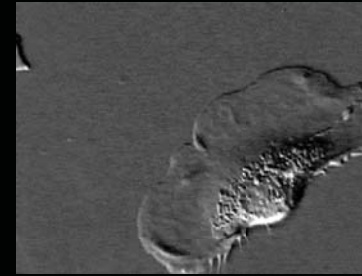


# BIOMOLEKULÁRIS RENDSZEREK VIZSGÁLATA

SPEKTROSZKÓPIÁK, MIKROSZKÓPIÁK

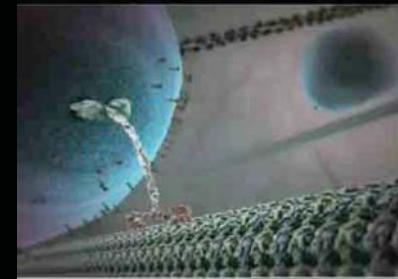
## ÉLŐ SEJT: MOLEKULAGÉPEZETEK SOKASÁGA



*Tovacsúzó keratinocita*



*Mikrotubulus dinamikus instabilitás*



*Vezikulum transport kinesinnel*



*Fehérjeszintézis riboszmán*

<http://multimedia.mcb.harvard.edu>

## VIZSGÁLATOK CÉLJA

- Biomolekuláris **szerkezet** és
- **működés** pontosabb megismerése

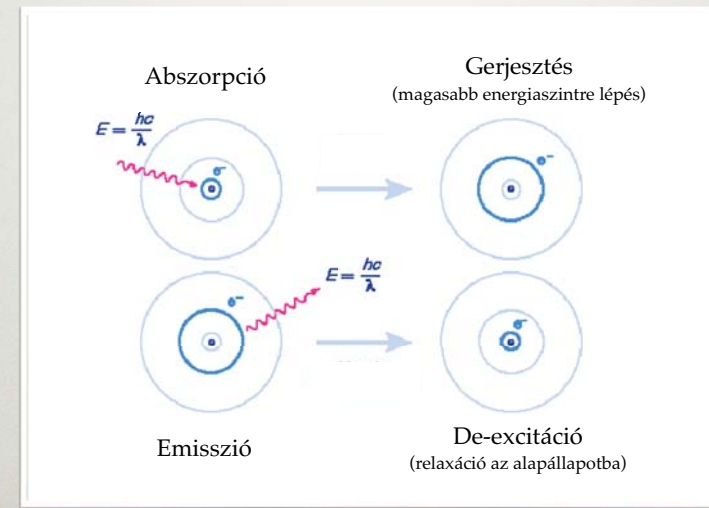
## VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

- Spektroszkópiák:
  - elektromágneses sugárzás és anyag közötti kölcsönhatások vizsgálata
  - abszorpció; fluoreszcencia (FRET); NMR
- Mikroszkópiák:
  - képalkotás a szabad szemmel nem látható világról
  - az Abbé-féle feloldási határ “megerősökölése”

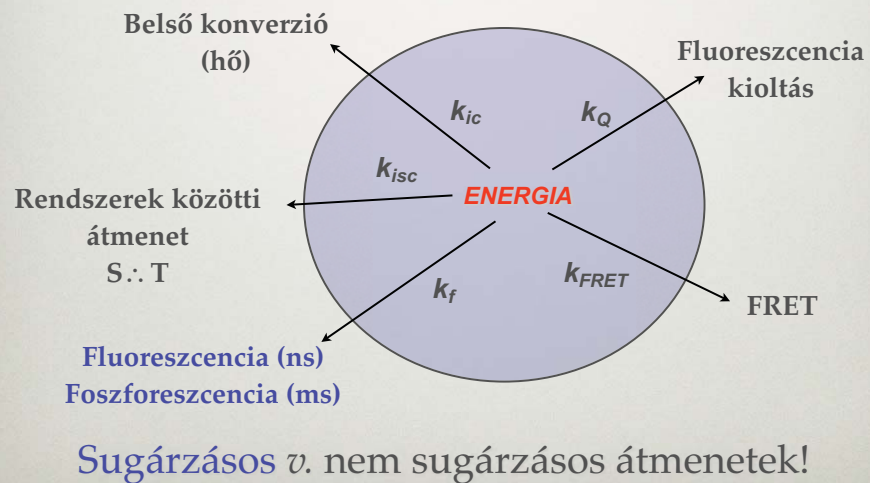
# LUMINESZCENCIA

- Gerjesztett állapotból fényemisszióval járó relaxáció
- A hőmérsékleti sugárzáson felül kibocsátott sugárzás
- “Hideg fény”
- Fluoreszcencia és foszforeszcencia

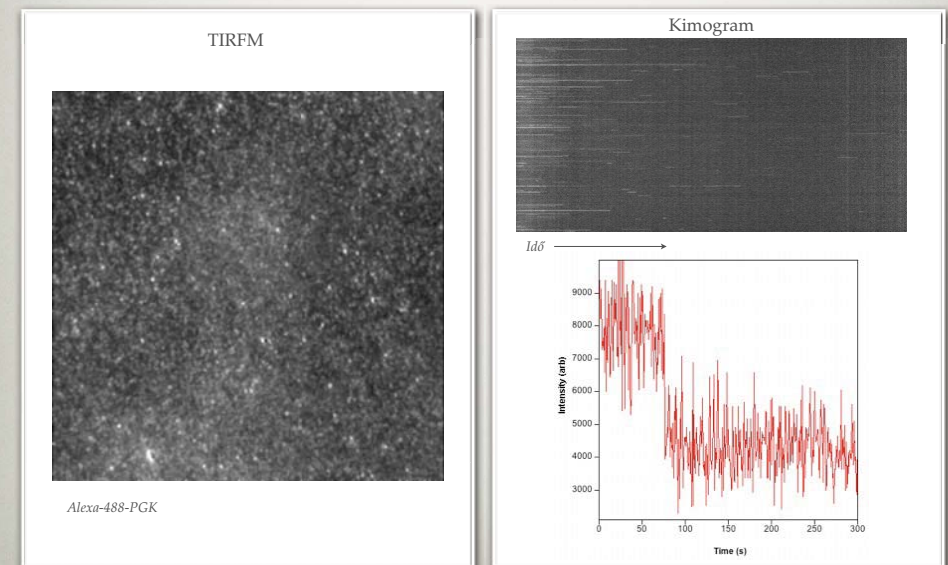
# A LUMINESZCENCIA LÉPÉSEI



# GERJESZTÉS SORÁN ELNYELT ENERGIA SORSA



# Egyedi molekula fluoreszcencia



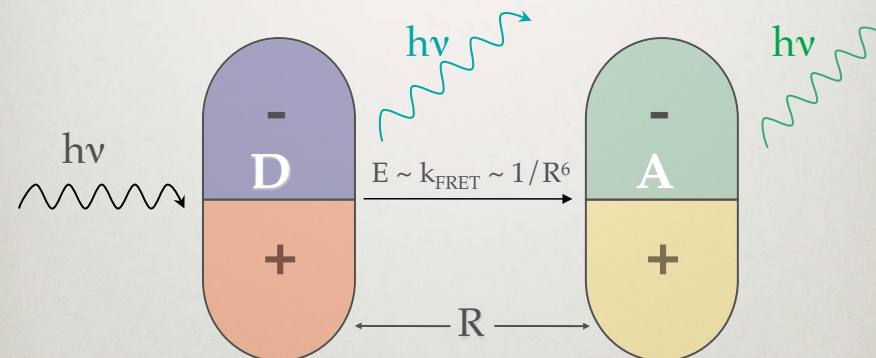
# FLUORESZCENCIA REZONANCIA ENERGIA TRANSZFER

## Általánosan:

- 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 energiáttranszfer szereplői fluorofórok.

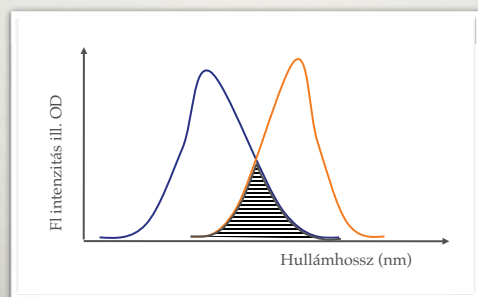
## FRET

- A gerjesztett donor relaxációjához hozzájárul az akceptor molekula emissziója!



## A FRET FELTÉTELEI

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

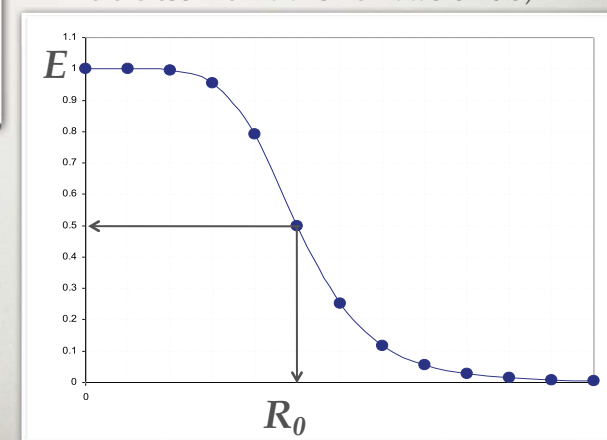


## A FRET TÁVOLSÁGFÜGGÉSE

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

A fluorofórok közötti  
aktuális távolság

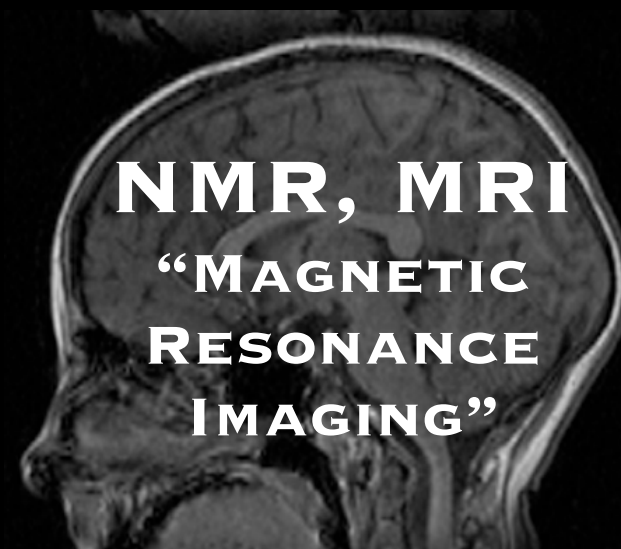
**Förster-távolság**  
(Az a távolság melyen a FRET hatásfok  
felére csökken: transzferhatásfok 0.5)



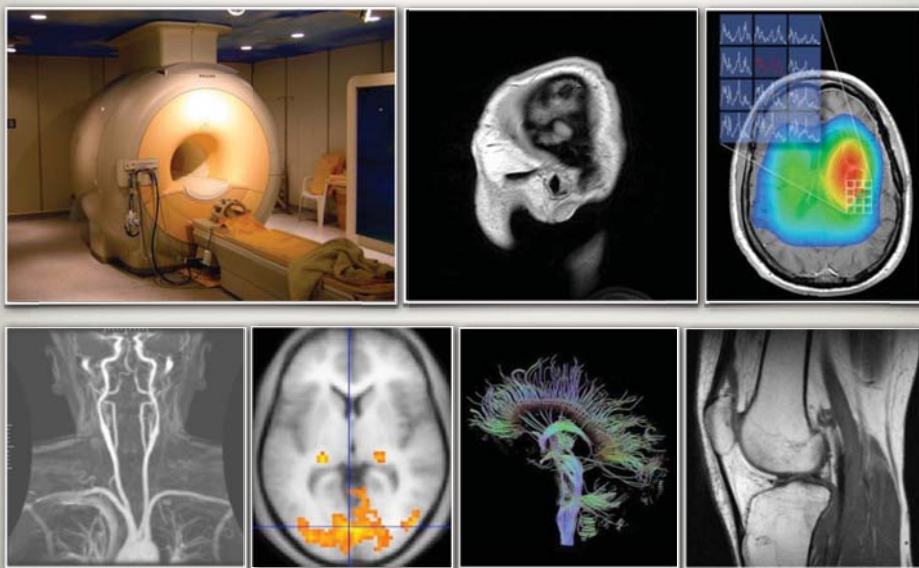


## A FRET ALKALMAZÁSA

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



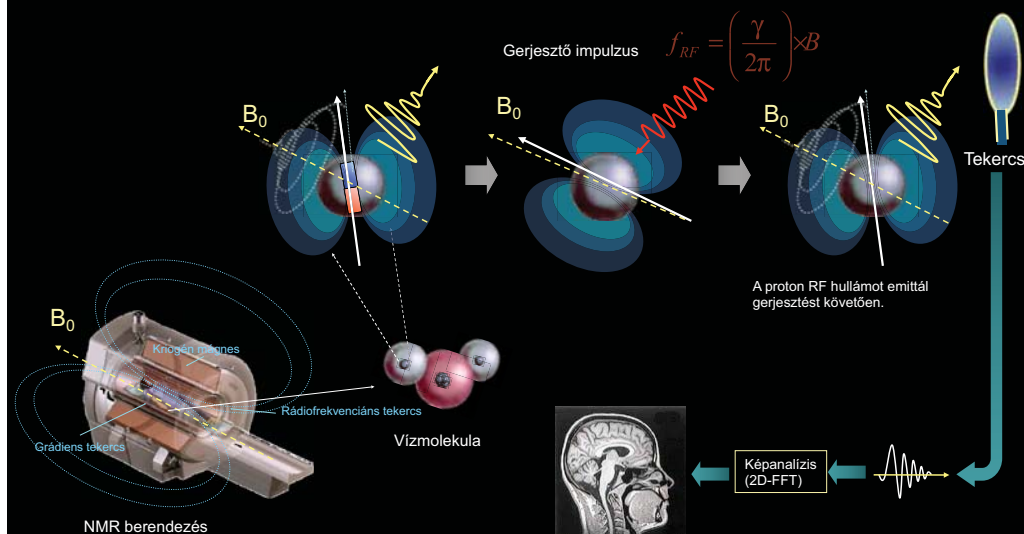
## MRI: A DIAGNOSZTIKÁT FORRADALMASÍTÓ MÓDSZER



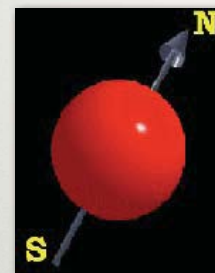
## MRI: NON-INVÁZÍV TOMOGRÁFIÁS MÓDSZER



## NMR: ALAPELVEK



## MAGSPINNEL RENDELKEZŐ MAGOK: ELEMI MÁGNESEK

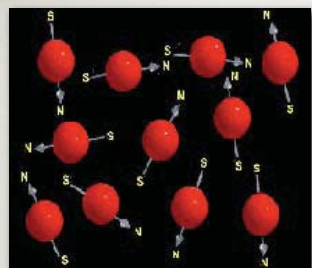


Mágneses momentum:

$$\mu_i = \gamma L$$

$\gamma$  = giromágneses hányados  
L = magspin

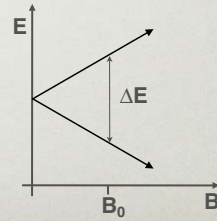
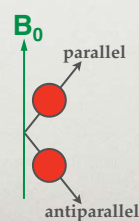
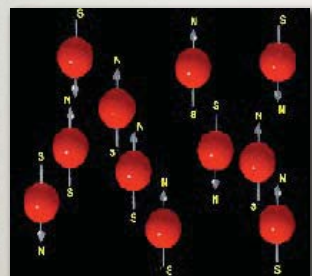
Mágneses tér hiányában:  
elemi mágnesek orientációja random



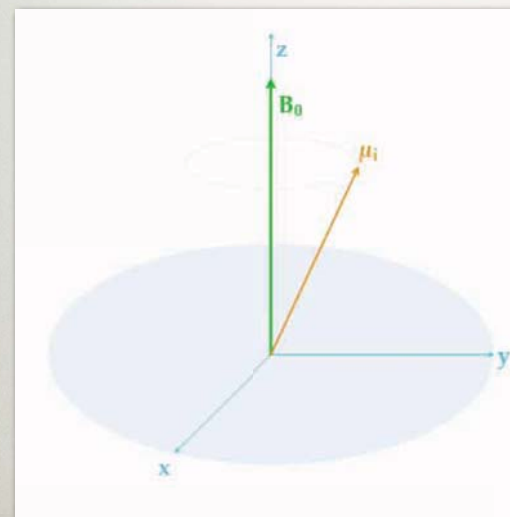
Mágneses térben:

elemi mágnesek  
orientálódnak

energiaszintek  
felhasadnak



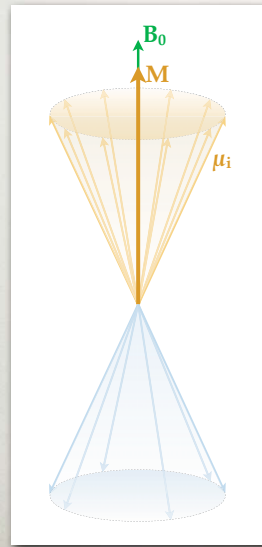
## PRECESSZIÓ



Precessziós vagy  
Larmor frekvencia:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

## MAKROSKÓPOS MÁGNESEZETTSÉG KÜLÖNBÖZŐ ENERGIASZINTEKEN SPINTÖBBLET MIATT



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

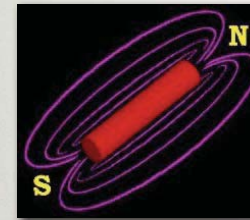
**Alacsony energia állapot**  
proton esetében parallel

**Magas energia állapot**  
proton esetében antiparallel

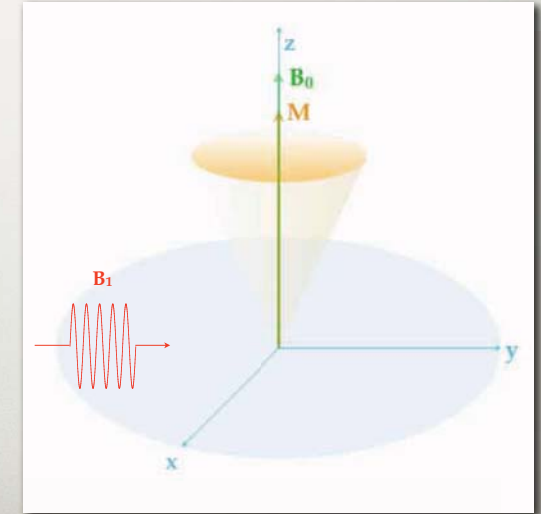
## GERJESZTÉS

### RÁDIÓFREKVENCIÁS ELEKTROMÁGNESES SUGÁRZÁSSAL

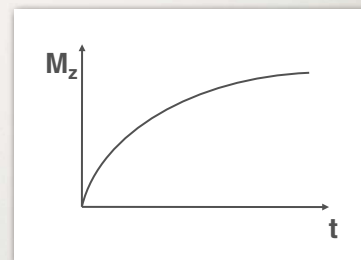
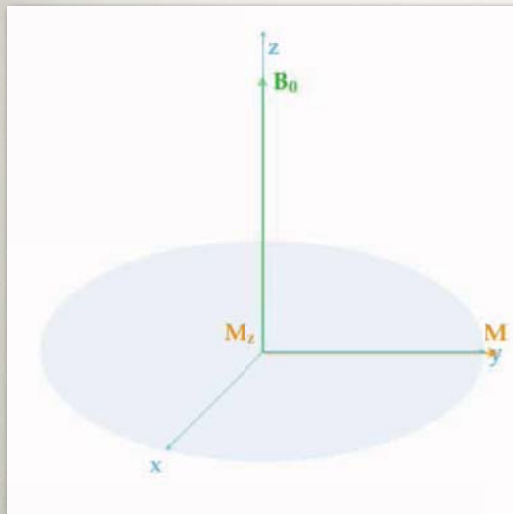
Rezonancia feltétel: Larmor frekvencia



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

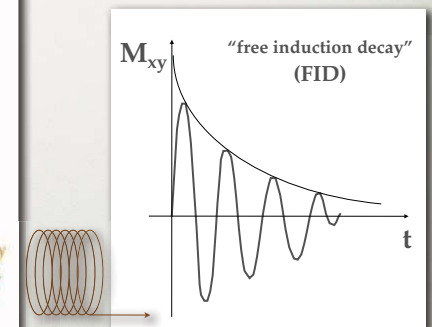
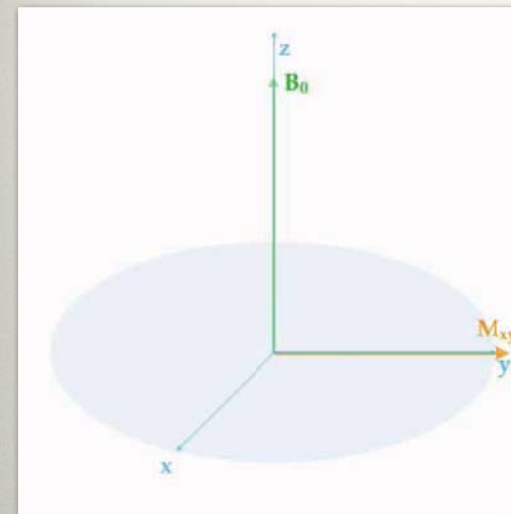


## SPIN-RÁCS RELAXÁCIÓ T1 VAGY LONGITUDINÁLIS RELAXÁCIÓ



**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



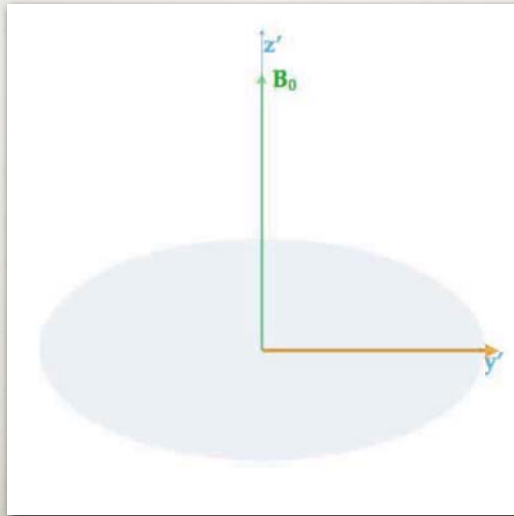
# SPIN-SPIN RELAXÁCIÓ

## T2 VAGY TRANZVERZÁLIS RELAXÁCIÓ

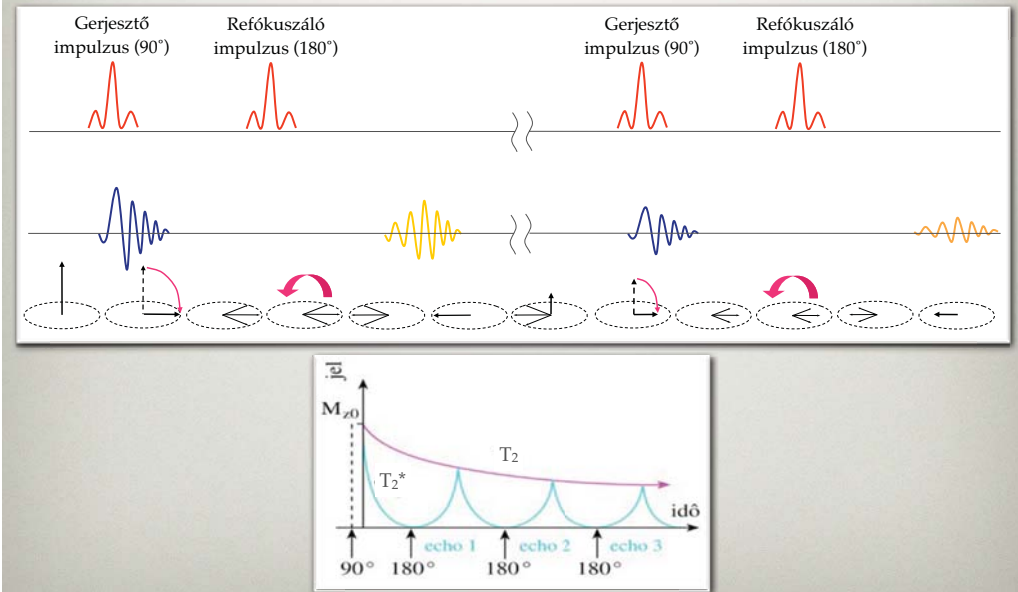
Ismétlődő gerjesztő és relaxációs impulzusok: spin-echo szekvencia



Erwin Hahn, 1949

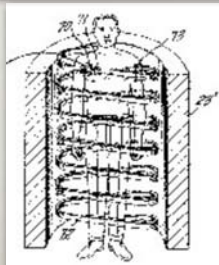
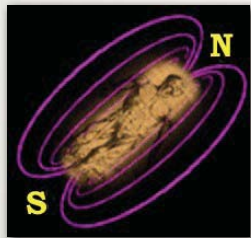


# A “SPIN-ECHO” KÍSÉRLET



# MRI:

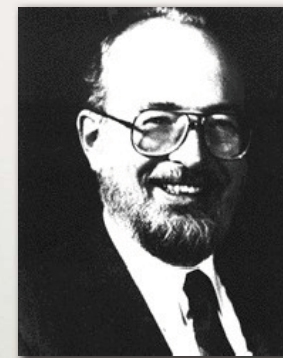
## AZ EMBERI TEST MAKROSKÓPOS MÁGNESEZETTSÉGÉT HOZZA LÉTRE



“indomitable”: “a rettenthetetlen”

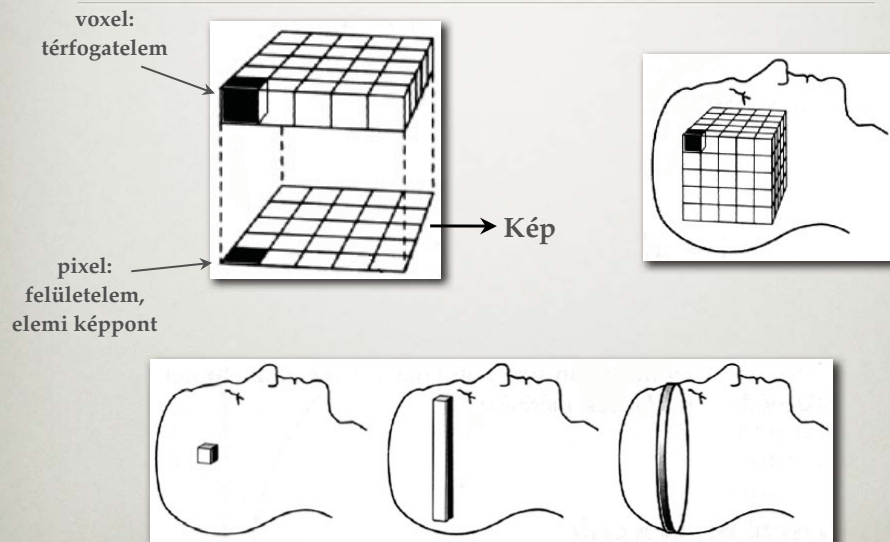
# PAUL C. LAUTERBUR

(1929-)

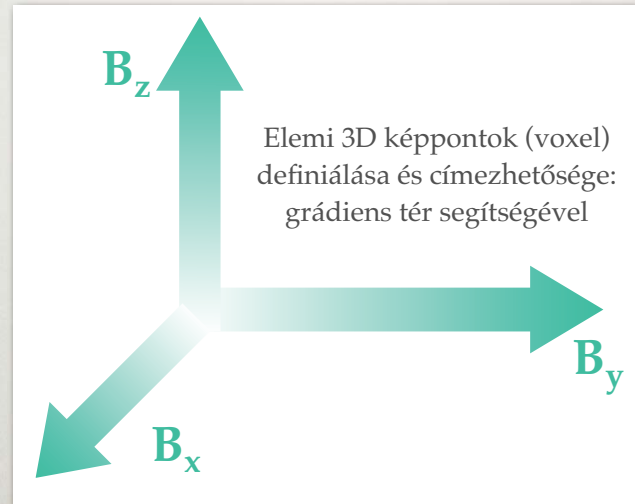


1971: térbeli felbontású NMR kidolgozása

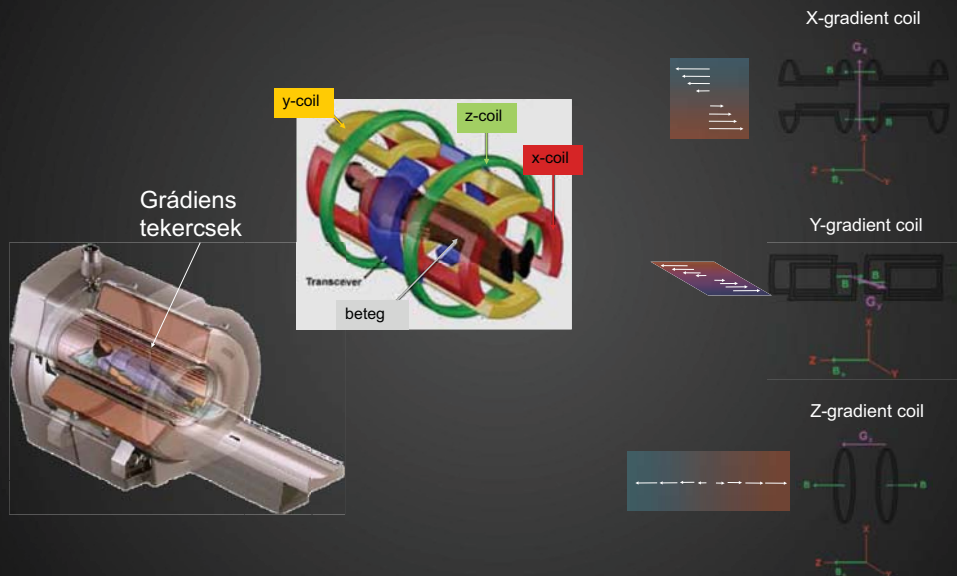
# MRI KÉPALKOTÁS I: TÉRBELI FELBONTÁS



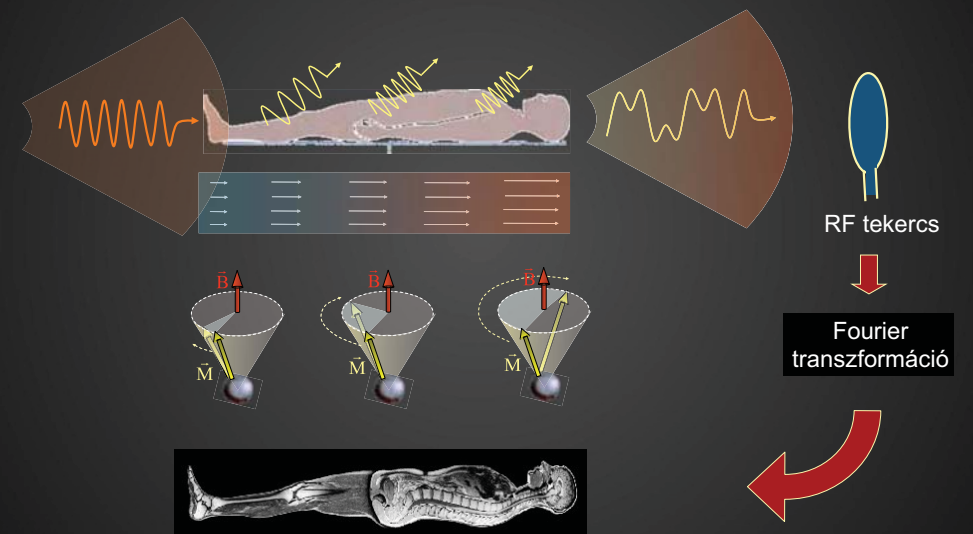
# MRI KÉPALKOTÁS I: TÉRBELI FELBONTÁS



## AZ NMR JEL TÉRBELI KÓDOLÁSA: MÁGNESES TÉRGRÁDIENSEK



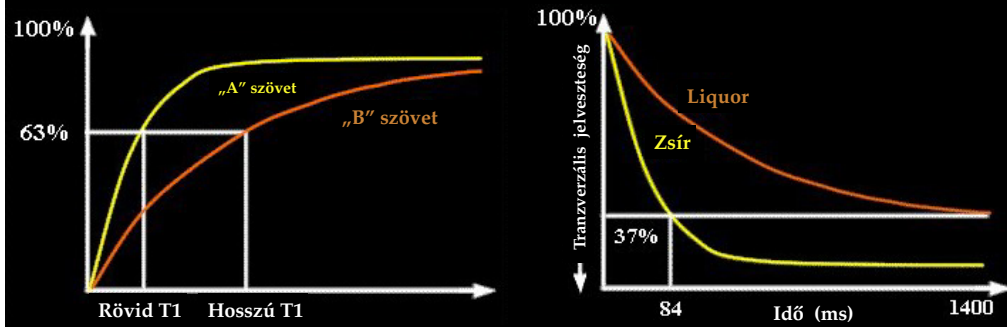
## NMR JEL TÉRBELI KÓDOLÁSA: A PRECESSZIÓ FREKVENCIAVÁLTOZÁSÁRA ÉPÜL





## MRI KÉPALKOTÁS II:

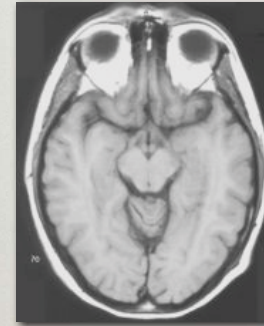
### SZÍNFELBONTÁS (KONTRASZT) RELAXÁCIÓS IDŐK ALAPJÁN



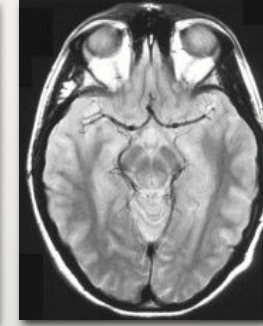
## MRI KÉPALKOTÁS II:

### SZÍNFELBONTÁS (KONTRASZT)

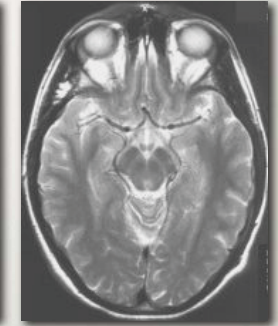
SPINSŰRŰSÉG ÉS RELAXÁCIÓS IDŐK ALAPJÁN



T1-súlyozás



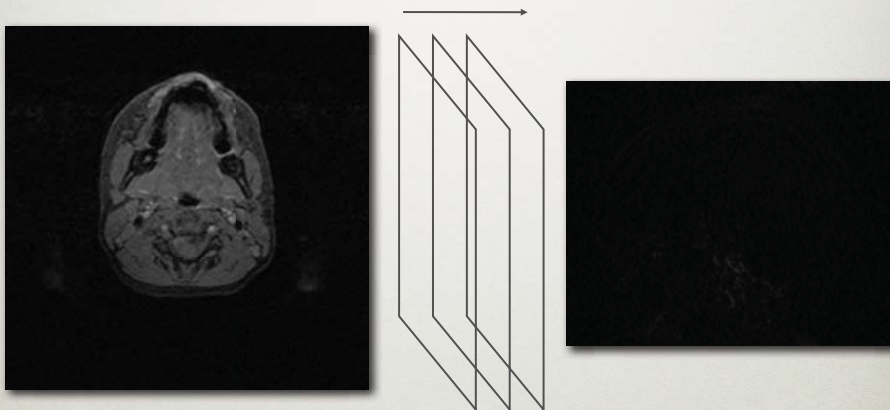
protonsűrűség-súlyozás



T2-súlyozás

## MRI:

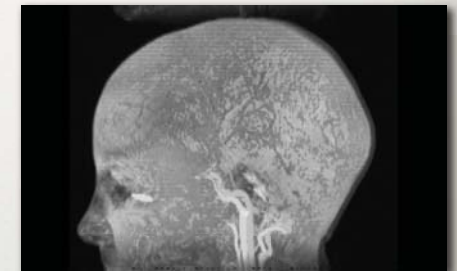
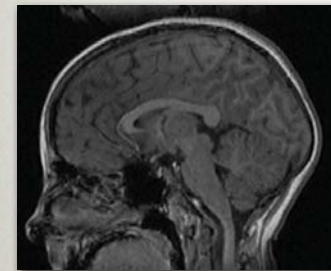
### KÉPI INFORMÁCIÓ MANIPULÁLÁSA I



Újraszeletelés merőleges síkban

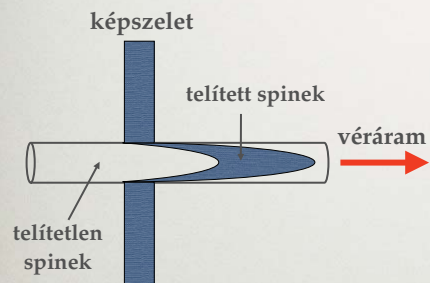
## MRI:

### KÉPI INFORMÁCIÓ MANIPULÁLÁSA II

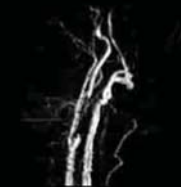


Térbeli projekció  
(„volume rendering”)

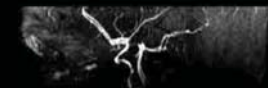
## MRI: NON-INVÁZÍV ANGIOGRÁFIA



## MRI: NON-INVÁZÍV ANGIOGRÁFIA



arteria carotis



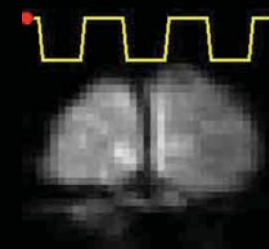
Circulus arteriosus Willisii

## MRI MOZGÓKÉP NAGY IDŐFELBONTÁSÚ FELVÉTELEK ALAPJÁN



Aortabillentyű nyílása-záródása

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



Villogó fény hatása a látókéregre

# MRI INFORMÁCIÓ SZUPERPONÁLÁSA EGYÉB INFORMÁCIÓVAL (PET)



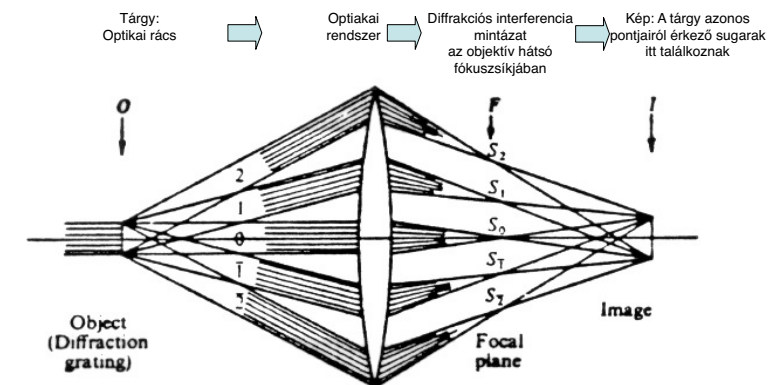
# SZUPERPONÁLT MRI ÉS PET KÉPSOROZAT



PET aktivitás: szemmozgatás során  
Térbeli rekonstrukció

# MIKROSKÓPIÁK

## Képképzés a fénymikroszkópban



Diffrakció (fényelhajlás) miatt: pontszerű fényforrás képe "elhajlási korong" (Airy disk)

Legkisebb feloldott távolság (Abbé):

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$$



## Mikroszkópos felbontás javításának lehetőségei

1. Az Abbé-féle képlet paramétereinek javítása

2. Feloldási probléma konvertálása pozicionálási problémává

3. Nem diffrakció-limitált képalkotás

## 1. Leképezési hullámhossz csökkentése: Elektronmikroszkópia

1. Elektron mint hullám,  
De Broglie (1924):

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

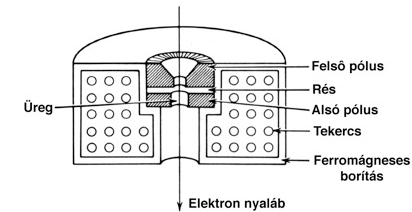
$\lambda$ =elektronhoz rendelhető hullámhossz  
 $h$ =Planck állandó  
 $m$ =elektron tömege  
 $v$ =elektron sebessége

2. Elektronnyaláb leképezése  
mágneses lencsével

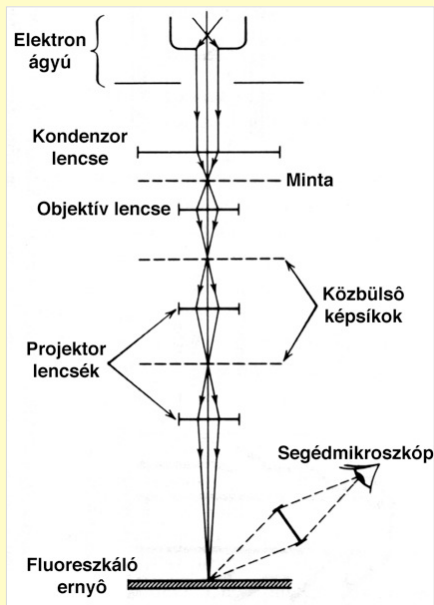
$$F = eBV_e \sin \alpha$$

$F$ =elektronra ható erő  
 $e$ =elektron töltése  
 $B$ =mágneses térerő  
 $V_e$ =elektron sebessége  
 $\alpha$ =elektron és a mágneses tér által meghatározott szög

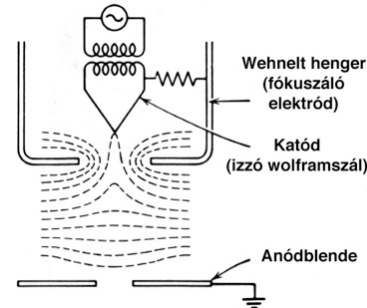
Mágneses elektronlencse:  
benn az elektronnyaláb spirális



## Az elektronmikroszkóp felépítése



Sugárforrás: elektronágyú



Nagyvákuum:  $10^{-2}$  Pa

## Feloldóképesség és kontrasztképződés az elektronmikroszkópban

A. Elméleti feloldóképesség:

módosított Abbé-képlet (kis  $\alpha$  szögekre)

Elektronok sebessége (100000 km/s) alapján  $d=0.005$  nm

$$d = \frac{\lambda}{\alpha}$$

B. Valódi feloldóképesség: kis NA által limitált,  $\sim 0.1$  nm.

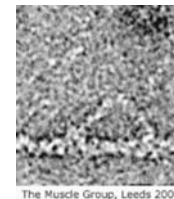
A kis NA miatt azonban "hatalmas" mélységélesség (több  $\mu$ m).

C. Biológiai gyakorlati feloldóképesség:

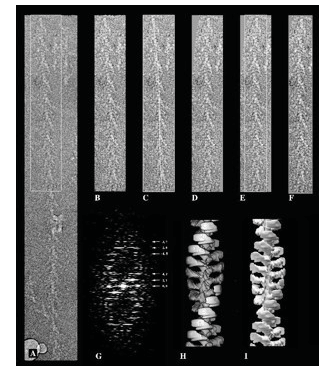
metszetvastagság 1/10-ed része.

D. Kontrasztképződés: elektronszóródás alapján

Kontrasztfokozás: elektrondenz festékek használata

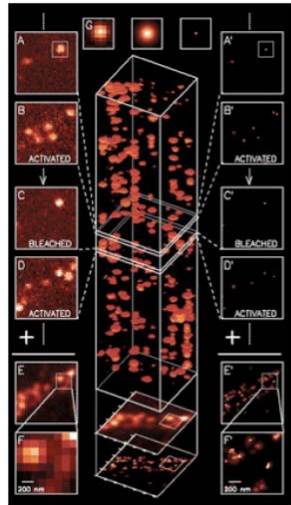


Krio-elektronmikroszkópia,  
partikulum-analízis  
képrekonstrukció

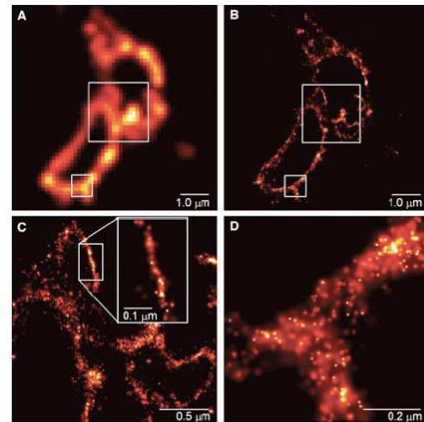


### 3. Feloldási probléma konvertálása pozicionálási problémává

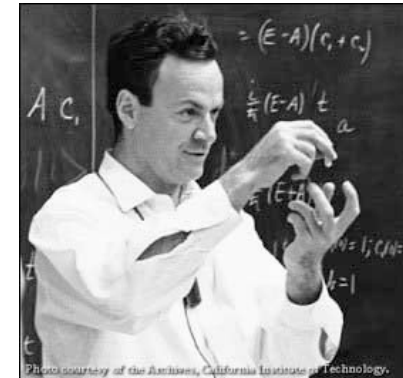
#### Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)



CD63, lizoszóma transzmembrán protein

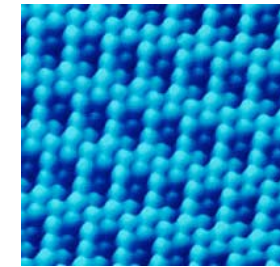


### 3. Nem diffrakciólimitált mikroszkópia Atomerőmikroszkópia, AFM



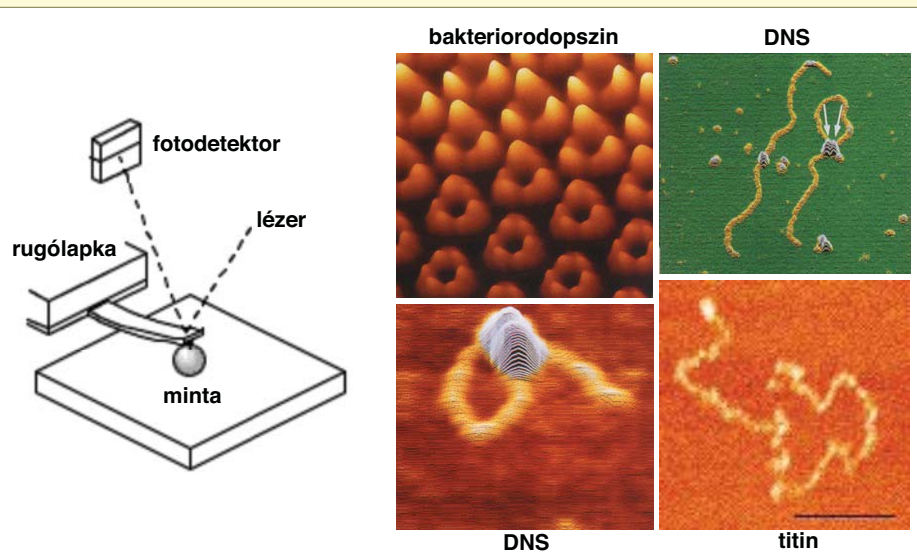
Richard P. Feynman:  
"There is plenty of room at the bottom"  
1959. december 29.

Oxigén atomok rhodium  
egy kristály felületén

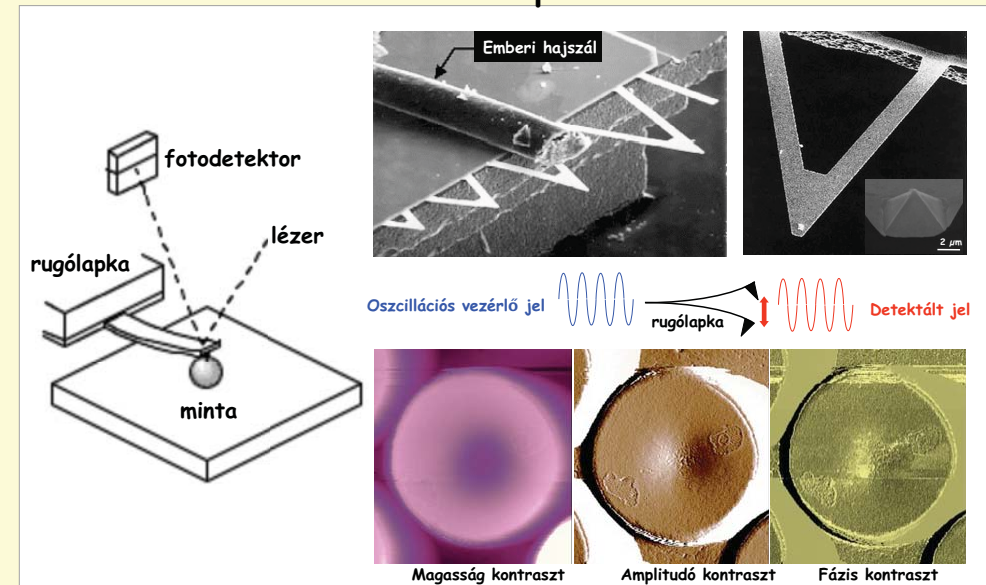


a "nanovilág" léptéke:  
1 nanométer

### Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscope = AFM)

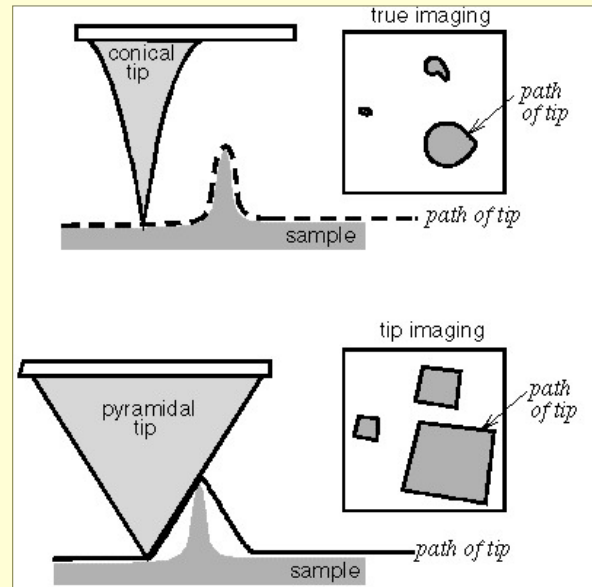


### AFM alapok Pásztázó képalkotás

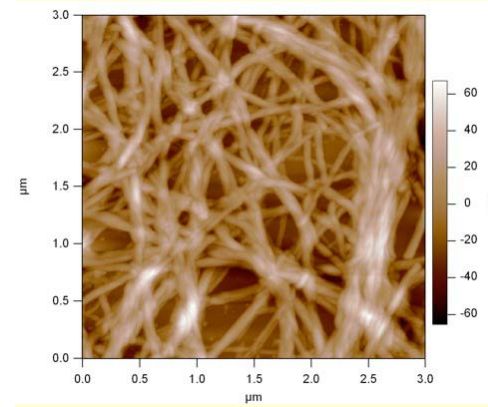




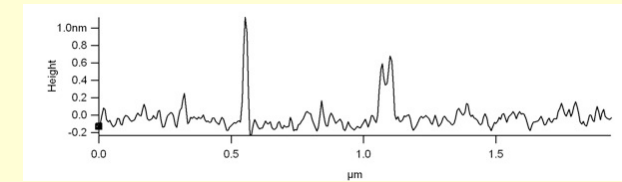
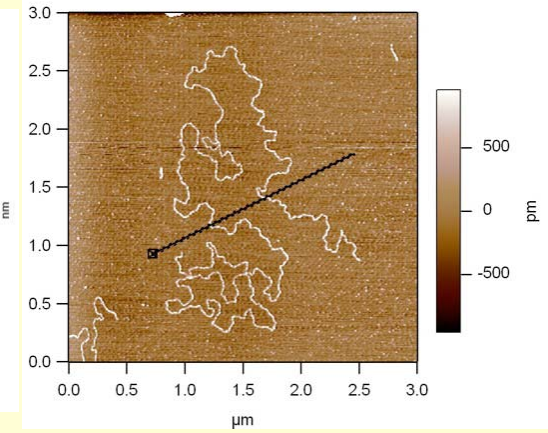
## Képkötési hibák, felbontás



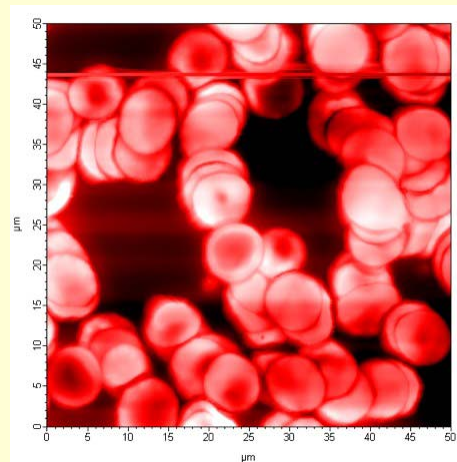
## Béta-amyloid fibrillumok



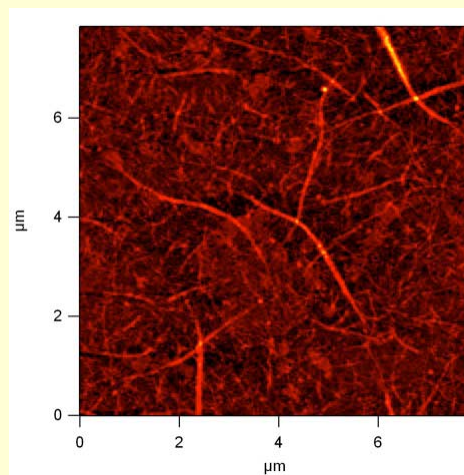
## DNS



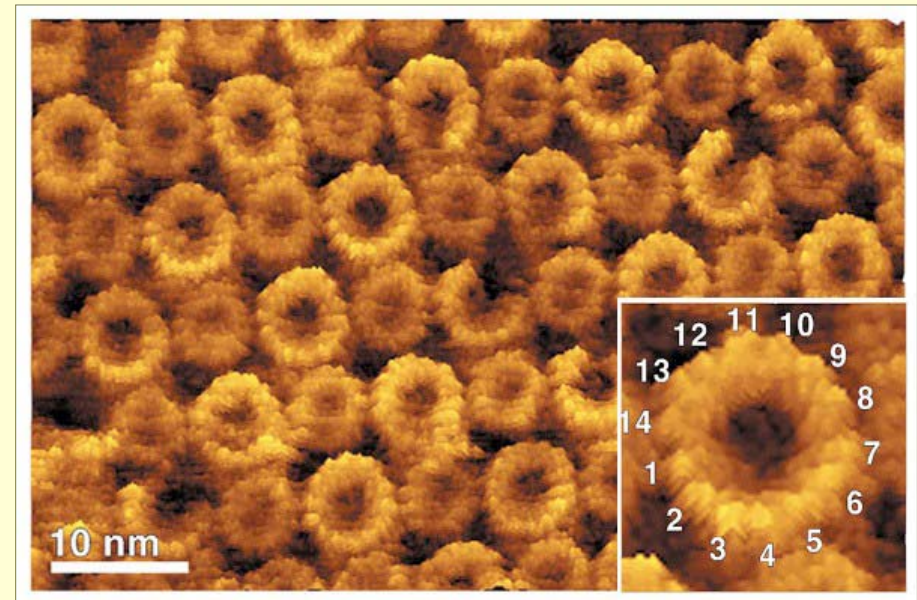
## Vvt kenet



## Fibrin hálózat



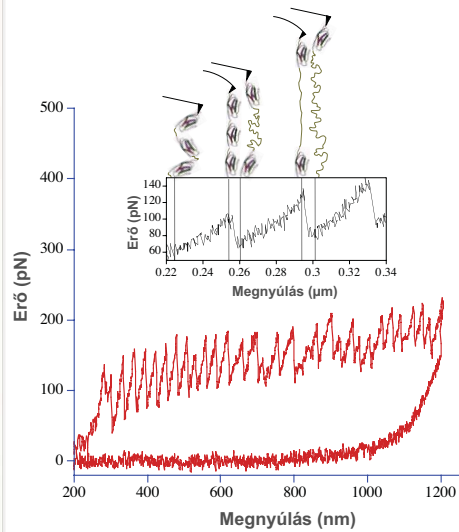
## Képek: ATP-szintáz



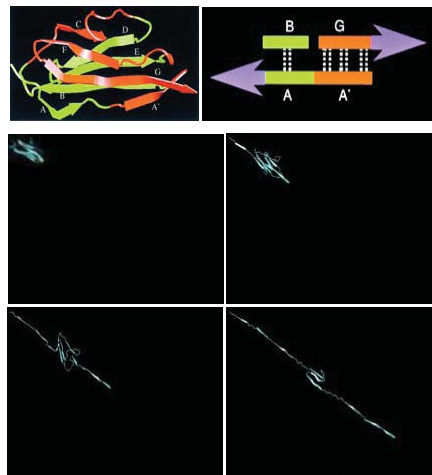


# Molekulamanipulálás AFM-mel

## Egyedi molekula erőspektroszkópia



## Erő-fűrészfogak: mechanikailag stabil domének nem-kooperatív kitekeredése



# Nanoindentáció, nanolitográfia

Lithos: kő, gráfia: rajzolni

