



Dr. Vámosi György

# Mozgékony molekulák vizsgálata modern mikroszkópiával

Debreceni Egyetem

ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Debrecen, 2015. nov. 25.

[www.meetthescientist.hu](http://www.meetthescientist.hu)

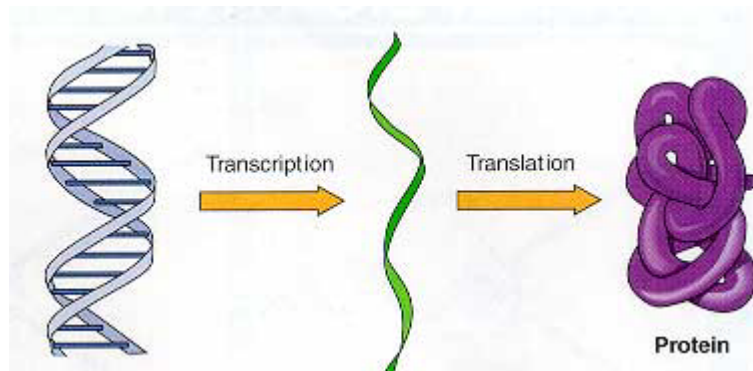
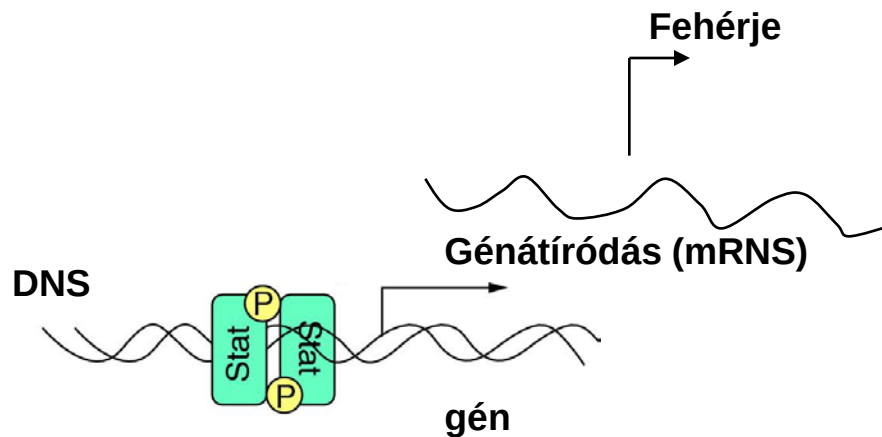




Prof. Nagy László

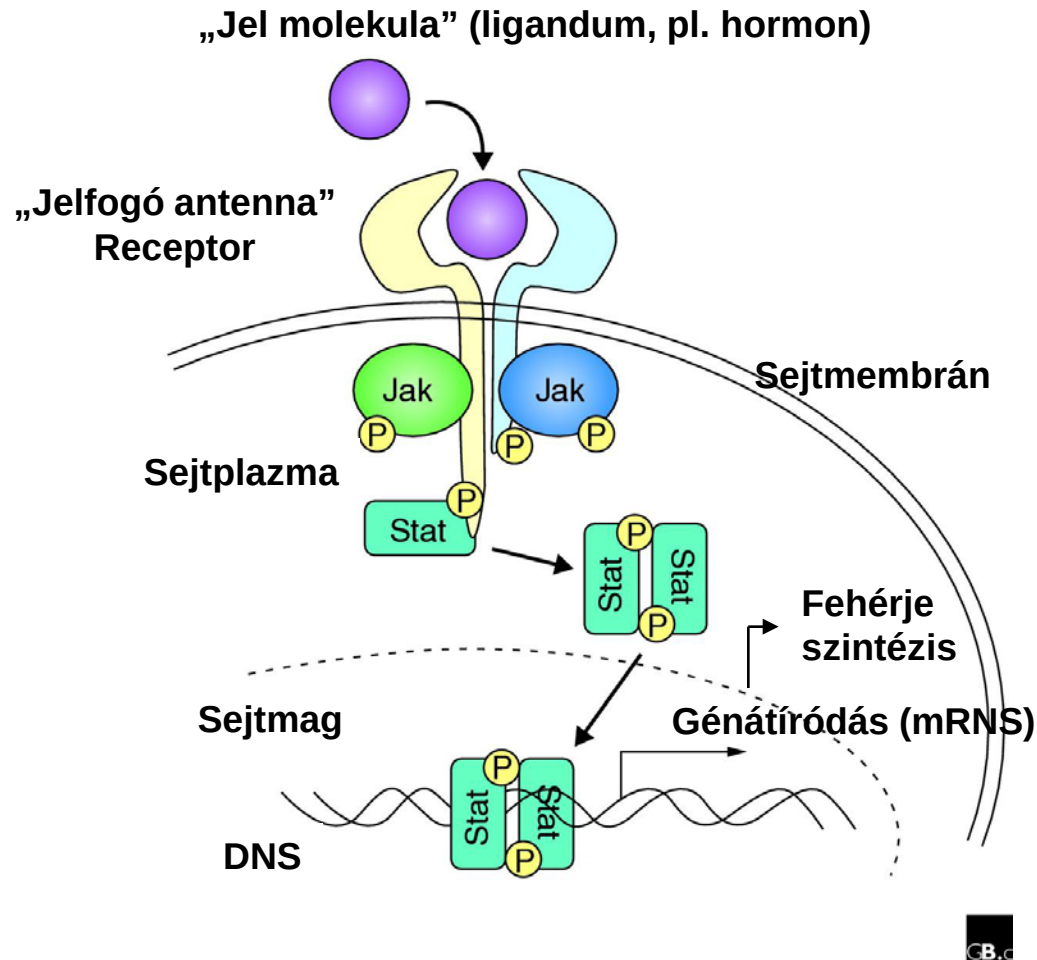
Sanford Burnham Prebys Orvosi Kutatóintézet, Lake Nona (Orlando) Florida

# DNS kódtól a fehérjéig



- A sejtek genetikai anyaga, a sejtmagban **elhelyezkedő DNS hordozza a sejt felépítését és működését irányító információkat**
- A DNS egységei a gének, melyek fehérjét kódolnak (meghatározzák aminosav sorrendjüket, ezáltal felépítésüket)
- Egy gén DNS-éről másolat készül (mRNS), majd fehérje
- **A fehérjék a sejt működésében különféle feladatokat látnak el, pl.**
  - biokémiai folyamatokat katalizálnak (enzimek),
  - a sejt vázát építik fel,
  - **külső ingerekre reagálnak (receptorok),**
  - **a gének működését szabályozzák** (transzkripciós faktorok), stb.
- **A különböző sejttypusokban (ideg, izom, hám, stb.) részben más-más fehérjék vannak jelen**
- **A fehérjék termelődése szigorúan szabályozott,** a sejt típusának és pillanatnyi igényeinek, állapotának megfelelően

# Jelátvitel a sejtekben



- A sejt mint automata: külső jelekre, ingerekre (input) megváltozott működéssel (output) válaszol
- Jel: ligandum, pl. egy hormon
- Jelfogó: sejtfelszíni receptor fehérje
- Jel továbbítás:
  - kölcsönható fehérjék láncolatán keresztül
  - gén átíródás, mRNS másolat keletkezése **adott génekről** → **fehérjék előállítása** az mRNS templát alapján
- **Sejtválasz:** megváltozott sejt működés, pl. sejtosztódás beindulása, sejthalál, sejt aktiváció, stb.

# Fő kutatási területeink

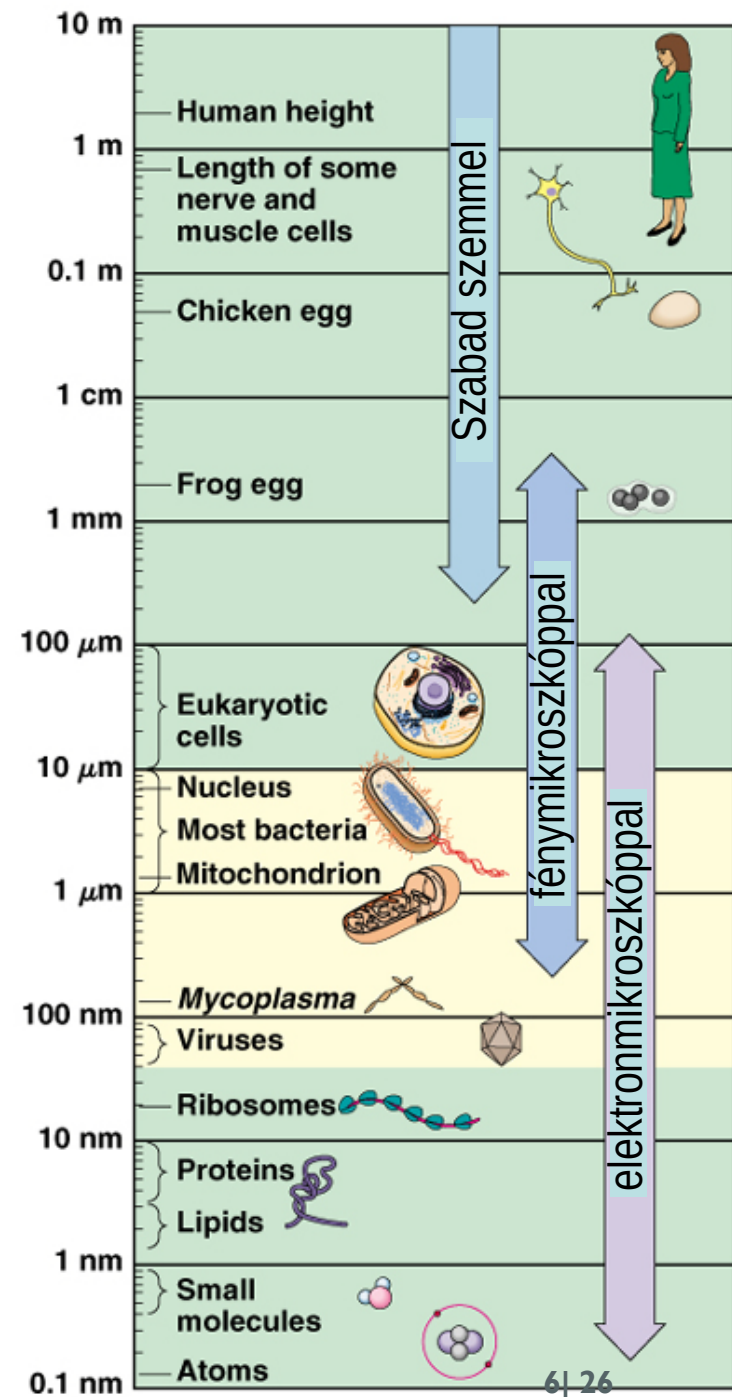
- A jelátviteli folyamatokban **résztevő** különféle fehérjék nem magányosan, hanem egymással összekapcsolódva, ún. komplexeket alkotva **működnek**
- Biofizikai, **mikroszkópos módszerekkel vizsgáljuk** a jelátvitelben szerepet játszó **fehérje-komplexek összeszerelődését, működését** a sejtmembránban és a sejtmagban
- Vizsgált fehérjék:
  - Az immunrendszer T sejtjeinek **működését** szabályozó membrán receptorok (interleukin-2/15 receptor)
  - A gének **működését** szabályozó fehérjék (transzkripciós faktorok: pl. cFos-cJun, magreceptorok)

# Mikroszkópia

mikrosz = kicsi, szkopeo = nézni

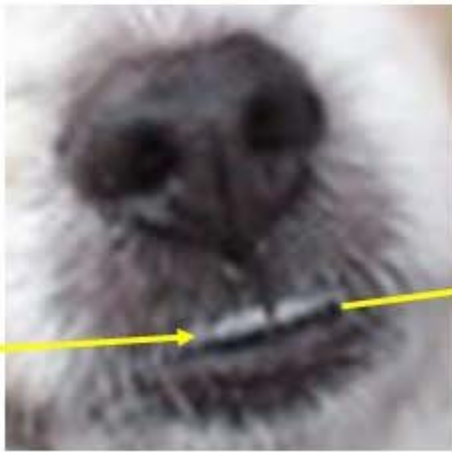
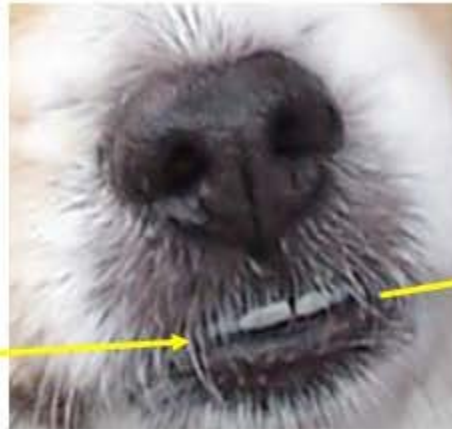
Mikroszkópia célja: láthatóvá tegye a vizsgált minta szabad szemmel nem kivehető részleteit.

- nagyított
- kontrasztos
- jó felbontású (részletgazdag) képet állítson elő
- legkisebb feloldható távolság fénymikroszkópnál kb. 200 nm (0,2  $\mu\text{m}$ )
- A hagyományos fénymikroszkópia láthatóvá tudja tenni a baktériumokat, az eukarióta sejtek sejszervecskéit (organellumokat), de a biológiai makromolekulák szerkezetét nem

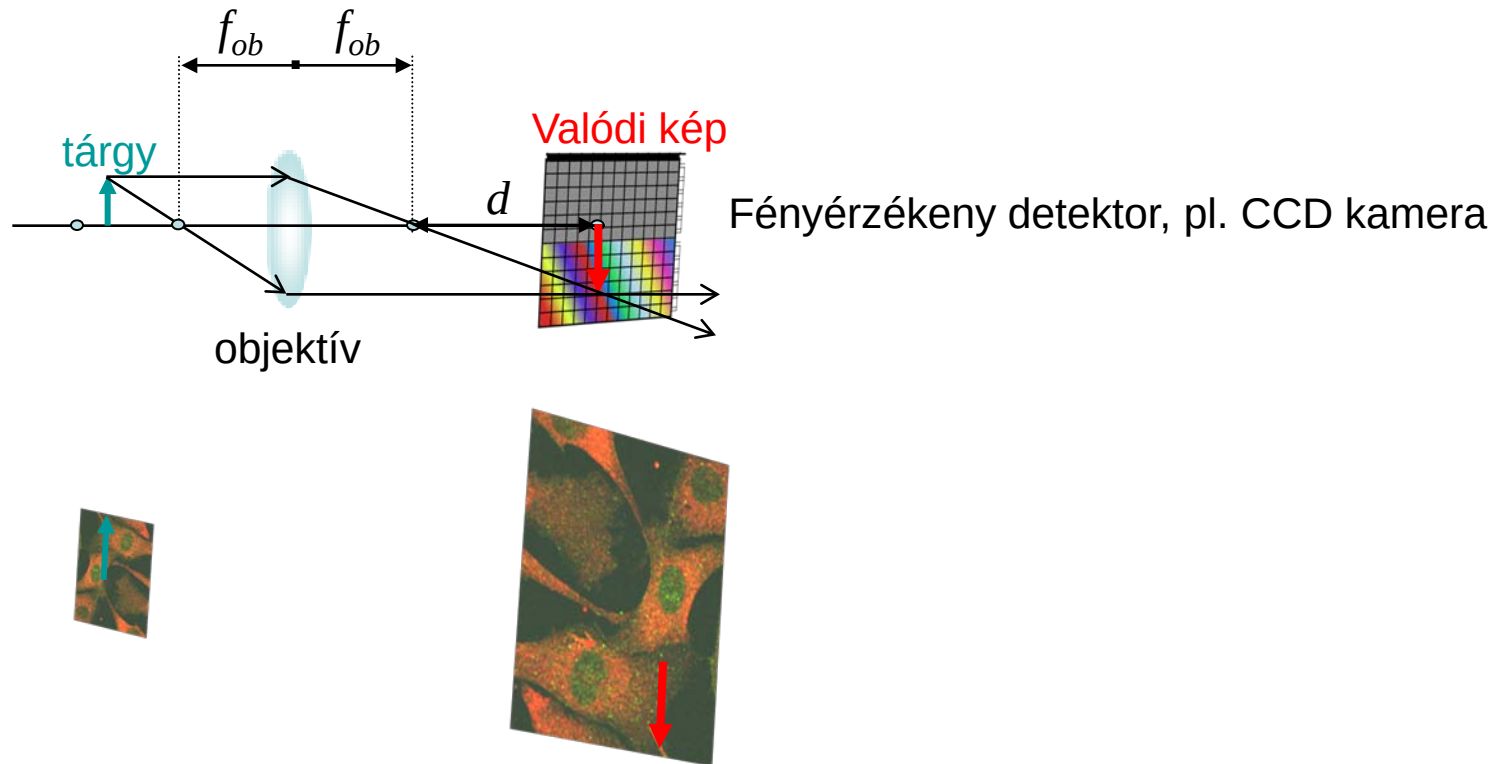


# A mikroszkóp nagyítása és felbontása: mi a különbség?

- Nagyítás: hányszor nagyobb a kép, mint a tárgy eredeti mérete?
- Felbontás: mekkora annak a két tárgypontnak a távolsága, melyeket még éppen meg tudunk különböztetni egymástól?

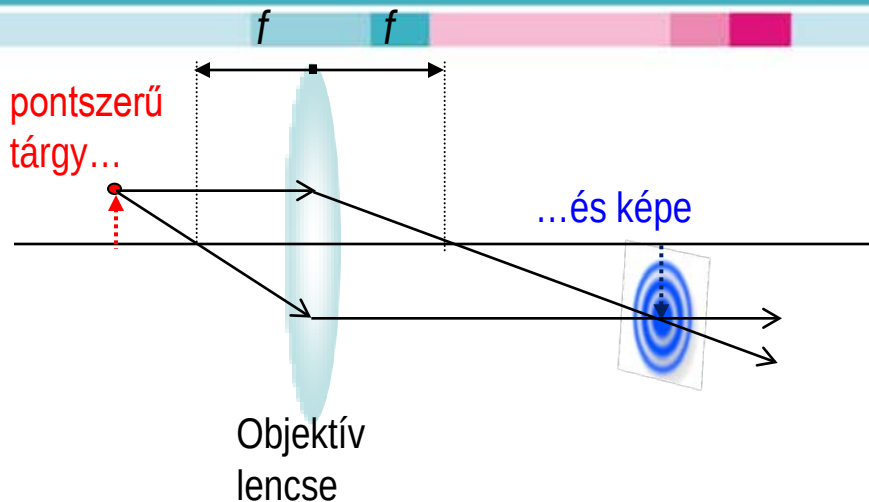


# Mikroszkóp képalkotása



- Képalkotás: a minta egy pontjából kiinduló fénysugarakat az objektív lencse egy pontban foltban gyűjti össze, létrehozva a tárgy képét a fényérzékeny detektoron

# A mikroszkóp felbontásának korlátja



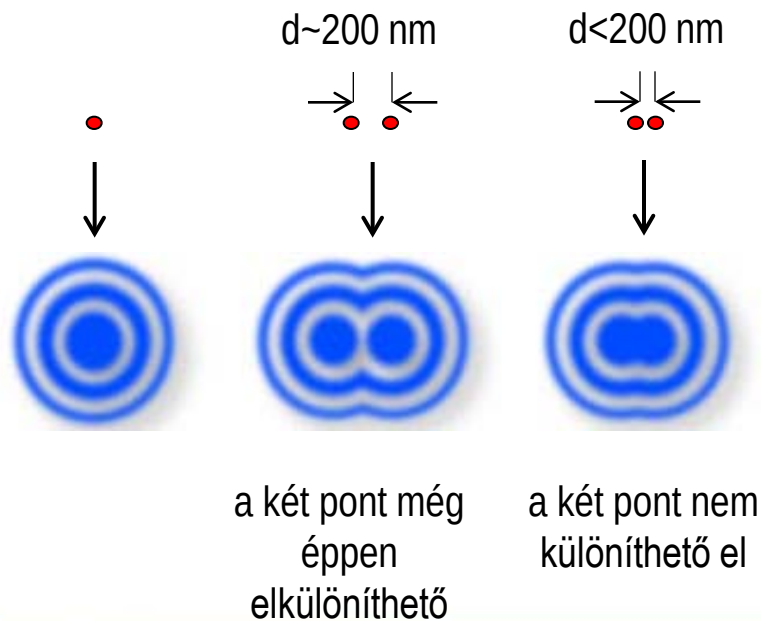
A fény hullámtermészete miatt a fénynyaláb nem fókuszálható egyetlen pontba  
→ a pontoszerű tárgy képe nem pontoszerű, hanem kiterjedt mintázat – ez határt szab a felbontásnak

- Két tárgypont képe akkor különül le, ha a mintázatok középső maximumai nem fednek át
- Legkisebb feloldható távolság:

$$d_{\min} \approx \frac{\lambda}{2} \approx 200 \text{ nm} = 0.2 \mu\text{m}$$

ez a milliméter 5000-ed része

$\lambda$ : a fény hullámhossza (~400 nm),



# Fluoreszcencia

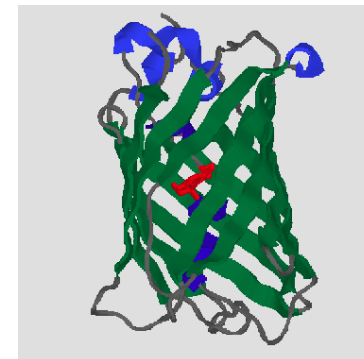
A vizsgálandó molekulákat festékekkel megjelöljük, így azok fluoreszcens mikroszkóppal megjeleníthetők

Fluoreszcencia: foton (fény) kibocsátása foton elnyelését követően

fluoreszcein molekula

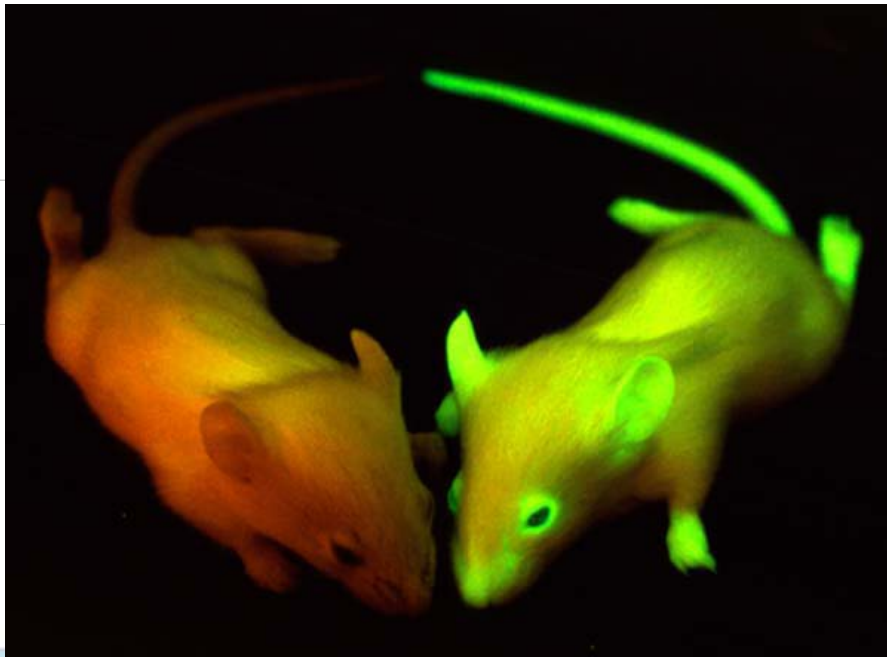


zöld fluoreszcens fehérje (GFP)

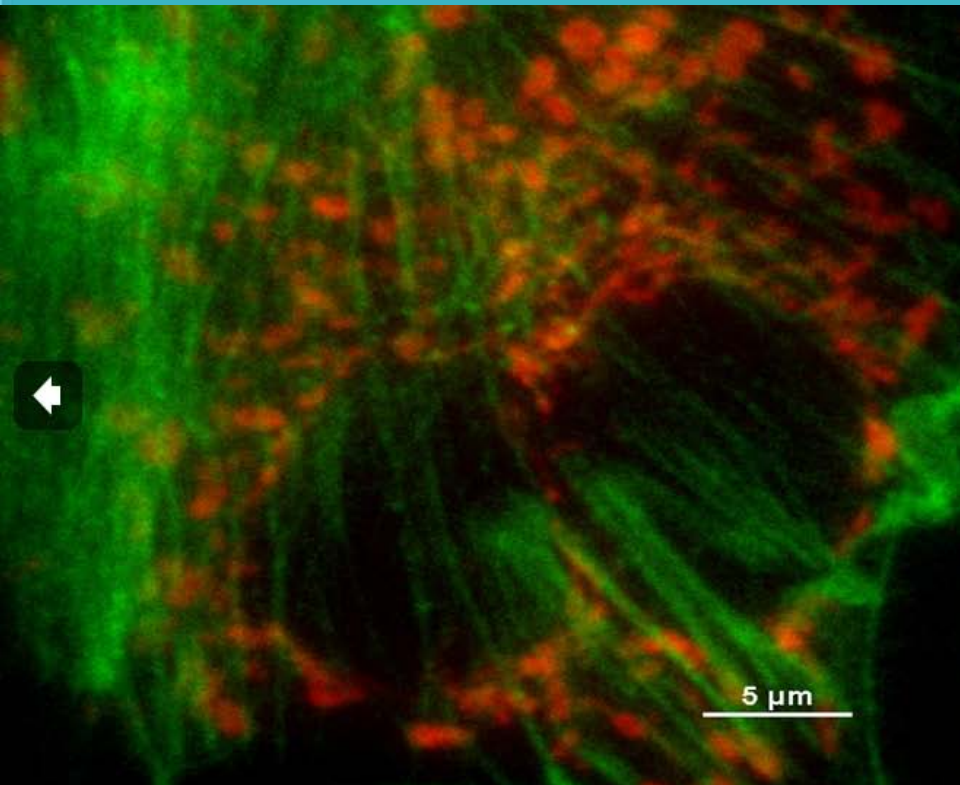


Aequorea victoria

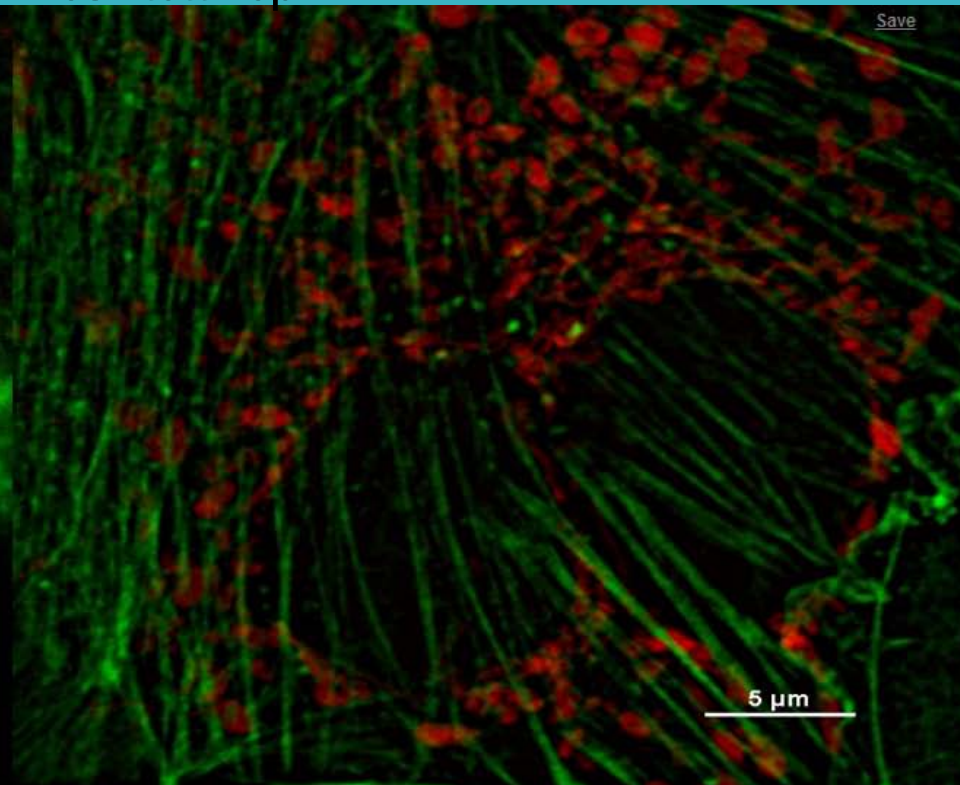
(2008 kémiai Nobel-díj)



## Fluoreszcencia mikroszkóppal készített kép

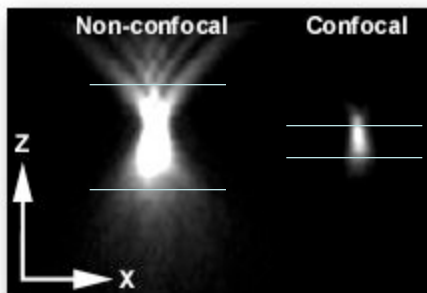


## Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készített kép



Hagyományos fluoreszcens mikroszkóp:

- A minta különböző z mélységeiből érkező fotonok egymásra vetülnek
  - Mélységélesség: 2-3  $\mu\text{m}$   
→ elmosódott kép
- Oldalirányú felbontás: 0,2  $\mu\text{m}$

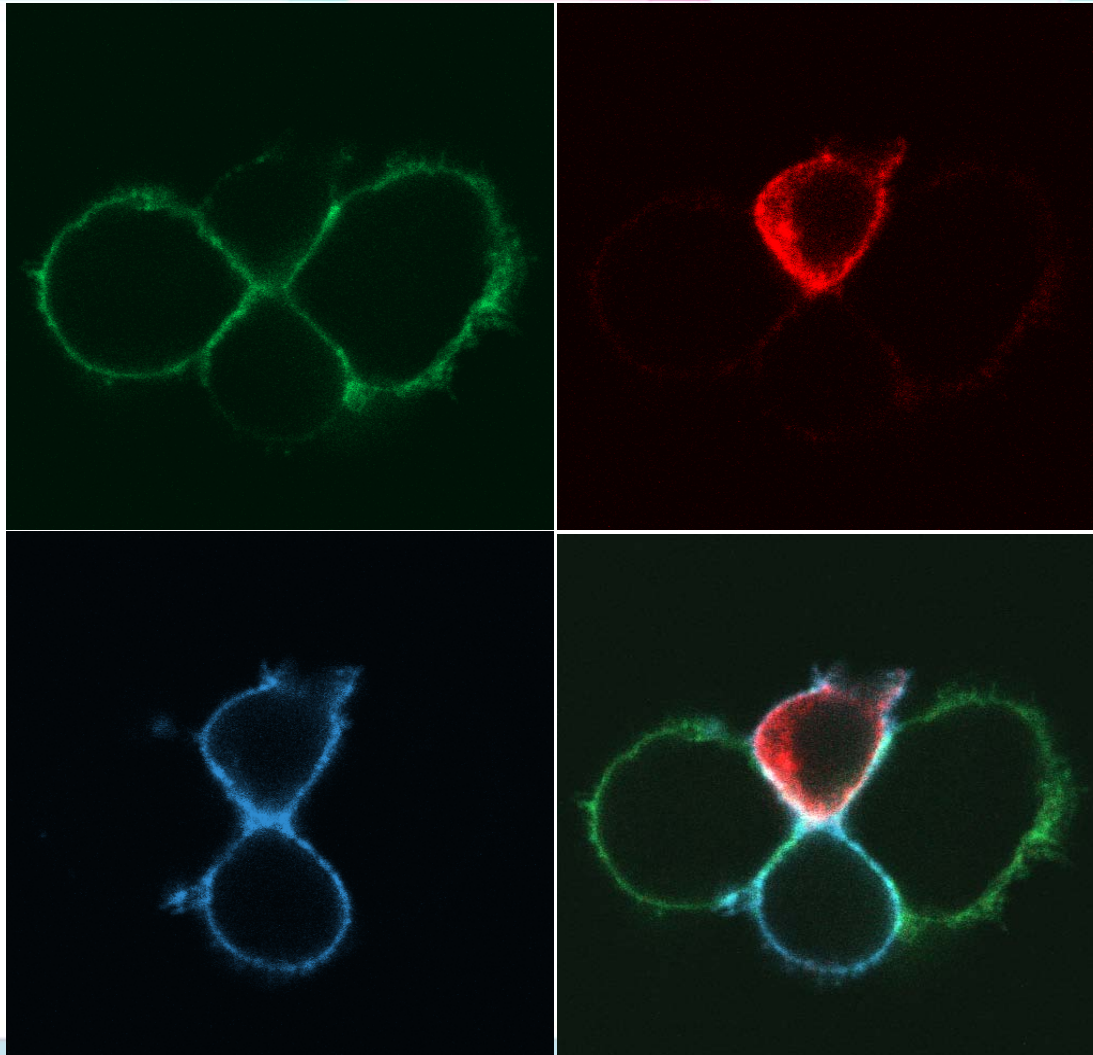


Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp:

- A minta pontonkénti pásztázása
- Egy „tűlyuk” apertúra csak a fókusz síkból származó fényt engedi a detektorra → vékony szelet leképezése
- Mélységélesség: 0.5  $\mu\text{m}$   
→ élesebb kép

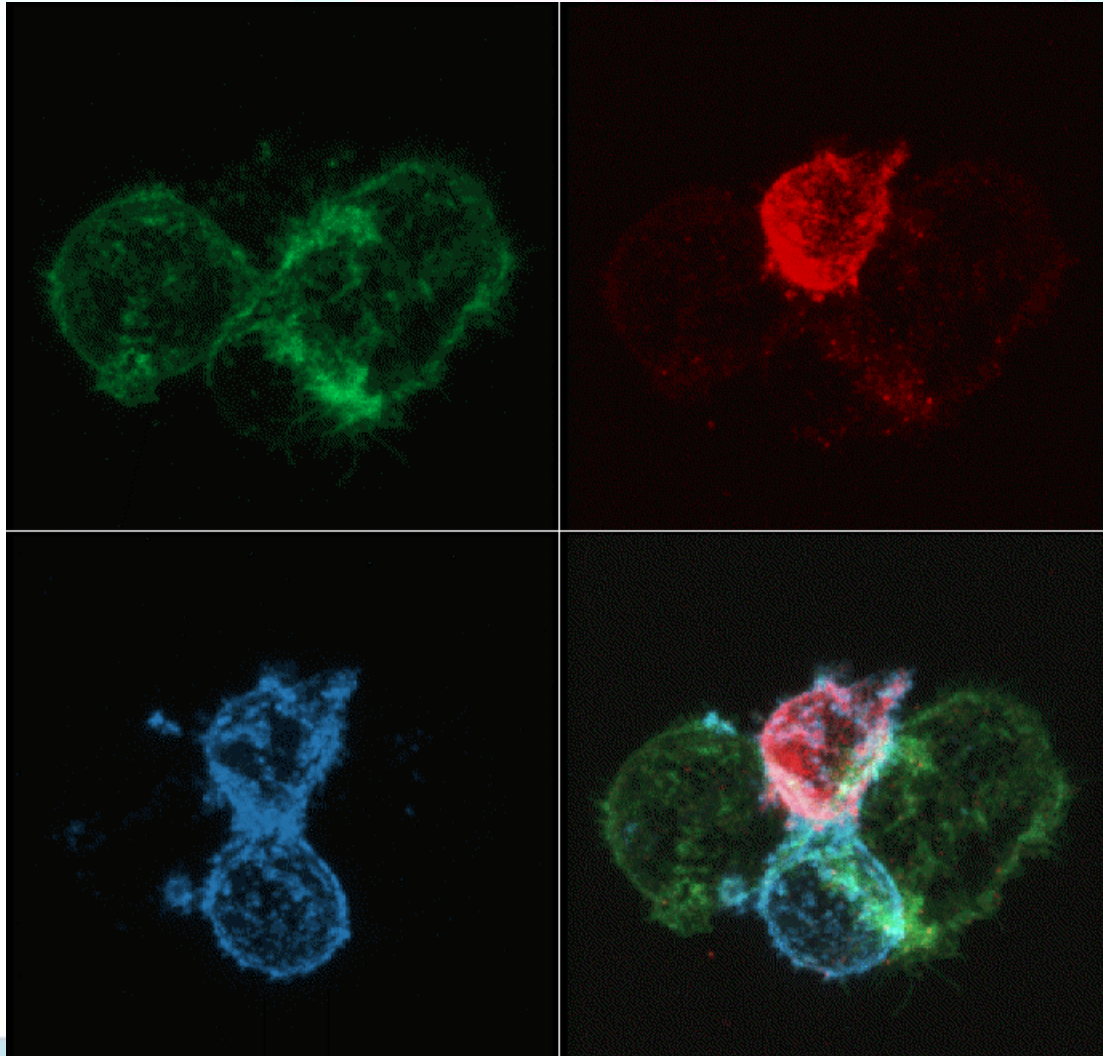
Oldalirányú felbontás: 0,2  $\mu\text{m}$

# 3D rekonstrukció az optikai szeletekből



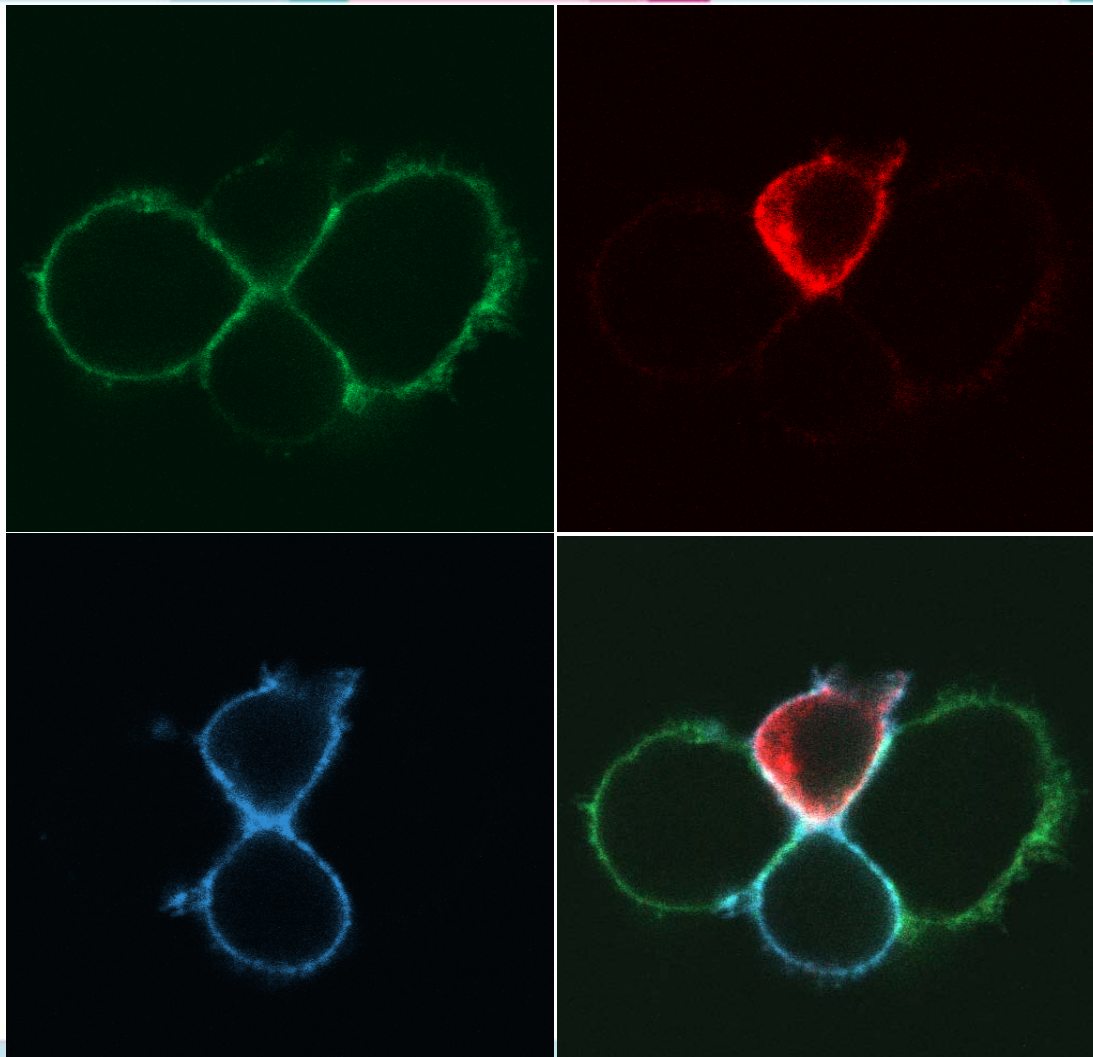
Kék: ölü sejt  
Zöld: célsejt

# 3D rekonstrukció az optikai szeletekből

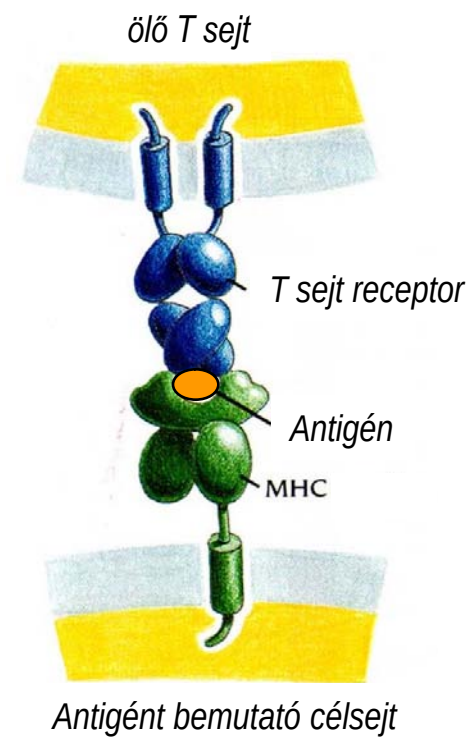


Kék: öló sejt  
Zöld: célsejt

# 3D rekonstrukció az optikai szeletekből



Kék: ölü sejt  
Zöld: célsejt



[http://biweb2.bi.technion.ac.il/faculty\\_websites/reiter/TCR-peptide-MHC%20interaction.htm](http://biweb2.bi.technion.ac.il/faculty_websites/reiter/TCR-peptide-MHC%20interaction.htm)



**A konfokális mikroszkóp felbontása (200 nm) nem elegendő a molekulakomplexek szerkezetének vizsgálatára**

Hogyan javítható a felbontás?

# A szuperfelbontású mikroszkópiák kifejlesztői: 2014 kémiai Nobel-díjasai



**Eric Betzig**  
Howard Hughes  
Medical Institute



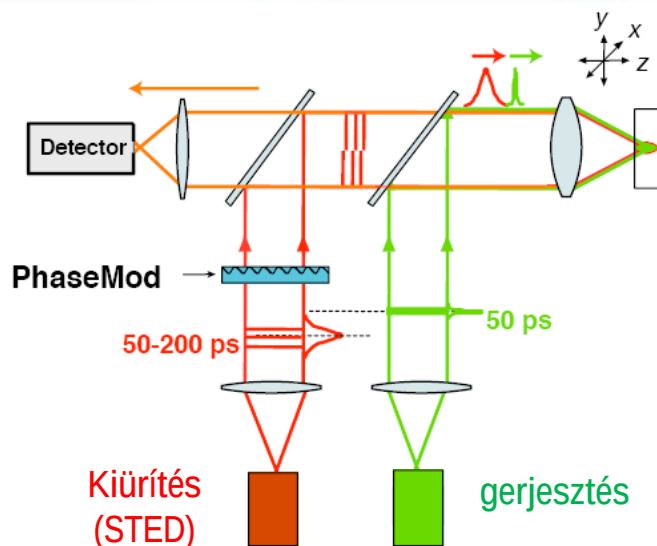
**Stefan W. Hell**  
Max-Planck-Institut



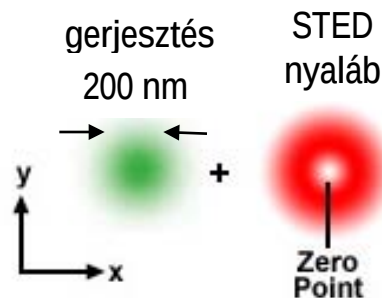
**William E. Moerner**  
Stanford University

A 2014-es kémiai Nobel-díjat Eric Betzig, Stefan W. Hell és William E. Moerner kapta „a szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia” kifejlesztéséért.

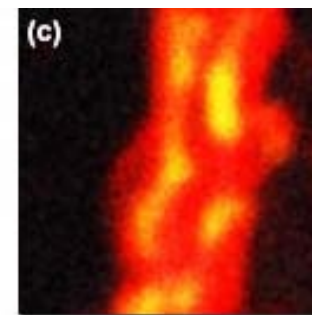
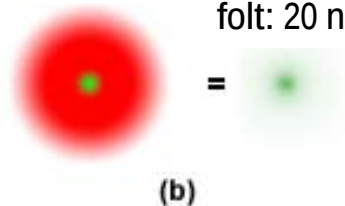
# A szuperfelbontású STED mikroszkópia elve: „stimulált fényemisszió alapuló kiürítés”



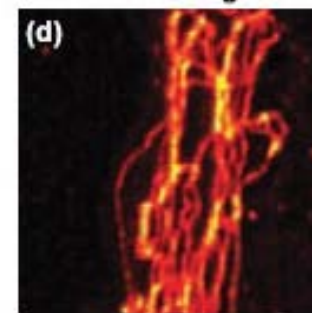
A gerjesztett folt  
méretének csökkentése



kiürítés  
Megmaradó  
folt: 20 nm



STED Image

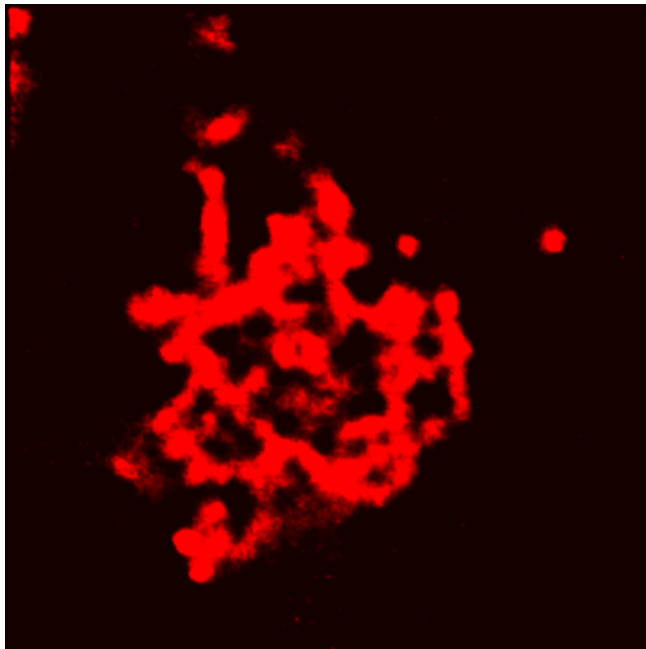


SW Hell, 1994, Optics Letters alapján

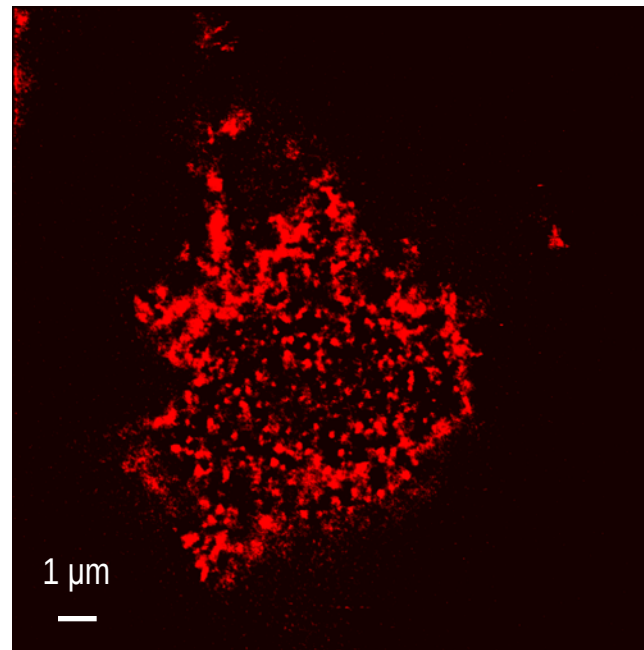
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu> alapján

# Interleukin-15 receptor $\alpha$ eloszlása T sejt felszínén

Konfokális kép



STED kép



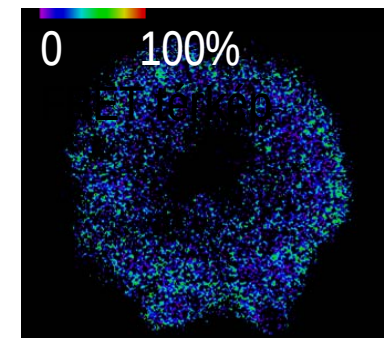
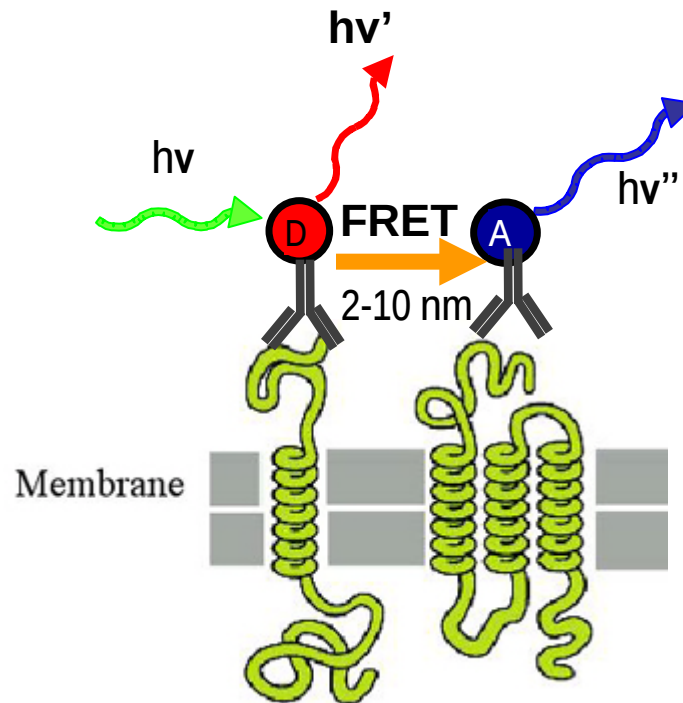
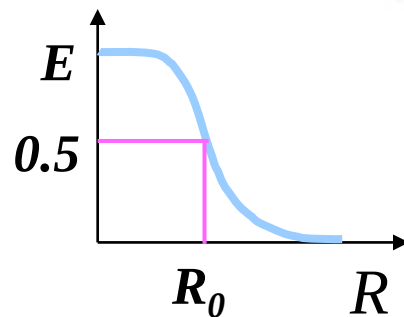
Mocsár Gábor



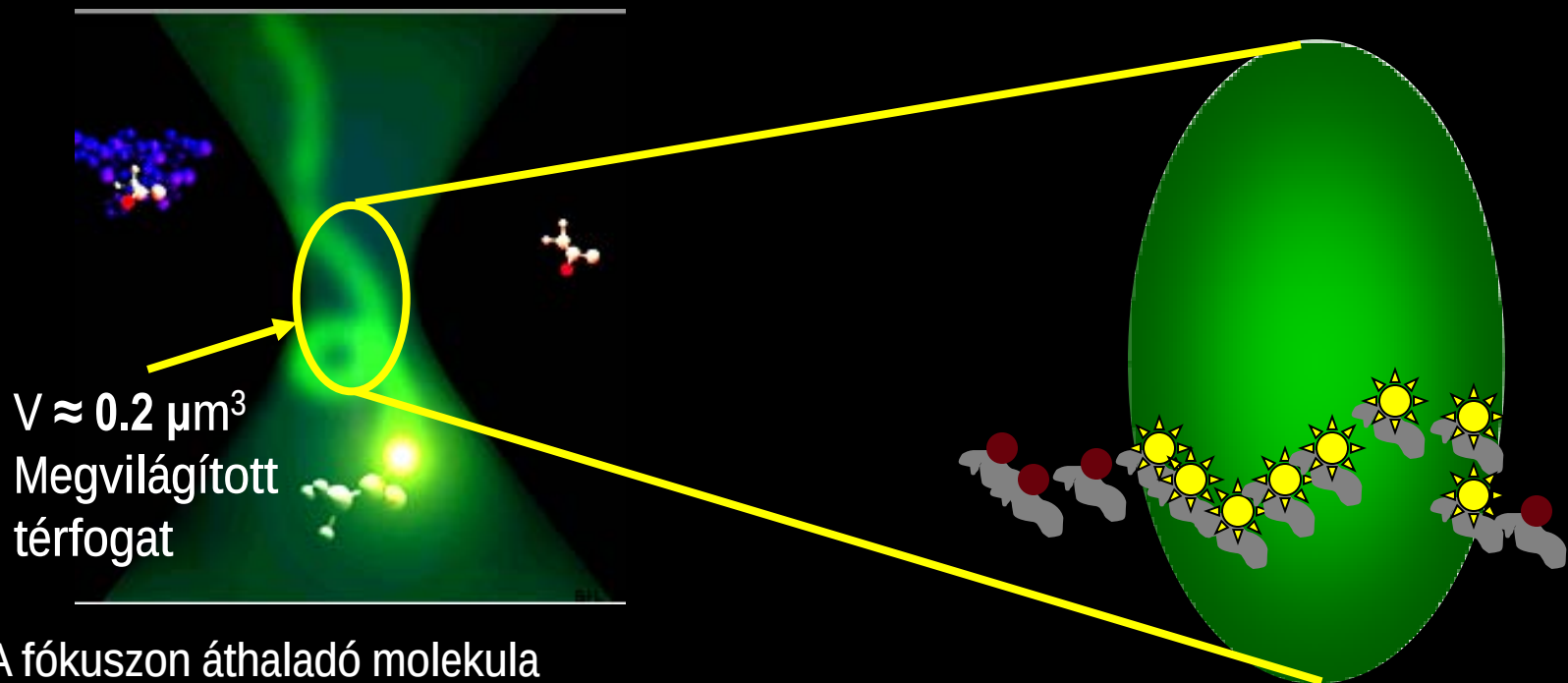
Volkó Julianna

# Távolságok mérése molekuláris vonalzóval: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

- Energiaátadás két festék között, ha a  $R < 10$  nm
- molekuláris kölcsönhatások térképezése, távolságbecslés



# Molekulák mozgékonyaságának mérése: Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

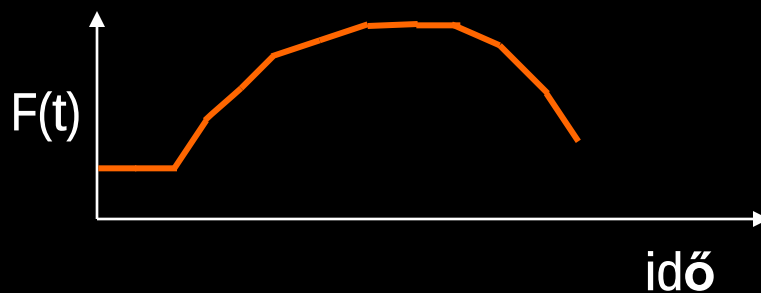


$V \approx 0.2 \mu\text{m}^3$   
Megvilágított  
térfogat

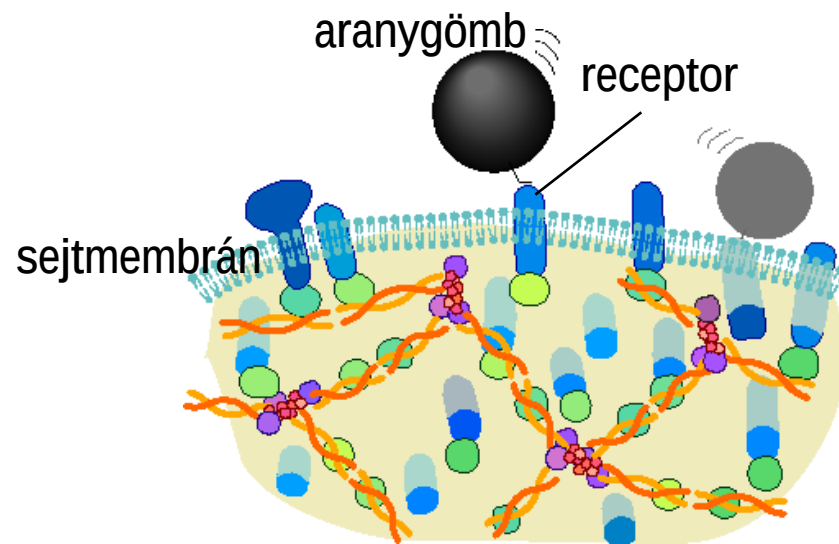
A fókuszon áthaladó molekula  
fluoreszcencia ingadozást okoz

Megméri, átlagosan mennyi idő alatt  
halad át a molekula a fókuszon

Gyors → szabad molekula  
Lassú → kötött állapotú molekula



# Egyedi molekula nyomkövetés



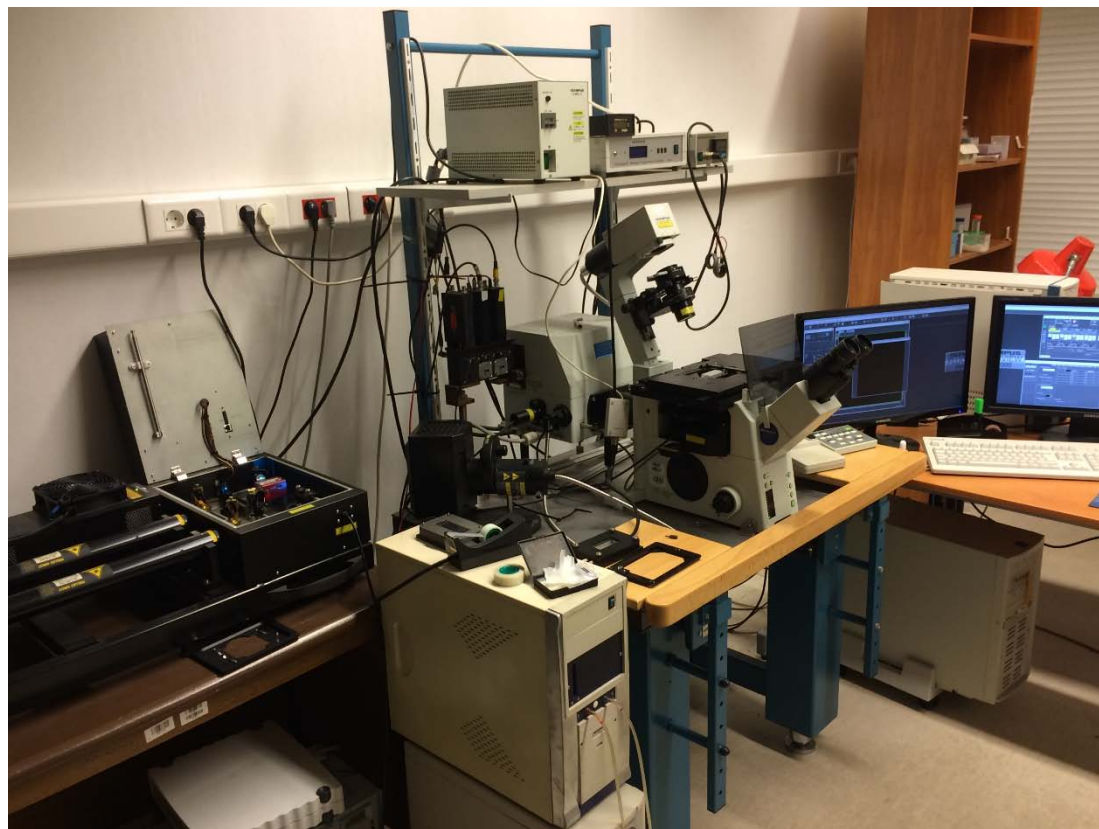
Transferrin receptor on NRK cell

Real time  
Scale = 1  $\mu\text{m}$

# Mikroszkóp régen és ma

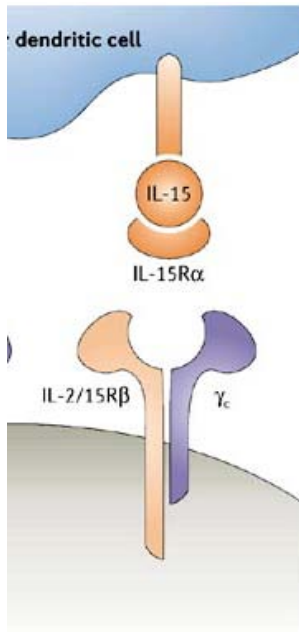


van Leeuwenhoek  
mikroszkópja 1670  
körül

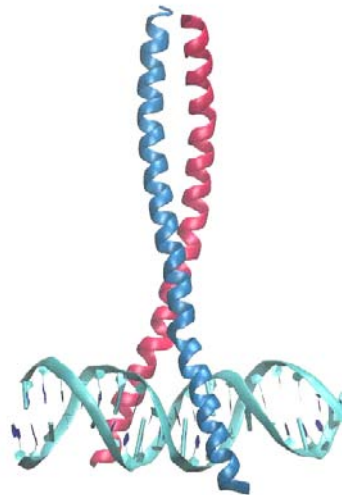


Olympus lézer pásztázó mikroszkóp,  
Debreceni Egyetem

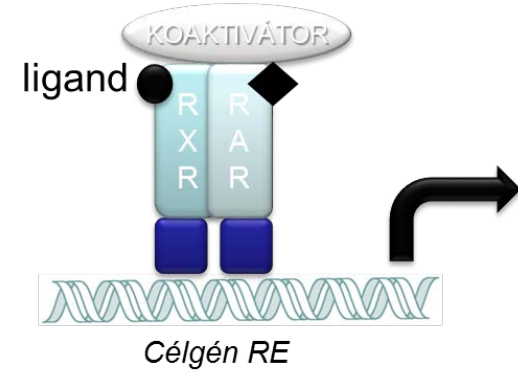
# Alkalmazások



- A T sejt aktivációért és az immunológiai memória kialakításáért felelős membrán receptorok összeszerelődése



- cFos onkogén fehérje homodimerizációja (két azonos molekula összekapcsolódása), kötődése a DNS-hez
- Lehetséges szerep tumorok kialakulásában



- Génműködést szabályozó magreceptor fehérjék aktivációja

# Floridai őslakosok



# Kennedy Space Center



# Karácsonyi hangulat Orlandóban





**Köszönöm szépen a  
figyelmet!**

[www.meetthescientist.hu](http://www.meetthescientist.hu)

