάζεται πίεση ακτινοβολίας (radiation pressure). Οποιαδήποτε αλλαγή στη διεύθυνση διάδοσης του φωτός, από ανάκλαση ή διάθλαση, οδηγεί σε αλλαγή στην ορμή του φωτός. Εάν ένα αντικείμενο κάμπτεται το φως, μεταβάλλοντας την ορμή του, η διατήρηση της ορμής απαιτεί το αντικείμενο να υποβληθεί σε μια ίση και αντίθετη αλλαγή ορμής[3] Αυτό συνεπάγεται άσκηση μιας δύναμης στο αντικείμενο. Το εισερχόμενο φως είναι μία ακτίνα laser, με προφίλ έντασης που περιγράφεται από μία καμπύλη Gauss. Δηλαδή, η ένταση του φωτός στο κέντρο της ακτίνας είναι μεγαλύτερη από την ένταση στις άκρες.

Όταν αυτό το φως αλληλεπιδρά με ένα σφαιρίδιο, οι ακτίνες φωτός κάμπτονται σύμφωνα με τους νόμους της ανάκλασης και της διάθλασης, οπότε στο σφαιρίδιο ασκούνται δύο δυνάμεις, κάθετες μεταξύ τους. Η μία δύναμη, που ονομάζεται δύναμη σκέδασης (scattering force), δημιουργείται λόγω της απώλειας ορμής από την ανάκλαση της δέσμης laser προς τα πίσω και τείνει να κινήσει τη σφαίρα κατά τη διεύθυνση διάδοσης του φωτός, για να αντισταθμίσει την απώλεια αυτή. Η άλλη δύναμη, που ονομάζεται δύναμη βαθμίδωσης (gradient force), δημιουργείται λόγω της διάθλασης του φωτός που διέρχεται από το σφαιρίδιο, η οποία έχει μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης από το περιβάλλον μέσο και τείνει να τραβήξει τη χάντρα προς την αύξουσα ένταση του φωτός (κέντρο δέσμης). Η συνισταμένη δύναμη οδηγεί σε σταθερή παγίδευση, όταν η επίδραση της δύναμης βαθμίδωσης είναι αρκετά μεγάλη ώστε να υπερνικήσει την επίδραση της δύναμης σκέδασης ($F_{grad} > F_{scat}$) .[1]Το σφαιρίδιο έχει υψηλότερο δείκτη διάθλασης από αυτόν του περιβάλλοντος μέσου (το

οποίο συνήθως είναι νερό), με τυπικές αναλογίες $\frac{n(\text{σωματιδίου})}{n(\text{περιβάλλοντος μέσου})}$



Εικόνα 1.1 Απεικονίζει το σωματίδιο εντός της δέσμης λέιζερ όπου η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζει το κέντρο της ακτίνας, η F_{grad} είναι $F_{βαθμίδωσης}$ και η F_{scat} είναι η $F_{σκέδασης}$. Η F_{grad} ‘τραβάει’ το σωματίδιο προς το κέντρο της ακτίνας ενώ η F_{scat} το ωθεί παράλληλα με το κέντρο της ακτίνας.[21]

Βήμα 2^ο : Μεγιστοποίηση της δύναμης που ασκείται στο αντικείμενο με σκοπό την καλύτερη παγίδευση

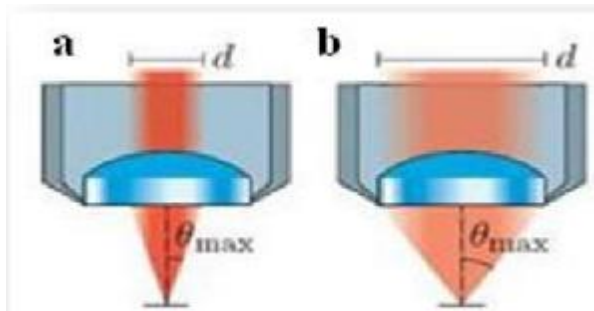
Για σταθερή παγίδευση απαιτείται η F_{grad} να είναι μεγαλύτερη της F_{scat} , προκειμένου το σωματίδιο να κινείται πιο κοντά προς το κέντρο της ακτίνας ώστε να παγιδεύεται. ($F_{grad} > F_{scat}$). Επομένως είναι απαραίτητη η χρήση ενός αντικειμενικού φακού για εστίαση της ακτίνας[1,2]

Έστω θ_{max} η γωνία πρόσπτωσης της ακτίνας στο επιθυμητό σημείο, τότε όσο μεγαλύτερη είναι η θ_{max} τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η βαθμίδωση, άρα και η F_{grad} . Η μέγιστη γωνία πρόσπτωσης θ_{max} ορίζεται από τον αντικειμενικό φακό που εστιάζει τη δέσμη laser. Πως θα χουμε μεγάλη θ_{max} άρα και F_{grad} ?

Δυο παράμετροι που εμπλέκονται :

1) Μία βασική παράμετρος του φακού είναι το αριθμητικό του άνοιγμα (Numerical Aperture, NA). Το NA είναι ένα μέτρο της γωνίας υπό της οποίας μπορεί ο αντικειμενικός φακός να συγκεντρώσει το φως. Θα πρέπει, λοιπόν, να χρησιμοποιούνται φακοί με μεγάλο NA.

2) Μία δεύτερη παράμετρος, που επηρεάζει το θ_{max} κατά παρόμοιο τρόπο, είναι η διάμετρος της δέσμης laser. Μεγαλύτερη διάμετρος δίνει μεγαλύτερο θ_{max} και επομένως μεγαλύτερη βαθμίδωση στην ένταση της δέσμης laser. Αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερη δύναμη βαθμίδωσης F_{grad} , καθιστώντας την ικανή να υπερνικήσει την δύναμη σκέδασης F_{scat} . Για τη βελτιστοποίηση, λοιπόν, της παγίδευσης με μία δέσμη, που το προφίλ της έντασης δίνεται από καμπύλη του Gauss, η δέσμη θα πρέπει να υπερκαλύπτει το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού.[1,2,7]



Εικόνα 1.2 Αύξηση της γωνίας θ_{max} με αύξηση της διαμέτρου d της δέσμης laser που περνάει από το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού. Μέγιστη θ_{max} όταν η δέσμη laser καλύπτει πλήρως το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού (a) Δέσμη laser καλύπτει μέρος του πίσω ανοίγματος του αντικειμενικού φακού (b) Δέσμη laser υπερκαλύπτει το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού.[22]

Βήμα 3^ο : Βελτιστοποίηση της παγίδευσης

Γενικότερα, η δύναμη που ασκείται πάνω στο σωματίδιο είναι

$$F = QnP/c$$

Όπου F = δύναμη που ασκείται

Q = αδιάστατη παράμετρος αποκλειστικότητας (δηλαδή ένα μέγεθος που εξαρτάται από τις ιδιότητες του παγιδευμένου αντικειμένου: σχήμα, μέγεθος, δείκτη διάθλασης του κοκ)

n = δείκτης διάθλασης περιβάλλοντος μέσου

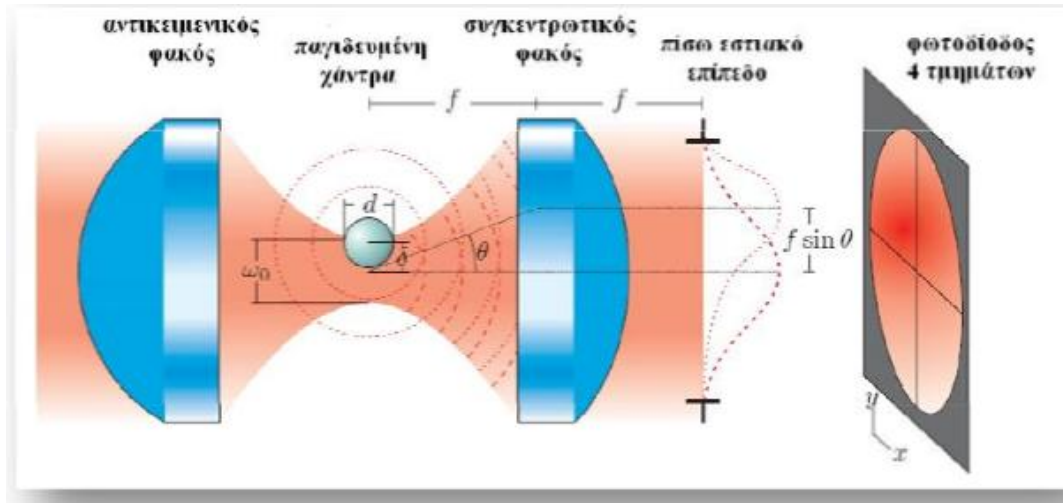
P = ισχύς του λέιζερ

c = ταχύτητα του φωτός

Το Q περιλαμβάνει την επίδραση του laser στην σκληρότητα της παγίδας, το μέγεθος και το προφίλ της δέσμης, την πόλωση της δέσμης και τη γωνία σύγκλισης. Στο Q λαμβάνονται υπόψη και οι οπτικές ιδιότητες του παγιδευμένου αντικειμένου, όπως το σχήμα, το μέγεθος και ο δείκτης διάθλασης. Από την παραπάνω σχέση είναι φανερό ότι η παγίδευση μπορεί να γίνει πιο αποτελεσματική αυξάνοντας την ισχύ του laser, το δείκτη διάθλασης του περιβάλλοντος μέσου ή το Q . Η ισχύς του laser μπορεί να αυξηθεί μέχρι κάποιο σημείο, υπέρβαση του οποίου μπορεί να οδηγήσει σε θέρμανση ή καταστροφή των οπτικών ή του βιολογικού δείγματος. Αύξηση του δείκτη διάθλασης δεν νοείται καθώς σχεδόν όλα τα βιολογικά δείγματα απαιτούν υδατικούς διαλύτες ($n=1,33$). Αυτό που μένει είναι η βελτιστοποίηση της γεωμετρικής παραμέτρου Q . [1,2,7]

3. Μέτρηση δυνάμεων

Οι οπτικές λαβίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μετρήσουν άμεσα δυνάμεις στα παγιδευμένα αντικείμενα. Αναφέρθηκε ήδη, ότι μια διηλεκτρική σφαίρα, που συγκρατείται σε κάποια θέση μακριά από το κέντρο της δέσμης laser δέχεται μια ελκτική δύναμη προς το κέντρο της δέσμης. Συμπεριφέρεται, δηλαδή, ως ένα ελατήριο, όπου η δύναμη αποκατάστασης είναι ανάλογη προς την απόσταση μεταξύ του κέντρου της σφαίρας και του κέντρου της δέσμης laser. Η μετατόπιση της σφαίρας από το κέντρο της παγίδας εκτρέπει επίσης την δέσμη laser. Η εκτροπή αυτή της δέσμης μπορεί να καταγραφεί από ένα φωτοανιχνευτή, όπως μία φωτοδίοδο 4 τμημάτων. Σε αυτή την περίπτωση, ένας συγκεντρωτικός φακός τοποθετείται μετά τον αντικειμενικό φακό και μετατρέπει τις γωνιακές εκτροπές σε εγκάρσιες αποκλίσεις, οι οποίες καταγράφονται από τον ανιχνευτή.



Εικόνα 1.3 Απεικόνιση του παγιδευμένου σωματιδίου μεταξύ του αντικειμενικού και συγκεντρωτικού φακού με φωτοδίοδο 4 τμημάτων ως ανιχνευτή.[23]

Είναι εξαιρετικά σημαντικό να τονιστεί ότι οι αποκλίσεις αυτές είναι απευθείας ανάλογες της αλλαγής στην ορμή του φωτός και συνεπώς της δύναμης, αν και μόνο αν συλλέγονται όλες οι ακτίνες φωτός. Από τη στιγμή, όμως, που η δέσμη laser υπερκαλύπτει το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού, οποιαδήποτε εκτροπή της δέσμης δεν συλλέγεται από τον συγκεντρωτικό φακό και επομένως δεν μπορεί να μετρηθεί απ' ευθείας η δύναμη. Το όργανο, σε αυτή την περίπτωση, πρέπει με κάποιο τρόπο να βαθμονομηθεί. [1,9,10,11,12]

Με άλλα λόγια, η δύναμη των οπτικών λαβίδων μπορεί γενικά να περιγραφεί από τον νόμο του Hooke:

$\mathbf{F} = \mathbf{kx}$ όπου F η δύναμη αποκατάστασης που ασκείται στο παγιδευμένο αντικείμενο,

x η μετατόπιση από το κέντρο της δέσμης

και k μία σταθερά που αναφέρεται ως σκληρότητα της παγίδας (trap stiffness).[1,3]

Κατά συνέπεια, εάν καθοριστεί η σταθερά k , μετρώντας τη μετατόπιση της σφαίρας από την παγίδα, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η δύναμη που ασκείται πάνω της. Η πιο ακριβής μέθοδος βαθμονόμησης υπολογίζει τη σταθερά k (σε pN/nm) από το

φάσμα θερμικής ισχύος και συσχετίζει την μετατόπιση του παγιδευμένου αντικειμένου με Volts υπολογίζοντας την ευαισθησία του ανιχνευτή (σεV/nm). Καθώς η σταθερά k και η ευαισθησία του ανιχνευτή εξαρτώνται από τοπικές παραμέτρους (ισχύς laser, δείκτης διάθλασης παγιδευμένου αντικειμένου, ιξώδες υγρού, κτλ), θα πρέπει να προσδιορίζονται για κάθε νέα μέτρηση. Αυτό αποτελεί μεγάλο μειονέκτημα της τεχνικής.

Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα πρέπει όλες οι ακτίνες φωτός να συλλέγονται ακόμη και μετά την εκτροπή της δέσμης, οπότε η δέσμη laser δεν πρέπει να καλύπτει πλήρως το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού αλλά μόνο μέρος αυτού. Σε αυτή την περίπτωση, όμως, η βαθμίδωση της έντασης της δέσμης laser είναι πολύ μικρή για να υπερνικήσει την δύναμη σκέδασης F_{scat} και η παγίδευση δεν είναι σταθερή.

4. Οπτικές λαβίδες διπλής δέσμης

Αντί για μια δέσμη μπορούν να χρησιμοποιηθούν λαβίδες διπλής δέσμης καθώς προσφέρουν πληθώρα θετικών στοιχείων. Η χρήση μάλιστα των οπτικών λαβίδων διπλής δέσμης οδήγησε, τα τελευταία χρόνια, σε μεγάλη πρόοδο στην μελέτη μεμονωμένων μορίων. Για να υπάρχει σταθερή παγίδευση, χωρίς όμως να υπερκαλύπτεται το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού, στους παραπάνω τύπους αντί να χρησιμοποιηθεί μία δέσμη laser προτιμάται να χρησιμοποιηθούν δύο αντίθετα διαδιδόμενες δέσμες laser, οι οποίες εστιάζουν στο ίδιο σημείο. Οι δυνάμεις σκέδασης που δημιουργούνται από τις δύο δέσμες laser αλληλοαναιρούνται, οπότε δεν υπάρχει μετατόπιση κατά το z άξονα και η παγίδευση του αντικειμένου σταθεροποιείται. Οι δυνάμεις παγίδευσης που δημιουργούνται για δεδομένη ισχύ του laser είναι ισχυρότερες από αυτές των οπτικών λαβίδων απλής δέσμης. Οι οπτικές λαβίδες διπλής δέσμης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές δύναμης μετρώντας απ'ευθείας την αλλαγή στην ορμή του φωτός. Πριν από κάθε νέα μέτρηση δεν χρειάζεται βαθμονόμηση, επειδή ο προσδιορισμός των δυνάμεων εξαρτάται μόνο από παραμέτρους του οργάνου, όπως φαίνεται από τις παραπάνω σχέσεις, οι οποίες δεν μεταβάλλονται με τις συνθήκες του πειράματος. Ένας ανιχνευτής μπορεί να μετρήσει τη δύναμη που ασκείται στο παγιδευμένο αντικείμενο στο x - y επίπεδο καταγράφοντας εντάσεις ρευμάτων εξόδου για τους δύο άξονες x και y .

$F_x = I_x R / c a f$ και $F_y = I_y R / c a f$ F_x και F_y =οι δυνάμεις στο επίπεδο x-y,

I_x και I_y =οι αντίστοιχες εντάσεις που καταγράφει ο ανιχνευτής,

R = ακτίνα ανιχνευτή

f =η εστιακή απόσταση των φακών,

a = παράγοντας αποτελεσματικότητας του ανιχνευτή

c =η ταχύτητα του φωτός[1,13,14]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

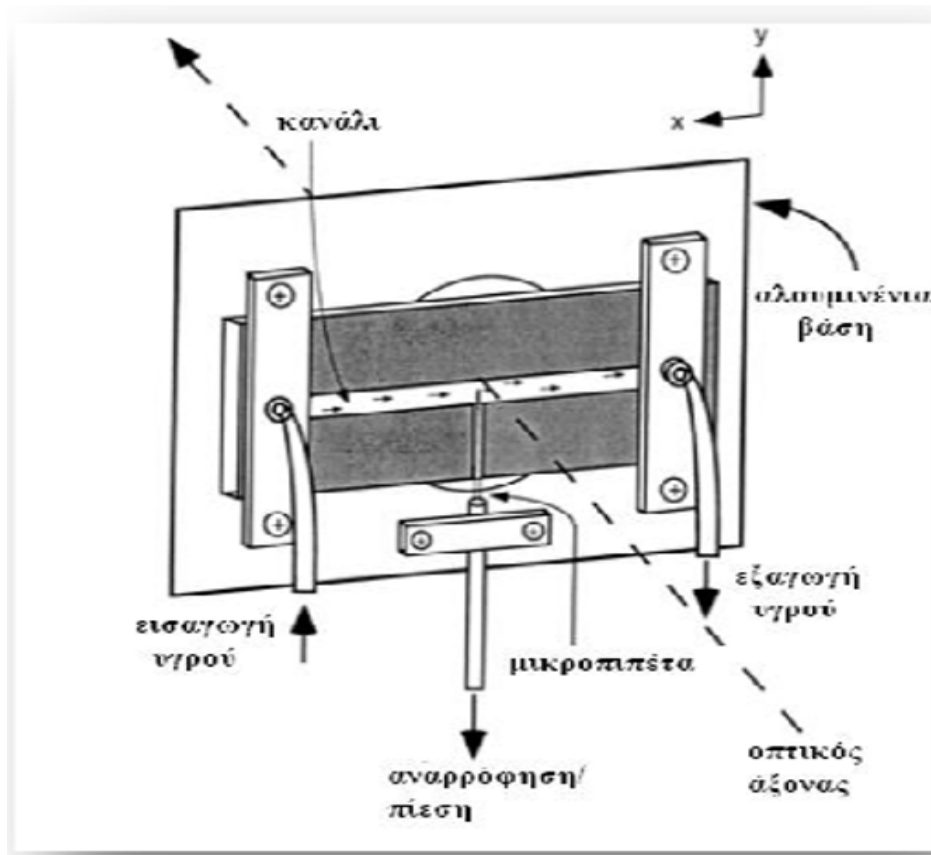
Εισαγωγή

Καθώς η τεχνική των οπτικών λαβίδων αναπτύχθηκε, είχε ολοένα και περισσότερες εφαρμογές στις βιολογικές επιστήμες. Κάποιες από αυτές είναι η παρατήρηση του βήματος μεμονωμένων μορίων κινεσίνης (Svoboda)[17] και αργότερα του ρυθμού της κίνησης αυτής (Svoboda and Block)[16], οι πρώτες καμπύλες δύναμης σε συνάρτηση με την έκταση δίκλωνων μορίων DNA και η παρατήρηση της κίνησης μεμονωμένης πρωτεΐνης στην εξωτερική μεμβράνη E.coli[4]. Προηγούμενες μελέτες μεμονωμένων μορίων έκαναν χρήση της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων (AFM) για να χαρακτηρίσουν την μηχανική μετουσίωση και αναδίπλωση πρωτεϊνών, όπως η GFP. Αν και χρήσιμη, αυτή η προσέγγιση περιοριζόταν στον χαρακτηρισμό της μετουσίωσης των πρωτεϊνών με χρήση υψηλών δυνάμεων. Η άμεση παρατήρηση της διαδικασίας αναδίπλωσης ήταν δύσκολη, εν μέρει λόγω της υψηλής σταθεράς k του βραχίονα του AFM, που ασκεί μεγάλα φορτία δυνάμεων. Αντίθετα, οι οπτικές λαβίδες, έχουν μειωμένη μηχανική σκληρότητα, οπότε μπορούν να ασκήσουν σημαντικά μικρότερα φορτία δυνάμεων και να χαρακτηρίσουν καλύτερα την μετουσίωση και στη συνέχεια αναδίπλωση μορίων RNA και μεμονωμένων πρωτεϊνών, όπως η RNase. Πρόσφατες μελέτες με οπτικές λαβίδες επικεντρώθηκαν στη διαδικασία της μεταγραφής με την παρατήρηση της RNA πολυμεράσης, καθώς και στην μελέτη της κίνησης ενός μορίου mRNA κατά τη διάρκεια της μετάφρασης από μεμονωμένα ριβοσώματα, όπου επιβεβαιώθηκε ότι η μετάφραση δεν είναι μία συνεχής διεργασία αλλά λαμβάνει χώρα μέσω πολλαπλών κύκλων μετακίνησης και παύσης. Για όλα αυτά, όμως θα μιλήσουμε παρακάτω αφού πρώτα :

- 1) Θα δείξουμε ενδεικτικά τον πιο σύνθητη μηχανισμό πειραμάτων με οπτικές λαβίδες
- 2) Θα αναλύσουμε κάποιες ουσιώδεις βιολογικές έννοιες
- 3) Θα παρουσιάσουμε κάποιες ενδεικτικές εφαρμογές, μια κλασσική εφαρμογή και μια καινοτόμο

1. Δημιουργία πειραματικού μηχανισμού

A. Ο θάλαμος του δείγματος



Εικόνα 2.1 Ο θάλαμος του δείγματος , η ροή νερού μέσα στο θάλαμο και η σύστασή του[23]

Το σύστημα ανταλλαγής διαλυμάτων στον θάλαμο έχει ως εξής: η ροή και ανταλλαγή των διαλυμάτων μέσα στο θάλαμο ελέγχονται από δοχεία πίεσης και ένα αυτόματο σύστημα βαλβίδων. Η ροή των διαφόρων διαλυμάτων από τα δοχεία πίεσης επιτυγχάνεται με υδροστατική πίεση και η εισαγωγή τους στο θάλαμο με το αυτόματο σύστημα βαλβίδων. Το διάλυμα που εξέρχεται από τον θάλαμο λόγω της εισαγωγής του νέου διαλύματος συλλέγεται σε ένα δοχείο απορριμμάτων. Με αυτόν τον τρόπο καθαρίζεται ο θάλαμος, αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες αέρα και εισάγονται σφαίρες αιωρημένες σε διάλυμα.[14,15]

Το πλεονέκτημα αυτού του συστήματος, σε σχέση με τις περισταλτικές αντλίες, είναι ότι δεν περιέχει μηχανικά εξαρτήματα, που θα επηρέαζαν τη σταθερότητα της ροής. Ο θάλαμος του δείγματος κατασκευάζεται σφραγίζοντας αεροστεγώς, με θέρμανση

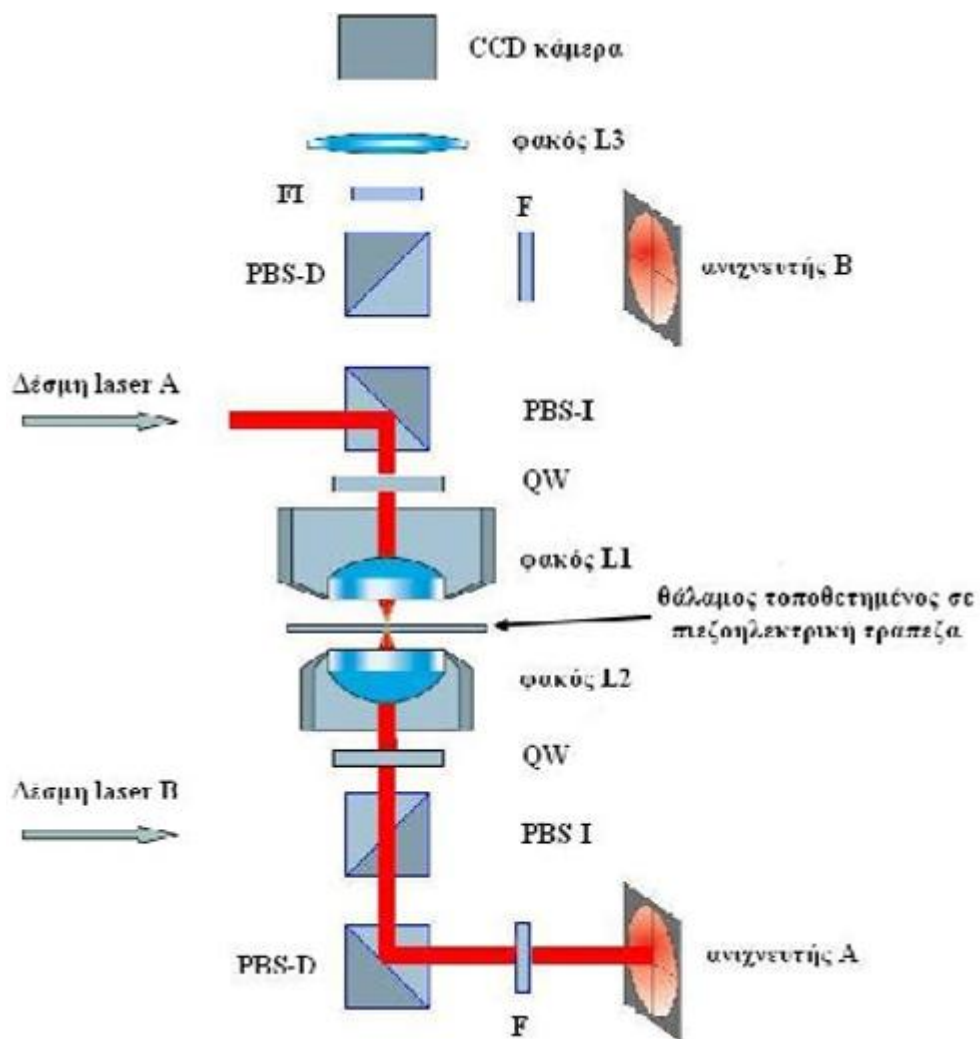
και πίεση, δύο στρώσεις παραφίλμ μεταξύ δύο αντικειμενοφόρων πλακών, ώστε να μην υπάρχει διαρροή. Πριν το σφράγισμα το παραφίλμ κόβεται, ώστε να σχηματιστεί ένα κανάλι ($50 \times 3.5 \times 0.3$ mm), που επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος. Επίσης, ένας καθετήρας από χαλαζία, εσωτερικής διαμέτρου 100 μm , τοποθετείται μεταξύ των δύο στρώσεων του παραφίλμ, που επιτρέπει την εισαγωγή ενός μικροσιφωνίου στον θάλαμο. Δύο οπές ανοίγονται στον θάλαμο για εισαγωγή και εξαγωγή υγρών και στη συνέχεια, ο θάλαμος στερεώνεται σε μία βάση αλουμινίου. Το μικροσιφώνιο (εσωτερικής διαμέτρου $< 1 \mu\text{m}$) δημιουργείται με ολκή ενός τριχοειδούς γυάλινου σωλήνα (εσωτερικής διαμέτρου 40 μm), εισάγεται στον θάλαμο μέσω του καθετήρα από χαλαζία και συνδέεται στην άλλη άκρη με μία σύριγγα, που επιτρέπει την αναρρόφηση σφαιρών μεγέθους μικρομέτρων στην άκρη της μικροπιπέτας. Μία σφαίρα στερεωμένη στην άκρη του μικροσιφωνίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία ευκόλως ανταλλάξιμη επιφάνεια, με καθορισμένες χημικές ιδιότητες, πάνω στην οποία μπορούν να δεσμευτούν και να μελετηθούν διάφορα μόρια. Ο ρυθμός της ροής μέσα στο θάλαμο είναι απ'ευθείας ανάλογος της υψομετρικής διαφοράς μεταξύ των δοχείων εισαγωγής διαλυμάτων και του δοχείου απορριμμάτων επί την εφαρμοζόμενη πίεση. Ο όγκος των διαλυμάτων μέσα στα δοχεία πίεσης είναι περίπου 4ml, πολύ μικρότερος από τον όγκο του αέρα στο σύστημα πίεσης (~80 κυβικά εκατοστά) και ο μέσος ρυθμός ροής είναι μικρός (~1 $\mu\text{l/s}$). Έτσι, η αλλαγή στον όγκο του αέρα, λόγω του εκτοπιζόμενου διαλύματος, είναι μικρή και η ροή παραμένει σταθερή.[14,15]

B. Τοποθέτηση του θαλάμου στο σύστημα

Ο θάλαμος τοποθετείται μέσω της αλουμινένιας βάσης σε μία μαγνητική πιεζοηλεκτρική τράπεζα, που επιτρέπει κίνηση στις τρεις διαστάσεις, 100 μm για τους άξονες x, y και 20 μm για τον άξονα z και κάθε άξονας ελέγχεται με ένα σήμα διαφοράς δυναμικού (0-100 V).

Η διάταξη αποτελείται από δύο ίδιους φακούς (L1 και L2), που χρησιμοποιούν νερό ως υγρό βύθισης. Ο ένας παίζει το ρόλο του αντικειμενικού και ο άλλος του συγκεντρωτικού φακού, ανάλογα σε ποια από τις δύο δέσμες laser γίνεται η αναφορά. Μία δέσμη laser (laser A, με $\lambda=830$ nm, $P_{\text{max}}=200$ mW), κάθετα πολωμένη, ανακλάται από ένα διαχωριστή πολωμένης δέσμης (Polarized Beam Splitter, PBS) και αφού περάσει μέσα από δύο πλακίδια καθυστέρησης φάσης $\lambda/4$ (Quarter-Wave

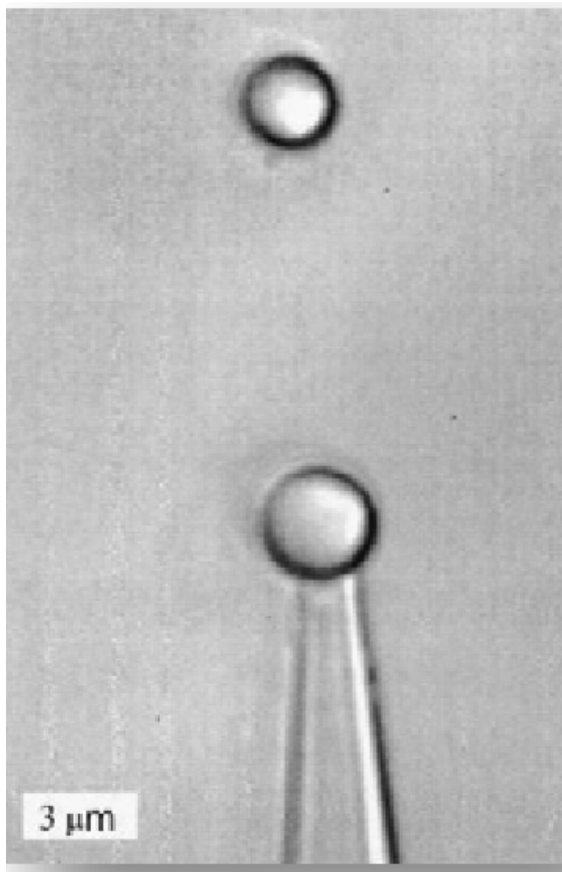
plates, QW) και τους δύο φακούς L1 και L2 μετατρέπεται σε οριζόντια πολωμένη. Γι' αυτό το λόγο διέρχεται μέσα από τον επόμενο PBS-I (PBS-Injection) και επανακατευθύνεται μέσω του PBS-D (PBS-Detection) στον ανιχνευτή. Καθώς η διάταξη είναι πλήρως συμμετρική, μία δεύτερη δέσμη laser (laser B) μπορεί επίσης να εισαχθεί και να ανιχνευτεί από τον ανιχνευτή B. Ο κάθε ανιχνευτής είναι μία φωτοδίοδος 4 τμημάτων, η οποία μετράει απ' ευθείας τις εντάσεις των ρευμάτων I_x και I_y , οι οποίες είναι απαραίτητες για τον υπολογισμό της δύναμης[14,15]



Εικόνα 2.2 Πειραματική διάταξη για την εισαγωγή και ανίχνευση δύο αντίθετα διαδιδόμενων δεσμών laser. PBS διαχωριστής πολωμένης δέσμης, QW πλακίδιο καθυστέρησης φάσης, F φίλτρο χαμηλής συχνότητας. Επίσης φαίνονται στο σχήμα LED δίοδος εκπομπής φωτός (480nm), DM διχρωματικό κάτοπτρο και FI φίλτρο χαμηλής συχνότητας για απεικόνιση. Ο φακός L3 είναι επιπεδόκυρτος για απεικόνιση του εστιακού επιπέδου του φακού L2 σε μία CCD κάμερα.[24]

Γ. Καταγραφή πειράματος

Κάθε πείραμα που λαμβάνει χώρα μέσα στο θάλαμο πρέπει να απεικονιστεί και να καταγραφεί από ένα στοιχείο συζευγμένου φορτίου (Charge Coupled Device, CCD κάμερα).



Εικόνες 2.3 Απεικόνιση μίας σφαίρας (διαμέτρου 3.1 μm) στερεωμένης στο μικροσιφώνιο με αναρρόφηση. Στο πάνω μέρος, μία δεύτερη χάντρα (διαμέτρου 2.9 μm) είναι παγιδευμένη από τις δύο αντίθετα διαδιδόμενες δέσμες laser των οπτικών λαβίδων.[23]

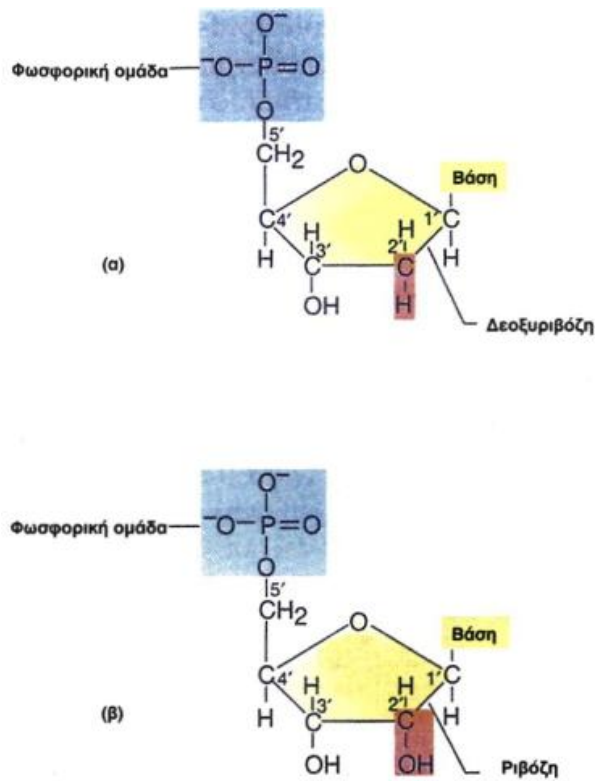
Μία δίοδος εκπομπής φωτός (Light Emitting Diode, LED) παρέχει φως μήκους κύματος 480 nm, το οποίο ανακλάται αρχικά από ένα διχρωματικό κάτοπτρο (Dichroic Mirror, DM) και κατόπιν περνάει από τον αντικειμενικό φακό. Ένας επιπεδόκυρτος φακός L3 χρησιμοποιείται για την απεικόνιση του δείγματος πάνω στην CCD κάμερα. Ενδιάμεσα υπάρχει φίλτρο χαμηλής συχνότητας (Filter for Imaging, FI), το οποίο αφαιρεί την ανεπιθύμητη, για την κάμερα CCD, ακτινοβολία υπερύθρου[14,15]

2. Ανάλυση βασικών βιολογικών εννοιών

A. DNA

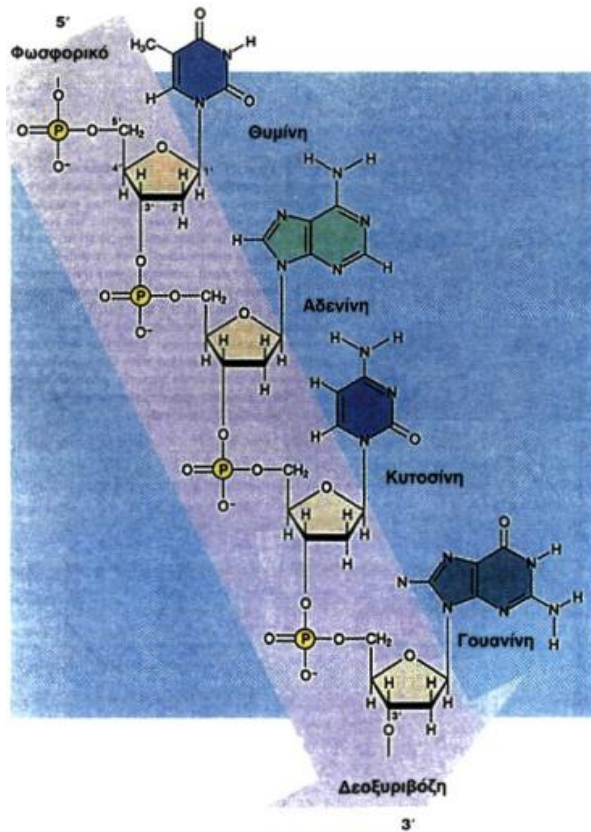
Γενετικό υλικό του ανθρώπινου οργανισμού. Περιέχει τη γενετική πληροφορία (η οποία όπως θα δούμε παρακάτω, στα ριβωσώματα, στο στάδιο της μετάφρασης περνάει στις πρωτεΐνες). Το μοντέλο της διπλής έλικας (Γουότσον και Γκρίκ) οργανώνεται ως εξής:

Ένα νουκλεοτίδιο, αποτελείται από μια φωσφορική ομάδα, μια πεντόζη (τη δεοξυριβόζη στο DNA, τη ριβόζη στο RNA) και μια αζωτούχο βάση (αδενίνη, θυμίνη, κυτοσίνη, γουανίνη)[4]



Εικόνα 2.4 Απεικόνιση της πεντόζης : δεοξυριβόσης (α) και ριβόζης (β) . Αριστερά υπάρχει πρόσδεση με τη φωσφορική ομάδα και δεξιά η πρόσδεση με το υδρογόνο (χαρακτηριστικό της δεοξυριβόζης) και με το υδροξύλιο (χαρακτηριστικό της πεντόζης)[4]

Πολλά νουκλεοτίδια μαζί συνθέτουν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Στο σχηματισμό της αλυσίδας κάθε νουκλεοτίδιο συνδέεται με το επόμενο του με δεσμό που δένει την πεντόζη του ενός με τη φωσφορική βάση του επομένου.



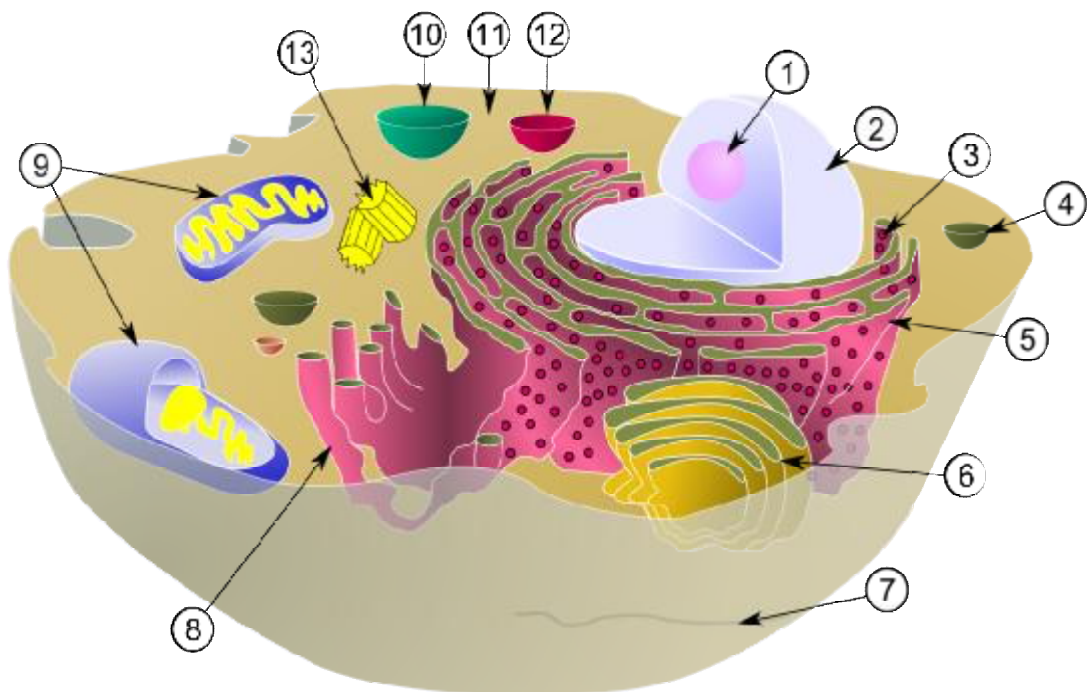
Εικόνα 2.5 Πρόσδεση περισσότερων νουκλεοτιδίων σε μια μονή έλικα.

Στη συνέχεια, συμπληρωματικές βάσεις μιας δεύτερης αλυσίδας δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τις βάσεις της πρώτης αλυσίδας και σχηματίζεται διπλή έλικα.[4]

B. Κύτταρο

Ως κύτταρο ονομάζεται το μικρότερο δομικό συστατικό της έμβιας ύλης, που αποτελείται από μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων, που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, δηλαδή η βασική δομική και λειτουργική μονάδα που εκδηλώνει το φαινόμενο της ζωής. Ολόκληρο το κύτταρο περιβάλλεται από τη κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη. Το κύτταρο διαθέτει μορφολογική, φυσική και χημική οργάνωση και την ικανότητα της αφομοίωσης, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Είναι μια μονάδα της ζωής ανεξάρτητη ως προς την αυτορύθμιση και την προσαρμοστικότητά του σε σχέση με το περιβάλλον. Ο χώρος εντός του οποίου βιώνουν τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών ονομάζεται μεσοκυττάριο υγρό.

Τα κύτταρα διακρίνονται σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά, ανάλογα με το αν διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα (ευκαρυωτικά) ή όχι (προκαρυωτικά). Σε αυτή την ταξινόμηση εξαίρεση αποτελούν οι ιοί, και οι φάγοι, μια ιδιαίτερη κατηγορία «οργανισμών» με δυνατότητα παρέμβασης στις κυτταρικές λειτουργίες. Άλλη ιδιόμορφη κατηγορία ύλης είναι τα μυκοπλάσματα (PPLO), μια ενδιάμεση μορφή ζωής ανάμεσα στους ιούς και τα βακτήρια. Μία ακόμη κατηγορία είναι τα απλοειδή και τα διπλοειδή κύτταρα που διακρίνονται σύμφωνα με τον αριθμό χρωμοσωμάτων που υπάρχουν στον πυρήνα: Τα απλοειδή φέρουν περιττό αριθμό χρωμοσωμάτων, τα διπλοειδή άρτιο[5]



Εικόνα 2.6 Σε ένα τυπικό, ευκαρυωτικό κύτταρο παρατηρούνται τα εξής διαφοροποιημένα τμήματα, τα οποία επονομάζονται κυτταρικά οργανίδια (με αρίθμηση όπως εικονίζονται)[18]

1. Πυρηνίσκος
2. Πυρήνας
3. Ριβόσωμα

4. Κυστίδιο
5. Τραχύ ενδοπλασματικό_δίκτυο
6. Συμπλεγμα_Golgi
7. Κυτταροσκελετός
8. Λείο ενδοπλασματικό_δίκτυο
9. Μιτοχόνδρια
10. Κενοτόπιο
11. Κυτταρόπλασμα
12. Λυσόσωμα
13. Κεντριόλιο μέσα_σε Κεντροσωμάτιο

Γ. Τα ριβοσώματα

Όλα τα κύτταρα περιέχουν ριβοσώματα καθώς για την ανάπτυξη και τη λειτουργία τους χρειάζεται συνεχής σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων καθώς και στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών. Ο αριθμός των ριβοσωμάτων που υπάρχουν σε ένα κύτταρο είναι πολύ μεγάλος, κυμαίνεται από 10⁴ στα προκαρυωτικά κύτταρα έως 10⁷ στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα E.coli[4], τα ριβοσώματα αποτελούν γύρω στο 50% της συνολικής μάζας του κυττάρου.

Τα ριβοσώματα είναι τα κυτταρικά σωματίδια που καταλύουν τον διαδοχικό πολυμερισμό αμινοξέων, σύμφωνα με τη γενετική πληροφορία που είναι κωδικοποιημένη σε ένα μόριο αγγελιοφόρου-RNA (mRNA), ώστε να βιοσυνθέσουν πρωτεΐνες. Οι βασικές τους λειτουργίες είναι η διασφάλιση της ορθής αποκωδικοποίησης της γενετικής πληροφορίας που μεταφέρει το mRNA και η δημιουργία πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων, αλλά είναι αρκετά πιθανή και η συμμετοχή τους στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών.

Τα ριβοσώματα είναι ριβονουκλεοπρωτεϊνικά (Ribo Nucleo Protein, RNP) σύμπλοκα, αποτελούμενα κατά τα 2/3 από RNA και 1/3 από ριβωσωμικές πρωτεΐνες.[14,15]

Συστατικό 1^ο : Ριβωσωμικές πρωτεΐνες

Η ονομασία των ριβωσωμικών πρωτεϊνών αναφέρεται στην θέση τους στο ριβόσωμα (S και L για τις πρωτεΐνες της μικρής και της μεγάλης υπομονάδας αντίστοιχα). Οι πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην σταθεροποίηση της δομής του ριβοσώματος καθώς το θετικό τους φορτίο αντισταθμίζει το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων του ριβωσωμικού RNA. Ένας μεγάλος αριθμός ριβωσωμικών πρωτεϊνών παρουσιάζει παντελή έλλειψη συγκεκριμένων αμινοξέων. Τα τέσσερα αμινοξέα που λείπουν πιο συχνά είναι η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη. Αυτά τα αμινοξέα θεωρούνται τα πιο απαραίτητα για τη διατροφή των θηλαστικών αλλά προφανώς όχι για το ριβόσωμα.

Συστατικό 2^ο: Ριβωσωμικό rRNA

Πρέπει να διακρίνουμε σε πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή δομή. Στην πρωτοταγή δομή έχουμε απλά συστατικά του rRNA, στη δευτεροταγή σχηματισμό κάποιων ελίκων σε δισδιάστατο χώρο και στην τριτογενή δομή αναδίπλωση στο χώρο του μορίου και τρισδιάστατη μορφή.

Η δευτεροταγής δομή των ριβωσωμικών RNAs αποτελείται από μία πολύπλοκη διευθέτηση ελίκων Α-μορφής και μη ελικοειδών περιοχών. Η τριτοταγής δομή των ριβωσωμικών RNAs έχει πρόσφατα αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό μετά από τη δημοσίευση της δομής της 30S υπομονάδας από τον οργανισμό *T.thermophilus*. Στη δε πρωτοταγή δομή, η μεθυλίωση στη ριβόζη φαίνεται πως προστατεύει τον γειτονικό φωσφοδιεστερικό δεσμό από τη δράση ριβονουκλεασών, γι'αυτό οι μεθυλομάδες των ριβοζών συνδέονται στα πρώτα στάδια της βιοσύνθεσης των ριβοσωμάτων όπου το rRNA είναι ακόμη εκτεθειμένο στις ριβονουκλεάσες και απαιτείται άμεση προστασία του. Αντίθετα οι τροποποιήσεις των βάσεων λαμβάνουν χώρα στα τελευταία στάδια της βιοσύνθεσης του ριβοσώματος παίζοντας ενδεχομένως ρόλο στη λειτουργία του ώριμου ριβοσώματος.

Τα ριβοσώματα έχουν 2 υπομονάδες. Η μικρή υπομονάδα εμπλέκεται στην αποκωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας μεσολαβώντας στις αλληλεπιδράσεις

μεταξύ mRNA και tRNAs, ενώ η μεγάλη υπομονάδα καταλύει την δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού.

Στα προκαρυωτικά κύτταρα :Η μικρή υπομονάδα (ταχ.καθίζησης 30S), αποτελείται από ένα μόριο ριβοσωμικού RNA (16S rRNA) και 21 ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Η μεγάλη υπομονάδα (50S) αποτελείται από δύο μόρια ριβοσωμικού RNA (23S rRNA και 5S rRNA) και 34 διαφορετικές πρωτεΐνες. Στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων τα ριβοσώματα είναι σημαντικά μεγαλύτερα με σταθερά καθίζησης 80S και μοριακή μάζα που κυμαίνεται από 3,9 μέχρι 4,5 x 10⁶ Daltons.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα: Η μικρή υπομονάδα (40S) περιέχει ένα μόριο ριβοσωμικού RNA (18S rRNA) και περίπου 30 ριβοσωμικές πρωτεΐνες ενώ η μεγάλη υπομονάδα (60S) περιέχει τρία μόρια ριβοσωμικού RNA (28S, 5S και 5,8S rRNA) και 45-50 πρωτεΐνες (ο ακριβής αριθμός ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ειδών)

Συγκρότηση των συστατικών σε ενιαίο ριβόσωμα: Κάποιες από τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες δεσμεύονται στο rRNA χωρίς καμία συνέργεια και είναι απαραίτητες για το σχηματισμό μιας πλήρως ενεργούς υπομονάδας, δηλαδή ξεκινούν την ορθή συγκρότηση των ριβοσωμικών υπομονάδων, που θα δώσουν στη συνέχεια ένα λειτουργικό ριβόσωμα. Δύο πρωτεΐνες για κάθε υπομονάδα επιτελούν αυτή τη λειτουργία:

Προκαρυωτικά κύτταρα: - Για τη 50S (μεγάλη υποομάδα): πρωτεΐνες L3 , L24/L20

- Για την 30S (μικρή υποομάδα): πρωτεΐνες S4 ,S7

Ευκαρυωτικά κύτταρα: - Για την 60S (μεγάλη): πρωτεΐνες L3 , L24

- Για την 40S (μικρή):πρωτεΐνες S4 , S7

Δεδομένου του μεγάλου αριθμού των ριβοσωμικών συστατικών, η σύνθεσή τους και η συγκρότηση του ριβοσώματος πρέπει να γίνουν απόλυτα συντονισμένα.

Σταθεροποίηση της δομής του ριβοσώματος [14,15]:

Όπως προαναφέρθηκε τα 23 του ριβοσώματος αποτελούνται από rRNA, πράγμα που σημαίνει ότι το ριβόσωμα είναι ένα μεγάλο πολυανιόν. Υπάρχουν τριών ειδών αλληλεπιδράσεις, οι οποίες σταθεροποιούν τη τριτοταγή δομή του rRNA:

1) οι γέφυρες Mg^{2+} ,

2) αλληλεπιδράσεις RNA-RNA και

3) αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεϊνών.

1) οι γέφυρες Mg^{2+} : Τα ιόντα μαγνησίου δημιουργούν ουδέτερες γέφυρες μεταξύ φωσφορικών ομάδων από διαφορετικές δευτεροταγείς δομές που έρχονται κοντά μεταξύ τους. Απομάκρυνση των ιόντων μαγνησίου οδηγεί σε διαχωρισμό του ριβοσώματος στις υπομονάδες του.

2) Αλληλεπιδράσεις RNA-RNA : σημαίνει είτε δημιουργία ζευγών βάσεων μεταξύ διαφορετικών δευτεροταγών δομών είτε δημιουργία A-ελάσσονων μοτίβων (A-minor motifs), όπου μία αδενίνη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μία ή δύο υδροξυλομάδες ενός ζεύγους γουανίνης-κυτοσίνης .

3) Στις αλληλεπιδράσεις RNA-πρωτεϊνών: οι πρωτεΐνες συνδέονται κυρίως με τα σάκχαρα και τις φωσφορικές ομάδες του rRNA. Αυτό σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες αναγνωρίζουν τη μορφή του rRNA και όχι συγκεκριμένες βάσεις, οπότε οι αλληλεπιδράσεις είναι μη ειδικές ως προς την νουκλεοτιδική ακολουθία του rRNA. Οι περισσότερες ριβοσωμικές πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του ριβοσώματος. Πολλές από αυτές έχουν μη σφαιρικές προεκτάσεις, οι οποίες εισχωρούν μέσα στο ριβόσωμα και γεμίζουν τα κενά μεταξύ των ελίκων του rRNA. Σε απομονωμένες ριβοσωμικές πρωτεΐνες αυτές οι προεκτάσεις, που περιέχουν περίπου 26% αργινίνη και λυσίνη, μοιάζουν με τυχαίες έλικες, οι οποίες αποκτούν την δομή που έχουν στο ριβόσωμα μόλις συνδεθούν σε αυτό.

Λειτουργία ριβοσώματος :

Όπως προαναφέρθηκε η βασική λειτουργία του ριβοσώματος είναι η σύνθεση πρωτεϊνών, μία διαδικασία που ονομάζεται μετάφραση. Μετάφραση ονομάζεται το στάδιο της έκφρασης της γεννητικής πληροφορίας κατά το οποίο δημιουργείται η πολυπεπτιδική αλυσίδα με βάση το mRNA. Η μετάφραση έπεται της μεταγραφής και

προηγείται της αναδίπλωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Όπως και το προηγούμενο στάδιο, η μετάφραση στηρίζεται στη συμπληρωματικότητα των νουκλεϊκών οξέων και στη δημιουργία και διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και τη δημιουργία των πεπτιδικών δεσμών.

Σε αυτό το στάδιο το RNA στο οποίο μεταγράφηκε η πληροφορία μπορεί να ταξιδύψει εκτός του πυρήνα και μόλις συναντήσει κάποιο ριβόσωμα αρχίζει η δημιουργία της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε αυτό. Σε αυτό το στάδιο συμμετέχουν και άλλα δύο είδη RNA, το sRNA και το tRNA. Χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας είναι ότι η γενετική πληροφορία κωδικοποιημένη στο RNA σε τέσσερις διαφορετικά χαρακτηριστικά συμπλέγματα (τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις) μετατρέπεται σε είκοσι διαφορετικά συμπλέγματα, τα είκοσι αμινοξέα.

Τα tRNA συνδέονται με αμινοξέα. Το κάθε tRNA φέρει ένα σημείο με το οποίο μπορεί να συνδεθεί στο mRNA, το οποίο ονομάζεται αντικωδικόνιο. Το αντικωδικόνιο αποτελείται από τρία διαδοχικά νουκλεοτίδια τα οποία είναι συμπληρωματικά τριών διαδοχικών νουκλεοτιδίων του mRNA, η οποία διαδοχική τριάδα νουκλεοτιδίων ονομάζεται κωδικόνιο, δηλαδή υπάρχει συμπληρωματικότητα ως προς τα κωδικόνια και τα αντικωδικόνια. Κάθε κωδικόνιο στο mRNA, αντιστοιχεί σε ένα αμινοξύ, αφού κάθε κωδικόνιο αντιστοιχεί ακριβώς σε ένα είδος tRNA που συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Η σύνδεση κωδικονίου-αντικωδικονίου συμβαίνει στο ριβόσωμα. Το ριβόσωμα έχει θέσεις για δύο αμινοξέα.[14,15]

Στη μία θέση μπαίνει το ένα αμινοξύ (συνδεδεμένο με το tRNA) εξαιτίας της σύνδεσης του tRNA με το mRNA. Αυτό ολισθαίνει στη δεύτερη θέση ταυτόχρονα με τη ολίσθηση του συνδεδεμένου mRNA, ενώ στην προηγούμενη μπαίνει το επόμενο αντίστοιχο σύμπλεγμα tRNA αμινοξέος εξαιτίας της συμπληρωματικότητας με το RNA. Τα δύο γειτονικά αμινοξέα συνδέονται με χημικό δεσμό. Ξαναγίνεται ολίσθηση, ώστε τη δεύτερη θέση να την πάρει το σύμπλεγμα που βρισκόταν στην πρώτη θέση αφήνοντας μια κενή θέση. Έτσι, εισέρχεται το επόμενο σύμπλεγμα tRNA-αμινοξέος και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Κατά την έξοδο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με το mRNA και το tRNA, αυτή αποσυνδέεται από τα tRNA και τα tRNA αποσυνδέονται από την αλυσίδα mRNA. Η διαδικασία έχει συγκεκριμένα κωδικόνια mRNA για την έναρξη και τη λήξη της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αυτή η διαδικασία αποδείχθηκαν με πειράματα που

ξεκίνησε ο Μ. Νίρεμπεργκ το 1961 και τελείωσαν οι Σ. Οχόα και Γκ. Κοράνα το 1965.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα αργότερα ακολουθεί και άλλα στάδια διαμόρφωσης, για την αποπεράτωση της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Το σύστημα αντιστοιχίας κωδικονίων-αντικωδικονίων-αμινοξέων είναι παγκόσμιο, ισχύει το ίδιο ακριβώς σε κάθε οργανισμό και ονομάζεται γενετικός κώδικας. Επειδή, το κάθε κωδικόνιο του mRNA αντιστοιχεί ακριβώς σε μια τριάδα νουκλεοτιδίων του DNA, οι διαδοχικές ακολουθίες νουκλεοτιδίων στο DNA καθορίζουν ποιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες θα παραχθούν στο κύτταρο και έμμεσα ποιες πρωτεΐνες θα παραχθούν σε αυτό, και μέσω αυτών ποιες λειτουργίες, ποια χαρακτηριστικά, ποιες αντιδράσεις θα έχει το κύτταρο στον κύκλο ζωής του.

Το ριβόσωμα διαβάζει τριπλέτες νουκλεοτιδίων από το mRNA και τις μετατρέπει στα αντίστοιχα αμινοξέα που συνθέτουν την πρωτεΐνη, με απαραίτητα για την μετατροπή ενδιάμεσα μόρια τα μεταφορικά RNAs (tRNAs). Αρχικά είχαν προταθεί δύο θέσεις δέσμευσης στο ριβόσωμα για τα tRNAs, η Α-θέση (Aminoacyl), όπου δεσμεύεται το εισερχόμενο αμινοάκυλο-tRNA και η Ρ-θέση (Peptidyl), όπου δεσμεύεται το πεπτιδύλο-tRNA με την νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αργότερα προτάθηκε μία τρίτη θέση δέσμευσης, η Ε-θέση (Exit), από όπου το απακυλιωμένο πλέον tRNA απελευθερώνεται από το ριβόσωμα. Κατά την μετάφραση διακρίνονται τρία βασικά στάδια: η έναρξη, η επιμήκυνση και ο τερματισμός. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι πιο πολύπλοκη, παρόλα αυτά ακολουθεί τις ίδιες αρχές.

Η σύνθεση των πρωτεϊνών ξεκινάει με το κωδικόνιο AUG (κωδικόνιο έναρξης), το οποίο αντιστοιχεί στο αμινοξύ μεθειονίνη. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, η πλειονότητα των mRNAs περιέχει ανοδικά (~10 νουκλεοτίδια) του κωδικονίου έναρξης μια περιοχή πλούσια σε πουρίνες, μεγέθους 7-15 νουκλεοτιδίων, η οποία ονομάζεται ακολουθία Shine-Dalgarno (SD). Η περιοχή αυτή είναι συμπληρωματική μιας περιοχής στο 3' άκρο του 16S rRNA, πλούσιας σε πυριμιδίνες, (αντι-ShineDalgarno) και βοηθά στην επιλογή του εναρκτήριου AUG .

Επιμίκυση :

Η επιμίκυση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας συνεχίζεται μέχρι να εμφανιστεί στην Α-θέση ένα κωδικόνιο τερματισμού (UAG, UAA, ή UGA). Τα κωδικόνια αυτά δεν αναγνωρίζονται από κάποιο tRNA αλλά από πρωτεΐνες, που ονομάζονται παράγοντες απελευθέρωσης (Release Factors, RF). Υπάρχουν δύο κατηγορίες παραγόντων απελευθέρωσης.

Σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών: Η απόκτηση της σωστής τριδιάστατης δομής των πρωτεϊνών αποτελεί ένα από τα πιο πολύπλοκα και υπό διερεύνηση προβλήματα της μοριακής βιολογίας. Φαίνεται ότι η διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με τη μετάφρασή τους. Πρόκειται δηλαδή για μια συμμεταφραστική διαδικασία, κατά την οποία η πρωτεΐνη αρχίζει να λαμβάνει την τριδιάστατη δομή της ενώ ακόμη είναι δεσμευμένη στο ριβόσωμα ως πεπτιδυλο-tRNA. Το μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας που προστατεύεται από το κανάλι κυμαίνεται από 30 έως 72 αμινοξέα, πράγμα που δείχνει ότι τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια έχουν διαφορετικές διαμορφώσεις. Έχει διατυπωθεί, λοιπόν, η υπόθεση ότι η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη αρχίζει να αποκτάει τη διαμόρφωσή της σε απόσταση περίπου 28Å από την έξοδο του καναλιού και συνεχίζει στην επιφάνεια της 50S υπομονάδας σε μια εσοχή κοντά στην έξοδό του. Σε αυτή τη φάση, η αναδίπλωση διευκολύνεται από βοηθητικούς παράγοντες (chaperones), οι οποίοι είναι πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε μη-αναδιπλωμένα ή μερικώς αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια. Καθώς τα μη-αναδιπλωμένα πολυπεπτίδια έχουν εκτεθειμένα πολύ περισσότερα υδρόφοβα αμινοξέα, είναι πολύ εύκολο να δημιουργήσουν συσσωματώματα. Σε αυτές τις υδρόφοβες περιοχές δεσμεύονται οι βοηθητικοί παράγοντες εμποδίζοντας τη συσσωμάτωση. Μέσω συντονισμένων κύκλων δέσμωσης-αποδέσμωσης διευκολύνουν τις πρωτεΐνες να αποκτήσουν την σωστή τριδιάστατη δομή τους.

Υπάρχει μία δεύτερη κατηγορία βοηθητικών παραγόντων, που ονομάζονται σαπερονίνες (chaperonins) και οι οποίοι δρουν αφού η πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει απελευθερωθεί από το ριβόσωμα. Οι σαπερονίνες είναι μεγάλες κυλινδρικές πρωτεΐνες, που παρέχουν ένα συγκεκριμένο χώρο μέσα στον οποίο μπορεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα να αποκτήσει την τριδιάστατη δομή της, απομονωμένη από το κυτταρόπλασμα. Στα βακτήρια ο κυριότερος βοηθητικός παράγοντας είναι ο TF (Trigger Factor), ο οποίος δεσμεύεται απ'ευθείας στο ριβόσωμα κοντά στην έξοδο του καναλιού και αλληλεπιδρά με την εξερχόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η πλειοψηφία των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών (65-80%) έχουν μικρό μέγεθος και πιστεύεται ότι αποκτούν τη σωστή τριδιάστατη δομή τους πολύ γρήγορα, χωρίς περαιτέρω βοήθεια πέραν του TF.[14,15]

1. Πειράματα

Προετοιμασία: τα Βιολογικά μόρια (π.χ. το DNA και τις πρωτεΐνες) είναι μικρότερα από 25 nm σε διάμετρο και είναι ως εκ τούτου πολύ μικρά για να παγιδευτούν απευθείας. Επίσης, το μέγεθος και ελαστικό τους μέγεθος και ακόμα και το σχήμα των συνθετικών μικροσφαιριδίων που χρησιμοποιούνται επιτρέπει την εύκολη βαθμονόμηση του συστήματος.

Για τη μετατροπή της οπτικής λαβίδας σε ένα όργανο για τη μέτρηση μικρών δυνάμεων (έναν μετατροπέα δύναμης), απαιτείται η προσθήκη ενός αισθητήρα που μπορεί να προσδιορίσει τη θέση των παγιδευμένων αντικειμένων. Οι πρωτεΐνες και το DNA είναι μόρια μικρά και έτσι οι σύγχρονες μελέτες χρησιμοποιούν πλαστικά μικροσφαιρίδια ως λαβές για να χειριστούν έμμεσα το υπό δοκιμή υλικό. Από τα προλεχθέντα, γνωρίζουμε ότι, για να εργαστούμε με τις λαβίδες μονής δέσμης, θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε διαφανή αντικείμενα με διάμετρο περίπου 1 μm . Η τοποθέτηση αυτών των ενιαίων μικροσφαιριδίων, που πραγματοποιήθηκε με οπτική λαβίδα, μπορεί να προσδιοριστεί είτε με τη χρήση ενός φωτοαισθητήρα τεταρτοκυκλικού για τη μέτρηση του του αντικειμένου, είτε με τη χρήση συμβατικών μέσων απεικόνισης (φωτεινό φόντο, σκοτεινό φόντο ή αντίθεση φάσης/phase contrast) είτε με τη χρήση συμβολομετρία. Εάν χρησιμοποιείται μια πολύ έντονη πηγή φωτισμού, τότε είναι δυνατόν να μετρηθούν πολύ μικρές μετατοπίσεις νανόμετρου σε εύρος ζώνης από 0,1 Hz έως 5 kHz.

Ο αισθητήρας και το κύκλωμα ανίχνευσης ρυθμίζεται είτε με τη μετακίνηση του αισθητήρα είτε με τη μετακίνηση των παγιδευμένων αντικείμενων σχηματίζοντας μια γνωστή απόσταση. Αφού είναι γνωστό ο συντελεστής θέσης (υπολογίζεται από την απόσταση του αισθητήρα και των παγιδευμένων αντικειμένων), τότε η σκληρότητα των οπτικών λαβίδων μπορεί να υπολογιστεί είτε από την ανάλυση της θερμικής κίνησης των παγιδευμένων αντικειμένων είτε με την εφαρμογή των γνωστών δυνάμεων ιξώδους οπισθέλκουσας (είτε υπολογισθείσας μέσω είτε με την εφαρμογή ενός ιξώδους οπισθέλκουσας δύναμης). Συνήθως, χρησιμοποιείται ο συνδυασμός των παραπάνω τρόπων για επαλήθευση. Τα περισσότερα κυκλώματα έχουν ως βάση μικροσκόπια που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του επιπέδου φθορισμού, και τα οποία επιτρέπουν τον έλεγχο πρωτεϊνών οι οποίες 'χρωματίζονται' με φθόριο. Ο έλεγχος του υπολογιστή είναι θεμελιώσες προαπαιτούμενο των πειραμάτων, καθώς επιτρέπει την εκτέλεση πολλούς τύπους πειραμάτων, τη διεργασία αυτόματων διαδικασιών βαθμονόμησης και ταχεία συλλογή στοιχείων, αποθήκευση και ανάλυση των.

Γνωρίζουμε ότι, για τη μέτρηση της κίνησης που παράγεται από τη μετουσίωση μιας και μόνο πρωτεΐνης, αναμένουμε μετατοπίσεις στην κλίμακα νανομέτρων. Γνωρίζοντας τις ενέργειες που εμπλέκονται, αυτό απαιτεί οπτική λαβίδα με δείκτη ακαμψίας περίπου 0,02 - 0,1 pN nm και απαιτείται ισχύς laser περίπου 5- 30 mW. Με τόσο χαμηλούς δείκτες ακαμψίας συμπαιρνάμε ότι, με την απουσία οποιασδήποτε βιολογικής δύναμης, η κίνηση ενός παγιδευμένου μικροσφαιριδίου προσδιορίζεται από την ισορροπία μεταξύ της θερμικής κίνησης Brown και τη δύναμη επαναφοράς της οπτικής λαβίδας.

Η συμπεριφορά ενός μετατροπέα της οπτικής λαβίδας, όπως έχουμε αναφέρει, είναι πολύ διαφορετική από εκείνη ενός μετατροπέα μακροσκοπικών δυνάμεων. Αυτό είναι επειδή σε καθεστώς πολύ χαμηλής ισχύος κάτω από το οποίο λειτουργεί ο μετατροπέας οπτικής λαβίδας, οι θερμικές δυνάμεις είναι αξιοσημείωτες. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως ο μετατροπέας είναι διαφορετικός από τα μικροσκόπια ατομικών δυνάμεων, επειδή η κίνηση ενός μικροσκοπίου ανίχνευσης ατομικών δυνάμεων χαρακτηρίζεται από σχετικά μεγάλη μάζα και την υψηλό δείκτη σκληρότητας έτσι ώστε η κορυφή του ανιχνευτή να δείχνει αιχμηρή. Είναι σημαντική η κατανόηση και η εκτίμηση της συμπεριφοράς του μετατροπέα πριν προχωρήσουμε σε ανάπτυξη των βιολογικών πειραμάτων που έχουν τελεστεί.

1. Το παραδοσιακό πείραμα των Svoboda κ.α.[5,16,17,19]

Ένα ορόσημο στη μελέτη των κινητήριων πρωτεϊνών ήρθε το 1993, όταν ο Svoboda κ.ά. μέτρησαν τα επιμέρους βήματα που ακολούθησε ο 'αχθοφόρος' κινεσίνη, καθώς περπατούσε κατά μήκος μιας καθορισμένης τροχιάς μικροσωληνίσκων. Ένα από τα περισσότερο συζητημένα και πιο ενδιαφέροντα προβλήματα στη βιοφυσική είναι ο μηχανισμός σύσπασης των μυών. Κατά τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει σαφές ότι όλα τα ζωντανά κύτταρα περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία μοριακών κινητήρων που λαμβάνουν χημική ενέργεια και τη μετατρέπουν σε μηχανικό έργο. Εκτελούν πληθώρα λειτουργιών που είναι απαραίτητες για τη ζωή, από την αντιγραφή του DNA, τη μεταγραφή του RNA και τη σύνθεση πρωτεϊνών ως την κυτταρική διαίρεση, τη μετακίνηση κυστιδίων, τη μετακίνηση κυττάρων, την ενδοκυττωση και φυσικά τη σύσπαση των μυών. Υπάρχουν δύο τύποι του κινητήρα. Οι περιστροφικοί κινητήρες, οι οποίοι είναι συνήθως ενσωματωμένοι σε μεμβράνες και οδηγούνται από τη ροή των ιόντων κατά μήκος διαμεμβρανικής ηλεκτροχημικής βαθμίδας (τα βακτήρια που κινούνται με μαστίγιο παραδείγματος χάριν). Οι δε γραμμικοί κινητήρες δουλεύουν σε ένα ισοτροπικό χημικό περιβάλλον και αντλούν ενέργεια από χημικές αντιδράσεις, συνήθως από την υδρόλυση της χημικής ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και φωσφορικό άλας. Οι γραμμικοί κινητήρες κινούνται κατά μήκος ανισοτροπικών (ή πολωμένων) πρωτεϊνικών οδών οι οποίες σε ένα μετέπειτα στάδιο ορίζουν την κατεύθυνση των παραχθέντων κινήσεων (ένα καλό παράδειγμα είναι το σύστημα των μυϊκών πρωτεϊνών).

Οι γραμμικοί κινητήρες μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε δύο κατηγορίες: σε αχθοφόρους (porters) και κωπηλάτες (rowers).

Οι γραμμικοί κινητήρες που λαμβάνουν πολλές διαδοχικές ενέργειες και ακολουθούν αποτελεσματικά την προκαθορισμένη πορεία χωρίς να αποκλίνουν σημαντικά, είναι γνωστοί ως αχθοφόροι (ένζυμα επεξεργασίας), ενώ εκείνοι οι γραμμικοί κινητήρες που αλληλεπιδρούν σε μια διακοπτόμενη πορεία, παράγοντας ένα μια μόνο δεσμό και μετά αποδεσμεύονται από τη διαδρομή, ονομάζονται κωπηλάτες (ένζυμα μη-επεξεργασίας). Για παράδειγμα, ο κινητήρας κινεσίνης που κινείται κατά μήκος των μικροσωληνίσκων στα νευρικά μας κύτταρα, που μεταφέρουν μεμβρανικά κυστίδια του νευροδιαβιβαστή από τη

σπονδυλική μας στήλη στα δάκτυλά μας είναι αχθοφόρος, ενώ η πρωτεΐνη που κινεί το μυ που ονομάζεται μυοσίνη είναι ένας κωπηλάτης, καθώς δρα ως μέρος μιας μεγάλης ομάδας μορίων, που το καθένα δημιουργεί γρήγορα ένα δεσμό με την ακτινίνη τον οποίο δεσμό τραβά προκειμένω να σφίξει ο μυς. Ως αχθοφόρος λοιπόν η κινεσίνη μεταφέρει μεμβρανικά κυστίδια ενώ ως κωπηλάτης η μυοσίνη λειτουργεί συλλογικά και στοχεύει στην παραγωγή μεγάλων δυνάμεων και τη σύσφιξη των μυών.

Οι περιστροφικοί κινητήρες και οι δύο υποκατηγορίες του γραμμικού κινητήρα (αχθοφόροι και κωπηλάτες) μελετήθηκαν με τη χρήση οπτικών λαβίδων. Έχουμε ήδη ακούσει πως ο Block[16,17] πραγματοποίησε τις πρώτες βαθμονομηθείς μελέτες της ακαμψίας του βακτηριακού μαστιγίου. Από τότε, οι Berry and Berg έκαναν μια πιο λεπτομερή μελέτη του βακτηριακού περιστροφικού μηχανισμού με τη μέτρηση της δύναμης που παράγεται από την περιστροφή του προς τα μπροστά και προς τα πίσω καθώς και την αντίστροφη περιστροφή του. Χρησιμοποίησαν ένα πλαστικό σφαιρίδιο που παγίδευσαν σε μια οπτική λαβίδα ως λαβή και το ώθησαν κατά του βακτηρίου προκειμένω να το πιέσουν και να το εξαναγκάσουν να περιστρέφεται γύρω από το μαστίγιό του, δημιουργώντας έτσι μια ροπή στο σύστημα κινητήρα. Βρήκαν ότι η ροπή που απαιτείται για να το ωθήσουν προς τα πίσω είναι ως μέγεθος ελαχίστως μεγαλύτερη από την απαιτούμενη για την παύση της κίνησης ροπή. Αυτό υποδεικνύει είτε ότι ο κινητήρας μπορεί να γλιστρήσει, ή ότι ο μηχανισμός είναι αναστρέψιμος και η μετάβαση της ροπής από τον κινητήρα στην αντλία (δυναμό) είναι απροσδιόριστη.

Οι Svoboda[16,17] κ.ά. μέτρησαν τα επιμέρους βήματα που ακολούθησε ο 'αχθοφόρος' κινεσίνη, καθώς περπατούσε κατά μήκος μιας καθορισμένης τροχιάς μικροσωληνίσκων. Στα πειράματά τους, ένα μόνο μόριο κινεσίνης συνδέθηκε σε ένα πλαστικό μικροσφαιρίδιο και αυτό στη συνέχεια τέλεσε τη διαδρομή του, η οποία είχε δημιουργηθεί στο εργαστήριο, στο μικροσκόπιο. Το περιβάλλον υγρό ήταν ένα διάλυμα άλατος που περιέχει την χημική ουσία ATP. Όταν ο κινητήρας κινεσίνης και το κομμάτι των μικροσωληνίσκων συνδυαστούν, το σφαιρίδιο σύρεται από την κινεσίνη και οι μετατοπίσεις κλίμακας νανομέτρων και οι κλίμακας piconewton δυνάμεις που παράγονται μπορούν να μετρηθούν. Η κρίσιμη παρατήρηση που έγινε, και η οποία μάλιστα αποτελεί μια απόδειξη για

την απίστευτη ακρίβεια της μεθόδου, ήταν η διαπίστωση ότι είχε γίνει μετατόπιση 8 nm του μορίου κινεσίνης. Αντί να κινείται ομαλά ως είθισται, το μόριο κινήθηκε σπασμωδικά, χωρίς λογική. Διαπιστώθηκε επίσης ότι ο κινητήρας σταμάτησε για ένα τυχαίο χρονικό διάστημα μετά την ολοκλήρωση κάθε επιμέρους βήματος της διαδικασίας καθώς περίμενε για ένα νέα μόριο ATP για να φθάσει. Οι κινήσεις μοριακής κλίμακας τροφοδοτούνταν από 1 μόνο μόριο ATP (που ισοδυναμεί με λιγότερο από το ένα δέκατο της ενέργειας ενός φωτονίου) και είχαν παρατηρηθεί σε πραγματικό χρόνο, χωρίς να απαιτείται σήμα.

Η επόμενη πρόκληση ήταν να προβούν σε ανάλογες μετρήσεις μυοσίνης, του μοριακού δηλαδή κωπηλάτη που λαμβάνεται από το μυ. Θα μπορούσε κανείς να σκεφτεί ότι αυτό θα ήταν μια απλή εξέλιξη από την μελέτη Svoboda, ωστόσο, αποδείχθηκε ότι, προκειμένου να μετρηθεί η δραστηριότητα των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων μια διαφορετική προσέγγιση ήταν απαραίτητη. Το 1994, ένας επιστήμονας, επινόησε έναν τρόπο για να κρατήσει τις δύο πρωτεΐνες, ακτίνη και μυοσίνη, κοντά τη μια στην άλλη για μεγάλο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να μπορούν να καταγραφούν πολλές ατομικές αλληλεπιδράσεις από ένα μόνο μόριο. Η μέθοδος του απαιτεί ένα σύστημα διπλών οπτικών λαβίδων. Χρησιμοποιώντας τις διπλές λαβίδες, για να χειριστεί μια μόνο ίνα ακτίνης η οποία παγιδεύεται από δύο μικροσφαιρίδια και τη συνέχεια τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια τρίτης σφαίρας που έχει επικάλυψη μυοσίνης. Επειδή το περιβάλλον διάλυμα περιέχει τη χημική ουσία ATP, όταν οι πρωτεΐνες έρχονται σε επαφή, ένα μόριο εκτινάσσεται και η ακτίνη μετακινείται. Η μετατόπιση της ακτίνης μετρείται μέσω υπολογισμού της θέσης ενός εκ των παγιδευμένων σφαιριδίων. Ένα χρόνο αργότερα, μια επιστήμονας έκανε μια παρόμοια μελέτη αλλά συνειδητοποίησε ότι οι διακοπτόμενες κινήσεις που παράγονται ήταν πολύ μικρές (μετατόπισης μόνο περίπου 5 nm), και ότι η θέση εκκίνησης για κάθε αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε ήταν τυχαία λόγω των θερμικές δονήσεις των σφαιριδίων στις λαβίδες. Με την παρακολούθηση της διακύμανσης της θέσης του σήματος μπόρεσαν να ανιχνεύσουν τους δεσμούς που 'έκανε η μυοσίνη (η διακύμανση χ^2 πέφτει όταν η μυοσίνη δημιουργεί δεσμό επειδή η σκληρότητα του συστήματος αυξάνεται) ήταν σε θέση να μετρήσουν πολλές εκατοντάδες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων μυοσίνης που σχηματίζουν δεσμούς και στη

συνέχεια να διαχωρίσει τα μόρια μυοσίνης των οποίων η μετατόπιση προκαλείται από την κίνηση, x_0 , από τη θερμική κίνηση μέσω της εξίσωσης $N = \exp \left[\frac{-k(x-x_0)^2}{2k_B T} \right]$ [16,17]

2. Μετρήσεις DNA και RNA

Η δομή της διπλής έλικας του DNA, είναι ίσως η πιο διάσημη ανακάλυψη στην δομική βιολογία. Πολλά πειράματα κινήθηκαν γύρω από το DNA, ωστόσο, θα ήταν προτιμότερη μια ενδεικτική αναφορά τους.

α) Σε μία από τις πρώτες μελέτες με χρήση μηχανικών οπτικών λαβίδων το DNA συνδέθηκε σε ένα πλαστικό σφαιρίδιο και στη συνέχεια σύρθηκε προκειμένου να επεκταθεί μέσω ενός παχύρρευστου μέσου, με σκοπό να μετρήσουμε τις μηχανικές του ιδιότητες. Αυτό έδωσε χρήσιμες πληροφορίες για τους μηχανισμούς του πολυμερούς. Η γνώση των μηχανισμών επίκινησης του DNA (περίπου 50 nm) δίνει την εντύπωση στους βιολόγους ότι υπάρχει πιθανότητα οι παρακείμενες περιοχές του DNA έρχονται σε επαφή μεταξύ τους. Για παράδειγμα, γνωρίζουμε ότι, εάν δύο νουκλεοτίδια αλληλουχίας έχουν απόσταση 20 nm, τότε η περιοχή σύνδεσης θα είναι αρκετά μεγάλη για να επιτρέψει τη σύσταση ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των βάσεων τους. [5,15]

β) Αργότερα μια επιστημονική ομάδα εφάρμοσε πολύ μεγάλες δυνάμεις στο DNA και διαπίστωσε ότι αιφνίδιες επιμηκύνσεις μπορούν να θραύσουν το μοντέλο της διπλής έλικας και να δημιουργηθεί μια παράλληλη σκάλα. Με την ικανότητα να χειραγωγήσουν το DNA και ένα αποδεδειγμένο ιστορικό της εργασίας με τις πρωτεΐνες κινητήρα, όπως η κινεσίνη, ο Block και οι συνεργάτες του ισχυρίζονται ότι όταν μετριέται η δύναμη που παράγεται από την RNA πολυμεράση, μεταγράφεται ένα γονίδιο DNA. Έτσι λοιπόν επισύναψαν ένα πλαστικό σφαιρίδιο στο ένα άκρο του ενός κλώνου του DNA και στη συνέχεια συνέδεσαν το άλλο άκρο με ένα ακινητοποιημένο μόριο RNA πολυμεράσης. Όταν προστέθηκε το μεταγραφικό ένζυμο που περιέχει όλα τα απαραίτητα για τη μεταγραφή νουκλεοτίδια, η RNA πολυμεράση μετακινήθηκε κατά μήκος του DNA, προχωρώντας και μεταγράφοντας το

γονίδιο και παράγοντας μιας νέας αλυσίδας RNA. Εκείνη τη στιγμή, ο Block παγίδευσε το σφαιρίδιο που συνδεόταν με το ελεύθερο άκρο του DNA και στη συνέχεια μετρήθηκε η δύναμη έλξης που παράγεται από την πολυμεράση RNA. Η δύναμη ήταν περίπου 25 pN και είναι πέντε φορές μεγαλύτερη από αυτή που παράγεται από οποιαδήποτε από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στον κινητήρα μυοσίνης ή κινεσίνης.[5,15]

3. Πειράματα με ριβοσώματα (βήμα-βήμα)

Τα σύγχρονα πειράματα έχουν πλέον απομακρυνθεί απ' τις παραπάνω γνωστές προσεγγίσεις και χρησιμοποιούν τις οπτικές λαβίδες για πιο περίπλοκα πειράματα που αφορούν τη σύνθεση πρωτεϊνών και τα ριβοσώματα. Όπως γνωρίζουμε, η αλληλουχία αμινοξέων μίας πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το DNA και η αλυσίδα αμινοξέων που συνδέονται μεταξύ τους με πολυπεπτιδικούς δεσμούς. Χρησιμοποιώντας μόνο 20 είδη διαφορετικών αμινοξέων ως βασικά δομικά στοιχεία, η φύση δημιουργεί μια τεράστια ποικιλία των πρωτεϊνών από δομικές πρωτεΐνες που είναι ισχυρότερο από το ατσάλι, σε μόρια που κάνουν τον ανθρώπινο εγκέφαλο να εργάζεται με κινητήρες που τροφοδοτούνται με ενιαία μόρια του καυσίμου σηματοδότησης. Το μυστικό για το πώς λειτουργούν όλες οι πρωτεΐνες που πραγματοποιήθηκε στη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής τους, πώς τα αμινοξέα αναδιπλώνονται μέχρι να οικοδομήσουμε την πρωτεΐνη.

Προηγούμενες μελέτες μεμονωμένων μορίων έκαναν χρήση της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων (AFM) για να χαρακτηρίσουν την μηχανική μετουσίωση και αναδίπλωση πρωτεϊνών, όπως η GFP. Αν και χρήσιμη, αυτή η προσέγγιση περιοριζόταν στον χαρακτηρισμό της μετουσίωσης των πρωτεϊνών με χρήση υψηλών δυνάμεων. Η άμεση παρατήρηση της διαδικασίας αναδίπλωσης ήταν δύσκολη, εν μέρει λόγω της υψηλής σταθεράς k του βραχίονα του AFM, που ασκεί μεγάλα φορτία δυνάμεων. Αντίθετα, οι οπτικές λαβίδες, έχουν μειωμένη μηχανική σκληρότητα, οπότε μπορούν να ασκήσουν σημαντικά μικρότερα φορτία δυνάμεων και να χαρακτηρίσουν καλύτερα την μετουσίωση και στη συνέχεια αναδίπλωση μορίων RNA. Πρόσφατες μελέτες με οπτικές λαβίδες επικεντρώθηκαν στη διαδικασία της μεταγραφής με την παρατήρηση της

RNA πολυμεράσης, καθώς και στην μελέτη της κίνησης ενός μορίου mRNA κατά τη διάρκεια της μετάφρασης από μεμονωμένα ριβοσώματα, όπου επιβεβαιώθηκε ότι η μετάφραση δεν είναι μία συνεχής διεργασία.

Τα πειράματα αυτά έχουν συνήθως την ακόλουθη δομή :

Βήμα 1^ο : PCR για την απομόνωση της ριβωσωμικής πρωτεΐνης (συνήθως της L4)[14,15]

Ο υβριδισμός και ο πολυμερισμός πραγματοποιούνται στην ίδια θερμοκρασία, οπότε στην ουσία αποτελούν ένα στάδιο. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, καθώς και για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA εισάγοντας παράλληλα σε αυτό θέσεις για πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού, προκειμένου να κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς. Η DNA πολυμεράση η συνθέτει DNA με μεγάλη ακρίβεια και μεγάλη ταχύτητα. Για αυτό το λόγο, ο χρόνος κάθε σταδίου PCR είναι αρκετά σύντομος. Επίσης, χρησιμοποιείται για την εισαγωγή μεταλλάξεων, καθώς και για την ραδιοεπισήμανση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας νουκλεοτιδίων, προκειμένου να πραγματοποιηθεί νουκλεοτιδική ανάλυση, (sequencing). Η τεχνική αυτή μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη της διαδικασίας αντιγραφής του DNA, διαδικασία που γίνεται στα κύτταρα, αφού το αποτέλεσμα είναι το ίδιο, η παραγωγή δηλαδή συμπληρωματικών κλώνων DNA από κάποιον ήδη υπάρχοντα κλώνο. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μιας θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο, για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Προκειμένου να δράσει η πολυμεράση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάζονται κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές), τα οποία είναι συμπληρωματικά μιας περιοχής της επιθυμητής ακολουθίας. Η τεχνική της PCR γίνεται σε τρία στάδια:

Στάδιο 1ο: Αποδιάταξη

Το δίκλωνο μόριο του DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 90°C-98°C. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται δυο μονόκλωνες αλυσίδες και το τμήμα

που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί για τα επόμενα στάδια.

Στάδιο 2ο: Υβριδισμός

Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό μειώνεται στους 50°C - 75°C και τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, (εκκινητές), υβριδίζονται με το εκμαγείο συμπληρωματικά, με δεσμούς υδρογόνου. Η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδισμού είναι πολύ σημαντική και εξαρτάται από τη σύσταση καθώς και από το μήκος των εκκινητών. Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο μειωμένη είναι η πιθανότητα λανθασμένων υβριδισμών. Οι εκκινητές επιλέγονται έτσι ώστε να περικλείουν το τμήμα του DNA, του οποίου ο πολλαπλασιασμός είναι επιθυμητός και μπορούν να σχεδιαστούν ώστε στα άκρα τους να περιέχουν θέσεις αναγνώρισης από ενδονουκλεάσες περιορισμού, με σκοπό την κλωνοποίηση του συντιθέμενου τμήματος του DNA σε ένα πλασμίδιο. Αν η επιλεγμένη θερμοκρασία δεν είναι η σωστή, είναι δυνατό να μην παραχθούν προϊόντα ή να παραχθούν παραπροϊόντα.

Στάδιο 3ο: Πολυμερισμός

Το στάδιο αυτό γίνεται σε θερμοκρασία περίπου 72°C. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την μονόκλωνη αλυσίδα και αναγνωρίζοντας την ελεύθερη -OH ομάδα, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή. Η σύνθεση του DNA συνεχίζεται έως ότου οι δυο νεοσυντιθέμενες αλυσίδες επιμηκυνθούν τόσο ώστε να περιέχουν περισσότερα νουκλεοτίδια από το επιθυμητό τμήμα του DNA. Η διάρκεια του πολυμερισμού εξαρτάται από το μήκος της πολλαπλασιαζόμενης ακολουθίας. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι θερμοάντοχη, ώστε να είναι λειτουργική στις υψηλές θερμοκρασίες των σταδίων. Τα τρία αυτά στάδια επαναλαμβάνονται για n κύκλους και παράγονται $2n$ μόρια DNA, που έχουν ως άκρα τους δύο εκκινητές. Στο τέλος των κύκλων, το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στους 72°C για 5 min, ώστε να συνεχιστεί ο πολυμερισμός.

Στο τέλος το ακριβές παραχθέν- μέσω PCR- αντίγραφο του DNA, δέχεται χημικό καθαρισμό πριν να είναι έτοιμο για την περαιτέρω χρήση.

Βήμα 2° : Βιοτινυλίωση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης in vivo (συνήθως της L4)[5,14,15]

Η γρήγορη επέκταση των τεχνολογιών της βιοχημείας, της ανοσολογίας, της βιολογίας κυττάρων και της βιοτεχνολογίας, που βασίζονται στις πολύ υψηλής αγκιστείας αλληλεπιδράσεις της βιοτίνης με τις πρωτεΐνες αβιδίνη και στρεπταβιδίνη, σκιάζουν το γεγονός ότι η βιοτίνη είναι, πάνω από όλα, μια βιταμίνη (βιταμίνη Η) απαραίτητη για όλες τις μορφές ζωής. Συντίθεται από τα φυτά, τα περισσότερα βακτήρια και μερικούς μύκητες, και δρα ως συνένζυμο. Η βιοτίνη ενώνεται ομοιοπολικά στο ενεργό κέντρο ορισμένων ενζύμων (καρβοξυλασών), που μεταφέρουν το διοξείδιο του άνθρακα από το όξινο ανθρακικό στα οργανικά οξέα για να διαμορφώσουν τους κυτταρικούς μεταβολίτες. Οι καρβοξυλάσες έχουν βασικούς ρόλους στην γλυκονεογένεση, την λιπογένεση, το μεταβολισμό των αμινοξέων και την ενεργειακή μετατροπή. Η αντίδραση που συνδέει την βιοτίνη σε αυτά τα ένζυμα είναι εντυπωσιακά εξειδικευμένη.

Η BPL (Biotin Protein Ligase) είναι το ένζυμο, το υπεύθυνο για την ένωση της βιοτίνης σε μια συγκεκριμένη λυσίνη στο ενεργό κέντρο των νεοσυντιθέμενων καρβοξυλασών. Η βιοτινυλίωση είναι μια μεταμεταφραστική τροποποίηση εξαιρετικής εξειδίκευσης. Στα *E.coli* αναγνωρίζεται μόνο μία λυσίνη της BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein) υπομονάδας της ακετυλο-CoA καρβοξυλάσης και βιοτινυλιώνεται από την BirA (την BPL του *E.coli*) (Chapman-Smith et al. 2001). Η σύνδεση της βιοτίνης είναι μια αντίδραση δύο σταδίων που οδηγεί στο σχηματισμό ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας της βιοτίνης και της ε-αμινομάδας της τροποποιημένης λυσίνης.

Οι ακολουθίες των *in vivo* βιοτινυλιωμένων υποστρωμάτων είναι υψηλά συντηρημένες ανάμεσα στα είδη. Για την *in vivo* βιοτινυλίωση πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί συστήματα, όπως το στέλεχος AVB101 του βακτηρίου *E.coli*[4].

Βήμα 3^ο : Απομόνωση ριβοσωμάτων με ενσωματωμένη την βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη L4

Βήμα 4^ο : Σήμανση ριβοσωμάτων με φθορισμοφόρο[5,15]

Τα ριβοσώματα, που είχαν βιοτινυλιωθεί στην L4 πρωτεΐνη, σημάνθηκαν μη ειδικά σε θέσεις όπου υπάρχουν κυστεΐνες με το φθορισμοφόρο Atto655 συζευγμένο με μαλεϊμίδιο όπως περιγράφηκε στην παράγραφο. Η περίσσεια του φθορισμοφόρου απομακρύνθηκε με στήλη μοριακής διήθησης, και συλλέχθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν τα σημασμένα ριβοσώματα. Ο υπολογισμός της απόδοσης της σήμανσης των ριβοσωμάτων, έγινε με μέτρηση των κλασμάτων της στήλης σε φθορισμόμετρο. Πριν μετρηθούν τα κλάσματα στο φθορισμόμετρο έγιναν καμπύλες αναφοράς τόσο για τη συγκέντρωση των ριβοσωμάτων όσο και του φθορισμοφόρου.

Βήμα 5^ο : Τροποποίηση γονιδιακής αλληλουχίας πρωτεϊνών για πειράματα οπτικών λαβίδων[5,15]

Τα γονίδια των πρωτεϊνών, που θα μεταφράζονται από τα ριβοσώματα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις με οπτικές λαβίδες, έπρεπε να τροποποιηθούν κατάλληλα όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα:

Αμέσως μετά το εναρκτήριο κωδικόνιο ATG εισάγεται το κωδικόνιο τερματισμού TAG (amber stop codon), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή/ενσωμάτωση βιοτίνης κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της πρωτεΐνης. Ακολουθεί μία ενδιάμεση αλληλουχία που κωδικοποιεί για 30-40 αμινοξέα και αμέσως μετά μία που κωδικοποιεί για έξι ιστιδίνες (6xHis ή His-tag). Μετά το Histag ακολουθεί η αλληλουχία της πρωτεΐνης συνοδευόμενη από μία δεύτερη αλληλουχία που κωδικοποιεί για επιπλέον 31 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Αν κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης δεν προστεθεί ιστιδίνη η σύνθεση θα σταματήσει όταν φτάσει στο His-tag, καθώς το γονίδιο δεν κωδικοποιεί για ιστιδίνη πριν από αυτό το σημείο. Το amber κωδικόνιο, όμως, θα έχει προβάλει από την έξοδο του ριβοσωμικού καναλιού, λόγω των 30-40 αμινοξέων που ακολουθούν. Σε αυτή τη φάση είναι δυνατή η σύνδεση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας με τη χάντρα που βρίσκεται παγιδευμένη στις οπτικές λαβίδες. Με προσθήκη ιστιδίνης η σύνθεση συνεχίζεται. Πριν από το κωδικόνιο τερματισμού υπάρχει θέση αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού. Δίνεται έτσι η δυνατότητα είτε να χρησιμοποιηθεί το γονίδιο ως έχει και να απελευθερωθεί η πρωτεΐνη από το ριβόσωμα είτε να κοπεί πριν το κωδικόνιο τερματισμού και να παραμείνει συνδεδεμένη στο ριβόσωμα μετά τη σύνθεσή της, καθώς δεν θα υπάρχει σήμα απελευθέρωσης. Στη δεύτερη περίπτωση, τα 31 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο εξασφαλίζουν τόσο την έξοδο ολόκληρης

της πρωτεΐνης από το κανάλι του ριβοσώματος όσο και την αναδίπλωση της. Χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια των πρωτεϊνών GFPem (Green Fluorescent Protein emerald), η οποία φθορίζει στα 509 nm μόλις αποκτήσει την τελική της διαμόρφωση και ουβικιτίνης, η οποία είναι μία μικρή πρωτεΐνη με πιο απλή τριτοταγή δομή. Παρακάτω αναφέρεται λεπτομερώς η διαδικασία τροποποίησης των γονιδίων τους, ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή αλληλουχία του γονιδίου A.

Βήμα 6^ο : Ετοιμασία συστήματος για μέτρηση με οπτικές λαβίδες[5,15]

Σε αυτό το στάδιο γίνεται σύνδεση των ριβοσωμάτων σε σφαίρες στρεπταβιδίνης.

Βήμα 7^ο : Εισαγωγή συστήματος στο θάλαμο των οπτικών λαβίδων και σύλληψη της νεοσυντιθέμενης πρωτεϊνικής αλυσίδας με λαβή DNA[5,15,20]

Οι χάντρες SiO₂ με τα συνδεδεμένα ριβοσώματα και στρεπταβιδίνη στα αμινοτελικά άκρα των πρωτεϊνικών αλυσίδων εισήχθησαν στο θάλαμο των οπτικών λαβίδων. Ο θάλαμος δέχεται γύρω στα 30 μl δείγματος και η εισαγωγή επιτυγχάνεται με ένα αυτόματο σύστημα βαλβίδων. Μετά την εισαγωγή των χαντρών στο θάλαμο, κάποια από αυτές παγιδεύτηκε στις οπτικές λαβίδες. Καθοδηγώντας το μικροσιφώνιο με πιεζοκρυστάλλους προς τις οπτικές λαβίδες, η χάντρα στερεώθηκε στο μικροσιφώνιο με αναρρόφηση. Οι υπόλοιπες χάντρες ξεπλύθηκαν με συνεχή ροή ρυθμιστικού διαλύματος. Κατόπιν, στο θάλαμο εισήχθησαν χάντρες πολυστυρενίου, στις οποίες είχαν προσδεθεί μόρια DNA, με βιοτινυλιωμένα άκρα. Τα μόρια DNA παίζουν το ρόλο λαβών, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τη στρεπταβιδίνη των πρωτεϊνικών αλυσίδων και περιορίζουν τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χαντρών. Όπως και προηγουμένως, κάποια από τις χάντρες αυτές παγιδεύτηκε στις οπτικές λαβίδες. Η ροή των χαντρών σταμάτησε και με κίνηση του μικροσιφωνίου προς την παγιδευμένη, από τις οπτικές λαβίδες, χάντρα πολυστυρενίου έγινε προσπάθεια σύλληψης της πρωτεϊνικής αλυσίδας με την DNA λαβή, μέσω του δεσμού βιοτίνης-στρεπταβιδίνης. Για να ελεγχθεί κάθε φορά αν η σύλληψη της πρωτεϊνικής αλυσίδας ήταν επιτυχημένη, το μικροσιφώνιο απομακρύνεται σιγά σιγά και

παρατηρείται αν μετατοπίζεται από τη θέση της η χάντρα πολυστυρενίου. Παρατηρήθηκε ότι η ειδική σύνδεση μεταξύ DNA και πολυπεπτιδικής αλυσίδας επιτυγχάνεται σε ένα εύρος δυνάμεων 6-20 pN, με μέσο όρο γύρω στα 10 pN. Άσκηση μεγαλύτερων δυνάμεων θα οδηγήσει σε ρήξη της σύνδεσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι οπτικές λαβίδες αποτέλεσαν σταθμό στις βιολογικές μετρήσεις. Μέσω αυτών μπορέσαμε να εξετάσουμε βιολογικά φαινόμενα που ειδήλλως ήταν αδύνατο να εξεταστούν. Μέσω αυτών μπορέσαμε να καταφέρουμε ό,τι δεν καταφέραμε με τις συμβατικές λαβίδες: την παγίδευση και μετακίνηση σωματιδίων τα οποία ειδήλλως θα υφίσταντο ποιοτική μεταβολή (θραύση σφαιριδίων ή αλλοίωση χαρακτηριστικών). Είναι, ωστόσο, πολλά που θα μπορούσαν να γίνουν κυρίως στον τομέα της βιολογικής εφαρμογής. Προμηνύεται μακρύς ο δρόμος στην ανακάλυψη βιολογικών διεργασιών και πειραμάτων πάνω τόσο στα δεοξυριβονουκλειικά σωματίδια όσο και στα ριβονουκλειικά σωματίδια. Οι λαβίδες, πλέον, αποτελούν αναπόσπαστο νανοτεχνολογικό εξοπλισμό για την παρατήρηση, την έρευνα και τη διεξαγωγή πειραμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J.E.Molly and M.j.Padgett Contemporary Physics 2002 , vol 43 , number 4 , pags 241-258 Lights , Action , optical tweezers 12)
2. Φυσική γ'τάξεως λυκείου κατεύθυνσης , 2002, Εκδόσεις Υπουργείου Παιδείας
3. Φυσική α'τάξεως λυκείου , 2002, Εκδόσεις Υπουργείου Παιδείας
4. Βιολογία γ' λυκειου κατεύθυνσης , 2002 ,Υπουργείο Παιδείας
5. Βιολογία β' λυκειου , 2002 ,Υπουργείο Παιδείας
6. Reicherter, M., Haist, T., Wagemann, E. U., and Tiziani, H. J., 1999, Optics Lett., 24, 608
7. Stevenson, Gunn-Moore, and Dholakia: Light forces the pace: optical manipulation for biophotonics,journal of biomedical optics, July/August 2010
8. Ashkin, A. (1970). Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure Phys. Rev. Lett. 24: 156-159.
9. Ashkin, A., and Dziedzic, J. M., 1987, Science, 235, 1517.
10. Ashkin, A., Dziedzic, J. M., and Yamane, T., 1987, Nature, 330, 769.
11. Ashkin, A., Dziedzic, J. M., 1989, Proc. natn. Acad. Sci. USA, 86, 7914
12. Ashkin, A., Schutze, K., Dziedzic, J. M., Euteneuer, U., and Schliwa, M., 1990,Nature, 348, 346.

13. A. Ashkin and J. M. Dziedzic, "Stability of optical levitation by radiation pressure," *Appl. Phys. Lett.* 2412, 586–588 1974.
14. Stevenson, Gunn-Moore, and Dholakia: Light forces the pace: optical manipulation for biophotonics, *journal of biomedical optics*, July/August 2010
15. Katranidis, A., Atta, D., Schlesinger, R., Nierhaus, K. H., Choli-Papadopoulou, T., Gregor, I., Gerrits, M., Buldt, G. and Fitter, J. (2009). Fast Biosynthesis of GFP Molecules: A Single-Molecule Fluorescence Study *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 1758-1761
16. Svoboda, K. and Block, S. M. (1994). Force and Velocity Measured for Single Kinesin Molecules *Cell* 77: 773-784.7)
17. Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J. and Block, S. M. (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry *Nature* 365: 721-727.
18. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9A%CF%8D%CF%84%CF%84%CE%B1%CF%81%CE%BF#/media/File:Biological_cell.sv
19. Sytnik, A., Vladimirov, S., Jia, Y. W., Li, L. Q., Cooperman, B. S. and Hochstrasser, R. M. (1999). Peptidyl transferase center activity observed in single ribosomes *J. Mol. Biol.* 285: 49-54.
20. Gunn-Moore, and Dholakia: Light forces the pace: optical manipulation for biophotonics, *journal of biomedical optics*, July/August 2010
21. http://www.ffn.ub.es/ritort/main_files/ot.gif
22. http://nn.physics.auth.gr/newsletter/Newsletter_June_09.pdf [σελιδα 7](#)
23. Μέσω scanner από : Katranidis, A., Atta, D., Schlesinger, R., Nierhaus, K. H., Choli-Papadopoulou, T., Gregor, I., Gerrits, M., Buldt, G. and Fitter, J. (2009). Fast Biosynthesis of GFP Molecules: A Single-Molecule Fluorescence Study *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 1758-1761
24. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Generic_Optical_Tweezer_Diagram.jpg
25. Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz *Ann. Phys.* 437: 55–75.
26. Sytnik, A., Vladimirov, S., Jia, Y. W., Li, L. Q., Cooperman, B. S. and Hochstrasser, R. M. (1999). Peptidyl transferase center activity observed in single ribosomes *J. Mol. Biol.* 285: 49-54.
27. Thompson, J., Kim, D. F., O'Connor, M., Lieberman, K. R., Bayfield, M. A., Gregory, S. T., Green, R., Noller, H. F. and Dahlberg, A. E. (2001). Analysis

- of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9002-9007.
28. Tomsic, J., Vitali, L. A., Daviter, T., Savelsbergh, A., Spurio, R., Striebeck, P., Wintermeyer, W., Rodnina, M. V. and Gualerzi, C. O. (2000). Late events of translation initiation in bacteria: a kinetic analysis EMBO J. 19: 2127-2136.
 29. Terhorst, C., Moller, W., Laursen, R. and Wittmann-Liebold, B. (1972). Amino acid sequence of a 50 S ribosomal protein involved in both EFG and EFT dependent GTP-hydrolysis FEBS Lett 28: 325-328.
 30. David James Stevenson , Frank Gunn-Moore , Kishan Dholakia Journal of biomedical optics Light forces the pace : optical manipulation for biophotonics
 31. Heckenberg, N. R., McDuV, R., Smith, C. P., and White, A. G., 1992, Optics Lett., 17, 221.
 32. Heckenberg, N. R., McDuV, R., Smith, C. P., Rubinsztein-Dunlop, H., and Wegener, M. J., 1992, Opt. quant. Electron., 24, S951.
 33. Liesener, J., Reicherter, M., Haist, T., and Tiziani, H. J., 2000, Optics Commun., 185, 77.
 34. Mogensen, P. C., and GluÈ ckstad, J., 2000, Optics Commun., 175, 75. [15] Block, S. M., Blair, H. C., and Berg, H. C., 1989, Nature, 338, 514