

# Premio Nobel de Química 2014

## Microscopía de fluorescencia con super-resolución

Andrés Arroyo-Pieck y Jorge Peón\*

### ABSTRACT (Super-resolved fluorescence microscopy)

The Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded to the developers of modern optical fluorescence microscopy techniques that allow imaging of living systems with nanometer resolution. These methodologies also allow for the time-resolved tracking of chemical and biochemical processes at the single molecule level. The works of Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner have given us extraordinary tools to study biological systems at unprecedented levels of spatial resolution.

**KEYWORDS:** Nobel Prize 2014, chemistry, super-resolved microscopy

### Resumen

El Premio Nobel de Química del 2014 se otorgó a los desarrolladores de las técnicas más modernas de microscopía óptica de fluorescencia. Estas metodologías permiten obtener imágenes de sistemas vivos con una resolución espacial de nanómetros. Además, gracias a estos desarrollos hoy en día es posible dar seguimiento temporal a procesos químicos y bioquímicos al nivel de una molécula individual. Los trabajos de Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner nos han dado herramientas extraordinarias para estudiar los sistemas biológicos a los niveles más fundamentales.

**Palabras clave:** Premio Nobel 2014, química, microscopía de super-resolución

La microscopía óptica es una de las herramientas más importantes de las ciencias biológicas, empezando con el descubrimiento de las células en 1665 por Robert Hooke. A través de los años se han desarrollado numerosas técnicas para mejorar el contraste y la calidad de las imágenes obtenidas, ayudando inmensamente a la investigación científica. Sin embargo, estas técnicas se encontraban limitadas por la resolución con la que se podían observar los sistemas vivos.

Cuando la luz entra en un microscopio es refractada por los lentes utilizados para iluminar y formar la imagen; sin embargo, efectos de difracción imponen un límite al área de la muestra que es irradiada, como sucede en microscopía confocal. En el caso de la microscopía de fluorescencia en general esto sucede en dos instancias: para la luz de excitación y para la emisión de las moléculas. Lo anterior produce que las moléculas fluorescentes no se vean como puntos de luz en el plano focal, sino como pequeñas manchas de luz conocidas como "discos de Airy", que son cientos de veces mayores al tamaño del emisor, es decir, de una molécula individual. Cuando dos o más moléculas se encuentran juntas, estos discos de luz se superponen, dando una imagen cuya resolución es del orden de la longitud de onda de la luz utilizada (Novotny & Hecht, 2006).

\*Instituto de Química de la UNAM, México.

Correo electrónico: jpeon@unam.mx



En el orden acostumbrado: Eric Betzig, William E. Moerner y Stefan W. Hell. (Los créditos de las fotos son, respectivamente: Matt Staley/HHMI; ©Bernard Schuller, Max-Planck Institute; K. Lowder vía Wikimedia Commons, CC-BY-SA-3.0).

La distancia mínima para que dos componentes de un sistema puedan diferenciarse con un microscopio se aproxima con el límite de difracción de Abbe, quien encontró que la resolución mínima que se podría alcanzar con luz visible es de aproximadamente 200 nm (Abbe, 1873).

El uso de longitudes de onda de luz más pequeñas, en la región del ultravioleta y los rayos X, permite una mayor resolución en las imágenes, pero la preparación de las muestras y la irradiación con luz de alta energía no son compatibles con el uso de células vivas, por lo que durante muchos años no se pudo observar la estructura fina y los procesos a nanoescala en muestras biológicas vivas (Koster & Klumperman, 2003).

El límite de Abbe no pudo ser superado sino hasta más de 100 años después del desarrollo del microscopio óptico, con la invención de la microscopía de campo cercano (Near-field Scanning Optical Microscopy, o NSOM), en la cual el detector debe encontrarse a unos pocos nanómetros del objeto estudiado (Ash & Nichols, 1972). Esta técnica permite obtener imágenes con alta resolución y ha seguido evolucionando desde su inicio, por ejemplo con el uso de fibras ópticas. Sin embargo, este método permite estudiar solo una delgada capa en la superficie de las muestras, lo que limita su uso.

Es gracias a la invención de las técnicas de super-resolución por los ganadores del premio Nobel 2014, que se han obtenido por primera ocasión imágenes con resolución de cerca de 10 nm de sistemas biológicos vivos, y que incluso sea posible reconstruir las estructuras finas de las células en tres dimensiones.

Aunque recibieron el premio en conjunto, los tres investigadores, Eric Betzig, Stefan Hell y William Moerner, desarrollaron diferentes métodos para lograr resolver las imágenes por debajo del límite de difracción impuesto por la naturaleza de la luz. En 1994, Stefan Hell (Hell, 1994) desarrolló la técnica de agotamiento de emisión estimulada (STED por sus siglas en inglés: Stimulated Emission Depletion Microscopy), la cual disminuye el tamaño del área iluminada por un láser por debajo del límite de difracción. Esto se logra utilizando dos rayos láser para iluminar la muestra: uno en configuración confocal que ilumina una región limitada por difracción, y otro que desactiva las moléculas en la orilla de esta zona por emisión estimulada. El segundo láser logra lo anterior gracias a que tiene un modo transversal en forma de “dona”, el cual rodea la iluminación lograda con el primer láser. Con esto se logra que el área que produce la fluorescencia realmente sea de solo unos cuantos nanómetros. Midiendo la intensidad de la fluorescencia emitida por las moléculas que se encuentran solo en la región central del primer haz, se forma una imagen con una resolución hasta diez veces mayor a la obtenida con un microscopio confocal convencional.

Las investigaciones de William Moerner y Eric Betzig *et al.* (2006) se basan en la localización de moléculas individuales. Cuando la distancia entre moléculas fluorescentes es mayor al límite de difracción, es posible obtener un perfil de intensidad del patrón de Airy formado en el microscopio, cuyo análisis permite encontrar el centro del disco (esto es, la posición real de la molécula), con una exactitud que depende sobre todo del número de fotones que se detectan. En una muestra real, la densidad de las moléculas fluorescentes debe ser alta para poder observar las estructuras, y la distancia promedio entre emisores es mucho menor al límite de difracción. Para poder observar a los emisores individualmente, es necesario que solo una molécula por cada región espacial del orden de un disco de Airy este emitiendo luz, lo

que se logra utilizando moléculas que pueden ser activadas con pulsos de luz de manera selectiva y estudiadas transitoriamente hasta que son destruidas por el haz de excitación. Esta activación se lleva a cabo mediante transformaciones foto-inducidas que llevan a los marcadores moleculares de una forma no-fluorescente a una forma fluorescente cuya emisión es detectada. Una vez marcada la posición de cada emisor, se reconstruye una imagen en forma de un mapa de localización que tiene una resolución diez veces mejor a la obtenida por técnicas convencionales. Este principio fue demostrado en 2006.

A partir de sus respectivas publicaciones, estas metodologías se han seguido desarrollando y han dado lugar a la invención de una gran familia de técnicas que siguen los mismos principios, y son denominadas colectivamente como microscopía de super-resolución (Allen *et al.*, 2013). El rápido avance que se ha dado en esta área ha ido a la par de una gran cantidad de estudios que han arrojado información sin precedentes sobre las estructuras de las células y su conformación, así como las propiedades, funciones e interacciones de proteínas *in vivo*.

Esta línea de investigación es altamente multidisciplinaria, donde grupos de investigación incluyen tanto a físicos como químicos y biólogos, cada uno con diferente formación y conocimiento y es una muestra de la importancia de la comunicación entre diferentes áreas de la ciencia.

## Referencias

- Abbe, E., Beitrage zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung, *Arch Mikroskop Anat*, **9**, 413-420, 1873.
- Allen, J. R., Ross, S. T. y Davidson, M. W., Sample preparation for single molecule localization microscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **15**, 18771-18783, 2013.
- Ash, E. A. y Nicholls, G., Super-resolution Aperture Scanning Microscope, *Nature* **237**(5357), 510-512, 1972.
- Betzig, E., George H. Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S.; Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J. y Hess, H. F., Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution, *Science*, **313**(5793), 1642-1645, 2006.
- Hell, S. W. and Wichmann, J., Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy, *Optics Letters*, **19**(11), 780-782, 1994.
- Koster A. J. y Klumperman J., Electron microscopy in cell biology: Integrating structure and function, *Reviews Molecular Cell Biology*, **4**(Suppl), S6-S10, 2003.
- Nobel Prize in Chemistry. Laureates. Consultada en octubre 13, 2014, en la URL <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/index.html>
- Novotny, L. and Hecht, B., *Principles of Nano-Optics*. Nueva York, EUA: Cambridge University Press, 2006.