

## SEMBLANZAS DE LOS PREMIOS NOBEL 2014

### EN QUÍMICA

El Premio Nobel en Química 2014 fue concedido conjuntamente a Eric Betzig (Howard Hughes Medical Institute, EE.UU.), Stefan W. Hell (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Alemania) y William E. Moerner (Universidad de Stanford, EE.UU.) *“por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia con super-resolución”*.

El auge que han tenido las técnicas de microscopía óptica de super-resolución durante los últimos años y los descubrimientos que han permitido en grandes campos de la Biología como, por ejemplo, la biología celular, la microbiología y la neurobiología, hacían previsible una concesión cercana de un premio en este campo. Quizá la declaración de 2015 como Año internacional de la Luz haya contribuido al pronto reconocimiento (la

primera contribución significativa de los trabajos premiados data de 1996) de la labor de estos investigadores.

Puede resultar algo sorprendente que el premio haya sido en Química, cuando se trata de técnicas ópticas y los últimos avances en microscopía fueron premiados en el área de Física (G. Binnig y H. Rohrer, Premio Nobel de Física 1986 por el microscopio de efecto túnel). Sin embargo, como veremos, las técnicas premiadas en 2014 necesitan de unos cruciales ingredientes químicos sin los cuales no habrían podido desarrollarse.

Desde los primeros estudios con lentes y espejos en la antigua Grecia, la búsqueda de nuevos métodos que permitan *ver* objetos más lejanos y más pequeños ha sido una constante en la evolución de la Óptica. Los primeros telescopios y microscopios datan de la primera mitad del siglo XVII y ya desde finales del siglo XIX se conoce la existencia de un límite fundamental en microscopía que es el denominado “límite de difracción”.

Desde los trabajos de Abbe (1873) y Lord Rayleigh (1896) se sabe que es imposible “resolver” (distinguir) ópticamente dos puntos de un objeto situados en un



Eric Betzig (Michigan, EE.UU., 1960), doctor por la Universidad Cornell, Ithaca (Nueva York, EE.UU.) trabaja en el Instituto Médico Howard Hughes, Ashburn (EE.UU.).



Stefan W. Hell (Arad, Rumanía, 1962), doctor por la Universidad de Heidelberg, dirige el Instituto Max Planck de Química Biofísica, en Gotinga (Alemania) y el Centro Alemán de Investigación contra el Cáncer de Heidelberg.



William E. Moerner (California, EE.UU., 1953), doctor por la Universidad Cornell, trabaja en la Universidad de Stanford (California, EE.UU.).

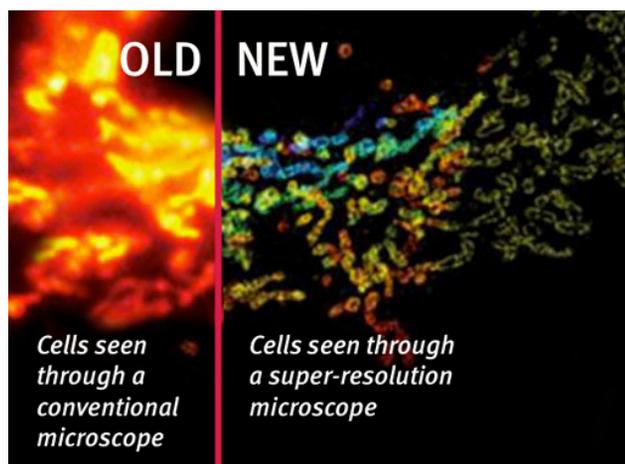


Figura 1. Comparación de las imágenes obtenidas de un mismo objeto con un microscopio convencional y con uno de super-resolución (Fuente: [http://www.burnet.edu.au/system/asset/file/834/Appeal\\_-\\_old\\_and\\_new\\_for\\_web.jpg](http://www.burnet.edu.au/system/asset/file/834/Appeal_-_old_and_new_for_web.jpg)).

plano perpendicular al eje de observación que estén separados en dicho plano por una distancia inferior a una semilongitud de onda de la radiación incidente. Es decir, si denominamos  $\Delta x_{\min}$  y  $\Delta y_{\min}$  a las distancias mínimas que pueden ser resueltas en las dos direcciones del plano, se cumple:

$$\Delta x_{\min} \approx \Delta y_{\min} \approx \lambda / 2$$

Por lo tanto, en microscopía óptica la distancia menor que puede ser resuelta es, de acuerdo con el límite de difracción, de aproximadamente 200 nm (para una iluminación con luz azul de unos 400 nm de longitud de onda). Es decir, con microscopía óptica no se pueden distinguir estructuras de tamaño menor que unos 200 nm. Esto hace que se pueden distinguir, por ejemplo, elementos intracelulares como el núcleo o las mitocondrias, pero no la estructura interna de las mitocondrias o de células pequeñas como pueden ser las bacterias y mucho menos estructuras como virus, proteínas, etc.

La expresión anterior se puede escribir de manera más cuantitativa para el caso de la microscopía de fluorescencia. En efecto, en esta técnica se incrustan en las moléculas de la estructura que se quiere estudiar pequeños componentes (denominados fluoróforos o fluorocromos) que tienen la propiedad de emitir radiación visible por fluorescencia, es decir, absorben radiación visible y reemiten parte de dicha radiación en una longitud de onda diferente (típicamente mayor que la de bombeo).

De esta forma, si una estructura con fluoróforos se observa por medio de un objetivo de microscopio, la dimensión espacial del fluoróforo (típicamente de 1 nm)

corresponde a una fuente emisora puntual y la teoría de Abbe para una fuente puntual observada a través de un objetivo de microscopio arroja la expresión:

$$\Delta x_{\min} = \Delta y_{\min} = \lambda / 2 NA$$

donde  $NA$  es la apertura numérica del objetivo que resulta ser  $NA = n \sin \theta$ , siendo  $n$  el índice de refracción del medio entre la muestra y el objetivo y  $\theta$  el semiángulo correspondiente al cono de luz subtendido por la fuente puntual y el diafragma de apertura del objetivo, que tiene como radio de la base el radio del diafragma de apertura del objetivo y como altura la distancia focal de trabajo del objetivo. De esta forma se puede conseguir mejorar la resolución en un factor 1,5 (ligeramente por debajo de 150 nm).

Las técnicas de fluorescencia de super-resolución que han sido premiadas se basan en dos aproximaciones distintas: i) excitar conjuntos de fluoróforos situados en regiones mucho más pequeñas que el límite de difracción y desplazar el punto de medida realizando barridos en el plano perpendicular al eje de observación, y ii) excitar simultáneamente varios fluoróforos de forma individual que estén separados una distancia mayor que el límite de difracción, capturar las imágenes de microscopía, obtener las posiciones de los fluoróforos con super-resolución, mediante un análisis estadístico de las imágenes de cada fluoróforo y repetir el proceso excitando fluoróforos distintos hasta obtener, por superposición, una representación de super-resolución de la estructura completa.

Las contribuciones de S.W. Hell corresponden al primero de los dos enfoques y dieron lugar a la técnica denominada "agotamiento por emisión estimulada" (*Stimulated Emission Depletion* – STED). En este enfoque se dispone de dos láseres; el primero de ellos, típicamente en el verde, excita los fluoróforos y el segundo, se sintoniza de manera que su longitud de onda corresponda con alguna transición de relajación del estado excitado de los fluoróforos que no coincida con la transición que corresponde con la emisión de la fluorescencia; de esta manera este segundo láser elimina (blanquea), por emisión estimulada, la emisión de luz de fluorescencia. Además, los dos láseres se enfocan sobre el mismo punto pero de forma que el láser que bombea la emisión estimulada presenta un mínimo de intensidad en el centro de su figura de difracción. Por lo tanto, con una adecuada sincronización de pulsos de los dos láseres se consigue tener emisión de los fluoróforos que proviene

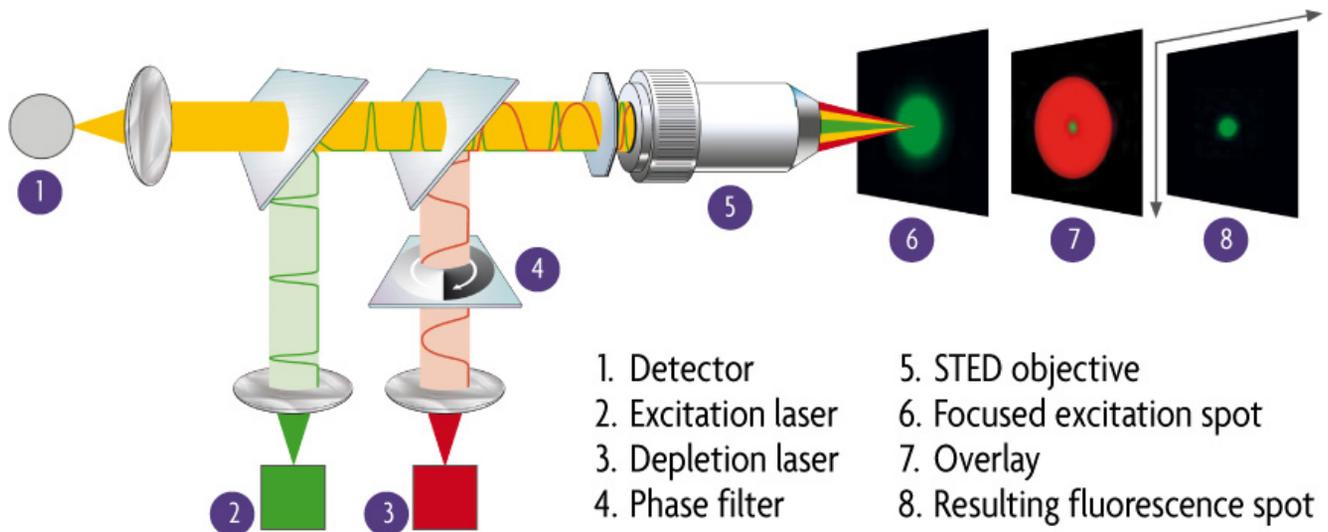


Figura 2. Esquema de funcionamiento de la técnica STED (Fuente: <http://www.activemotif.com/catalog/627/sted-microscopy-products>).

solamente de la zona central del foco del láser verde en la que la intensidad del láser de “blanqueo” es mínima. En estas condiciones se puede demostrar que la anchura de la zona de la muestra que efectivamente emite fluorescencia es:

$$\Delta_{min} = \frac{\lambda}{2n \operatorname{sen} \alpha \left( \sqrt{1 + I_0/I_{sat}} \right)}$$

donde  $I_0$  es la intensidad del láser de blanqueo e  $I_{sat}$  es la intensidad necesaria para eliminar la emisión de fluorescencia. De esta forma, la anchura de la zona de emisión se puede disminuir teóricamente de forma ilimitada aumentando la intensidad del láser de blanqueo. Obviamente, existen límites para el blanqueo como pueden ser el daño de las muestras o la necesidad de altas intensidades en el láser de blanqueo.

Este tipo de técnicas también se denominan de ingeniería de la función imagen de un punto (*point spread function engineering*) puesto que implican la construcción de una geometría especial del haz de blanqueo focalizado y han permitido obtener resoluciones un poco superior a la decena de nanómetros.

Las contribuciones de Betzig y Moerner se centran en las técnicas que utilizan la excitación y localización de fluoróforos individualmente. Todas estas técnicas se basan en que los fotones emitidos por un único fluoróforo alcanzan el plano del detector de un microscopio (tipo cámara CCD o similar) formando una distribución de intensidad típicamente gaussiana, con una anchura

igual al límite de difracción, que se puede describir por una densidad de probabilidad:

$$p(x, y) \approx K \exp \left[ -\frac{(x-x_0)^2}{2\Delta^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2\Delta^2} \right]$$

donde  $K$  es una constante de normalización,  $\Delta$  es el límite de difracción de Abbe y  $x_0$  e  $y_0$  son las coordenadas del centro de la distribución. Si se puede asegurar que la distribución de fotones proviene de una única fuente puntual, las coordenadas  $x$  e  $y$  del punto de emisión pueden ser estimadas con un error estándar que se puede estimar aproximadamente como:

$$\Delta_{min} = \frac{\Delta}{\sqrt{N}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \frac{\lambda}{2n \operatorname{sen} \alpha}$$

donde  $N$  es el número total de fotones registrados en el detector. Es decir, la resolución del detector mejora en un factor  $1/N^{1/2}$  el límite de difracción de Abbe, por lo tanto, si se detectan 100 fotones provenientes de la misma fuente puntual, se obtiene una resolución 10 veces mejor que el límite de difracción.

Sin embargo, para reconstruir una estructura a base de registrar los fotones provenientes de fluoróforos individuales se tienen que dar dos condiciones: i) que los fluoróforos estén suficientemente separados entre sí (separados una distancia superior al límite de difracción) para que se pueda estar seguro de que los fotones registrados en cada zona del detector provienen de un único fluoróforo y ii) que los fluoróforos cuyos centros se localicen estén suficientemente juntos, en su distribución

sobre la estructura, como para poder reconstruir su imagen por entero.

Estos dos requisitos parecen ser contradictorios y es aquí donde se da la contribución de Betzig. En 1995 propone una solución teórica al problema basada en la utilización de múltiples clases de fluoróforos con propiedades espectrales distintas. De esta forma se podría excitar separadamente cada clase de manera que para cada clase los fluoróforos estuvieran suficientemente lejanos entre sí. Una vez obtenidas las coordenadas de los centros de cada fluoróforo para todas las clases, éstas se podrían superponer en una sola imagen con super-resolución. Se realizó alguna implementación experimental de este método pero resultaba complicado y poco eficiente.

El ingrediente que faltaba para la solución conveniente del problema se consigue en 1997. Moerner, experimentando con algunas variantes de la proteína verde fluorescente (GFP) observa, sorprendentemente, que excitada con luz de 488 nm se producía una emisión de fluorescencia intermitente (*blinking*) que desaparecía después de varios ciclos de intermitencia. Más sorpren-

dentemente aún, la fluorescencia podía ser reactivada por excitación a 405 nm. Estos estudios supusieron el inicio de investigaciones sobre la activación y desactivación de las propiedades de fluorescencia de proteínas.

Aprovechando dichos estudios, Betzig consigue una solución elegante al problema utilizando una variante de la proteína verde fluorescente que se activa irradiada a 413 nm, emite fluorescencia si se excita con luz de 488 nm y se desactiva irreversiblemente por iluminación intensa a 488 nm. En su realización experimental, publicada en 2006, se ilumina la muestra en puntos separados con 413 nm, activando un subconjunto de unos pocos fluoróforos en la muestra de manera que estén suficientemente separados unos de otros, se excita la fluorescencia de dichos fluoróforos con luz de 488 nm, se registra la imagen, se obtienen las coordenadas de los fluoróforos con super-resolución y se desactiva este subconjunto de fluoróforos por iluminación intensa a 488 nm. Seguidamente, se activa un nuevo subconjunto de fluoróforos separados con la luz de 413 nm y se repite el esquema hasta conseguir, por superposición, un muestreo denso de la estructura de la muestra con

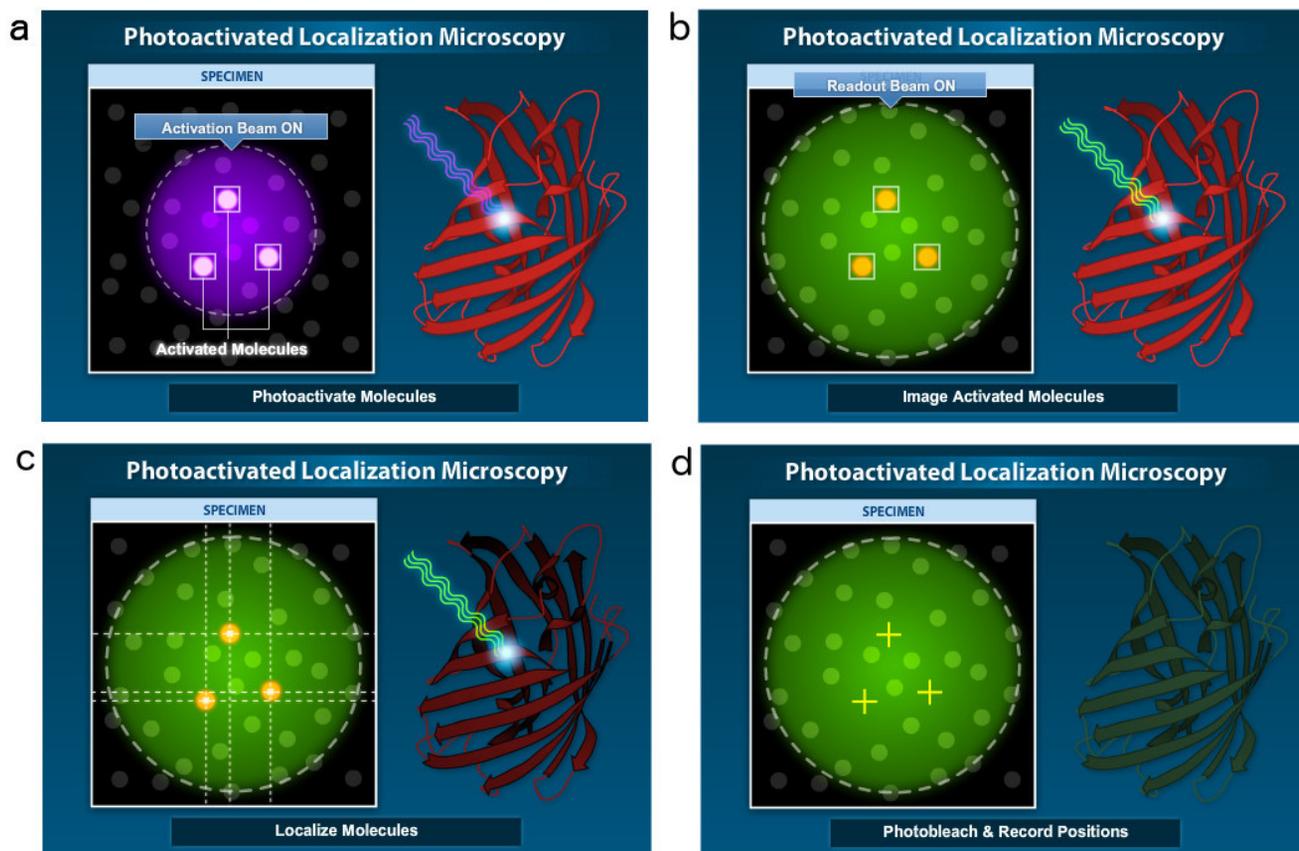


Figura 3. Imágenes obtenidas por microscopía por localización fotoactivada (PALM). (Fuente: <http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2015/01/TutorialStills-PALM.jpg>).

super-resolución. Los autores denominaron la técnica como “microscopía por localización fotoactivada” (*Photoactivated Localization Microscopy* – PALM). Con este tipo de técnicas se pueden conseguir resoluciones inferiores a 10 nm.

En el poco tiempo transcurrido desde esta primera demostración de las técnicas de microscopía de fluoróforos excitados de forma individual se han propuesto ya numerosas variantes de la técnica (STORM, PALMIRA, etc.) y la investigación en fluoróforos ha proporcionado ya decenas de moléculas útiles (proteínas,

inmunoglobulinas, etc.) y nuevos esquemas de activación-excitación-desactivación. Además, casi todas las grandes firmas de microscopía tienen ya en producción equipos comerciales basados en estas técnicas. Finalmente, la utilización de este tipo de técnicas ha permitido la visualización de complejas estructuras biológicas que sin ellas seguirían siendo desconocidas.

Miguel Ángel Rubio Álvarez  
*Dpto. de Física Fundamental*