

El Premio Nobel de Química (2014)

La evolución del conocimiento de cómo funcionan los organismos vivos ha ido de la mano de la capacidad para tener imágenes cada vez más precisas de, primero, los organismos vivos más pequeños -microbios, bacterias- mediante el microscopio óptico, hasta, finalmente, de moléculas mediante la crio-microscopía electrónica - objeto del premio Nobel de 2017. Un paso anterior a esta solución definitiva es la microscopía de fluorescencia de superresolución, que recibió el premio en 2014. https://s3.eu-de.cloud-object-storage.appdomain.cloud/kva-image-pdf/assets/globalassets-priser-nobel-2014-kemi-pop_ke_en_14.pdf

La microscopía óptica permite obtener imágenes cuando lo que se quiere observar es irradiado con luz. Desde 1873 se admitía, tras los trabajos de Ernst Abbe, que no podían obtenerse imágenes de menos de 0,2 micras (0,0002 milímetros) -la mitad de la longitud de onda de la luz- lo que permite observar células o bacterias, pero no orgánulos del interior de las células, como las mitocondrias responsables de la generación de energía a nivel celular- y mucho menos moléculas grandes como las proteínas. El conjunto de los trabajos de los tres científicos galardonados este año, Eric Betzig, Stefan Hell y William Moerner, permitió en 2006 (<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1127344>) obtener imágenes de proteínas del interior celular con una resolución de hasta 2 nanómetros, esto es, 1000 veces menos que el supuesto límite de Abbe. En otra manera de expresarlo, se ha pasado del microscopio al nanoscopio. En términos de la Academia sueca por “por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia de superresolución”.

La idea que desarrolla Hell consiste en poder disponer de una fuente de luz de tamaño nanoscópico -algo como una linterna nanoscópica- que permitiera iluminar zonas distintas de una molécula y después componer la imagen final.

En 1994 Stefan Hell publica la primera aproximación teórica a través de lo que denomina microscopía por agotamiento de la emisión estimulada (microscopía STED en inglés *stimulated emission depletion*). <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-19-11-780>

La irradiación de moléculas fluorescentes (aquellas que emiten con una longitud de onda mayor que la que reciben) con un rayo láser en una zona muy concreta y de tamaño nanométrico, mientras el resto se mantienen “apagadas”, provoca la emisión de luz en esa zona concreta; si se desplaza el rayo láser sobre toda la muestra, se produce la emisión de las moléculas fluorescentes distribuidas en el objeto observado generando una imagen, tanto más precisa cuanto menor sea el volumen de muestra que se excita.

En el año 2000 demostró sus planteamientos teóricos al observar una *Escherichia coli* con una resolución jamás alcanzada (<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2800%2901896-2>) aprovechando la proteína fluorescente verde, cuyo descubrimiento y aislamiento en una medusa fue objeto del premio Nobel de Química de 2008, y que era ya bien conocida a principios de los años 90.

El segundo concepto que constituye el premio Nobel de este año es la *microscopía de molécula única*. Hasta los trabajos de Moerner y Betzig la observación de la fluorescencia era siempre de un conjunto de moléculas -de millones de ellas- y los datos observados promedio de todas ellas.

William E. Moerner, conocido como W.E., en 1989 consiguió medir la absorción de una sola molécula en un sólido. Trabajaba entonces en California en el *Almaden Research Center* de la compañía IBM. <https://journals.aps.org/prl/pdf/10.1103/PhysRevLett.62.2535> Ocho años más tarde, 1997 en la Universidad de California en San Diego, la incorporación de la proteína verde fluorescente (GFP) a sus trabajos le permitió “encender” la proteína irradiando a 488 nm y tras

la desaparición de la fluorescencia, “apagado”, una nueva radiación a 405 nm reactiva la proteína para que pueda volver a “encenderse” cuando se excita a 488 nm. Se dispone entonces de un sistema para provocar de forma controlada (ON/OFF) la fluorescencia de una molécula. <https://www.nature.com/articles/41048>

Por su parte Eric Betzig venía trabajando en *microscopía de campo cercano*, técnica que consiste en irradiar luz desde distancias muy cortas, del orden de nanómetros. Esta técnica permite soslayar el límite de Abbe pero hace extraordinariamente difícil visualizar estructuras en el interior de las células. En 1995, dos años antes de la aparición de los trabajos de W.E., publicó sus avances en microscopía de fluorescencia de campo cercano sugiriendo la posibilidad de alcanzar resolución a nivel molecular y abandonó la investigación volviendo a la empresa familiar. <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-20-3-237>

Sin embargo, Betzig retomó los resultados de W.E. Moerner considerando inicialmente que si además de proteínas fluorescentes verdes se pudiera disponer de proteínas que emitieran en otros colores la precisión de las imágenes mejoraría; la idea era débil por la dificultad de disponer de proteínas con tan diferentes propiedades ópticas. Esta limitación se supera no cambiando el color de la fluorescencia sino el momento en que las proteínas fluorescen. La publicación de 2006, ya indicada anteriormente, explica que al irradiar a baja potencia sólo una parte de las proteínas emiten luz, como son pocas están situadas a mayor distancia del límite de Abbe, y son perfectamente visibles. Cuando se extingue la fluorescencia se irradia de nuevo y otro grupo de proteínas responde del mismo modo. La repetición del proceso permite, con la acumulación de imágenes tras cada irradiación, componer la imagen precisa de la molécula observada.

La idea de la “linterna nanoscópica” (Hell) junto a la posibilidad de observar la fluorescencia de una única molécula (Moerner) y la observación a tiempos distintos (Betzig) conforman nuevas técnicas de nanoscopía que los galardonados siguen utilizando para incrementar el conocimiento en dominios cada vez más diminutos. Así Stefan Hell ha observado el interior de células nerviosas vivas,

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933504700825?via%3Dihub> William

Moerner ha estudiado las proteínas relacionadas con una enfermedad hereditaria que afecta células nerviosas del cerebro (Huntington)

<https://www.cambridge.org/core/journals/quarterly-reviews-of-biophysics/article/delayed-emergence-of-subdiffraction-sized-mutant-huntingtin-fibrils-following-inclusion-body-formation/E96CDB5D87DE2C07389E456A6AE34CF3> y Betzig ha estudiado la división celular a

nivel embrionario. <https://www.nature.com/articles/nprot.2014.087>

Los premiados

Eric Betzig (1960, Ann Arbor, Michigan, E.E.U.U.) Doctor (1988, Cornell University, Ithaca, New York, E.E.U.U.) Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, Virginia, E.E.U.U.

Stefan W. Hell (1962, Arad, Rumania; ciudadano alemán). Doctor (1990, Universidad de Heidelberg, Alemania. Director del Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen, y *Division head* en el Centro Alemán de Investigación del Cáncer, Heidelberg, Alemania.

William E. Moerner (1953, Pleasanton, California, E.E.U.U.) Doctor (1982, Universidad Cornell,, Ithaca, Nueva York, E.E.U.U.) *Professor* de Química y *Professor, by courtesy*, de Física Aplicada en la Universidad Stanford, Stanford, California, E.E.U.U.