Osvrti, Kem. Ind. **64** (1-2) (2015) 69–90

Nobelova nagrada za kemiju za 2014. godinu

I. Weber[*]
Institut Ruđer Bošković
Bijenička cesta 54
10 000 Zagreb

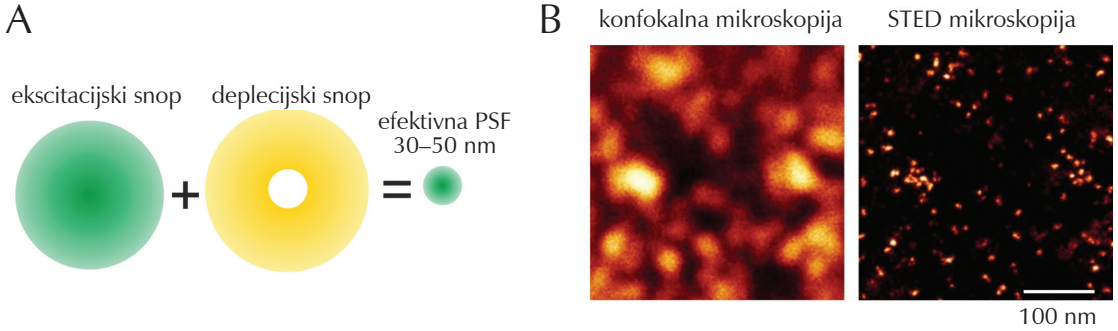
Znanstvenici *Eric Betzig*, *Stefan W. Hell* i *William E. Moerner* dobitnici su ovogodišnje Nobelove nagrade za kemiju za razvoj superiorno razlučujuće fluorescencijske mikroskopije.

Ova je nagrada ujedno priznanje svjetske znanstvene zajednice velikom napretku koji je svjetlosna mikroskopija postigla u posljednjih dvadesetak godina i njezinom sve većem utjecaju na razvoj znanosti o životu. Snažan utjecaj na preporod svjetlosne mikroskopije i njezine primjene u bioznanostima također su imali otkriće i razvoj fluorescentnih proteina, nagrađeni Nobelovom nagradom za kemiju 2008. godine.

Počevši s revolucionarnim otkrićima *Antona van Leeuwenhoeka* i *Roberta Hooka* u 17. stoljeću, mikroskopija je oduvijek otvarala nove vidike u proučavanju mikrosvijeta, kako živog tako i neživog. Znanstvene zasade gradnje mikroskopa i razumijevanje optičkih principa stvaranja slike u mikroskopu nisu, međutim, značajnije napredovali sve do druge polovice 19. stoljeća. Tada je njemački fizičar *Ernst Abbe* postavio osnove znanstveno utemeljene konstrukcije optičkih leća i objasnio razlog ograničenja moći razlučivanja mikroskopa primjenjujući tzv. difrakcijsku teoriju stvaranja slike. Pojednostavljeno rečeno, nakon difrakcije, tj. ogiba upadnih zraka svjetlosti na česticama uzorka, slika se stvara interferencijom difraktiranog svjetla u stražnjoj fokalnoj ravnini objektiva. Iz teorije difrakcije na optičkoj rešetki poznato je da će kut ogiba zrake svjetlosti na nekom strukturnom detalju uzorka biti to veći što je taj detalj manji i što je valna duljina korištene svjetlosti veća. Stoga je sposobnost razabiranja što manjih pojedinosti u uzorku određena mogućnošću prednje leće objektiva da prihvati svjetlost koja iz uzorka izlazi pod što većim kutovima, tj. ovisi o prihvatnom kutu objektiva. Ova razmatranja rezultirala su poznatim Abbeovim izrazom za najmanju dimenziju detalja koji se mogu razlučiti pomoću svjetlosnog mikroskopa, tj. za njegovu moć razlučivanja: $d = \lambda/(2n \sin \alpha)$. Ovdje λ označuje valnu duljinu svjetlosti, n je indeks loma sredstva koje optički povezuje prednju leću objektiva i uzorak, dok se α odnosi na polovicu prihvatnog kuta objektiva. Uz optimalne uvjete, najmanje dimenzije detalja razlučivih s pomoću standardnih istraživačkih svjetlosnih mikroskopa u praksi iznose oko 250 nanometara.

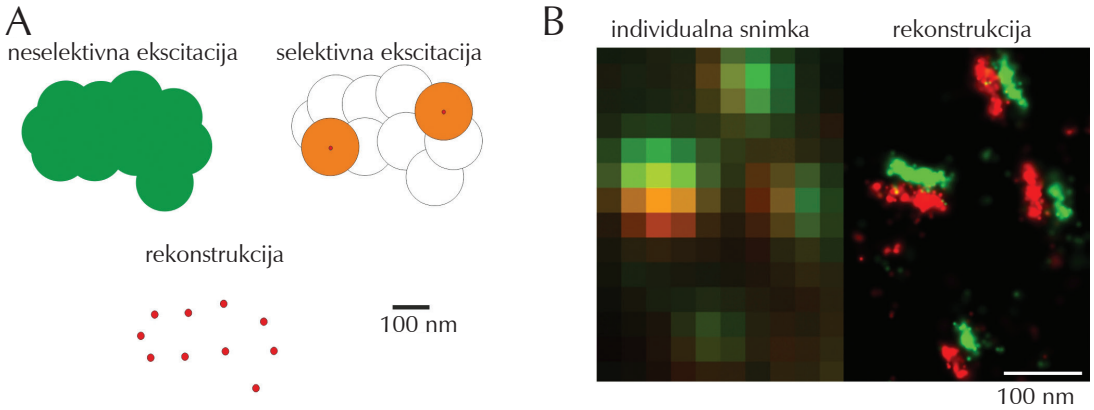
Ovo se fundamentalno ograničenje moći razlučivanja optičkih instrumenata može drugim riječima predočiti tako da mikroskop u procesu oslikavanja točkaste izvore svjetla razmazuje u kružne "otiske" tipičnog polumjera d. Točan opis ovakva otiska, tzv. funkcije rasapa točke (eng. *Point Spread Function*, PSF) ili Airyeva obrasca, daje difrakcijski ograničenu sliku točkastog objekta. Više od stotinu godina smatralo se da svjetlosni mikroskopi nikada neće moći pružiti informacije o prostornim detaljima strukture tvari sitnijim od spomenute difrakcijske granice.

Nobelova nagrada za kemiju 2014. godine dodijeljena je upravo za prevladavanje ovog ograničenja koje je ingeniozno zaobiđeno u fluorescencijskoj mikroskopiji primjenjujući dva različita principa. Prva metoda, mikroskopija STED (eng. *Stimulated Emission Depletion*), upotrebljava dva laserska snopa različitih oblika i razmaknutih u vremenu kako bi ograničila protežnost funkcije rasapa točke i time povećala moć razlučivanja. Kao prvo se na fluorescirajuće molekule u uzorku, tzv. fluorofore, aplicira snop laserske svjetlosti odgovarajuće valne duljine za pobudu fluorescencije koji ima klasičnu Gaussovu raspodjelu intenziteta. Manje od pola nanosekunde kasnije aplicira se sljedeći snop svjetlosti veće valne duljine i velikog intenziteta u obliku torusa koji sve njime obasjane molekule pobuđuje na stimuliranu emisiju (*stimulated emission*) i time iscrpljuje (*depletion*) broj molekula koje mogu fluorescirati. Na taj se način, superpozicijom dvaju u vremenu razmaknutih snopova, uz pomoć njihovih odgovarajuće oblikovanih prostornih profila emisija fluorescencije ograničava na središnji dio pobudnog snopa (slika 1). STED je prema tome metoda



Slika 1 – (A) Princip prostornog ograničenja funkcije rasapa točke (PSF) u mikroskopiji STED; (B) Usporedba slika fluorescentno obilježenih kompleksa jezgrinih pora dobivenih konvencionalnom konfokalnom i mikroskopijom STED.

[*] Prof. dr. sc. Igor Weber
e-pošta: Igor.Weber@irb.hr



Slika 2 – (A) Princip rekonstrukcije superiorno razlučene raspodjele fluorofora u mikroskopijama PALM i STORM iz velikog broja pojedinačnih snimaka u kojima su fluorofori selektivno ekscitirani. (B) Primjer pojedinačne snimke presinaptičkih (crveno) i postsinaptičkih (zeleno) proteina u uzorku mišjeg mozga i rekonstrukcije njihove raspodjele dobivene superpozicijom informacija o lokalizaciji centara individualnih fluorofora iz nekoliko stotina pojedinačnih snimaka.[7]

koja fizički, u realnom vremenu, postiže ograničenje funkcije rasapa točke, te se stoga implementira u pretražnim konfokalnim mikroskopima koji prikupljaju svjetlost emitiranu iz uzorka točku po točku. Zbog brzine skupljanja podataka, mikroskopija STED je idealna za snimanje živih uzoraka. Zanimljivo je da rezolucija u mikroskopiji STED ovisi ponajprije o intenzitetu deplecijskog laserskog snopa, te bi se teoretski mogla mijenjati kontinuirano i bez ograničenja. U praksi, međutim, ovom se metodom može postići razlučivost u području 30 – 50 nm. Metodu STED smislio je i razvio njemački fizičar Stefan W. Hell.[1,2]

Američki fizičari Eric Betzig i William E. Moerner, neovisno jedan od drugoga, pronašli su drugačiji način za postizanje subdifrakcijske rezolucije u fluorescencijskoj mikroskopiji.[3–6] U ovim inačicama superiorno razlučujuće mikroskopije, koje su nazvane PALM (*Photoactivated Light Microscopy*), odnosno STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), radi se o tome da se prilikom jedne kratke ekspozicije uzorka detektira signal tek malog dijela ukupnog broja prisutnih fluorofora. Za sve nepreklapajuće otiske pojedinačnih molekula moguće je velikom točnošću odrediti položaj njihova središta, tj. centra svakog pojedinačnog PSF-a. Ponavljanjem takvog mjerenja nekoliko stotina pa i tisuća puta moguće je dobiti informaciju o položaju velikog broja fluorescentnih molekula u uzorku s velikom preciznošću (slika 2). Osnovni problem za implementaciju ove metode je u načinu kako u svakom pojedinom trenutku aktivirati samo mali postotak fluorescentnih molekula, odnosno deaktivirati većinu njih. Ovdje je veliku ulogu igralo poznavanje fotokemijskih svojstava specifičnih fluorofora, a u specifičnostima postupaka reverzibilne aktivacije i utišavanja fluorescencije leži i glavna razlika između metoda PALM i STORM. Ove se metode primarno izvode primjenom klasične mikroskopije širokog polja, ali su ipak dugotrajne zbog potrebe za snimanjem velikog broja slika za rekonstrukciju raspodjele fluorofora u uzorku. Moć rezolucije u ovim metodama tzv. lokalizacijske mikroskopije ovisi ponajprije o broju detektiranih fotona po elementu slike, a time i o ukupnom vremenu snimanja. U radu na fiksiranim uzorcima, gdje vrijeme nije ograničavajući faktor, može se postići razlučivost u području 10 – 20 nm.

Istraživanja ovogodišnjih laureata tako su efektivno proširila primjenu svjetlosne mikroskopije na područje nanoskopije. Iako je od otkrića metoda superiorno razlučujuće fluorescencijske mikroskopije prošlo tek desetak godina, već su doprinijele mnogim važnim i utjecajnim istraživanjima i otkrićima u staničnoj biologiji, mikrobiologiji, biomedicini i neuroznanostima. Sve raširenija primjena ovih metoda tako je odlučujuće doprinijela odluci o ovogodišnjoj dodjeli Nobelove nagrade za kemiju. S druge strane, to je priznanje i za mnoge druge važne inovacije u ovom području provedene u zadnjih nekoliko desetljeća poput, na primjer, razvoja konfokalne mikroskopije. Razvoj suvremene svjetlosne mikroskopije i dalje je u punom zamahu te ova tradicionalna, ali obnovljena, znanstvena disciplina i danas nastavlja pružati nove alate istraživačima znanosti o životu.[8,9]

ROBERT ERIC BETZIG rođen je u Ann Arboru u SAD-u, u saveznoj državi Michigan, 13. siječnja 1960. Fiziku je studirao isprva na Kalifornijskom tehnološkom institutu, a zatim na Sveučilištu Cornell gdje je i doktorirao 1988. Nakon toga je radio u Bell Laboratories. Ondje se bavio visokorazlučnom optičkom mikroskopijom, polučio je i prve rezultate na tom području, ali 1996. prelazi u obiteljsku tvrtku koju je vodio njegov otac. Dok je on unaprijeđivao proizvodnju strojnih dijelova, značajno su napredovala istraživanja koja su mogla pomoći u ostvarenju bitnih pomaka u fluorescencijskoj mikroskopiji, posebno fluorescentnih proteina (za što je dodijeljena Nobelova nagrada 2008.). Betzig se tako ipak vraća znanosti (osim toga, ostao je bez posla). Budući da, zbog višegodišnjeg izbivanja iz akademske zajednice, nije mogao odmah dobiti posao u nekom znanstvenom institutu ili visokoškolskoj ustanovi, počinje razvijati nove ideje u stanu Haralda Hessa, bivšeg kolege iz Bell Laboratories, također nezaposlenog. Nakon što je razradio teorijske postavke na svom laptopu, a zatim i načinio preliminarne pokuse, 2005. godine počinje raditi u istraživačkom centru Janelia Farm Research Campus u Ashburnu u Virginiji. Ondje radi i danas, vodi svoju istraživačku grupu (u istome centru H. Hess ima svoj laboratorij) i bavi se tehnikama oslikavanja u biologiji, najviše neurobiologiji. Osim Nobelove nagrade, od drugih priznanja, koja je dobio, valja izdvojiti *McMillan Award* (1992.) i *National Academy of Sciences Award for Initiatives in Research* (1993.) i *Max Delbruck Prize* (2010., odbio ju je primiti).

STEFAN WALTER HELL porijeklom je iz Banata, a rođen je 23. prosinca 1962. godine u rumunjskom gradu Aradu. Do šesnaeste godine živio je u Rumunjskoj, a tada se, s roditeljima Nijemcima, seli u u Saveznu Republiku Njemačku. Studirao je fiziku na Sveučilištu u Heidelbergu, gdje je 1990. stekao i doktorat. Do 1993. radio je u EMBL-u (European Molecular Biology Laboratory) u Heidelbergu, od 1993. do 1996. na Sveučilištu u Turkuu, a 1994. bio je i gostujući znanstvenik na Sveučilištu u Oxfordu.

Od 1997. radi na Institutu Maxa Plancka za biofizičku kemiju u Göttingenu. Godine 2002. na tom je institutu osnovao odjel posvećen istraživanjima na području nanobiofotonike. Profesor je na Sveučilištu u Göttingenu i Sveučilištu u Heidelbergu, a također radi u Njemačkom centru za istraživanje raka (DKFZ). Hell se od početka istraživačkog rada bavio mikroskopijskim metodama koje zaobilaze ograničenja u razlučivosti zadana Abbeovim zakonom, isprva razvijajući 4Pi-mikroskopiju, a zatim i STED-mikroskopiju. Prije nego je postao laureatom Nobelove nagrade za kemiju 2014., za svoja je istraživanja dobio niz drugih priznanja među kojima su *Carl-Zeiss-Forschungspreis* (2002.), *Deutscher Zukunftspreis* (2006), *Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Preis* (2008.), *Meyenburg-Preis* (2011.) *Carus-Medaille* (2013.) i druge.

WILLIAM ESCO MOERNER rođen je 24. lipnja 1953. godine u Pleasantonu u Kaliforniji. Pohađao je Washingtonovo sveučilište u St. Louisu. Jedini od triju dobitnika Nobelove nagrade za kemiju u 2014. godini nije običan fizičar: uz fiziku završio je elektrotehniku i matematiku, istina, samo kao prvostupnik, ali zato s pohvalama. Na Sveučilištu Cornell fiziku je magistrirao i doktorirao, a prvi posao izvan sveučilišta dobio je u IBM-ovu laboratoriju u San Joseu. Osim ostalog, u San Joseu je proučavao ponašanje pojedinačnih molekula i to mu je bio prvi susret s problemom predočavanja objekata nanoskopskih dimenzija. U IBM-u je ostao do 1995., već od 1993. radi i predaje na nekoliko sveučilišta: ETH-u u Zürichu do 1994., Kalifornijskom sveučilištu u San Diegu (1995. – 1998.), Harvardu (1997. – 1998.) te Stanfordu od 1998. do danas. Teško je definirati znanstvena područja koja ga zanimaju, uglavnom se radi o hvatanju i promatranju pojedinačnih molekula te o manipulaciji njima. Npr. jedno od postignuća njegove istraživačke grupe je praćenje molekule RNA u živoj stanici u prostoru i u realnom vremenu. Moerner je dobitnik mnogih nagrada, počeo ih je dobivati još u izviđačima. Najznačajnije su: *Wolf Prize in Chemistry* (2008.), *Irving Langmuir Award* (2009.), *Pittcon Award* (2012.), *Peter Debye Award* (2013.), *John Gamble Kirkwood Medal* (2013.).

Literatura

1. *S. W. Hell, J. Wichman*, Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion-microscopy, Opt. Lett. **19** (1994) 780–782, doi: http://dx.doi.org/10.1364/OL.19.000780.
2. *T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell*, Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97** (2000) 8206–8210, doi: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.15.8206.
3. *W. E. Moerner, L. Kador*, Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid, Phys. Rev. Lett. **62** (1989) 2535–2538, doi: http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.2535.
4. *E. Betzig*, Proposed method for molecular optical imaging, Opt. Lett. **20** (1995) 237–239, doi: http://dx.doi.org/10.1364/OL.20.000237.
5. *R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E: Moerner*, On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein, Nature **388** (1997) 355–358, doi: http://dx.doi.org/10.1038/41048.
6. *E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess*, Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, Science **313** (2006) 1642–1645, doi: http://dx.doi.org/10.1126/science.1127344.
7. *A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, X. Zhuang*, Super-resolution imaging of chemical synapses in the brain, Neuron **68** (2010) 843–856, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.021.
8. B. Huang, M. Bates, X. Zhuang, Super-resolution fluorescence microscopy, Annu. Rev. Biochem. **78** (2009) 993–1016, doi: http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014.
9. *L. Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt*, A guide to super-resolution fluorescence microscopy, J. Cell Biol. **190** (2010) 165–175, doi: http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201002018.