

DANIEL GUERRA GIRALDEZ

PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2014: SUPERANDO EL LÍMITE INFRANQUEABLE DE LA MICROSCOPIA A LA NANOSCOPIA

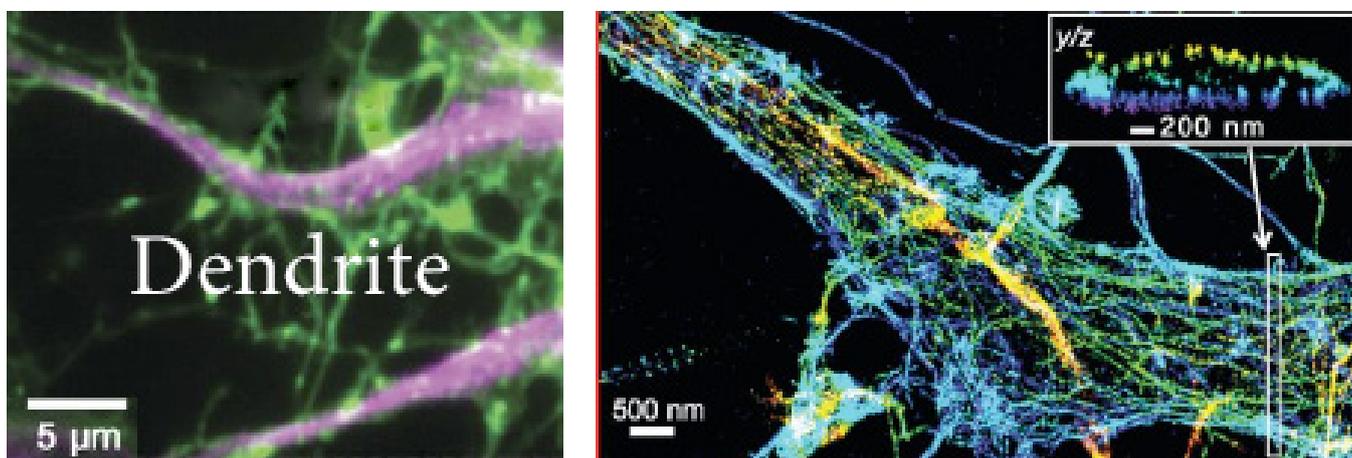


Figura 1. Microscopía vs. nanoscopía. Izquierda: imagen por microscopía convencional de fluorescencia, donde la proteína actina (marcada de verde) y MAP2 (marcada de magenta) muestran la estructura de una dendrita de una neurona del hipocampo. Derecha: imagen tridimensional tomada por nanoscopía Storm, correspondiente al rectángulo marcado en la imagen de la izquierda. Se observa la compleja red formada por fibras individuales de actina marcada. El inserto corresponde a la sección transversal de la región marcada. Fuente: Xu, Zhong y Zhuang (2013)

La invención de la microscopía es un ejemplo histórico muy claro de cómo el desarrollo de una nueva tecnología extiende el horizonte científico de lo observable y lo comprensible. Desde que Anton van Leeuwenhoek creó el primer microscopio de uso científico en el siglo XVII, esta tecnología fue avanzando con una progresiva acumulación de mejoras, tales como el diseño de microscopios compuestos,

el uso del aceite de inmersión y la eliminación de aberraciones propias de la calidad de los lentes. Sin embargo, en el siglo XX, se llegó a alcanzar un máximo de resolución que parecía infranqueable, puesto que estaba impuesto por las propiedades físicas de la luz. Las imágenes que vemos naturalmente o con instrumentos ópticos se forman por ondas de luz que atraviesan o se reflejan en los objetos.

La física nos demuestra que la perturbación de una onda no puede distinguir entre dos objetos si estos se encuentran separados por una distancia menor a la mitad de la longitud de esa onda. De hecho, las ondas de luz visible (longitud 400–700 nanómetros) no distinguen entre dos objetos que se encuentren separados por menos de 200 nanómetros entre sí. Por ello, no podemos obtener con ningún instrumento –por perfecto que sea– información espacial con una resolución mayor a este límite⁽¹⁾.

Hasta hace muy poco, este máximo de resolución de 200 nm –llamado límite de difracción de la luz– había podido ser superado únicamente cuando se dejaba de utilizar luz. La microscopía electrónica utiliza, en su lugar, rayos de electrones de longitudes de onda del orden de picómetros, que permiten llegar a resoluciones mayores. Lamentablemente, la energía involucrada en esta microscopía y los tratamientos que requiere son incompatibles con la vida y no pueden utilizarse para observar células vivas. En cuanto a las microscopías de sonda, como la microscopía de fuerza atómica (AFM), estas han permitido crear imágenes submicroscópicas al no usar rayos de ningún tipo, sino una sonda que “palpa” la superficie de la muestra. No obstante, las estructuras interiores de una célula viva son totalmente inalcanzables para este tipo de microscopía.

Las células que observamos en el microscopio óptico, vivas y transparentes –de un tamaño típico de 1 micra para bacterias, y de 100 micras para células eucariotes–, nos muestran únicamente sus corpúsculos mayores, tales como organelas. Es innegable la cantidad de información que esto nos ha revelado sobre la vida y la diversidad de los microorganismos, y sobre la estructura y el funcionamiento de los tejidos, puesto que la microbiología y la histología se encuentran no solo articuladas, sino incluso podríamos decir fundadas y definidas por el uso del microscopio óptico.

Sin embargo, con este, vemos poco o nada de la danza de moléculas que determina el funcionamiento de la célula, debido a que estas son típicamente de tamaños entre 1 y 10 nm (0,001–0,01 micras). Dado que las moléculas son invisibles para el microscopio óptico, la bioquímica tuvo que desarrollarse aislando los procesos de la célula y llevándolos a escalas observables mediante infinidad de métodos, desde reacciones colorimétricas hasta cristalografía de rayos X. Así, hemos ido aprendiendo sobre el quehacer interior de la célula más por modelaje que por observación directa, para lo cual se extrapola lo que observamos en procesos aislados en tubos de ensayo –lo que puede ocurrir in vivo–, tratando de ir completando un esquema integrado. Por su parte, el desarrollo de la genética nos ha construido un mapa de funciones mediante la asociación de secuencias de ADN a funciones

1 Abbe (1873)

y estructuras específicas, según lo observado, con técnicas de bioquímica y microscopía.

¿Cómo integrar los procesos moleculares elementales de la vida si no los podemos ver en funcionamiento en su contexto natural? Esta tarea es el reto que acepta el científico experimentalista. Un logro importante en este sentido, merecedor del premio Nobel de química en el año 2008⁽²⁾ y precedente directo del logro de la microscopía de ultra resolución, es el marcaje de proteínas con proteína verde fluorescente (GFP). Esta proteína fluorescente fue descubierta en la medusa *Aequorea victoria*, y mediante técnicas de ingeniería genética se la puede adherir con relativa facilidad a un gen específico cualquiera. De este modo, una proteína que podemos escoger dentro de los miles diferentes que tiene una célula adquiere la propiedad de brillar, de modo que es visible para el microscopio óptico, a pesar de su diminuto tamaño (1-10 nm). El uso de la GFP como etiqueta molecular ha permitido seguir el rastro de muchas proteínas desde su síntesis, monitorear su abundancia, su localización en la célula y su ensamblaje en estructuras visibles al microscopio óptico. Además, la existencia de esta etiqueta abrió las puertas a que los avances técnicos en fluorescencia pudieran ser aprovechados para el desarrollo de microscopios de ultra-alta resolución, que finalmente romperían la barrera del límite

2 Nobel Prize Org. (2014a)

de difracción de la luz con fines de estudios biológicos⁽³⁾.

Los métodos de detección de fluorescencia llegaron a ser muy sensibles gracias a técnicas desarrolladas entre las décadas de 1970 y 1990. Se logró, incluso, detectar moléculas individuales en una superficie, siempre y cuando estas se encontraran distanciadas entre sí más allá del límite de difracción. Cabe anotar que al utilizar dispersiones de fluoróforos de manera muy diluida en una superficie se sabe de antemano que todos ellos se encuentran a más de 200 nm uno de otro. Así, al analizar los datos de emisión, sabiendo que cada fuente de brillo corresponde a una única molécula, los datos de frecuencia de emisión dibujan una curva normal de Gauss, cuyo centro corresponde a la localización real de la molécula fluorescente (Figura 2 a y b). Según la calidad y la abundancia de la información, puede estimarse la ubicación de dicho centro con una resolución que se acerca teóricamente al infinito (Figura 2 c).

3 Nobel Prize Org. (2014a)

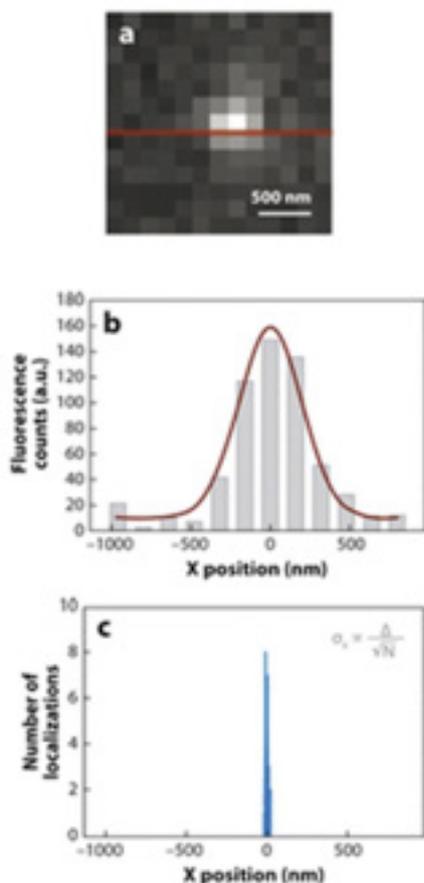


Figura 2. Principio estadístico de la localización de moléculas individuales en ultra-alta resolución. (a) Imagen pixelizada de la intensidad obtenida de un único fluoróforo en el plano x-y del fotodetector; se traza una línea roja a ser analizada en los siguientes paneles. (b) Intensidad de la fluorescencia hallada en la traza roja, según posición en el eje X (barras), y ajuste a una distribución normal (línea curva). (c) Densidad de probabilidad de centro de la distribución normal según posición en el eje X; el conocimiento a priori de que la fuente es un emisor único permite localizar la posición del punto central con una precisión mucho mayor que el ancho de la distribución de intensidades. Fuente: Thompson et al. (2012).

Sin embargo, la localización de moléculas únicas dispersas de esta manera no puede

llevar a cabo la labor de observar complejas maquinarias biológicas. El reto de localizar estas diminutas fuentes de luz dentro de un espacio densamente complejo, en el que más de una puede ubicarse a distancias minúsculas, fue el que tomaron los ganadores del Nobel en Química 2014, y que nos trae hoy al inicio de la era de la nanoscopía. Al conocerse variantes de GFP de diferente espectro de emisión (i.e., color), se propuso tomar datos a partir de diferentes longitudes de onda, cada una correspondiente a un tipo de fluoróforo. Luego, si se ensambla la información colectada de diferentes canales y si en cada uno se ha cumplido la condición de localizar fluoróforos únicos, el conjunto de ellos construye una imagen en la que moléculas muy cercanas una a otra pueden identificarse como distintas por ser de diferente espectro. Con este método, se logró localizar a moléculas fluorescentes con una resolución cercana a 20 nm, pero con la condición de que las moléculas cercanas fueran siempre fluoróforos diferentes. Dicha condición impone un severo límite a la utilidad del método, puesto que la introducción de un fluoróforo en una célula viva involucra un trabajo de modificación genética, que hace más difícil la introducción de un segundo y un tercero. Además, para observar adecuadamente el ensamblaje de estructuras celulares construidas por múltiples subunidades, con frecuencia es necesario poder distinguir el número y la posición relativa de subunidades que son idénticas entre sí.

Guiada por esta necesidad, la investigación de Moerner se enfocó en buscar diferentes propiedades espectroscópicas en versiones mutantes de GFP. Asimismo, demostró que, si esta proteína es estimulada a 488 nm, emite normalmente luz en forma de parpadeos hasta alcanzar un estado agotado (*bleached*), en el que no vuelve a brillar, pero que puede ser estimulado nuevamente si la proteína es irradiada por una diferente longitud de onda de 405 nm⁽⁴⁾. Estos resultados demostraron que era posible aprovechar las propiedades fotoquímicas de una proteína para guiarla a estados activos o inactivos de fluorescencia. En el año 2006, Betzig y su grupo aprovecharon esta propiedad de fotoactivación en una estrategia de colección de múltiples imágenes. En cada paso, la muestra se somete a una baja irradiación a 413 nm, la cual activa solo algunas de las GFP presentes. Seguidamente, la excitación a 488 nm es utilizada para hacer parpadear las moléculas activas, que debido a su escaso número se encuentran siempre a grandes distancias entre sí, lo que cumple la condición necesaria para su localización en ultra-alta resolución. Tras pasar un tiempo de excitación, el primer grupo de moléculas agota espontáneamente su fluorescencia y un segundo grupo puede ser activado por una nueva irradiación a 413 nm. Así ocurre sucesivamente hasta que todos los subgrupos han participado en la construcción de una imagen conjunta de auténtica ultra-alta

resolución⁽⁵⁾. Bajo el nombre de Photoactivated Localization Microscopy (PALM), esta ingeniosa combinación de activación, parpadeo y agotamiento permite la localización de moléculas individuales a partir de un solo tipo de fluoróforo, aun si estas se encuentran muy densamente distribuidas, a distancias entre sí tan pequeñas como 20 nm.

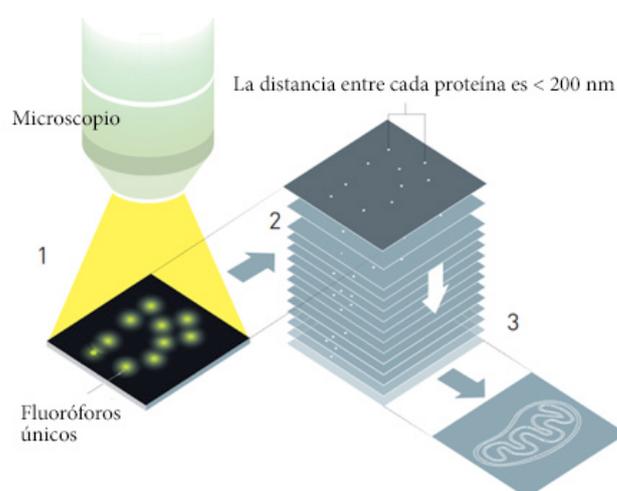


Figura 3. Principio de la nanoscopía de localización por fotoactivación (PALM). 1, Un pulso débil activa una fracción del total de proteínas fluorescentes. La distancia entre ellas es mayor que el límite de difracción de 200 nm. Las proteínas activadas brillan hasta blanquearse por agotamiento, momento en el que se repite el procedimiento. 2, Las imágenes de baja resolución son procesadas para hallar la localización de las fuentes únicas de emisión con mayor precisión (procedimiento estadístico descrito en la figura 2). 3, Al superponer todas las imágenes, se obtiene una imagen de ultra-alta resolución, en la que pueden distinguirse moléculas fluorescentes individuales (Nobel Prize Org. (2014b)). Fuente: Nobel Prize Org. (2014b).

El otro científico reconocido por el Nobel de Química 2014 es Stefan W. Hell quien, antes que William Moerner y Eric Betzig, ideó y

4 Dickson et al. (1997)

5 Betzig et al. (2006) y Born y Wolf (2002)

construyó un sistema muy diferente para aprovechar las propiedades de los fluoróforos de alcanzar distintos estados. Hell utilizó un juego de dos rayos láser. Con uno, excitaba una zona de moléculas fluorescentes, y con el otro –en forma de tubo hueco– estimulaba hasta agotar la fluorescencia de todas ellas, excepto de una diminuta zona central⁽⁶⁾. Debido a que estaba basado en refinar la zona central observada mediante la estimulación hasta agotar la fluorescencia de la zona periférica,

el método se llamó Stimulated Emission Depletion o STED. Según la intensidad del rayo agotador, esta zona central de estimulación puede reducirse indefinidamente, y así lograr mayores resoluciones. Sin embargo, si la intensidad es demasiado alta, esta puede dañar irreversiblemente la muestra. La imagen detallada se puede construir si ambos rayos navegan por todo el campo observado, estimulando y agotando las moléculas fluorescentes de cada porción de la muestra.

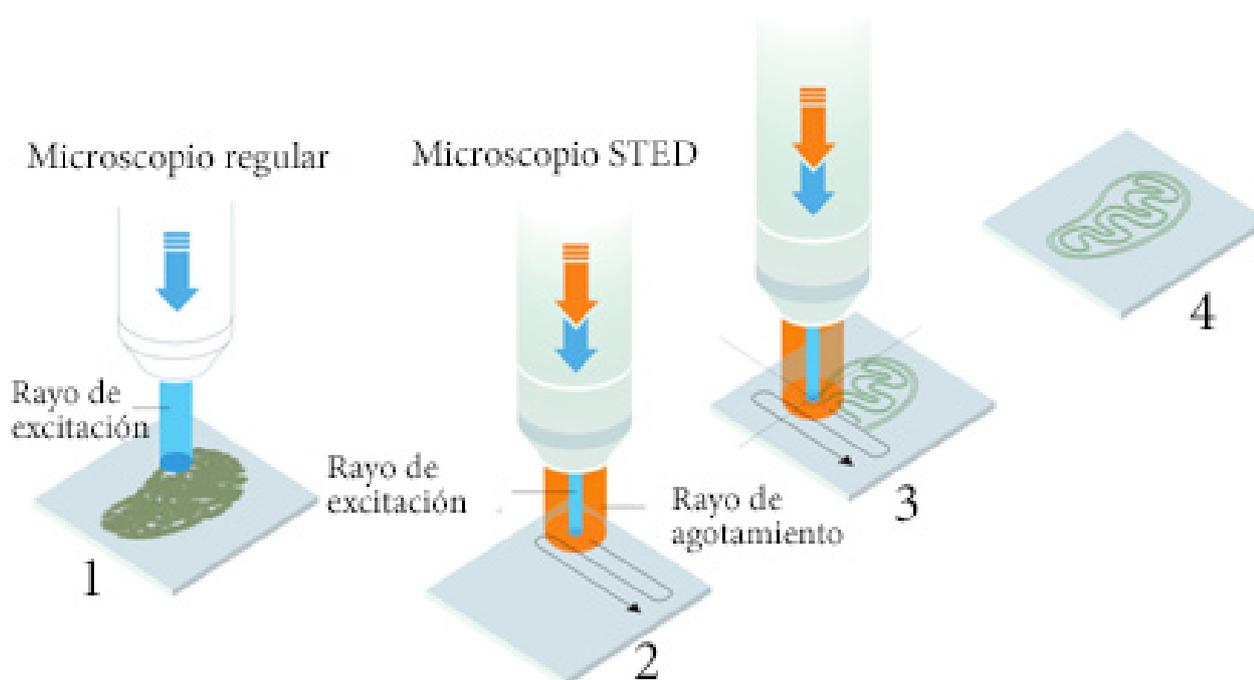


Figura 4. Principio de la nanoscopía de agotamiento por emisión estimulada (STED). 1, En un microscopio óptico regular, el contorno de una mitocondria puede distinguirse, pero la resolución no puede mejorar más allá de los 200 nm. 2, En un microscopio STED, un rayo anular agota toda la fluorescencia, excepto aquella en un volumen nanométrico central. 3, Los rayos sondan la muestra para generar la imagen de todo un campo. 4, La imagen final obtiene una resolución que supera por mucho la barrera de los 200 nm, dependiendo del volumen central de excitación. Fuente: Nobel Prize Org. (2014b).

⁶ Klar et al. (2000)

Ahora que el límite que antes parecía infranqueable ha sido superado, el uso, el desarrollo y la mejora de estas tecnologías avanzan rápidamente⁽⁷⁾. Presumiblemente, hay aún mucho por mejorar al explorar diferentes modificaciones en la óptica, en el análisis de los datos y en el uso de diferentes fluoróforos fotoactivables. De estos últimos, existe actualmente una amplia variedad, ya sean moléculas pequeñas o proteínas fluorescentes, con diversas propiedades fotoquímicas que los hacen más o menos adecuados para cada versión de nanoscopía⁽⁸⁾. Por tratarse de un campo en rápida expansión, los grupos de investigación que desean estar a la vanguardia aún desarrollan sus propias modificaciones a partir de estos y otros principios. Por ejemplo, Sang-Hyuk Lee, del grupo de investigación, liderado por el peruano Carlos Bustamante en la Universidad de California, Berkeley, desarrolló un sistema de PALM y un método original de análisis para contar moléculas individuales dentro de una célula viva y caracterizar la calidad del parpadeo de diferentes fluoróforos⁽⁹⁾. Este método se utilizó con éxito para caracterizar en bacterias la dinámica de los complejos que realizan la fosforilación oxidativa difundiendo en la membrana⁽¹⁰⁾, y también la dinámica con la que la maquinaria de transporte de ADN se ensambla e interviene en la fisión celular durante la esporulación⁽¹¹⁾.

7 Persson et al. (2013)

8 Lukyanov et al. (2005)

9 Lee et al. (2012)

10 Llorente-García et al. (2014)

11 Flemming et al. (2010)

En la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el acceso a esta tecnología podría darnos la oportunidad de realizar múltiples hallazgos de trascendencia mundial. Con el uso de etiquetas moleculares como el GFP o de anticuerpos monoclonales marcados con fluoróforos químicos, podríamos potenciar nuestras actuales investigaciones en biofísica molecular, inmunología, neurociencias y microbiología, por mencionar únicamente las áreas de aplicación directa. La oportunidad existe gracias a la estrecha colaboración que sostenemos con el profesor Bustamante, a través de nuestro laboratorio gemelo, y el interés de varios investigadores de la Facultad de Ciencias y Filosofía, que han esbozado proyectos para utilizar un microscopio PALM en nuestra universidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBE, E. (1873). "BEITRÄGE ZUR THEORI DES MIKROSKOPS UND DER MIKROSKOPISCHEN WAHRNEHMUNG". *ARCHIV FÜR MIKROSKOPISCHE ANATOMY*, 9: 413-418.

BETZIG E., G. H. PATTERSON, R. SOUGRAT, O. W. LINDWASSER, S. OLENYCH, J. S. BONIFACINO, M. W. DAVIDSON, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ Y H. F. HESS (2006). "IMAGING INTRACELLULAR FLUORESCENT PROTEINS AT NANOMETER RESOLUTION". *SCIENCE*, 313: 1642-1645.

BORN, M. Y E. WOLF (2002). *PRINCIPLES OF OPTICS*. CAMBRIDGE: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.

DICKSON R. M., A. B. CUBITT, R. Y. TSIEN Y W. E. MOERNER (1997). "ON/OFF BLINKING AND SWITCHING BEHAVIOR OF SINGLE MOLECULES OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN". *NATURE*, 388: 355-358.

FLEMMING, TINYA C., JAE YEN SHIN, SANG-HYUK LEE, ERIC BECKER, KERWYN CASEY HUANG, CARLOS BUSTAMANTE Y KIT POGLIANO (2010). "DYNAMIC SPOIIIIE ASSEMBLY MEDIATES SEPTAL MEMBRANE FISSION DURING BACILLUS SUBTILIS SPORULATION". *GENES DEV*, JUNIO DE 2010, 24: 1160-1172.

KLAR, T. A., S. JAKOBS, M. DYBA, A. EGNER Y S. W. HELL (2000). "FLUORESCENCE MICROSCOPY WITH DIFFRACTION RESOLUTION BARRIER BROKEN BY STIMULATED EMISSION". *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*. 97: 8206-8210.

LLORENTE-GARCÍA, ISABEL, TCHERN LENN, HEIKO ERHARDT, OLIVER L. HARRIMAN, LU-NING LIU, ALEX ROBSON, SHENG-WEN CHIU, SARAH MATTHEWS, NICKY J. WILLIS, CHRISTOPHER D. BRAY, SANG-HYUK LEE, JAE YEN SHIN, CARLOS BUSTAMANTE, JAN LIPHARDT, THORSTEN FRIEDRICH, CONRAD W. MULLINEAUX Y MARK C. LEAKE (2014). "SINGLE-MOLECULE IN VIVO IMAGING OF BACTERIAL RESPIRATORY COMPLEXES INDICATES DELOCALIZED OXIDATIVE PHOSPHORYLATION". *ELSEVIER*, 1837: 811-824.

LUKYANOV, K. A., D. M. CHUDAKOV, S. LUKYANOV Y V. V. VERKHUSHA (2005). "INNOVATION: PHOTOACTIVATABLE FLUORESCENT PROTEINS". *NATURE REVIEWS. MOLECULAR CELL BIOLOGY*, 6 (11), 885–891. doi:10.1038/NRM1741

NOBEL PRIZE ORG. (2014A). "THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2008 - ADVANCED INFORMATION". *NOBELPRIZE.ORG. NOBEL MEDIA AB 2014*.

<[HTTP://WWW.NOBELPRIZE.ORG/NOBEL_PRIZES/CHEMISTRY/LAUREATES/2008/ADVANCED.HTML](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/advanced.html)>.

NOBEL PRIZE ORG. (2014B). "THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2014 - ADVANCED INFORMATION". *NOBELPRIZE.ORG. NOBEL MEDIA AB 2014*.

<[HTTP://WWW.NOBELPRIZE.ORG/NOBEL_PRIZES/CHEMISTRY/LAUREATES/2014/ADVANCED.HTML](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/advanced.html)>.

PERSSON, F., I. BARKEFORS Y J. ELF (2013). "SINGLE MOLECULE METHODS WITH APPLICATIONS IN LIVING CELLS". *CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY*, 24 (4), 737–44. doi:10.1016/j.copbio.2013.03.013

SANGHYUK, LEE, JAE YEN SHIN, ANTONY LEE Y CARLOS BUSTAMANTE (2012). "COUNTING SINGLE PHOTOACTIVATABLE FLUORESCENT MOLECULES BY PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MICROSCOPY (PALM)". *PNAS*, 23 DE OCTUBRE, 109 (43): 17436-17441

THOMPSON M. A., M. D. LEW Y W. E. MOERNER (2012). "EXTENDING MICROSCOPIC RESOLUTION WITH SINGLE MOLECULE IMAGING AND ACTIVE CONTROL". *ANNU REV BIOPHYS*, 41: 321-342.

XU K., G. ZHONG Y X. ZHUANG (2013). "ACTIN, SPECTRIN, AND ASSOCIATED PROTEINS FORM A PERIODIC CYTOSKELETAL STRUCTURE IN AXONS". *SCIENCE*, ENERO, 339(6118): 452-456.

