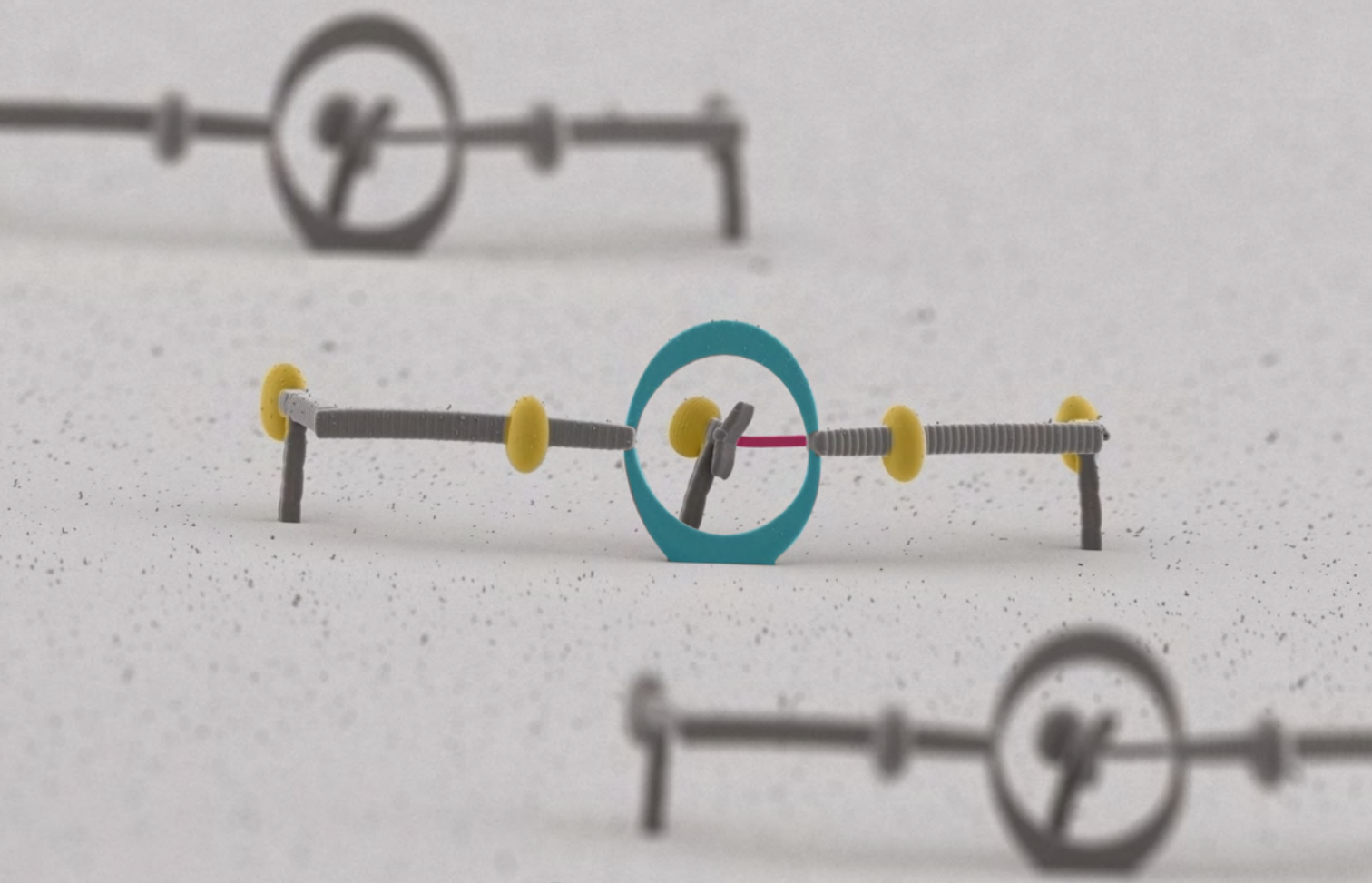
fizikai szemle

BIOFIZIKA

Sejtméretű szerszámok
Szuperfelbontású mikroszkópia
A fák hosszú élete



2026/5

Fizikai Szemle

MAGYAR FIZIKAI FOLYÓIRAT

A Mathematikai és Természettudományi Értesítőt az Akadémia 1882-ben indította
A Mathematikai és Physikai Lapokat Eötvös Loránd 1891-ben alapította

SZERKESZTŐSÉG

Felelős szerkesztő: Iglói Ferenc főszerkesztő
Olvasószerkesztő: Bodrog Zoltán
Technikai szerkesztő: Hock Gábor

SZERKESZTŐBIZOTTSÁG

Asbóth János, Biró László Péter, Csengeri Kamilla, Czitrovszky Aladár, Gyürky György, Horváth Dezső, Horváth Gábor, Járai-Szabó Ferenc, Kiss Ádám, Kopasz Katalin, Néda Zoltán, Ormos Pál, Pálfalvi László, Pásztor Gabriella, Sándor Bulcsú, Simon Ferenc, Simon Péter, Sódor Ádám, Sükösd Csaba, Szabó Gábor, Takács Gábor, Trócsányi Zoltán, Ujvári Sándor

A beküldött tudományos, ismeretterjesztő és fizikatanítási cikkek a Szerkesztőbizottság, illetve az általa felkért, a témában elismert szakértő jóváhagyó véleménye után jelenhetnek meg.

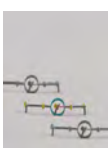
Kiadja és terjeszti az Eötvös Loránd Fizikai Társulat,
1092 Budapest, Ráday utca 18. földszint III.
Telefon/fax: (1) 201-8682
Felelős kiadó: Újfalussy Balázs főtitkár

A Társulat és a folyóirat honlapja:
http://fizikaiszemle.elft.hu,
e-postacíme: elft@elft.hu
A folyóirat szerkesztőségi e-mail címe:
fsz_szerkesztok@elft.hu. A lapba szánt írásokat erre a címre kérjük. Kéziratokat nem őrzünk meg és nem küldünk vissza. A szerzőknek tiszteletpéldányt küldünk.

Nyomdai előkészítés: Hock Gábor. *Nyomdai munkálatok:* OOK-PRESS Kft., *felelős vezető:* Szathmáry Attila ügyvezető igazgató.
Előfizethető a Társulatnál vagy postautalványon a 10200830-32310274-00000000 számú egyszámlán.
Az egyes számok ára: 2000,– Ft (a dupla számoké 4000,– Ft) + postaköltség.

HU ISSN 0015-3257 (nyomtatott)
HU ISSN 1588-0540 (online)

A lapot az MTA Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) archiválja



A címlapon:

Elektronmikroszkópos felvétel fénnyel készített mikrorobotokról (ld. Kelemen Lóránd cikke)

TARTALOM

BIOFIZIKA – TEMATIKUS BLOKK

***Vendégszerkesztő:* Zimányi László**

Zimányi László: Válogatás hazai biofizikai műhelyek eredményeiből – Bevezetés 145

Ábrahám Ágnes, Galajda Péter, Nagy Krisztina: Becsapdázva: egyedi sejtek vizsgálata mikrofluidikai módszerekkel 146
A cikk aktív és passzív elven működő mikrolfuidikai csapdarendszereket mutat be. Ezeknek az eszközöknek a segítségével lehetőség nyílik egyedi sejtek vizsgálatára precízen kialakított, jól szabályozható mikrokörnyezetekben.

Balogh Anna, Rajmon Imola, Kovács Kinga Dóra, Horváth Róbert: A nanofluidikai csatornával ellátott fluidikai erőmikroszkóp (FluidFM) biofizikai és biológiai alkalmazásai 152
A FluidFM nanotechnológiai módszer új lehetőségeket kínál az egyedi élő sejtek manipulációja és szubcelluláris vizsgálata terén. Robotizált kialakítása és nagy áteresztőképessége révén új távlatokat nyit a sejtbiológiai és biofizikai alapkutatások, valamint az alkalmazott tudományok előtt.

Kelemen Lóránd: Sejtméretű szerszámok: biofizikai kutatások polimer mikroeszközökkel 157
Egyedi sejtek vizsgálatához azok méretével összemérhető polimer mikroeszközök készíthetők, a mérésekhez optimalizált geometriával és egyéb fizikai paraméterekkel (pl. rugalmasság). Ezekkel az eszközökkel az optikai csipesszel mozgatott sejtek izotrop felbontású 3D mikroszkópos leképezése vagy időben és térben kontrollált sejt-sejt kölcsönhatás valósítható meg.

Török György, Kellermayer Miklós: MINFLUX mikroszkópia: A szuperfelbontású mikroszkópia (nanoszkópia) fizikai határának feszegetése 162
A tanulmány az utóbbi évtizedben az optikai mikroszkópiában történt jelentős újításokat veszi sorra. Ezek a nanoszkópia tudományterület és végső soron a MINFLUX megszületéséhez vezettek.

Lukács András, Pirisi Katalin, Raics Katalin: Ultragyors spektroszkópia a biológiában 166
A kékfény-fotoreceptorfehérjék működése során a kék foton abszorpcióját követően nagyon gyors elektrontranszfer-folyamat játszódik le, amit ezután a fehérje szerkezetének nagyobb megváltozása követ. Az ultragyors spektroszkópia segítségével ezeket a gyors elektrontranszfer-folyamatokat lépésről lépésre meg tudjuk figyelni.

Papp Eszter, Vattay Gábor: Fehérjék a vezető és szigetelő állapotok határán 170
Friss eredmények igazolják, hogy a fehérjék nem szigetelők, hanem az elektromosságot rendkívül hatékonyan továbbító, úgynevezett kvantumkritikus vezetők. Ez az új megközelítés felold bizonyos korábbi ellentmondásokat, és megmagyarázza, hogyan képesek ezek a molekulák hatékony töltés- és energiatovábbításra.

Bernáth Szabolcs, Szöllősi Gergely János, Derényi Imre: A fák hosszú életének titka 174
A fák képesek évszázadokon keresztül egészségesen élni és növekedni. Genetikai állományuk stabilitásának okát, a csúcsrügyek őssejtjeinek különösen ritka osztódását tárja fel a szerzők által teljesgenomszekvencia-adatokon végzett átfogó modellezés.

A FIZIKA TANÍTÁSA

Lévainé Kovács Róza: Krausz Ferenc az Öveges Fizikaversenyen 178

~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~ · ~

BIOPHYSICS – THEMATIC BLOCK

L. Zimányi: Selection of results from Hungarian biophysics research teams – Introduction

Á. Ábrahám, P. Galajda, K. Nagy: Trapped: studying individual cells with microfluidic methods

A. Balogh, I. Rajmon, K. D. Kovács, R. Horváth: Biophysical and biological applications of a fluidic force microscope (FluidFM) with a nanofluidic channel

L. Kelemen: Cell-scale tools: biophysical investigations with polymer microdevices

Gy. Török, M. Kellermayer: MINFLUX microscopy: Pushing the physical limits of super-resolution microscopy (nanoscopy)

A. Lukács, K. Pirisi, K. Raics: Ultrafast spectroscopy in biology

E. Papp, G. Vattay: Proteins at the boundary between conducting and insulating states

Sz. Bernáth, G. J. Szöllősi, I. Derényi: The secret to the longevity of trees

TEACHING PHYSICS

R. Lévainé Kovács: Ferenc Krausz at the Öveges Physics Competition

Fizikai Szemle
MAGYAR FIZIKAI FOLYÓIRAT
megjelenését támogatják:

KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS MINISZTÉRIUM
Nemzeti Kulturális Alap
OTTHON, VÁROS FERENCVÁROS
A FIZIKA BARÁTAI

LXXVI. ÉVFOLYAM, 5. (858.) SZÁM 2026. MÁJUS

VÁLOGATÁS HAZAI BIOFIZIKAI MŰHELYEK EREDMÉNYEIBŐL

Zimányi László
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet, Szeged
E-mail: zimanyi.laszlo@brc.hu

A Magyar Biofizikai Társaság a világon az elsők között alakult meg 1961-ben, és a biofizika azóta is egyik erőssége a magyar tudománynak. Tavaly fogalmazódott meg az igény arra, hogy az Eötvös Loránd Fizikai Társulatban is tagsággal rendelkező biofizikusok és biológiai fizikusok – sokan közülük eredetileg fizikus végzettséggel – az ELFT-n belül is meghatározzák magukat, létrehozva a Biofizikai Szakcsoportot. Ezzel együtt kapta meg a biofizikus és biológiai fizikus közösség a felkérést egy tematikus blokk összeállítására a *Fizikai Szemlé*ben, aminek nagy örömmel teszünk eleget. A négy orvosképző egyetem biofizikai, orvosi fizikai intézeteiben, a HUN-REN SZBK Biofizikai Intézetében, az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén és további intézmények kutatócsoportjaiban fontos eredményeket elérő kollégák munkájának bemutatását természetesen csak a teljesség igénye nélkül vállalhatjuk. Az alábbi válogatás arra törekszik, hogy a csak nagyon tágan és bizonytalanul értelmezhető biofizikai – biológiai fizikai határtudomány eredményeiből felvillantson néhány modern, izgalmas és egymástól is eléggé különböző munkát a hazai műhelyekből.

Ábrahám Ágnes, Galajda Péter és *Nagy Krisztina* cikke betekintést nyújt az egyedi élő sejtek, illetve kisebb sejtpopulációk vizsgálatának lehetőségeibe. A (bio-) fizika szerepe itt elsősorban technikai: a mikrofluidikára, mikrofabrikációra és csiplaboratóriumi (lab-on-a-chip) módszerekre épülő, a fizikából és anyagtudományból kölcsönzött eljárások teszik lehetővé a különböző környezeti hatásoknak kitett sejtek tulajdonságainak beható vizsgálatát, az adott esetben genetikailag azonos sejtek fenotipikus változatosságának, heterogenitásának kimutatását. Kutatásaik orvosbiológiai és környezetbiológiai szempontból igen jelentősek, hiszen a baktériumok antibiotikum-rezisztenciája az egészségügy egyik legégetőbb problémája, a biofilmek tulajdonságainak megismerése pedig orvosi, mezőgazdasági, ipari jelentőséggel is bír.



Zimányi László 1979-ben kapott fizikusdiplomát Szegeden, és azóta is a HUN-REN (korábban MTA) Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének tagja – 2025 óta nyugdíjas kutató professor emerituskén. Az MTA doktora, az SZTE címzetes egyetemi tanára, az intézet korábbi igazgatója (2015–2024). Kutatási területe a molekuláris biofizika, elsősorban az energiaátalakításban, ion- és elektrontranszportban részt vevő fehérjék működésének fizikája.

Évtizedes múltra tekint vissza az atomerő-mikroszkópia alkalmazása biológiai objektumokra, mind morfológiai, mind sejt- vagy makromolekulaszintű mechanikai vizsgálatokban. A technika újabb változata, a fluid-FM készülékre alapozva több területen forradalmasította a biofizikai kutatást, igen jelentős biológiai és orvosbiológiai vonatkozásokkal, ahogy azt *Balogh Anna, Rajmon Imola, Kovács Kinga Dóra* és *Horváth Róbert* írásából megtudhatjuk. Az atomerő-mikroszkópban használatos tűbe integrált mikrofluidikai csatorna alkalmas egyedi sejtek felszíni erőinek mérésére nagyszámú mintán, sejtek elválasztására egysejtes vizsgálatokhoz, anyagok bejuttatására élő sejtekbe, illetve pikoliternyi mintavételre a citoplazmából, továbbá mikro- és nanostruktúrák felületi nyomtatására is biofizikai vizsgálatokhoz.

A molekuláris és sejtbiológia területén igen nagy jelentősége van a nagy felbontású mikroszkópos képalkotásnak, a kölcsönhatások (pl. sejtek közötti erőhatások) mérésének, jellemzésének. *Kelemen Lóránd* dolgozatában azt mutatja meg, hogy hogyan lehet változatos feladatokra alkalmas mikroszkopikus méretű „szerszámokat” készíteni és használni többek között biológiai kutatásokra. Közeli infravörös, femtoszekundumos lézerrel végzett kétfotonos polimerizációval mikroszkóp alatt tetszőleges formájú és mechanikai tulajdonságú testeket tudnak készíteni. Ezeket aztán multifókuszú optikai csipesz segítségével képesek a három transzlációs és három rotációs irányban mozgatni, a hozzájuk rögzített testtel, például élő sejtekkel együtt. A kidolgozott tomografikus módszer jelentősen javítja az optikai képek felbontását. A szellemes mechanikai eszközök, például a rugalmas mikrocsipeszek pedig alkalmasak sejtek közötti kölcsönhatásoknak a pikonewtonos tartományba eső mérésére.

A szuperrezolúciós fluoreszcenciamikroszkópia három eltérő módszerének feltalálásáért 2014-ben odaítélt kémiai Nobel-díj egyik díjazottja, Stefan Hell nemrég jelentősen túllépett saját, STED-nek nevezett módszerén, megalkotva a még sokkal jobb felbontású MINFLUX eljárást. *Török György* és *Kellermayer Miklós* részletesen ismerteti ezt a forradalmi újítást, amivel gyakorlatilag az elektronmikroszkópia felbontóképességét lehet elérni optikai mikroszkóppal, így akár élő sejtek is vizsgálhatóak. A szerzők látványos ábrákon demonstrálják saját kísérletüket, amivel megmérték egy sejt mitokondriuma és endoplazmás retikulumja között a távolságot, illetve a mitokondrium szerkezetéről nagyfelbontású 3D képet is készítettek. Ha az egyébként „kényes” MINFLUX kísérleti körülményeit sikerül megfelelően beállítani, akkor

ez a technika akár egyedi motorfehérjék mozgásának időbeli felbontására és a fehérjék működését kísérő elmozdulások atomi szintű kimutatására is alkalmas lehet.

Az enzimek működését nem mindig kísérik látványos konformációváltozások, a fontos dolgok a belsejükben lévő kofaktorokkal és környezetükkel történhetnek, és spektroszkópiai módszerekkel vizsgálhatók. Erre sorolnak fel példákat *Lukács András, Pirisi Katalin* és *Raics Katalin,* akik írásukban az ultragyors (femtoszekundumos) spektroszkópia eljárásainak alkalmazását mutatják be több, flavin kofaktort tartalmazó, de eltérő biológiai funkciót ellátó fehérje esetében. Az általuk is vizsgált fehérjék egy részének működésében a fénynek nincs szerepe, az csak a spektroszkópiai ismeretszerzés eszköze, más részük, a fotoaktív fehérjék esetén viszont a fény elnyelése a működés alapja. Az utóbbi csoportban kulcsszerepet játszik a fotoindukált elektrontranszfer, amit aztán változatos molekuláris kölcsönhatások követnek fontos biológiai funkciókkal.

A többnyire húsz különböző aminosavból álló fehérjék három (négy) hierarchikus szinten felépülő makromolekulák, az elsődleges szekvenciától a háromdimenziós feltekeredésig. Egyedi szerkezetük se nem kristályos, se nem amorf, hiszen az esetek többségében a funkciójukhoz meghatározott térbeli szerkezet szükséges – bár ez alól van sok kivétel is. A fehérjék anyagát sokáig elektromosan szigetelőnek tekintették, mígnem elektródák közé helyezett fehérjemonorétegek vezetőképességét – az elektrontranszportot – mérve ki nem derült, hogy a vezetőképességük jóval nagyobb a szigetelőkénél, és kriogenikus hőmérsékleteken sem szűnik meg. A kifejezetten biológiai elektrontranszfert megvalósító redoxfehérjék rövidebb távú „vezetéséért" felelős alagúteffektus a fenti elektrontranszport-kísérletek eredményét nem magyarázza meg megfelelően. *Papp Eszter* és *Vattay Gábor* részletes és alapos kvantumfizikai számításokkal és létező modellek továbbfejlesztésével jutott arra a meglepő következtetésre, hogy a fehérjék kvantumkritikus állapotban vannak, ami megmagyarázza az elektronvezetésük fenti tulajdonságait.

Ahogy az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének munkatársaitól megszoktuk, ezúttal is egy olyan jelenség modellezésével és magyarázatával jelentkeznek, amit mindenki ismer, de csak kevesen gondolkoznak el rajta (közéjük tartozik Enyedi Ildikó, akinek új filmje, a „Csendes barát" a közelmúltban hat díjat nyert a velencei filmfesztiválon). A fák akár évszázadokig is elélnek anélkül, hogy – növekedésüktől eltekintve – észrevehetően megváltoznának, aminek a hátterében a genetikai állományuk rendkívüli stabilitása áll. *Bernáth Szabolcs, Szöllősi Gergely János* és *Derényi Imre* genomikai adatok „big data" analízisével jutottak arra a következtetésre, hogy a fák csúcsrügyeiben élő őssejtek, minden további sejt forrásai, csak rendkívül ritkán osztódnak, ezzel minimalizálva az osztódáskor elkerülhetetlen véletlen mutációk számát és későbbi esetleges negatív hatásaikat.

Végül megköszönöm szerzőink támogatását és hozzájárulását, és remélem, hogy a *Fizikai Szemle* olvasói is érdekesnek találják az itt következő biofizikai tematikus blokkot.

BECSAPDÁZVA: EGYEDI SEJTEK VIZSGÁLATA MIKROFLUIDIKAI MÓDSZEREKKEL

Ábrahám Ágnes[1,@], Galajda Péter[1], Nagy Krisztina[1,2]
[1]HUN-REN SZBK, Biofizikai Intézet, Biofotonikai és Biomikrofluidikai Kutatócsoport, Szeged
[2]SZTE TTIK, Fizikai Intézet, Kísérleti Fizikai Tanszék, Szeged
[@]E-mail: abraham.agnes@brc.hu

Bevezetés

A mikrofluidika egy multidiszciplináris tudományterület, mely a mérnöki tudományok, a fizika, a kémia és a biológia határán helyezkedik el [1]. A mögötte álló technológia alapja a folyadékáramlás mikroszkopikus méretű csatornákban történő szabályozása. Ezekben a nagyon kis – jellemzően egy hajszál vastagságánál kisebb – átmérőjű csatornákban a folyadékok viselkedése eltér a makroszkopikus világban megszokottól, különleges fizikai jelenségeket (pl. lamináris áramlás) figyelhetünk meg.

A csövekben áramló folyadékok jellemzésére, és az áramlási mintázatok előrejelzésére az ún. Reynolds-számot (Re) szokták használni. A Reynolds-szám egy dimenzió nélküli mennyiség, amely a tehetetlenségi erők és a viszkózus erők közötti viszonyt adja meg. A következőképp írhatjuk fel:

$$\mathrm{Re} = \frac{\text{tehetetlenségi erők}}{\text{viszkózus erők}} = \frac{vl\rho}{\eta},$$

ahol v az áramlás sebessége, l a rendszer egy jellemző hosszmérete, ρ a folyadék sűrűsége, η pedig a folyadék dinamikus viszkozitása. Alacsony Reynolds-szám esetén lamináris, míg magas érték esetén turbulens áramlást várunk. A mikrofluidikai rendszerekre jellemző az alacsony Reynolds-szám, és így a lamináris (réteges) áramlás, ahol a folyadékáramok egymással párhuzamosan haladnak, és keveredésük főként diffúzióval, a részecskék véletlenszerű mozgásával, lassan történik. Ezzel ellentétben a nagy Reynolds-számú tartományra a turbulens áramlás és a

gyors keveredés a jellemző. A laminárisból a turbulens áramlásba történő átmenet nem köthető egy konkrét határértékhez.

A mikrofluidikai eszközök elsősorban mikroméretű csatornákból és kamrákból állnak, de tartalmazhatnak elektródákat, szelepeket vagy kémiai felületmódosításokat is. Előállításukra kezdetben a mikroelektronikából ismert gyártási eljárásokat (pl. fotolitográfia) és anyagokat (szilícium) használták, manapság azonban gyakran polimerekből készülnek az eszközök fotopolimerizációs vagy kis méretekre optimalizált öntési, fröccsöntési eljárásokkal.

A fent említett lamináris áramlás jellegzetességei számos olyan előnyt nyújtanak, melynek köszönhetően az utóbbi évtizedekben a mikrofluidika és a hozzá kapcsolódó mikrofabrikációs technológiák egyre nagyobb szerepet kaptak az élettudományi kutatásokban. Ezekben a rendszerekben a folyadékok mozgása kiszámítható és rendezett, ezáltal lehetőség nyílt a folyadékok, sejtek és (bio-) molekulák precíz manipulálására és analízisére a mikroszkopikus méretű csatornákban. Lehetőség van precíziós áramláskontrollra, szabályozott keverésre, speciális geometriai struktúrák, szelepek kialakítására, és membránok integrálásra. A „lab-on-a-chip" technológia alkalmas különböző elválasztási technikák csipen belül történő megvalósítására, pl. egyes minták, reagensek réteges elválasztására, a DNS szekvenálására és fehérjék analízisére is. Teszi mindezeket minimális folyadéktérfogatok felhasználásával [2].

A mikrofluidika forradalmasította a sejtbiológiai kutatásokat is azáltal, hogy lehetővé teszi az egyedi sejtek szintjén történő összetett vizsgálatokat. Segítségével kialakíthatók olyan elrendezések, melyek alkalmasak kisebb méretű sejtpopulációk egysejt-szinten történő vizsgálatára. Sőt, képesek vagyunk akár egyedi sejtek manipulációjára, mikroszkopikus méretű sejtcsapdák kialakítására, és egyes sejtek izolálására is [3–5]. Ez kivételes lehetőségeket hoz magával, hiszen a hagyományos laboratóriumi módszerekkel nem volt lehetőség a sejtek között kialakuló heterogenitás pontos megfigyelésére. A heterogenitásnak azóta igen nagy szerepet tulajdonítanak többek között a bakteriális antibiotikum-rezisztencia kialakulásában, de a tumorbiológiában sem lehet eltekinteni tőle [6, 7]. Fontos kiemelni, hogy a jól szabályozható áramlási térnek köszönhetően, a sejtek mikrokörnyezetének (például a gyógyszerhatóanyagok vagy tápanyagok koncentrációjának) pontos szabályozására is lehetőségünk van. Az eszközök mikroszkópiával történő kombinálása pedig valós idejű megfigyeléseket tesz lehetővé [8].

Ahhoz, hogy bizonyos sejteket hosszú időn át meg tudjunk figyelni, azok rögzítésére, csapdázására van szükség. A mikrofluidikai rendszerekben történő csapdázásnak többféle módszer képezi az alapját, ezek mindegyike fizikai elveken alapul. Céljuk a sejtek megfogása és helyükön tartása, közben friss tápanyag biztosítása. A mikrofluidikai csapdákban „megfogott" sejtek számos tulajdonsága vizsgálható: 1) lehetőség van az egyedi sejtek növekedésének, osztódásának, génexpressziójának nyomon követésére; 2) a tápoldat kémiai összetételét változtatva modellezhetjük a természetes élőhelyeket is jellemző dinamikus körülményeket, vizsgálhatjuk pl. a stressz (ez lehet az antimikrobiális szerek jelenléte) által kiváltott sejtválasz heterogenitását. A jelen tanulmány célja, hogy néhány példán keresztül bemutassa az egysejt-csapdák működési elvét, alkalmazási lehetőségeit. Elsősorban a kutatócsoportunk által tervezett és elkészített eszközökre fókuszálunk.

Aktív csapdázás – sejtek a folyadékáramban

A sejtek csapdázásának egyik fő típusa, amikor áramlással fogjuk be és tartjuk is benn a sejteket a pontosan megtervezett és kialakított geometriájú csapdákban, és ugyanez az áramlás biztosítja számukra a folyamatos tápanyagutánpótlást is. Erre mutat néhány példát az *1. ábra*.

Az *1A–B. ábrán* olyan elrendezések láthatók, melyek algasejtek befogására és hosszú távú mikroszkópos megfigyelésére alkalmasak [9, 10]. A jellemzően 4–10 μm átmérőjű *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgák fontos modellorganizmusai a fotoszintézis- és biotechnológiai



Ábrahám Ágnes biofizikus a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének, azon belül a Biofotonika és Biomikrofluidika Kutatócsoportnak tudományos munkatársa. Kutatási területe mikroorganizmusok vizsgálata különböző, dinamikusan változó környezetekben. Ezeket a környezeteket mikrofluidikai csipekben alakítják ki, melyek tervezésében és előállításában is részt vesz.



Galajda Péter biofizikus a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont tudományos főmunkatársa. Kutatásai a mikroorganizmusok kollektív viselkedését, a sejtek mozgását és az evolúció fizikai korlátait vizsgálják mikrofluidikai rendszerekben.

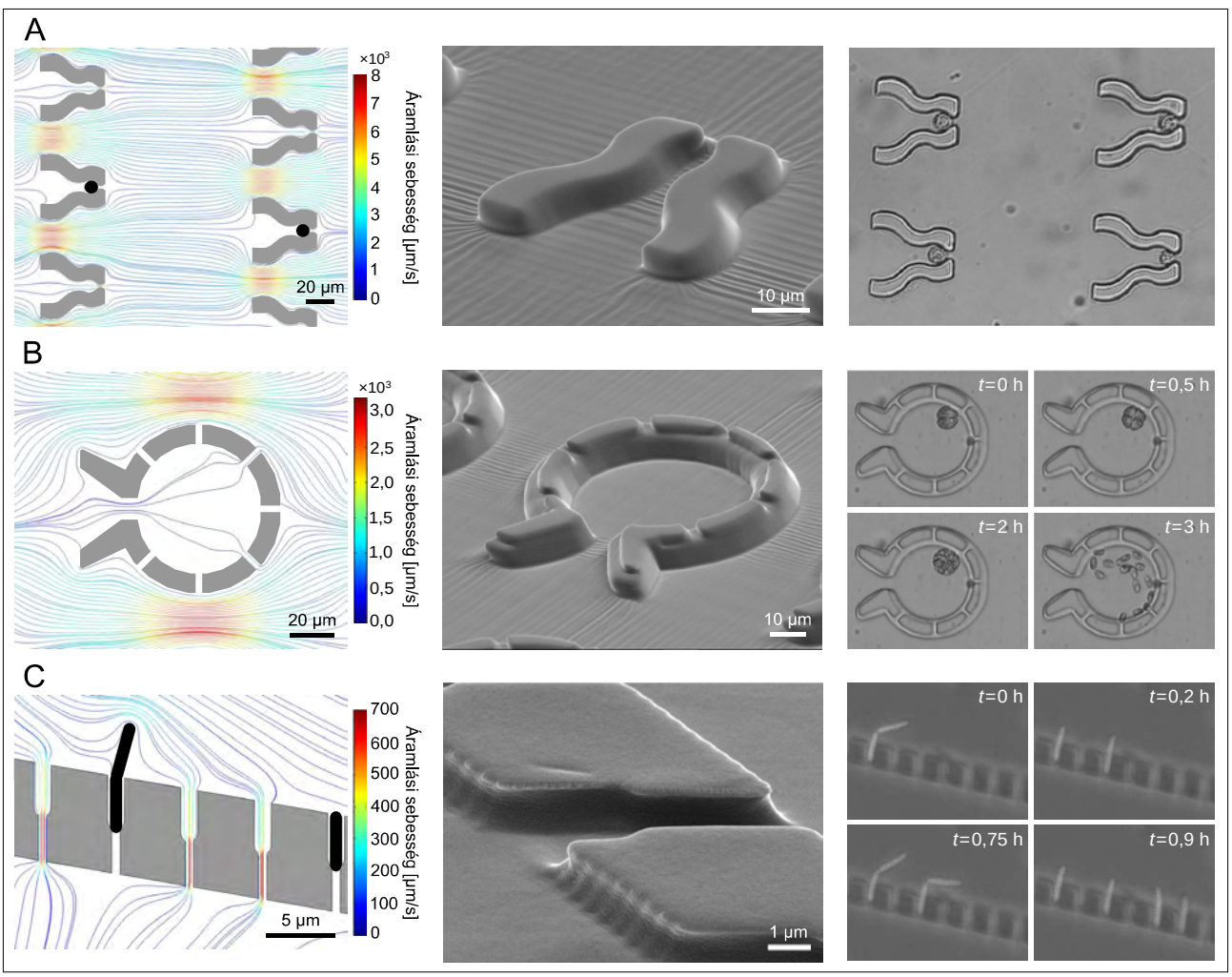


Nagy Krisztina a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének tudományos munkatársa és a Szegedi Tudományegyetem Fizikai Intézetének adjunktusa. Fő kutatási területe a mikrofluidika alkalmazása biológiai rendszerek vizsgálatában. Munkájának központi kérdése, hogy a mikrokörnyezet milyen hatással van a baktériumok kommunikációjára, kooperatív viselkedésére és evolúciójára.

kutatásoknak. A fotoszintetikus hatékonyság mérésére széles körben elterjedt módszer a klorofill-a fluoreszcenciájának mérése, mely a bemutatott eszközökben egyedi sejtek szintjén is megvalósítható. Ezáltal vizsgálható az algasejtek morfológiája és fotoszintézise közötti kapcsolat. Munkatársaink az általunk készített eszközök segítségével kimutatták, hogy a zöldalgák fotoszintetikus aktivitását nagymértékű heterogenitás jellemzi az egyedi sejtek szintjén. Ez a heterogenitás már az egy adott sejt osztódásakor keletkező utódok között is megmutatkozik [9].

Az *1A. ábrán* egy olyan eszköz szerepel, melyben a csapdageometria egyetlen sejt befogását és megfigyelését teszi lehetővé, míg az *1B. ábrán* látható elrendezéssel a befogott sejtek osztódását vizsgálhatjuk, hiszen a keletkező leánysejtek is begyűjthetők. A bal oldali panelek szemléltetik a csapdák működését, az áramlás szerepét. Számítógépes hidrodinamikai szimulációkkal kiszámítható az áramlási tér. Az áramvonalak jól szemléltetik, hogy a csapdageometria fontos elemét képezik a keskeny átvezető nyílások, melyeken a folyadék keresztül tud haladni, így juttatva be sejteket a csapdákba. Ezeknek a nyílásoknak a száma és mérete meghatározza a csapdázás hatékonyságát. Egyetlen nyílás esetében a befogott sejt blokkolja a folyadékáramot, így újabb sejt nem érkezik a csapdába *(1A ábra)*. Az *1B panelen* bemutatott csapdatípus több és nagyobb méretű átvezetővel rendelkezik, ezzel biztosítva a csapdázás hosszú távú eredményességét. A folyadékáram szerepe azért is fontos, mert megnehezíti azt, hogy az aktívan úszó sejtek elhagyják a csapdát.

A baktériumok csapdázása méretüknél fogva nagyobb kihívást jelent, de a megfelelő mikrofabrikációs technológiával (pl. kétfotonos polimerizációval) elkészíthetők az egyes sejtek csapdázására alkalmas struktúrák. Az *1C. ábrán* egy jelenleg fejlesztés alatt álló elrendezés látható. Az eszközben a csapdázás elve megegyezik az *1A. ábrán* bemutatott algacsapdákkal, ugyanakkor ebben az esetben a cél az, hogy kezdetben egyetlen baktériumsejtet fogjunk be, majd ezen sejt osztódását követően



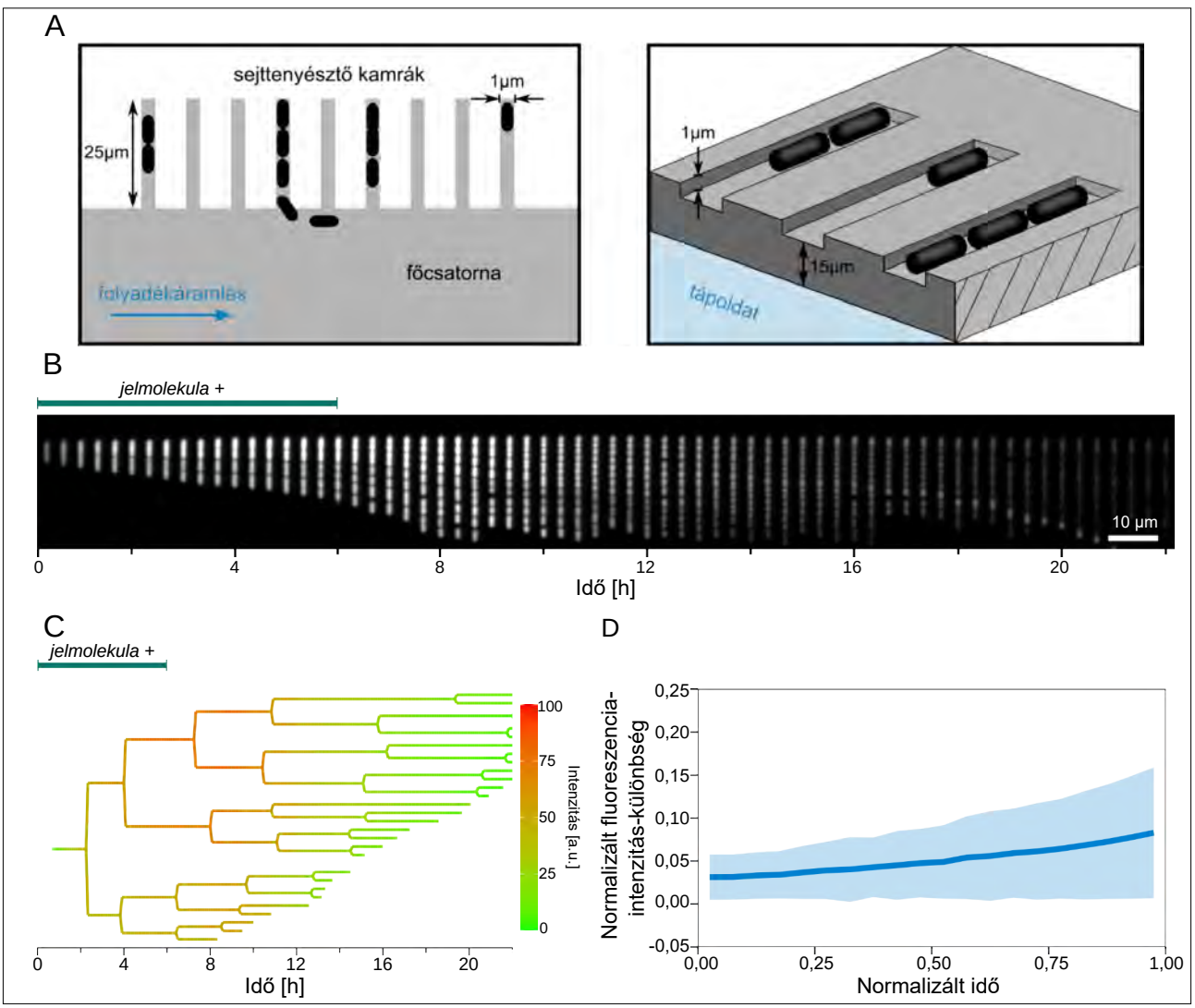
1. ábra. Hidrodinamikai elven működő egysejtcsapdák. A bal oldali panelen az áramlási tér szimulációja szemlélteti a csapdák működési elvét. Az áramvonalak sűrűsége és színe a sebesség nagyságát jelzi. A középső panelen nagyfelbontású pásztázó elektronmikroszkópos felvételek láthatók az elkészült csapdákról, a jobb oldali panelen pedig mikroszkópos felvételek mutatják a mikrofluidikai eszközöket működés közben. A) *C. reinhardtii* algasejtek befogására és vizsgálatára alkalmas mikrofluidikai csapdák. B) *C. reinhardtii* sejtek és az osztódások során keletkező leánysejtek befogására, hosszú távú megfigyelésére alkalmas csapdarendszer. C) Egy baktérium befogására és az adott sejt utódainak begyűjtésére, hosszú távú megfigyelésére alkalmas mikrofluidikai elrendezés részlete

az egyik leánysejt az eredeti csapdában maradjon, míg a másikat az áramlás átmossa a következő csapdába. Ez mindaddig ismétlődik, amíg az összes csapda be nem telik. Így lehetőség van a leszármazási viszonyok hosszú távú nyomon követésére, és a heterogenitás megjelenésének tanulmányozására egy klonális (vagyis genetikailag homogén) baktériumpopuláció esetében.

Passzív csapdázás – sejtek a nyugvó folyadékban

A baktériumok egysejt-szinten történő tanulmányozására egy az irodalomban sokat használt eszköz az ún. Mother Machine *(2A. ábra)* [11]. Ez az elrendezés egy főcsatornából és az ebből nyíló, végükön zárt oldalágakból épül fel. A sejtek az oldalcsatornákban növekednek és osztódnak, majd, amikor elérik a kamra főcsatorna felőli nyílását, az áramlás elmossa őket. Az oldalágak szélessége és magassága összemérhető egy baktériumsejt átmérőjével (kb. 1 µm), míg a főcsatorna magassága egy nagyságrenddel nagyobb. Az elrendezés egy sajátos tulajdonsága, hogy az egyes oldalcsatornákban a sejtek osztódásakor néhány generáción keresztül pontosan követhetőek a leszármazási kapcsolatok. Az oldalcsatornák tulajdonképpen zsákutcák: folyadék nem áramlik rajtuk keresztül, bennük a sejteket nyugvó folyadék veszi körül. A sejtek számára szükséges tápanyagot a főcsatornában áramló folyadék biztosítja. Az oldalcsatornákba a tápanyag és az egyéb molekulák diffúzióval jutnak be, amit az eszköz tervezésénél figyelembe kell venni. Optimális esetben a főcsatornából a kamrák végéig 1-2 másodpercen belül bediffundálnak az oldott anyagok.

A Mother Machine eszközt csoportunk *Pseudomonas aeruginosa* baktériumsejtek kommunikációjának



2. ábra. Baktériumok vizsgálata a Mother Machine mikrofluidikai eszközben. A) Az eszköz sematikus ábrázolása. Az eszköz két fő részből áll: a baktériumok csapdázására szolgáló, zárt végű oldalcsatornákból és a főcsatornából, melyben folyadékot áramoltatunk. B) Fluoreszcens képek sorozata, mely egy adott oldalcsatornában található *P. aeruginosa* sejtek GFP-termelésének időbeli változását mutatja be jelmolekula hozzáadása és megvonása mellett. C) Egy adott oldalcsatornához tartozó leszármazási fa. A sejtek intenzitásváltozását a színskála jelzi. D) Két leánysejt között mért normalizált fluoreszcenciaintenzitás-különbség egy osztódási ciklus időtartama alatt. A vastag kék vonal 1233 darab sejt átlaga, a szélesebb kék sáv pedig ezeknek a szórása

vizsgálatához használta. A bakteriális kommunikáció egyik formája a quorum érzékelés, mely során a sejtek jelmolekulákat termelnek, és érzékelik is azok jelenlétét. Amennyiben a sejtszám (és ezzel a jelmolekula koncentrációja) elér egy küszöbszintet, a sejtek összehangolják a viselkedésüket a génexpressziójukon keresztül. Ez a fajta kommunikáció kulcsfontosságú például a biofilmképzésben és a virulenciafaktorok termelésében, ezáltal nagymértékben hozzájárulhat egy baktériumtörzs patogenitásához. Bár a quorum érzékelés populációszinten egy összehangolt válaszreakciót eredményez, az egyedi sejtek esetében nagy a génexpresszió változatossága. Az, hogy egy sejt mikor kerül quorum állapotba és hogyan változik meg a génexpressziója a többi sejthez képest, sejtről-sejtre különbözhet. Ennek a heterogenitásnak a vizsgálatára nyújtott kiváló lehetőséget a Mother Machine. A jelmolekula megvonására adott válaszreakció nyomon követése szintén fontos biológiai kérdés, melyet hagyományos laboratóriumi módszerekkel nehéz vizsgálni.

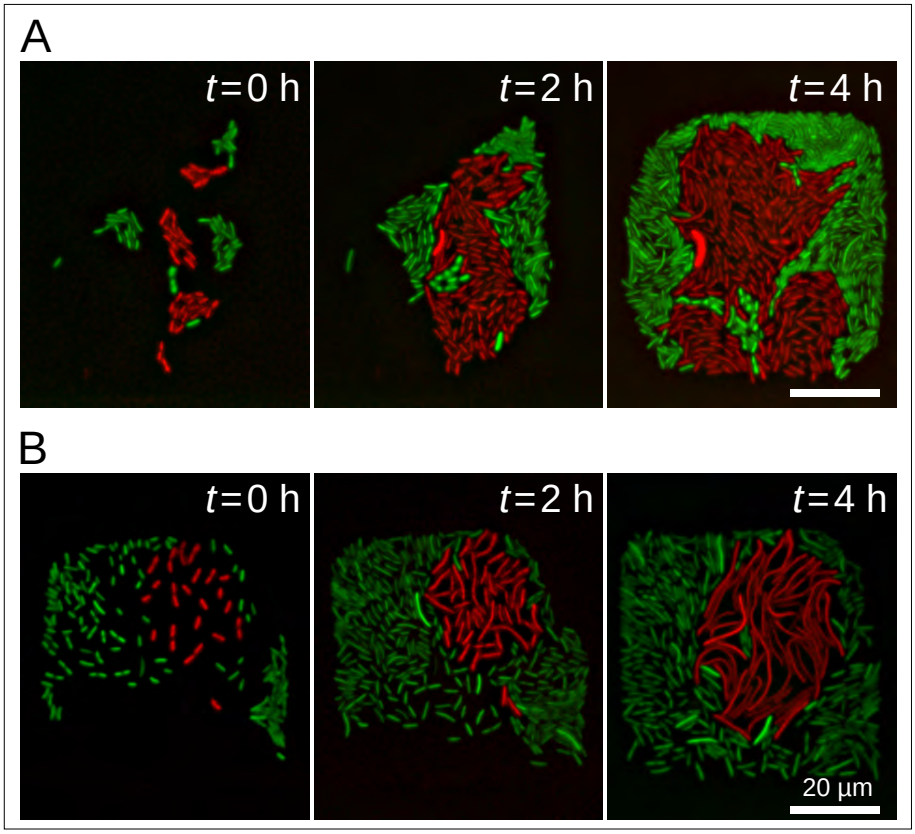
Kísérleteinkhez egy mutáns *P. aeruginosa* törzset használtunk, mely nem képes a jelmolekula termelésére, azonban külsőleg hozzáadva reagál annak jelenlétére. Az általunk használt elrendezésben a sejtek quorum állapota a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) termelésén keresztül volt vizsgálható. A *2B. ábra* egy tipikus kimográfot (időbeli képsorozatot) mutat be, melyen jól látszik, hogyan viselkedik egy adott oldalcsatornában növekedő baktériumpopuláció a jelmolekulák hozzáadásakor, majd megvonásakor. A sejtek fluoreszcenciaintenzitása a jelmolekula hozzáadását követően gyorsan emelkedik (amikor érzékelik a jelmolekulát, megkezdik a GFP termelését), majd a megvonás után fokozatosan csökken. Látható, hogy bár az adott oldalcsatorna egyetlen egy (a legbelső) sejt utódait tartalmazza, azok fluoreszcenciaintenzitása mégsem egyforma a kísérlet során. Vannak sejtek, melyek GFP-termelése fokozottabb a társaikhoz képest, és a jelmolekula megvonására sem egyformán reagálnak. Megfelelő képanalízis segítségével a csatornában követhetők a leszármazási viszonyok, melyekből kirajzolható egy fa *(2C. ábra)*. A leszármazási fák a Mother Machine eszközben aszimmetrikusak, hiszen az osztódó leánysejtek egy részét a főcsatorna áramlása elmossa, így ezeknek az osztódását már nem tudjuk tovább követni. Ha időben követjük egy osztódás után a keletkező két leánysejt intenzitását, akkor a normalizált fluoreszcenciaintenzitás-különbség kiszámításával tanulmányozható a heterogenitás felépülése. A vizsgált *P. aeruginosa* sejtek osztódási ciklusának átlagos hossza az eszközben kb. 4 óra, és a *2D. ábra* alapján látható, hogy a két utódsejt között az intenzitáskülönbség lineárisan nő. Ez alatt a pár óra alatt már átlagosan kb. 5%-os eltérés alakul ki közöttük [12, 13].

Ezt a jelenséget, amikor genetikailag megegyező sejtek megjelenésében bármilyen eltérés mutatkozik, fenotípusos heterogenitásnak nevezzük. Ennek a heterogenitásnak fontos szerepe lehet abban, hogy egy baktériumpopuláció milyen gyorsan tud alkalmazkodni és túlélni a természetes élőhelyeket jellemző változó környezeti feltételek mellett. A bakteriális kommunikáció mellett a heterogenitás megnyilvánulására kiváló példa az egyes sejtek antibiotikumokkal szemben mutatott ellenállóképessége. Napjaink egyik sokat vizsgált globális problémája az antibiotikum-rezisztencia kialakulása, melynek részletesebb tanulmányozására szintén kiváló lehetőséget biztosít a Mother Machine. Az eszköz segítségével az egyedi sejtek szintjén tudjuk vizsgálni a különböző hatásmechanizmusú antibiotikumok koncentrációfüggő hatását, és azonosítani tudjuk az ellenálló egyedeket. Megfelelő módszerekkel (pl. optikai csipesszel) ezek az egyedek akár ki is emelhetők a csatornákból további vizsgálatok céljából; így részletesen tudjuk tanulmányozni többek között az úgynevezett perzisztens (egyáltalán nem vagy nagyon lassan osztódó) sejtek megjelenését is, melyek toleranciát mutatnak az antibiotikumkezelésekkel szemben [14].

A fent bemutatott eszköz egy módosított változata az ún. Microcolony Machine. Itt a szűk, egy sejt szélességű oldalcsatornák helyett nagyobb oldalkamrákat használunk, melyekben egy kisebb, párszáz sejtből álló baktériumpopuláció vizsgálható. Az eszköz működési elve megegyezik a Mother Machine-éval: a főcsatornában áramoltatott tápoldat látja el a sejteket tápanyaggal, s ahogy a populáció növekszik, a kamra bejáratánál lévő sejteket elmossa az áramlás. Ebben az eszközben megfelelő fluoreszcens jelölések mellett akár populációk közötti kölcsönhatásokat, versengést is tanulmányozhatunk egysejt-szinten, dinamikusan változó környezeti feltételek mellett. A *3. ábra* mikroszkópos felvételei egy vad típusú (pirosan jelölt) és egy ciprofloxacin-rezisztens mutáns (zölden jelölt) *Escherichia coli* baktériumpopuláció egymás melletti növekedését mutatják be egy oldalkamrában. A képeken jól látható, hogy míg antibiotikummentes tápoldat jelenlétében egyformán növekszik a két populáció, addig ciprofloxacin – egy sejtosztódást gátló antibiotikum – jelenlétében jelentős a viselkedésbeli eltérés közöttük. A vad típusú sejtek megnyúlnak, és nem osztódnak tovább. A rezisztens törzs benépesíti a kamrát; ezek a sejtek közel normál morfológiával rendelkeznek.

Összefoglalás

A fenti példák jól mutatják, hogy a modern mikrofabrikációs technikák alkalmasak akár a baktériumok méretével összemérhető, apró struktúrák kialakítására. Ezeket a mikroszkopikus méretű geometriákat áramlással kombinálva olyan mikrofluidikai rendszereket állíthatunk elő, melyek újfajta megközelítéseket hoznak a sejtbiológiai kutatásokba, legyen szó baktériumokról vagy akár emlőssejtekről. Az egysejtszintű vizsgálatok bebizonyították, hogy azonos genetikai háttérrel rendelkező sejtek is mutathatnak különbségeket fenotípusukat tekintve. A mikroszkópiával egybekötött valós idejű megfigyelések rengeteg információval szolgálhatnak arra vonatkozóan, hogy ez a heterogenitás hogyan alakul ki, és a mikrokörnyezet milyen szerepet játszik benne. Ezeknek a folya-



3. ábra. E. coli sejtek növekedése és osztódása a Microcolony Machine eszközben. A vad típusú sejtek pirosan, míg a rezisztens sejtek zölden vannak jelölve. A) A két baktériumpopuláció közel egyformán viselkedik, amikor a főcsatornában normál tápoldat áramlik. B) Ciprofloxacin jelenlétében a vad típusú sejtek osztódása megáll, a sejtek megnyúlnak. A rezisztens populáció növekedését nem befolyásolja számottevően az antibiotikum jelenléte

matoknak a részletesebb feltárása kritikus fontosságú az orvostudomány és a biotechnológia szempontjából egyaránt. A mesterséges intelligencia robbanásszerű fejlődése ezeket a kutatásokat a közeljövőben még inkább előre mozdíthatja, hiszen az automatizált képanalízis és fenotípus-osztályozás sokkal hatékonyabbá teheti a hatalmas mennyiségű adat feldolgozását.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük *Dér Lászlónak* a projektekben való aktív részvételt, az adatok analízisében nyújtott segítséget. A zöldalgák fotoszintetikus aktivitásának egysejt-szinten történő tanulmányozása *Tóth Szilvia Zitával* és kutatócsoportjával (HUN-REN SZBK Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport) való együttműködés keretében valósult meg.

Irodalom

1. Whitesides G. M. (2006): The origins and the future of microfluidics. *Nature,* 442, 368–73.
2. Jayamohan H., Romanov V., Li H., Son J., Samuel R., Nelson J., mtsai (2017): Advances in Microfluidics and Lab-on-a-Chip Technologies. In: Molecular Diagnostics (Chapter 11). Academic Press. Cambridge, USA.
3. Hol F. J. H., Dekker C. (2014): Zooming in to see the bigger picture: Microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria. *Science,* 346, 1251821.
4. Rusconi R., Garren M., Stocker R. (2014): Microfluidics expanding the frontiers of microbial ecology. *Annu. Rev. Biophys.,* 43, 65–91.
5. Nagy K., Ábrahám Á., Keymer J. E., Galajda P. (2018): Application of microfluidics in experimental ecology: The importance of being spatial. *Front. Microbiol.*, 46, 363–94.
6. Ackermann M. (2015): A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.,* 13, 497–508.
7. Joshi R., Ahmadi H., Gardner K., Bright R. K., Wang W., Li W. (2025): Advances in microfluidic platforms for tumor cell phenotyping: from bench to bedside. *Lab Chip.,* 25, 856–83.
8. Allard P., Papazotos F., Potvin-Trottier L. (2022): Microfluidics for long-term single-cell time-lapse microscopy: Advances and applications. *Front. Bioeng Biotechnol.,* 10, 968342.
9. Széles E., Nagy K., Ábrahám Á., Kovács S., Podmaniczki A., Nagy V. és mtsai (2022): Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single-cell level. *Cells.,* 11, 285.
10. Széles E. (2023): Mikrofluidikai eszközök fejlesztése *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga egysejtszintű morfológiai és fotoszintetikus vizsgálataihoz (PhD). Szeged, Hungary.
11. Wang P., Robert L., Pelletier J., Dang W. L., Taddei F., Wright A. és mtsai (2010): Robust growth of *Escherichia coli. Curr Biol.,* 20, 1099–103.
12. Ábrahám Á., Dér L., Csákvári E., Vizsnyiczai G., Pap I., Lukács R. és mtsai (2024): Single-cell level LasR-mediated quorum sensing response of *Pseudomonas aeruginosa* to pulses of signal molecules. *Sci. Rep.,* 14, 16181.
13. Ábrahám Á. (2024): Design, modeling and application of microfluidic single-cell traps for algal and bacterial studies (PhD). Szeged, Hungary.
14. Balaban N. Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. (2004): Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science,* 305, 1622–1625.

A NANOFLUIDIKAI CSATORNÁVAL ELLÁTOTT FLUIDIKAI ERŐMIKROSZKÓP (FLUIDFM) BIOFIZIKAI ÉS BIOLÓGIAI ALKALMAZÁSAI

Balogh Anna[1], Rajmon Imola[1,2], Kovács Kinga Dóra[1,3], Horváth Róbert[1,2,@]
[1]Nanobioszenzorika Laboratórium, Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézet, HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpont, Szeged
[2]Nanobioszenzorika Kutatócsoport, Biofizikai Intézet, HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged
[3]Biológiai Fizika Tanszék, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
[@]E-mail: horvath.robert@ek.hun-ren.hu

Bevezetés – Egyedi sejtszintű technológiák

A fizikai világgal ellentétben, mely jól definiált tulajdonságokkal rendelkező elemi részecskékből épül fel, az élőlények építőkövei – az élő sejtek – egymástól nagyon eltérőek lehetnek. Akár a teljesen azonos genetikai tulajdonságokkal rendelkező sejtekből álló populációk egyes sejtjei is jelentősen különbözhetnek egymástól. Ma már bizonyított, hogy fontos fizikai és biológiai jellemzők, mint például az egyedi sejtek mérete, alakja, a termelt fehérjék összetétele és mennyisége mind nagyfokú heterogenitást mutatnak. Ez a változatosság feltehetően hozzájárul a populációk életképességéhez, melynek – ma még részleteiben feltáratlan – okai lehetnek. Napjainkban a szövetek heterogenitásának kutatása és megértése, valamint a szövet alpopulációinak (a hasonló tulajdonsággal rendelkező sejtek szűkebb csoportjainak) feltérképezése egy aktívan kutatott terület [1]. A megszerzett tudás új felhasználási területekhez és megoldásokhoz vezethet az orvostudományban, különös tekintettel a célzott, személyre szabott gyógyászatban. Fontos kiemelni, hogy a nagyszámú egyedi sejt tulajdonságainak vizsgálatára alkalmas technikák csak napjainkban kezdenek széles körben is hozzáférhetőek lenni, lehetővé téve új alapkutatási irányok megjelenését.

Az eddig használt biológiai és biofizikai technikák többsége viszonylag nagyszámú sejt együttes vizsgálatára alkalmas, ezek a populációt alkotó egyedi sejtek jelének egyfajta átlagát mérik. Viszont az így nyert eredmények félrevezetőek lehetnek, ha egy alpopuláció jelentős mértékben eltér az átlagtól, illetve ha a mért mennyiség nem normális eloszlást követ. Ezzel szemben egyedi sejtszintű mérésekből sokkal részletesebb képet kaphatunk a szövetek heterogenitásáról, komplex biológiájáról és a lehetséges alpopulációkról. Az egyedi sejtek kutatása előrébb mozdíthatja a sejtek magasabb szerveződésének feltérképezését és számos gyakorlati jelentőségű felfedezést is eredményezhet. Például implantátumok és gyógyszerhatóanyagok kifejlesztésében, számos betegség hatékony kezelésében jelenthet áttörést [2, 3].

A fentiekből következik, hogy azon új módszerek, melyek segítségével egyedi sejteket tudunk kiválogatni, manipulálni vagy releváns biológiai tulajdonságaikat mérni, kiemelt jelentőséggel bírnak. Ilyen technikákat használnak például a rendszerbiológia, a genomika és a proteomika területén. Az egyedi sejtszintű technológiák közé tartoznak az elektrofiziológián, tömegspektromet-



Balogh Anna PhD-hallgató az ELTE Fizika Doktori Iskolában és az Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetének Nanobioszenzorika Laboratóriumában Horváth Róbert és Derényi Imre témavezetésével. Kutatásának fókuszában a sejtadhézió jelölésmentes vizsgálata áll.



Rajmon Imola 2024-ben szerezte MSc-diplomáját az ELTE fizikus képzésén, tanulmányait a Szegedi Tudományegyetem Doktori Iskolájában folytatja. Jelenleg az Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetének Nanobioszenzorika Laboratóriumában végez kutatómunkát sejtadhéziós témákban.



Kovács Kinga Dóra biofizikus, PhD-hallgató az ELTE Fizika Doktori Iskolában. A HUN-REN EK MFA Nanobioszenzorika Laboratóriumban végzi kutatómunkáját. Kutatási területe a sejtadhézió jelölésmentes vizsgálata és élő sejtek injektálása.



Horváth Róbert fizikus-biofizikus a Nanobioszenzorikai Laboratórium vezetője a HUN-REN EK MFA-ban. Kutatási területe a jelölésmentes bioszenzorikai és biofizikai módszerek fejlesztései és alkalmazásai.

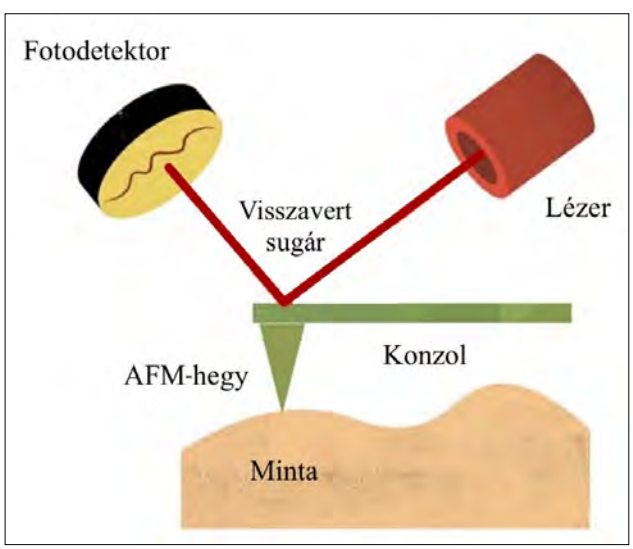
rián, nagy felbontású képkészítési, mikrofluidikai vagy nanofluidikai elveken alapuló műszerek. A következőkben egy ilyen nanofluidikai vizsgálatra alkalmas műszert fogunk bemutatni.

A FluidFM működési elve és összehasonlítása a hagyományos AFM technikával

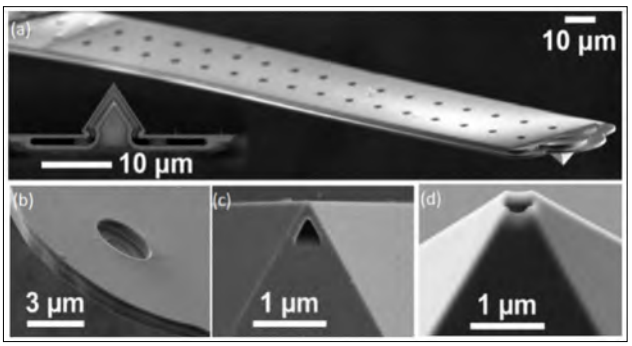
Fluidikai erőmikroszkópot (Fluidic Force Microscopy, FluidFM) használva egyedi sejteken lehet biofizikai-biológiai méréseket és manipulációkat végezni. A műszer nagyban hasonlít az atomerőmikroszkópra (Atomic Force Microscopy, AFM), annyi különbséggel, hogy a rugólapkája üreges, benne egy mikrofluidikai csatorna található. A hagyományos AFM-mel akár atomi felbontású mechanikai képalkotás is végezhető. A módszer elsősorban felületek topográfiájának vizsgálatára alkalmas, és egyaránt elterjedt a modern anyagtudományi és biológiai-biofizikai kutatásokban.

Röviden ismertetve egy AFM a következőképpen működik. A felületet pásztázó tűt egy rugólapkához rögzítik, ezt együttesen szokás konzolnak nevezni. A rugólapka meghajlásából következtetni lehet a tű és a minta között fellépő erőre. Magát a tűt és a rugólapkát egy piezoelektromos kristály segítségével függőleges és vízszintes irányban lehet mozgatni a vizsgálandó minta felett. A minta felületi topográfiájától függően az egyes pontokban a konzol meghajlása eltérő mértékű lesz. A rugólapka meghajlását optikai úton, egy lézernyaláb segítségével lehet nagy pontossággal mérni az *1. ábrán* látható módon. A lézerfény visszaverődik a rugólapka mintával ellentétes oldaláról egy fotodetektorra, amelylyel a lézer elmozdulását valós időben lehet követni [4].

Az általunk használt és bemutatni kívánt FluidFM eszköz például abban különbözik a hagyományos AFM-től, hogy a képalkotást egy invertált optikai mikroszkóppal végezzük. Továbbá, a mikroszkóp fölé van építve a műszer központi manipulációs egysége („fej”), melyre ráilleszthető a mérés során használt rugólapka, amelyben egy mikrofluidikai csatorna található. A mikrofluidikai csatorna egyik vége egy nyomásszabályozóhoz van csatlakoztatva, amely segítségével a csatornában uralkodó nyomást –700 és 1000 mbar között lehet szabályozni. Az eszközhöz többféle kialakítású rugólapka létezik, felhasználási céltól függően különböző apertúra található a végükön *(2. ábra)*.



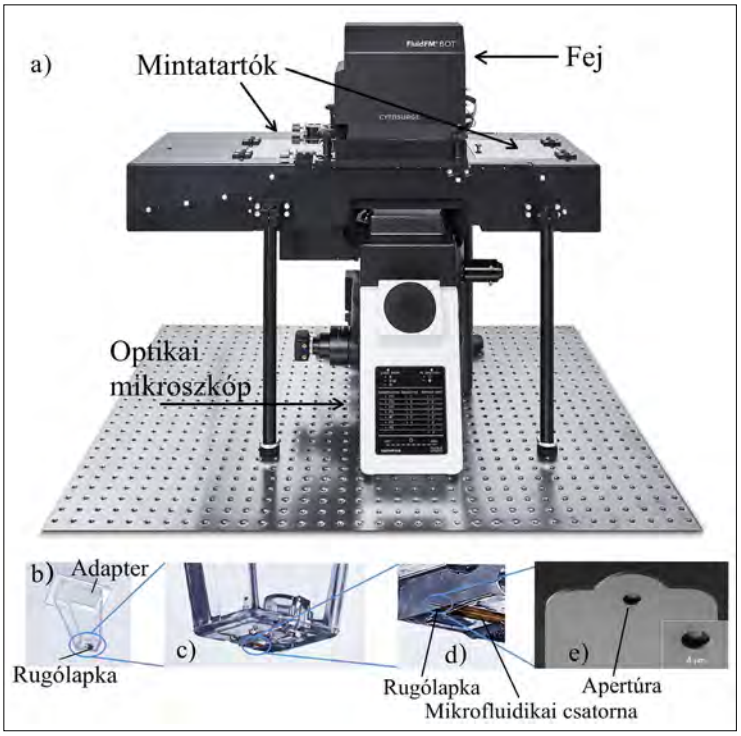
1. ábra. Egy tradicionális AFM vázlatos működési ábrája [13]



2. ábra. A különböző mérések során használt FluidFM-rugólapkák. Az a) képen az injektálás során használt, hegyben végződő rugólapka látható. Ezen mérési eljárás során képesek vagyunk anyagokat élő sejtekbe juttatni. Az injektálás során használt hegy közelebbről a c) és d) képeken látható. Az adhézióméréshez használt kör alakú apertúra a b) képen található [16]

Adhézióméréshez, illetve speciális felületek nyomtatásához tű nélküli rugólapkát és kör kialakítású apertúrát használunk, melynek átmérője 2 µm, 4 µm vagy 8 µm lehet. A műszer segítségével kis (több femtoliteres) folyadéktérfogatok injektálása is elvégezhető *(2. ábra)*. A FluidFM-mel végzett injektálás során egy olyan piramidális hegyben végződő tűt szokás alkalmazni, melynek az oldalán egy 600 nm átmérőjű lyuk található, lehetővé téve különböző anyagok injektálását, illetve a sejtekből történő mintavételt. Ilyen konfigurációval könnyen, precíz erőkontroll mellett átszakítható a sejtmembrán anélkül, hogy a mikrofluidikai csatorna eldugulna, vagy a sejt a beavatkozás következtében elpusztulna. Az apertúra kialakítása mellett a konzolnak egy másik nagyon fontos tulajdonsága a rugóállandója, melynek értéke 0,3 N/m, 1 N/m, 2 N/m vagy 4 N/m lehet. Az atomerőmikroszkóppal végzett mérésekhez hasonlóan a konzol meghajlását lézerfény segítségével lehet detektálni, amely a konzol felfelé néző (aranyréteggel borított, erősen reflektív) felületéről verődik vissza, és jut egy két szegmensből álló pozícióérzékeny detektorba. Méréskor így valójában a konzol meghajlásával arányos feszültségjelet mérünk, melyből a Hooke-törvény segítségével megkaphatjuk a sejt és a konzol között fellépő erőt, amely tipikusan a pN–nN erőtartományban található [4–6].

Alapvetően mind a hagyományos AFM, mind a FluidFM kiválóan alkalmas sejt-sejt vagy sejt-felület kölcsönhatások tanulmányozására. Fontos különbség, hogy AFM-et használva a sejteket kémiailag, irreverzibilisen rögzítik a konzolhoz, ami időigényes folyamat (körülbelül 20–30 perc). Ezzel szemben fluidikai erőmikroszkópot alkalmazva a sejt konzolvéghez rögzítése csak



3. ábra. A FluidFM felépítése: A kép a) részén látható az inverz optikai mikroszkópra ráépített mintatartó, és a fej, amely a vezérlést végzi, míg a kép b) részén látható az adapter, aminek az alján található a rugólapka. A c), d) ábrák az adapter aljának nagyított képét tartalmazzák. Az e) kép az adhéziómérések során használt rugólapka elektronmikroszkópos felvétele [7, 8]

néhány másodpercet vesz igénybe: a nyílás végén a sejtet a kialakított vákuum reverzibilisen rögzíti. Ennek következtében a FluidFM alkalmas nagyszámú sejt vizsgálatára is.

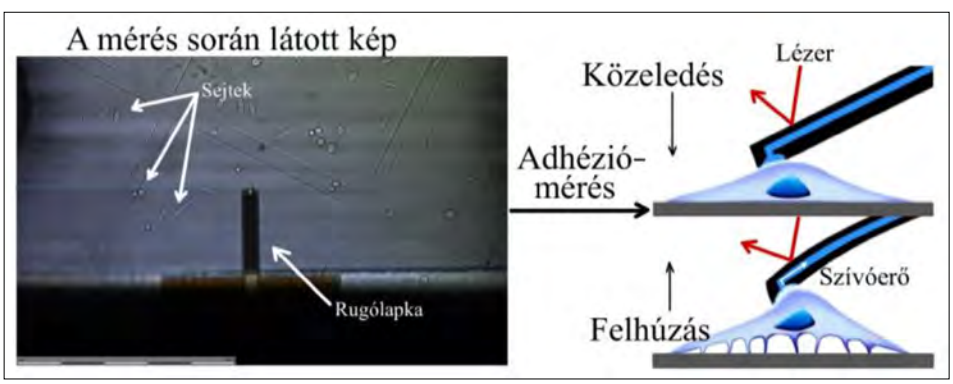
A FluidFM alkalmazási módjai

Egyedi sejtek és mikrogyöngyök felületi adhéziómérése

A sejtadhézió azon folyamat, amely során a sejtek egymással vagy a környezetükkel kölcsönhatnak, így lehetővé téve a kitapadásukat. Mivel a szöveti sejtek 6–8 óránál hosszabb időt letapadás nélkül nem élnek túl, ezen folyamat a sejtek létfenntartásához elengedhetetlen, vizsgálata és megértése pl. újabb rákterápiás módszerek kifejlesztéséhez vezethet. Szerepe emellett jelentős az immunológiai kutatásokban, agykutatásban, illetve az implantátumok fejlesztésében is.

Az adhéziómérés során a sejt konzollal történő megközelítése után a konzol végén található mikrométeres lyukba lényegében azonnal beszívódik a sejt teteje az alkalmazott negatív nyomás következtében. Mindezek után a konzol lassú (1 μm/s) felemelése során, a kitapadt sejt és felület között ébredő erő következtében a konzol meghajlik. Mivel a kísérleteket élő mintákon végezzük, fontos az idő tényező-je – a FluidFM esetén sokkal több sejtet lehet egy adott idő alatt vizsgálni, mint a hagyományos AFM-et alkalmazva. Egy másik előnye a FluidFM-nek, hogy túlnyomást alkalmazva a megfogott sejtet könnyen el tudjuk távolítani a konzolról, és így azt akár más vizsgálatoknak, pl. génszekvenálásnak is alá lehet vetni. Megjegyezzük, hogy a FluidFM-et leszámítva még kevés olyan technika létezik, mellyel teljesen kitapadt sejtek adhéziós erejét tudnánk mérni úgy, hogy a sejt felszakítása nagy erőfelbontás mellett pontosan végigkövethető. Ugyanakkor a FluidFM-nek nagy hátránya, hogy a fluidikai csatornát membrándarabkák, egyéb sejtalkotók vagy nagyobb molekulák eltömíthetik. Szerencsére ezt a problémát mosással és szennyezésgátló bevonatokkal csökkenteni lehet, vagy akár teljesen el is tudjuk kerülni [6].

Tipikus kísérleteinkben célszerű egy olyan adhéziós felületet létrehozni, mely tartalmazza az RGD (arginin- glicin- aszparaginsav) tripeptidszakaszt, melyet felismernek a kötőszövetek sejtjeinek adhéziós receptorai, az integrinek. A sejtek szabályozott és reprodukálható módon le tudnak tapadni ezen felületre [4, 14]. A stabil konzol-sejtfelszín kontaktus kialakulása után a sejtet lassan felhúzza a konzol, így elválasztva azt a felülettől. Eközben a műszer a konzol felszínén található aranyborításról visszaverődő lézerfény segítségével detektálja annak meghajlását, így mérve azt a feszültséget, amelyből később megkaphatjuk a felhúzási folyamat során végzett munkát az *5. ábrán* látható erő-távolság görbe alapján. A mérés során tudjuk változtatni azt a sebességet, amellyel a konzol felemelkedik, amely összefügg a sejt és a felület szétválásának sebességével. Ezenkívül változtatható még a konzolra kapcsolható nyomás nagysága és az időtartam is, amíg a



4. ábra. Az adhéziómérés menete. Bal oldalt a mikroszkóppal rögzített kép látható a sejtekről és a konzolról. A jobb oldali fantáziarajzon a konzol megközelíti a sejtet, majd annak beszívja egy kis darabját, és szép lassan felhúzza a sejtet, leválasztva azt a kitapadási felületről [8]

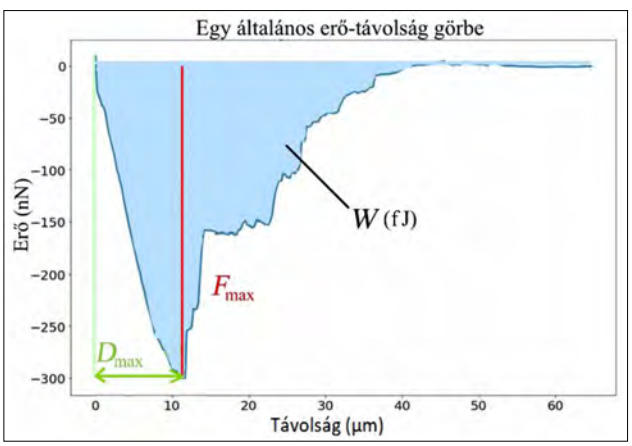
konzol a sejttel kapcsolatot létesít. Így meghatározható, hogy a megfogás előtt (a szívóerő alkalmazása előtt) a konzol a sejthez milyen erővel nyomódik. A legnagyobb mérhető erő értéke meghatározható a következő képlet segítségével:

$$F_{\max} = \pi \cdot r^2 \cdot p, \qquad (1)$$

ahol r az apertúra sugara, és p a mérés során alkalmazott nyomáskülönbség (a beállított és a légköri nyomás közötti különbség) értéke, amely a szívóerőt okozza. A konzol meghajlását a konzol rugóállandójának Sader-módszerrel történő meghatározásával és az inverz optikai érzékenység felhasználásával kalibráljuk erőértékekre [4].

Az élő sejtekkel végzett adhéziómérések során *(4. ábra)* nagyon fontos a megfelelő beállítások használata, mivel a sejtek nagyon érzékenyek a környezet változásaira, és nem megfelelő paraméterek esetén akár szét is szakadhatnak. Ekkor a sejt-felület kapcsolatnak nincs ideje szétválni, és a sejtmembrán fog szétszakadni ott, ahol a sejt az apertúrával érintkezik.

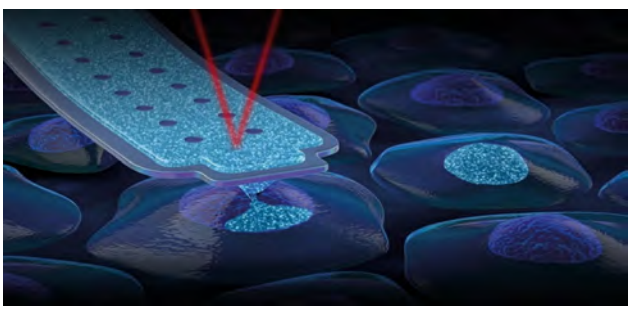
Sejtfelszedés közben meg tudjuk határozni a sejt felületről történő elválasztásához szükséges erő távolságfüggését. A leválási erő ($F_{\max}$) a maximális erőérték, amit a sejt felülettől történő elválasztása során mérni tudunk. A legegyszerűbben úgy tudjuk ezt modellezni, hogy feltesszük, a sejtek adhéziójáért felelős receptorok eloszlása egyenletes a sejt alján található kontaktzónában. A receptor-RGD kötések erőssége és a felhúzási folyamat során végzett munka értéke összefügg, így ezen erőérték alkalmas a sejtek adhéziójának jellemzésére [4, 9]. Kiemelendő, hogy a módszer segítségével nagy áteresztőképességű, közvetett erőmérő módszerek erőkalibrálását is elvégeztük (számítógépvezérelt mikropipetta, egyedi sejtes optikai bioszenzor) [4, 6].



5. ábra. A mérés során rögzített erő-távolság görbe. $F_{\max}$ az adhéziós erő, W a felhúzási folyamat során végzett munka, amit integrálással kapunk, $D_{\max}$ pedig az adhéziós távolság, ami az $F_{\max}$ érték rögzítésekor uralkodó felület-konzol távolság

FluidFM-injektálás és mintavétel egyedi élő sejtből

A FluidFM segítségével nemcsak fel tudunk szedni felületre letapadt sejteket, hanem képesek vagyunk a sejtmembránt átlyukasztva megfelelő erőkontroll mellett, precíz nyomás- és időkontrollt alkalmazva különböző anyagokat a sejtbe juttatni, injektálni a *6. ábrán* látható módon. A mérések során, az adhéziómérésekhez hasonlóan a konzol először megközelíti a sejtet, majd átszúrva a sejtmembránt pozitív nyomást kapcsolunk a mikrofluidikai csatornára egy adott időintervallumon keresztül – ezzel a sejtbe juttatva az előzetesen a konzolba pipettázott anyagot. Az adhéziómérésekkel ellentétben, ahol a konzol nem rendelkezik heggyel, ezen mérések során az apertúra egy piramis alakú hegyben végződik, amelynek az oldalán 600 nm átmérőjű nyílás található. Ezen injektálási eljárás segítségével képesek vagyunk arra, hogy pl. GFP-t (green fluorescent proteint, azaz zölden fluoreszkáló fehérjét) juttassunk a sejtekbe. Ezenkívül lehetőség van még különböző anyagokat közvetlenül a citoplazmába vagy a sejtmagba injektálni, például mRNS-t és plazmidokat, illetve akár CRISPR komplexeket is, a különböző gyógyszerek sejten belüli tesztelésére már nem is beszélve. A FluidFM-mel végzett injektálós méréseknél a sejtek túlélési aránya magas (jellemzően 80% feletti), így lehetőségünk van az injektált anyagok okozta változásokat populációszinten is követni [6, 7].



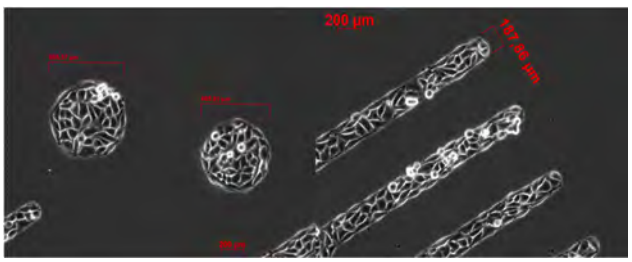
6. ábra. A felületre tapadt élő sejtek és az egyedisejtes injektálás folyamata (fantáziarajz) [7]

A tű segítségével kis térfogatokat is eltávolíthatunk a citoplazmából, illetve a sejtmagból, így szelektív módon végezve a mintavételezést. Tanulmányok azt mutatták, hogy a sejtek akár 4 pl-nyi sejtplazma eltávolítása után is regenerálódnak és életben maradnak. Erre alapozva Julia Vorholt (ETH) és Bart Deplancke (EPFL) csoportja kidolgozták a Live-seq technikát, amelynek segítségével egyedi sejtek transzkriptomjait (a bennük megtalálható RNS-molekulák összességét) szekvenálták FluidFM-es citoplazma-mintavétel (extrakció) segítségével. Fontos megjegyezni, hogy a mintavételt a sejtek túlélték, így lehetőség nyílt az élő sejtek mRNS-állományának valós idejű követésére, merőben új irányokat megnyitva a vonatkozó sejtbiológiai kutatásokban. Ez a példa is mutatja azt, hogy a FluidFM módszerrel nyert sejtkivonatok tovább vizsgálhatók egyéb, például biokémiai vagy tömegspektroszkópiai eljárásokkal [1, 10, 11].

Mikro- és nanostruktúrák nyomtatása FluidFM-mel

A FluidFM-et nemcsak adhéziómérésre és injektálásra, hanem két- és háromdimenziós nyomtatásra is használ-

hatjuk mikro- és nanopipetta típusú konzolok segítségével. Az utóbbi pontosabb nyomtatást tesz lehetővé, mivel kisebb átmérőjű a rajta található apertúra, de mind a kétféle konzol képes különböző mintázatok létrehozására változatos felületeken. A műszer segítségével kis térfogatokat tudunk juttatni száz nanométeres pontossággal az alkalmazandó felületre. Nagy viszkozitású anyagok is alkalmazhatóak, de a legáltalánosabb eljárások során nanorészecskéket vagy RGD tripeptidszakaszt szoktak nyomtatni, és a vizsgálandó sejtek ezen síkbeli formák – vonalak, pontok – mentén tapadnak le, ahogy a *7. ábrán* is látható [7, 8].



7. ábra. Az RGD tripeptidszakasz korong és vonal mintázatokként nyomtatva egy egyébként sejttaszító felületre. A felületi mintára az élő rákos sejtek szelektíven letapadnak [15]

Összefoglalás

Megállapítható, hogy a FluidFM technika új utakat nyitott meg az egyedi sejtszintű mérések és manipulációk terén, különösen a biofizikai alkalmazásokban. A módszer előnyei közé tartozik a nagy pontosságú erőmérés, az élő sejtekbe történő precíz injektálás, valamint a sejtfelszíni adhéziós erők hatékony vizsgálata. Különösen értékes és előremutató fejlesztés a technika robotizált változata, melynek a segítségével gyorsabb, pontosabb és szélesebb körű sejtszintű elemzések végezhetők. Az eljárásban rejlő további lehetőségek, például a génszekvenálás, új irányokat nyithatnak az orvosbiológiai kutatásokban és a személyre szabott gyógyászatban.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-22-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Emellett köszönettel tartozunk *Vörös Jánosnak* és *Derényi Imrének* a hasznos szakmai diszkussziókért és segítségeikért. A munkánkat szintén támogatta az MTA Lendület Programja és a következő NKFIH-pályázatok: TKP2021-EGA-04, ADVANCED 153121 és 2024-1.2.10-TÉT-IPARI-IL-2024-00030.

A kutatás a Kulturális és Innovációs Minisztérium EKÖP-24 kódszámú Egyetemi Kiválósági Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Irodalom

1. Horvath R. (2022): Single-cell temporal transcriptomics from tiny cytoplasmic biopsies. *Cell Rep. Methods.,* 2(10), 100319. https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100319. PMID: 36313799; PMCID: PMC9606287.
2. Efremova M., Vento-Tormo R., Park J. E., Teichmann S. A., James K. R. (2020): Immunology in the era of single-cell technologies. *Annu. Rev. Immunol.,* 38, 727–757. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-090419-020340. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32075461.
3. Ohgushi H., Caplan A. I. (1999): Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res.,* 48(6), 913–927. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(1999)48:6<913::aid-jbm22>3.0.co;2-0. PMID: 10556859.
4. Sztilkovics M., Gerecsei T., Peter B., Saftics A., Kurunczi S., Szekacs I., Szabo B., Horvath R. (2020): Single-cell adhesion force kinetics of cell populations from combined label-free optical biosensor and robotic fluidic force microscopy. *Sci. Rep.,* 10(1), 61. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56898-7. PMID: 31919421; PMCID: PMC6952389.
5. Nagy Á. G., Kámán J., Horváth R., Bonyár A. (2019): Spring constant and sensitivity calibration of FluidFM micropipette cantilevers for force spectroscopy measurements. *Sci. Rep.,* 9(1), 10287. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46691-x. Erratum (2019): *Sci. Rep.,* 9(1), 18009. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54634-9. PMID: 31311966; PMCID: PMC6635487.
6. Tamás Gerecsei, Beatrix Péter, Rita Ungai-Salánki, Sándor Kurunczi, Inna Székács, Bálint Szabó, Robert Horvath (2022): Chapter 1 – Prospects of fluidic force microscopy and related biosensors for medical applications. Pawan Kumar Maurya, Pranjal Chandra (eds.) In: Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Nanobioanalytical Approaches to Medical Diagnostics, Woodhead Publishing, pp. 1–28. ISBN 9780323851473, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85147-3.00014-1
7. (2023): https://www.cytosurge.com
8. Ágoston G. Nagy (2022): *In vitro* living cell studies on high-throughput nanofluidic force microscope and phase holographic imaging. Doctoral thesis.
9. Taubenberger A. V., Hutmacher D. W., Muller D. J. (2014): Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials. *Tissue Eng. Part. B Rev.,* 20(1), 40–55. https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2013.0125. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23688177.
10. Tang L. (2022): Sequencing single cells without killing. *Nat. Methods.,* 19(10), 1166. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01648-3. PMID: 36198838.
11. Chen W., Guillaume-Gentil O., Rainer P. Y., Gäbelein C. G., Saelens W., Gardeux V., Klaeger A., Dainese R., Zachara M., Zambelli T., Vorholt J. A., Deplancke B. (2022): Live-seq enables temporal transcriptomic recording of single cells. *Nature*, 608(7924), 733–740. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05046-9. Epub 2022 Aug 17. PMID: 35978187; PMCID: PMC9402441.
12. (2024): https://nanobiosensorics.com/research/singlecell
13. (2024): https://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=2083
14. Orgovan N., Peter B., Bősze S., Ramsden J. J., Szabó B., Horvath R. (2014): Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor. *Sci. Rep.,* 4, 4034. https://doi.org/10.1038/srep04034. PMID: 24503534; PMCID: PMC3916899.
15. Saftics A., Türk B., Sulyok A., Nagy N., Gerecsei T., Szekacs I., Kurunczi S., Horvath R. (2019): Biomimetic dextran-based hydrogel layers for cell micropatterning over large areas using the FluidFM BOT technology. *Langmuir.,* 35(6), 2412–2421. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03249. Epub 2019 Feb 1. PMID: 30653328.
16. Nagy Á. G., Kámán J., Horváth R., Bonyár A. (2019): Spring constant and sensitivity calibration of FluidFM micropipette cantilevers for force spectroscopy measurements. *Sci. Rep.,* 9(1), 10287. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46691-x. Erratum (2019): *Sci. Rep.,* 9(1), 18009. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54634-9. PMID: 31311966; PMCID: PMC6635487.

SEJTMÉRETŰ SZERSZÁMOK: BIOFIZIKAI KUTATÁSOK POLIMER MIKROESZKÖZÖKKEL

Kelemen Lóránd
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged
E-mail: kelemen.lorand@brc.hu

Sejtek tanulmányozása mikroeszközökkel

A mikrovilágban zajló folyamatokat, jelenségeket kezdetben makroszkopikus eszközökkel tanulmányozták. Az ebbe a mérettartományba eső készülékek elsősorban megfigyelni képesek, legismertebb képviselőjük a mikroszkóp. Léteznek olyan, általában mikroszkóphoz kapcsolódó berendezések is, amelyek nemcsak a megfigyelést teszik lehetővé, hanem precíziósan kölcsön is tudnak hatni megfigyelésük mikroméretű tárgyával. Ilyenek az egyetlen sejten lokálisan ionáramokat mérni képes mikropipetták (patch-clamp), amelyek esetében felülről nyitott mintatérre van szükség ahhoz, hogy hozzá lehessen férni a sejtekhez. Az atomerő-mikroszkópot (AFM) is hasonlóan kell alkalmazni, és vele többek között a sejtek rugalmasságát vagy a sejtfelszíni molekulákra jellemző adhéziós erőket lehet mérni [1]. Az AFM-mel azonban már egy mérettartománnyal lejjebb biológiai makromolekulák (fehérje, DNS) jellemzése, feltekeredésük vagy más fehérjékhez való kapcsolódásuk erősségének tanulmányozása is lehetséges [2]. A makroszkopikus eszközök használatának azonban korlátai is vannak, és így felmerült az igény a mikrométeres mérettartományba eső összetett szerkezetek létrehozására. Már a kétezres évek elején megkezdődtek az ilyen irányú kutatások: Edwin Jäger és munkatársai egyedi sejteket mozgatni képes mikrorobotokat fejlesztettek vezető polimer felhasználásával [3]. A feszültség alá helyezett polimer és fém kettős rétegekből álló, 670 µm hosszú eszköz kontrollált módon képes volt megragadni és áthelyezni egy 100 µm-es tesztgolyócskát. Ez azonban még mindig nyitott mintateret és külső vezetékes táplálást kívánt. Mivel vannak olyan esetek, ahol a minta vagy a mérési körülmények ezt nem teszik lehetővé, szükséges volt kifejleszteni külső fizikai kontaktus nélkül manipulálható önálló mikroeszközöket.

Az ilyen típusú mikroeszközöket számos szempont szerint lehet csoportosítani, például a felhasznált anyagok szerint [4], az alapján, hogy helyhez kötöttek vagy mozgathatók-e [5], de aszerint is, hogy merevek-e vagy alakváltoztatók [6]. Mikrofluidikai rendszerbe integrált, fix helyzetű és merev eszközökre példák a méretszelektív szűrők [7] vagy a sejtek mozgásának tanulmányozásához készített gátrendszerek [5]. Ha olyan mozgatható mikroeszközt készítünk, amit mágneses térrel akarunk meghajtani, akkor a felhasznált anyagot ennek megfelelően kell kiválasztani: a ferromágneses mikroeszközöket változó mágneses térbe helyezve például alakjuk megváltozása [8] révén lehet mozgatni. A HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofotonikai és Biomikrofluidikai Kutatócsoportjában az elmúlt két évtizedben polimer anyagú mikroeszközök széles skáláját fejlesztettük, melyek között találhatók helyhez kötöttek és mozgathatók, bevonat nélküliek és funkcionális felületbevonással készültek, valamint merevek és alakváltoztatók is. A szerkezeteket elsősorban fizikai és biológiai jelenségek vizsgálatához alkalmaztuk.

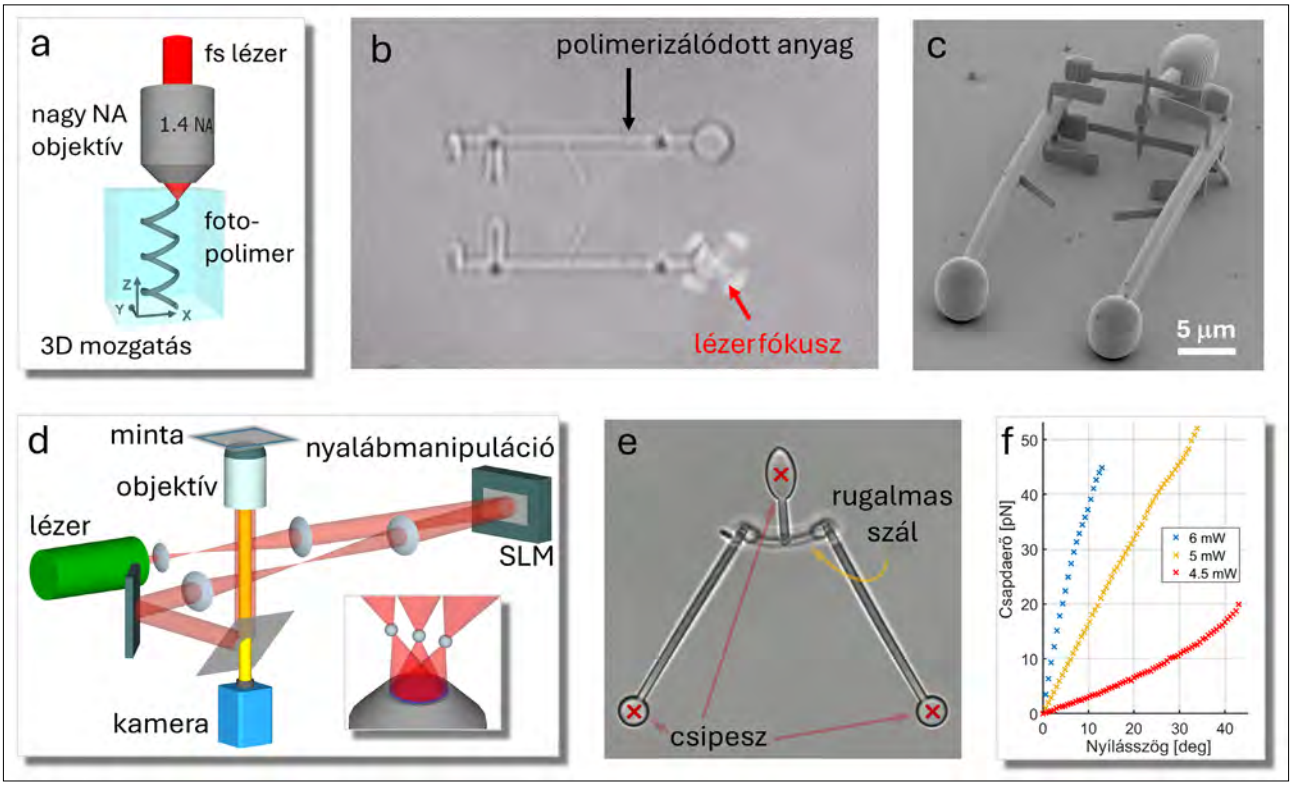
Mikroeszközök előállítása

Mikroszkopikus eszközök előállításához számos technológia használható, amelyek között a választást a szerkezet anyaga (fém, polimer, biológiai anyag), mérete (szub-mikrométertől a milliméterig), és összetettsége (2D, 3D) határozza meg. Alkalmazhatók a mikroelektronikai gyártásból ismert maszklitográfiás eljárások, amelyek egy lépésben 2D mintázatot hoznak létre, így ha összetettebb szerkezetet szeretnénk készíteni, több lépésre van szükség. Elterjedtek a direkt íráson alapuló módszerek is, melyek során az anyagnak valamilyen fókuszált nyalábbal (elektromágneses sugárzás, elektron, ionizált anyag) való kölcsönhatása alakítja ki a szerkezetet. Ezekkel akár egyetlen lépésben is kialakíthatók 3D szerkezetek. Laboratóriumunkban egy additív direkt írásos eljárást, a kétfotonos polimerizációt (two-photon polymerization, TPP, *1a. ábra*) használjuk 3D mikroszerkezetek előállítására [9].

A TPP során egy ultrarövid impulzusú, közeli infravörös hullámhosszú (kb. 800 nm) lézer nyalábját fókuszáljuk bele egy olyan, fényre polimerizálódó anyagba, melynek lineáris abszorpciója az UV-tartományban van. Az ultrarövid impulzusoknak köszönhetően azonban, a kétfoton-mikroszkóphoz hasonlóan, a polimer iniciátora a fényt a fókuszban kétfotonos abszorpcióval el tudja nyelni, és így ott megindulhat a polimerizáció. Ekkor, ha a fókuszt a polimerben három dimenzióban pásztázzuk, egyetlen



Kelemen Lóránd a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai intézetének tudományos főmunkatársa, a Biofotonikai és Biomikrofluidikai Kutatócsoport tagja. Fizikusi diplomáját a József Attila Tudományegyetemen (a Szegedi Tudományegyetem elődje) szerezte, PhD-fokozatát pedig a Szegedi Tudományegyetemen. Kutatási területe a polimer mikroeszközök fejlesztése és alkalmazása elsősorban biológiai kutatási témákban.



1. ábra. Mikroeszközök készítése és mozgatása. A TPP sematikus ábrázolása (a), ennek folyamata a mikroszkópban lézeres pásztázás közben (b), és egy elkészült mikroszerkezet elektronmikroszkópos képe (c). A szerkezetek mozgatásához használt holografikus csipeszrendszer optikai elrendezése (d) és egy rugalmas szállal készített deformálható mikroszerkezet optikai csipesszel szétnyitott állapotban (e). A piros keresztek az optikai csipesz fókuszainak helyét jelölik. Az (e) panelen látható szerkezet szétnyitásához szükséges optikai erő a nyílásszög függvényében (f), különböző teljesítménnyel polimerizált rugalmas szálak esetében

levilágítási lépésben összetett 3D alakzatok állíthatók elő *(1b. ábra)*. A módszerrel 100 nm körüli részletekkel alakíthatók ki akár száz mikrométeres struktúrák is *(1c. ábra)*.

Ezzel a módszerrel többféle polimertípusból – epoxy, akril vagy szerves és szervetlen kompozitalapúból – lehet szerkezeteket készíteni. Megfelelő fényérzékeny iniciátor segítségével akár fehérjékből is állíthatók elő szerkezetek. Zselatinból olyan eszközt készítettek, mely segíti a gyógyszerhatóanyag megfelelő helyre juttatását a szervezetben, majd később lebomlik [10]. Az elkészült szerkezetek alkalmazhatóságát valamilyen funkcionális réteggel, pl. fehérjékkel vagy fém nanorészecskékkel történő bevonással jelentősen ki lehet terjeszteni. Az utóbbi évek fejlesztése révén kutatócsoportunknak sikerült olyan merev és deformálható szerkezeteket polimerizálni, amelyekkel egyedi sejteket tudunk precízen megragadni és mozgatni. Ebben kulcsszerepet játszik az eszközök mozgatását is lehetővé tévő optikai csipesz.

Mikroeszközök mozgatása

A polimer mikroeszközök széles családját alkotják azok, amelyeket működésükhöz mozgatni kell. Vannak köztük olyanok, melyeknek csak az alakja változtatható, és vannak olyanok, melyek az alkalmazás helyén el is mozdulnak. Az előbbire példa a korábban említett elektródokon keresztül kívülről vezérelt mikrorobot [3]. A nem helyhez kötött eszközök mozgatása ennél annyival nehezebb feladat, hogy nem lehet őket külső „huzalozás” segítségével meghajtani. Ezekben az esetekben szóba kerülhet mágneses tér használata, a dielektroforetikus, vagy az optotermikus jelenségek kihasználása, akár ezek kombinációja: Jin Qianru és munkatársai a szerkezet helyét mágneses tér segítségével, alakját pedig a hőmérséklet kontrollálásával változtatták [11].

A mikroeszközöket fény segítségével is hatékonyan lehet mozgatni. Bár erre a fény-anyag kölcsönhatás többféle módját is felhasználták, a legtöbb módszer a fény törése vagy visszaverődése miatt bekövetkező impulzusváltozáson alapszik [12, 13]. Ezek között is kiemelkedő az optikai vagy lézercsipesz, amely az elmúlt három évtizedben a biofizikai kutatások egyik legfontosabb eszközévé vált. Az optikai csipesz működésének lényege, hogy a térben a fény segítségével két vagy három dimenzióban rögzíteni lehet olyan, néhány mikrométeres tárgyak pozícióját, melyek a csipeszt alkotó lézer hullámhosszán nem nyelnek el, törésmutatójuk pedig nagyobb, mint az őket körülvevő közegé. A jelenség magyarázatának kiterjedt irodalma van [14, 15], és röviden úgy lehet összefoglalni, hogy a csapdázott testen megtörő fénynek megváltozik az impulzusa, és ez az impulzusváltozás Newton III. törvénye miatt egy, a testre kifejtett erőhatást eredményez. Bár az optikai csipesznek számos megvalósítási módja lehetséges, a legelterjedtebb egyetlen, nagy

numerikus apertúrájú mikroszkópobjektívvel fókuszált lézernyalábot alkalmaz [16, 17]. Ebben az esetben a fókuszban csapdázott testre az onnan bármilyen irányban történő kitérítés esetén a kitéréssel arányos visszatérítő erő hat. Az optikai csipesz azért igen alkalmas biofizikai mérésekre, mert vele a sejtek, molekulák esetében jelentős pikonewtonos vagy akár az alatti erők, valamint nanométeres elmozdulások is mérhetők és előidézhetők.

A TPP-vel készített mikroeszközök és az optikai csipesz kombinálása ígéretes új vizsgálati módszereket adott a kutatók kezébe [18–20]. Az összetett mikroeszközök mozgatását a holografikus optikai csipesz (holographic optical tweezers, HOT, *1d. ábra*) tette lehetővé, mellyel a csapdázó fókuszok megtöbbszörözhetők (*1d. ábra,* kis kép), és ezek a fókuszpontok bármely dimenzió mentén, egymástól akár függetlenül is, elmozdíthatók. A HOT kulcs eleme egy térbeli fázismodulátornak nevezett eszköz (spatial light modulator, SLM), ami a csapdázó lézer eredeti nyalábjának síkhullám fázisfrontját tetszőlegesen tudja modulálni: optikai rácsnak megfelelő fázistolás-mintázattal a nyalábokat meg tudja többszörözni és el tudja téríteni, lencsének megfelelővel pedig a divergenciáját tudja módosítani. Ennek a két hatásnak köszönhetően lehet a mintatérben a csapdázó fókuszokat laterálisan (a ráccsal) és axiálisan (a lencsével) mozgatni. A fókuszok néhány nanométeres pontosságú mozgatását pedig a csapdázott test követi, így lehetővé válik annak hat szabadsági fokú mozgatása (transzláció és forgatás).

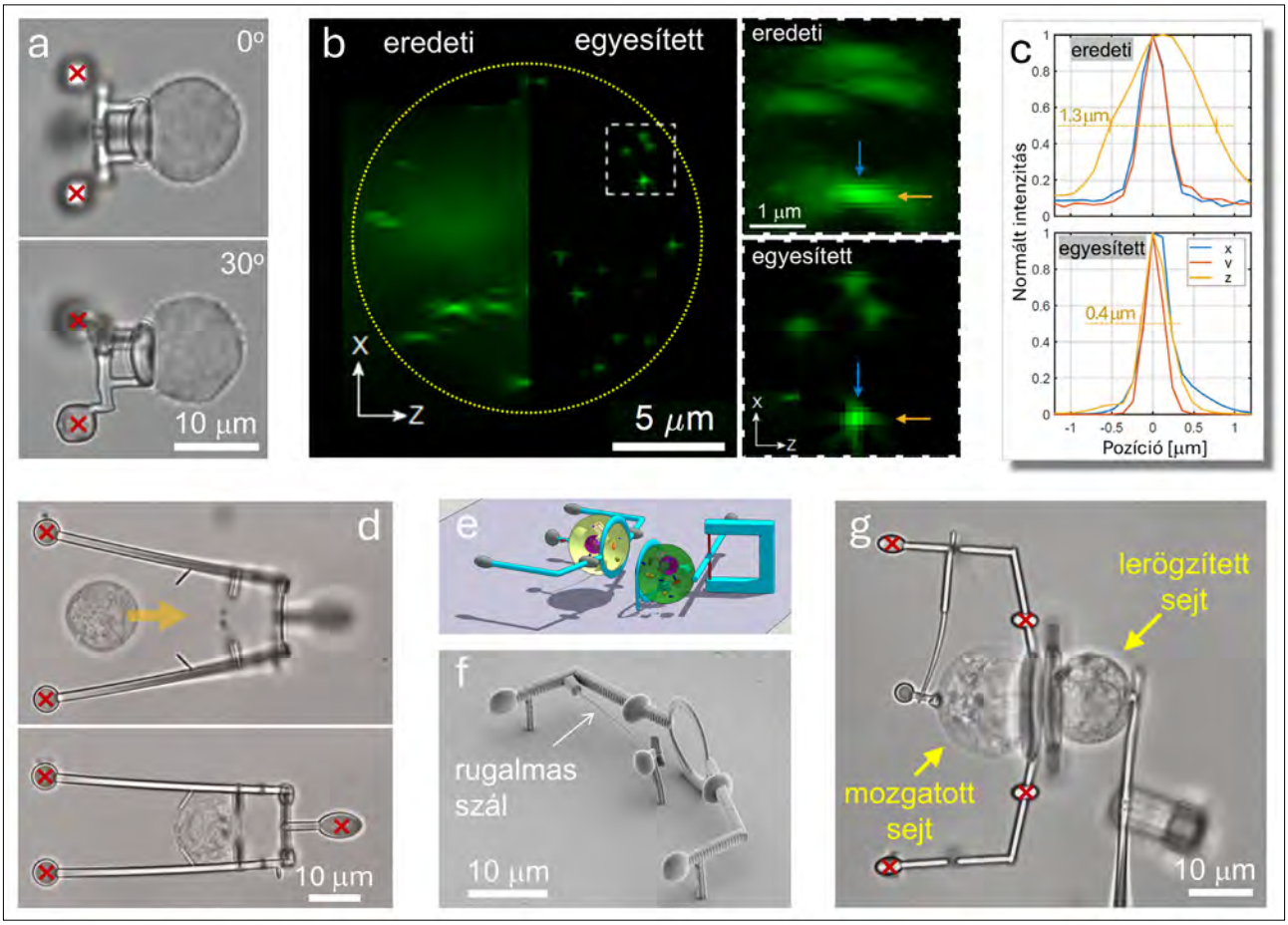
Egyedi sejtek jellemzése lézercsipesszel mozgatott mikroeszközökkel

Egyedi sejtek vizsgálatához a polimerizált és optikai csipesszel mozgatott mikroeszközök elsősorban méretük miatt, másodsorban pedig tetszés szerinti kialakításuk miatt alkalmasak. Készíthető olyan mikroeszköz, amely az egyedi sejteket csak letapogatja [21], és olyan is, amely az egyedi sejteket mozgatni képes, például úgy, hogy azokat megragadja [19]. Kutatócsoportunk ebben a témában ért el kimagasló eredményeket egy olyan módszer kidolgozásával, mely az egyedi, nem letapadó sejtek komplex mikroeszközökkel való indirekt optikai manipulációját teszi lehetővé [20, 22]. A sejtek mikroeszközökkel való mozgatásához sokszor azokat egymáshoz kell tapasztani, ami biokémiai módszerekkel pl. streptavidin-biotin kapcsolódás segítségével lehetséges [22]. Vannak olyan esetek, amikor elkerülhető a sejtek kezelése: sejtfelszíni glikoproteinekben gazdag emlőssejtek manipulációjakor elegendő csak a szerkezeteket bevonni konkanavalin A fehérjével, amely a sejtek felszínén található cukrokhoz kötődik. Miután a sejt szorosan hozzátapadt a mikroszerkezethez, nagy pontossággal követi annak mozgását. A sejt direkt csapdázásával szemben ennek az indirekt módszernek két fő előnye van. Egyrészt ekkor nem a sejtet világítja meg a nagy intenzitású csapdázó lézer, másrészt a nagyobb törésmutatójú mikroeszköz csapdázásán keresztül ($n_{\text{sejt}} \approx 1{,}38$, $n_{\text{eszköz}} = 1{,}55–1{,}6$) stabilabban lehet a sejtet tartani.

A mikroeszközök egyik lehetséges alkalmazási területe az egyedi sejtek 3D mikroszkópos leképezésének javítása. Ezt egy már létező leképezési módszer továbbfejlesztésén alapuló, indirekt optikai manipulációval megvalósított, hat szabadsági fokú sejtmozgatással sikerült elérnünk a közelmúltban [20]. Az optikai mikroszkópok felbontása az optikai tengely irányában 3–5-ször rosszabb, mint a laterális irányban. Emiatt egy fluoreszcens 3D felvétel esetében a leképezett objektumok (pl. sejtalkotók) képei az optikai tengely irányában megnyúlnak *(2b. ábra)*. Az izotrop felbontás eléréséhez több módszert dolgoztak ki az elmúlt évtizedekben, egyik ilyen a többnézetű mikroszkópia. Ennek során a leképezendő tárgyról több irányból készítenek 3D felvételeket, melyeket aztán számítógép segítségével egyesítenek. A folyamat egyik kritikus lépése a több irányú felvételek elkészítéséhez szükséges pontos mintaforgatás a mikroszkóp objektíve előtt. Ez egyedi sejt esetében nem könnyű, mivel vagy a teljes mintát kell forgatni, vagy egy statikus mintában az egyes sejtet. Mi ez utóbbit valósítottuk meg a vizsgálandó sejtnek egy speciális alakú mikroeszközhöz való tapasztásával, illetve optikai csipesszel történő forgatásával és transzlációjával. Módszerünknek a többnézetű mikroszkópiás eljárások között az ad különös jelentőséget, hogy ezzel egy zárt, statikus mintában tudtunk egy tetszőleges sejtről tetszőleges irányból képsorozatot készíteni úgy, hogy a sejtet nagy pontossággal mozgattuk előre meghatározott pozíciókba.

A sejtforgatáshoz használt polimerizált mikroeszköz egy, a sejt sugarához hasonló görbületi sugarú homorú felületből állt, ahova a sejt kitapadt, illetve három gömbből, amelyeken keresztül az optikai csipesz meg tudta azt fogni. A szerkezetet konkanavalin A fehérjével vontuk be, amihez a hozzányomott sejt kb. 10 s alatt hozzátapadt. A mikroeszköz-sejt párost a csipesszel kb. 100–150 nm-es fluktuációval lehetett egy helyben tartani, ami kisebb, mint a mikroszkóp felbontóképessége, így csak csekély mértékben torzítja a leképezést. Továbbá lehetséges volt térben tetszőlegesen eltolni, illetve bármely irányba elforgatni a sejtet *(2a. ábra)*. A leképezés javításának ellenőrzéséhez a sejteket a mikroszkóp laterális felbontóképességénél kisebb, 100 nm-es fluoreszcens gömbökkel jelöltük meg, és a cél az volt, hogy ezek képe minél inkább gömbszerű legyen.

A mérés során csak a szerkezet-sejt párost mozgattuk a csipesszel. A mintában a mozdulatlan objektív egyetlen síkot képezett le élesen, aminek a mélységélessége 1 μm körül volt. A fluoreszcensen jelölt sejtet ezen a síkon át mozgattuk a csipesszel 250 nm-es lépésekben, és minden lépés után egy felvételt készítettünk róla. Miután a teljes sejt átvonult a leképezés síkján, visszamozgattuk a kiindulás helyére, majd a csipesszel egy adott szöggel elforgattuk egy, az optikai tengelyre merőleges tengely körül. Ezután megismételtük az egész folyamatot. Összesen 9 orientációban készítettünk felvételeket a sejtről a 0–180 fok tartományban. Az így elkészült 3D felvételeken először dekonvolúcióval eltávolítottuk a fókuszon kívüli



2. ábra. Mikroszerkezetek alkalmazásai egyedi sejtek vizsgálatában. Mikroszerkezethez konkanavalin A fehérjével hozzátapasztott, K562 típusú sejt optikai csipesszel két különböző irányban tartva többnézetű mikroszkópiás megfigyeléshez (a). A piros keresztek az optikai csipesz fókuszainak helyét jelölik. Egy optikai csipesszel tartott, fluoreszcens nanogömbökkel jelölt sejt fluoreszcens mikroszkópos képeinek montázsa (b). A nagy kép bal oldala mutatja a nanogömböknek az eredeti felvételeken látható megnyúlt alakját, míg a jobb oldala az egyesített felvételeket a megnyúlás megszüntetésével. A kis képeken a szaggatott vonallal bekeretezett területen lévő nanogömbök felnagyított képei láthatók. A (b) panel kis képei a színes nyilakkal jelölt irányban a nanogömbön megfigyelt fluoreszcenciaintenzitások összehasonlítását mutatják az eredeti és az egyesített felvételeken (c). Jól látható az optikaitengely-irányú megnyúlás csökkenése (narancssárga görbék). Egy K562 sejt befogása rugalmas mikroeszközzel (d). A sejt-sejt kölcsönhatás megvalósításához használt elrendezés vázlatos képe (e) és az egyik, ehhez használt mikroeszköz elektronmikroszkópos képe (f). A sejt-sejt kölcsönhatás optikai mikroszkópos képe (g)

fluoreszcens jelet, majd egy matematikai algoritmussal az egyes felvételeket forgatással pontosan azonos irányba orientáltuk az egymásnak megfelelő fluoreszcens gömbök képeinek fedésbe hozásával. Az utolsó lépés az egyes orientációkban felvett és egymáshoz forgatott felvételek egyesítése volt, ami egy Fourier-transzformáción alapuló eljárással történt. A folyamat végén egyetlen 3D felvételt kaptunk, amiben a fluoreszcens gömbök képeinek eredeti, optikaitengely-irányú megnyúlása gyakorlatilag eltűnt *(2b., 2c. ábra).* A fluoreszcens gömbökkel kidolgozott eljárást olyan sejtre is elvégeztük, melyben egy adott típusú sejtorganellumok, a mitokondriumok voltak fluoreszcensen megjelölve. Ebben az esetben szintén el tudtuk tüntetni a mitokondriumok képeinek optikaitengely-irányú megnyúlását.

Kutatásaink legújabb eredményeit a polimer mikroszerkezeteknek egy új, innovatív családja reprezentálja. Ezek optikai csipesszel deformálható mikroszerkezetek, melyek különösen jól használhatók egyedi sejtek indirekt optikai manipulációjához [23]. Legnagyobb előnyük, hogy használatukhoz a felületkezelések teljesen elhagyhatók, mivel a sejteket a mikroeszközök rugalmassága segítségével, a makroszkopikus laborcsipeszhez hasonlóan lehet a szerkezetekhez rögzíteni. Mivel nem tapadnak a szerkezetekhez, a sejteket bármikor el lehet engedni. A mikroeszközök deformálhatóságának kulcsai a néhány száz nanométeres keresztmetszetűre polimerizált nanoszálak *(1e. ábra)*. A polimerizációs paraméterek (lézerteljesítmény és pásztázási sebesség) viszonylag széles tartományában lehet a nanoszálak rugalmasságát hangolni *(1f. ábra),* hogy elég szilárdak legyenek a szerkezet egyben tartásához, de elegendően lágyak, hogy az optikai csipeszünk által kifejthető kb. 70 pN erővel még deformálhatók legyenek.

A rugalmasság helyes beállítása után több kísérlettel is megmutattuk a deformálható szerkezetek sokoldalú alkalmazhatóságát. A legegyszerűbb alkalmazásban egy sejtszuszpenzióban egyedi, kiválasztott sejteket fogtunk meg a mikroeszközökkel, majd egy külön erre a célra készített tartályba összegyűjtöttük őket. Ez a rugalmas szerkezet a

kiválasztott sejtet két félgömbbel közrefogja anélkül, hogy azt megnyomná, az optikai csipesszel mozgatva elszállítja, majd a célterületen kinyitva elengedi. A szerkezettel 300 μm/s sebességgel lehet haladni vizes közegben, és pár perc alatt kb. egy tucat sejt gyűjthető össze. A második alkalmazás a sejtek mikroszkópos leképezésében segít. Ezt azzal éri el az eszköz, hogy az előzővel ellentétben szorosan megragadja a sejtet *(2d. ábra),* és minimális, kb. 120 nm félérték-szélességű fluktuációval tartja egy helyben; ezenkívül tetszőleges irányba el is tudja azt forgatni. Ezzel az eszközzel sikeresen demonstráltuk a korábban bemutatott többnézetű mikroszkópiás képalkotás felbontásjavító hatását.

A harmadik eszközt sejt-sejt kölcsönhatások megvalósításához fejlesztettük ki. A módszerrel térben és időben jól kontrollált módon lehet a kölcsönhatást előidézni. Az eljárás során a sejtek mindenkori távolsága, illetve a kölcsönhatás kezdete is pontosan definiált – szemben azzal az esettel, amikor a kétféle sejtet egy oldatban egyszerűen összekeverik és a már kialakult sejtkapcsolódásokat vizsgálják. A módszerhez egy eszközpár szükséges *(2e., 2f. ábra),* aminek az egyik tagjával a kiválasztott sejtet rögzítjük a mintatér aljához, a másikkal pedig meg tudunk ragadni egy másik sejtet, és azt az optikai csipesszel mozgatva a rögzített sejthez tudjuk érinteni. A sejtekkel laterális *(2g. ábra)* és axiális irányból is meg lehet egymást közelíteni, eltérő típusú eszközpárt használva. A két irányú megközelítés lehetőséget ad arra, hogy a sejtek közötti kölcsönhatást különböző irányokból is megfigyelhessük. A laterális megközelítéssel a közös felületük síkjának irányából láthatunk morfológiai változásokat (pl. sejtek közötti fonalak létrejöttét), míg az axiális megközelítéssel a közös felszín normálisának irányából a kölcsönhatásban fontos szerepet játszó sejtfelszíni fehérjék feldúsulása lesz megfigyelhető. Mindkét esetre igaz, hogy pontosan ismerjük a sejtek érintkezésének idejét, és így a megfigyelt folyamatok pontos időbeli lefutása megismerhető. A laterális megközelítés további előnye, hogy amennyiben a sejtek egymáshoz tapadnak, de azokat az optikai csipesszel szét lehet választani, az ehhez szükséges erőt meg lehet mérni, ami szintén fontos jellemzője lehet a kölcsönhatásnak.

Összefoglalva elmondható, hogy a feladatspecifikusan tervezett, optikai csipesszel mozgatható polimer mikroeszközök olyan, az egyedi sejtek biofizikai vizsgálatához használható új módszereket vezethetnek be, melyek segítségével korábban nehezen vagy egyáltalán nem kivitelezhető méréseket lehet megvalósítani.

Irodalom

1. Varga B., et al. (2018): De-adhesion dynamics of melanoma cells from brain endothelial layer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects,* 1862(3), 745–751.
2. Beckwitt E. C., Kong M., Van Houten B. (2018): Studying protein-DNA interactions using atomic force microscopy. *Seminars in Cell & Developmental Biology,* 73, 220–230.
3. Jager E. W. H., Inganäs O., Lundström I. (2000): Microrobots for micrometer-size objects in aqueous media: Potential tools for single-cell manipulation. *Science,* 288(5475), 2335–2338.
4. Ji Q., et al. (2021): 4D thermomechanical metamaterials for soft microrobotics. *Communications Materials,* 2(1), 93.
5. Sima F., et al. (2018): 3D biomimetic chips for cancer cell migration in nanometer-sized spaces using "Ship-in-a-Bottle" femtosecond laser processing. *ACS Applied Bio Materials,* 1(5), 1667–1676.
6. Malachowski K., et al. (2014): Self-Folding Single Cell Grippers. *Nano Letters,* 14(7), 4164–4170.
7. Buchroithner B., et al. (2021): Dual channel microfluidics for mimicking the blood–brain barrier. *ACS Nano,* 15(2), 2984–2993.
8. Jang B., et al. (2015): Undulatory locomotion of magnetic multilink nanoswimmers. *Nano Letters,* 15(7), 4829–4833.
9. Kawata S., et al. (2001): Finer features for functional microdevices – Micromachines can be created with higher resolution using two-photon absorption. *Nature,* 412(6848), 697–698.
10. Ceylan H., et al. (2019): 3D-printed biodegradable microswimmer for theranostic cargo delivery and release. *ACS Nano,* 13(3), 3353–3362.
11. Jin Q., et al. (2020): Untethered single cell grippers for active biopsy. *Nano Letters,* 20(7), 5383–5390.
12. Búzás A., et al. (2012): Light sailboats: Laser driven autonomous microrobots. *Applied Physics Letters,* 101(4), 041111.
13. Oroszi L., et al. (2015): Dimensionality constraints of light-induced rotation. *Applied Physics Letters,* 107(20), 204106.
14. Ashkin A. (1992): Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal,* 61(2), 569–582.
15. Neuman K. C., Block S. M. (2004): Optical trapping. *Review of Scientific Instruments,* 75(9), 2787–2809.
16. Galajda P., Ormos P. (2001): Complex micromachines produced and driven by light. *Applied Physics Letters,* 78(2), 249–251.
17. Kellermayer M. S. Z., et al. (1997): Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science,* 276(5315), 1112–116.
18. Fekete T., et al. (2021): Optically manipulated microtools to measure adhesion of the nanoparticle-targeting ligand glutathione to brain endothelial cells. *ACS Applied Materials & Interfaces,* 13(33), 39018–39029.
19. Shishkin I., et al. (2020): Auxiliary optomechanical tools for 3d cell manipulation. *Micromachines,* 11(1), 90.
20. Vizsnyiczai G., et al. (2020): Multiview microscopy of single cells through microstructure-based indirect optical manipulation. *Biomedical Optics Express,* 11(2), 945–962.
21. Grexa I., et al. (2020): Single-cell elasticity measurement with an optically actuated microrobot. *Micromachines,* 11(9), 882.
22. Aekbote B. L., et al. (2016): Surface-modified complex SU-8 microstructures for indirect optical manipulation of single cells. *Biomedical Optics Express,* 7(1), 45–56.
23. Iványi G. T., et al. (2024): Optically actuated soft microrobot family for single-cell manipulation. *Advanced Materials,* 36(32), 2401115.

1%

A FIZIKA BARÁTAI

Legyen Ön is A FIZIKA BARÁTJA,
támogassa adója 1%-ával az Eötvös Loránd Fizikai Társulatot
mint kiemelt közhasznú szervezetet.
Adószámunk: 19815644-2-43

1%

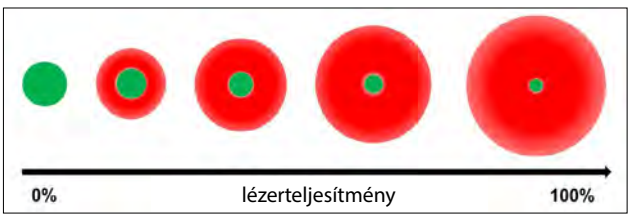
MINFLUX MIKROSZKÓPIA: A SZUPERFELBONTÁSÚ MIKROSZKÓPIA (NANOSZKÓPIA) FIZIKAI HATÁRÁNAK FESZEGETÉSE

Török György[@], Kellermayer Miklós
Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Budapest
[@]E-mail: torok.gyorgy@semmelweis.hu

A mikroszkópia történetében a legnagyobb kihívás mindig is a fény diffrakciója miatti, kb. 200 nm-es (síkbeli) feloldási határ (Abbe-féle határ) felülmúlása volt. A 21. század elején megjelent technikák, mint a stimulált emisszióval történő kioltás (STED) [1], az egymolekuláris lokalizációs mikroszkópia (SMLM, pl. PALM/STORM) [2, 3], valamint a strukturált megvilágítást alkalmazó módszerek (SIM, SSIM) [4, 5] forradalmasították a mikroszkópiát, létrehozva a szuperfelbontású mikroszkópia, vagy másnéven a nanoszkópia területét.

Ezen mikroszkópiák alkalmazásával a fundamentális határ sikeresen meghaladható, és módszertől függően 20–80 nm feloldási határ érhető el. Azonban ezen felül a feloldás további javítása már újabb korlátokba ütközik. A STED esetében a kioltási hatékonyság és a fluoreszcens jelölőkben, valamint a mintákban a nagy fényterhelés miatt fellépő fotokárosítás a legfontosabb tényezők. Az SMLM-ben pedig a lokalizációs pontosság növeléséhez a fotonok számának növelése és a zaj csökkentése együttesen szükséges, ami a képalkotási sebesség rovására megy. A MINFLUX (Minimal Photon Flux) [6] ezen korlátok áttörésére született meg, egyesítve az előző technikák előnyeit – a hátrányaik nélkül!

A hagyományos, jó felbontású fénymikroszkópoknál az alap, hogy megvilágítjuk (gerjesztjük) a mintát, és a visszaérkező fluoreszcens fényt detektáljuk. A MINFLUX a fluorofórok gerjesztésénél azonban alapvetően eltér a megszokott sémáktól. Míg a hagyományos konfokális vagy STED mikroszkópia a molekula „bekapcsolására”, az SMLM pedig a lehető legtöbb foton gyűjtésére törekszik a pontos lokalizáció érdekében, addig a MINFLUX célja a fluoreszcens fotonok számának aktív csökkentésére fókuszál a lokalizációs folyamat során. A STED mikroszkópiából már ismerős lehet a fánknak becézett speciális intenzitáseloszlás *(1. ábra)*. Ez egy olyan formált fénynyaláb, amelynek középpontjában az intenzitás nulla, míg attól radiálisan távolodva meredeken, de ismert matematikai függvény szerint (közelítőleg Gauss-görbe szerint) növekszik az intenzitás. Míg a STED mikroszkópia esetén a fánk a fluoreszcencia stimulált emisszión alapuló kioltására szolgál, addig a MINFLUX esetében egy szellemes csavarral a gerjesztésre használják.



1. ábra. A fánk alakjának és a közepén lévő nullintenzitású régió méretének alakulása a lézerteljesítmény függvényében. A zöld jelölés a nullintenzitású régió könnyebb érzékelésére szolgál. A STED mikroszkópia esetében a piros területeken kioltjuk a fluoreszcenciát és a zöld terület az effektív fluoreszcens területnek felel meg, ahonnan a fotonokat gyűjtjük. A MINFLUX esetében éppen az ellenkezőre törekszünk, és a fluoreszcens jelölőnket pontosan a nullintenzitású régióban szeretnénk tudni

A MINFLUX mikroszkópia alapvetően a pásztázó konfokális mikroszkópián alapul, ezért lehetőség van hagyományos konfokális képalkotásra is, amely biztosítja a mintában a jelölések helyzetének előzetes megismerését (diffrakciólimitált módon). A már „megismert” mintában a MINFLUX képalkotás során a korábban említett fánk alakú nyalábbal a pásztázás egy iteratív, zárt hurkú lokalizációs algoritmus használatával zajlik, amely a detektált fotonok számát használja fel közvetlen távolságinformációként. A folyamat lépései *(2. ábra)* egyetlen molekulára nézve a következők:

1. *Kezdeti pozicionálás:* A fánk középpontját egy előre meghatározott, ismert (x_0, y_0) koordinátára helyez-



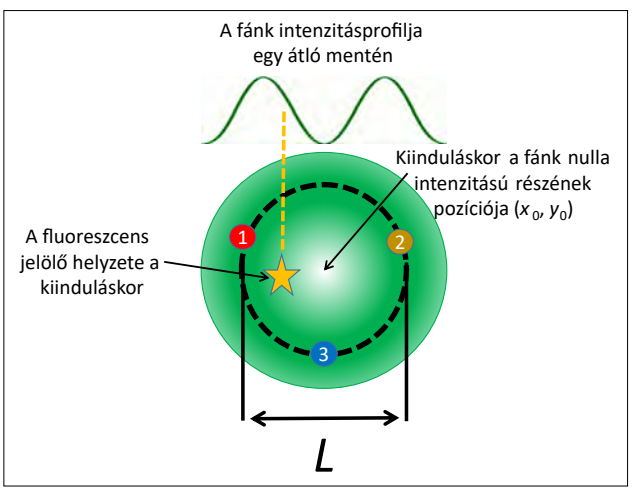
Török György (1984) a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet adjunktusa. Szakterülete a molekuláris sejtbiológia és a mikroszkópia. Munkája során számos új technika fejlesztésében és tökéletesítésében vett részt. Jelenlegi kutatásaiban a legkorszerűbb fénymikroszkópos technikák alkalmazásával sejt- és szöveti szinten vizsgálja az izmok működését, főként az izomfehérjékre, , valamint az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium közöttikapcsolatokra fókuszálva.



Kellermayer Miklós (1964) a Semmelweis Egyetem egyetemi tanára és a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet igazgatója. Szakterülete a molekuláris biofizika és nanobiotechnológia. Világszinten is úttörő munkát végzett az egyedi molekulamanipuláció területén: az elsők között vizsgálta lézercsipesszel a titin fehérje rugalmasságát. Kutatásai meghatározóak a szívizom működésének megértésében. Munkásságát 2022-ben a Magyar Érdemrend tisztikeresztje kitüntetéssel ismerték el.

zük a molekula feltételezett közelében, majd detektáljuk a fotonokat (N_0) egy rövid időablakban.

2. *„Keresés”:* A fánk középpontját elmozdítjuk több (általában három) előre meghatározott, szintén ismert pozícióba egy L átmérőjű körben (pl. (x_1, y_1) (x_2, y_2), (x_3, y_3)), és mindegyiknél detektáljuk a fotonok számát (N_1, N_2, N_3).
3. *Pozíciómeghatározás:* A mért (N_i) fotonszámok és az ismert fánk-intenzitásprofil ($I(x, y)$) alapján – amely közvetlenül arányos a gerjesztési valószínűséggel – kiszámítjuk a molekula legvalószínűbb pozícióját. A molekula valódi helyzete az a pont, ahol a mért fotonfluxusok a legjobban illeszkednek az $I(x, y)$ profil előrejelzett értékeire.
4. *Közelítés és lokalizáció:* A fánk középpontját ezután a számított pozícióba mozgatjuk. Itt, a nullintenzitású pont közelében vagy felette a fluoreszcencia minimális. Ezt a koordinátát rögzítjük a molekula végső pozíciójaként. A folyamat gyorsan konvergál, mivel minden iterációs lépés pontosabban szűkíti a keresési területet, tehát az L átmérő folyamatosan csökken, mígnem eléri a minimumot.



2. ábra. A MINFLUX módszer alapjainak sematikus ábrázolása. A kiindulási pontban a narancs színű csillag a fluorofór helyzetét mutatja. A belőle induló szaggatott vonal a fánkhoz tartozó intenzitásprofilon mutatja be, hogy körülbelül milyen a jelölőre jutó gerjesztési fény intenzitása, amelytől a detektált fotonok (N_i) mennyisége függ. A fekete szaggatott vonal a „keresés”-hez tartozó L átmérőjű kört jelöli, amelyen a számozott színes körök az előre meghatározott pozíciókat mutatják ((x_1, y_1) (x_2, y_2), (x_3, y_3))

A nanoszkópok teljesítményét a feloldóképesség javulása írja le a legjobban. A MINFLUX által kombinált két megközelítés közül a STED mikroszkópia esetében a feloldóképesség (Δd) a következő képlettel írható le:

$$\Delta d = \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}\sqrt{1 + I/I_{\mathrm{sat}}}},$$

ahol a λ a gerjesztő fény hullámhossza, az NA a numerikus apertúra, az I a fánk alakú kioltó lézer intenzitása, míg az I_{sat} a telítési intenzitás egy adott fluorofórra. A képletből elméletileg végtelenül kicsi felbontás következne, azonban mind a kioltólézerre, mind a fluorofórra jellemző intenzitásértékek fizikai korlátokba ütköznek, ezért ez csak egy elméleti megállapítás. A lokalizáción alapuló technikáknál nem a klasszikus értelemben vett fenti módosított Abbe-féle képlet az irányadó, hanem a lokalizációs pontosság (σ) és a detektált fotonok száma (N) közötti összefüggés írja le a legjobban a teljesítményt. A hagyományos SMLM-nél ez a kapcsolat közelítőleg:

$$\sigma \cong \frac{\mathrm{PSF}}{\sqrt{N}},$$

ahol PSF a detektált fluoreszcens folt pontkiterjedési függvényének félértékszélessége (FWHM), általában ~200–250 nm, N pedig a detektált fotonok száma. A képletből következik, hogy a tízezer foton gyűjtésével elérhető lokalizációs pontosság kb. 2–2,5 nm. A korlátot itt a gyűjtött fotonok száma, a detektor pixelszáma, valamint pixelmérete is befolyásolja, ezért a gyakorlatban ezt elég nehéz elérni.

A MINFLUX esetében a lokalizációs pontosságot nem a PSF határozza meg, hanem a geometriai megközelítés miatt a sokkal kisebb fánk nullintenzitású régiója. A lokalizációs pontosság összefüggését a következő képlet írja le:

$$\sigma \cong \frac{L}{\sqrt{N}},$$

ahol az L a keresési tartomány átmérője, N pedig a gyűjtött fotonok száma. Az egyenletből következik, hogy a keresési terület szűkítése önmagában növeli a pontosságot. Mivel a közelítés során L folyamatosan csökken, drasztikusan kevesebb foton árán érhető el a hagyományos SMLM technikáknál is jobb lokalizációs precizitás (~1–3 nm). Fizikai korlátot itt már nem jelent sem a fény hullámhossza, sem egyéb optikai, vagy detekciós paraméterek, hanem a rendszer és a minta mechanikai stabilitása, valamint a lézernyaláb pozicionálásának pontossága jelöli ki a határokat. A technológia jelenlegi fejlettsége lehetővé teszi, hogy akár 1 nm alatti felbontást is elérjünk, ami már atomi szintű felbontást jelent. Ezzel a technológia gyakorlatilag hidat képez a fénymikroszkópia és az elektronmikroszkópia között, megőrizve a fénymikroszkópia előnyét: az élő minták vizsgálatának lehetőségét. Az élő minták vizsgálata terén a technikában rejlő másik nagy előny, a sebesség jelenti a kulcsot. Ugyanis a lokalizációhoz használt fánkot nem csak precízen lehet mozgatni, hanem elképesztő sebességgel is. Ebből kifolyólag alkalmas a mozgások gyors követésére is, természetesen más vezérlő algoritmus használatával, így alkalmassá téve a rendszert például egyedi kinezinmolekulák lépkedésének követésére is [7].

A MINFLUX számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, amelyek a mérések során hasznosulnak. A fotonok közül gyakorlatilag mindegyik részt vesz a lokalizáció javításában. Nemcsak síkban (2D), de térben (3D) is lehet képalkotásra használni, miközben a lokalizációs preci-

zitása nem romlik, és a leképezés a tér minden irányában azonos felbontású (izotrop). Az időfelbontás kiváló, kevesebb fotont kell gyűjteni, így rövid idő (milli- vagy akár mikroszekundumok) alatt nanométeres pontosságú nyomkövetést tesz lehetővé. A fototoxicitás alacsony, mert jelentősen kevesebb a gerjesztés során használt fotonok száma, illetve a megvilágítási idő is rövid, ami csökkenti a fotokárosítást, és a szabad gyökök keletkezését, lehetővé téve hosszabb ideig tartó megfigyeléseket élő sejtekben.

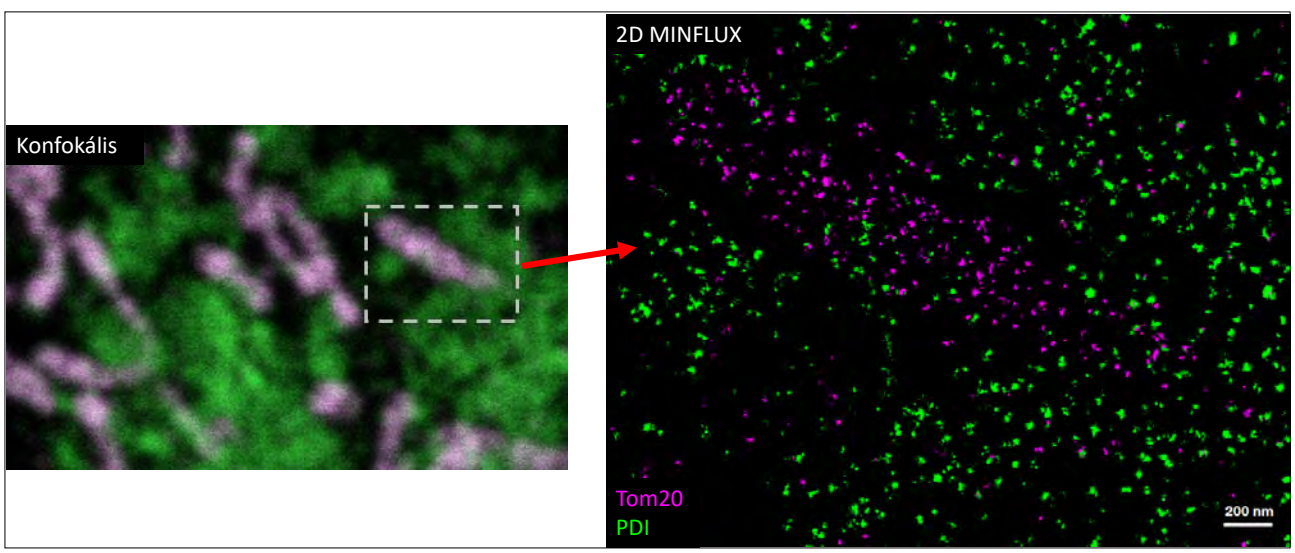
A MINFLUX képességei több fronton forradalmasítják a nanoskálájú megfigyeléseket:

1. *Sejtstruktúrák.* A sejtváz fehérjéi – mint az aktin vagy a mikrotubulusok – olyan részletességgel láthatók, hogy az egyes protofilamentumok szerkezete és egymáshoz viszonyított elhelyezkedése egyértelműen megkülönböztethető.
2. *Egymolekuláris nyomkövetés és dinamika.* A MINFLUX lehetővé teszi a fehérjék, lipidek és nukleinsavak diffúziójának és kölcsönhatásainak vizsgálatát a sejtmembránban vagy a sejtplazmában. Képes nyomon követni a motorfehérjék, pl. a már említett kinezin lépéseit nanométeres pontossággal.
3. *Konformációs változások megfigyelése.* Egy fehérje különböző részeinek eltérő színű fluoreszcens festékkel történő megjelölése és azok követése MINFLUX képalkotással, alkalmas a domének közötti távolságváltozást kimutatni, akár angströmszintű pontossággal, valós időben, így közvetlen betekintést nyújtva a fehérje működésébe.

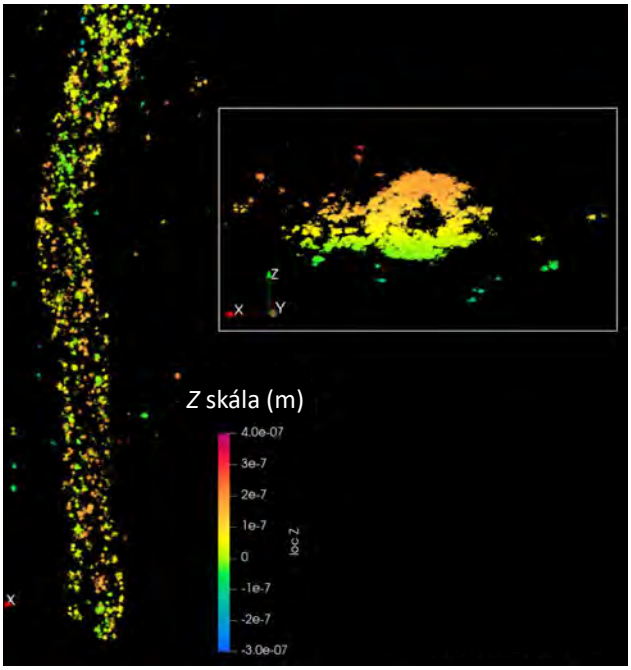
A sejtstruktúrák vizsgálatával a mi kutatócsoportunk is foglalkozik, és volt alkalmunk kipróbálni a MINFLUX mikroszkópia képességeit saját mintáinkon is. Egyik érdekes tématerületünk, amelyben az endoplazmatikus retikulum (ER) és a mitokondrium (mito) kapcsolatát és távolságát vizsgáljuk, különösen alkalmas a rendszer korlátainak felmérésére. Mivel a vizsgált sejtalkotók nagyon közel (20–40 nm) helyezkednek el egymáshoz, hagyományos fénymikroszkópos módszerekkel nem lehet vizsgálni a kapcsolatukat, mert egy nagyságrenddel közelebb vannak a feloldóképességnél. A korábban már említett szuperfelbontású mikroszkópok feloldóképessége sem elég jó ilyen közeli struktúrák vizsgálatához, ezért csak az elektronmikroszkópos kísérletek eredményeire alapozhatjuk a tudásunkat. Az elektronmikroszkópok használata viszont kizárja az élő minták vizsgálatát, valamint számos egyéb probléma is felmerül, különösen, ha három dimenzióban szeretnénk látni a kapcsolódási pontokat két struktúra között. A saját mintáinkban pont az utóbbi vizsgálatát szerettük volna megvalósítani. A *3. ábrán* látható, hogy ezt a célt sikerült is elérnünk.

A mintáinkban a mitokondriumokat a Tom20 fehérjén keresztül, míg az endoplazmatikus retikulomot a PDI fehérjén keresztül jelöltük és vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópos felvételt a MINFLUX-szal összehasonlítva szembetűnő, hogy a feloldóképesség drámaian jobb a MINFLUX esetében. Míg a konfokális képen látható, hogy a struktúrák jelölődtek, és ugyan elkülönülnek, de gyakran át is fednek egymással, addig a MINFLUX-os képen a jelölt helyek is egyértelműen kivehetők. Ezek pontosan a fluorofórok helyét jelölik ki, és lehetőséget adnak azok távolságának pontos megmérésére. A *4. ábrán* látható, hogy a jelölt mitokondrium belső, üreges szerkezete is feltárható volt 3D MINFLUX-szal vizsgálva. Mindemellett az egyedi jelölt helyek továbbra is jól kivehetőek.

Azonban semmilyen módszer nem tökéletes, és egyik sem elégíthet ki egyszerre minden igényt, így a hátrányok és limitációk említése itt sem maradhat el.



3. ábra. Az endoplazmatikus retikulum (ER) és a mitokondrium elhelyezkedésének vizsgálata a PDI és Tom20 fehérjéken keresztül. Az ábrán az ER zölddel, míg a mitokondrium lila színnel szerepel. A bal oldalon a hagyományos, diffrakciólimitált konfokális mikroszkóppal készült kép látható. A szaggatott vonallal körbehatárolt területről készült a jobb oldalon látható MINFLUX felvétel. A mérce 200 nm-t jelöl, ami megfelel az Abbé-féle feloldási határnak



4. ábra. A Tom20 fehérjén keresztül jelölt mitokondrium 3D MINFLUX mikroszkópos felvétele. Az ábrán a *z* tengely menti mélység van színkóddal jelölve. A fehér téglalapban szemből (a fő ábrán lentről nézve) nyerhetünk betekintést a struktúrába

Bár a MINFLUX jelenleg a felbontás és a lokalizációs pontosság csúcsát jelenti, főként a működési elvből és a technikai bonyolultságából fakadóan vannak hátrányai.

Míg egyetlen molekula követése extrém gyors, egy teljes sejt vagy szövetdarab feltérképezése általában lassú, mert a rendszernek sorban, egymás után kell azonosítania a jelölt molekulákat. A MINFLUX elve az intenzitásminimum keresésére épül, ezért a mintában lévő „háttérzajra", például az autofluoreszcenciára nagyon érzékeny. Egy másik nagy hátrány a jelöléseknél jelentkezik, és már a fluorofórok kiválasztása sem mindegy, főleg a többszínű jelöléseknél. Egyrészt a fluoreszcens jelölőknél elvárás a pislogás jelensége, a képalkotás során (nem a követésnél) a molekulákat egyenként kell bekapcsolni (hasonlóan a STORM-hoz). Ennek a kémiai környezetét beállítani eleve nehézkes lehet. A jelölők ki-be kapcsolására van szükség, ezért a megfelelő lokalizációs precizitás elérése általában hosszú időt vesz igénybe. A mechanikai stabilitás szintén kulcsfontosságú. Ha 1 nanométeres pontossággal akarunk mérni, akkor az elcsúszás (drift) jelensége még nagyobb ellenség lesz, mint a többi módszernél. Bármilyen nem várt mozgás vagy rezgés azonnal tönkreteszi a mérést, ezért aktív stabilizáló rendszerekre és nagyon szigorú környezeti kontrollra van szükség. Ha figyelembe vesszük a lokalizáció pontosságát, akkor nem hagyhatjuk figyelmen kívül a jelölések méretéből fakadó pontatlanságot sem. Egy hagyományosnak tekinthető elsődleges és a hozzá kapcsolódó jelölt másodlagos ellenanyagon alapuló jelölés mérete többszörösen meghaladja a rendszer feloldóképességét, ami megnehezítheti az eredmények értelmezését. Ezért törekedni kell a jelölések méretének csökkentésére, pl. nanobody-k vagy DNA-PAINT technikák alkalmazásával, hogy csak az egyszerűbbeket említsük. Ha a fentebb említett korlátokon átjutunk is, még akkor is marad egy nagyon jelentős probléma, ugyanis a MINFLUX rendkívül érzékeny a jelölés sűrűségére. Ha túl sok jelölő van nagyon kicsi térrészben, pl. egy molekulárisan zsúfolt sejtalkotóban, vagy egyszerűen túl magas egy jelölt molekulánk koncentrációja a vizsgált térrészben, akkor nem fogjuk tudni megfelelően egy molekulára szűkíteni a keresést, mert az *L* átmérőjű keresési területen mindig „belebotlunk" másik molekulába is. Ennek leküzdése szintén a jelölők és a jelölés optimalizálásával lehetséges, de korántsem egyszerű, és szintén nagyon időigényes lehet.

Összegzés

Mindent figyelembe véve azonban kijelenthető, hogy a MINFLUX mikroszkópia nem csupán egy új eszköz a szuperfelbontásos eszköztárban, hanem bizonyos értelemben paradigmaváltás is. Újraírja a térbeli lokalizáció metódusát azáltal, hogy a gerjesztési fény geometriáját használja közvetlen analitikai mérőműszerként. A korábbi technikákkal szemben lehetővé teszi egy molekula vagy egy molekulán belül a pozíciók angströmszintű meghatározását, akár mikroszekundumos időskálán. A technika jelenlegi állása nemcsak leküzdi a diffrakciós korlátot, hanem feltehetőleg ténylegesen megközelíti a fluoreszcenciaalapú mikroszkópia végső fizikai határát, mindazonáltal új dimenziókat nyit meg a molekuláris világ megismerése és megértése előtt.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a MINFLUX képalkotásban *Isabelle Jansen* (Abberior Instruments, Göttingen), valamint a minták előkészítésében *Farkas Erika* és *Mórotz Gábor* (Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet) segítségét.

Irodalom

1. Hell S. W., Wichmann J. (1994): Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.,* 19(11), 780–782.
2. Betzig E., et al. (2006): Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science,* 313, 1642–1645.
3. Rust M. J., Bates M., Zhuang X. (2006): Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods,* 3(10), 793–795.
4. Gustafsson M. G. (2000): Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.,* 198, 82–87.
5. Gustafsson M. G. (2005): Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 13081–13086.
6. Balzarotti F., et al. (2017): Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science,* 355, 606–612.
7. Wirth J. O., et al. (2023): MINFLUX dissects the unimpeded walking of kinesin-1. *Science,* 379, 1004–1010.

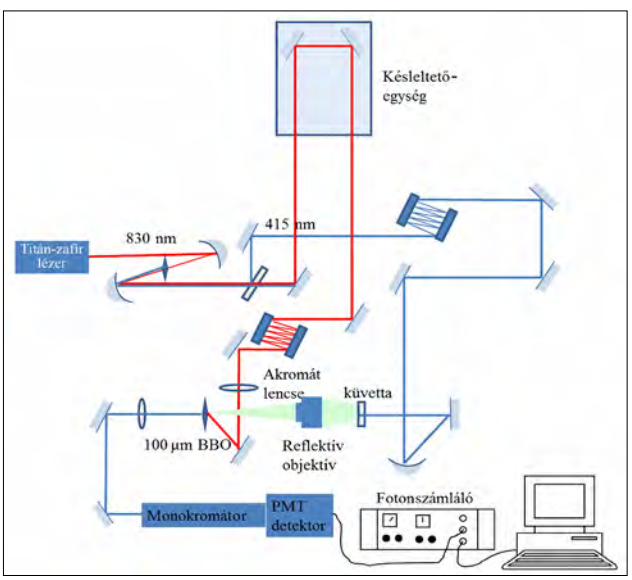
ULTRAGYORS SPEKTROSZKÓPIA A BIOLÓGIÁBAN

Lukács András@, Pirisi Katalin, Raics Katalin
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Pécs
@E-mail: andras.lukacs@aok.pte.hu

A kilencvenes évek technikai fejlődését követően, amelynek során a Szipőcs Róbert és Krausz Ferenc által felfedezett és sikerrel alkalmazott csörpölt tükröknek köszönhetően sikerült elérni már a 10 femtoszekundumos impulzushosszt is [1–5], felvetődött, hogy miként lehetne a femtoszekundumos lézereket biológiai problémák megválaszolására használni. Ez időben terjedtek el az úgynevezett fluoreszcencia-upkonverziós rendszerek, amelyek a fluoreszcencia-élettartammérésre voltak alkalmasak, ráadásul megépítésük viszonylag olcsó és gyors volt, mivel csak egy lézeroszcillátorra és két nemlineáris kristályra volt szükség, na, meg a detektorra. A femtoszekundumos – sok esetben ultragyorsnak is nevezett – spektroszkópia biológiai alkalmazásának első úttörői Fumio Tanaka és csoportja voltak, akik a kilencvenes évek végén megmérték a riboflavinkötő fehérje (RBP) és a glükóz-oxidáz fluoreszcencia-élettartamát [6]. Az általuk használt upkonverziós rendszerrel olyan rövid fluoreszcencia-élettartamokat tudtak meghatározni, mint az RBP esetében megfigyelt 98 fs-os és 410 fs-os komponensek. Ennek a nagyon rövid relaxációnak az oka az, hogy a kék foton (400–450 nm) abszorpcióját követően az akár több nanoszekundumos fluoreszcenciára képes flavin a környezetében levő triptofán vagy tirozin aminosavaktól elvon egy elektront, aminek következtében a fluoreszencia megszűnik, vagyis a fluoreszcencia-élettartam nagyon rövid lesz. Noboru Mataga és Fumio Tanaka néhány évvel később szintet léptek [7], az általuk épített upkonverziós rendszer felbontása elérte a 120 femtoszekundumot, ennek segítségével pedig sikerült meghatározni a flavodoxin fluoreszcencia-élettartamát, amely 158 fs volt. A japán csoport által használt technológia egészen 40–50 femtoszekundumos időfelbontást is lehetővé tesz, ami jól használható volt a molekuláris motorok tanulmányozásakor [8–11].

Tranziens fluoreszcenciaspektroszkópia

Az upkonverziós elrendezés mérési elve rendkívül egyszerű – miközben a mérés persze nem az – egy nemlineáris kristály (tipikusan BBO) segítségével az alapnyaláb másodharmonikusát hozzuk létre (az alábbi ábrán ez kékkel van ábrázolva) és ez a nyaláb gerjeszti a mintánkat. Egy késleltető egységgel a 830 nm-es alapnyalábot egy következő nemlineáris kristályba vezetjük, ahol „összekeverjük” a fókuszált fluoreszcens nyalábbal. A késleltetőegység mozgatásával határozzuk meg, hogy a lézerimpulzus a fluoreszcenciához képest mikor érkezik a nemlineáris kristályra, vagyis a fluoreszcens lecsengés melyik része számára nyitja ki az ajtót.



1. ábra. Fluoreszcencia-upkonverziós berendezés (*Forrás:* [18])



Lukács András biofizikus, egyetemi tanár, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai Intézetének igazgatója. Posztdoktorként dolgozott a franciaországi École Polytechnique, valamint az Egyesült Királyságban a University of East Anglia egyetemen, ahol több spektroszkópiai – tranziens abszorpciós, valamint Kerr-kapuzott fluoreszcenciaspektroszkópiai – rendszert épített. Kutatási területe a kékfény-fotoreceptorok működésének vizsgálata ultragyors lézerspektroszkópiai módszerekkel.



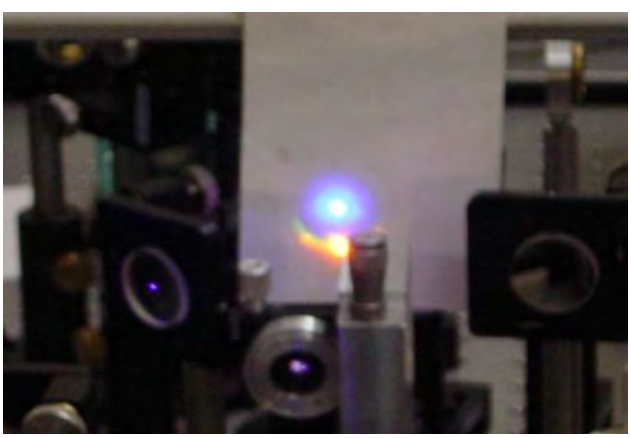
Pirisi Katalin a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében egy Ti:Sa lézerre épülő tranziens abszorpciós kísérletsorozatokon dolgozott, amelynek során fotoaktív fehérjék ultragyors folyamatait vizsgálta. Jelenleg az ELI-ALPS kutatóintézet középinfravörös csoportjának munkájában vesz részt, amely nemzetközi kísérletek népszerű témája. A felhasználók kutatásaiban legnépszerűbbnek számító magasharmonikus-keltésen túl, attól markánsan eltérő kísérletek is helyet kapnak, mint például LIPSS (laser induced periodic surface structure) mérések.



Kilián Balázsné dr. Raics Katalin (1984) fizika-környezettan és biológia szakos középiskolai tanár. 2014 óta a pécsi Ciszterci Rend Nagy Lajos Gimnáziumának fizikatanára, emellett a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében kutat. Kutatási témája funkcionális fehérjedinamikai vizsgálatok fluoreszcencia- és ultragyors lézerspektroszkópiai módszerekkel. A Nagy Lajos Gimnázium alatt terjeszkedő ún. Lézerpince ötletgazdája, amelyet diákjaival és kollégáival épít és gondoz mint „saját csodáik palotáját”, zömmel optikai kísérleteket bemutatva. Az interaktív installációkban gazdag pince alkotói az elmúlt évtized gimnazistái, látogatói az ország minden részéről érkező diákcsoportok és tanárok.

A flavoproteinekben lejátszódó elektrontranszfer-folyamatok vizsgálatába „beszállt” a Nobel-díjas Ahmed Zewail és posztdokja, Donping Zhong, akik szintén a riboflavinkötő fehérje és a glükóz-oxidáz fotofizikáját tanulmányozták, de ezúttal már tranziens abszorpciós spektroszkópiával is [12]. A fehérjeszerkezet ismeretében azt a javaslatot tették, hogy glükóz oxidázban az elsődleges elektrondonor egy a flavin-adenin-dinukleotidhoz (FAD-hoz) közeli triptofán, ennek köszönhető a tranziens abszorpció gyors lecsengése.

Ebben az időszakban, vagyis a kétezres évek elején alakult ki az ultragyors spektroszkópia módszertana és standard eszközparkja. A kutatócsoportok többsége titán-zafír lézeroszcillátorokat, valamint erősítőket használt, köszönhetően a titán-zafír kristály kedvező hővezető tulajdonságainak. A kereskedelmileg megvásárolható rendszerek 50–100 femtoszekundumos impulzushossz generálására voltak képesek és általában 1 kHz-es ismétlési frekvenciával működtek. Tekintettel arra, hogy egy BBO kristály segítségével könnyedén elő lehetett állítani a titán-zafír lézer második harmonikusát, a legtöbb tranziens abszorpciós rendszer 400 nm körüli pumpaimpulzussal működött, a próbaimpulzust pedig az alkalmazáshoz illően zafírban, kalcium-fluorid kristályban vagy akár vízben hozták létre. Giulio Cerullo és Takayoshi Kobayashi munkájának köszönhetően viszont hamar megjelentek az optikai paremetrikus erősítők (OPA), valamint a nemkollineáris optikai parametrikus erősítők (NOPA), amelyek segítségével már más hullámhosszúságú pumpaimpulzusokat is el lehetett érni, nem csak a második harmonikust. Saját méréseinkhez több NOPA-t építettünk és használtunk, ezekkel sikerült elérni a mintegy 50–100 fs-os impulzushosszt, valamint 530–600 nm-es impulzusokat tudtunk generálni. A megvalósítás elegánsan egyszerű: a titán-zafír nyalábot két ágba osztottuk, a nagyobb energiájú nyalábot egy BBO kristályon vezetettük át, létrehozva a másodharmonikust. A kisebb energiájú nyalábot egy zafírlemezen vezettük át, amelyben fehérfény-kontinuumot hoztunk létre, majd a másodharmonikus nyalábot és a fehérfény-kontinuumot egyesítettük egy újabb BBO kristályban. A megfelelő szög alatt megvalósult az erősítés *(2. ábra)*.



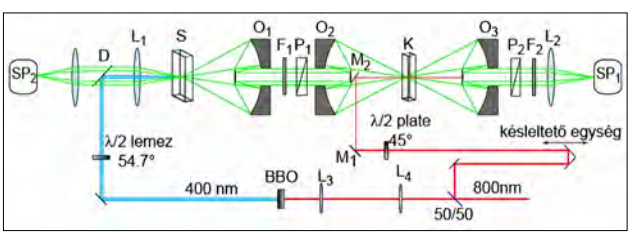
2. ábra. Az általunk épített NOPA működés közben

A Dongping Zhong és Ahmed Zewail által felvetett problémakört néhány éve a saját, egyben új módszerünkkel újra áttekintettük és azonosítottuk az elsődleges elektrondonort, egy a FAD-hoz közeli tirozint [13].

A glükóz-oxidáz fotofizikájának tanulmányozásához a saját fejlesztésű műszerünket alkalmaztuk, a Kerr-kapuzott tranziens fluoreszcenciaspektroszkópiai rendszert [14].

A Kerr-kapuzott fluoreszcenciaspektroszkópia az optikai Kerr-effektusra épül, amelyet röviden úgy lehetne összefoglalni, hogy nagy intenzitású lézerimpulzus hatására az adott anyag elforgatja a polarizált fény polarizációs síkját. Ez a hatás az adott anyagtól függ; nagyon erős Kerr-effektus figyelhető meg például CS_2-ben, vagy benzolban, de ennél jóval gyengébb az elforgatás mértéke például üvegben.

A berendezés működésének elve látható a *3. ábrán*. A lézererősítőből kijövő lézernyalábot 50-50% arányban osztjuk meg. Az egyik rész átmegy egy BBO kristályon, amelyben megvalósul a frekvenciakétszerezés. Ez szolgál majd az S küvettában található minta gerjesztéséhez. A keletkező fluoreszcencia két Cassegrain-objektíven keresztül áthaladva jut a K-val jelölt Kerr-ablakhoz, ami lehet benzol, CS_2 vagy Suprasil üveg. A Cassegrain-objektív azért volt hasznos ebben az elrendezésben, mert hatékonyan gyűjti be a fluoreszcens fényt, amelyet párhuzamosít, a következő a Cassegrain-objektívvel pedig hatékonyan tudtuk fókuszálni a fluoreszcens nyalábot a Kerr-kapura. Mivel a P_1 és P_2 polarizátorok keresztállásban vannak, a fluoreszcencia csak akkor halad át a P_2-es polarizátoron, ha létrejön a Kerr-effektus, azaz ha a Kerr-kapu az intenzív lézernyaláb hatására kinyílik. A lézerimpulzus okozta Kerr-hatás következtében az áthaladó fény elliptikusan polarizálttá válik, így egy része áthalad a P_2-es polarizátoron, ezt a fényt gyűjtjük be az O_3-as Cassegrain-objektívvel. A mérés során a késleltetőegység mozgatásával szabályozzuk, azt, hogy a Kerr-kapu mikor „nyisson ki” a gerjesztő impulzushoz képest.



3. ábra. Az általunk épített Kerr-kapuzott fluoreszcenciaspektroszkópiai rendszer

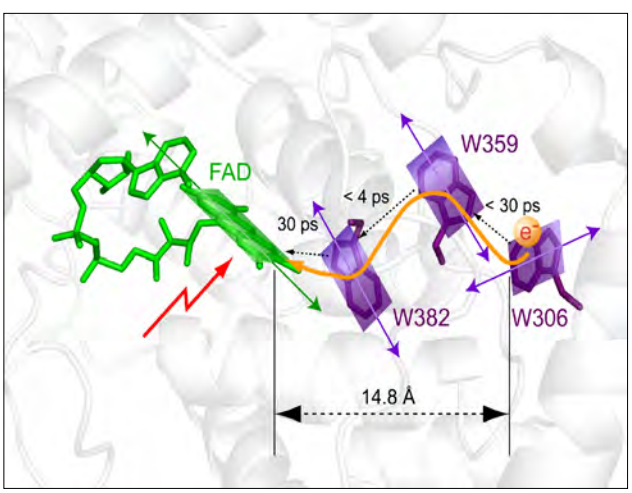
Fotoaktív flavoproteinek

Az ultragyors spektroszkópia kezdeti úttörő kísérletei nagyon izgalmasak és fontosak voltak technikai szempontból – hiszen ezek során lettek kifejlesztve az ultragyors tranziens abszorpciós és tranziens fluoreszcenciaspektroszkópiai rendszerek – valamint az elektrontranszfer-folyamatok leírása szempontjából. A glükóz-

oxidáz, a flavodoxin- vagy a riboflavinkötő fehérje olyan flavoproteinek, amelyek esetében azonban a fénynek nincs köze a fehérje funkciójához. A flavoproteinek nagy családjában – ez közel 150–200 fehérjét jelent – viszont számos olyan fehérje van, amely fotoaktív, és amelyek funkciójában a fény kulcsszerepet játszik. Ezek esetében a funkció szempontjából releváns információ, hogy a gerjesztés után milyen fotokémiai folyamat zajlódik le a fehérjében. A fotoaktív flavoproteinek osztályába tartoznak a fotoliázok és kriptokrómok, amelyek a DNS javításában vesznek részt, vagy a cirkadián ritmus szabályozásában, vagy akár a madarak mágneses tájékozódásában. Szintén a fotoaktív flavoproteinek családjába tartoznak a BLUF (blue light sensing using FAD) doménfehérjék, amelyek a fotoszintetikus baktériumokban töltenek be szabályozó szerepet, vagy részt vesznek az ATP cAMP-vé való konvertálásában. Mindkét említett fehérjecsaládban a fehérjék funkciójában kulcsszerepet játszik a fotoindukált elektrontranszfer. Ennek során a gerjesztett FAD egy elektront von el egy közeli triptofántól vagy tirozintól, és ez vezet majd a fehérje funkciójához. Ez az elsődleges elektrontranszfer-lépés a gerjesztést követően nagyon rövid idő alatt valósul meg, sokszor akár néhány száz femtoszekundum alatt.

Fotoliázok

A fotoliáz esetében két fotoindukált elektrontranszfer-folyamat ismert, amelyek esetében kulcsszerepet játszik a fehérje által kötött FAD. Aziz Sancar munkásságának köszönhetően tudjuk – aki a fotoliáz DNS-javító mechanizmusának leírásáért 2015-ben kémiai Nobel-díjat kapott – hogy a DNS-javításhoz a FAD-nak teljesen redukált $FADH^-$ redoxállapotban kell lennie. Ebben az esetben, a kékfény-foton abszorpcióját követően a FAD-ról egy elektron ugrik a DNS-ben található pirimidin dimerre, aminek következtében az felhasad [15, 16]. A fotoliázban egy másik fotoindukált elektrontranszfer-folyamat is megvalósul, ha a FAD félig redukált állapotban van. Ebben az esetben egy látható foton abszorpciója vezet a flavin redukálódásához: a gerjesztést követően a FAD egy elektront von el egy közeli triptofántól, ez pedig egy elektrontranszfer-kaszkádot indít el, amelynek következtében az oldathoz közeli W306-os triptofán a fő elektrondonor. A folyamat időbeliségét polarizációs tranziens abszorpciós mérések segítségével határoztuk meg [17].



4. ábra. A fotoaktiváció folyamata a fotoliázban

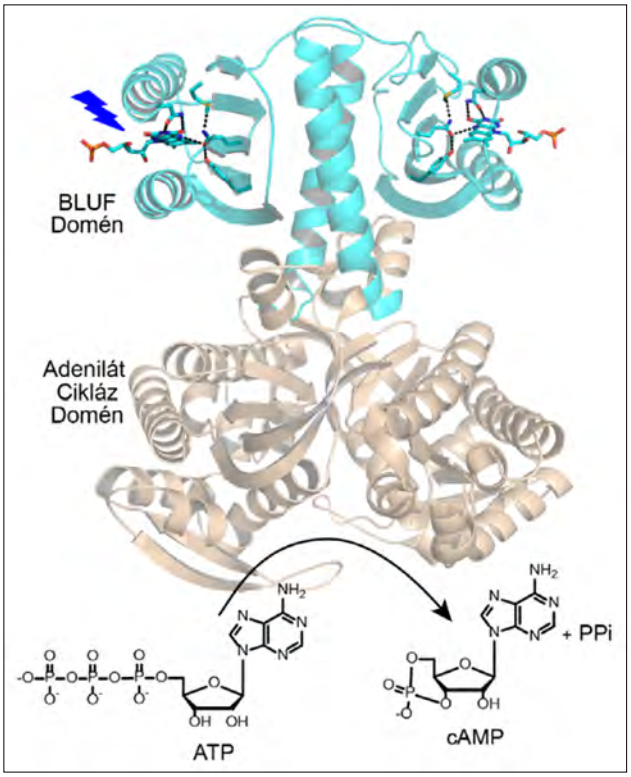
Fotoaktiválható adenilát-ciklázok

Az adenilát-ciklázok (AC-k) az enzimek fontos osztályát alkotják, amelyek az adenozin-trifoszfát (ATP) ciklikus adenozin-monofoszfáttá (cAMP) és szervetlen pirofoszfáttá (PPi) való átalakításában játszanak meghatározó szerepet. A fotoaktivált adenilát-ciklázok (PAC) az adenilát-cikláz enzimek egy olyan alcsoportját képviselik, ahol az ATP G-protein segítsége nélkül alakul át cAMP-vé.

A kék fény által aktivált adenilát-ciklázok működése általában egy BLUF vagy ritkábban egy LOV (light-oxygen-voltage-sensing, fényt, oxigént és feszültséget érzékelő) domén segítségével valósul meg. Az első ismert PAC az *Euglena gracilis* nevű csillós ostoros egysejtűből lett izolálva, és ennek megfelelően EuPAC-nak lett elnevezve. Az EuPAC egy 400 kDa (kilodalton) méretű heterotetramer, amely két-két α és β egységet tartalmaz, amelyek egyenként két BLUF és két AC domént tartalmaznak. Az EuPAC felfedezését követően kisebb méretű bakteriális PAC-okat is találtak, amelyek esetében az AC aktivitást szintén BLUF domén szabályozza. Az egyik legismertebb ilyen enzim a bPAC, amely a szulfidoxidáló baktériumban (*Beggiatoa* sp.) található meg. A bPAC-nek a kis mérete mellett kedvező tulajdonsága, hogy sötétben alacsony aktivitást mutat, kékfény-abszorpcióját követően viszont aktivitása mintegy 300-szoros növekedést mutat kék fény abszorpciót követően.

Tekintettel arra, hogy a cAMP számos jelátviteli folyamatban játszik szerepet, a cAMP-termelés fényvezérelt szabályozása a PAC enzimeket nagyon vonzó optogenetikai eszközzé teszi. Például az EuPAC az Aplysia nevű tengeri haslábú neuronjaiban kifejeződve lehetővé tette a neuronstimuláció optikai kontrollját. A bPAC-ot a közelmúltban transzgenikus egerekben alkalmazták motilitásukat vesztett spermiumok flagelláris mozgásának helyreállítására.

A közelmúltban egy újabb ígéretes fotoaktivált adenilát-ciklázt fedeztek fel: az *Oscillatoria acuminata* cianobaktériumban termelődik, amelynek különlegessége, hogy nagyon alacsony aktivitást mutat sötétben – a legalacsonyabb az eddig ismert PAC fehérjék közül – lehetővé téve a fotoindukált cAMP-termelés finomabb szabályozását. Ennek megfelelően kiváló optogenetikai eszköz lehet, a sötétben ugyanis szinte nem mutat aktivitást, megvilágítás hatására azonban azonnal megindul a cAMP-termelés. Az OaPAC vizsgálata során az elsődleges kérdés az volt, hogy a fehérje N-terminálisánál elhelyezkedő a flavin abszorpciója hogyan vezet ahhoz a konformációs változáshoz, aminek következtében megvalósul az ATP-konverzió. Saját kísérleteink arra vezettek, hogy a fehérje funkciójához vezető első lépés egy



5. ábra. Az OaPAC szerkezete: kékkel van ábrázolva a BLUF domén, ahol a kék foton abszorpciója, majd a protonkapcsolt elektrontraszfer elsődleges lépése megtörténik

protonkapcsolt elektrontranszfer-folyamat: a kék foton abszorpcióját követően egy közeli tirozin egy elektront és egy protont is ad a gerjesztett állapotban levő flavinnak. A folyamat során egy közeli glutamin aminosav elfordul, s ez indítja el azt a mechanikai folyamatot, amely a nyaki régiót követően eljut a C-terminálishoz, ahol megvalósul a fehérje funkciója.

Az ultragyors spektroszkópia jövője

A fenti példák jól mutatják az ultragyors spektroszkópia által nyújtott lehetőségeket biológiai folyamatok vizsgálata során. A jövő azonban még izgalmasabb: a szabadelektron-lézerek megjelenésével az elmúlt közel tíz évben az ultragyors spektroszkópia és a röntgenszerkezeti módszerek „egymásra találtak". Így sikerült meghatározni a rhodopszin időfüggő szerkezeti változásait, vagy például a fotoliáz DNS-javítása során bekövetkező szerkezeti változásokat. Mi is végeztünk időfüggő röntgenkrisztallográfiai méréseket, amelyek során femtoszekundumos impulzusokkal gerjesztettük az OaPAC fehérjét és femtoszekundumos röntgenimpulzusokkal végeztük el a diffrakciós mérést különböző késleltetések mellett, így sikerült megfigyelnünk a kék foton abszorpciója után bekövetkező szerkezeti változásokat. Mindezek fényében megállapíthatjuk, hogy az ultragyors spektroszkópia jövője izgalmasabb, mint valaha.

Irodalom

1. Stingl A., Spielmann C., Krausz F., Szipocs R. (1994): Generation of 11-fs pulses from a Ti-sapphire laser without the use of prisms. *Optics Letters,* 19, 204–206. https://doi.org/10.1364/OL.19.000204
2. Szipocs R., Ferencz K., Spielmann C., Krausz, F. (1994): Chirped multilayer coatings for broad-band dispersion control in femtosecond lasers. *Optics Letters,* 19, 201–203. https://doi.org/10.1364/OL.19.000201
3. Spielmann C., Lenzner M., Krausz F., Szipocs R. (1995): Compact, high-throughput expansion-compression scheme for chirped pulse amplification in the 10 fs range. *Optics Communications,* 120, 321–324. https://doi.org/10.1016/0030-4018(95)00494-S
4. Spielmann C., Lenzner M., Krausz F., Szipocs R., Ferencz K. (1995): Chirped dielectric mirrors improve Ti:sapphire lasers. *Laser Focus World,* 31, 55–60.
5. Stingl A., Lenzner M., Spielmann C., Krausz F., Szipocs R. (1995): Sub-10-fs mirror-dispersion-controlled Ti-sapphire laser. *Optics Letters,* 20, 602–604. https://doi.org/10.1364/OL.20.000602
6. Mataga N., Chosrowjan H., Shibata Y., Tanaka F. (1998): Ultrafast fluorescence quenching dynamics of flavin chromophores in protein nanospace. *Journal of Physical Chemistry B* 102, 7081–7084. https://doi.org/10.1021/jp982583t
7. Mataga N., et al. (2002): Femtosecond fluorescence dynamics of flavoproteins: Comparative studies on flavodoxin, its site-directed mutants, and riboflavin binding protein regarding ultrafast electron transfer in protein nanospaces. *Journal of Physical Chemistry B* 106, 8917–8920. https://doi.org/10.1021/jp020574l
8. Hall C. et al. (2017): Ultrafast dynamics in light-driven molecular rotary motors probed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society,* 139, 7408–7414. https://doi.org/10.1021/jacs.7b03599
9. Roy P., Browne W., Feringa B., Meech S. (2023): Ultrafast motion in a third generation photomolecular motor. *Nature Communications,* 14, Article number: 1253. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36777-6
10. Roy P., Sardjan A., Browne W., Feringa B., Meech S. (2024): Excited state dynamics in unidirectional photochemical molecular motors. *Journal of the American Chemical Society,* 146, 12255–12270. https://doi.org/10.1021/jacs.4c01019
11. Roy P., et al. (2024): Substituent effects on first generation photochemical molecular motors probed by femtosecond stimulated Raman. *Journal of Chemical Physics,* 161, 074504. https://doi.org/10.1063/5.0216442
12. Zhong D., Zewail A. H. (2001): Femtosecond dynamics of flavoproteins: charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B_2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 98, 11867–11872. https://doi.org/10.1073/pnas.211440398
13. Nag L., Lukacs A., Vos M. H. (2019): Short-lived radical intermediates in the photochemistry of glucose oxidase. *Chemphyschem* 20, 1793–1798. https://doi.org/10.1002/cphc.201900329
14. Laptenok S. P., Nuernberger P., Lukacs A., Vos M. H. (2014): Subpicosecond Kerr-gate spectrofluorometry. *Methods Mol. Biol.,* 1076, 321–336. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_13
15. Ozgur S., Sancar A. (2003): Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2. *Biochemistry,* 42, 2926–2932. https://doi.org/10.1021/bi026963n
16. Sancar A. (2008): Structure and function of photolyase and *in vivo* enzymology: 50th anniversary. *J. Biol. Chem.,* 283, 32153-32157, https://doi.org/10.1074/jbc.R800052200
17. Lukacs A., Eker A., Byrdin M., Brettel K., Vos M. (2008): Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. *Journal of the American Chemical Society,* 130, 14394–14395. https://doi.org/10.1021/ja805261m
18. Heisler I. M., et al. (2009): Reactive dynamics in confined liquids: Ultrafast torsional dynamics of Auramine O in nanoconfined water in aerosol OT reverse micelles. *J. Phys. Chem. B,* 113(6), 1623–1631. https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp808989f

FEHÉRJÉK A VEZETŐ ÉS SZIGETELŐ ÁLLAPOTOK HATÁRÁN

Papp Eszter, Vattay Gábor[@]
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Fizikai és Csillagászati Intézet,
Komplex Rendszerek Fizikája Tanszék, Budapest
[@]E-mail: gabor.vattay@ttk.elte.hu

A fehérjék központi szerepet játszanak az életfolyamatokban, hiszen a legtöbb biokémiai reakció ezeknek a molekuláknak a közreműködésével megy végbe. Az élő rendszerek számos kulcsfolyamata – például a sejtlégzés és a fotoszintézis – alapvetően az elektronok gyors és hatékony, nanométeres távolságokon történő, redoxreakciókon keresztül megvalósuló, molekulák közötti átadásán alapul. Aperiodikus szerkezetük és a hagyományos értelemben vett vezetési sávok hiánya azonban látszólag kizárta a hatékony elektrontranszport lehetőségét. A fehérjék feltételezett szigetelőjellege és a megkövetelt biológiai funkció közötti ellentmondás évtizedeken át a biofizika egyik paradoxonának számított.

A gondolat, miszerint a kvantummechanika összefüggésben állhat a biológiai rendszerek működésével, nem új keletű. Erwin Schrödinger már 1944-es „Mi az élet?” című korszakalkotó könyvében felvetette, hogy az élő anyagot a kvantumfizika törvényei irányíthatják. Szent-Györgyi Albert pedig már 1941-ben úgy vélte, hogy a kvantummechanikai energiaszintek meghatározó szerepet játszhatnak biokémiai folyamatokban [1, 2], és élete utolsó évtizedeit a „bioelektronika” [3] és a „szubmolekuláris biológia” [4] megalapozásának szentelte. Szent-Györgyi megsejtette, hogy az élet alapvető folyamatai nem csupán a molekulák klasszikus kémiai kölcsönhatásain, hanem az elektronok mozgásán, a töltésátvitelen alapulnak. Bár forradalmi elgondolásait akkoriban nem tudta kísérletileg vagy számításokkal igazolni a megfelelő eszközök hiányában, az ő szellemi öröksége adja kutatásaink történelmi hátterét, amelyek során a fenti paradoxonra találtunk egy lehetséges megoldást. Felfedeztük, hogy a fehérjék se nem hagyományos szigetelők, se nem a fémekhez hasonló vezetők. Ehelyett egy új kategóriát képviselnek: kvantumkritikus vezetők, amelyek pontosan egy fém-szigetelő átmenet határán helyezkednek el. Ez a figyelemre méltó állapot feltehetően az evolúció több milliárd éves munkájának eredménye, amely a fehérjéket optimális működésre hangolta.

Fehérjék a káosz peremén

Elméletünk alapjai Stuart Kauffman komplexitáselméleti kutatóval [5] és Denis Salahub kvantumkémikussal folytatott együttműködésünkből [6] származnak. Kauffman alapvető koncepciója a „káosz pereme” [7], ahol a komplex adaptív rendszerek optimális egyensúlyt érnek el a rend és a rendezetlenség között, lehetővé téve egyszerre a stabilitást és a fejlődőképességet. Ezt a biológiai elvet alkalmazva a kondenzált anyagok fizikájában, feltettük a kérdést: mi a „káosz peremének” fizikai megfelelője egy elektron számára, amely egy fehérje komplex, rendezetlen struktúrájában mozog? A választ Philip Anderson 1958-as, Nobel-díjat érő lokalizációelmélete adja meg. Egy erősen rendezetlen rendszerben az elektron csapdába esik, hullámfüggvénye lokalizálódik, és nem képes terjedni. A rendszer *szigetelőként* viselkedik. Ezzel szemben egy rendezett vagy kevéssé rendezetlen rendszerben a hullámfüggvény kiterjedt, azaz delokalizált, lehetővé téve az elektron szabad mozgását. A rendszer ekkor vezető, *fémként* viselkedik. E két fázis között egy éles határvonal húzódik, amikor a rendezetlenség éppen az Anderson-féle fém-szigetelő átmenet (metal-insulator transition) *kvantumkritikus* pontjának megfelelő szintet éri el. Ezen a ponton a rendszer sem nem tökéletes vezető, sem nem tökéletes szigetelő, hanem egyedi, rendkívüli tulajdonságokkal rendelkezik [8].

A 2015-ben publikált cikkünkben [6] megfogalmazott központi állításunk az volt, hogy a funkcionális fehérjék mindenféle külső hangolás nélkül, természetes állapotukban éppen ezen a kritikus ponton helyezkednek el. Ezt a



Dr. Papp Eszter az ELTE Komplex Rendszerek Fizikája Tanszékének kutatója, ahol a biológia és a kvantumfizika összefüggéseit vizsgálja. A kutatás mellett a tudománykommunikációban is aktív szerepet vállal, többek között az ELTE TTK Science Podcast műsorvezetőjeként.

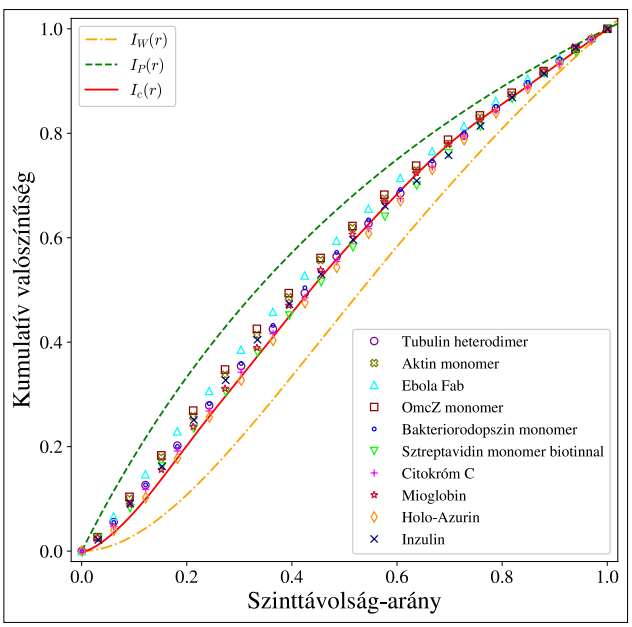


Prof. Vattay Gábor az ELTE Komplex Rendszerek Fizikája Tanszékének vezetője, kutatásai a kvantuminformatika, a kvantumfizika, a komplex rendszerek és a biológiai folyamatok határterületeit vizsgálják. Munkája úttörő a fehérjék kvantumos vezetési tulajdonságainak elméleti leírásában és a kvantumbiológia hazai meghonosításában.

1. táblázat. A fém-szigetelő átmenet fázisainak összehasonlítása

Tulajdonság	Szigetelő állapot (lokalizált)	Fémes állapot (delokalizált)	Kvantumkritikus állapot
A hullámfüggvény jellege	Lokalizált	Kiterjedt az egész rendszeren	Multifraktális; kiterjedt, de inhomogén
A szinttávolság-arányok eloszlása	Poisson-eloszlás	Wigner-eloszlás	Átmeneti eloszlás
Vezetőképesség	Elhanyagolható; csak termikus ugrálás (hopping)	Magas; gyengén függ a rendezetlenségtől	Rendkívül érzékeny a perturbációkra; nagy fluktuációk

hipotézist számítógépes modellezéssel teszteltük. A szemiempirikus kiterjesztett Hückel-módszert alkalmaztuk különféle biomolekulák – a kis jelzőmolekuláktól egészen a nagyobb fehérjékig – elektronikus Hamilton-mátrixának kiszámításához. Ez a módszer megfelelő egyensúlyt biztosított a számítási megvalósíthatóság és a fizikai betekintés között a nagyméretű, komplex molekulák esetében. A véletlenmátrix-elmélet eszköztárát felhasználva elemeztük a kiszámított molekulapálya-energiaszintek statisztikáit. Három univerzális statisztikai eloszlás létezik *(1. táblázat),* és eredményeink a funkcionális fehérjék esetében egyeztek az „átmeneti" eloszlással, amely a kritikus pont egyedi ujjlenyomata. 2025-ben pedig már olyan fehérjéket vizsgáltunk, amik különböző kísérletekben jó vezetőknek bizonyultak. Megmutattuk, hogy ezek is mind a kritikus pontra jellemző eloszlással rendelkeznek *(1. ábra)* [9]. A kritikus ponton a hullámfüggvények se nem lokalizáltak, se nem teljesen delokalizáltak, hanem multifraktálok – bonyolult, önhasonló mintázatok, amelyek inhomogén módon töltik ki a teret. Számításaink megerősítették, hogy ezen fehérjék elektron-hullámfüggvényei pontosan ezt a multifraktális jelleget mutatják. Tehát az elektronok közelről lokalizáltaknak tűnnek, de kisebb tartományok között szabadon tudnak mozogni, így eljuthatnak a molekula egyik oldaláról a másikra.



1. ábra. A szinttávolság-arány egy statisztikai mérőszám a kvantummechanikában, amelyet a szigetelő, fémes és kvantumkritikus rendszerek megkülönböztetésére is használnak az egymást követő energiaszintek közötti távolságok (s_n) arányai ($r_n = s_{n+1}/s_n$) eloszlásának elemzésével. A Poisson-eloszlás $I_{P(r)}$ szigetelő, a Wigner-eloszlás $I_{W(r)}$ a fémes, míg az $I_{c(r)}$ a kvantumkritikus rendszerre jellemző. Részletek az eredeti cikkben [9]

A kvantumkritikus pont nem egy kiterjedt régió, hanem egy jól definiált pont a rendszer paraméterterében, ahol a vezető és szigetelő fázis határa húzódik. Kezdeti és legújabb vizsgálataink is azt mutatták, hogy a funkcionálisan fontos biomolekulák széles skálája ezen a ponton helyezkedik el [6, 9]. Annak a valószínűsége, hogy ez pusztán a véletlen műve legyen, rendkívül kicsi. Mindez arra utal, hogy az evolúció aktívan szelektálhatta és fenntarthatta ezt a kvantumkritikus állapotot, amely univerzális funkcionális előnyt jelenthetett az élő rendszerek számára.

Független kísérleti megerősítés

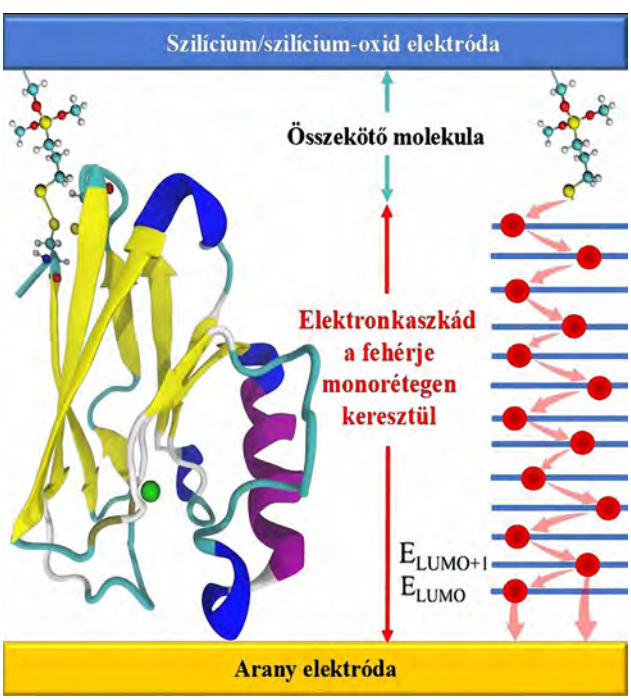
David Cahen úttörő munkát végzett a Weizmann Intézetben, ahol csoportjával olyan módszereket fejlesztett ki, amelyekkel vékony fehérjefilmeket vagy monorétegeket tudtak két elektróda közé rögzíteni. Cahen laboratóriumának központi, paradigmaváltó felfedezése az volt, hogy számos fehérje, mint például az azurin vagy a mioglobin, hatékonyan képes vezetni az elektronokat több nanométeres távolságon. A legmeglepőbb az volt, hogy ez a vezetés szinte teljesen *hőmérséklet-független* volt, szobahőmérséklettől egészen 4 kelvinig. Ez a felfedezés forradalmi jelentőségű volt, hiszen a rendezetlen szerves anyagokban a töltéstranszport hagyományos modelljei az „ugrásokon" (hopping) alapulnak, ahol az elektron helyről helyre mozog egy sor termikusan aktivált ugrás során. Az ilyen folyamat erősen hőmérsékletfüggő, és alacsony hőmérsékleten teljesen megszűnik. Cahen eredményei gyakorlatilag kizárták ezt a klasszikus képet. A hőmérséklet-függetlenség erős bizonyítékot szolgáltatott egy kvantummechanikai folyamatra, amelynek legkézenfekvőbb jelöltje az alagúteffektus volt.

Stuart Lindsay az Arizonai Állami Egyetemen egy kifinomult technikát fejlesztett ki, amely pásztázó alagútmikroszkóp (STM) segítségével egyetlen fehérjemolekula vezetőképességét mérte. Ez a megközelítés kiküszöbölte a sok molekulát egyszerre vizsgáló (ensemble) mérések bizonytalanságait. Lindsay kísérletei szintén figyelemre méltó eredményeket hoztak, ugyanis rámutattak, hogy az elektródákhoz megfelelően csatlakoztatott fehérjék egyáltalán nem szigetelők, hanem – saját megfogalmazása szerint – „a világ legjobb molekuláris vezetékei". Nanosiemens nagyságrendű vezetőképes-

séget mért több nanométeres nagyságú fehérjén, ami nagyságrendekkel magasabb érték, mint amit egyszerű alagutazással magyarázni lehetne. Lindsay munkájának egyik kulcsfontosságú felismerése az volt, hogy a fehérjéhez való kémiai csatolás módja döntő szerepet játszik a vezetőképesség mérésében. Specifikus ligandumok alkalmazása, amelyek az elektródák felületéhez kötődve a fehérje belső, hidrofób részéhez kapcsolódtak, lényegesen nagyobb vezetőképességet eredményezett, mint amikor a kötődés csak az elektróda és a fehérje külső felszíne között jött létre. Ez arra utal, hogy az áram útja a fehérje belsején keresztül vezet, és a teljes ellenállást a kontaktusok dominálják, nem pedig a fehérje mérete.

A két kutatási irány akkor találkozott, amikor Lindsay csoportja a „hatalmas vezetőképesség-fluktuációk" jelenségét próbálta megérteni. Ekkor fedezték fel a kvantumkritikusságról szóló elméleti munkánkat [10]. Felismerték, hogy egy kritikus ponton, a vezető és szigetelő állapot közöttj kényes egyensúlyban lévő rendszer rendkívül érzékeny lenne az olyan kis perturbációkra, mint egy külső feszültség, ami természetes magyarázatot ad ezekre a fluktuációkra.

Cahen kísérletei egy ellentmondást tártak fel. A transzport hőmérséklet-független, ami alagutazásra utal, ugyanakkor a transzport olyan távolságokon (néhol több tíz nanométer) ment végbe, amelyek túl nagyok a hatékony, egylépéses alagutazáshoz. Lindsay eredményei sem támogatták az alagúteffektust mint lehetséges mechanizmust, mert a mért vezetőképesség sokkal nagyobb volt annál, mint amit az alagutazás megengedne, és alig függött a fehérje méretétől, ami szintén ellentmond az egyszerű alagúteffektuson alapuló elméletnek. A megfigyelések, bár a klasszikus modellek ellen szóltak, látszólag ellentmondtak egymásnak az alagutazás szerepét illetően. Kvantumkritikus modellünk egységes megoldást kínál. A kritikus rendszerben a transzportmechanizmus nem egyszerű alagutazás. A folyamatban delokalizált, multifraktális hullámfüggvények vesznek részt, amelyek az egész molekula szerkezetét inhomogén módon fedik le. Ez lehetővé teszi a hatékony, nagy távolságú transzportot, amely eredendően kvantummechanikai (és így lehet hőmérsékletfüggetlen), de nem követi az egyszerű alagutazásra jellemző exponenciális távolságfüggést. A modell tehát egyszerre magyarázza a Cahen-csoport kísérleteiben kimutatott hőmérséklet-függetlenséget, valamint a Lindsay-féle mérésekben tapasztalt magas, mérettől független vezetőképességet. A kvantumkritikus értelmezés jól illeszkedett a kísérleti megfigyelésekhez, de a mechanizmus részletei továbbra sem voltak ismertek; a legnagyobb rejtély a szinte teljes hőmérséklet-függetlenség volt. Ennek felderítésére kidolgoztuk a *töltéshordozó-kaszkád modellt* (carrier-cascade model) [11], amely a vezetőképességet egy általánosított Landauer-formula segítségével írja le.



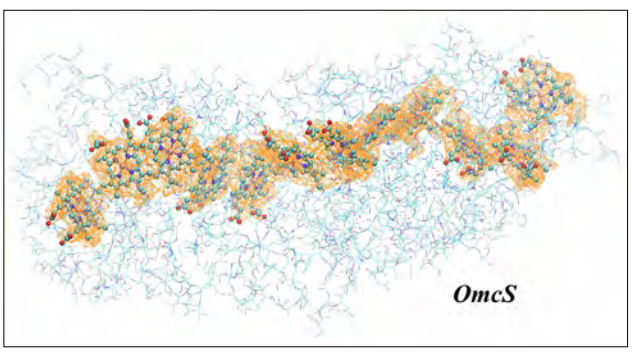
2. ábra. Az elektronkaszkád sematikus ábrája. A szilícium/szilícium-oxid elektródához kis molekulákkal kapcsolják a fehérjéket, amelyek a két elektróda között egyszeres (mono-) réteget alkotnak. Részletes leírás az eredeti cikkben [11]

Új elméleti eszköztár építése

A kísérleti eredményekkel való összehasonlíthatóság érdekében nem elegendő csupán az általános vezetési mechanizmus alapjainak megértése, szükség van olyan elméleti formulákra is, amelyekből a konkrét kísérleti elrendezésekben mért vezetési tulajdonságok kiszámíthatók. Az „Egy Landauer-formula bioelektronikai alkalmazásokra" című publikációnkban [12] egy általánosított Landauer-formulát vezetettünk be, amely a hagyományos, alacsony hőmérsékletű alagúteffektus-modellt kiterjeszti a környezettel (fononokkal) való kölcsönhatás, azaz a dekoherencia figyelembevételével. A modell újszerűsége abban rejlett, hogy újfajta közelítéseket alkalmazott, amelyek jelentősen leegyszerűsítették a számításokat. Ennek köszönhetően a vezetőképességet nem a molekula minden atomi részletét leíró, rendkívül bonyolult mikroszkopikus paraméterekből, hanem néhány, jól mérhető makroszkopikus paraméterből lehetett meghatározni. Ez az általános keretrendszer tette lehetővé a komplex biológiai rendszerek vezetőképességének hatékony számítását. A legfontosabb, hogy ez a modell képes megmagyarázni a fehérjevezetés két alapvető tulajdonságát: a mérsékelt távolságfüggést és az alacsony hőmérsékleten tapasztalt hőmérséklet-függetlenséget.

Az általánosított Landauer-formula után a *Scientific Reports* folyóiratban publikált munkánkban [13] egy kevesebb közelítést tartalmazó modellt mutattunk be, amely a fehérjéken belüli töltéstranszportnak már nemcsak a leírását, hanem a vizualizációját is lehetővé tette *(3. ábra)*. A megközelítés a Liouville-féle kvantum-mesteregyenlet sűrűségmátrixát ötvözi a molekuláris vezetés fenomenológiai modelljével. Az új formulánk a teljes

vezetőképességet három különálló fizikai mechanizmus összegeként adja meg. A *Landauer–Büttiker-tag* a tiszta, koherens alagutazást reprezentálja. Hőmérsékletfüggetlen, de exponenciálisan csökken a távolsággal, ezért nagyobb fehérjéknél elhanyagolható. A *termikus tag* a termikusan aktivált folyamatokat írja le, amelyekben az elektron termikus gerjesztéssel jut be az egyik kontaktusból a molekulába, majd termikus úton kerül át a másik kontaktusba. Ez a mechanizmus dominál magasabb hőmérsékleteken. Az általunk azonosított újdonság a *kevert tag,* amelyben az elektron az egyik elektródából alagutazással jut be a molekulába, majd egy termikus folyamat révén éri el a másik elektródát. Ezt a modellt az úgynevezett extracelluláris citokróm nanodrótokra alkalmaztuk, amelyekről ismert, hogy rendkívül jó vezetők. Számításaink és vizualizációink megerősítették, hogy a legmagasabb vezetőképességű régiók a fehérjék belsejében, a porfiringyűrűk láncolata mentén helyezkednek el, így a nanodrótok egészükben szigetelt kábelekre emlékeztetnek. A modell képes volt kvantitatívan reprodukálni és részben megmagyarázni azt a kísérleti megfigyelést is, hogy az OmcZ nanodrótok miért vezetnek több nagyságrenddel jobban, mint az OmcS típusúak.



3. ábra. Vezető tartományok a *Geobacter sulfurreducens* OmcS nanodrótjában (naranccsal jelölt részek). A baktérium ezeken a nanodrótokon elektronokat szállít mikrométeres távolságokra. A citokróm molekulákat golyó-pálcika modell, míg a szerkezet fehérje részét vonalábrázolás szemlélteti. Lásd bővebben az eredeti cikkben [13]

Az elmélet és a kísérlet találkozása

A modell kulcsfelismerése az, hogy a vezetés aktivációs energiája ezekben a rendszerekben nem a legmagasabb betöltött (HOMO) és a legalacsonyabb betöltetlen (LUMO) molekulapálya közötti nagy energiakülönbség. Ehelyett, mivel a fehérje a kritikus ponton egy sűrű energiasáv-rendszer, a töltéshordozók egy sor sűrűn elhelyezkedő pályán „kaszkádszerűen" haladhatnak keresztül. A releváns aktivációs energiává a szomszédos pályák közötti sokkal kisebb energiakülönbség válik, mint például a HOMO és a HOMO–1, vagy a LUMO+1 és a LUMO közötti energiakülönbség *(2. ábra)*. A modell egy konkrét, tesztelhető jóslatot tett, miszerint bár a vezetőképességnek egy széles hőmérséklet-tartományban közel állandónak kell lennie (mivel az aktivációs energia kicsi), alacsony hőmérsékleteken mégis egy mérsékelt, Arrhenius-típusú hőmérsékletfüggést kell mutatnia. Cahen kísérleti adatainak elemzése megerősítette ezt a megjósolt viselkedést. A végső lépés egy validáció volt, amelyben Carlos Romero-Muñiz és Linda A. Zotti korszerű sűrűségfunkcionál-elméleti (DFT) módszerekkel kiszámították a fent említett energiakülönbségeket pontosan azokra a fehérjékre, amelyeket Cahen csoportja vizsgált. A DFT-számítások eredményei és a kísérleti adatokból kinyert aktivációs energiák szinte tökéletes egyezést mutattak három különböző fehérje és három különböző kísérleti elrendezés esetében. Ez a közös publikáció a *Journal of Physical Chemistry B* folyóiratban jelent meg [11].

Holografikus elv a biológiában

A holografikus elv szerint bizonyos rendszerekben a térfogatban lévő információ mennyisége nem a térfogattal, hanem a határfelületének területével arányos, hasonlóan ahhoz, ahogyan egy 3D hologram egy 2D felületen van kódolva. Számításaink szerint a fehérjék elektron-hullámfüggvényeinek korrelációs fraktáldimenziója $d_2 \approx 2$, ami egyedi a háromdimenziós kritikus rendszerek között, ahol d_2 jellemzően nem egész értékű [9]. Ez arra utal, hogy a fehérjék elektronikus állapotai hatékonyan, kvázi kétdimenziós csatornák mentén szerveződnek. Az ilyen multifraktális, alacsonyabb dimenziós útvonalak csökkenthetik a visszaszórást, és elősegíthetik a hosszú hatótávolságú, hőmérsékletfüggetlen elektrontranszportot.

Kitekintés

A munka egy elméleti hipotézisből indult, amelyet számításos és kísérleti eredmények egyaránt alátámasztottak. A különböző megközelítések összhangja arra utal, hogy a kvantumkritikus állapot nem véletlenszerű sajátosság, hanem a fehérjék evolúciósan kialakult, funkcionálisan előnyös tulajdonsága lehet. Ez az állapot ötvözi a szigetelők stabilitását a vezetők hatékony töltéstranszportjával, így érzékeny válaszokat tehet lehetővé környezeti változásokra – ez a tulajdonság a biológiai érzékelés és a jövőbeli szenzorikai alkalmazások szempontjából is alapvető fontosságú.

Egy lehetséges irány annak a vizsgálata, hogy a fehérjék szerkezeti módosulásai és mutációi miként befolyásolják a kvantumkritikus állapotot. Érdekes kérdés még az is, hogy a vezető régiók és a funkcionális helyek között kimutatható-e korreláció. A modell ezen túl alapot adhat nanobioelektronikai berendezések tervezéséhez is, ahol a fehérjék kvantummechanikai tulajdonságai célzottan használhatók az irányított töltéstranszport és az érzékelés optimalizálására.

Kutatásaink ezt az irányt követik tovább: a kvantumkritikus jelenségek mélyebb megértésén keresztül szeretnénk feltárni, hogyan kapcsolódik össze a biológiai funkcionalitás és a kvantumfizika.

Irodalom

1. Albert Szent-Györgyi (1941): Towards a new biochemistry? *Science,* 93 (2426), 609–611.
2. Albert Szent-Gyorgyi (1941): The study of energy – levels in biochemistry. *Nature,* 148(3745), 157–159.
3. Albert Szent-Györgyi (1973): Bioelectronics and cancer. *Journal of Bioenergetics,* 4(6), 533–562.
4. Albert Szent-Györgyi (1960): Submolecular biology. *Radiation Research Supplement,* 2, 4–18.
5. Gabor Vattay, Stuart Kauffman, Samuli Niiranen (2014): Quantum biology on the edge of quantum chaos. *PloS One,* 9(3), e89017.
6. Gábor Vattay, Dennis Salahub, István Csabai, Ali Nassimi, Stuart A. Kaufmann (2015): Quantum criticality at the origin of life. In: *Journal of Physics: Conference Series,* Vol. 626, p. 012023. IOP Publishing.
7. Stuart A. Kauffman (1992): The origins of order: Selforganization and selection in evolution. In: Spin Glasses and Biology, pp. 61–100. World Scientific.
8. Ferdinand Evers, Alexander D. Mirlin (2008): Anderson transitions. *Reviews of Modern Physics,* 80(4), 1355–1417.
9. Eszter Papp, Gábor Vattay (2025): Holographic nature of critical quantum states of proteins. *Computational and Structural Biotechnology Journal.*
10. Bintian Zhang, Weisi Song, Pei Pang, Yanan Zhao, Peiming Zhang, István Csabai, Gábor Vattay, Stuart Lindsay (2017): Observation of giant conductance fluctuations in a protein. *Nano Futures,* 1(3), 035002.
11. Eszter Papp, Gábor Vattay, Carlos Romero-Muñiz, Linda A. Zotti, Jerry A. Fereiro, Mordechai Sheves, David Cahen (2023): Experimental data confirm carrier-cascade model for solid-state conductance across proteins. *Journal of Physical Chemistry B,* 127(8):1728–1734.
12. Eszter Papp, Dávid P. Jelenfi, Máté T. Veszeli, Gábor Vattay (2019): A Landauer formula for bioelectronic applications. *Biomolecules,* 9(10), 599.
13. Eszter Papp, Gábor Vattay (2024): Computation of biological conductance with Liouville quantum master equation. *Scientific Reports,* 14(1), 19571.

A FÁK HOSSZÚ ÉLETÉNEK TITKA

Bernáth Szabolcs[1,@], Szöllősi Gergely János[1,2], Derényi Imre[1]

[1]Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Fizika Tanszék, Budapest

[2]Okinawa Institute of Science and Technology, Model-Based Evolutionary Genomics Unit, Okinawa, Japan

[@]E-mail: bernathsz@student.elte.hu

A fák rendkívüli élettartama evolúciós és sejtbiológiai szempontból is különleges jelenség, hiszen a sejtek osztódásainak melléktermékeként megjelenő mutációk az évek során felhalmozódódva a sejtek működésének fokozatos leépüléséhez vezethetnek. Ennek ellenére a fák hosszú életük során is megőrzik genomjuk stabilitását, ami a csúcsrügyekben található őssejtek sajátos osztódási dinamikájának köszönhető. Egy friss, teljesgenom-szekvenálási vizsgálat adatait újraelemezve, valós mutációs mintázati példákon keresztül mutatjuk be, hogy a fák őssejtjei milyen dinamikát követnek annak érdekében, hogy minimalizálják az osztódásaik számát.

Bevezetés

A szövetes növények (Tracheophyta) élettartama rendkívül szerteágazó. Találkozhatunk egynyári fajokkal (pl. kukorica, görögdinnye, zöldborsó), illetve olyanokkal, amelyek több száz, akár több ezer évig is képesek élni (pl. egyes tűlevelűek). Érdekes azonban, hogy fejlődésükben ezek a növények nagyon hasonlóak. Mindegyikük hajtásának csúcsán található egy csúcsrügy (apikális rügy), melyben egy merisztéma nevű parányi szövet tartalmazza a növény őssejtjeit. Őssejteknek nevezzük azokat a differenciálatlan sejteket, amelyek osztódással képesek akár újabb őssejteket vagy differenciált (specifikusabb) sejteket létrehozni. Ezek az őssejtek biztosítják a növény élethosszig tartó növekedését, valamint az oldalrügyek (axilláris rügyek) kialakulását. A rügyekből fejlődnek ki az új hajtások, virágok és termések, vagyis a növény majdnem minden szövete végső soron a csúcsrügyek őssejtjeiből származik. Kivételt képeznek a gyökérszövetek, melyek a gyökércsúcsok őssejtjeiből származnak. Az őssejtek tehát kulcsszerepet játszanak a növény fejlődésében, de egyben hordozzák annak veszélyét is, hogy az évek során genetikai hibák, mutációk halmozódhatnak



Bernáth Szabolcs az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének doktorandusza. Kutatási területe az élő szervezetek szomatikus evolúciójának vizsgálata a genetikai állományban azonosított mutációkon keresztül, valamint őssejtosztódási mechanizmusok modellezése.



Szöllősi Gergely János az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének adjunktusa és az Okinawa Tudományos és Technológiai Intézet professzora, ahol jelenleg a Modellalapú Evolúciós Genomikai Egységet vezeti. Kutatási területe genomevolúciós modellek fejlesztése és alkalmazása, valamint a szomatikus evolúció analitikus modellezése és sztochasztikus szimulációja.



Derényi Imre az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének professzora, az MTA levelező tagja. Kutatási területe molekuláris motorfehérjék működésének értelmezése, sejtek és biológiai membránok dinamikájának vizsgálata, valamint szomatikus evolúciós folyamatok modellezése.

fel bennük. Ez pedig az őssejtek elöregedéséhez és a belőlük származó szövetek leromlásához vezet.

Egyetlen év alatt egy fa ágán számos új oldalrügy keletkezik. Ezek szerkezetileg azonosak a csúcsrügyekkel, hiszen bármelyikben megvan a képesség, hogy új hajtást (ágat) indítson, és így maga is csúcsrüggyé váljon. Többségük mindaddig alvó állapotban marad, amíg hormonális vagy környezeti jelek (például az eredeti csúcsrügy sérülése) növekedésre nem késztetik. Minden új oldalrügy létrejötte ezért a csúcsrügy őssejtjeinek osztódását igényli. Bár az osztódás során fellépő DNS-replikáció rendkívül pontos, időnként mégis hiba csúszik a folyamatba, elromlik az eredeti bázissorend, azaz mutációk jelennek meg. Azt gondolnánk, hogy egy több száz évig élő fa hatalmas mennyiségű mutációt gyűjt, azonban a kísérleti tapasztalat nem ezt mutatja. Egy néhány éve megjelent tanulmányban [1] egy 234 éves tölgyfa két ágáról vett levélminták génállományát szekvenáltak (azaz olvasták le a genetikai információikat). Ebből kiderült, hogy a két ág között csupán néhány tucatnyi (de legfeljebb 50) mutációs eltérés található. Hogyan lehetséges az, hogy egy fa több évszázadon keresztül képes megőrizni genomjának stabilitását, miközben folyamatosan növekszik és új szöveteket hoz létre? A tölgyfa genomja kb. $0{,}8 \cdot 10^9$ bázispár hosszúságú. Ezt beszorozva a kb. $0{,}3 \cdot 10^{-9}$/bázispár osztódásonkénti mutációs gyakorisággal kapjuk, hogy az egy sejtosztódásra jutó mutációk száma körülbelül 0,24. Ha mindkét ág a szétválásuk óta legfeljebb 25-25 mutációt halmozott fel, akkor az azt jelenti, hogy az őssejtjeik legfeljebb $25/0{,}24 \approx 100$ sejtosztódáson mentek keresztül. Ez döbbenetesen kevés ahhoz képest, hogy ezalatt az idő alatt akár több ezer oldalrügy képződhetett. Felmerül a kérdés, hogy milyen különleges osztódási dinamikát követnek az őssejtek, hogy ily mértékben képesek minimalizálni az osztódásaik számát és ezzel együtt a mutációk felhalmozódását.

Ezt a kérdést mindmáig nem sikerült teljes mértékben megválaszolni, mivel a csúcsrügy őssejtjeinek nyomon követése rendkívül nehéz feladat. Az őssejtek morfológiailag alig különböztethetők meg a környező sejtektől, ezért az azonosításukhoz speciális molekuláris jelölőkre van szükség, amelyekkel az őssejtekre jellemző génexpresszió kimutatható. A mikroszkópos vizsgálatokhoz pedig metszetek készítése szükséges, ami a szövetek roncsolásával jár.

Mutációk, sejtvonalak azonosítása

Az elmúlt évtizedekben hatalmas fejlődés ment végbe a génszekvenálási technológiákban. Ma már gyorsan, olcsón és viszonylag egyszerűen tudunk teljes genomokat szekvenálni (leolvasni), ami korábban elképzelhetetlen mennyiségű adatot eredményez. Mindezeket optimalizált algoritmusokkal erős számítógépeken hatékonyan tudjuk feldolgozni, így ma olyan kérdéseket is vizsgálhatunk, amelyek korábban technikailag elérhetetlenek voltak. Ennek köszönhetően kutathatjuk a növényekben felhalmozódó mutációkat, hogy visszakövessük azok eredetét egészen a kiindulási (csírázáskori) őssejtjeikig. Mivel a növényekben minden sejt őssejtekből keletkezik, egy őssejtben bekövetkező mutáció minden leszármazott sejtre átöröklődik, és minden új őssejtmutáció egy-egy külön sejtvonalat hoz létre. A mutációk így közvetlen lenyomatai az őssejtek osztódási dinamikájának és leszármazási történetének. Az így kirajzolódó sejtvonalmintázatokból következtetni lehet a csúcsrügyek őssejtjeinek számára, osztódási mechanizmusaira, valamint arra is, hogy hány különböző őssejt járul hozzá például egy új oldalrügy kialakításához. A mutációk feltérképezése tehát lehetőséget teremt arra, hogy feltárjuk az egyed fejlődési történetét – hasonlóan ahhoz, ahogyan a fajok genetikai mintázatai segítségével tárható fel az élővilág törzsfejlődése, csak itt mindez egyetlen élőlényen belül történik.

A többsejtű állatok (és az emberek) esetében meg szokás különböztetni a testi (szomatikus) sejteket a csíravonal sejtjeitől. Az öröklődés szempontjából nem mindegy, hogy melyikben milyen mértékben halmozódnak a mutációk. Éppen ezért a csíravonal, mely a hímivarsejteket és petesejteket tartalmazza, korán elkülönül a szomatikus sejtektől. A növények esetében azonban nem tudjuk, létezik-e egyáltalán elkülönült csíravonal [2]. De ennek nincs is jelentősége, hiszen ha létezne is csíravonal, a sejtjei a többi őssejthez hasonlóan kellene hogy kövessék a rügyek keletkezését annak érdekében, hogy minimalizálják a mutációk felhalmozódását. Ennek következtében akár generatív úton (magképződéssel), akár vegetatív úton (például hajtásokkal, mint a rózsa, vagy indákkal, mint a szamóca) szaporodik egy növény, viszonylag kevés mutációt örökít át az utódokra.

Az elmúlt években megjelent néhány tanulmány, ami különböző növények mutációit vizsgálta. A tanulmányokban rendre a növények valamilyen differenciált szövetét: levelet, rügyet, termést szekvenáltak. Egy ilyen vizsgálat során az adott mintában nem egy-egy sejt genetikai kódját határozzák meg, hanem több sejtét összekeverve. Ez képet adhat arról, hogy a minta milyen típusú őssejtekből keletkezhetett, és legalább hány őssejt járult hozzá a mintához tartozó szövet képzéséhez. Fontos megemlíteni, hogy a rügyek merisztémáiban három őssejtréteg különböztethető meg. Az L1 réteg a növény felszínét borító epidermiszt hozza létre, az L2 főként az epidermisz alatt található, kloroplasztban gazdag mezofillumsejteket adja, míg az L3 a szár- és szállítószövetek (xilém és floém) fejlődéséért felelős. Bár ezek a rétegek morfológiailag elkülönülnek, nem ismert, hogy mennyire önfenntartóak, esetleg cserélődnek-e sejtek a rétegek közt. Korábbi tanulmányokból kiderült, hogy a levél mind a három őssejtréteg leszármazottjait tartalmazza, a termés héja az L1 rétegből, a termés húsa pedig az L2 rétegből eredeztethető. Ha tehát egy levélmintát szekvenálunk, és elemezzük a mutációit, legalább három őssejt leszármazottaival fogunk találkozni. Azért legalább három, mert lehet, hogy egy sejtrétegből két vagy több genetikailag különböző őssejt is hozzájárul a szövet kialakításához.

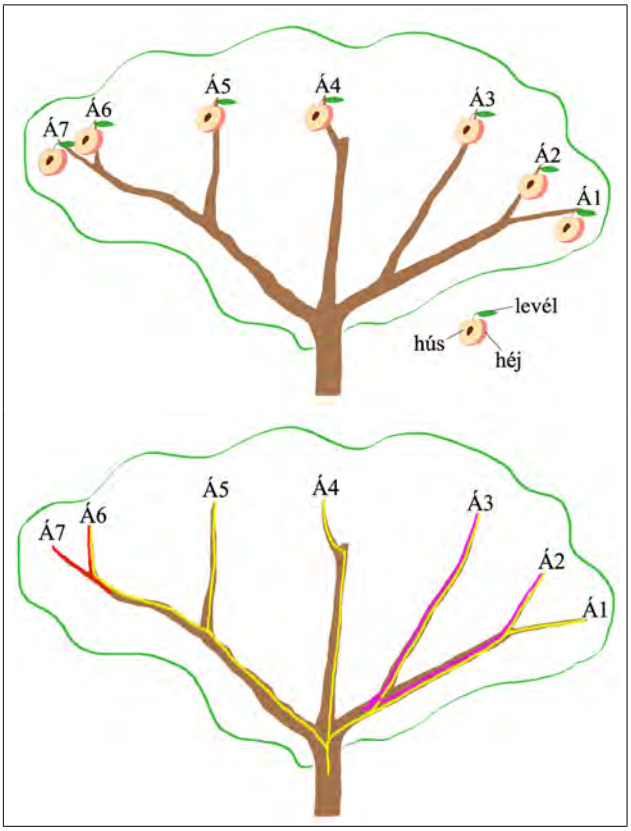
Mindezt úgy tudjuk meghatározni, ha azonosítjuk a minta DNS-ében fellelhető mutációkat. Ehhez először a sejtek DNS-ét ki kell nyerni, majd szekvenálni (leolvasni a bázissorrendet). A szekvenálási folyamat során a DNS-t rövid részekre vágjuk. Ezeket a rövid DNS-szakaszokat nevezzük olvasatoknak (read-eknek). Itt fontos kiemelni, hogy különbség van aközött, hogy egy eddig ismeretlen élőlény DNS-ét akarjuk meghatározni, vagy egy már ismert DNS-sel (referenciagenommal) akarjuk összehasonlítani a mintánkat. Az előbbi esetben általában minél hosszabb (néhány ezertől százezer bázisig) szakaszokra vágjuk a genetikai állományt, az utóbbiban általában rövidebb (50–500 bázis) szakaszokra, amit felsokszorosítunk. Ezután az elvágott és felsokszorosított szakaszok bázissorrendjét különböző technikákkal meghatározzuk. A mutációk azonosításához már ismerjük az eredeti bázissorrendet, amit a referenciagenom tartalmaz. Ezzel hasonlítjuk össze a mintánk DNS-eit.

A mutációk azonosítása azonban nem triviális feladat. A sok kis DNS-olvasatot, aminek már tudjuk a bázissorrendjét, különböző algoritmusokat használva a legjobban illeszkedő helyre tesszük a referenciában. Ez nagyjából annak felel meg, mint amikor egy mondat helyét szeretnénk megtalálni egy szövegben azzal a különbséggel, hogy itt betűk és írásjelek helyett négyféle (A,T,G,C jelű) bázis váltakozik, és a mutációk miatt a rövid mondatok (olvasatok) nem minidig egyeznek meg teljes mértékben a szöveg megfelelő mondatával. A felsokszorosítás és a több sejtet tartalmazó mintavétel miatt minden genomi pozíciót több ilyen olvasat fog lefedni. Ezek közül lesz olyan, ami meg fog egyezni a referenciával, mások viszont eltérést fognak mutatni. Az eltérések jelentik a lehetséges mutációkat. A mutáció lehet egy vagy több bázis kicserélődése, egy néhány bázis hosszúságú szakasz kitörlődése (deléciója) vagy beékelődése (inzerciója), illetve bonyolultabb, teljes kromoszómát érő elváltozás. A mutációk előfordulási gyakoriságának jellemzésére bevezethetjük a variáns allélfrekvenciát (VAF) mint a mutációt támogató olvasatok részarányát az adott genomi pozíción.

Ideális esetben, ha egy diploid (egy anyai és egy apai kromoszómakészletből álló) genomban megjelenik egy mutáció, az VAF = 0,5 értéket adna, hiszen egy mutáció általában csak az egyik kromoszómát (apai vagy anyai) érinti. A valóságban azonban ritkán beszélhetünk ideális esetről. Nagyon gyakran előfordul az, hogy rossz a referenciagenom, nem jó minőségűek az olvasatok. Az illesztés során is nagyon sok műtermék keletkezhet, például ha egy génszakasz több azonos vagy hasonló példányban is megtalálható a genomban.

Korábbi adatsor elemzése és néhány sejtvonal meghatározása

Nemrégiben megjelent egy tanulmány [3], amelyben a szerzők egy barackfa hét különböző ágáról gyűjtöttek mintákat (*1. ábra,* felső), és mindegyikből három szövetet – a termés héját, húsát és a közeli levelet – szekvenáltak. Így összesen 21 minta teljes genomját vizsgálták, amelyek mind több sejtből álltak. Mi az eredeti adathalmazt újrafeldolgoztuk: az olvasatokat újraillesztettük a referenciagenomhoz, majd azonosítottuk és kiszűrtük az ismétlődő régiókat (amik a teljes genom mintegy 40%-át tették ki).



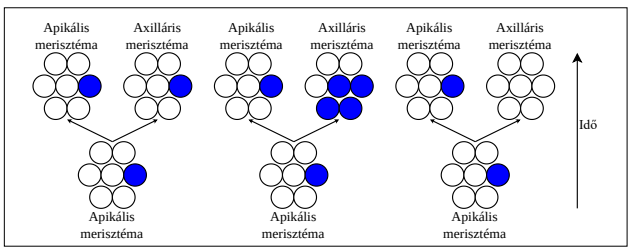
1. ábra. Felső kép: a vizsgált fa fizikai szerkezete számozott ágakkal, a mintavételek helyével. Alsó kép: az említett mutációk alkotta sejtvonalak behelyezve a valós fába. A berajzolt sejtvonalak nem keresztezik egymást

Az elemzés során több száz mutációt találtunk, amelyek különböző mintázatokat mutattak. Az első kategóriába azok a mutációk tartoztak, amelyek kizárólag egyetlen mintában fordultak elő – vagyis csak egy levélben, egy gyümölcshúsmintában, illetve egy gyümölcshéjmintában voltak kimutathatók. Ezek a mutációk nem érdekesek a számunkra, mert lehet, hogy a szövet kialakulása során a már differenciált sejtekben jöttek létre. A több mintában is előforduló mutációk viszont nagy valószínűséggel már az őssejtekre jellemzők.

Azonosítottunk olyan mutációkat, amelyek csak egy adott ághoz tartoznak, de az adott ág mindhárom mintájában jelen vannak (és így feltehetőleg az L2 őssejtrétegből származnak). Ezek már hordozhatnak információt arról, hogy egy-egy szövetet hány őssejt és milyen arányban hoz létre.

De a legérdekesebbek azok a mutációk, amelyek több ágról vett mintában is megtalálhatóak, mert ezek feltehetőleg még azelőtt jelentek meg az őssejt-populációban, hogy az adott ágak elkülönültek volna egymástól. Ezeket már érdemes összevetni a barackfa fizikai szerkezetével.

Találtunk például két olyan mutációt, amelyik a 6-os és 7-es ág mindegyik mintájában jelen van, ami arra utal, hogy ezek még azelőtt keletkeztek, hogy a két ág elvált volna egymástól (*1. ábra,* alsó, piros sejtvonal). Ugyanakkor találtunk olyan eseteket is, ahol a mutációk nem követik a fa fizikai szerkezetét. Két mutáció (*1. ábra,* alsó, sárga sejtvonal) például minden ágban megtalálható volt, kivéve a 7-est, ahol egyik mintában sem jelent meg. Ez arra utal, hogy az a sejtvonal, amelyben a mutáció keletkezett, nem vett részt a 7-es ág kialakításában – vagyis a különböző ágak eltérő őssejt-populációkból származnak. Hasonló a helyzet másik két mutációval (*1. ábra,* alsó, lilás sejtvonal), amelyeket kizárólag a 2-es és 3-as ágban találtunk meg, de az 1-esben nem.



2. ábra. Különböző merisztémaosztódási típusok. Bal szélső ábra: minden őssejt osztódik az apikális merisztémában, ami azt eredményezi, hogy az új axilláris merisztéma összetétele meg fog egyezni az apikális merisztéma őssejtjeivel. Középső ábra: az apikális merisztéma őssejtjeiből csak néhány, például kettő a hétből vesz részt az új axilláris merisztéma képzésében. Ha az egyik kiválasztott sejt mutált, a mutáció magasabb allélfrekvenciával jelenik meg az új ágon. A jobb szélső ábrán az új axilláris merisztémát véletlenszerűen éppen olyan őssejtek hozzák létre, amelyek nem tartalmazzák a mutációt, ezért az új ágon a mutáció nem lesz kimutatható

Hogyan tudjuk megmagyarázni ezeket a mintázatokat? Naivan azt gondolhatnánk, hogy a csúcsrügyben található apikális merisztéma összes őssejtje részt vesz minden új rügy létrehozásában (*2. ábra,* bal szélső), de az adatok mást mutatnak. Az allélfrekvenciák elemzése szerint csak néhány, de nem az összes őssejt járul hozzá egy-egy rügy kialakulásához. Ennek magyarázata: ha például az apikális merisztéma 7 őssejtből áll, melyek közül egy mutált, akkor minden új szövetben a mutáció várható allélfrekvenciája $0{,}5/7 \approx 0{,}07$ lenne (azaz 150-szeres lefedettség mellett körülbelül 10 olvasatban jelenne meg). A mért allélfrekvenciák azonban ennél jóval magasabbak, ami arra utal, hogy a rügyképzéshez valójában csak az őssejtek egy kis része járul hozzá. Tegyük fel például, hogy 7 őssejtből mindössze kettő vesz részt egy új ág kialakításában. Ekkor két eset lehetséges:

- ha a két őssejt közül az egyik hordozza a mutációt, akkor a várható allélfrekvencia $0{,}5/2 = 0{,}25$ (*2. ábra,* középső);
- ha egyikük sem mutált, akkor a mutáció nem jelenik meg az új ágban (*2. ábra,* jobb szélső).

Ez jól magyarázza, miért találunk sok mintában magas allélfrekvenciával egy adott mutációt, máshol pedig (akár a fa fizikai szerkezetével látszólag nem összeegyeztethető módon) miért tűnik el. Felmerülhetne, hogy a hiányzó mutációk oka a visszamutáció, azaz az eredeti bázissorrend visszaállása egy újabb mutáció hatására, ám ennek valószínűsége rendkívül kicsi, mi pedig elég gyakran találkozunk ilyen jelenséggel.

Hogyan tudjuk megadni azt a minimum őssejtszámot, ami kialakítja az új rügyet? Minden mutáció ugyanabban a 21 mintában lett azonosítva, ezért a mutációs mintázatoknak egyszerre kell teljesülniük. Ha például találunk egy mutációt, ami megjelenik a 2-es és 3-as ágban, de nem jelenik meg az 1-es ágban, ezzel párhuzamosan pedig találunk egy mutációt, ami megjelenik mindhárom ágban, az csak úgy lehet, ha több sejttípus alakítja ki az ágakat. Ezzel a módszerrel az összes mutációt figyelembe véve megadhatjuk a minimum őssejtszámot, ami képzi a rügyeket. Eddigi tapasztalataink szerint ez a szám nagyon kicsi, minden őssejtrétegből csak néhány sejt járulhat hozzá az új rügyek képzéséhez.

A megfigyeléseinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a növények úgy csökkentik az őssejtosztódásaik számát, hogy rügyképzésnél nem a csúcsrügy összes őssejtje, hanem annak csak kis hányada osztódik és építi fel az új oldalrügyet. Ez biztosítja, hogy minden csúcsrügyben nagyon ritkán osztódnak az őssejtek, és így nagyon kis mértékben vannak kitéve a mutációk megjelenésének. Néhány gyors, egymást követő osztódáson csak akkor esnek át, amikor felépítik az új oldalrügy őssejt-populációját, de mihelyt csúcsrüggyé válva új hajtást indít a rügy, már ismét nagyon ritkán fog egy-egy őssejt osztódni. Ez lehet a magyarázat arra is, hogy még több száz év alatt is miért osztódnak a tölgyfa ágcsúcsainak őssejtjei legfeljebb százszor.

Záró gondolatok

Fontos kiemelni, hogy minden módszer, amelyet használunk, szükségszerűen leegyszerűsíti a valóságban zajló biológiai folyamatokat. Számítások, modellezések és szimulációk során különböző közelítésekkel élünk: például feltételezzük, hogy az őssejt-populáció mérete állandó, és minden ágon azonos marad. Azt is adottnak vesszük, hogy az őssejtek osztódási mechanizmusa a fa teljes élettartama alatt változatlan, holott a természetben jól látható, hogy az idős fák kevesebb rügyet hoznak áganként, mint a fiatalabbak – ugyanakkor több ággal rendelkeznek, így összességében mégis több rügyet képezhetnek. Modelljeink nem veszik figyelembe a környezeti hatásokat sem, és minden mutációt neutrálisnak veszünk. Ez a feltételezés nagyrészt helytálló, hiszen a legtöbb mutáció valóban semleges, nem jár közvetlen előnnyel vagy hátránnyal. Ugyanakkor megfigyeltek már olyan eseteket is, amikor egy fa bizonyos része ellenállóbb volt bizonyos kórokozókkal szemben, ami arra utal, hogy egyes mutációk szelektív előnyt is hordozhatnak.

Mindazonáltal ezek az egyszerűsített modellek rendkívül hasznosak: segítségükkel jobban megérthetjük a

komplex biológiai folyamatokat, és számszerűsíthetjük azokat a jelenségeket, amelyeket a kísérleti adatokkal is összevethetünk. Így tehát ez a megközelítés lehetővé teszi, hogy az őssejtek közvetlen megfigyelése nélkül megértsük, milyen folyamatok révén korlátozzák a fák az őssejtjeik osztódását, és ezzel együtt a mutációk felhalmozódását.

Irodalom

1. Schmid-Siegert E., et al. (2017): Low number of fixed somatic mutations in a long-lived oak tree. *Nature plants,* 3(12), 926–929.
2. Lanfear R. (2018): Do plants have a segregated germline? *PLoS Biology,* 16(5), e2005439.
3. Goel M., et al. (2024): The vast majority of somatic mutations in plants are layer-specific. *Genome Biology,* 25(1), 194.

A FIZIKA TANÍTÁSA

KRAUSZ FERENC AZ ÖVEGES FIZIKAVERSENYEN

Lévainé Kovács Róza
az Öveges Fizikaverseny szervezőbizottságának elnöke
E-mail: levaine.kovacs.roza@gmail.com

A 2024–25-ös tanévben a 35. Öveges József Kárpát-medencei Fizikaverseny szervezői úgy döntöttek, a fizikatörténeti feladatok Krausz Ferenc fizikai Nobel-díjas professzor életéről és munkásságáról készüljenek.

A verseny történetében először fordult elő, hogy körünkben élő személyről szóltak a fizikatörténeti feladat kérdései. Nagy kihívás volt, de *Horváth Norbert Tamás,* a budapesti Baár-Madas Református Gimnázium tanára – alapos kutatómunkával – kiválóan megoldotta. A segédanyagokat évek óta ő állítja össze a versenyzők számára, így történt ez ebben az évben is. Felvette a kapcsolatot Krausz professzorral, majd többhónapos munka, egyeztetés, a kapcsolatok feltérképezése, interjúkészítések következtek. Az eredmény egy remek anyag lett, ami elnyerte a tudós elismerését is, aki így írt a visszajelzésében: „Kiváló összeállítás, nagyon szépen köszönöm." Az érdeklődők megtalálják az írást a verseny honlapján: https://ovegesfizikaverseny.samfules.hu/oveges/2024_25/irodalom.

A feladatsort mindkét fordulóhoz *Slezsák Zsolt* fizikatanár, szaktanácsadó, az ELFT Általános Iskolai Oktatási Szakcsoportjának elnöke állította össze, amelyet *dr. Kovács László* professzor lektorált.

A második forduló

A 2025. március 25-ei második fordulón, a vármegyei, fővárosi döntőn a versenyzőknek Krausz Ferenc életéről kellett számot adniuk. A feladat megoldottsága elmaradt a várakozástól, 32%-os lett.



Lévainé Kovács Róza a Karcagi Kováts Mihály Általános Iskola nyugalmazott intézményvezető-helyettese, Ericsson-díjas, Bonis Bona – A Nemzet Tehetségeiért Életműdíjas, Rátz Tanár Úr Életműdíjas mesterpedagógus. 2011 óta irányítja az Öveges fizikaverseny szervezését

A két véglet: az 1. feladat 65%-os eredménye volt a legjobb, a 372 megoldó közül 182 versenyző tudta, hol és mikor született a professzor (1962. május 17-én, Móron). Az 5. feladat 5 pontot ért, öt tanár nevét kellett felidézni és a kedvelt tantárgyakhoz rendelni. Mindössze 15 diák dolgozott hibátlanul, így ez a feladat lett a legkevésbé eredményes, 14%-os.

Az 5. feladat: gimnáziumi éveire mint élete legszebb éveire emlékszik vissza Krausz Ferenc. Kiket említ tanárai közül az iskola 60 éves fennállásának alkalmából készített riportban? Írd a tantárgy neve mögé a professzor tanárának nevét!

Megoldás:
fizika: __Cseh tanár úr__
kémia: __Farkas tanárnő__
matematika: __Klock tanárnő__
német: __Mátrai igazgató úr__
történelem: __Balogh tanár úr__

A versenyzők 60%-a tudta Magyarország térképén bejelölni Mór helyét (2. feladat).

Az eredményességi sorban a harmadik az 50%-os 4. feladat: „A képeken Krausz professzor általános és középiskolája látható. Melyek voltak ezek? Írd a képek alá az iskolák nevét!" (Radnóti Miklós Általános Iskola, Mór; Táncsics Mihály Gimnázium, Mór).

A 3. feladat 40%-os eredményt hozott: „Általános iskolai és későbbi gimnáziumi osztálytársától, Kőhidi Margittól megtudhattuk, hogy Ferenc nagyon szeretett sportolni. Mely sportágakat említi?" (futás, kerékpározás, pingpongozás).

A 10. feladat 30%-ot hozott: „Krausz Ferenc szociális érzékenysége is kitűnik a tudományos világban. Milyen adományokkal segítette az általa megalapított Science-4People szervezetet?" (a Wolf-díj és a Nobel-díj teljes összegét az S4P-nek adományozta).

A 30%-os eredményű 8. feladatban a 2023. évi fizikai Nobel-díjasok nevét kellett felsorolni úgy, hogy a feladat szövege tartalmazta a tudósok munkahelyét, országát (Pierre Agostini, Krausz Ferenc, Anne L'Huillier).

Meglepően rossz megoldottságra (25%) vezetett a 6. feladat: „1981 szeptemberében a BME Villamosmérnöki Kar hallgatója lett. Ezzel egy időben beiratkozott az ELTE fizikus szakára is. Így történhetett meg, hogy Magyarország két legkiemelkedőbb tudós tanárának tanítványa is lehetett. Kik voltak ők?" (Simonyi Károly, Marx György).

Az eredményességi sor végén a két 20%-os feladat áll, a 7. és a 9., feltehetően azért, mert ezek kicsit a munkásséghoz is kapcsolódnak. 7. „Diplomamunkájának témáját Juhász Tibor kollégája javasolta. Mivel foglalkozott a dolgozata?" (rövid idejű lézerimpulzusok mérése). 9. „Krausz professzor 2019-től Magyarországon is kutatást vezet. Mely központban vezető és mi a kutatás célja?" (Molekuláris Ujjlenyomat Kutató Központ, vérminták molekuláris ujjlenyomata).

A harmadik forduló

A 35. Öveges József Kárpát-medencei Fizikaverseny május 23–25-ei országos döntőjének megnyitójára személyesen nem tudott elmenni Krausz professzor, de videóüzenetben lelkesítette a verseny előtt álló fiatalokat. Néhány gondolat a filmből:

„... Ez a verseny nem csupán egy megmérettetés, hanem egy remek lehetőség arra, hogy a tudásotokat, önmagatokat próbára tegyétek. Gratulálok mindannyiótoknak, hogy idáig eljutottatok, hiszen az is hatalmas teljesítmény, hogy döntősök vagytok! Azt bizonyítja, hogy kíváncsiak, kitartóak és tehetségesek vagytok. Éppen ezek a tulajdonságok viszik előre a tudományt. Ez a verseny nemcsak arról szól, hogy ki ér el jobb eredményt, hanem arról is, hogy találkozhattok olyan diáktársaitokkal, akiket ugyanúgy lenyűgöz a fizika, mint titeket. Éppen ezért ne ellenfelekként tekintsetek egymásra! A terem, ahol éppen vagytok, tele van olyan fiatalokkal, akikkel közös az érdeklődésetek. Némelyikükből akár életre szóló barátok is válhatnak. ... Kívánom, hogy az itt eltöltött idő legyen tele izgalmas kihívásokkal, szerezzetek új tapasztalatokat, és élvezzétek a verseny minden pillanatát! Mindenkinek sok sikert kívánok!"

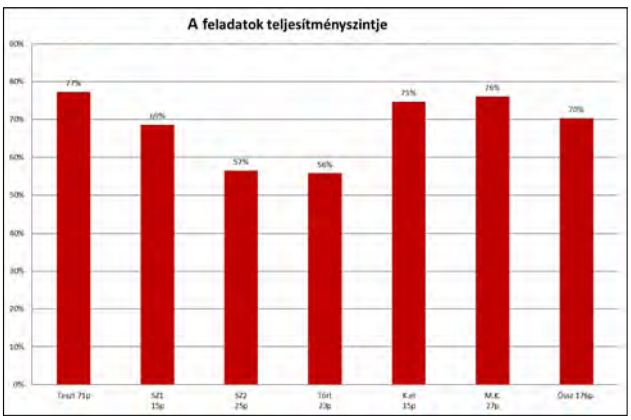


A videóüzenet lejátszása a győri városháza dísztermében, a megnyitón

A versenykiírás szerint „A fizikatörténeti feladat témája: Krausz Ferenc (2023-ban fizikai Nobel-díjat kapott magyar fizikus) élete, munkássága a döntőben kiegészül még Öveges József élete és munkássága ismeretével." Ebben az évben az utolsó három kérdés kapcsolódott Öveges József professzor életéhez, munkásságához.

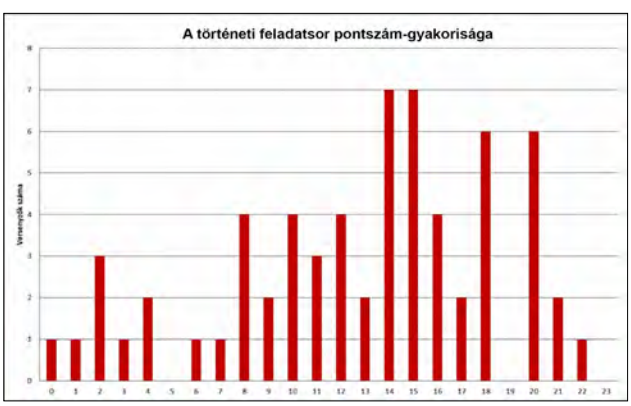
Az országos döntőn ismét a fizikatörténeti feladat volt a legkevésbé sikeres (a második fordulóhoz, de a korábbi országos megmérettetésekhez viszonyítottan is), 56%-os eredményességgel. Pozitívumként kell elkönyvelni, hogy a 2. forduló 32%-os teljesítményéhez képest jelentősen jobb ez az eredmény.

A javítóbizottság értékeléséből néhány gondolat: „A megyei megoldáshoz képest sokkal több magas pontszám született. Néhányan a kérdésekre válaszolva plusz információkat is írtak. Pár versenyzőnél a nevek helyesírása nem volt megfelelő."



Az egyes feladatokban és a teljes versenyen nyújtott teljesítmény. (Az ábrán az egyes oszlopok jelentése rendre: teszt, 1. számítási, 2. számítási, fizikatörténeti, kísérletelemzési, mérőkísérleti feladat eredménye, összeteljesítmény.)

A döntőn induló 64 tanuló fizikatörténeti felkészültsége, teljesítménye igen nagy szórást mutat. Hét-hét fő ért el 14-15 pontot, 18 és 20 pontos hat-hat versenyző lett. Összesen tízen maradtak el leginkább a mezőnytől, ami az indulók 15,6%-a.



Az ábra a versenyzők számát mutatja a fizikatörténeti feladatban elért pontszámok szerint

A szerezhető 23 pontból a legfelkészültebb *Csikós Attila,* a budapesti Városmajori Gimnázium diákja 22 pontot ért el, ezért *Szelecz Lászlónak,* a Péri Öveges József Általános Iskola igazgatójának 16 000 Ft-os könyvutalványát kap-

ta. Felkészítője, *Kurunczi Sándor* tanár úr az Eötvös Loránd Fizikai Társulat által felajánlott könyvet vehette át.



Középen a különdíjas versenyző, balra a felkészítője, jobbra a díj felajánlója, átadója

A feladatsor Krausz Ferencre vonatkozó része, zárójelben a megoldás:

1. 1962. május 17-én, Móron született Krausz Ferenc. Milyen jelentős esemény történt születése előtt pár nappal? (Az amerikai lézeres Hold-letapogatás.)
2. A képeken Krausz professzor három jelentős tanára látható. Kik ők? Írd a képek alá a nevüket! (Kiss Károly, Klock Júlia, Láng Hugó.)



3. Melyik két egyetemen tanult egyidőben? (A BME Villamosmérnöki Karán és az ELTE fizikus szakán.)



4. 1985-ben a befejezi egyetemi tanulmányait. A BME-n diplomát szerez. Diplomamunkájának témája a rövid idejű lézerimpulzusok mérésével foglalkozik. Mit jelentett ebben az időben a „rövid idő”? Hányszorosa ez az attoszekundumnak? (Milliószorosa.)
5. A nagy elődök. Krausz Ferenc mellett büszkék lehetünk hazánk Nobel-díjjal kitüntetett tudósaira. Kiket ábrázolnak a képek? Írd alá a nevüket! (Szent-Györgyi Albert, Karikó Katalin, Békésy György, Gábor Dénes, Wigner Jenő)
6. A Svéd Királyi Akadémia úgy döntött, hogy 2023-ban a fizikai Nobel-díjat két társával megosztva Krausz Ferencnek ítéli oda. Mi volt a kutatási területük, amivel kiérdemelték a díjat? (Az attoszekundumos fényfelvillanások kísérleti előállításáért, amelyekkel az anyagok elektronjainak mozgása tanulmányozható.)
7. Egészítsd ki az alábbi szöveget! Krausz Ferenc a következőképpen magyarázza a világon egyedülálló ujjlenyomat-kutatási módszerét:

„Rendkívül rövid ___ fényimpulzusokat használunk, amelyekkel ___ a vérmintát. Ez a fényimpulzus meggerjeszti a molekulát, és a molekulák sok frekvencián rezgésbe jönnek, amelyek jellemzőek a ___. Olyan ez, mint a hangvilla válasza, ha megpendítjük. A gerjesztésre adott választ nevezhetjük a vér molekuláris ___. Ezt a jelet tudjuk nagy érzékenységgel mérni az ___ méréstechnika segítségével.” (A kiegészítés rendre: infravörös, átvilágítjuk, molekulára, ujjlenyomatának, attoszekundumos)

Összegzés

A 2024–25-ös tanév Öveges versenyének mottója: „A kísérlet igazolta a várakozásunkat.” Öveges professzor népszerű gondolata nem állta meg a helyét az idei fizikatörténeti feladat vonatkozásában. A szervezőbizottság abban bízott, hogy a 2023-ban fizikai Nobel-díjat kapott magyar fizikus élete és munkássága felkelti a tanulók érdeklődését és alaposan felkészülnek a 2-3. fordulóra a kiadott segédanyagból. Az eredmények nem igazolták a várakozásunkat. A döntőbe jutottak a vármegyei fordulóhoz képest többet foglalkoztak a fizikatörténeti feladatokra való felkészüléssel, de még nem eleget. Felvetődik a kérdés, megfelelő volt-e a témaválasztás. Mindenképpen igen, hisz legalább ezek a gyerekek foglalkoztak a kiadott segédanyaggal, ismerkedtek a Nobel-díjas fizikussal, néhány információt megjegyeztek az életéről, olvastak a munkásságáról. Ha Krausz Ferenc példája motivál pár versenyzőt a jövőben, és a fizika felé orientál a pályaválasztásnál, akkor már megérte a befektetett munka, a ráfordított energia.

MEGHÍVÓ

Az Eötvös Loránd Fizikai Társulat
küldöttgyűlésére

az Eötvös Loránd Tudományegyetem
Déli épülettömb 0.803-as Szabó József termébe.
Budapest XI. Pázmány Péter sétány 1/C

2026. május 16. szombat 10:00 órára

Ha a küldöttközgyűlés a meghirdetett időpontban nem lenne határozatképes, akkor 10:30-ra ismét összehívjuk, és a küldöttgyűlés a napirend előtti szakmai előadás után kezdi meg a munkáját. Az ily módon ismételten összehívott küldöttgyűlés határozatképes, tekintet nélkül a megjelent küldöttek létszámára.

A küldöttgyűlés hagyományosan napirend előtti szakmai előadással kezdődik 10:00 órakor.

Dr. Csonka Szabolcs
BME Fizika Tanszék
„A 2025. évi Fizikai Nobel-díj: a makroszkopikus kvantumos alagutazástól a kvantumszámítógépek felé" címmel tart előadást

Az ELFT elnöksége a következő napirendi pontokat javasolja a küldöttgyűlésnek:

1. A Társulat elnökének megnyitója
2. A napirend elfogadása
3. A Szavazatszámláló Bizottság és a jegyzőkönyv-hitelesítők felkérése
4. Főtitkári beszámoló
   4.1. A Társulat 2025. évi közhasznúsági jelentése
   4.2. A Társulat 2026. évi költségterve
5. A Felügyelőbizottság jelentése
6. Vita a 4., 5. pontokról és nyílt szavazás pontonként
7. A Társulat díjainak átadása
8. Egyebek
9. Zárszó

A küldöttgyűlés nyilvános, azon bárki részt vehet. A vitákban a Társulat tagjai részt vehetnek, felszólalhatnak, de a szavazásban csak a területi és szakcsoportok által megválasztott, küldöttigazolvánnyal rendelkező küldöttek vehetnek részt.

A küldöttek a küldöttigazolványukat a jelenléti ív aláírásakor a helyszínen, a regisztráció alkalmával tudják átvenni!

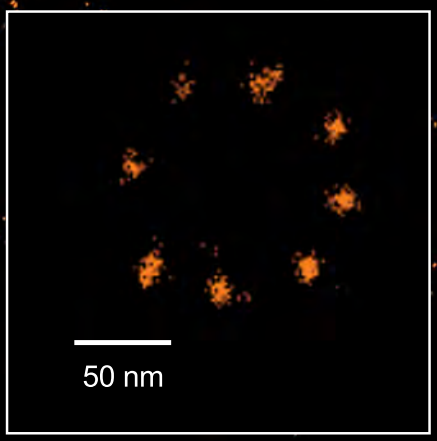
abberior

MINFLUX

Molekuláris felbontás a világ legerősebb fluoreszcens mikroszkópjával

(a)

(a)



500 nm

A magpórus komplex alegységeinek *2D MINFLUX* képe. A SNAP-tag® NUP96-ot termelő, fixált emlőssejteket *abberior FLUX 647 SNAP*-pel jelöltük meg. A konfokális mikroszkópiával ellentétben a *2D MINFLUX* lehetővé teszi a magpórus komplex egyes alegységei alakjának és elrendezésének megjelenítését.

A stabil U2OS NUP96 SNAP sejtvonalat Prof. Dr. Jan Ellenberg és Dr. Jonas Ries, EMBL Heidelberg biztosította



UNICAM Magyarország Kft.