

NOWE BARWY ŚWIATA



Od biologii molekularnej, przez medycynę i chemosensory, aż po organiczne diody emitujące światło białe.

Nie sposób opisać wszystkich zastosowań fluorescencji.

JERZY KARPIUK

PRZYKŁADEM popularnej techniki fluorescencyjnej stosowanej w badaniach struktury biomolekuł jest metoda FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) – lub trafniej: Förster – Resonance Energy Transfer). W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko przeniesienia energii wzbudzenia między podjednostką biocząsteczki, pełniącą funkcję donora energii, a podjednostką pełniącą funkcję akceptora. Można w ten sposób wyznaczyć odległość między tymi podjednostkami. Przeniesienie energii zachodzi za pomocą zdalnego (nawet do 10 nm) oddziaływania elektrycznego donora z akceptorem, możliwego dzięki nierównomiernym rozkładom ładunków jąder i elektronów. Donor i akceptor można opisywać jako dipole elektryczne o niezerowym momencie dipolowym, wielkości charakteryzującej przestrzenny rozkład zbioru ładunków. Każdy z tych dipoli „wyczuwa” pole elektryczne partnera, co prowadzi do oddziaływania sprzęgającego donora z akceptorem. Dzięki temu

Transgeniczna mysz z genem meduzy (Aequorea victoria) kodującym zielone białko fluorescencyjne GFP. Gen ten został wprowadzony do zapłodnionego jaja myszy przy użyciu wirusa (laboratorium M. Okabe z Uniwersytetu w Osace). Białko GFP można stosować do znakowania komórek rakowych lub leków i śledzenia ich przemieszczania w organizmie.

wzbudzenie donora przenosi się na akceptor i może na nim pozostać. Podczas eksperymentu FRET wzbudza się selektywnie donory i na podstawie osłabienia ich fluorescencji oraz wzrostu natężenia fluorescencji akceptora ocenia wydajność procesu przeniesienia energii. Następnie, wykorzystując znaną z teorii (zapropozowaną w 1949 roku przez Theodora Förstera, stąd Förster w nazwie FRET) zależność tego parametru od odległości, wyznacza się odległość między donorem a akceptorem.

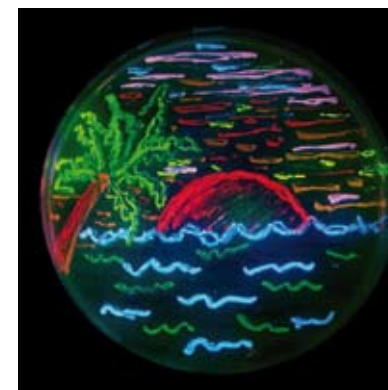
Samo zjawisko międzymolekularnego przeniesienia energii – fascynujący przykład „wyczuwania się” cząsteczek na odległość – jest rozpowszechnione w przyrodzie i stanowi ważne ogniwo procesu fotosyntezy. W technice FRET umożliwia m.in. badanie struktury przestrzennej biomolekuł, śledzenie ich dynamiki konformacyjnej czy oddziaływań z innymi cząsteczkami. Postępy spektroskopii pojedynczych cząsteczek pozwoliły w 1996 roku na połączenie

techniki FRET z fluorescencyjnym obrazowaniem pojedynczych cząsteczek i badanie w czasie rzeczywistym zmian w strukturze, oddziaływaniach i dynamice biocząsteczek. Badania w skali pojedynczych cząsteczek oznaczają także możliwość indywidualizacji obiektów badań fluorescencyjnych, a tym samym otwierają nowe perspektywy badań genetycznych czy diagnostyki medycznej.

Sondowanie mikroświata

Fluorescencja emitowana przez cząsteczki, polimery lub nanoobiekty ma zasadniczą przewagę nad radioizotopami używanymi wcześniej masowo do znakowania w biologii, biochemii i medycynie: nie tylko sygnalizuje obecność fluoroforów w badanym układzie, ale również niesie wiele różnych informacji na temat ich lokalizacji i otoczenia, a także, co bardzo ważne, ich fizycznych lub chemicznych oddziaływań z otoczeniem. Do sondowania tych oddziaływań używa się odpowiednio dobranych cząsteczek, szczególnie czułych na badane właściwości otoczenia, zwanych próbnikami lub sondami fluorescencyjnymi. Oczywiście, próbniaki muszą spełniać inne wymagania niż znaczniki fluorescencyjne. Dobierając zarówno próbniaki, jak i metody ich wzbudzania i detekcji emisji, można obecnie badać obiekty i zjawiska w skali od pojedynczych cząsteczek

Zachód słońca na plaży w San Diego namalowany koloniami żywych bakterii, wytwarzających białka fluorescencyjne w ośmiu różnych barwach. Różne kolory białek fluorescencyjnych uzyskano przez odpowiednie mutacje bakterii.



do dziesiątków kilometrów. Od wielu lat próbniaki fluorescencyjne wykorzystują zależność widma emisji fluoroforu od jego otoczenia, najczęściej polarności, ale także protyczności czy wartości pH.

Naturalną sondą w badaniach struktury białek jest tryptofan – kapryśny spektroskopowo aminokwas o fluorescencji silnie zależnej od otoczenia ze względu na obecność dwóch stanów elektronowych o zbliżonej energii. Coraz większą rolę zaczynają jednak odgrywać biosensory fluorescencyjne, czyli funkcjonalne połączenia biomolekuł lub struktur biologicznych (np. przeciwciał) z barwnikami fluorescencyjnymi. Poza przeniesieniem energii (jak w technice FRET) w sensorach wykorzystuje się inne procesy fotofizyczne, takie jak fotoindukowane przeniesienie elektronu czy protonu i wygaszanie fluorescencji.

Oczy oknami duszy

Ciekawym przykładem biosensingu są testy fluorescencyjne wykrywające wczesne stadia choroby Alzheimera – polegają na badaniu oczu pod kątem sprawdzenia obecności charakterystycznych dla tej choroby peptydów amyloidu beta. Akumulują się w mózgu w postaci patologicznych agregatów, tzw. płytek starczych, te neurotoksyczne peptydy indukują procesy zapalne i uwalnianie reaktywnych form tlenu, co prowadzi do śmierci sąsiednich neuronów. Takie same peptydy odkładają się także w oczach, tworząc na soczewkach złogi charakterystyczne dla choroby Alzheimera.

Zmiany zwiastujące tę chorobę nie pogarszają wzroku i nie można ich wykryć podczas rutynowego badania u okulisty. Ujawniają się natomiast przez fluorescencję znaczników, które po podaniu w kroplach do oczu przechodzą przez soczewkę i po specyficznym związaniu z amyloidem w warunkach wzbudzenia światłem o odpowiedniej długości fali emitują fluorescencję. Ten rodzaj fluorescencyjnego biosensora jest szczególnie ważny ze względu na brak biomarkerów *in vivo* tej choroby i trudności z diagnostyką struktur wewnątrz mózgu.

Ze względu na ogromne zainteresowanie wykryciem („monitorowaniem”) indywiduów chemicznych, których nie można bezpośrednio uwidocznić metodami luminescencyjnymi – takich jak tlen, protony, ditlenek węgla, glukoza, mocznik czy jony metali – w ostatnich latach szczególnego znaczenia zaczęły nabierać fluorescencyjne sensory chemiczne zwane też chemosensorymi – układy przetwarzające informację chemiczną (np. zachodzenie reakcji chemicznej albo właściwość badanego układu) w użyteczny analitycznie sygnał fluorescencyjny. Chemosensory fluorescencyjne składają się z części receptorowej, która odbiera informację chemiczną z badanego układu (np. roztworu zawierającego jony wykrywanych metali) oraz części przetwarzającej, której zadaniem jest przetworzenie informacji chemicznej w sygnał fluorescencyjny. Takie sensory odznaczają się bardzo wysoką selektywnością, umożliwiającą np. wykrywanie jonów jednego rodzaju

metalu w obecności wielu innych, wysoką czułością oraz krótkim czasem odpowiedzi.

Przykładem intensywnie rozwijanych ostatnio układów tego typu są rodaminowe sensory ciężkich metali. Rodaminy są znanymi od 1887 roku barwnikami ksenonowymi, które – zależnie od polarności i protoczności środowiska – mogą istnieć w formie bezbarwnej (z uwagi na strukturę tych barwników zwanej laktonową lub zamkniętopierścieniową) lub w formach barwnych, jonu obojnego i kationowej (zwanymi otwartopierścieniowymi). Forma bezbarwna różni się od barwnej brakiem wiązania C=O, dzięki czemu układy sprzężonych wiązań π -elektronowych w obu formach są całkowicie różne. W chemosensorych wykorzystuje się fakt, że przy wzbudzeniu światłem widzialnym forma bezbarwna nie fluoryzuje, natomiast barwna emituje bardzo silną fluorescencję. Chemosensory rodaminowe konstruuje się tak, aby skompleksowanie odpowiedniego jonu metalu prowadziło do dysocjacji wiązania C=O w formie bezbarwnej i wytworzenia formy barwnej, której obecność w roztworze można ilościowo badać, mierząc fluorescencję.

ŚWIECĄCE ZNACZNIKI

Fluorescencyjne białka to obecnie jedno z najbardziej przydatnych i najczęściej wykorzystywanych narzędzi biologii molekularnej. Ich



„naukowa” historia rozpoczęła się w 1992 roku, kiedy to w czasopiśmie „Gene” opublikowano sekwencję genu kodującego białko zielonej fluorescencji (GFP – green fluorescent protein) z meduzy *Aequorea victoria*. W kolejnych latach badacze ulepszali białko, poszukując mutacji zwiększających jego stabilność i intensywność fluorescencji. GFP jest trwałe i niereaktywne (podobnie jak jego pochodne), co czyni je wyjątkowo przydatnym podczas „podglądania” pod mikroskopem fluorescencyjnym procesów zachodzących w żywych komórkach. Fluorescencyjne białka „doczepia się” dziś standardowo do tych białek, których zachowanie chcemy śledzić (dokładniej rzecz biorąc, odbywa się to na poziomie konstruktów genowych). Dzięki takiemu znacznikowi można na przykład poznać lokalizację w komórce interesującego nas białka bądź partnerów, z którymi wchodzi ono w interakcję. Możliwe jest też wykorzystanie GFP do monitorowania niektórych bardziej „ogólnych” stanów komórki, jak na przykład wykrywanie zmiany pH lub obecności jonów określonego rodzaju (prawidłowa, zdolna do fluorescencji forma białka powstaje wtedy tylko w określonych warunkach). Za badania nad GFP Martin Chalfie, Osamu Shimomura i Roger Y. Tsien otrzymali w 2008 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Fluorescencyjne białko znalazło także zastosowanie pozanaukowe – w Stanach Zjednoczonych można zamówić do domowego akwarium fluorescencyjne rybki GloFish (to zmodyfikowany genetycznie danio pręgowany).

(AW)

Przyroda stroni od fluorescencji

W odróżnieniu od człowieka, przyroda rzadko wykorzystuje fluorescencję jako sygnał komunikacyjny. Molekuły o istotnym znaczeniu dla życia – DNA, białka – nie tylko nie fluoryzują, ale ulegają tak szybkiej dezaktywacji bezpromienistej, że w czasie życia stanu wzbudzonego nawet nie zdążą wyemitować promieniowania. Wydaje się, że istnieje co najmniej kilka powodów, dla których biomolekuły praktycznie nie fluoryzują.

Po pierwsze, fluorescencja jest w istocie marnowaniem pochłoniętej przez cząsteczkę energii, którą organizm żywy może lepiej spożytkować, np. zamieniając energię wzbudzenia na formę użyteczną chemicznie – potencjał redoks – a w konsekwencji na energię wiązań chemicznych w procesie (skądinąd niewydajnej) fotosyntezy.

Po drugie, musimy pamiętać, że absorpcja promieniowania przenosi cząsteczki do stanów wzbudzonych, których chemia może być dużo bardziej gwałtowna niż stabilnych stanów podstawowych, natomiast fluorescencja jest procesem powolnym w molekularnej skali czasu (miliony razy wolniejszym niż jedno drganie w cząsteczce). Cząsteczka, czekając, aż uda się jej wyemitować foton, może ulec zabójczym procesom fotochemicznym – fotodysocjacji (przerwaniu wiązania w stanie wzbudzonym), izomeryzacji czy reakcji z inną cząsteczką. Przypomina to chodzenie boso po rozgrzanych węglach – oparzenie nie powstanie, jeśli kontakt stopy z gorącym węglem jest wystarczająco krótki.

Jeśli fotodysocjacja wystąpi w jednym ze składników DNA, np. w zasadzie nukleinowej, nieodwracalne zmiany w tej cząsteczce mogą uniemożliwić prawidłową replikację DNA, a w konsekwencji doprowadzić do zwyrodnienia lub śmierci komórki. Dlatego organizmy żywe bronią się przed szkodliwym, wysokoenergetycznym promieniowaniem UV, zamieniając w ultrazszybkiej przemianie energię wzbudzenia na energię drgań. Być może dzięki temu dzisiejsze składniki materii żywej wygrały w konkurencji z innymi cząsteczkami, które żyjąc dłużej w singletowym stanie wzbudzonym, były podatniejsze na fotochemię.

W DNA energia zaabsorbowanych, potencjalnie niebezpiecznych, fotonów jest bardzo szybko (w skali czasu drgań wiązań chemicznych) zamieniana na energię oscylacyjną wiązań wodorowych i poprzez te wiązania przekazywana otoczeniu. Wiązania wodorowe są wszechobecne w cząsteczkach biologicznych i odgrywają niezwykle ważną rolę – wyznaczają strukturę DNA i są podstawą trzecio- i czwartorzędowej struktury białek. Za wyjaśnienie mechanizmu fotostabilności cząsteczek biologicznych Fundacja na rzecz Nauki Polskiej przyznała w 2008 roku prof. Andrzejowi Sobolewskiemu z Instytutu Fizyki PAN w Warszawie swoją doroczną nagrodę, tzw. polskiego Nobla.

Na tym da się zarobić

Wiadomo już od czasów Monardesa, a przede wszystkim Duranda, dostawcy fluoresceiny na potrzeby eksperymentu na górnym Dunaju, że na fluorescencji można zbić fortunę. Niebawem powodzenie metod fluorescencyjnych w technice, a zwłaszcza

w biologii i medycynie, ma oczywiście swój aspekt ekonomiczny – specjalistyczną wiedzę i kreatywną wyobraźnię można było (i da się nadal) wykorzystać do opracowania nowych fluoroforów przeznaczonych do najróżniejszych zastosowań, a także metod ich obrazowania oraz technik uzyskiwania informacji.

Doskonałym przykładem wycucia ducha epoki było powstanie i rozwój wspomnianej amerykańskiej firmy Molecular Probes. Firma ta – czołowy producent i dostawca barwników dla biologii, biochemii i medycyny – rozpoczęła działalność w kuchni Richarda i Rosarii Hauglandów, którzy w 1975 roku pomyśleli, że produkcja barwników fluorescencyjnych do badań biomedycznych może być ich pomysłem na życie. 10 lat później przedsiębiorstwo zatrudniało 20 pracowników, w 2002 roku – 220, w latach 1990–2002 odnotowywało stopę wzrostu na poziomie 20–25% rocznie i dopracowało się 2600 wysoce specjalistycznych produktów w ofercie! Przejęta w 2003 roku za 325 mln dolarów przez koncern Invitrogen, Molecular Probes wprowadziła na rynek takie barwniki, jak Alexa Fluor®, BODIPY czy specjalne barwniki używane przy sekwencjonowaniu DNA, a jej stale modyfikowany i wznawiany w szeregu wydań katalog molekularnych próbników fluorescencyjnych osiągał nakład setek tysięcy egzemplarzy i jest bezcennym źródłem wiedzy na temat fluorescencji cząsteczek.

Barwniki i próbki fluorescencyjne Molecular Probes stały się światowym standardem w biologii i medycynie, natomiast barwniki laserowe zapewniły w latach 70. sukces niemieckiej firmie Lambda Physik, która stała się światowym liderem na rynku techniki laserowej. Było to w czasach, kiedy w laboratoriach na całym świecie królowały lasery barwnikowe, a laser tytanowo-szafirowy był tylko jedną z nowinek.

Barwniki i próbki fluorescencyjne Molecular Probes stały się światowym standardem w biologii i medycynie, natomiast barwniki laserowe zapewniły w latach 70. sukces niemieckiej firmie Lambda Physik, która stała się światowym liderem na rynku techniki laserowej. Było to w czasach, kiedy w laboratoriach na całym świecie królowały lasery barwnikowe, a laser tytanowo-szafirowy był tylko jedną z nowinek.

Inżynieria fluoroforów

Druga dekada XXI wieku, a zapewne także i następne, z pewnością nie będą uboższe w szanse i wyzwania dla „branży fluorescencyjnej”. Wręcz przeciwnie, upowszechnienie spektrofotometrii, rozwój technik



Mikroskop fluorescencyjny.

Powyżej: Laser barwnikowy – do niedawna podstawowe narzędzie badawcze czasowo rozdzielczej spektroskopii molekularnej.



fluorescencyjnych w ostatnim dwudziestolecu oraz powstanie nanoskopii na początku XXI wieku przyczyniło się do stworzenia ogromnego zapotrzebowania na nowe fluorofory do nowych zastosowań. Nadchodzi także epoka nowych źródeł światła, organicznych diod luminescencyjnych (OLED), w których pierwsze skrzypce zagrają elektrycznie generowana fluorescencja i fosforescencja cząsteczek organicznych, chemia będzie więc musiała dotrzymać kroku temu wzrostowi oczekiwań. Chemicy z pewnością nie zasypiają gruszek w popiele, a poszukiwania nowych emiterów przyniosły wiele bardzo ciekawych efektów.

W ciągu ostatniej dekady zadomowiły się w laboratoriach jaskrawo świecące nanocząstki półprzewodnikowe, których widmo fluorescencji jest określone głównie ich wielkością. Zmieniając średnicę nanocząstki selenku kadmu z 2 do 12 nm, przechodzimy z emisją od ciemnego błękitu do głębokiej czerwieni, co jest wynikiem charakterystycznej dla kropek kwantowych zależności struktury elektronowej nanocząstki od jej wymiarów. Funkcjonalizacja fluoryzujących nanocząstek oraz ich łączenie z biomolekułami i mikrostrukturami biologicznymi jest przedmiotem intensywnych prac w wielu laboratoriach.

Inną klasę nowych fluoroforów stanowią związki metaloorganiczne, w tym głównie kompleksy lantanowców i platynowców. O ile te pierwsze zyskały już sławę markerów luminescencyjnych w testach immunologicznych, o tyle czas tych drugich dopiero nadchodzi – kompleksy irydu stanowią podstawę wprowadzanych na rynek OLED-ów. Uhonorowane Nagrodą Nobla w 2008 roku białka fluorescencyjne stały się poważnym narzędziem biologii molekularnej (ramka).

Podstawą do opracowywania nowych fluoroforów o zadanych właściwościach jest wiedza na temat ich fotofizyki i właściwości luminescencyjnych w różnych warunkach i otoczeniu. Ciekawe, że pomimo trwających ponad 100 lat badań fluorescencji nadal nie umiemy przewidywać ze „stuprocentową” pewnością,

czy zaprojektowana struktura molekularna lub nowo zsyntetyzowane indywiduum chemiczne będzie emitować wydatną fluorescencję. Także widmo, a co za tym idzie kolor fluorescencji cząsteczek organicznych, można przewidywać tylko w przybliżeniu. Chemia i fizyka dorobiły się w tej dziedzinie jedynie zbioru reguł, przeważnie empirycznych, pozwalających prognozować, jaki kierunek syntezy chemicznej może zaowocować większą wydajnością fluorescencji albo jak zmodyfikować już istniejącą strukturę, aby tę wydajność podwyższyć. Projektowanie struktur nowych fluoroforów będzie z pewnością wymagało także rozwoju podstaw teoretycznych.

Ciekawym zadaniem stojącym przed tą nową dziedziną na pograniczu chemii, fotofizyki i elektroniki molekularnej jest opracowanie białych fluoroforów – cząsteczek i układów molekularnych emitujących światło białe. Emisja światła białego przez proste układy molekularne jest bardzo pożądanym i poszukiwanym zjawiskiem, głównie ze względu na jego ewentualne zastosowanie w organicznych diodach luminescencyjnych. Do ciągłego pokrycia obszaru widzialnego, np. od 430 do 700 nm, potrzebne są emisje o szerokości spektralnej przynajmniej 9000 cm^{-1} . Fluorescencję o takiej szerokości spektralnej może zapewnić jedynie połączenie dwóch lub więcej pasm emisji pochodzących z różnych stanów wzbudzonych cząsteczki. Dobrym kandydatem na takie emitery mogą być zbadane niedawno w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie ekscypleksy wewnątrzcząsteczkowe wykazujące podwójną fluorescencję o cechach światła białego.

A więc fluorescencja!

Być może ten, z konieczności skrótowy i fragmentaryczny, przegląd zastosowań fluorescencji skłoni Czytelników do bliższego zainteresowania się promieniowaniem emitowanym przez cząsteczki. Analiza tego promieniowania jest jednym z najważniejszych źródeł wiedzy o świecie. Fluorescencja odsłania go w niezwykły sposób, wzbogacając o dodatkowy wymiar nasze postrzeganie wzrokowe.

Fluoryzujące molekuly odpowiadają światłem na delikatne pobudzenie promieniowaniem, przekazu-



Współczesna wersja eksperymentu Ehrlicha (patrz str. 21) w diagnostyce chorób oka.

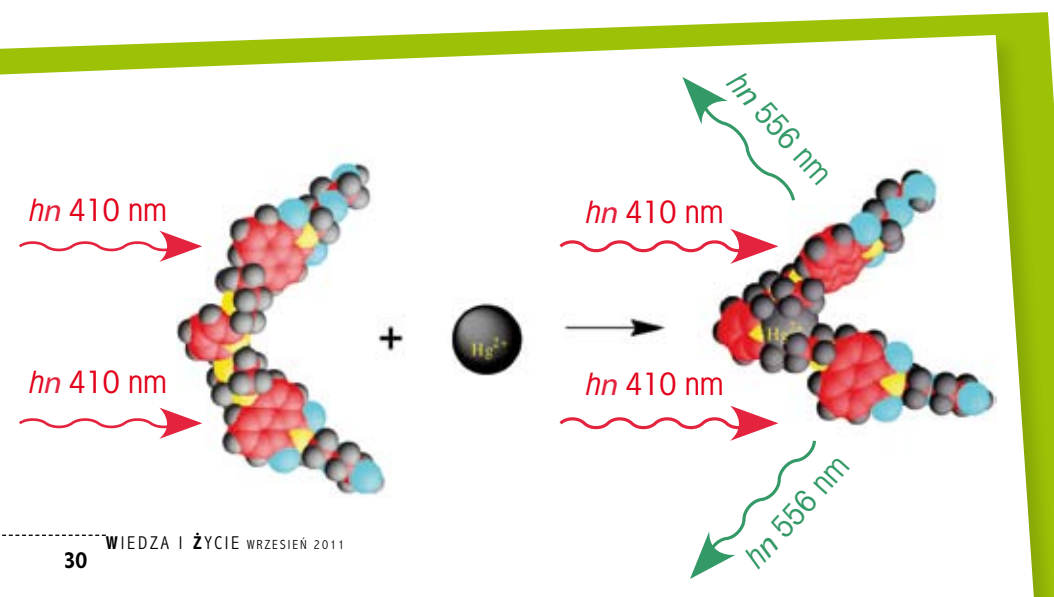
jąc informacje o sobie i swoim otoczeniu, informacje, których uzyskanie inną drogą byłoby często niemożliwe. Fluorescencja pozwala odkrywać, często powikłaną, historię dzieł malarstwa, ale i ujawnia, czasami mikroskopijne, ślady i dowody zbrodni. Dzięki fluorescencji poznaliśmy właściwości wielu leków, lepiej zrozumieliśmy mechanizmy powstawania chorób gnębiących naszą cywilizację i odczytaliśmy sekwencję genomu ludzkiego. Fluorescencja umożliwia wykrywanie groźnych wirusów, takich jak HIV czy wirus Ebola, i pozwala na śledzenie ścieżek transportu i aktywności leków w naszym organizmie.

Być może, z jej pomocą odkryjemy kiedyś ślady życia w kosmosie. Natomiast z pewnością zajrzemy w strukturę materii znacznie głębiej, niż pozwalała na to mikroskop elektronowy. I nawet jeśli inne techniki i metody badawcze mogą rościć sobie prawo do tych samych osiągnięć, dialog z przyrodą za pośrednictwem języka molekularnych fotonów, nadfioletowych, widzialnych czy podczerwonych, ma kilka bezkonkurencyjnych atutów.

Badania fluorescencyjne nie stwarzają zagrożeń dla próbek (zwłaszcza biologicznych), pozwalając np. na badanie żywych komórek bez efektów ubocznych. Fluorescencja pozwala oglądać w czasie rzeczywistym takie procesy, jak np. skurcz komórek mięśnia sercowego wskutek stymulacji jonami wapnia. Fluorescencja nie generuje toksycznych odpadów i jest niedrogim, i taniejącym narzędziem badawczym. Ze względu na ilość i charakter dostarczanych informacji, coraz większą prostotę i wygodę użycia, badania fluorescencyjne są dziś powszechnie stosowanym narzędziem ujawniania tajemnic mikro- i makroświata

dr hab. inż. Jerzy Karpiuk
asystent w Instytucie Chemii Fizycznej PAN
w Warszawie

Nowe narzędzia chemii analitycznej: chemosensory fluorescencyjne umożliwiają selektywne wykrywanie np. jonów metali, takich jak rtęć, ołów czy miedź na poziomie pojedynczych ppb (10^{-9}).



POLSKO-JAPOŃSKA WYŻSZA SZKOŁA TECHNIK KOMPUTEROWYCH



WARSZAWA

INFORMATYKA

INFORMATYKA
SPOŁECZNA

ARCHITEKTURA
WNĘTRZ

KULTURA JAPONII

SZTUKA NOWYCH
MEDIÓW

ZARZĄDZANIE
INFORMACJĄ

BYTOM

INFORMATYKA

GRAFIKA

KULTURA JAPONII

GDAŃSK

INFORMATYKA

SZTUKA NOWYCH
MEDIÓW

REKRUTACJA TRWA!

WWW.PJWSTK.EDU.PL

