



Kellermayer Miklós

Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet | kellermayer.miklos@med.semmelweis-univ.hu

Kémiai Nobel-díj

A Svéd Királyi Akadémia 2014. október 8-án hirdette ki döntését a kémiai Nobel-díjról. Ennek értelmében 2014-ben a kémiai Nobel-díjban Eric Betzig, Stefan W. Hell és William E. Moerner részesült a szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia kidolgozásáért. Vajon kik ezek a tudósok és mi is az a szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia?



Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner (nobelprize.org)

Eric Betzig amerikai állampolgár, 1960-ban született a Michigan állambeli Ann Arborban. Doktori fokozatát 1988-ban szerezte a Cornell Egyetemen. Már ekkor a feloldási határ leküzdése érdekelte, és a közeli mező fizikájával foglalkozott. A New Jersey állambeli Murray Hill AT&T Bell Laboratóriumban a közeli mező pásztázó fénymikroszkóp kifejlesztésében ért el jelentős eredményeket. 1993-ban elsőként alkotott nagy felbontású képet egyedi fluoreszcens molekulákról szobahőmérsékleten. Később, felismerve a fényaktiválható fluoreszcens fehérjemolekulákban rejlő lehetőségeket, jutott el a PALM mikroszkópia (photoactivation light microscopy) kifejlesztéséhez. 2005 óta a Howard Hughes Medical Institutes Janelia Farm intézményében csoportvezető.

Stefan W. Hell német állampolgár, 1962-ben született Aradon. Doktori fokozatát 1990-ben szerezte a Heidelbergi Egyetemen. 1993 és 1996 között a finnországi Turku Egyetemen dolgozott, ahol lefektette a STED (stimulated emission depletion) mikroszkópia elméleti alapjait. 1997-től a Max Planck Intézet (Biofizikai Kémia, Heidelberg) munkatársa, majd igazgatója, ahol a STED mikroszkópia megépítését, továbbfejlesztését és számos alkalmazását valósította meg.

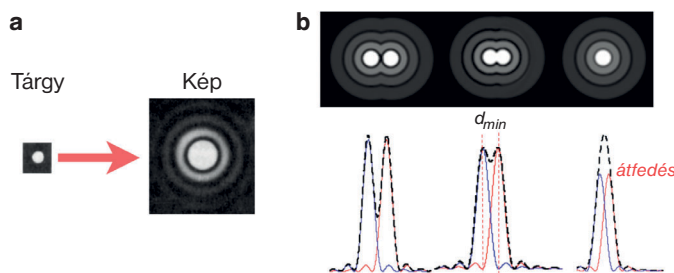
William E. Moerner amerikai állampolgár, 1953-ban született a kaliforniai Pleasantonban. Doktori fokozatát 1982-ben szerezte a Cornell Egyetemen. 1989-ben elsőként mérte meg egyetlen, mélyfagyasztott kondenzátumban csapdázott molekula abszorpciós spektrumát. 1997-ben megfigyelte, hogy a zöld fluoreszcens fehérjemolekula (GFP, green fluorescent protein) pislog, azaz véletlenszerűen kialszik (sötét állapotba kerül), majd visszatér fluoreszcenciájára. Ugyancsak kimutatta, hogy a GFP-t rövid hullámhosszú fényvel való megvilágítással irányítottan is ki lehet hozni sötét állapotából. Később ez a megfigyelés vált a lokalizációs mikroszkópiák alapjává. Jelenleg a Stanford Egyetem professzora.

A szuperfelbontású fluoreszcencia mikroszkópia jelentősége abban rejlik, hogy mintegy megerősokolja az immár közel másfél évszázados elméleti és gyakorlati optikai feloldási határt, és

nanométeres, molekuláris feloldást tesz lehetővé. A 19. században Ernst Abbé (1873) és Lord Rayleigh (1896) ismerték fel, hogy hullámelhajlási, azaz diffrakciós okok miatt egy tárgyról hullámok, például fény segítségével alkotott kép nem lehet tetszőlegesen részletgazdag. Ennek az az oka, hogy egy pontszerű tárgy (pl. egy optikai rács pontja vagy egy pontszerű fényforrás) képe kiszélesedett folt, úgynevezett elhajlási korong (**1.a ábra**). Ha a tárgy pontok az elhajlási korong méreténél közelebb kerülnek egymáshoz, akkor a képek alapján továbbá nem különíthetők el (**1.b ábra**). A mikroszkópos feloldásnak tehát elméleti és gyakorlati határa van (d_{min}), és ez a feloldási határ az alkalmazott hullámhosszal (λ) összemérhető:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}, \quad (1)$$

ahol n az optikai közeg törésmutatója, α pedig a leképező rendszer nyílásszöge. A feloldási határ látható fény, azaz fénymikroszkópia esetében 0,2 μm -nek adódik. Bár az elektronmikroszkópban a rendkívül kis hullámhossz miatt jelentősen jobb feloldás érhető el, biológiai minták esetében az elektronmikroszkóp alkalmazásának rengeteg hátránya van.



1. ábra. A fénymikroszkópos feloldási határ problémája.

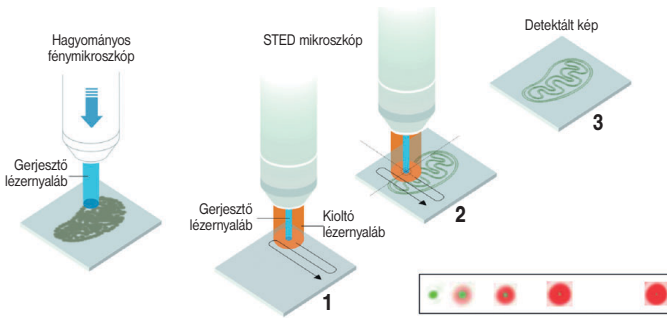
a) Az elhajlási korong. b) Képpontok átfedése és összemosódása a feloldási határon belül elhelyezkedő tárgy pontok esetén

A 20. században számos erőfeszítés történt arra, hogy a feloldási határt valamilyen módon áttörjük. Igazán jelentős áttörést azonban csak az idei Nobel-díjasok munkássága hozott. A 2014. évi kémiai Nobel-díj háttérében voltaképpen három fontos felfedezés és fejlesztés húzódik: a) szuperfelbontású fluorofór-sokaság mikroszkópia, b) egyedi molekula fluoreszcencia spektroszkópia és c) szuperfelbontású egyedi fluorofór mikroszkópia. A szuperfelbontású fluorofór-sokaság mikroszkópia alapja Stefan W. Hell azon felismerése, hogy egy diffrakciólimitált fókuszpont által gerjesztett molekulásokaság mérete – amelynek kiterjedését tehát az elhajlási korong határozza meg – csökkenthető úgy, hogy a fókuszpont szélein elhelyezkedő gerjesztett állapotú molekulákat stimulált emisszió segítségével mintegy kimerítjük, kioltjuk, vagyis depletáljuk. Mindezt úgy lehet megvalósítani, hogy a gerjesztő fénynyalábra azzal koncentrikus gyűrű alakú kioltó fénynyalábot vetítünk (**2. ábra**). Ez tehát a STED mikroszkópia alapja. A kioltó fény intenzitásának (I) növelésével elméletileg korlátlanul csökkenthető feloldási határ:



$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + J/J_s}} \quad (2)$$

ahol J_s a gerjesztő fény intenzitása. A gyakorlatban szuperponált gerjesztő és kioltó lézernyaláb pásztázza végig a mintát pontról pontra, és az így csökkentett méretű gerjesztési térfogathoz összegyűjtött fénypontokból rekonstruálódik a nanométeres feloldású kép.



2. ábra. A STED mikroszkópia alapja. Betétábra: a kioltó (vörös) fény intenzitásának növelésével csökken a gerjesztési térfogat (zöld) (forrás: <http://www.nobelprize.org>)

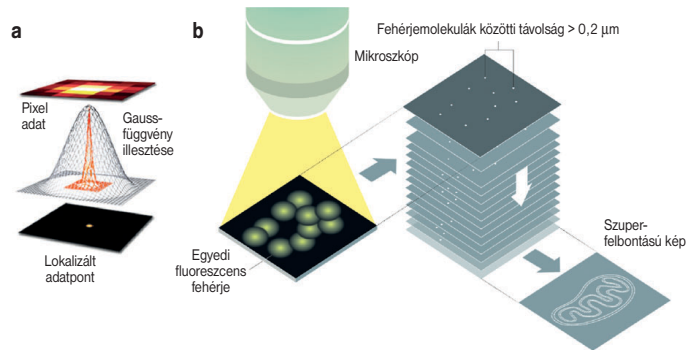
Kémiai tudásunk nagy része olyan kísérletekből származik, amelyekben molekulaköszegélyt vizsgálunk, például egy kémcsónyi vagy küvetányi vegyületet egy spektroszkópiás mérés során. Hatalmas előrelépést jelentett a W. E. Moerner által elindított egyedi molekula fluoreszcencia spektroszkópia, amely kísérletesen is rámutatott az egyedi molekulák szintjén megnyilvánuló sztochasztikus, véletlenszerű jelenségekre és folyamatokra, amelyen például a fluoreszcens festékmolekulák pislogása (blinking). W. E. Moerner 1997-ben felfedezte, hogy bár a 488 nanométeres fényrel gerjeszthető GFP molekula egy idő után kieg és sötét állapotba kerül, 405 nanométeres fényrel ismét aktiválható. Ez a jelenség azt a lehetőséget hordozza, hogy egy fluoreszcens molekula állapotát tetszés szerint tudjuk megváltoztatni, vagyis ki- és bekapcsolhatjuk.

Eric Betzig 1995-ben azt az elméleti lehetőséget vetette fel, hogy ha az egyedi molekulák közötti távolság nagyobb, mint 0,2 μm , azaz a molekulák a feloldási határon kívül helyezkednek el, akkor pozíciójukat sokkal pontosabban meghatározhatjuk, mint a feloldási határ. Sőt, ha a molekulák egymástól eltérő tulajdonságúak, például különböző színűek, akkor a pozíciójukat még olyan esetben is pontosan meghatározhatjuk, ha egymáshoz közel helyezkednek el. Ekkor arra van szükség, hogy egymás után két különböző képet alkossunk, amelyek mindegyikén csak az egyik molekula látszik. Csak jóval később, 2005-ben jött rá, hogy az elkülönítendő molekuláknak nem is kell különböző színűeknek lenni; az is elegendő, ha időben máskor fluoreszkálnak. Mindez megvalósítható úgy, hogy először az egyik molekulát bekapcsoljuk, majd kikapcsolása után a másikat kapcsoljuk be. A lényeg, hogy egyetlen

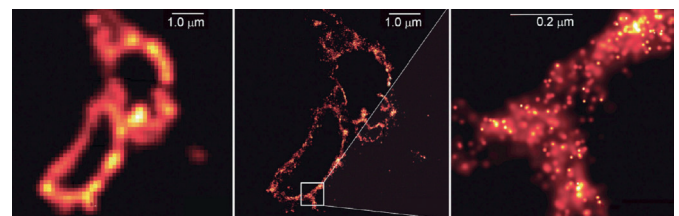
len képpont feltétlenül csak egyetlen fluoreszcens molekulát tartalmazzon. A fluoreszcencia-aktiválás alapján kidolgozott mikroszkópia a PALM (3. ábra). A feloldóképesség növekedésének alapja az, hogy a molekula képére kétdimenziós Gauss-görbe illeszhető, amelynek középpontja a fotonszám (N) függvényében pontosabban kiszámítható, mint az intenzitásprofil félértékessége:

$$d_{\min} = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (3)$$

A gyakorlatban ismétlődő fotoaktivációs és fotokifehérítési ciklusok során gyűjtjük a fénypont-adatokat, amely alapján nanométeres feloldású szuperképet számol ki a berendezés (4. ábra). A PALM-mal rokon módszer a STORM (stochastic optical reconstruction microscopy).



3. ábra. A PALM mikroszkópia alapja. a) Egy fluoreszcens molekula pozíciójának meghatározása. b) Képrekonstrukció a PALM mikroszkópiában (forrás: <http://www.nobelprize.org>)



4. ábra. Fluoreszcens fehérjével (kaede) konjugált lizoszomális transzmembrán fehérje (CD63) COS7 sejtben – hagyományos (bal oldal) és PALM mikroszkópos felvételen (középső és jobb oldal). (Forrás: Betzig et al. Science 313, 1642, 2006)

A szuperfelbontású mikroszkópiák története alig néhány évre tekint vissza, de a közel másfél évszázada fennálló mikroszkópos feloldási határ áttörésével jelentős paradigmaváltást idéztek elő. A segítségükkel útnak indult nanoszkópia különleges bepillantást enged a természet molekuláris dimenziójú felépítésébe és működésébe. Nem fér hozzá kétség, hogy a nanoszkópia további fejlődésével az élő sejt működéséről valóban látványos felfedezéseknek lehetünk tanúi.

Penke Botond

■ SZTE Orvosi Vegytani Intézet

Orvosi-élettani Nobel-díj

Tavaly október 6-án a stockholmi Karolinska Intézetben kihirdették, hogy a 2014-es orvosi-élettani Nobel-díjat megosztva az amerikai-brit tudós, John O'Keefe, illetve a norvég May-Britt Mo-

ser és férje, Edvard Moser kapta meg az agy kutatásban elért eredményeikért. A bizottság indoklása szerint a három tudós felfedezte az agy helymeghatározó rendszerét, amelynek segítségével