

CÓMO EL MICROSCOPIO ÓPTICO SE TRANSFORMÓ EN UN NANOSCOPIO

Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner han obtenido el Premio Nobel de Química 2014 por haber superado la limitación que establecía que un microscopio óptico nunca puede tener una resolución mayor de 0,2 micras. Utilizando la fluorescencia de las moléculas los científicos pueden ahora controlar la interacción entre moléculas individuales en el interior de las células, observar las proteínas relacionadas con determinadas enfermedades o rastrear la división celular a una escala de nanómetros.

Glóbulos rojos, bacterias, células de levadura y espermatozoides...cuando los científicos en el siglo XVII estudiaron por primera vez los organismos vivos con un microscopio óptico, un nuevo mundo se abrió ante sus ojos. La microbiología había nacido y, desde entonces, el microscopio óptico ha sido una de las herramientas más importantes en el estudio de los organismos vivos. Otros métodos, como la microscopía electrónica, requieren procesos de preparación de las muestras que pueden matar las células.

Moléculas brillantes para superar una limitación física

Durante mucho tiempo la microscopía óptica estuvo limitada por una limitación física en cuanto al tamaño de las estructuras que era posible observar. En 1873 el microscopista Ernst Abbe demostró que la resolución de un microscopio está limitada por, entre otras cosas, la longitud de onda de la luz empleada. Durante la mayor parte del siglo XX esto llevó a creer que los microscopios ópticos nunca serían capaces de observar cosas más pequeñas que, aproximadamente, la mitad de la longitud de onda de la luz, es decir, 0,2 micrómetros (Figura 1). Podríamos observar los contornos de algunos orgánulos de las células, como las mitocondrias, pero sería imposible distinguir objetos más pequeños o, por ejemplo, seguir la interacción entre moléculas de proteínas en la célula. Es algo parecido a ser capaz de ver los edificios de una ciudad sin ser capaz de observar a sus ciudadanos ni saber cómo viven. Para entender cómo funciona una célula hemos de ser capaces de observar el comportamiento de moléculas individuales.

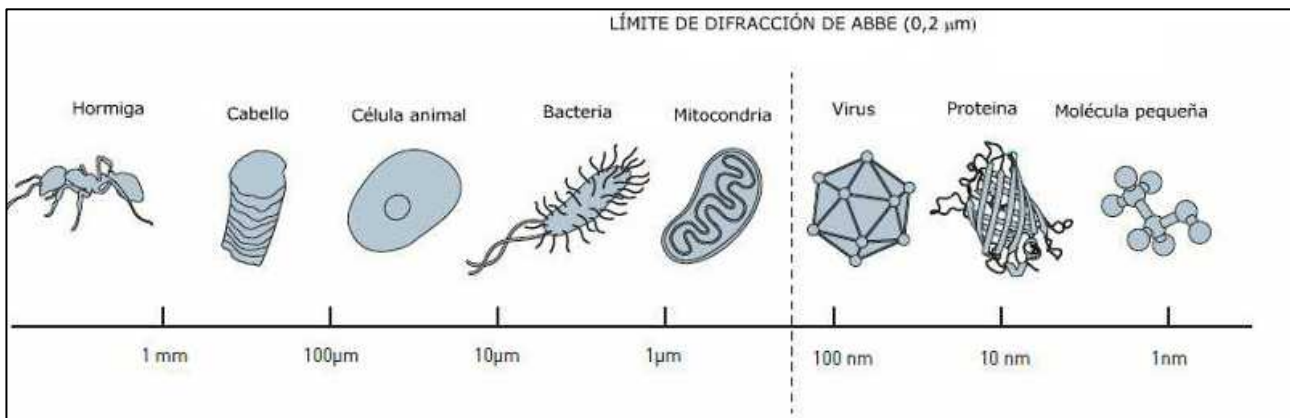


Figura 1. A finales del siglo XIX, Ernst Abbe limitó el poder de resolución del microscopio óptico a aproximadamente la mitad la longitud de onda de la luz (0,2 micrómetros), lo que significaba que se podían ver células y algunas de sus partes (orgánulos). Sin embargo, nunca seríamos capaces de visualizar algo tan pequeño como un virus de tamaño medio o proteínas individuales.

La ecuación de Abbe sigue vigente, pero el límite que fijaba ha sido superado. **Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner** han obtenido el Premio Nobel de Química 2014 por llevar a la microscopía óptica a una nueva dimensión, gracias al empleo de moléculas fluorescentes. Teóricamente ya no hay ninguna estructura demasiado pequeña para ser estudiada. El resultado ha sido que la microscopía se ha convertido en nanoscopía

La historia de cómo fue burlado el límite de difracción de Abbe ha seguido dos caminos paralelos; han sido premiados dos principios diferentes, desarrollados independientemente uno del otro. Comenzamos en 1993, en un piso de estudiantes en el sudoeste de Finlandia, donde Stefan Hell tuvo una idea genial cuando ojeaba un texto de óptica cuántica.

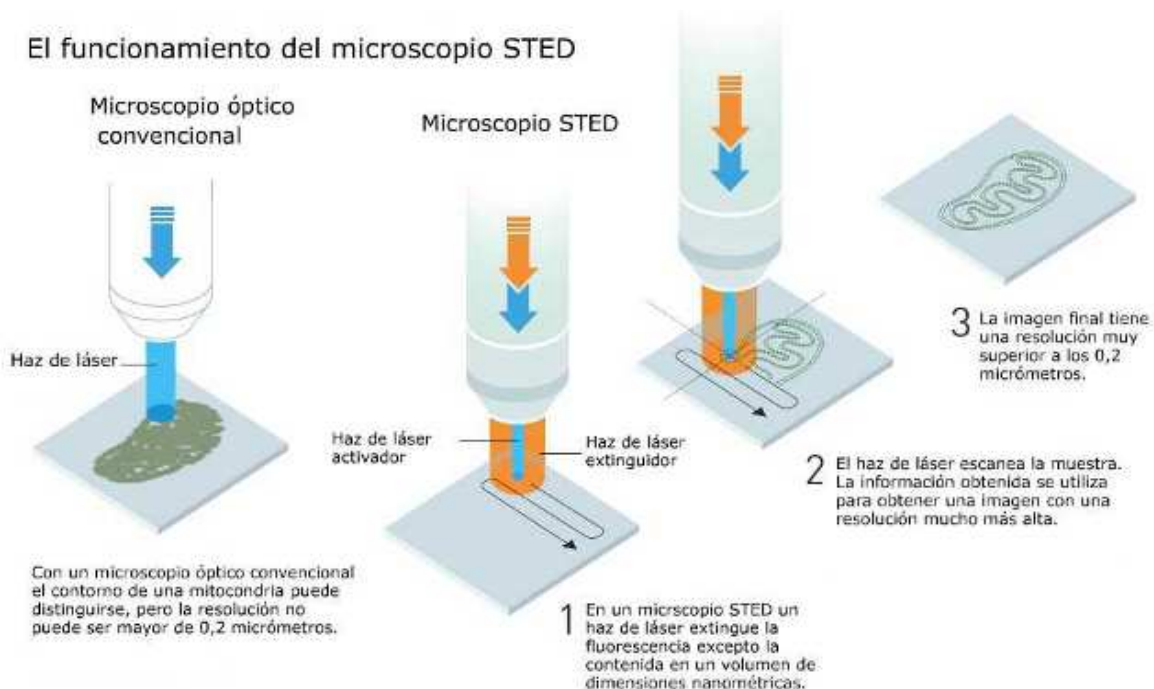
La rebelión juvenil contra el límite de difracción de Abbe recibida con escepticismo

Desde la obtención de su doctorado (en 1990), por la Universidad de Heidelberg, Stefan Hell había estado buscando una forma de burlar la limitación que Ernst Abbe había definido más de un siglo antes. La idea de desafiar a un principio tan establecido era tentadora, pero sus superiores en Alemania habían recibido su idea con escepticismo. Por lo tanto, Stefan Hell, buscó refugio en el frío norte. Un profesor de la Universidad de Turku que trabajaba en microscopía de fluorescencia le había ofrecido un puesto en su equipo de investigación. Hell estaba convencido de que tenía que haber una manera de eludir el límite de difracción de Abbe, y cuando se encontró con el concepto de *emisión estimulada* en un libro de óptica cuántica se le ocurrió una nueva idea: "En ese momento, me di cuenta. Finalmente había encontrado un concepto concreto para perseguir una pista real." Este fue su comentario en 2009, profundicemos en su idea.

La solución: una luz de tamaño nanométrico para escanear la muestra

En Turku, Stefan Hell trabajó en la llamada microscopía de fluorescencia, una técnica en la que se usan moléculas fluorescentes para obtener imágenes del interior de la célula. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos fluorescentes que se acoplan específicamente al ADN celular y que después se excitan mediante un breve pulso de luz, haciéndolos brillar durante unos instantes. Si los anticuerpos se acoplan al ADN emitirán luz desde el interior de la célula, ya que el ADN se localiza en su núcleo. De esta manera los científicos pueden ver donde se localizan ciertas moléculas. Pero sólo fueron capaces de localizar grupos de moléculas enredadas en los filamentos del ADN. La resolución es demasiado baja para discernir las cadenas de ADN individuales. Era como ver un rollo de hilo, pero no el hilo.

Cuando Stefan Hell descubrió el fenómeno de la emisión estimulada, se dio cuenta de que podía ser posible idear una especie de nanolinterna capaz de barrer la muestra, nanómetro a nanómetro, y usando la emisión estimulada apagar las moléculas fluorescentes. Al incidir el láser en las moléculas perderían su energía oscureciéndose. En 1994, Stefan Hell publicó un artículo exponiendo sus ideas. En el método propuesto, denominado *disminución de la emisión estimulada* (STED), un pulso de luz excita las moléculas fluorescentes, mientras que otro pulso de luz la anula, excepto en un volumen de tamaño nanométrico, en el centro del haz (Figura 2). Sólo este volumen es visible. Barriando la muestra y midiendo continuamente los niveles de luz, es posible obtener una imagen completa. Cuanto menor sea el volumen que emite fluorescencia en determinado momento, tanto mayor será la resolución de la imagen final. Por lo tanto, en principio, no existe límite a la resolución de los microscopios ópticos.



Desarrollando la primera luz nanométrica en Alemania

El artículo teórico de Stefan Hell no provocó conmoción alguna, pero fue suficiente para que a Stefan Hell le ofrecieran un puesto en el Instituto Max Planck de Química y Biofísica de Göttingen. En los años siguientes Hell desarrolló sus ideas construyendo un microscopio STED. En el año 2000 fue capaz de demostrar que sus ideas funcionaban realmente en la práctica logrando, entre otras cosas, la imagen de la bacteria *E. coli* con una resolución nunca antes alcanzada con un microscopio óptico (Figura 3).

El microscopio STED recoge la luz de una multitud de pequeños volúmenes para crear un conjunto. En contraste, el segundo principio premiado, la microscopía de un sola molécula, implica la superposición de varias imágenes. Eric Betzig y W. E. Moerner (que siempre ha sido llamado por sus iniciales, W. E.), independientemente, contribuyeron a su desarrollo con ideas fundamentales. Los fundamentos de la técnica fueron presentados cuando W. E. Moerner logró detectar una única molécula fluorescente.

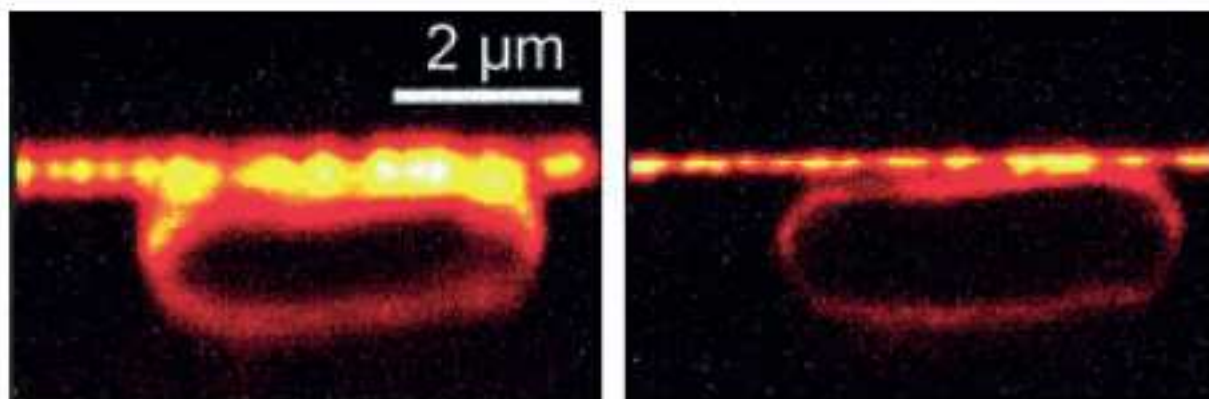


Figura 3. Una de las primeras imágenes tomadas por Stefan Hell utilizando un microscopio STED. A la izquierda, imagen de una bacteria *E. coli* obtenida mediante microscopía convencional; a la derecha, imagen de la misma bacteria usando STED. La resolución de la imagen STED es tres veces mejor.

W.E. Moerner, el primero en detectar una molécula fluorescente.

Con métodos como la medida de la absorción y la fluorescencia, los científicos pueden estudiar millones de moléculas simultáneamente. Los resultados de tales experimentos representan una especie de molécula típica, promedio. Los científicos han tenido que aceptar esto ya que otra cosa no era posible, pero durante mucho tiempo su sueño era poder observar moléculas individuales, pues si se tiene un conocimiento más exacto y detallado, mayor será la posibilidad de entender, por ejemplo, cómo se desarrollan las enfermedades.

En 1989, W. E. Moerner consiguió un logro fundamental al medir la absorción de la luz por una sola molécula por primera vez. Entonces trabajaba en el centro de investigación de IBM en San José, California. El experimento abrió la puerta a un futuro nuevo e inspiró a muchos químicos a dirigir su atención hacia las moléculas individuales. Uno de ellos fue Eric Betzig, cuyos logros se comentan más abajo.

Ocho años más tarde Moerner dio el siguiente paso hacia la microscopía unimolecular, apoyándose en el descubrimiento de la proteína fluorescente GFP, también galardonado con el Premio Nobel.

Moléculas que se encienden y se apagan

En 1997 W. E. Moerner había llegado a la Universidad de California en San Diego, donde Roger Tsien, laureado con el premio Nóbel, estaba tratando que la proteína GFP emitiera fluorescencia en todos los colores del espectro. La proteína fue obtenida a partir de una medusa fluorescente y su importancia reside en su capacidad para hacer visibles otras proteínas dentro de células vivas ya que existe tecnología para unir la proteína verde fluorescente a otras proteínas. La luz verde revela posteriormente en que lugar exacto de la proteína se ha situado.

W. E. Moerner descubrió que la fluorescencia de una variante de la GFP podía encenderse y apagarse a voluntad. Cuando excitó la proteína con luz de longitud de onda de 488 nm la proteína comenzó a emitir

fluorescencia, pero después de un rato se apagó. Luego, con independencia de la cantidad de luz que incidiera sobre la proteína, la fluorescencia no apareció. Resultó, sin embargo, que la luz de 405 nm podía hacer que la fluorescencia volviera a aparecer. Una vez reactivada volvía a emitir fluorescencia con luz de 488 nanómetros.

Dispersando estas proteínas en un gel, Moerner, consiguió que la distancia entre las moléculas fuera mayor que el límite de difracción de Abbe (0,2 μm). En estas condiciones un microscopio óptico pudo discernir el resplandor de las moléculas individuales (eran como pequeñas lámparas con interruptores). Los resultados fueron publicados en la revista científica Nature en 1997.

Con este experimento Moerner demostró que era posible controlar ópticamente la fluorescencia de moléculas individuales. Ello solucionaba el problema que Eric Betzig había formulado dos años antes.

Cansado de la academia pero obsesionado con el límite de difracción de Abbe

Al igual que Stefan Hell, Eric Betzig estaba obsesionado por la idea de superar el límite de difracción de Abbe. En los comienzos de los noventa estaba trabajando en un nuevo tipo de microscopía óptica llamada microscopía de campo cercano en los laboratorios Bell en Nueva Jersey. En microscopía de campo cercano el rayo de luz se emite desde una punta extremadamente fina colocada a escasos nanómetros de la muestra. Este tipo de microscopía también puede eludir el límite de difracción de Abbe, aunque el método tiene restricciones importantes. Por ejemplo, la luz emitida tiene un alcance tan corto que es difícil de visualizar las estructuras interiores de la célula.

En 1995 Eric Betzig llegó a la conclusión de que la microscopía de campo cercano no se podía mejorar mucho más. Además, no se sentía a gusto en el mundo académico y decidió poner fin a su carrera de investigador; sin saber adónde ir, dejó los laboratorios Bell, pero el límite de difracción de Abbe seguía obsesionándolo. Durante un paseo en un frío día de invierno tuvo una nueva idea, ¿sería posible burlar el límite de difracción usando moléculas con propiedades diferentes, moléculas que presenten fluorescencia con colores diferentes?

Inspirado por W. E. Moerner, entre otros, Eric Betzig ya había detectado fluorescencia en moléculas individuales mediante microscopía de campo cercano. Empezó a reflexionar sobre si un microscopio ordinario podría generar la misma alta resolución si diferentes moléculas brillaban con diferentes colores, como rojo, amarillo y verde. La idea era registrar una imagen por color. Si todas las moléculas de un color estaban separadas como mínimo por los 0,2 micrómetros estipulados por el límite de difracción de Abbe, su posición podría ser determinada con precisión. A continuación, cuando estas imágenes se superponen, la imagen completa tendría una resolución mucho mejor que el límite de difracción de Abbe y las moléculas rojas, amarillas y verdes sería distinguibles incluso si estuvieran separadas pocos nanómetros. De esta manera podría superarse el límite de difracción de Abbe. Sin embargo, en la práctica, surgieron algunos problemas, por ejemplo la falta de moléculas con las propiedades necesarias.

En 1995 Eric Betzig publicó sus ideas teóricas en la revista Optics Letters, abandonó el mundo académico y comenzó a trabajar en la empresa de su padre.

Vuelta a la microscopía atraídos por las proteínas verdes fluorescentes

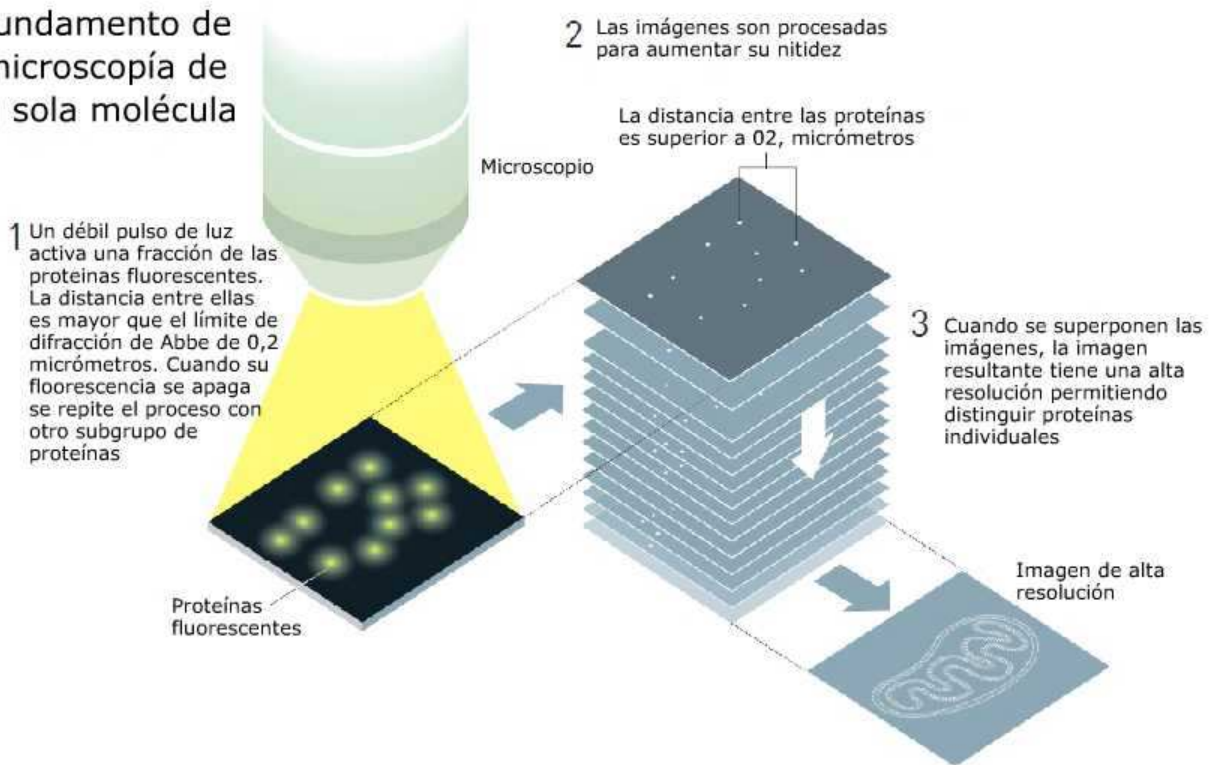
Durante muchos años Eric Betzig estuvo totalmente desconectado de la investigación. Pero un buen día su interés por la ciencia volvió a cobrar vida y, al volver a la literatura científica, se encontró con la proteína verde fluorescente por primera vez. Al darse cuenta de que había una proteína que podía hacer visibles otras proteínas dentro de células, sus ideas sobre cómo eludir el límite de difracción de Abbe, volvieron a revivir.

El verdadero avance llegó en 2005, cuando se tropezó con proteínas fluorescentes que podrían activarse a voluntad, similares a las moléculas que W. E. Moerner había detectado en 1997. Betzig se dio cuenta de que tal proteína era la herramienta necesaria para implementar la idea que había tenido diez años antes. Las moléculas fluorescentes no tenían por qué ser de diferentes colores, también podían emitir fluorescencia en diferentes momentos.

Superando el límite de Abbe por superposición de imágenes

Un año más tarde, Eric Betzig demostró, en colaboración con los científicos que trabajan con proteínas fluorescentes, que su idea podía ser llevada a la práctica. Entre otras cosas, acoplaron la resplandeciente proteína a la membrana que envuelve el lisosoma, la estación de reciclaje de la célula. Usando un pulso de luz las proteínas fueron activadas para que emitieran fluorescencia, pero si el pulso era lo suficientemente débil sólo una fracción de ellas comenzaba a brillar. Debido a su reducido número, la distancia entre la mayoría de ellas era superior a los 0,2 micrómetros, el límite de difracción de Abbe.

El fundamento de la microscopía de una sola molécula



Por lo tanto, la posición de cada proteína podía ser registrada con mucha precisión con el microscopio. Después de un tiempo, cuando la fluorescencia cesa, se activa un nuevo subgrupo de proteínas. Una vez más, el pulso era tan débil que sólo una fracción de las proteínas comienza a brillar, con lo cual se registra otra imagen. Este procedimiento se repite una y otra vez. Al superponer las imágenes, Betzig obtuvo una imagen de alta resolución de la membrana del lisosoma. Su resolución es mucho más alta que el límite de difracción de Abbe. El innovador método fue publicado en Science en 2006.

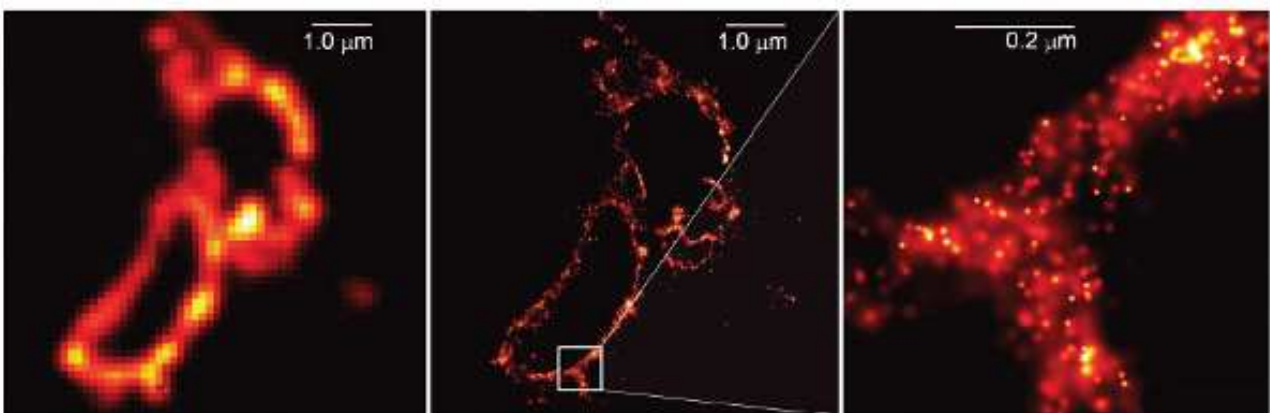


Figura 5. La imagen del centro muestra las membranas del lisosoma y es una de las primeras tomadas por Betzig utilizando microscopía de una sola molécula. A la izquierda, la misma imagen tomada mediante microscopía convencional. A la derecha se ha ampliado la imagen de las membranas. Téngase en cuenta que la escala de 0,2 micrómetros equivale al límite de difracción de Abbe. La resolución es mucho mejor. Imagen de Science 313:1642 – 1645.

Los premiados mapean, actualmente, los más íntimos secretos de la vida

Los métodos desarrollados por Eric Betzig, Stefan Hell y W. E. Moerner han conducido a varias técnicas de nanoscopía y actualmente se utilizan en todo el mundo. Los tres galardonados son investigadores que siguen activos encabezando la innovación en el campo de la nanoscopía. Dirigiendo su poderoso nanoscopio hacia los componentes más pequeños de la vida, generan conocimiento de vanguardia. Stefan Hell se asoma al interior de las células nerviosas, vivas, con el fin de comprender mejor las sinapsis cerebrales. W el. E. Moerner ha estudiado las proteínas en relación con la enfermedad de Huntington. Eric Betzig ha rastreado la división celular dentro de los embriones. Estos son solo algunos ejemplos. Una cosa es cierta, el Premio Nobel de Química 2014 ha sentado las bases del desarrollo de un conocimiento de gran importancia para la humanidad.

LINKS AND FURTHER READING

Additional information on this year's Prizes, including a scientific background article in English, may be found at the website of the Royal Swedish Academy of Sciences, <http://kva.se>, and at <http://nobelprize.org>. They also include web-TV versions of the press conferences at which the awards were announced. Information on exhibitions and activities related to the Nobel Prizes and the Prize in Economic Sciences may be found at www.nobelmuseum.se.

Articles

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

Lectures and interviews (video)

Betzig, E. (2012) Day 2 Distinguished Lecture by Dr. Eric Betzig at MF Symposium, www.youtube.com/watch?v=UqMIL8-eaxk

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

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

Interview with Moerner, W. E. (2013) Alumni Achievement Award: W.E. Moerner
www.youtube.com/watch?v=VBmgvIATbCc

THE LAUREATES

ERIC BETZIG U.S. citizen. Born 1960 in Ann Arbor, MI, USA. Ph.D. 1988 from Cornell University, Ithaca, NY, USA. Group Leader at Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA. <http://janelia.org/lab/betzig-lab>

STEFAN W. HELL German citizen. Born 1962 in Arad, Romania. Ph.D. 1990 from the University of Heidelberg, Germany. Director at the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, and Division head at the German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany. www3.mpibpc.mpg.de/groups/hell

WILLIAM E. MOERNER U.S. citizen. Born 1953 in Pleasanton, CA, USA. Ph.D. 1982 from Cornell University, Ithaca, NY, USA. Harry S. Mosher Professor in Chemistry and Professor, by courtesy, of Applied Physics at Stanford University, Stanford, CA, USA. <http://web.stanford.edu/group/moerner>