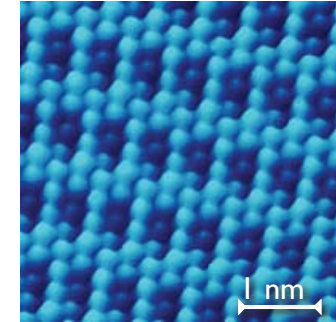


# BIOMOLEKULÁRIS SZERKEZET ÉS DINAMIKA VIZSGÁLATA

FLUORESZCENCIA, EGYMOLEKULA BIOFIZIKA,  
RÁDIÓSPEKTROSKÓPIÁK (EPR, NMR, MRI)



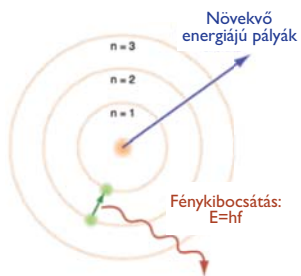
John Dalton (1766-1844)



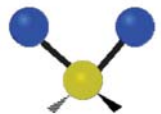
Oxigén atomok rhodium egykristály felületén

## Fluoreszcencia és különleges alkalmazásai

Energiaátmenetek  
atomban

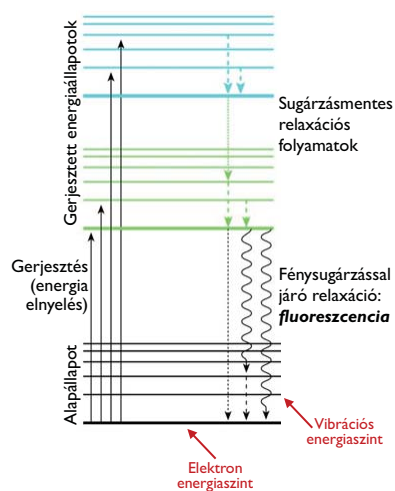


Egy molekula energiáját  
mozgásállapota is befolyásolja



Vibráció

Energiaátmenetek  
molekulában



Fluoreszcencia genetikailag  
módosított fajban:

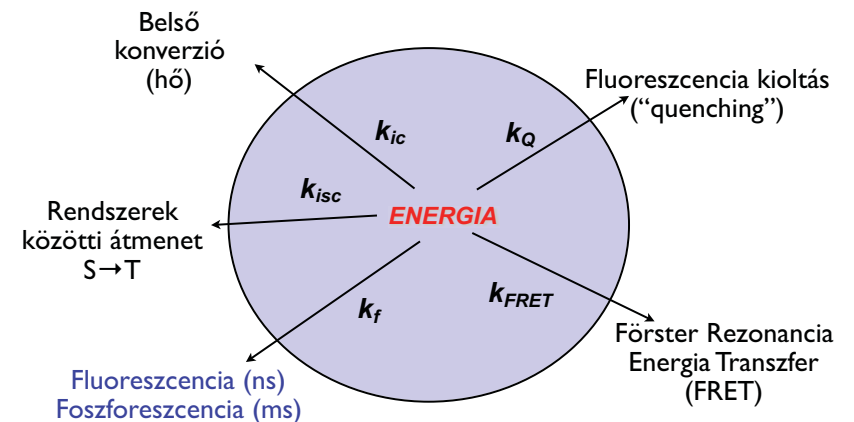


GFP: ~27 kDa,  
238 aa; 11-szállú  
β-hordó;  
kromofór a központi hélix  
Ser65-Tyr66-  
Gly67  
oldalláncából



“Zöld egér”

## Gerjesztés során elnyelt energia sorsa



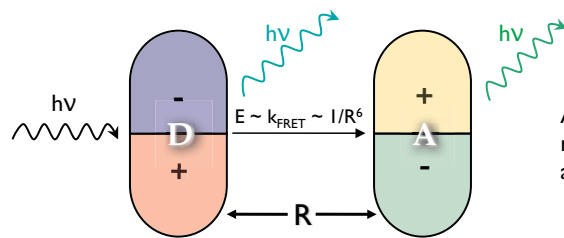
Sugárzásos és nem sugárzásos átmenetek!

# Förster Rezonancia Energia Transzfer (FRET)

- A gerjesztett állapotban lévő molekula (**donor**), valamint egy megfelelő spektroszkópiás követelményeket kielégítő molekula (**akceptor**) között **dipól-dipól** kölcsönhatás révén, **sugárzás nélküli** energiaátadás formájában jön létre.
- Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer (FRET):** ha az energiatranszfer szereplői fluorofórok.



Theodor Förster  
(1910-1974)



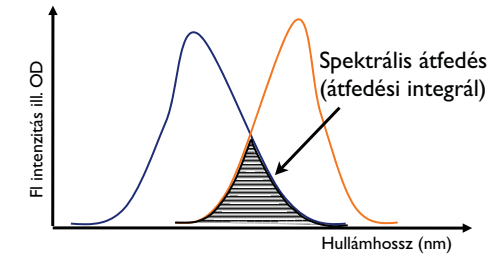
A gerjesztett donor (D) relaxációjához hozzájárul az akceptor (A) molekula emissziója!

## A FRET feltételei

- Fluoreszcens** donor (D) és akceptor (A) molekula.
- A donor és akceptor molekula közötti **távolság (R)** 2-10 nm!
- Átfedés** a **donor** emissziós spektruma és az **akceptor** abszorpciós spektruma között.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

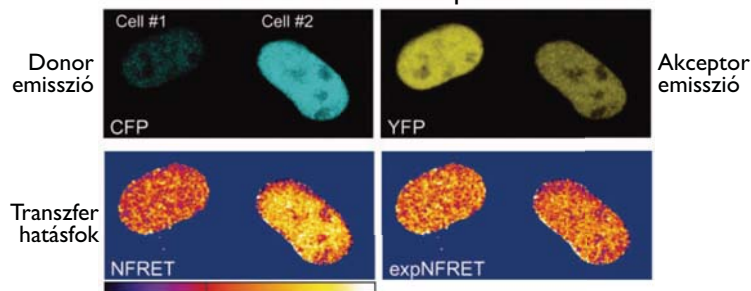
$R_0$ : **Förster-távolság** (Az a távolság melyen a FRET hatások felére csökken: transzferhatásfok 0.5)  
 $R$ : A fluorofórok (D-A) közötti aktuális távolság



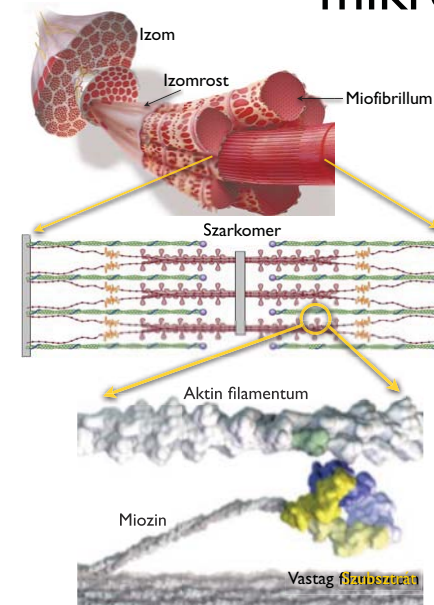
## A FRET alkalmazása

- Molekuláris mérőszalag:** távolságmérés a nm-es ( $10^{-9}$ m) tartományban.
- Nagyon érzékeny (lásd hatvány összefüggés)!
- Alkalmazás:**
  - Molekulák közötti **kölcsönhatások** tanulmányozása.
  - Molekulákon belüli **szerkezeti** változások tanulmányozása.

FRET mikroszkópia



## Érzékenyített fluoreszcencia video mikroszkópia



In vitro motilitási próba

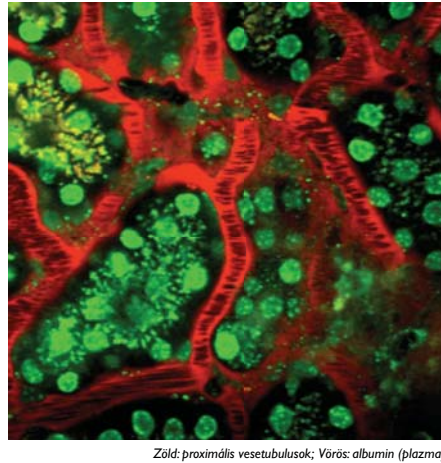
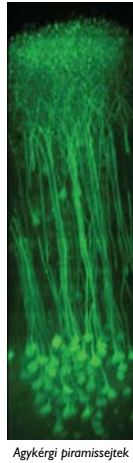
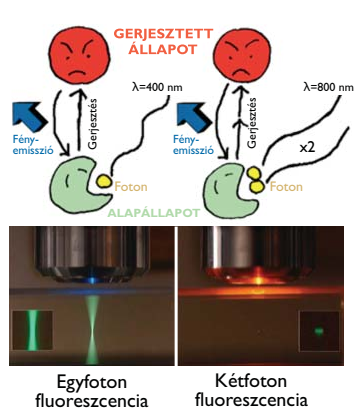


Rodamin-jelölt aktin filamentumok motilitása - érzékenyített epifluoreszcencia videomikroszkópia



# Multifoton fluoreszcencia mikroszkópia

- Két (vagy több) foton energiája összeadódik a gerjesztéskor
- Gerjesztés (következésképp emisszió) csak a fókuszpontban (limitált fotokárosítás)
- Gerjesztés nagy (közel IR) hullámhosszú, rövid (fs) fényimpulzusokkal
- Nagy hullámhossz miatt mély optikai behatolás (akár 2 mm)

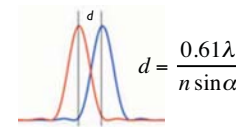


# Egyedi fluoreszcens molekulák feloldása: Szuperfelbontású mikroszkópia

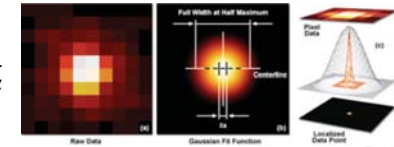
Kémiai Nobel-díj, 2014

A feloldási problémát pozíciómeghatározási problémává alakítjuk

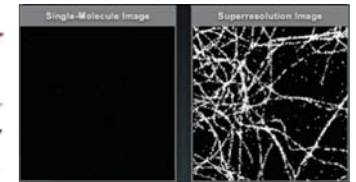
Feloldási probléma (Abbé-elv)



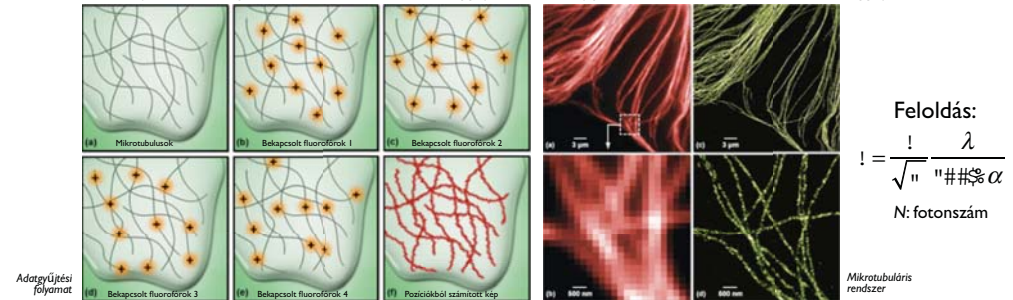
Pozíciómeghatározási probléma (pontosság a foton számától függ)



"Stochasztikus" adatgyűjtés egyedi fluorofórokról



STORM ("stochastic optical reconstruction microscopy"); PALM ("photoactivated localization microscopy")



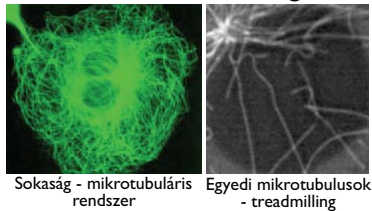
Feloldás:

$$\Delta r = \frac{\lambda}{\sqrt{N}}$$

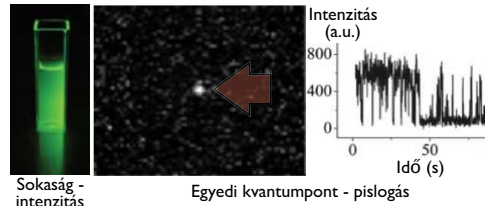
N: foton szám

## Egymolekula biofizika

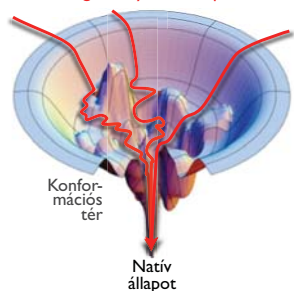
1. Egyének (tér- időbeli trajektóriák) azonosíthatók sokaságban



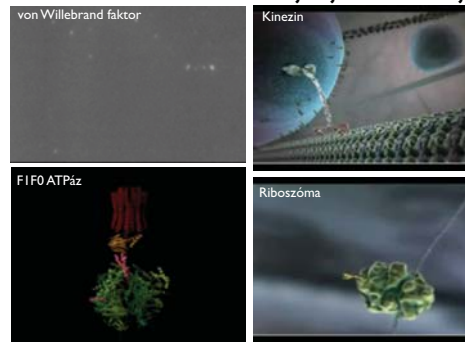
2. Sztochasztikus eseményeket fedeztünk fel



3. Párhuzamos útvonalon haladó folyamatokat ismerhetünk meg

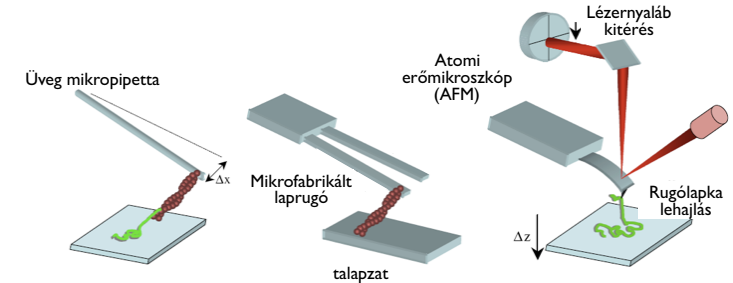


4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük

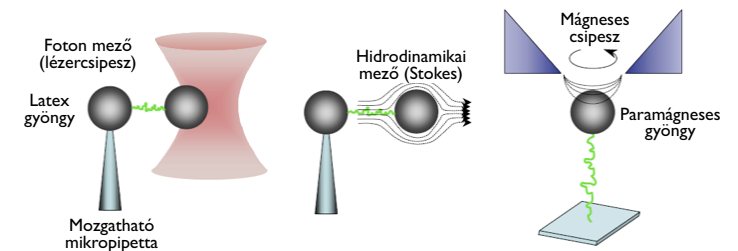


## Egyedi molekulák manipulálása

Rugólapka módszerek

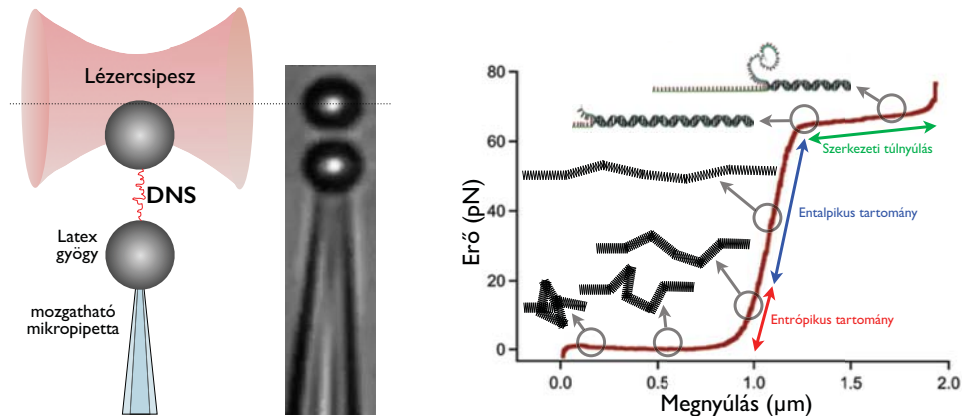


Mező alapú módszerek



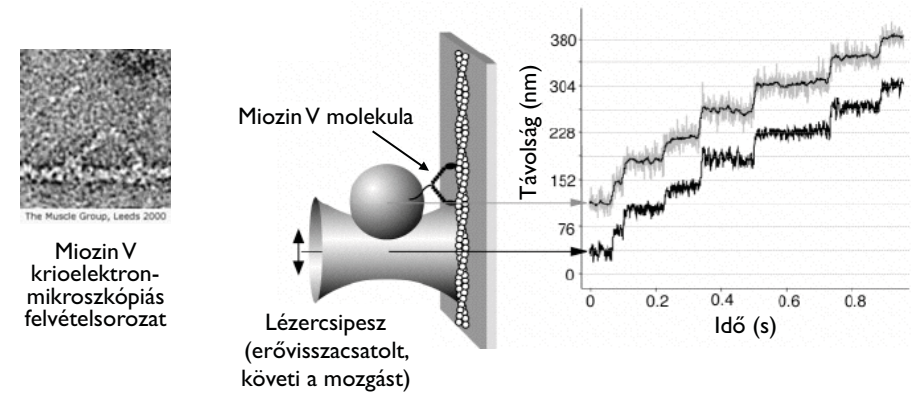
# Mérhető paraméterek I. Erő

Mekkora erő fejlődik egy dsDNS molekula nyújtásakor?



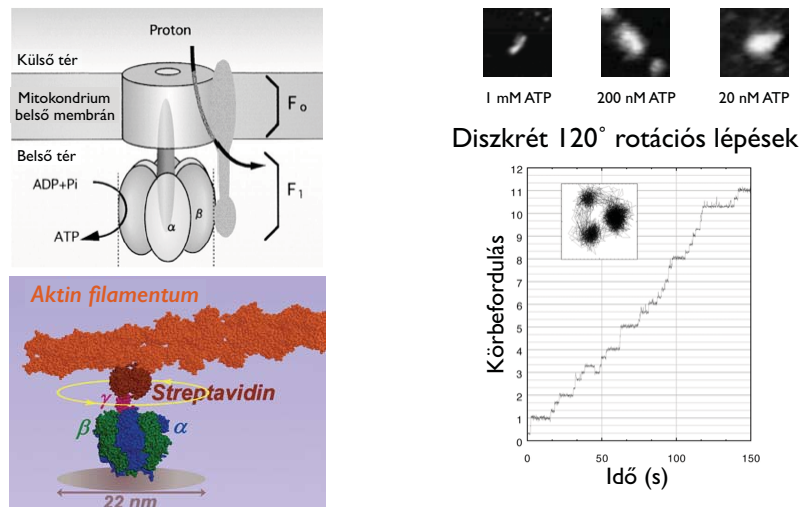
# Mérhető paraméterek II. Távolság

Mekkora lép egy motorfehérje?



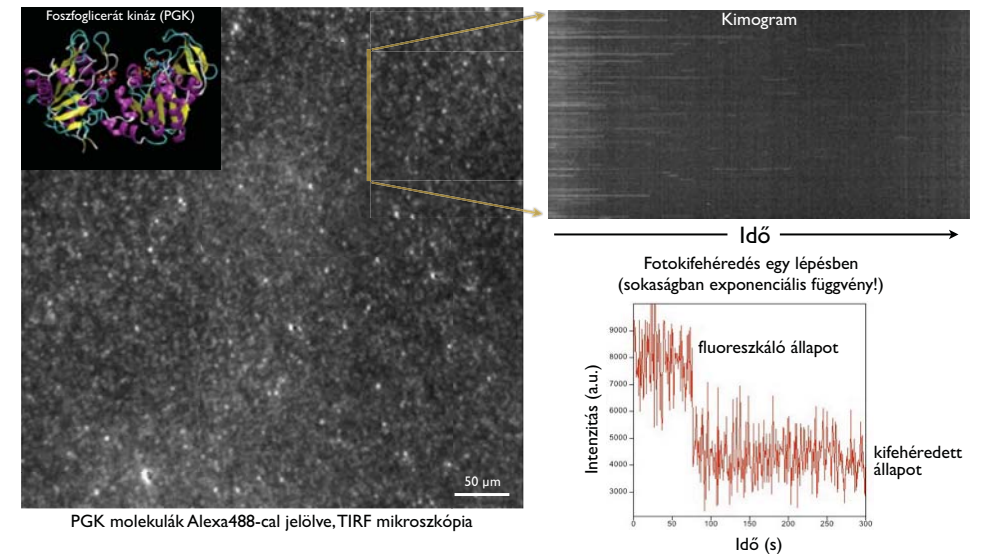
# Mérhető paraméterek II. Elfordulási szög

Hogyan működik az ATP szintáz?



# Mérhető paraméterek I. Fluoreszcencia

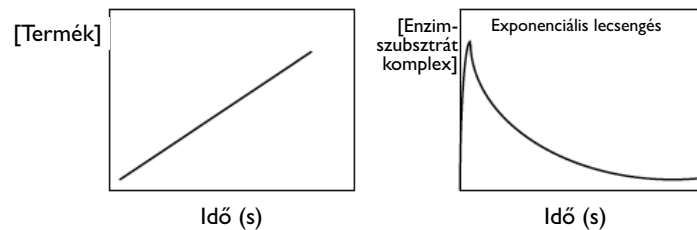
Milyen állapotok között fluktuál egy molekula?



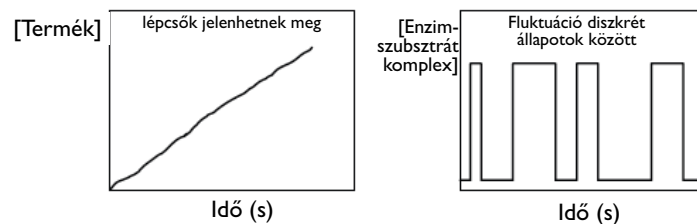


# Sokaság versus egymolekula viselkedés

Sokaság:



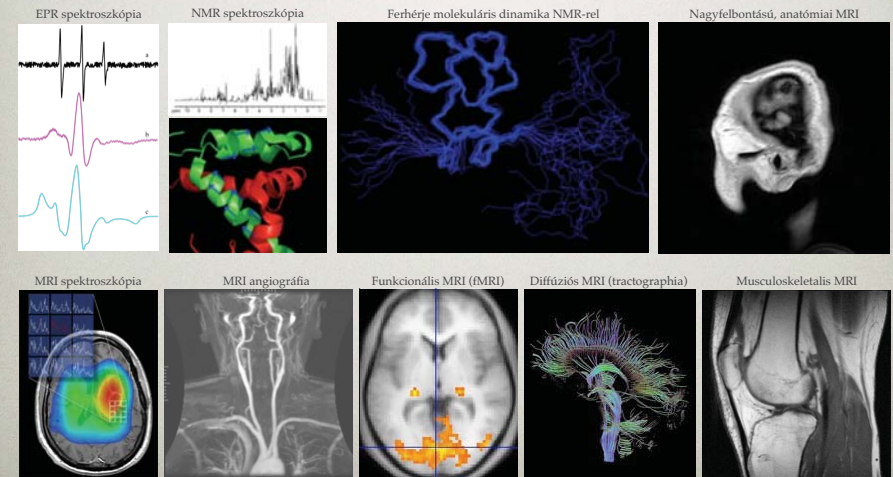
Egyedi molekula:



## “RÁDIÓSPEKTROSKÓPIÁK”:

FORRADALMASÍTOTTÁK A FIZIKÁT, KÉMIÁT, BIOLÓGIÁT ÉS ORVOSTUDOMÁNYT

- Elektronspin rezonancia (ESR, elektron paramágneses rezonancia - EPR)
- Mágneses magrezonancia (NMR, MRI)



## ATOMI, MOLEKULÁRIS RENDSZEREK ELEMI MÁGNESKÉNT VISELKEDHETNEK

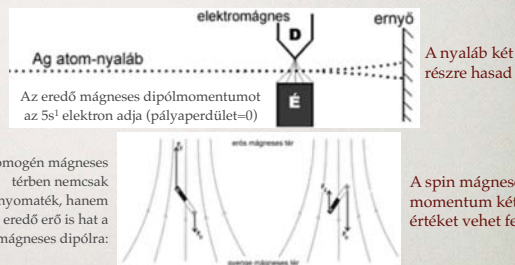
Stern-Gerlach kísérlet (1922)



Otto Stern  
(1888-1969)



Walther Gerlach  
(1889-1979)



Mágneses magrezonancia (“nuclear magnetic resonance”, NMR)  
Nobel-díj, 1952



Isidor Rabi  
(1898-1988)



Felix Bloch  
(1905-1983)

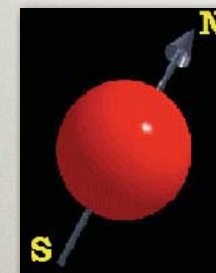


Edward Mills Purcell  
(1912-1997)

Mágneses rezonancia: Mágneses térbe helyezett minta általi, rezonancia-abszorpció jellegű elektromágneses energia elnyelés.

## ÉREDŐ SPINNEL RENDELKEZŐ RENDSZEREK: ELEMI MÁGNESEK

- Elemi részecskék (p, n, e) saját *spinnel* rendelkeznek.
- Az elemi részecskék száma és bizonyos rendező elvek (pl. Pauli-elv) miatt a rendszerben *eredő spin* léphet fel.
- Atommag: páratlan tömegszám - feles magspin ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ); páros tömegszám, páratlan rendszám - magspin egész; páros tömegszám és rendszám - magspin zérus.
- Elektron: eredő elektronspin stabil párosítatlan elektront tartalmazó rendszerekben (pl. szabad gyökök).
- Töltés és eredő spin miatt *mágneses momentum* lép fel.



Pörgettyűmodell

Mágneses momentum:

$$M_N = \gamma_N L$$

$\gamma_N$  = atommag giromágneses hányadosa (mágneses momentum és perdület aránya)

$L$  = magspin ( $L = \sqrt{I(I+1)}\hbar$ ), ahol  $I$  = eredő spin kvantumszám.

Elektronspin mágneses momentuma:

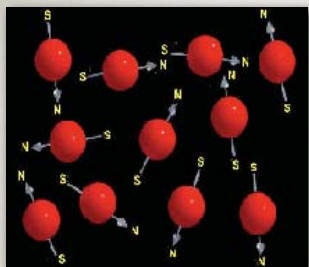
$$M_e = -g\mu_B \sqrt{S(S+1)}$$

$g$  = elektron g-faktora (a mágneses momentum és giromágneses hányados kapcsolatát leíró dimenzió nélküli arányszám)

$\mu_B$  = Bohr magneton (az elektron mágneses dipólmomentumának egysége)

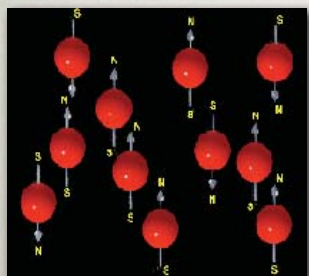
$S$  = spin kvantumszám





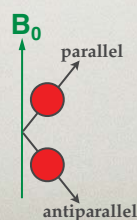
## Mágneses tér hiányában: elemi mágnesek orientációja random

**Paramágnesség:** külső mágneses tér hatására fellépő mágnesezettség (mágneses dipólok orientációja).

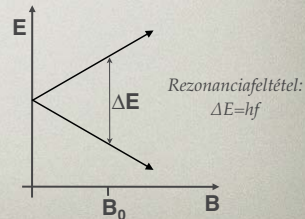


## Mágneses térben:

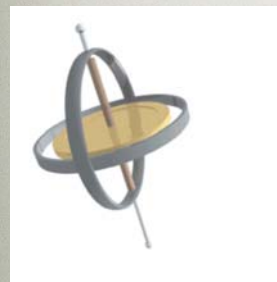
elemi mágnesek  
orientálódnak



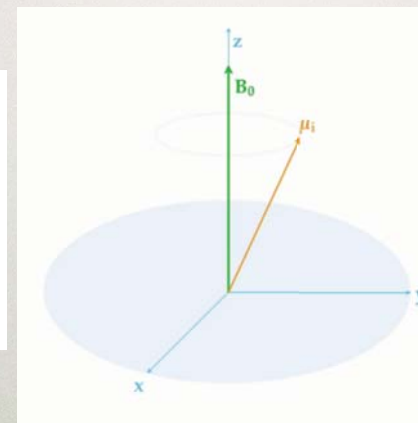
energiaszintek  
felhasadnak



## PRECESSZIÓ



Pörcgettyű, giroszkóp



Klasszikus ("pörcgettyű")  
modell szerint -  
Precessziós vagy  
Larmor frekvencia:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

$$f_{Larmor} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

Rezonanciafeltétel:

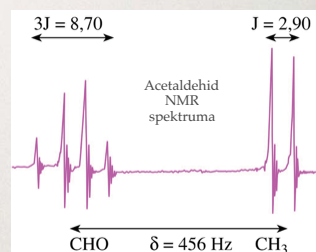
$$\Delta E = \frac{h\omega_0}{2\pi}$$



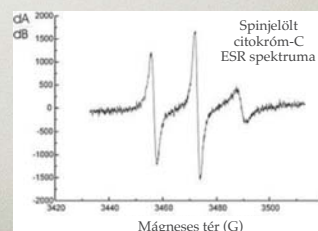
Felix Bloch, 1946

## NMR ÉS EPR SPEKTROSKÓPIA

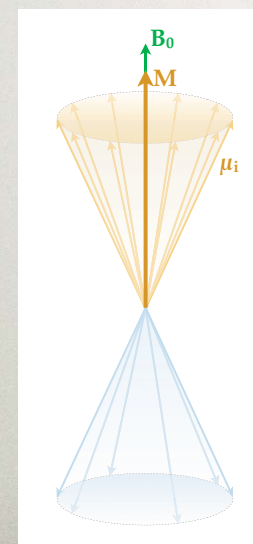
- NMR spektrum: elnyelt elektromágneses sugárzás intenzitása frekvencia függvényében.
- "NMR-vonal" görbe alatti területe az abszorbeáló atommagok számával arányos.
- Elektronfelhő (i.e., annak szerkezete) befolyásolja a lokális mágneses teret: frekvenciafeltétel elhangolódik ("kémiai eltolódás"). Kémiai szerkezetmeghatározás lehetősége.



- EPR spektrum: elnyelt elektromágneses sugárzás intenzitása a mágneses tér függvényében.
- NMR-énél alacsonyabb mágneses tér, de nagyobb elektromágneses sugárzási frekvenciák (mikrohullám).
- Spin-jelölés: stabil párosítatlan elektront tartalmazó vegyülettel való jelölés.
- Mozgási (rotációs) sebességek mérési lehetősége a  $10^{-4} - 10^{-2}$  s időtartományban.



## MAKROSKÓPOS MÁGNESEZETTSÉG KÜLÖNBÖZŐ ENERGIASZINTEKEN SPINTÖBBLET MIATT



$B_0$  = mágneses tér  
 $M$  = makroszkópos mágnesezettség

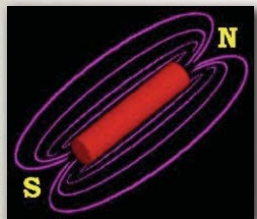
**Alacsony energia állapot**  
proton esetében parallel

**Magas energia állapot**  
proton esetében antiparallel

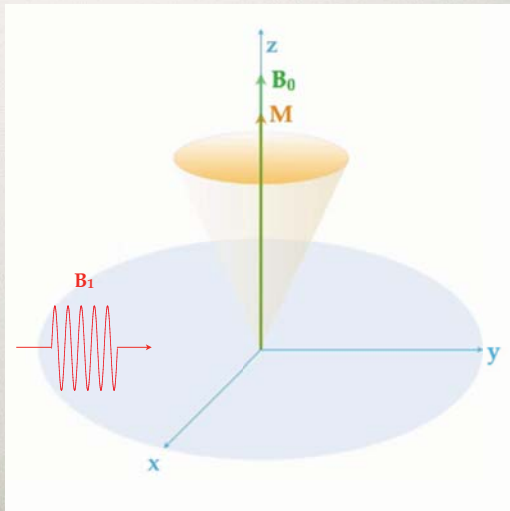
# GERJESZTÉS

## RÁDIÓFREKVENCIÁS ELEKTROMÁGNESES SUGÁRZÁSSAL

Rezonancia feltétel: Larmor frekvencia

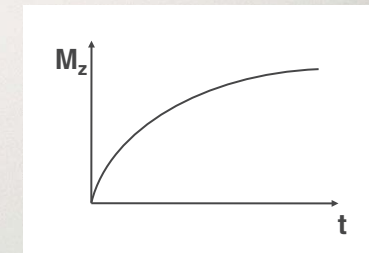
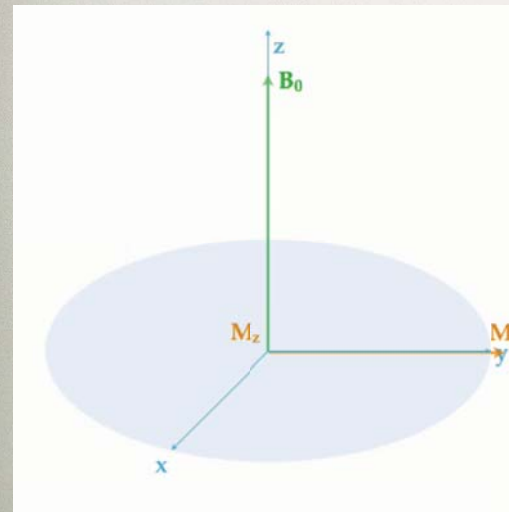


$B_0$  = mágneses tér  
 $M$  = makroszkópos mágneszettség  
 $B_1$  = besugárzott rádiófrekvenciás elektromágneses tér



# SPIN-RÁCS RELAXÁCIÓ

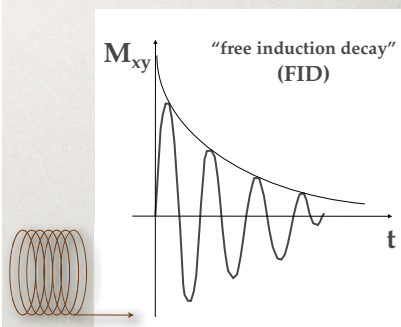
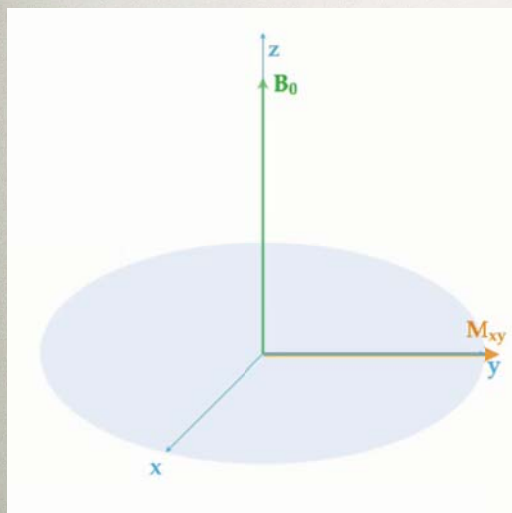
## T1 VAGY LONGITUDINÁLIS RELAXÁCIÓ



T1 relaxációs idő:  
 elemi mágnes (proton) és  
 környezete közötti kölcsönhatásra utal

# SPIN-SPIN RELAXÁCIÓ

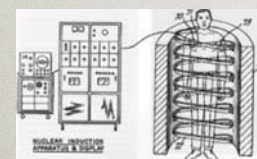
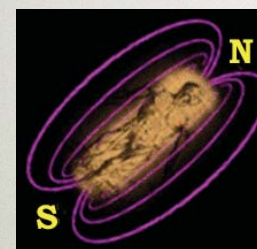
## T2 VAGY TRANZVERZÁLIS RELAXÁCIÓ



T2 relaxációs idő:  
 elemi mágnesek (protonok)  
 közötti kölcsönhatásra utal

# MRI:

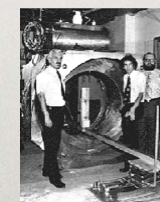
## AZ EMBERI TEST MAKROSKÓPOS MÁGNESEZETTSÉGÉT HOZZA LÉTRE



Ábra Damadian szabványügyi bejelentéséből



Raymond V. Damadian  
 (1936-)



"indomitable": "a rettenthetetlen"

Nobel-díj (2003)



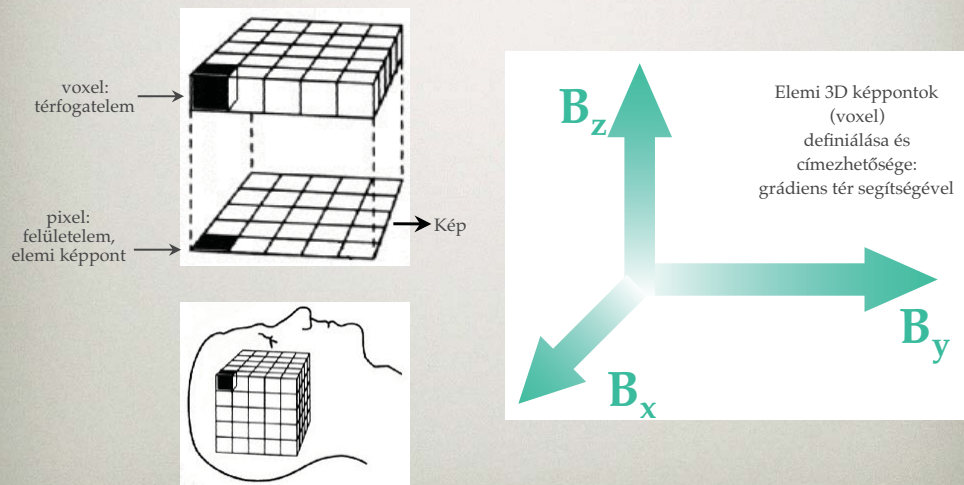
Paul C. Lauterbur  
 (1929-)



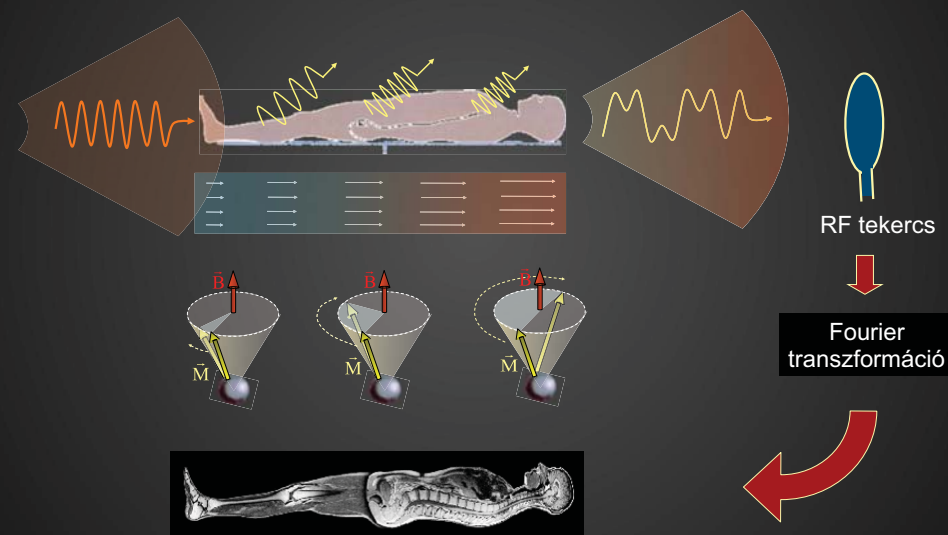
Peter Mansfield  
 (1933-)



# MRI KÉPALKOTÁS I: TÉRBELI FELBONTÁS

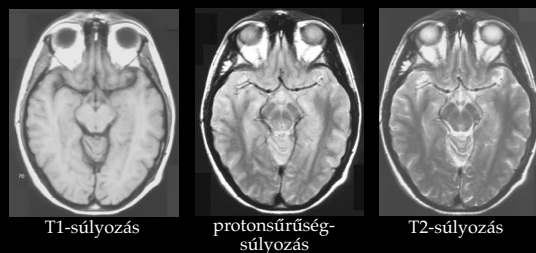
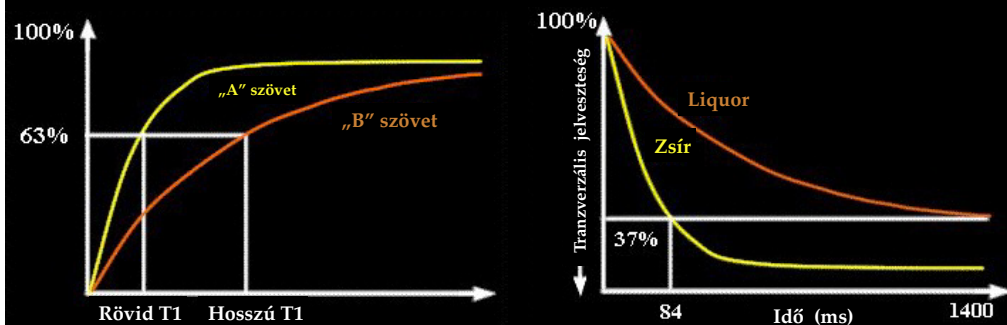


# NMR JEL TÉRBELI KÓDOLÁSA: A PRECESSZIÓS FREKVENCIA MÁGNESES TÉRFÜGGÉSÉRE ÉPÜL

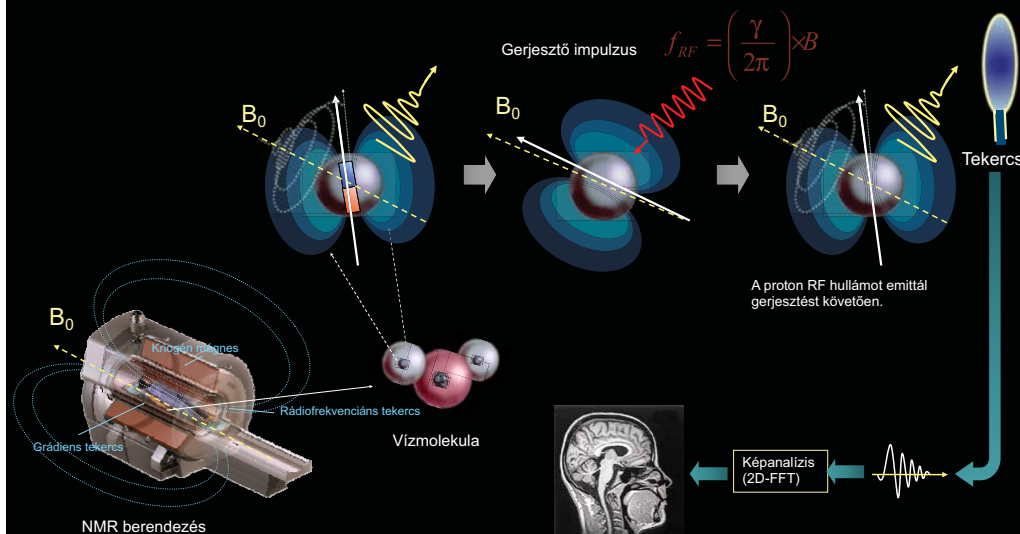


# MRI KÉPALKOTÁS II: SZÍNFELBONTÁS (KONTRASZT) RELAXÁCIÓS IDŐK ALAPJÁN

SZÍNFELBONTÁS (KONTRASZT) RELAXÁCIÓS IDŐK ALAPJÁN



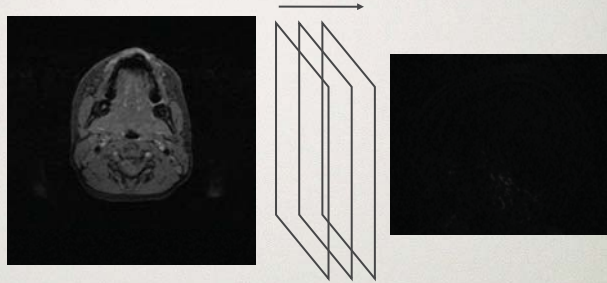
# MRI ÖSSZEFOGLALÁS



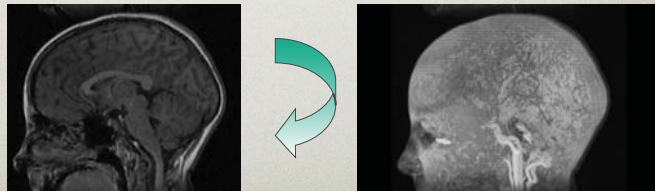


## MRI: KÉPI INFORMÁCIÓ MANIPULÁLÁSA I

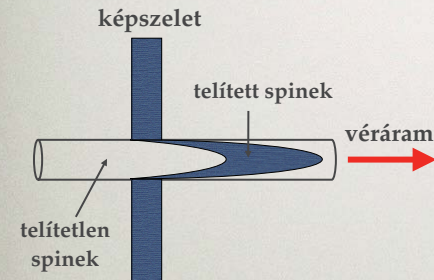
Újraszeletelés  
merőleges síkban



Térbeli projekció  
(„volume rendering”)



## MRI: NON-INVÁZÍV ANGIOGRÁFIA

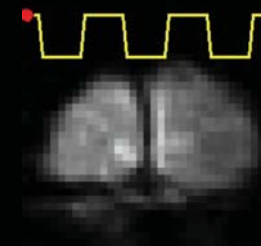


## MRI MOZGÓKÉP NAGY IDŐFELBONTÁSÚ FELVÉTELEK ALAPJÁN



Aortabillentyű nyílása-záródása

## FUNKCIONÁLIS MRI (FMRI) ÉLETTANI FOLYAMATTAL SZINKRON FELVETT NAGY IDŐFELBONTÁSÚ KÉPSOROZAT



Villogó fény hatása a látókéregre

# SZUPERPONÁLT MRI ÉS PET KÉPSOROZAT



PET aktivitás: szemmozgatás során  
Térbeli rekonstrukció

