

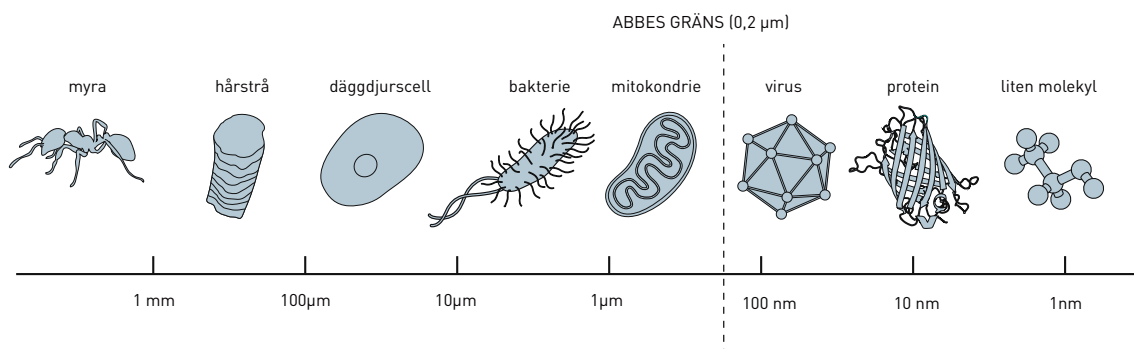
Hur ljusmikroskopet blev ett nanoskop

2014 års Nobelpris i kemi tilldelas **Eric Betzig, Stefan W. Hell** och **William E. Moerner** eftersom de har sprängt en förmodad gräns inom vetenskapen: att ljusmikroskopet aldrig skulle kunna få en upplösning bättre än 0,2 mikrometer. Med fluorescerande molekyler kan forskare numera synliggöra samspellet mellan enskilda molekyler inuti celler; de kan se sjukdomsrelaterade proteiner klumpa ihop sig och följa celledelning på nanonivå.

Röda blodkroppar, bakterier, jästsvampar och spermier. När forskare på 1600-talet för första gången studerade levande material under ett ljusmikroskop öppnade sig en ny värld. Där och då föddes mikrobiologin och sedan dess har ljusmikroskopet varit ett av livsvetenskapernas viktigaste verktyg. Den stora fördelen är att det går att följa processer inuti levande celler. Andra mikroskopimetoder, som elektronmikroskopi, kräver att cellen prepareras på ett sätt som tar död på den.

Lysande molekyler forcerade den fysikaliska begränsningen

Länge har dock ljusmikroskopin hämmats av en fysikalisk begränsning för hur små strukturer som går att se. Mikroskopisten Ernst Abbe publicerade år 1873 en ekvation som visar att mikroskopets upplösning bland annat är villkorad av ljusets våglängd. Detta har inneburit att forskare under större delen av 1900-talet trodde att ljusmikroskopet aldrig skulle kunna visa detaljer mindre än ungefär halva ljusets våglängd, 0,2 mikrometer (figur 1). Det har gått att se konturerna av vissa av cellens organeller, som dess energikraftverk mitokondrierna. Men det har varit omöjligt att urskilja mindre objekt, som exempelvis enskilda proteinmolekyler som samspelar i cellen. Det är ungefär som att kunna se husen i en stad, men inte kunna följa invånarna som bygger staden och lever i den. Den som vill förstå hur en cell fungerar, behöver kunna följa de enskilda molekylernas arbete.



Figur 1. Mot slutet av 1800-talet definierade Ernst Abbe gränsen för ljusmikroskopets upplösning till ungefär halva ljusets våglängd, cirka 0,2 mikrometer. Det innebar att forskare kunde urskilja hela celler och även vissa delar av cellen, så kallade organeller. Men det skulle aldrig gå att urskilja till exempel ett normalstort virus eller enskilda proteiner.

Abbes ekvation är fortfarande giltig, men hans gräns har ändå forcerats. Eric Betzig, Stefan W. Hell och William E. Moerner tilldelas 2014 års Nobelpris i kemi eftersom de med hjälp av fluorescerande molekyler har tagit ljusmikroskopin till en ny dimension. Rent teoretiskt finns numera ingen struktur som är för liten för att studera. Mikroskopin har tack vare detta blivit till nanoskopi.

Berättelsen om hur Abbes gräns kringgicks löper i parallella spår; två olika principer som har utvecklats oberoende av varandra belönas. Vi börjar i en studentlägenhet i sydvästra Finland. År 1993 fick Stefan Hell en genialisk idé när han en dag bläddrade i en lärobok i kvantoptik.

Ungdomligt uppror mot Abbes gräns bemöttes med skepticism

Stefan Hell hade ända sedan han disputerat vid universitetet i Heidelberg år 1990 försökt att få en möjlighet att göra upp med Ernst Abbes över hundra år gamla gräns. Tanken att utmana en så vedertagen princip kittlade. Men etablerade forskare i Tyskland bemötte hans iver med skepticism. Det var därför som Stefan Hell hade tagit sin tillflykt till det kalla Norden. En professor som utvecklade fluorescensmikroskopi vid universitetet i Åbo (Turku) hade erbjudit honom en plats i sin forskargrupp. Stefan Hell var övertygad om att det måste finnas ett sätt att kringgå Abbes gräns och det var när hans blick föll på orden *stimulerad emission* i boken om kvantoptik som en ny tanke bana öppnade sig: ”I den sekunden kom insikten till mig. Jag hade slutligen hittat en bärande idé – en verklig tråd att följa.” Så kommenterade han händelsen 2009. Låt oss dyka in i hur han tänkte.

Lösningen: en ficklampa i nanofomat som kan svepa över provet

I Åbo (Turku) arbetade Stefan Hell med så kallad fluorescensmikroskopi, där forskare utnyttjar fluorescerande molekyler för att synliggöra delar av cellen. Till exempel kan de använda fluorescerande antikroppar som specifikt kopplar till cellens arvs massa, DNA. Med hjälp av en kortvarig ljuspuls laddar forskarna upp antikropparna, som sedan under en kort tid lyser. Om antikropparna binder till DNA kommer de att stråla från cellens mitt, eftersom nästan allt DNA ligger packat inuti cellens kärna. På detta vis kan forskare se var en viss molekyl befinner sig. Men de har bara kunnat lokalisera kluster av molekyler, till exempel en härva av DNA. Upplösningen har varit för låg för att man ska kunna urskilja de enskilda långa DNA-slingorna. Det är som att kunna se ett garnnystan, men inte kunna följa själva tråden.

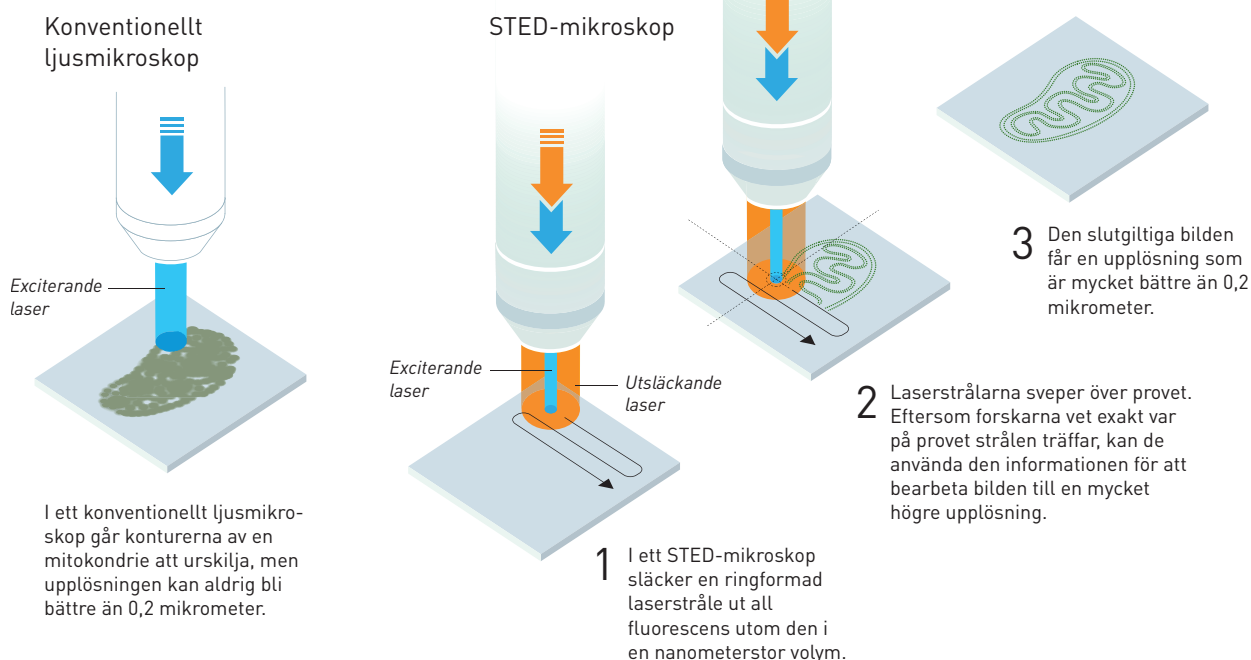
När Stefan Hell läste om stimulerad emission insåg han att det skulle gå att skapa en sorts nanoficklampa som svepte över provet, nanometer för nanometer. Stimulerad emission innebär att forskare kan släcka fluorescerande molekyler. De skickar en laserstråle mot molekylerna som omedelbart tappar sin energi och blir mörka. År 1994 publicerade Stefan Hell en artikel där han presenterade sina tankar. Metoden, kallad *stimulated emission depletion (STED)*, går ut på att en ljuspuls laddar alla fluorescerande molekyler så att de börjar lysa (figur 2). Samtidigt släcker en annan puls ner alla molekyler utom dem i en nanometerstor volym i mitten. Då registreras ljuset från just bara denna minimala volym. Genom att svepa över provet och kontinuerligt mäta ljusnivåerna går det att få en helhetsbild. Ju mindre volym som tillåts fluorescera åt gången, desto högre upplösning får den slutliga bilden. Det finns i princip inte längre någon gräns för ljusmikroskopin.

Stefan Hell tillverkar den första nanoficklampan i Tyskland

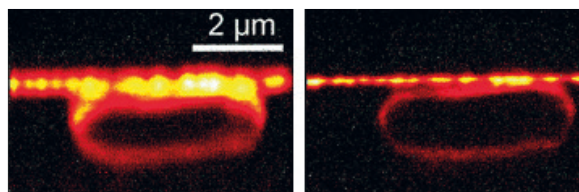
Stefan Hells teoretiska publikation väckte ingen omedelbar uppståndelse, men var tillräckligt intressant för att han skulle erbjudas en plats vid Max Planck-institutet för biofysikalisk kemi i Göttingen. Under de kommande åren förverkligade han sina idéer; han utvecklade ett STED-mikroskop. År 2000 kunde han visa för världen att hans teorier också fungerar i praktiken, bland annat avbildade han en *E. coli*-bakterie med en upplösning som aldrig tidigare varit möjlig i ett ljusmikroskop (figur 3).

Figur 2

Principen för STED-mikroskopi



STED-mikroskopet sammanfogar alltså ljuset från en mängd små volymer till en stor helhet. Nästa princip som nu belönas, *enmolekylmikroskopi*, bygger i stället på att flera bilder läggs ovanpå varandra. Eric Betzig och W. E. Moerner (som sedan födseln har haft sina initialer, W. E., som tilltalsnamn) har var och en för sig stått för viktiga steg i utvecklingen. Grunden lades när W. E. Moerner lyckades detektera en enda liten fluorescerande molekyl.



Figur 3. En av de första bilderna som Stefan Hell tog med ett STED-mikroskop. Till vänster är *E. coli*-bakterien avbildad med hjälp av konventionell mikroskopi, till höger med STED. Upplösningen i STED-bilden är tre gånger bättre. Bild från *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 8206–8210.

Först i världen – W. E. Moerner detekterar en enskild fluorescerande molekyl

De flesta kemiska metoder, till exempel mätningar av absorption och fluorescens, bygger på att forskare studerar miljontals molekyler samtidigt. Resultaten från sådana experiment representerar ett genomsnitt, en sorts medelmolekyl. Forskare har fått nöja sig med detta eftersom inget annat har varit möjligt. Men länge har de drömt om att kunna göra mätningar på enskilda molekyler. Ju större detaljrikedom de får i sina kunskaper, desto större är chansen att de till exempel ska förstå hur en sjukdom utvecklas.

Därför var det en revolution när W. E. Moerner år 1989, som förste forskare i världen, lyckades mäta ljusabsorptionen från en enskild molekyl. Vid denna tidpunkt arbetade han vid IBM:s forskningscentrum i San Jose i Kalifornien. Experimentet öppnade en dörr mot en ny framtid. Det inspirerade många kemister att arbeta med enskilda molekyler, bland annat Eric Betzig. Men hans del av historien får vänta lite.

Nästa steg mot enmolekylmikroskopin tog W. E. Moerner åtta år senare. Då med hjälp av en tidigare Nobelprisbelönad upptäckt: *det grönfluorescerande proteinet (GFP)*.

Molekylstora lampor som går att slå på och av

År 1997 hade W. E. Moerner flyttat till University of California, San Diego, där den numera Nobelprisbelönade Roger Tsien arbetade med att få GFP att fluorescera i alla regnbågens färger. Det gröna proteinet isolerades från en självlysande manet, och dess kraft ligger i att det kan synliggöra andra proteiner inuti levande celler. På genteknisk väg kopplar forskarna ihop det grönfluorescerande proteinet med andra proteiner. Det gröna skenet avslöjar då exakt var i cellen det märkta proteinet befinner sig.

W. E. Moerner upptäckte att en variant av GFP gick att slå på och av. När han belyste proteinet med ljus av våglängden 488 nanometer fluorescerade proteinet, men efter ett tag sloknade det. Oavsett hur mycket ljus han sedan skickade mot proteinet var fluorescensen död. Däremot, visade det sig, kunde ljus av en annan våglängd, 405 nanometer, väcka proteinet till liv igen. När proteinet hade aktiverats, fluorescerade det återigen vid 488 nanometer.

Dessa aktiverbara proteiner spred W. E. Moerner ut i en gel, så att avståndet mellan varje enskilt protein var större än Abbes gräns på 0,2 mikrometer. Eftersom de låg så glest kunde ett vanligt ljusmikroskop särskilja skenet från de enskilda molekylerna – de var som minimala lampor med en strömbrytare. Resultaten publicerades i *Nature* 1997.

Genom sin upptäckt visade W. E. Moerner att det går att kontrollera enstaka molekylers fluorescens. Därmed bidrog han på ett fundamentalt sätt till lösningen av ett problem som Eric Betzig hade formulerat två år tidigare.

Trött på akademien – men besatt av Abbes gräns

Precis som Stefan Hell var Eric Betzig besatt av tanken på att försöka spränga Abbes gräns. Vid Bell Laboratories i New Jersey arbetade han under 1990-talets början med en ny form av ljusmikroskopi som kallas för närfältsmikroskopi, där ljusstrålen kommer från en extremt tunn spets som bara ligger några nanometer från själva provet. Även denna form av mikroskopi kringgår Abbes gräns, men metoden har svagheter. Bland annat har ljuset från den sköra spetsen kort räckvidd, vilket gör det svårt att visualisera strukturer som ligger under cellens yta.

År 1995 tyckte Eric Betzig att närfältsmikroskopin hade kommit till vägs ände. Han trivdes också dåligt i den akademiska miljön och bestämde sig för att avsluta sin forskarkarriär. Utan att veta vad han skulle göra härnäst, sa han upp sig från Bell Labs. Men tankarna kretsade ändå kring Abbes gräns. Under en kall vinterpromenad dök en ny idé upp i huvudet: kunde man kringgå Abbes gräns genom att använda molekyler med olika optiska egenskaper, som exempelvis fluorescerade med olika färg?

Inspirerad av bland annat W. E. Moerner hade Eric Betzig med närfältsmikroskopins hjälp detekterat fluorescensen från enstaka molekyler. Nu började han fundera på om ett vanligt mikroskop skulle kunna ge samma höga upplösning om olika molekyler lyste i olika färger, exempelvis rött, gult och grönt. Tanken byggde på att mikroskopet tog en bild per färg. Låg alla molekyler av samma färg så glest att de aldrig kom närmare varandra än Abbes gräns, kunde deras position bestämmas väldigt väl. Lades sedan dessa glesa bilder ovanpå varandra skulle den sammansatta bilden få en upplösning långt bättre än Abbes gräns; en röd, en gul och en grön molekyl skulle gå att särskilja även om avståndet mellan dem bara var några nanometer. På detta vis kunde Abbes gräns kringgås.

Men det fanns viktiga praktiska problem, bland annat en brist på molekyler med tillräckligt många särskiljbara optiska egenskaper.

År 1995 publicerade Eric Betzig sina teoretiska tankegångar i tidskriften *Optics Letters*. Sedan tog han arbete i sin pappas företag och övergav forskningen.

Det grönfluorescerande proteinet lockade tillbaka Eric Betzig till mikroskopin

Under många år var Eric Betzig bortkopplad från forskningen. Men en dag vaknade längtan efter vetenskapen igen. När han återvände till den vetenskapliga litteraturen, stötte han för första gången på det grönfluorescerande proteinet. Insikten om att det fanns ett protein som kan få andra proteiner att lysa inuti celler blåste liv i Eric Betzigs funderingar kring Abbes gräns.

Det verkliga genombrottet kom 2005 när han snubblade över aktiverbara fluorescerande proteiner liknande dem som W. E. Moerner år 1997 hade detekterat på enmolekylnivå. Eric Betzig insåg att dessa proteiner var det verktyg som krävdes för att förverkliga den idé han hade fått tio år tidigare. De fluorescerande molekylerna behövde inte ha olika färg, de kunde precis lika gärna fluorescera vid olika tidpunkter.

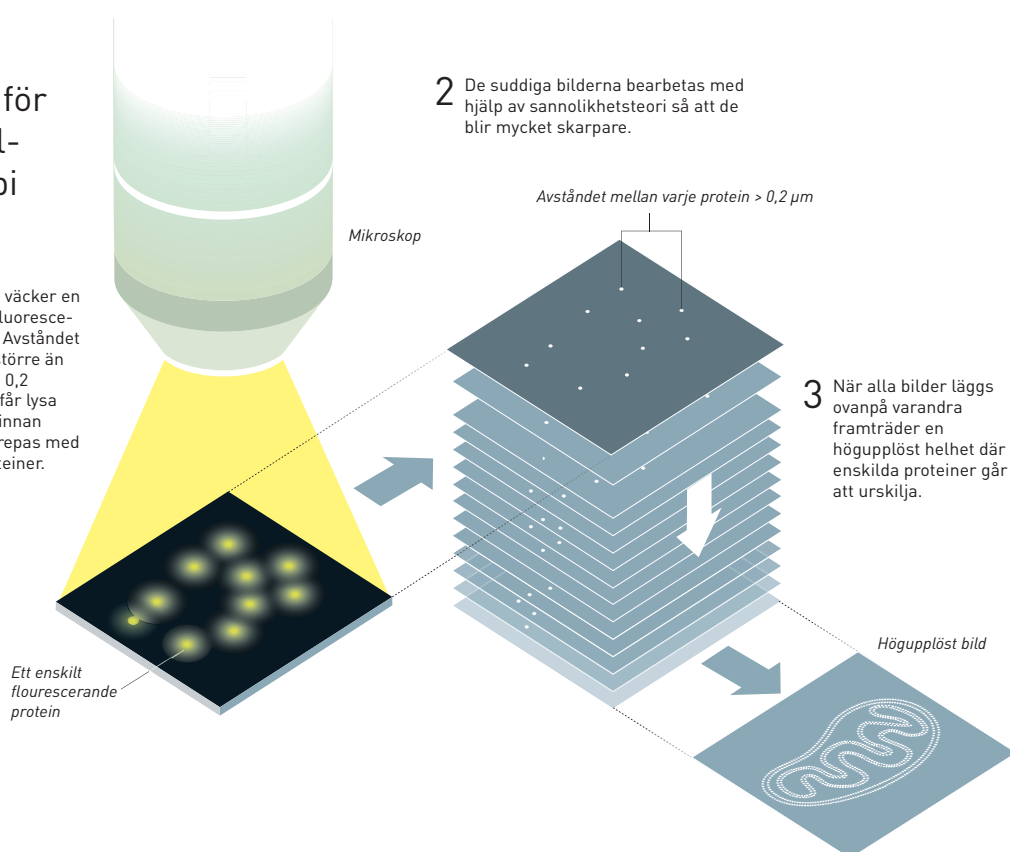
Eric Betzig övervinner Abbes gräns genom att lägga bilder ovanpå varandra

Bara ett år senare kunde Eric Betzig, i samarbete med forskare som arbetade med aktiverbara fluorescerande proteiner, visa att hans idé höll i praktiken (figur 4). Bland annat kopplade forskarna aktiverbara proteiner till det membran som omger cellens återvinningsstation, lysosomen. Med hjälp av en ljuspuls triggades de fluorescerande proteinerna, men pulsen var så svag att endast en bråkdel av dem vaknade till liv. Eftersom de var så få låg nästan alla på ett avstånd från varandra som var större än Abbes gräns om 0,2 mikrometer. Därmed kunde läget för varje enskilt lysande protein registreras med hög noggrannhet i mikroskopet. När deras fluorescens efter ett tag dog ut,

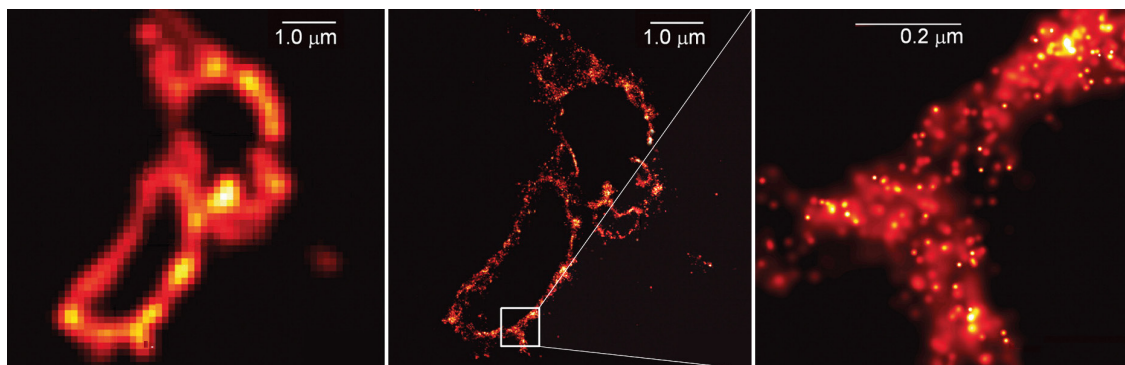
Figur 4

Principen för enmolekylmikroskopi

- 1 En svag ljuspuls väcker en bråkdel av alla fluorescerande proteiner. Avståndet mellan dem är större än Abbes gräns om 0,2 mikrometer. De får lysa tills de bleknar, innan proceduren upprepas med en ny grupp proteiner.



aktiverade forskarna en ny undergrupp av proteiner. Pulsen var återigen svag och endast en bråkdel började lysa. Ännu en bild registrerades, innan proceduren upprepades om och om igen. När Eric Betzig lade alla bilder ovanpå varandra fick han en superupplöst bild av lysosomens membran. Upplösningen var långt bättre än Abbes gräns. Det banbrytande arbetet publicerades 2006 i tidskriften *Science*.



Figur 5. Bilden i mitten visar lysosomens membran och är en av de första bilderna som Eric Betzig tog med enmolekylmikroskopi. Den vänstra bilden är tagen med ett konventionellt mikroskop. Till höger syns en förstoring; lägg märke till att skalstrecket är 0,2 mikrometer, vilket är Abbes gräns. Bilden har en mångfalt bättre upplösning. Bild från *Science* 313:1642–1645.

2014 års Nobelpristagare kartlägger fortfarande livets innersta hemligheter

De metoder som har tagits fram av Eric Betzig, Stefan Hell och W. E. Moerner ligger till grund för flera nanoskopitekniker och används i dag över hela världen. Pristagarna är alla fortfarande aktiva forskare; de utgör en del av den stora och växande grupp som leder utvecklingen inom nanoskopin. När de riktar sina kraftfulla nanoskop mot livets minsta beståndsdelar får de också fram fundamental kunskap. Stefan Hell har tittat in i levande nervceller för att bättre förstå hjärnans synapser. W. E. Moerner har undersökt proteiner som är inblandade i Huntingtons sjukdom. Eric Betzig har följt hur celler delar sig i embryon. Detta är bara några exempel av väldigt många. En sak är säker: 2014 års Nobelpristagare i kemi har lagt grunden till en kunskapsutveckling av största nytta för mänskligheten.

LÄNKAR OCH LÄSTIPS

Mer information om årets priser, bland annat en vetenskaplig bakgrundsartikel på engelska, finns på Kungl. Vetenskapsakademiens webbplats, <http://kva.se> och på <http://nobelprize.org>. Där kan man också se presskonferensen som webb-TV. Mer information om utställningar och aktiviteter kring Nobelpriset och Ekonomipriset finns på www.nobelmuseum.se.

Artiklar

Nair, P. (2012) QnAs with W. E. Moerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(17):6357

Deffke, U. (2011) Outsmarting optical boundaries, www.mpg.de/1039625/Optical_Boundaries

Gewin, V. (2006) Eric Betzig, group leader, Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Leesburg, Virginia, *Nature* 440:578

Howard Hughes Medical Institute, Biography Eric Betzig, www.hhmi.org/scientists/eric-betzig

Föreläsningar och intervjuer (video)

Betzig, E. (2012) Day 2 Distinguished Lecture by Dr. Eric Betzig at MF Symposium, www.youtube.com/watch?v=UqMLL8-eaxk

Intervju med Betzig, E. (2013) Eric Betzig Sequence, www.youtube.com/watch?v=RfmgDv46sC8

Intervju med Hell, S. W. (2013) Stefan Hell Sequence, www.youtube.com/watch?v=WjBPFpVu_6I

Intervju med Moerner, W. E. (2013) Alumni Achievement Award: W.E. Moerner
www.youtube.com/watch?v=VBmgvLATbCc

PRISTAGARNA

ERIC BETZIG

Amerikansk medborgare. Född 1960 (54 år) i Ann Arbor, MI, USA. Fil.dr 1988 vid Cornell University, Ithaca, NY, USA. Gruppledare vid Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA.
<http://janelia.org/lab/betzig-lab>

STEFAN W. HELL

Tysk medborgare. Född 1962 (51 år) i Arad, Rumänien. Fil.dr 1990 vid Universitetät Heidelberg, Tyskland. Forskningsledare vid Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen och chef vid Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Tyskland.
www3.mpibpc.mpg.de/groups/hell

WILLIAM E. MOERNER

Amerikansk medborgare. Född 1953 (61 år) i Pleasanton, CA, USA. Fil.dr 1982 vid Cornell University, Ithaca, NY, USA. Harry S. Mosher Professor in Chemistry och Professor, by courtesy, of Applied Physics vid Stanford University, Stanford, CA, USA.
<http://web.stanford.edu/group/moerner>