

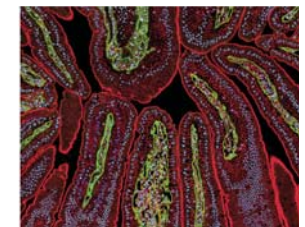
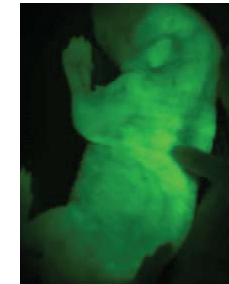
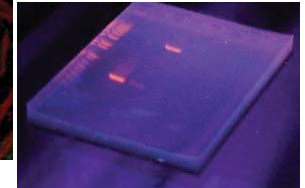
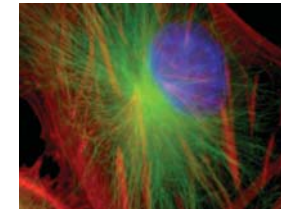
A FLUORESCZENCIA ORVOSBIOLÓGIAI ALKALMAZÁSAI

KELLERMAYER MIKLÓS

A fluoreszcencia orvosi- biológiai alkalmazásai

Néhány példa:

- Fluoreszcencia mikroszkópia
- DNS szekvenálás (lánc terminációs módszer)
- DNS festés (EtBr)
- DNS microarray technológia
- Immunfluoreszcencia
- Fluoreszcencia-aktivált sejt válogatás (FACS)
- Förster rezonancia energia transzfer (FRET)
- "Fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP)
- Fluoreszcens fehérje-konjugációs technikák
- Jelölés kvantum pontokkal (quantum dots)
- stb...



Fluoreszcencia alkalmazások

- Fluoreszcencia forrása
Intrinsic, extrinsic (jelölések, konjugációk)
- Gerjesztett állapot lecsengési mechanizmusai
- Spektroszkópiás alkalmazások
FRET
- Speciális alkalmazások
FACS, FRAP
- Mikroszkópiák
TIRF, konfokális, kétfoton fluoreszcencia, szuperrezolúció

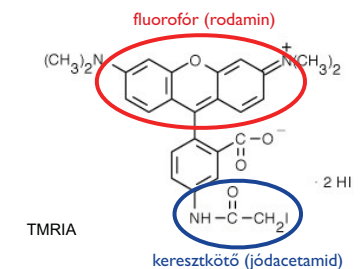
Fluoreszcencia forrása I.

Intrinsic (belső) fluorofórok:

Pl. triptofán, tirozin fehérjékben (konjugált kettőskötés-rendszert tartalmazó aminosavak)

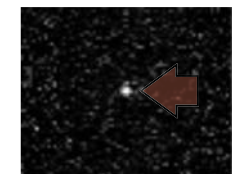
Extrinsic (külső) fluorofórok:

Kívülről bevitt festékmolekulák
Módszer - "fluoreszcens jelölés"
Problémák: kémiai specifitás és célozhatóság, térbeli specifitás és mobilitás



Fluoreszcens jelölés szempontjai:

1. spektrális tulajdonságok (pl. gerjesztési spektrum helye, szélessége, távolsága az emissziós maximumtól, emissziós spektrum helye a látható tartományban)
2. kvantumhatásfok
3. stabilitás (fotokiféledési hajlam)
4. pislogás (blinking)

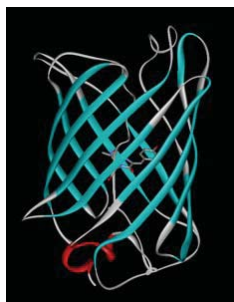


Egyedi kvantum pont -
pislogás ("blinking")

Fluoreszcencia forrása II.

Fluoreszcens fehérjékkel való konjugálás

I. Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein, GFP)



Méret: ~27 kDa, 238 aa

Szerkezet: 11-szálú β -hordó

Kromofór: a központi hélix Ser65-Tyr66-Gly67 oldalláncaiból

Fluoreszcencia 3D szerkezet intaktaságától függ

Tandem fúziós konstrukció a GFP és a vizsgált fehérje génjeiből

Előnyök: *in vivo* mérések, mutánsokból spektrális variánsok állíthatók elő, melyek több különböző konstrukció együttes vizsgálatát is lehetővé teszik.

Hátrányok: pislogás, csak terminális (N vagy C) jelölés, a GFP a célfehérje működését szterikusan befolyásolhatja.



GFP-egér

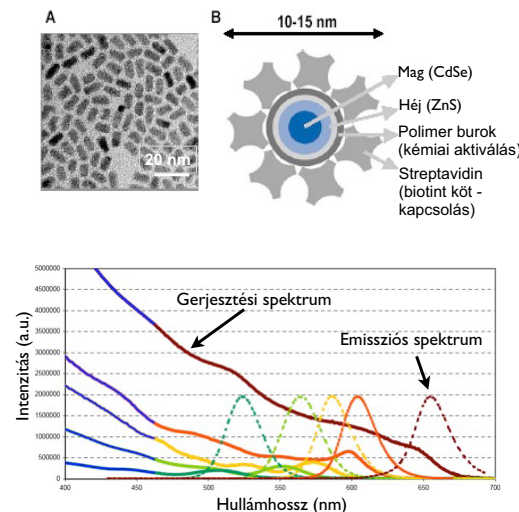
2. A GFP egyéb színű (kék, sárga, vörös) mutánsai

3. Fotoaktiválható GFP analóg

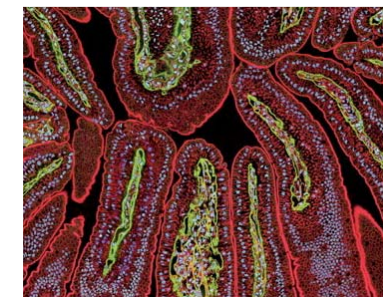
4. Kaede: korallból származó fluoreszcens fehérje, mely UV-indukálható zöld-vörös fotokonverziót mutat

Fluoreszcencia forrása III.

Kvantumpontokkal való jelölés (félvezető nanokristályok)

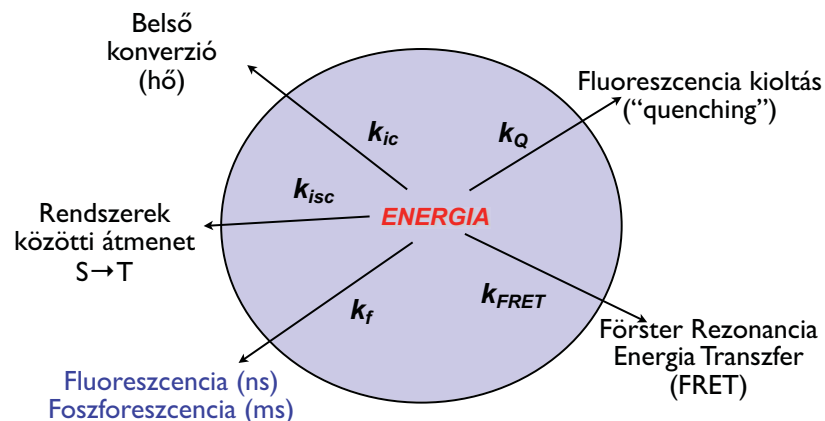


- Széles gerjesztési spektrum
- Hangolható emissziós spektrum (részecske méretétől függ)
- Fotokiféledéssel szemben rendkívül ellenállóak
- Pislogásra (blinking) hajlamosak



Kvantumponttal konjugált ellenanyagokkal jelölt egér bélhám (vörös: aktin, zöld: laminin, kék: sejtmag)

Gerjesztés során elnyelt energia sorsa



Sugárzásos és nem sugárzásos átmenetek!

Förster Rezonancia Energia Transzfer (FRET)

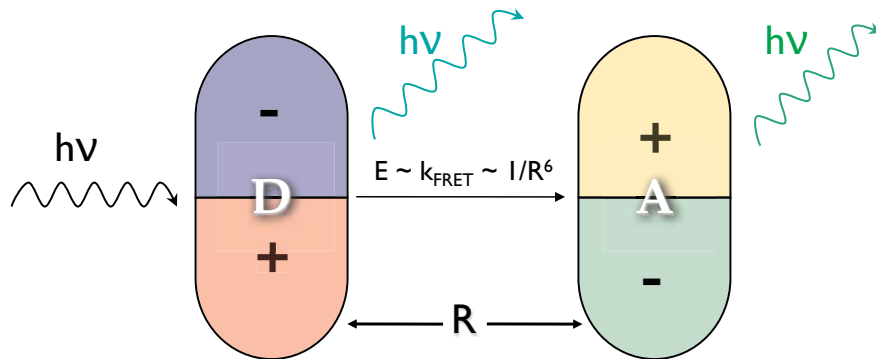
Általánosan:

- 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 energiatranszfer szereplői fluorofórok.

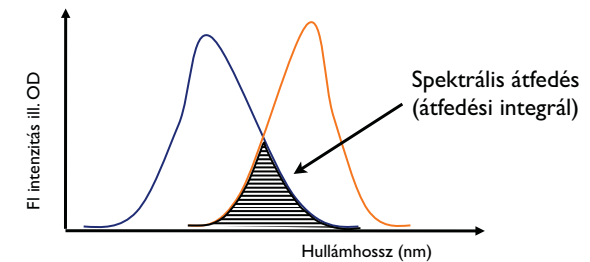
A FRET mechanizmusa

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

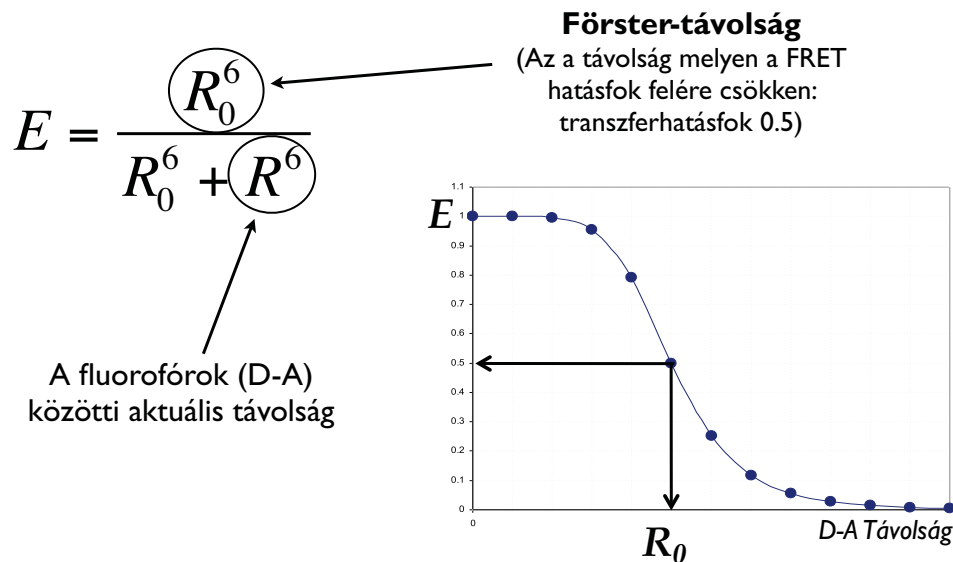


A FRET feltételei

- **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** abszorpció spektruma között.



A FRET távolságfüggése



A FRET alkalmazása

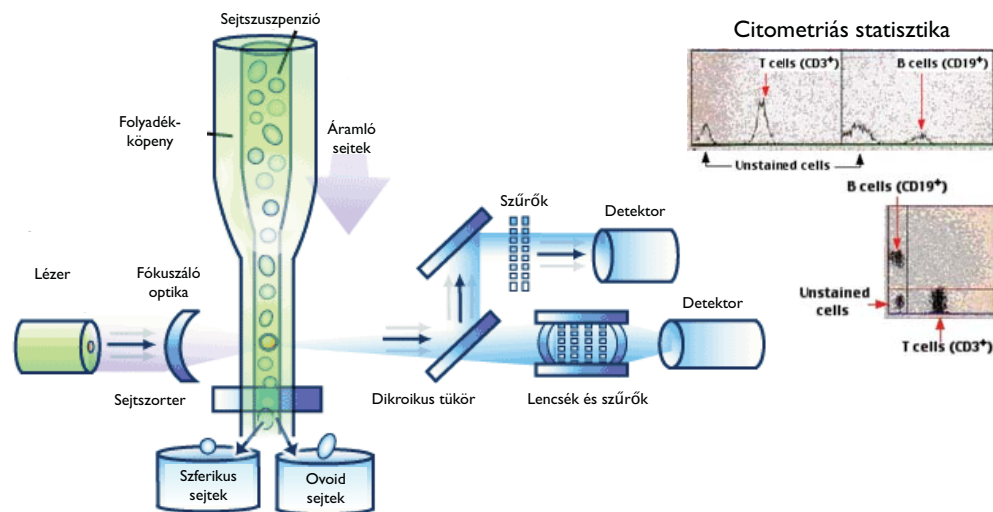
- **Molekuláris mérőszalag:** távolságmérés a nm-es (10^{-9} m) tartományban.
- Nagyon érzékeny (lásd hatvány összefüggés)!
- **Alkalmazás:**
 - Molekulák közötti **kölcsönhatások** tanulmányozása.
 - Molekulákon belüli **szerkezeti** változások tanulmányozása.



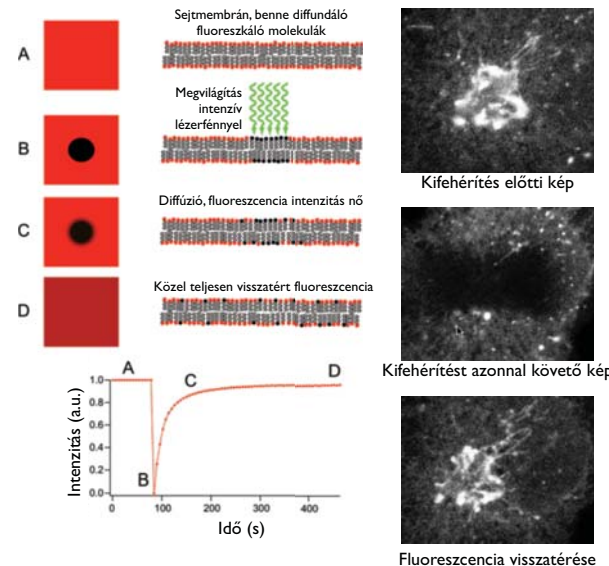
Fluorescence activated cell sorter (FACS)

Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás; Áramlási citometria (flow cytometry)

- Fluoreszcensen fajlagosan megjelölt sejtuszuspenziót sejtenként analizálunk
- Sok paramétert mérünk (fluoreszcencia intenzitás különböző hullámhosszokon, kis- és nagyszögű szórás)
- Statisztikai analízist végzünk
- Szükség esetén a sejteket szétválogathatjuk a paraméterek alapján



Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

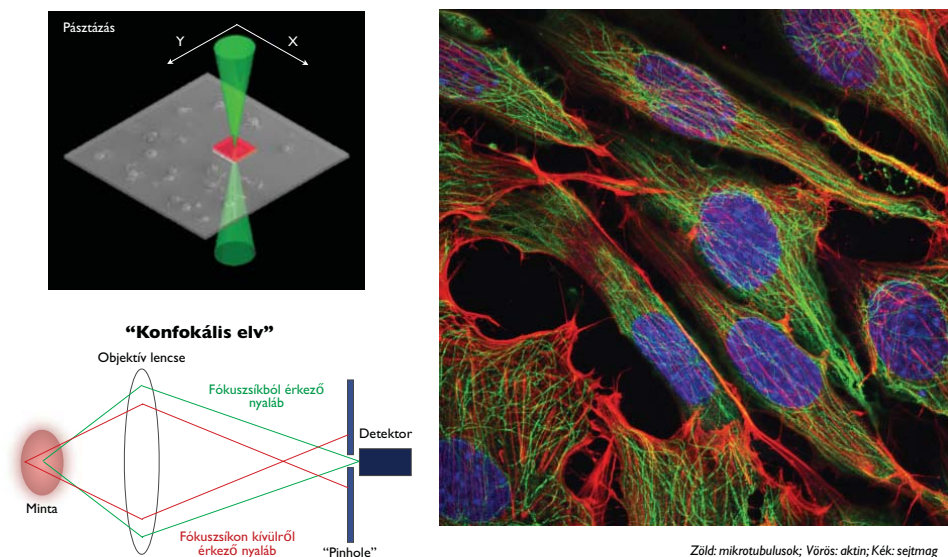


Diffúziós állandó meghatározható a fluoreszcencia intenzitás visszatéréseinek időbeli lefutásából:

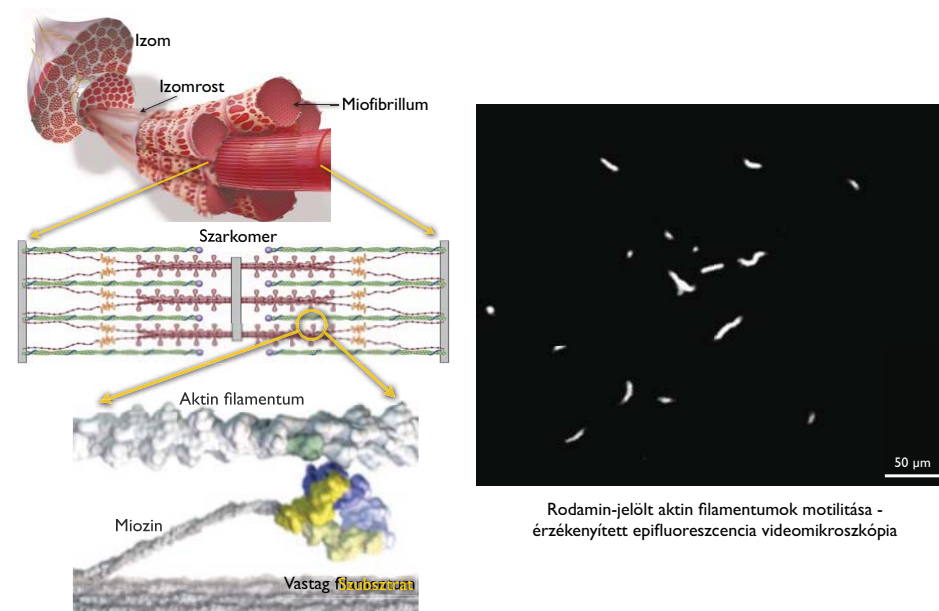
$$D = \frac{w^2}{4t_D}$$

D = diffúziós állandó
w = kifehérített terület átmérője
t_D = időállandó

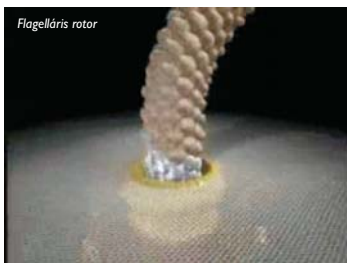
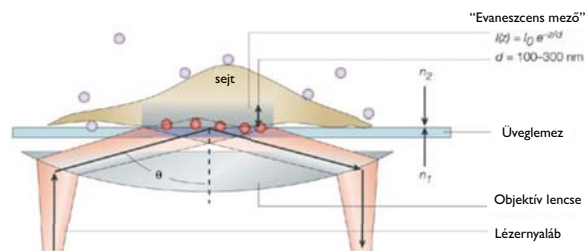
Lézer pásztázó konfokális mikroszkópia



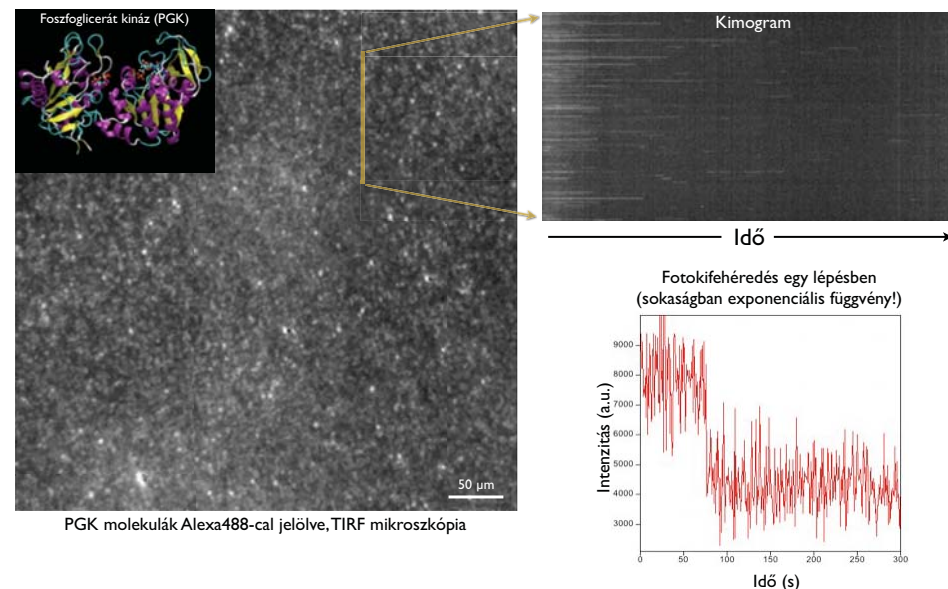
Érzékenyített video mikroszkópia



Teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópia (TIRFM)

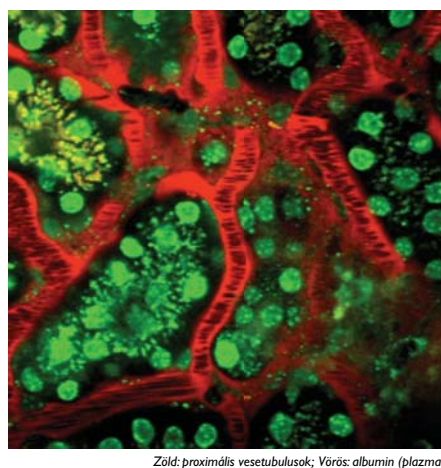
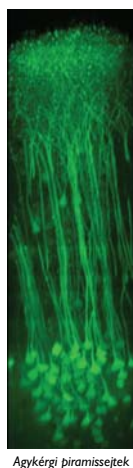
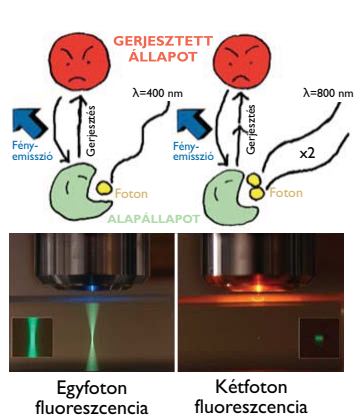


Egyedi enzim molekulák TIRFM képe



Multifoton 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)



Agykérgi piramis sejtek

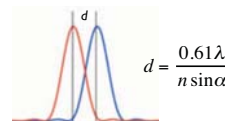
Zöld: proximális vesetubulusok; Vörös: albumin (plazma)

Szuperfelbontású mikroszkópia

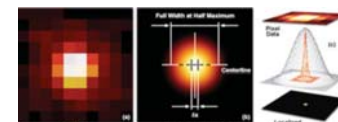
Kémiai Nobel-díj, 2014

A feloldási problémát pozíciómeghatározási problémává alakítjuk

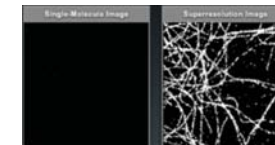
Feloldási probléma (Abbé-elv)



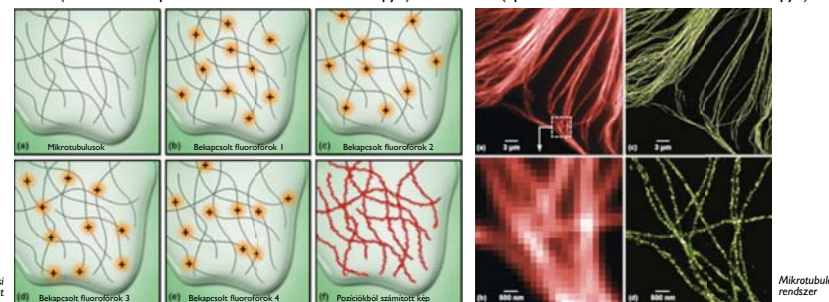
Pozíciómeghatározási probléma (pontoság a fotonszámtól függ)



"Stochastic" adatgyűjtés egyedi fluorofórokról



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



Adatgyűjtési folyamat

Mikrotubuláris rendszer