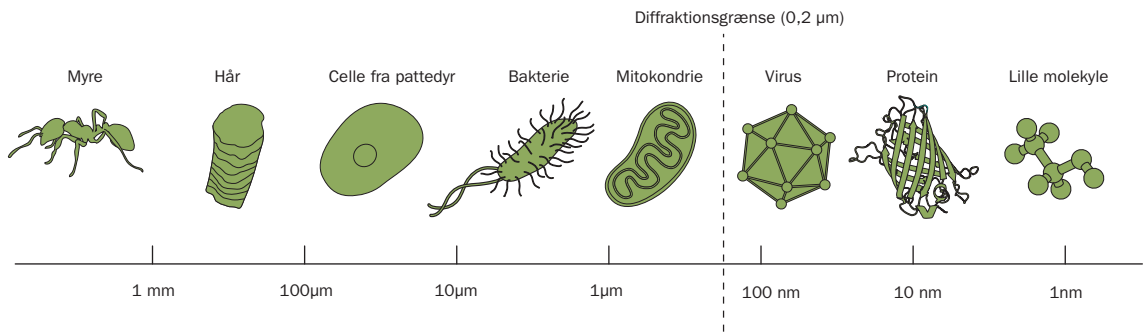


Nanoskopi

- en verden af detaljer

Nobelprisen i kemi uddeles i år til tre forskere, der står bag udviklingen af såkaldte "super-opløsningsmikroskoper" eller nanoskoper. Disse mikroskoper bryder med en århundrede år gammel grænse for, hvad det er muligt at se med lysmikroskopi.



Skala over forskellige størrelsesordner. Et alm. lysmikroskop kan opløse strukturer ned til ca. 200 nanometer (nm).

Om forfatterne



Mathias P. Clausen, ph.d., fra Syddansk Universitet. Postdoc ved University of Oxford, hvor han arbejder med udvikling af nanoskopi – særligt STED-nanoskopi. Har været på forskningsophold i Stefan Hells gruppe ved Max Planck Institutet. mathias.clausen@rdm.ox.ac.uk



Jes Dreier, ph.d., postdoc ved Syddansk Universitet, hvor han bl.a. har bygget et STED-mikroskop og anvender det til at undersøge de dynamiske forhold i hud, samt karakteriserer biologiske prøver. jdreier@bmb.sdu.dk

For at forstå, hvordan verden hænger sammen, er man nødt til at kunne studere den på mikroskopisk niveau. Dette kan gøres med mikroskopi, som har været et uvurderligt værktøj i mange forskellige grene af naturvidenskaben. Særligt inden for biologien bruges mikroskopi i vid udstrækning til at udforske bl.a., hvordan planters og dyrs celler er opbygget og fungerer. Grænsen for, hvor fine strukturer, man kan se ved hjælp af et lysmikroskop, har flyttet sig de seneste årtier. Æren for dette kan i særdeleshed tilskrives dette års tre modtagere af Nobelprisen i kemi: W. E. Moerner (USA), Eric Betzig (USA) og Stefan W. Hell (Tyskland). De står bag udviklingen af en ny gren af lysmikroskopi kaldet "nanoskopi", som er i gang med at ændre vores opfattelse af verden ved at gøre hidtil usynlige detaljer synlige.

Fra mikroskopi til nanoskopi

Indtil for ca. 10-15 år siden var det bredt accepteret, at man i et lysmikroskop ikke kan skelne strukturer, der er mindre end ca. halvdelen af bølgelængden på det lys, man bruger til at studere sin prøve med. Det blev formuleret i en fysisk lov af Ernst Abbe i 1873 og skyldes lysets brydning. I praksis vil

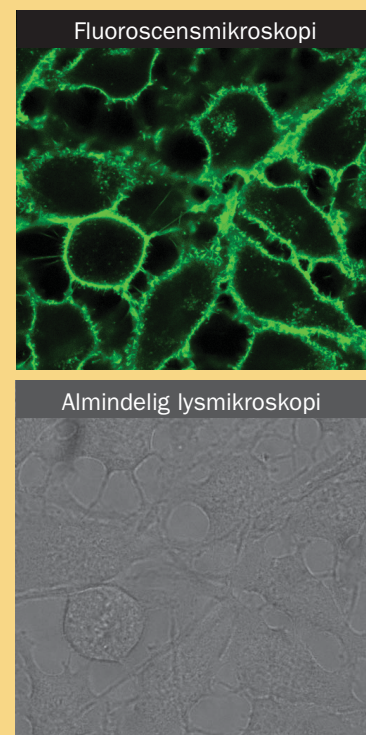
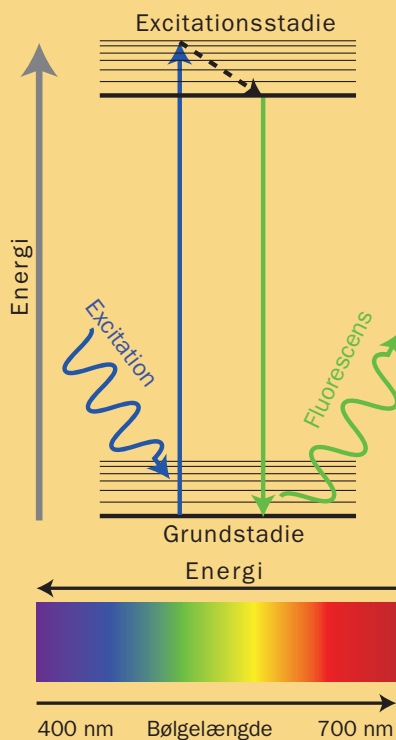
det sige, at detaljer under ca. 200 nanometer (nm) er slørede (da synligt lys har bølgelængder mellem 400 og 700 nm). Uanset, om man har et punkt på 1 nm, en prik på 10 nm eller en plet på 100 nm, vil de med lysmikroskopi se ud som om de har samme størrelse – billedet af dem vil nemlig i alle tilfældene være en ca. 200 nm stor cirkulær kontur. Har man blot en enkelt isoleret lysende prik, kan man stadig bestemme dennes præcise position som centrum af den 200 nm store kontur. Har man derimod to objekter tættere på hinanden end 200 nm, vil de fremstå som et sammenhængende objekt, og man kan ikke adskille dem fra hinanden. Man siger derfor, at der er en opløsningsgrænse på 200 nm.

Trods begrænsningerne er mikroskopi stadig et kraftfuldt værktøj, for mange strukturer er nemlig større end 200 nm, fx er en celle i kroppen typisk 10-100 mikrometer. Men hvis man før i tiden fx ville studere strukturer på virus, der typisk kun er 100 nm store, eller fine strukturer inde i celler, kunne det ikke lade sig gøre med lysmikroskopi. Med udviklingen af nanoskopi – også kaldet "super-opløsningsmikroskopi" – har man populært sagt ophævet opløsningsgrænsen!

Fluorescens og fluorescensmikroskopi

Visse farvestoffer har evnen til at optage lys med én bølglængde og udsende lys med en anden bølglængde – det kaldes fluorescens. Processen er illustreret i figuren, hvor et farvestof (fx et lille molekyle eller et protein – samlet betegnet en fluorofor) optager en foton fra en lyskilde og derved bliver exciteret til et højere energiniveau. Efter et stykke tid vil farvestoffet igen falde ned til det oprindelige energiniveau, og ved denne proces udsendes en ny lysfoton. Da der i mellemtiden er sket et energitab (som er gået til vibration i molekylet) vil den udsendte foton have en lidt lavere energi og derved også en længere bølglængde (dvs. en anden farve). I eksemplet optages der blått lys, mens der udsendes grønt lys. Farveændringen er meget praktisk, da man derved kan kende forskel på det indsendte lys og lyset fra fluoroforen.

Man udnytter fluorescens i bl.a. fluorescensmikroskopi, hvor man mærker de strukturer, man gerne vil observere i sin prøve, det kan fx være cellens skelet eller membran, med et fluorescerende farvestof. Dermed er det kun disse strukturer, der lyser op, når man kigger på prøven, mens baggrunden er helt sort. Kontrasten er derfor meget høj i fluorescensmikroskopi.



Der er sideløbende blevet udviklet forskellige former for nanoskopi, hvorfor Nobelprisen i år deles af tre personer. Alle typer af nanoskopi baserer sig dog på såkaldt fluorescensmikroskopi. Her benytter man farvestoffer, der har evnen til at udsende lys, når de selv bliver lyst på med fx en laser. Over de senere år er der gjort store fremskridt inden for måling af signalet fra et enkelt af disse farvestofmolekyler. Det er en forudsætning for, at nanoskopi kan lade sig gøre, og særligt den ene prismodtager, W. E. Moerner, har været en pioner inden for dette felt.

Tænd, sluk – tænd, sluk

Det overordnede princip bag de forskellige former for nanoskopi er det samme. For at forstå princippet kan man forestille sig en gruppe af små lysende prikker så tæt på hinanden, at vi ikke kan skelne dem med traditionel mikroskopi. Hvis vi nu kan sørge for, at prikkerne lyser op på forskellige tidspunkter, kan vi bestemme deres placering præcist hver for sig. Ved at sammenholde de forskellige placeringer opnår vi en opløsning bedre end de traditionelle 200 nm. Det er netop det, vi gør i nanoskopi, og derfor er nanoskopi i bund

Prismodtagerne

Eric Betzig (f. 1960 i USA).

I dag gruppeleder ved Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA.

Photo: Matt Staley/HHMI



Stefan W. Hell (f. 1962 i Rumænien, tysk statsborger).

I dag direktør ved Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, og afdelingsleder ved German Cancer Research Center, Heidelberg.

Foto: Bernd Schuller, Max-Planck-Institut

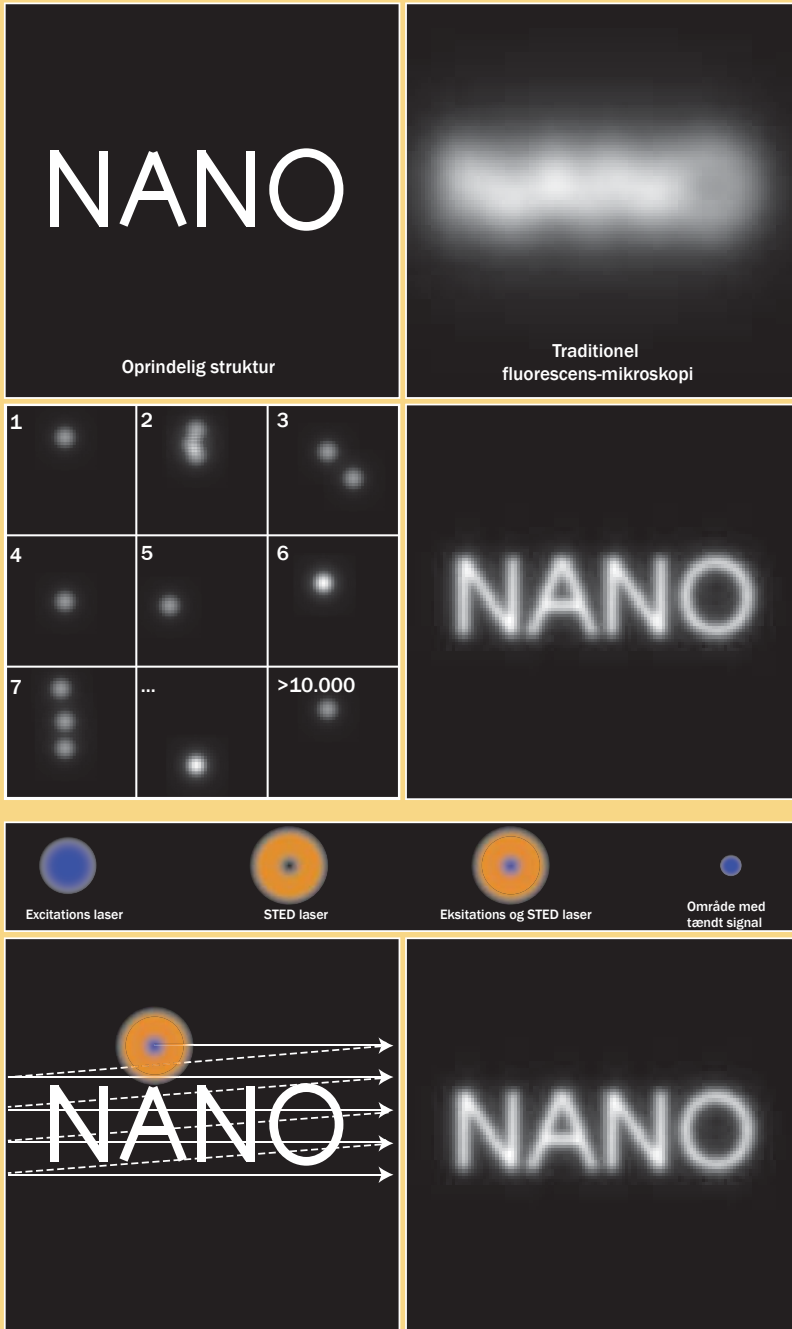


W. E. Moerner (f. 1953 i USA).

I dag Harry S. Mosher Professor i kemi ved Stanford University, USA.

Foto: L.A. Cicero





Lokalisations-nanoskopi

I lokalisations-nanoskopi undgår man på en snedig måde problemet med, at man ikke kan skelne ting, der er tættere end 200 nm fra hinanden. I stedet for at tænde alle farvestofmolekylerne i prøven på én gang, tænder man dem på skift i tilfældig rækkefølge. Et enkelt billede består da af et antal lysende prikker, hvis position man let kan bestemme som centrum af prikken – typisk med en opløsning på 10 nm. For at få den samlede struktur må man derfor tage et stort antal billeder (ca. 10.000), og til slut lægge alle billederne oven på hinanden for at få det endelige, superopløste, billede.

STED-nanoskopi

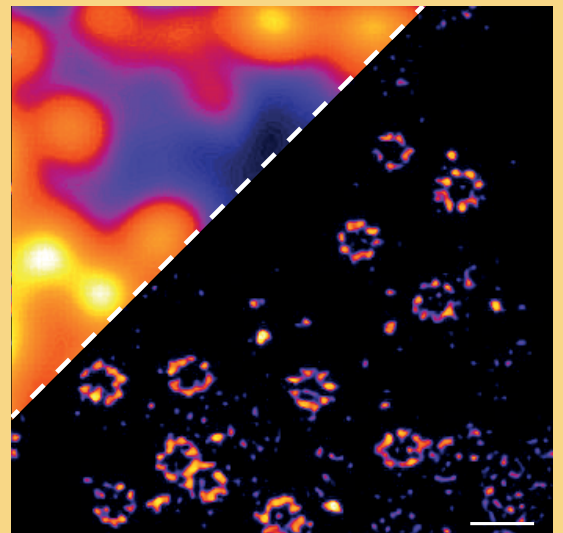
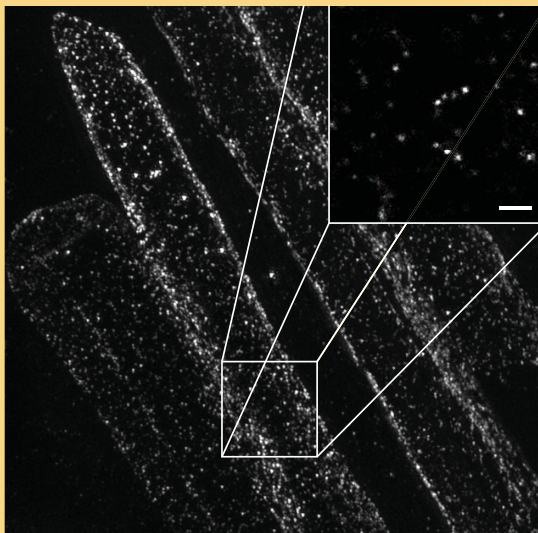
I STED-nanoskopi kontrollerer man på sofistikeret vis, hvornår man tænder og slukker farvestofferne i ens prøve. Man udnytter, at de farvestoffer, man bruger, ikke kun kan tændes med lys, men også kan slukkes af lys med en anden farve. Man belyser derfor sin prøve samtidig med to forskellige lasere, der har forskellig farve. Den ene tænder signalet, og den anden slukker det. Tricket er da, at den laserstråle, som slukker signalet, har form som en donut. Man slukker derfor kun signalet i donut-ringens, mens signalet fra centrum ikke bliver berørt. Således har man effektivt kun signal fra et lille område i centrum af donutten. Dernæst skanner man de to lasere hen over prøven og tænder og slukker derfor på skift farvestofferne i takt med, om de befinder sig i ringen eller i midten af donutten. Ved at forøge laserintensiteten af STED-laseren gør man hullet i donutten mindre og mindre, og opløsningen bliver derfor bedre og bedre – typisk ned til 40 nm.

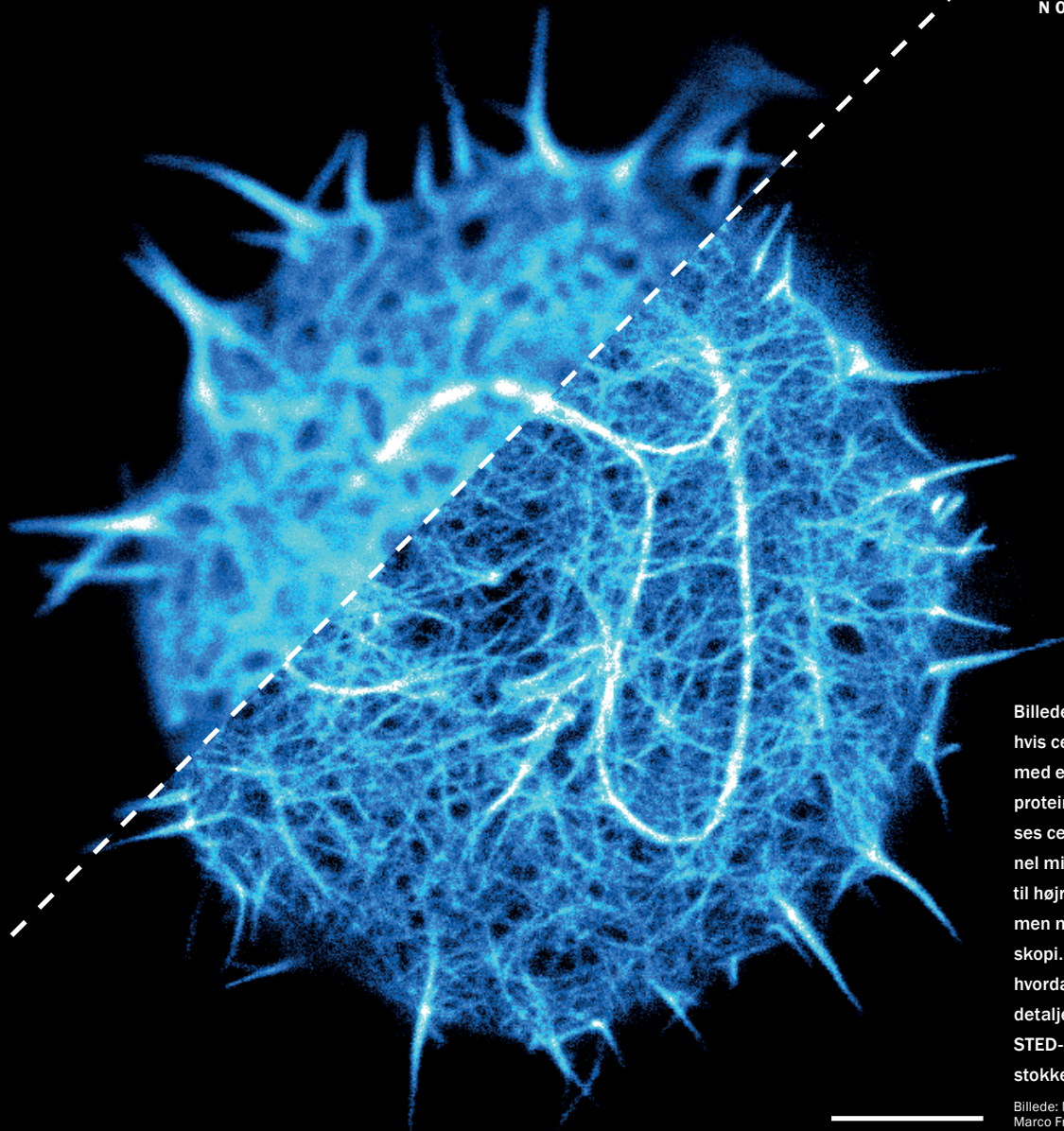
↓ Billedet viser nogle porer, der sidder i cellekernernes membran og kontrollerer transport ind og ud af cellekernen. Øverst til venstre ses området med traditionel mikroskopi. Nederst til højre ses samme område, men med STED-nanoskopi. Der er ingen detaljer at se med almindelig mikroskopi, mens der med STED-nanoskopi ses, at porerne består af otte ens enheder. Målestokken er 200 nm.

Billeder: Abberior

→ Billedet er taget med lokalisations-nanoskopi og viser et protein, der sidder i membranen af en plantecelle. Proteinet organiserer sig i små grupper, der er mindre end opløsningsgrænsen, så man kan ikke få samme information med almindelig mikroskopi. Målestokken er 500 nm.

Billeder: Iwona Ziolkiewicz & Alexander Schulz, Københavns Universitet





Billedet viser en celle, hvis celledskelet er farvet med et fluorescerende protein. Øverst til venstre ses cellen med traditionel mikroskopi. Nederst til højre ses samme celle, men med STED-nanoskopi. Det ses tydeligt, hvordan mange flere detaljer er synlige med STED-nanoskopi. Målestokken er 2 μm .

Billede: Mathias P. Clausen, Marco Fritzsche & Christian Eggeling, Univ. of Oxford.

og grund et spørgsmål om at kontrollere, hvornår farvestofferne er "tændt", og hvornår de er "slukket".

At tænde og slukke for farvestofferne kan gøres på to grundlæggende forskellige måder – enten tilfældigt eller kontrolleret. Tilfældighedsprincippet bruges i *lokalisations-nanoskopi*, som Eric Betzig som den første demonstrerede i 2006, men som i dag findes i mange forskellige varianter. Her tages en lang række billeder med kun få af farvestofmolekylerne tændt, og deres placering bestemmes uafhængigt af hinanden.

I *STED-nanoskopi*, som blev udviklet eksperimentelt af Stefan W. Hell i 2000, tænder og slukker man på en kontrolleret måde farvestofferne ved hjælp af to lasere, der skannes henover prøven.

En mere detaljeret verden

Med nanoskopi kan vi nu gå på opdagelse i en verden af strukturer, der hidtil har været uden for

vores mikroskopers rækkevidde. Vi har fået en opløsning, der svarer til størrelsen af enkelte molekyler, og vi kan dermed få oplysninger om strukturer på et molekylært niveau. Vi kan derfor tillade os at stille nye spørgsmål og forvente at kunne besvare dem ved direkte visualisering. Samtidig er vi med nanoskopi i stand til at adskille strukturer i en grad, som man ikke tidligere har været i stand til. Det har fx ændret opfattelsen af hvordan samspillet mellem elementer i celler fungerer på et meget detaljeret niveau.

Et af de områder, hvor nanoskopi virkelig har gjort en forskel, er i forståelsen af, hvordan cellers skelet ændrer sig, fx når cellen bevæger sig eller bliver påvirket af et signal udefra. Celleskellet består af forskellige meget tynde fibre (ca. 10-20 nm), der ligger tæt overalt i cellen. Det er derfor ikke muligt at adskille fibrene med almindeligt mikroskopi, men man kan nu ved hjælp af nanoskopi studere dem detaljeret. På den måde har man kunnet afdække det komplicerede samspil imellem de

Videre læsning

Jagten på en ny membranmodel, *Aktuel Naturvidenskab* nr. 4/2013

Om nobelprisen i kemi:
www.nobelprize.org

forskellige fibre i cellen, der gør cellen i stand til at ændre form og derved bevæge sig.

Skepsis gjort til skamme

Nanoskopi er kommet langt siden sin begyndelse i starten af årtusindet. Nogle forskere var – og er til stadighed – kritiske og hurtige til at udpege problemerne ved nye teknikker. Fx er nogle skeptiske over den lysmængde, man udsætter prøven for i STED-mikroskopi og ser kun begrænsninger i den mængde billeder, der skal bruges i lokaliserings-nanoskopi. Realiteten er dog, at man kan optage billeder meget hurtigt efter hinanden i lokaliseringsmikroskopi og dermed begrænse den samlede tid, det tager at fremkalde et billede. Ligeledes har man med STED-mikroskopi vist, at man kan tage billeder direkte ned i hjernen af en levende mus (under bedøvelse naturligvis!) og undersøge hjernecellernes opførsel, og det vel at mærke uden at musens hjerneceller lider nogen skade som følge af intensiteten af laserlyset.

Der sker stadig udvikling indenfor nanoskopi, og teknikkerne bliver fortsat bedre. Således opnår man stadig bedre opløsning (både i 2 og 3 dimensioner), og man har udviklet variationer af STED-nanoskopi, som bruger meget lav laserintensitet til at belyse prøven. Nanoskoper bliver også stadig lettere at anvende.

Nanoskopi i Danmark

Nanoskopi foregår ikke længere kun på Hells, Betzigs og Moerners laboratorier, men har spredt sig til laboratorier i hele verden. Det kræver dog stadig specialviden at anvende disse avancerede mikroskoper. I Danmark så særligt to grupper af forskere for år tilbage styrken ved nanoskopi, og der findes i dag nanoskoper ved Institut for Biokemi og Molekylærbiologi (BMB), Syddansk Universitet, og Center for Advanced Bioimaging (CAB), Københavns Universitet.

Meget af den nanoskopi, der laves på Syddansk universitet er tilknyttet forskningen ved *Center for Bio-analytical Sciences* og *MEMPHYS*, hvor sidstnævnte er et center for biomembranfysik. Cellemembranen adskiller en celle fra dens omgivelser, men samtidig tillader den nærings- og signalstoffer at passere ind til cellen. Membranen er kun to molekyler tyk, hvilket svarer til 5-8 nm, så den er et oplagt emne at undersøge med nanoskopi. Nanoskopi er i MEMPHYS blevet brugt til bl.a. at undersøge de dynamiske forhold i membranen og samspillet mellem membranbundne proteiner og membranens lipider samt til dynamisk og fysisk karakterisering af transport over hudbarrieren. Udover at anvende nanoskopi til konkrete undersøgelser, bruges der en del kræfter på at bygge og videreudvikle teknikkerne, så man fremover kan besvare endnu flere spørgsmål. ■