

‘Individuele deeltjes zien blinken blijft fascinerend’

Een individueel deeltje dat als een lampje aan- en uitfloept, het is de basis van single molecule detection. Na al die jaren raakt ‘spectroscopist’ Johan Hofkens er nog altijd door gefascineerd. ‘Ik volg gewoon mijn gevoel als ik de breedte opzoek.’

Vijfentwintig jaar geleden woonde Johan Hofkens, toen nog een jonge scheikundestudent, in een volgepakt auditorium van de KU Leuven een conferentie bij over fluorescentiemicroscopie. Die vorm van microscopie waarbij je moleculaire labels (fluoroforen) aan andere deeltjes koppelt om ze te kunnen traceren, was begin jaren negentig nog maar pas zijn kinderschoenen ontgroeid. Maar de uitgenodigde sprekers lieten het publiek zien welke stormachtige ontwikkelingen eraan zaten te komen.

Een van de sprekers toonde een filmpje waarop een label continu aan en uit floepte – als een knipperend seinlicht dat je aandacht trekt. Het bleek één enkel penta-ceenmolecuul. ‘Die man had het dus klaargespeeld een individueel molecuul in beeld te brengen’, vertelt Johan Hofkens. ‘Ik was met verstomming geslagen. Een individueel deeltje!’

Zijn mentor, emeritus hoogleraar scheikunde Frans De Schryver, vertelde Hofkens en zijn collega-studenten na de conferentie dat ze zich geen illusies hoefden te maken dat de fluorescentiemicroscopie of de techniek om individuele moleculen waar te nemen – *single molecule detection* in jargon – snel naar Leuven zou komen. ‘Single molecule detection werkte toen alleen maar bij extreem lage temperaturen’,

zegt Hofkens. ‘Bovendien had je er vloeibaar helium voor nodig, wat duur was en speciale apparatuur vereiste.’

Maar de sprekers op de conferentie kregen gelijk: fluorescentiemicroscopie maakte inderdaad een stormachtige evolutie door. Hofkens: ‘Vier jaar later, ik had toen mijn PhD binnen en was als postdoc aan de slag, hadden we al een microscoop die werkte bij kamertemperatuur. Soms gaat de wetenschap heel snel vooruit.’

Laten we eerst onze positie bepalen. Hoe verhouden fluorescentiemicroscopie en in het bijzonder single molecule detection – jouw vakgebied – zich tot de spectroscopie, toch de rode draad in dit nummer?

‘De spectroscopie is heel breed: ze houdt zich per definitie bezig met onderzoeken en meten van de parameters die voortkomen uit interacties tussen materie en elektromagnetische straling. De discipline zou

je min of meer kunnen indelen in twee gebieden: het meet- en het onderzoeksgebied. In het meetgebied, waarin dus fluorescentiemicroscopie thuishoort, speelt de aard van het uitgestraalde licht meestal geen belangrijke rol, want het toont ons gewoon waar de labelmoleculen zich op een bepaald tijdstip bevinden. En bij single molecule detection, wat inderdaad eigenlijk een extreme vorm van fluorescentiemicroscopie is, zoom je gewoon nog wat meer in. Dus ja, beide vakgebieden behoren tot dat ene gebied van de spectroscopie.’

Eigenlijk lijkt single molecule detection te mooi om waar te zijn: je kunt er zowel eiwitten in een levende cel mee volgen als individuele polymeren in een structuurmatrix. Zijn er toch ook niet een paar kanttekeningen?

‘Natuurlijk zijn die er. Je moet gewoon heel goed nadenken over je experiment alvorens je begint. En je moet weten wat kan, en wat onmogelijk is. De belangrijkste beperkingen hebben te maken met het signaal waarmee je werkt, licht dus. Je moet in de tijd waarbinnen je experiment loopt voldoende fotonen uit je labelmolecuul zien te ‘oogsten’, zodat je een voldoende sterk signaal krijgt. Dit is zo cruciaal dat het in wezen je experiment bepaalt. Als je een biologisch proces wilt bekijken, moet dit zich dus op een tijdschaal afspelen die

‘Soms gaat de wetenschap heel snel vooruit’



BART CLOET

compatibel is met de fluorescentie van je labels. Een paar microseconden is bijvoorbeeld te kort, want tot nog toe beschikken we niet over moleculen die voldoende snel fluoresceren en dus genoeg fotonen uitzenden om een zinvolle meting op te leveren.’

Wat is dan wel een goede tijdschaal?

‘Een tijdschaal van enkele milliseconden is bijvoorbeeld wel oké. Als je dan om de honderd microseconden een meting doet, heb je een informatief beeld.

Een andere beperking wordt veroorzaakt door het feit dat je fluoroforen uiteindelijk degraderen door de blootstelling aan licht, wat we *photobleaching* noemen. Ook dáár-mee moet je dus rekening houden. Wil je langer kijken, dan kies je best voor een fotostabiel fluorofoor. Mik je op een korter

proces, dan volstaat misschien een minder stabiel labelmolecuul dat daarentegen sneller fluoresceert en méér fotonen uitstuurt.’

Hoe belandt een spectroscopist eigenlijk in single molecule detection?

‘Je kunt niet zeggen dat single molecule detection rechtstreeks uit de spectroscopie voortvloeit, nee. Maar het is wel een logische volgende stap als je met fluorescentie-microscopie bezig bent. Het is immers een van de krachtigste methodes die je hebt, al dien je natuurlijk de juiste onderzoeksvragen te stellen. Naar homogene stalen, zoals grafreen, moet je bijvoorbeeld niet willen kijken, dat is puur tijdsverlies. Alleen heterogene stalen zijn interessant. Sterker, de

Johan Hofkens

- ▶ **2016**
gastprofessor, Hokkaido University, Japan
- ▶ **2012**
ERC Advanced Grant voor project Fluorocode
- ▶ **2011**
gastprofessor, CNRS/Université Lille
- ▶ **2010**
Zernike-leerstoel, Rijksuniversiteit Groningen
- ▶ **2008**
gewoon hoogleraar, KU Leuven
- ▶ **1993**
promotie over lichtgeïnduceerde ladingsoverdracht in de organische chemie, KU Leuven

boeiendste experimenten zijn diegene waarbij de heterogeniteit een cruciale rol speelt in de probleemstelling.’

Zitten we dan automatisch in de micro- en celbiologie?

‘Individuele cellen zijn inderdaad schoolvoorbeelden van heterogeniteit: ze zijn opgebouwd uit talloze verschillende organellen en ontelbaar veel verschillende moleculen. Sommige processen worden aangestuurd door moleculen waarvan binnen die cel maar een of twee kopieën bestaan. Andere moleculen zijn dan weer in honderd- of duizendvoud aanwezig. Die zeldzame, unieke moleculen, dat zijn de *targets* waar je automatisch naartoe gaat als je in single molecule detection zit.’

Geef eens een voorbeeld van een prikkelend vraagstuk.

‘Samen met onderzoekers van het Regainstituut (een Leuvense medische onderzoeksinstituting, red.) kijken we nu al geruime tijd naar hiv. Een vraag die nog openligt, is wat er precies gebeurt tussen de binnenkomst van een viruspartikel in een cel en het ogenblik waarop het genetisch materiaal de celkern binnendringt. Ergens tussen het cel- en het kernmembraan ontdekt het virus zich van zijn coating. Door de coatingmoleculen te labelen met fluorescentiemoleculen willen we filmen hoe ▶



WELCOME TO **WOTS**

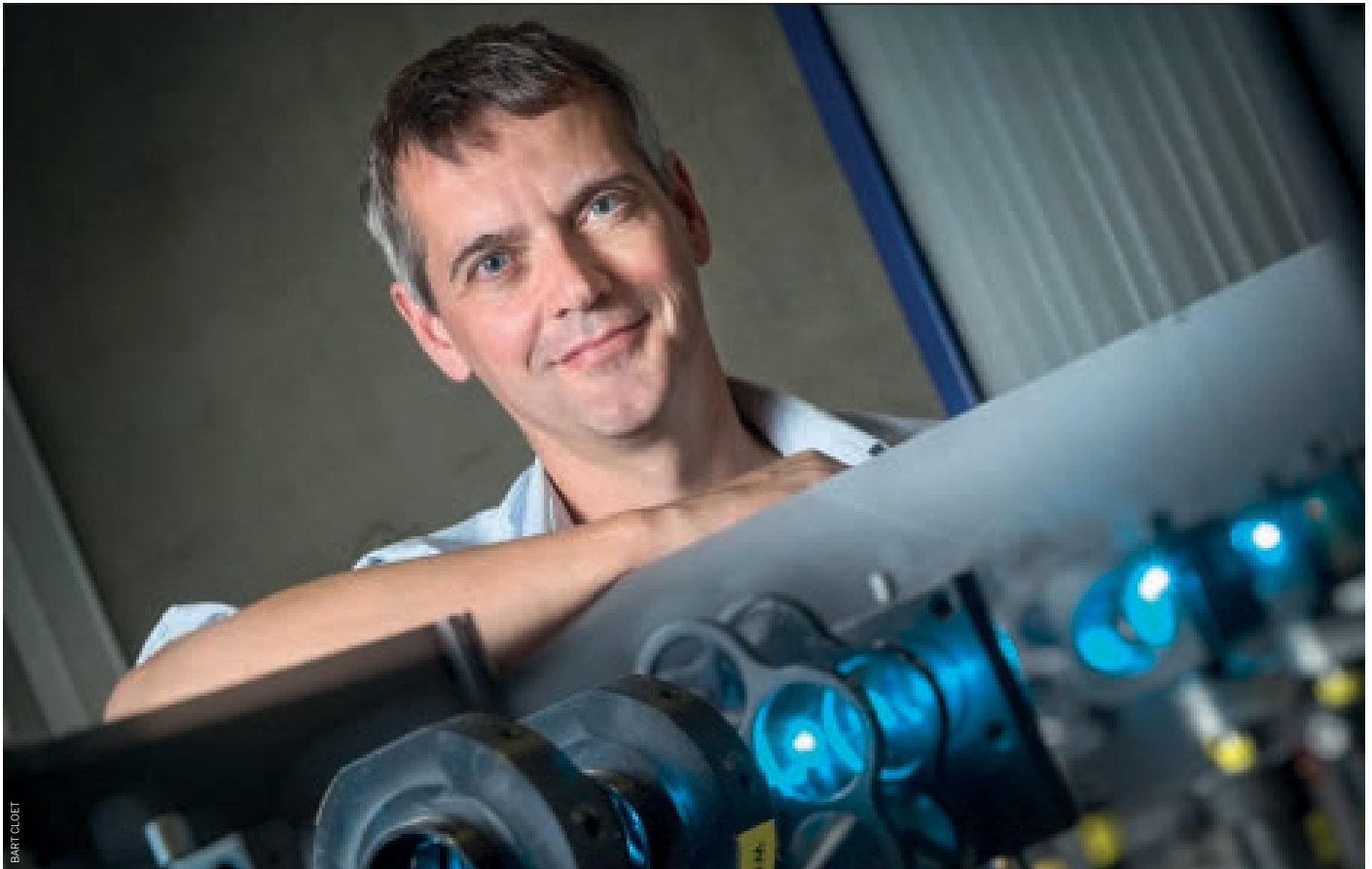
WORLD OF LABORATORY



STANDNUMMER 7E080

4-7 OKT JAARBEURS UTRECHT





► hiv als het ware zijn jas uittrekt. Om dat goed te visualiseren, zijn we al een hele tijd bezig om een driedimensionale versie van een superresolutiefluorescentiemicroscop te bouwen, want in twee dimensies krijg je een nietszeggend beeld. Dat is gemakkelijker gezegd dan gedaan, want 3D blijft moeilijk in superresolutie, zeker in een cellulaire en dynamische context. Je zou kunnen zeggen dat dit de heilige graal is in de superresolutiemicroscopie, iedereen probeert dat aan de praat te krijgen.’

Wat is het spectaculairste dat je met jouw eigen microscoop hebt gezien?

‘Vier jaar geleden hebben we beelden gemaakt van virusgeassocieerde proteïnen die bijeen clusteren op de virusmantel. Dat was daarvoor alleen met een elektronenmicroscop en in cryo aangetoond. Wij deden het met levende materie en een fluorescentiemicroscop.’

Maar met je eigen ogen de individuele deeltjes zien blinken, de basis van single molecule detection, blijft toch ook fascinerend. Het is de rechtstreekse manifestatie van kwantumprincipes.’

Je zit ook in een project waarin naar een link tussen onze darmflora en de ziekte van Alzheimer wordt gezocht. Wat heeft dat met spectroscopie te maken?

‘We willen een nieuw soort microscoop ontwikkelen waarmee we zeer snel en

goedkoop het DNA van darmbacteriën in kaart kunnen brengen en de micro-organismen aanwezig in een stoelgangsample dus kunnen herkennen. Sequencing is hiervoor veel te omslachtig. Wat wij precies doen, is het koppelen van fluorescente labels aan stukjes DNA met een welbepaalde opeenvolging van basen – bijvoorbeeld de combinatie AGCT. We hebben immers ontdekt dat ons DNA dermate specifiek is dat we door die koppeling als het ware unieke barcodes creëren. Die barcodes kunnen vervolgens worden gematcht aan de genomen van de bekende bacteriën in de literatuur. Momenteel zijn er vijf kandidaat-darmbacteriën die het risico op Alzheimer zouden kunnen verhogen – althans dit is aangetoond bij muizen. Om die claim verder te onderzoeken is nog onnóemelijk veel uitleeswerk van DNA nodig.’

Tussendoor vond je ook nog de tijd om de tl-lamp opnieuw uit te vinden...

(lacht) ‘Nou ja, we hebben de basis gelegd. Vijftien jaar geleden al las ik in een paper in *Science* dat zilverpasta, dat je gebruikt bij solderen, soms fluorescentie vertoont. Blijkbaar gebeurt dat bijvoorbeeld wanneer de zilveratomen met vier tegelijk in piramidevormige clusters zijn gestapeld. Helaas vallen die clusters zeer snel uit elkaar, zodat de fluorescentie meteen stopt. Bio-ingenieurs van onze universiteit leerden ons dat we die clusters kunnen onder-

‘Een 3D-versie is toch wel de heilige graal’

brengen in zeolieten, een materiaal met kleine holtes, zonder dat ze uiteenvallen. De voorbije jaren hebben we vooral geïnteresseerd aan de efficiëntie van de lichtproductie. Met succes, want we hebben ze inmiddels opgedreven van 3 % in het begin tot de volle 100 %. Dat was ook de reden waarom *Nature Materials* er eerder dit jaar over berichtte.’

Waar komen zulke uiteenlopende interesses toch vandaan?

‘Van nature heb ik een zeer brede interesse. Als ik het gevoel heb dat we met onze apparatuur een verschil kunnen maken, dan beginnen we eraan. En ja, dat heeft zijn voor- en nadelen. Je kunt met vele dingen bezig zijn en de technologie van de microscopie leent zich daar ook uitstekend voor. Sommigen verdiepen zich helemaal in één domein, waardoor ze kans maken om dé wereldexpert in één topic te worden. Ik maak daarin een andere keuze en blijf heel breed werken. Daarmee volg ik mijn gevoel, maar tegelijkertijd is het een heel rationele, bewuste keuze.’ ●