

Nobelovo nagrado za kemijo so podelili za mikroskopijo nanometrskih razsežnosti - nanoskopijo

Marko Kreft, Jernej Jorgačevski, Robert Zorec

Nobelovo nagrado za kemijo so letos prejeli Eric Betzig, Stefan W. Hell in William E. Moerner za razvoj superločljivostne fluorescenčne mikroskopije. Telesa vseh živih bitij so iz celic. To temeljno spoznanje biologije 19. stoletja, ki je del celične teorije, je bilo mogoče prav zaradi izumitve mikroskopa dve stoletji pred tem. Do razvoja nanoskopije zaradi omejene optične ločljivosti ni bilo mogoče opazovati celičnih struktur, kot sta na primer mitohondrij ali kloroplast. Po zaslugi letošnjih nagrajencev za kemijo lahko opazujemo delovanje živih organizmov na ravni ne le celičnih organelov, pač pa posameznih proteinov. Švedska kraljeva akademija je nagradila dva pristopa k doseganju superločljivosti. Prvi pristop STED je razvil Stefan W. Hell (Inštitut Maxa Plancka za biofizikalno kemijo), drugi pristop PALM sta razvila Eric Betzig (Howard Hughes Medical Institute) in William E. Moerner (Univerza Stanford). V obrazložitvi ob podelitvi Nobelove nagrade pa je opisan še tretji pristop: mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo.

Temelj vseh nanoskopij je fluorescenčni mikroskop

Fluorescenčni mikroskopi so nepogrešljivi za opazovanje posebej označenih struktur in za meritve fizioloških procesov v celicah. Fluorescenca je pojav, ko s svetlobo kratkih valovnih dolžin, na primer modre ali ultravijolične, vzbudimo izsevanje svetlobe daljših valovnih dolžin. Pri tem zaradi absorpcije fotona elektroni v atomih fluorescentne snovi preidejo v višje energijsko stanje. Pri

vrnitvi elektronov v osnovno stanje se izseva foton svetlobe. Ločljivost fluorescenčne mikroskopije je omejena zaradi uklona svetlobe, in sicer na približno polovico valovne dolžine. To omejitev je leta 1873 odkril in pojasnil fizik Ernst Karel Abbe, ki je deloval v Jeni, nemškem središču razvoja in industrije optike.

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\alpha}$$

Ernst Abbe je pojasnil omejitev ločljivosti optičnih mikroskopov (d). Ločljivost je odvisna od valovne dolžine svetlobe (λ), lomnega količnika snovi, v kateri je objekt opazovanja (n), in sinusa vpadnega kota svetlobe v objektiv (α). Omejitev temelji na fizikalnih lastnostih svetlobe, zato je do izuma nanoskopije veljala za nepresegljivo.

Fluorescenčni mikroskop STED (vzbujeno praznjenje emisije) presega stoletno omejitev ločljivosti

Stefan W. Hell, ki je bil rojen v Aradu v Romuniji in študiral fiziko v Heidelbergu v Nemčiji, je začel z razvojem napredne mikroskopije na Univerzi Turku na Finskem. Objavil je teoretična dela z utemeljitvijo, da je Abbejevo omejitev ločljivosti mogoče preseči. Ko se je vrnil v Nemčijo na Inštitut Maxa Plancka v Göttingenu, je leta 1999 zgradil prvi superločljivostni mikroskop. Mikroskop temelji na zamisli, da lahko z močno svetlobo predčasno sklenemo običajni cikel fluorescence. Mikroskopijo, ki izkorišča to lastnost, je poimenoval z an-



Stefan W. Hell (Inštitut Maxa Plancka za biofizikalno kemijo).

Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Stefan_Hell#mediaviewer/File:Stefan_W_Hell.jpg.

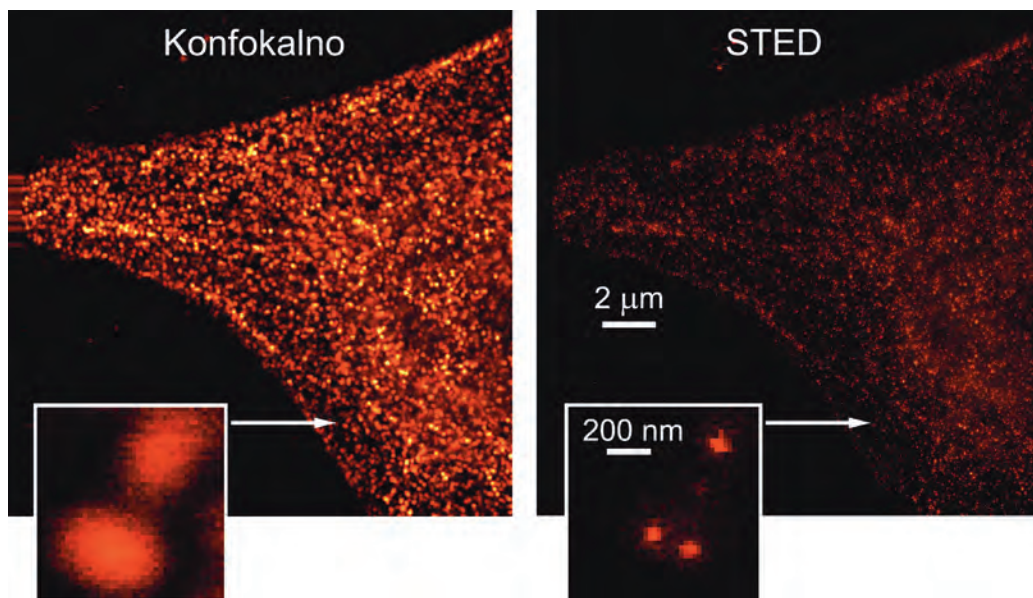
gleškimi akronimom STED (**ST**imulated **E**mission **D**epletion), kar pomeni »vzbujeno praznjenje emisije«. O tem pristopu doseganja superločljivosti smo v *Proteusu* pisali tik pred podelitvijo Nobelove nagrade (*Proteus*, 76, 9-10, 2014: 413).

Z izrabo učinka STED lahko laserski curek ostro ošilimo. Tako omejimo sevanje fluorescenčne svetlobe na zelo majhno območje, nekajkrat manjše od območja, ki bi ga sicer osvetljevali z laserjem. Fluorescenca v vzorcu uspešno nastane le v središču votlega curka (stolpca) svetlobe STED, ki ima v preseku obliko kolobarja ali venca. Premer te vrzeli je mnogo manjši od premera curka za osvetljevanje, tako je območje uspešne fluorescence močno omejeno (ošiljeno), kar omogoča sestavljanje slike s superločljivostjo. Mikroskop sestavi celotno sliko tako, da usklajeno premika oba curka svetlobe po preparatu, računalnik pa beleži jakost svetlobe fluorescence v teh posameznih drobnih fluorescenčnih točkah. Mikroskopija STED nima nobene načelne omejitve ločljivosti. Z močnejšimi laserji dosegamo višje ločljivosti.

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}}$$

Enačba je podobna Abbejevi, le da je v imenovalcu ulomka dodan člen, ki opisuje učinkovitost STED. I je jakost laserske svetlobe STED, I_s pa je jakost (intenziteta) svetlobe STED, ki ugasne polovico vseh fluorescenčnih molekul.

Pred tremi leti smo raziskali vlogo proteina Munc18-1 pri izločanju hormonov iz možganske žleze hipofize. Izsledke smo objavili v znanstveni reviji *Journal of Neuroscience*. Letošnji Nobelov nagrajenec Stefan Hell je kot eden od soavtorjev prispeval superločljivostne meritve celičnih mešičkov. Nova mikroskopska tehnika za celično fiziologijo pomeni tako velik napredek, da smo se odločili zgraditi svoj sistem STED z dvema fluorescenčnima kanaloma in hitrim zajemanjem slike. Pri načrtovanju in izgradnji smo sodelovali z nemškimi kolegi Stefanom Hellom ter Claudio Geisler in Alexandrom Egnerjem iz nemškega Laser Laboratorium Goettingen. Gradnja je potekala v okviru Centra odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (CIPKeBiP) in nacionalnega raziskovalnega programa za celično fiziologijo. Mikroskop je nameščen v Referenčnem središču za konfokalno mikroskopijo Carl Zeiss na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete



Konfokalna in STED-slika istega astrocita, ki je bil označen s fluorescentnimi protitelesi proti glutamatnemu transporterju 1. Na povečanih izsekih konfokalne in STED-slike (obrobjena z belim kvadratom v levem spodnjem kotu obeh slik) je vidna razlika v ločljivosti med obema tehnikama. Na konfokalni sliki sta vidni dve ločeni fluorescenčni entiteti, na STED-sliki pa se pokaže, da gre za tri entitete, pri čemer je razdalja med dvema manjša od uklonske limite (opisano v prvi enačbi).

v Ljubljani. S tem mikroskopom trenutno raziskujemo procese v astrocitih, ki so celice gljive v možganih in vplivajo na prenos informacije v sinapsah. Meritve so pokazale, da se mikroskopija STED lahko za slikanje bioloških vzorcev precej približa ločljivosti elektronske mikroskopije, zajema pa še časovni potek procesov v živih celicah.

Nanoskopija, ki izkorišča fluorescenco posameznih molekul

Pri fluorescenčni mikroskopiji slikamo preparate, v katerih hkrati svetijo številne fluorescenčne molekule. Če so preblizu skupaj, jih ne razločimo. Na Univerzi California v San Diegu je deloval Nobelov nagrajenec Roger Tsien, ki je raziskoval zelene fluorescenčne proteine. Tokratni Nobelov nagrajenec William Moerner je odkril, da nekatere zelene fluorescenčne proteine lahko po želji prižiga in ugaša. Moerner se je rodil v Ple-

asantonu v Kaliforniji v Združenih državah Amerike in končal tri študije: fiziko, matematiko in elektrotehniko. Doktoriral je iz fizike na Univerzi Cornell, od leta 1998 pa deluje na Univerzi Stanford.

Eric Betzig je opisal, da lahko to prižiganje in ugašanje izkoristi za to, da molekule slika drugo za drugo. Betzig se je rodil v Ann Arborju v Michiganu v Združenih državah Amerike, po diplomi iz fizike je na Univerzi Cornell še doktoriral iz fizike. Sprva je delal v laboratorijih telekomunikacijskega podjetja Bell in nato sedem let v očetovem podjetju za industrijske stroje. Kasneje se je želel vrniti v znanost, vendar je taka vrnitev brez znanstvenih objav težavna. Zato se je domislil zasnove mikroskopa, ki bi ga lahko pripeljala do nove priložnosti. Z vloženim patentom se mu je priložnost ponudila v Znanstvenem centru Janelia v Ashburnu v Virginii v Združenih državah Amerike.



William Moerner (Univerza Stanford). Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/William_E._Moerner#mediaviewer/File:WE_Moerner.jpg.



Eric Betzig (Howard Hughes Medical Institute). Vir: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/betzig-facts.html.

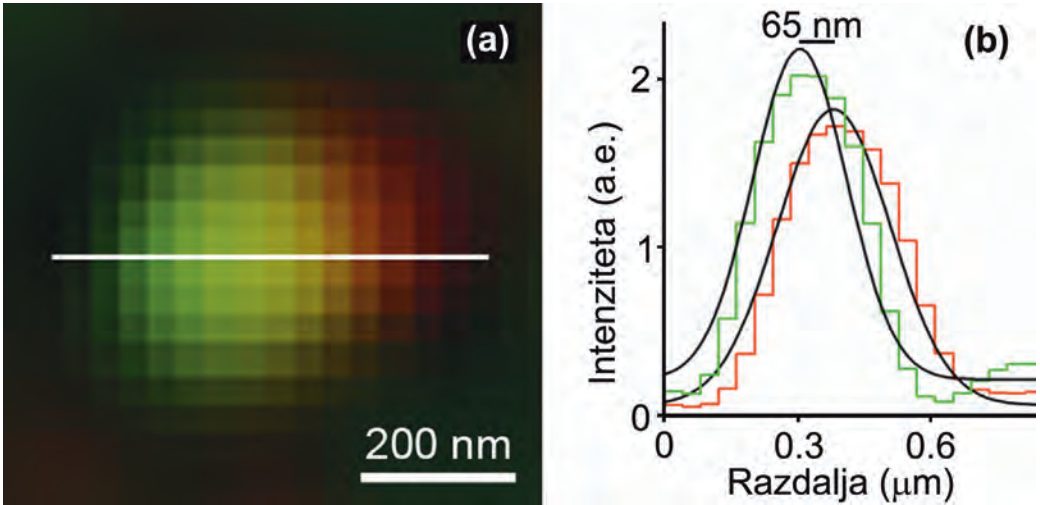
Tam je razvil mikroskop, ki sosednje molekule loči z nesinhronim ugašanjem in prižiganjem njihove fluorescence. Tako so slike sosednjih molekul ločene časovno. Vsaka posamezna slika molekule nima ločljivosti nič večje, kot jo je opisal Abbe, lahko pa z veliko večjo natančnostjo matematično določimo središče slike posamezne molekule. Ko zložimo skupaj na stotine matematično določenih središč molekul, ki so svetile le v določenem kratkem času, dobimo celostno sliko vseh molekul v preparatu. Tak pristop nanoskopije uporabljajo različice mikroskopije, ki jih imenujemo z angleškimi akronimi PALM (Photo-Activated Localization Microscopy), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) in PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography). Tudi te nimajo nobene načelne omejitve ločljivosti. Njihova ločljivost je obratno sorazmerna s korenem

številca fotonov, ki jih kamera zazna iz posamezne molekule (N):

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha \sqrt{N}}$$

Mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo

Tretji pristop za zviševanje ločljivosti mikroskopije, ki ni bil neposredno nagrajen, je pa v obrazložitvi ob podelitvi Nobelove nagrade opisan kot pomemben napredek v razvoju mikroskopije, je mikroskopija s strukturirano osvetlitvijo. Osvetlitev izkorišča interferenco med dvema curkoma, kar povzroči sinusoidni vzorec vzbujevalne svetlobe. Ko taka sinusoidna osvetlitev interferira s strukturami v biološkem preparatu, se pojavijo svetlobni vzorci (znani kot Moiréjevi vzorci). Ti vzorci s pomočjo računalniške analize razkrijejo podrobnosti, ki so manjše

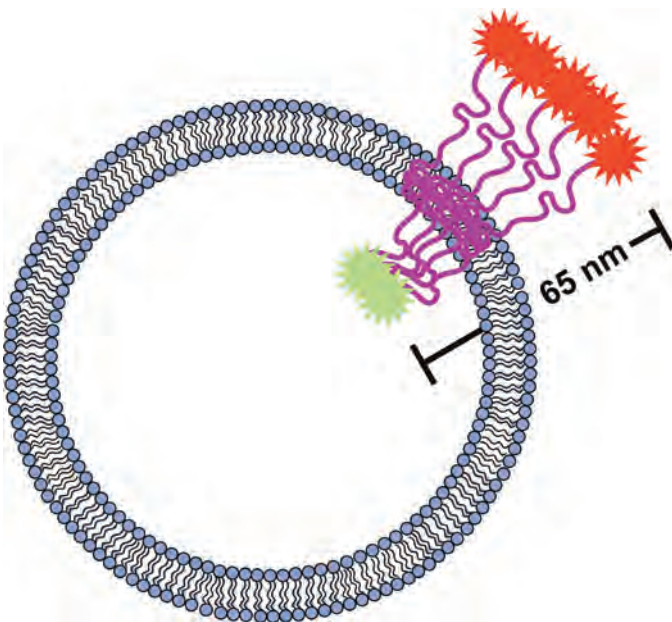


(a) Slika SIM prikazuje zeleno in rdečo fluorescenčno sondo na krajnih koncih sinaptobrevina 2. Intenziteti obeh fluorescenčnih signalov, ki smo ju izmerili ob beli horizontalni črti v ekvatorialni ravnini obeh signalov, sta prikazani na desni strani slike (b). Razdaljo med obema sondama smo izmerili kot razdaljo med vrhovoma Gaussovih krivulj, ki smo ju prillegli na posamezni intenzitetni profil fluorescenc.

od Abbejeve omejitve ločljivosti za faktor dva:

$$d = \frac{\lambda}{4n}$$

Ta pristop smo uporabili v raziskavi, ki je bila nedavno objavljena v reviji *Nature Communications*. Raziskali smo vlogo enega od proteinov, ki sodelujejo pri procesu izlivanja mešičkov (sinaptobrevin 2). Določili smo velikost tega proteina, prostorsko konfiguracijo in število molekul v posameznem mešičku v živem astrocitu.



S posebnimi superločljivostnimi izboljšavami mikroskopije s strukturirano osvetlitvijo in z označevanjem s fluorescenčnimi sondami (rdeče in zeleno) smo razvozlati nanoarhitekturo umeščenosti sinaptobrevina 2 (vijolično) v membrano posameznega mešička v prerezu (modro). Odkrili smo tudi število molekul, ki je potrebno za učinkovito zlivanje membran.

Zgradbo teh mešičkov in nanoarhitekturo umeščenosti sinaptobrevina 2 smo razvozla- li z metodami molekulske biologije. Protein sinaptobrevin 2 smo na vsakem koncu ozna- čili s fluorescentno molekulo.

To je še dodatno povečalo ločljivost optič- ne mikroskopije s strukturirano osvetlitvijo. Mejo ločljivosti smo s približno 120 nano- metrov še povečali na 20 nanometrov. Ti poskusi so nam omogočili izmeriti, da je sinaptobrevin 2, ko je v svojem naravnem okolju, velik 65 nanometrov ter da je na po- sameznem mešičku manj kot 25 teh mole- kul. Odkrili smo tudi, da se te molekule v mešičku sestavljajo v večje strukture. Podat- ki so pomembni za razumevanje fiziološke vloge tega proteina, ki ga cepita tetanusni in botulinusni nevrotoksin (najbolj toksič- ni snovi, ki paralizirata prenos signalov po živčevju).

Literatura:

- Hell, S. W., 2007: *Far-Field Optical Nanoscopy*. *Science*, 316: 1153-1158.
- Wildanger, D., Rittweger, E., Kastrop, L., Hell, S. W., 2008: *STED microscopy with a supercontinuum laser source*. *Optics Express*, 16: 9614-9621.
- Singh, P., Jorgačevski, J., Kreft, M., Grubišič, V., Stout, R. F. Jr., Potokar, M., Parpura, V., Zorec, R., 2014: *Single-vesicle architecture of synaptobrevin 2 in astrocytes*. *Nature Communications*, 5: 3780.
- The Nobel Prize in Chemistry 2014*. *Nobelprize.org*. *Nobel Media AB 2014*. *Web. 29 Oct 2014*. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/.
- Jorgačevski, J., Potokar, M., Grile, S., Kreft, M., Liu, W., Barclay, J. W., Bückers, J., Medda, R., Hell, S.W., Parpura, V., Burgoyne, R. D., Zorec, R., 2011: *Munc18-1 tuning of vesicle merger and fusion pore properties*. *Journal of Neuroscience*, 31: 9055-9066.
- Kreft, M., Jorgačevski, J., 2014: *Mikroskopija, ki presega meje optične ločljivosti*. *Proteus*, 76 (9/10): 413-419.

Naravoslovje v šoli • Raziskave PISA in šolske politike

Raziskave PISA in šolske politike

Zdenko Kodolja

V zadnjem desetletju imajo mednarodne raziskave, ki skušajo izmeriti znanje učen- cev pri matematiki, naravoslovju in bralni pismenosti, velik vpliv na šolske politike v številnih razvitih državah. Še posebej velik vpliv imajo raziskave PISA, ki se izvajajo od leta 2000 (v Sloveniji pa od leta 2006) na tri leta v državah članicah OECD in drža- vah partnericah. Gre za raziskave, katerih cilj je ugotoviti, kakšna je raven tako ime- novane bralne, matematične in naravoslovne pismenosti pri učenkah in učencih, ko so stari približno 15 let, to je nekako takrat, ko zaključijo obvezno šolanje. Pismenost je v tem kontekstu razumljena predvsem uti- litaristično: kot zmožnost uporabe znanja in spretnosti v vsakdanjem življenju. Za te raziskave je namreč značilno, da jih zani-

ma znanje, ki ga otroci te starosti imajo, ne pa toliko to, kje so ga pridobili. Zato niso izključno usmerjene le na znanje, ki ga po- sredujejo šole. Bolj kot vprašanje, kaj učenci od tistega, kar je v učnih načrtih določeno kot učenja vredno, tudi dejansko znajo, jih zanima, kako tisto znanje, ki naj bi ga kot petnajstletniki po mednarodnih normah imeli, znajo uporabiti pri reševanju praktič- nih problemov v realnem življenju.

Kljub temu pa so rezultati teh raziskav – ki so svetovni javnosti predstavljeni podobno kot rezultati mednarodnih športnih tekmo- vanj, torej v obliki rang lestvice, na kateri so države razvrščene po dosežkih svojih učen- cev – pogosto razumljeni kot objektivna in mednarodno primerljiva ocena kakovosti šol