

El Premi Nobel de Química 2014: la microscòpia de fluorescència amb superresolució

The Nobel Prize in Chemistry 2014: super-resolved fluorescence microscopy

Jordi Hernando

Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Química

Resum: El Premi Nobel de Química 2014 va ser concedit als investigadors Eric Betzig, Stefan W. Hell i William E. Moerner per les seves contribucions al desenvolupament de la microscòpia de fluorescència amb superresolució, un nou grup de tècniques que permeten la caracterització òptica de la matèria a escala nanomètrica. En aquest article es descriuen els principals fonaments d'aquest tipus de microscòpia, així com les descobertes realitzades pels tres guardonats en aquest camp.

Paraules clau: Microscòpia de fluorescència amb superresolució, microscòpia òptica, espectroscòpia de fluorescència de molècules individuals.

Abstract: *The Nobel Prize in Chemistry 2014 has been awarded to physicists Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner for their contributions to the development of super-resolved fluorescence microscopy, a new group of techniques that allow the optical characterization of matter to be brought down to the nanometre scale. This article reviews the fundamentals of this type of microscopy, as well as the main discoveries made by the Nobel laureates in this area.*

Keywords: *Super-resolved fluorescence microscopy, optical microscopy, single-molecule fluorescence spectroscopy.*

Introducció

El Premi Nobel de Química 2014 ha estat concedit conjuntament a dos investigadors nord-americans (Eric Betzig i William E. Moerner) i un alemany d'origen romanès (Stefan W. Hell) en reconeixença de les seves contribucions «to the development of super-resolved fluorescence microscopy» [1] (figura 1). La microscòpia de fluorescència amb superresolució agrupa un conjunt de tècniques desenvolupades durant els darrers vint anys que han permès estendre la resolució de la microscòpia òptica fins a l'escala nanomètrica, la qual cosa ha obert la porta a l'estudi de la matèria a un nivell de detall gairebé sense precedents. Es tracta, doncs, d'un avenç fonamentalment instrumental, que ha estat dut a terme majoritàriament per físics experimentals (de fet, tots tres guardonats són doctors en física) i que té el seu principal camp d'aplicació en les ciències biològiques. Davant d'aquesta situació, és inevitable preguntar-se: per què aquesta descoberta ha estat reconeguda amb la concessió del Premi Nobel de Química? Tal com es descriu al llarg d'aquest article, la resposta a aquesta pregunta rau en les bases sobre les quals es fonamenta la microscòpia de fluorescència amb superresolució; no es tracta de

nous principis físics ni de desenvolupaments tecnològics, sinó de l'ús intel·ligent de les propietats (foto)químiques dels compostos moleculars i, especialment, de les molècules fluorescents [2].

La microscòpia òptica per a l'estudi de la matèria a escala nanomètrica

La descoberta de tècniques que permeten l'estudi de la matèria a escala micro- i nanomètrica ha estat un dels motors que ha



FIGURA 1. D'esquerra a dreta, els tres científics guardonats amb el Premi Nobel de Química 2014: Eric Betzig (Ann Arbor, EUA, 1960), Stefan W. Hell (Arad, Romania, 1962) i William E. Moerner (Pleasanton, EUA, 1953) [1]. Font: Nobel Media AB 2014 (fotografia de Niklas Elmehed).

esperonat el progrés de la física, la química i la biologia al llarg del segle *xx*, a més de contribuir al naixement de la nanociència i la nanotecnologia. Entre aquestes tècniques es troben les microscòpies d'efecte túnel (STM) i de forces atòmiques (AFM) desenvolupades per IBM durant la dècada del 1980 [3, 4], les quals han fet possible el somni de visualitzar àtoms i molècules individuals. En molts casos, però, seria desitjable poder assolir aquest límit mitjançant microscòpia òptica, ja que això n'hauria de simplificar la complexitat experimental i permetria estudiar la matèria en condicions ambientals, de forma remota i no invasiva, així com obtenir informació del seu interior i no només de la superfície. I totes aquestes condicions són especialment rellevants quan es volen aplicar les tècniques microscòpiques a l'estudi de sistemes biològics.

Els orígens de la microscòpia òptica es remunten al segle *xvii*, en què es van construir els primers microscopis [5]. Tot i que avui se'n fabriquen de molt més complexos, els seus elements principals continuen sent els mateixos: una font de llum i un conjunt de lents amb què il·luminar la mostra i, posteriorment, recollir i enviar el senyal generat a un detector. D'aquesta manera és possible obtenir imatges de gairebé qualsevol material de forma rutinària a escala microscòpica [5]. Ara bé, assolir l'objectiu de visualitzar àtoms i molècules requereix augmen-

tar alguns ordres de magnitud la sensibilitat i la resolució dels microscopis òptics tradicionals fins a convertir-los en veritables «nanoscopis òptics». Són els estudis de Betzig, Hell i Moerner els que han posat les bases per fer possible aquesta fita.

L'espectroscòpia de fluorescència de molècules individuals

Quin és l'objecte més petit que pot ser detectat en microscòpia òptica? Aquesta és la primera qüestió que cal respondre per tal d'avaluar la capacitat d'aquesta tècnica per assolir la detecció d'àtoms i molècules. La sensibilitat d'un microscopi òptic depèn en gran mesura del tipus de senyal enregistrat i, normalment, les majors sensibilitats s'aconsegueixen mitjançant la detecció dels fotons emesos per una mostra (és a dir, microscòpia de fluorescència) [6]. Per aquest motiu és sorprenent que, en el primer estudi en què es va plantejar i demostrar la detecció òptica d'una única molècula, s'arribés a aquest límit mitjançant mesures d'absorbància [7]. Aquest treball va ser desenvolupat al laboratori de Moerner a l'Almaden Research Center d'IBM (EUA), on es va aconseguir mesurar el senyal d'absorbància de molècules individuals de pentacè dins de cristalls de *p*-terfenil (figura 2*a*). Tot i que

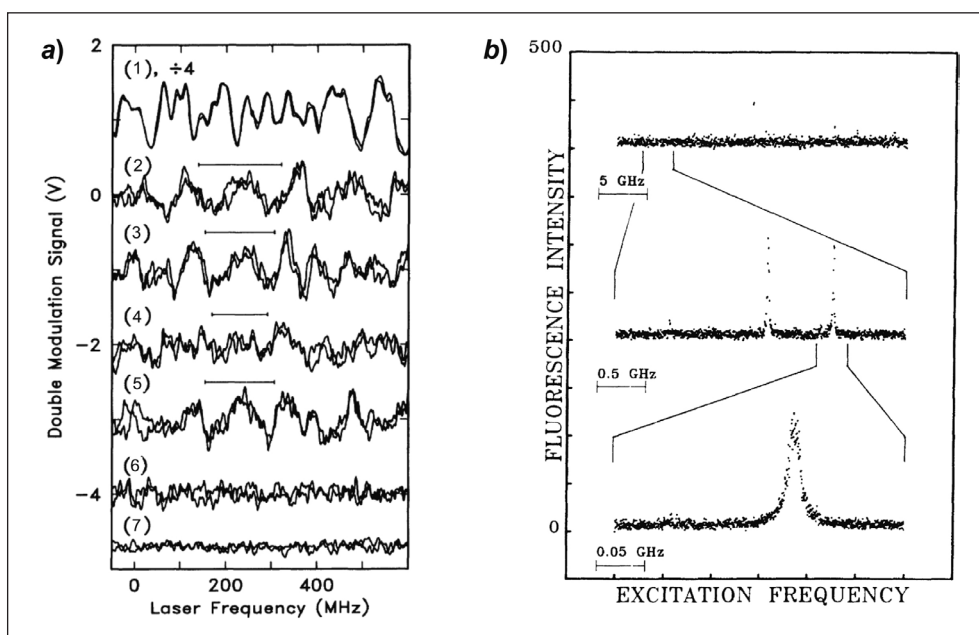


FIGURA 2. *a*) Exemples de senyals d'absorbància obtinguts a 1,6 K per a cristalls de *p*-terfenil dopats amb molècules de pentacè mitjançant mesures de doble modulació: (1) estructura fina de l'espectre d'absorbància del cristall a $\lambda_{exc} = 592,312$ nm; (2-5) senyals d'absorbància de molècules individuals a diferents freqüències de modulació; (6) senyal d'absorbància amb radiació no ressonant amb la transició molecular; (7) senyal sense irradiació. Reproduït de [7] amb permís. *b*) Pics d'excitació de fluorescència de molècules individuals de pentacè en cristalls de *p*-terfenil a 1,8 K. Reproduït de [8] amb permís.

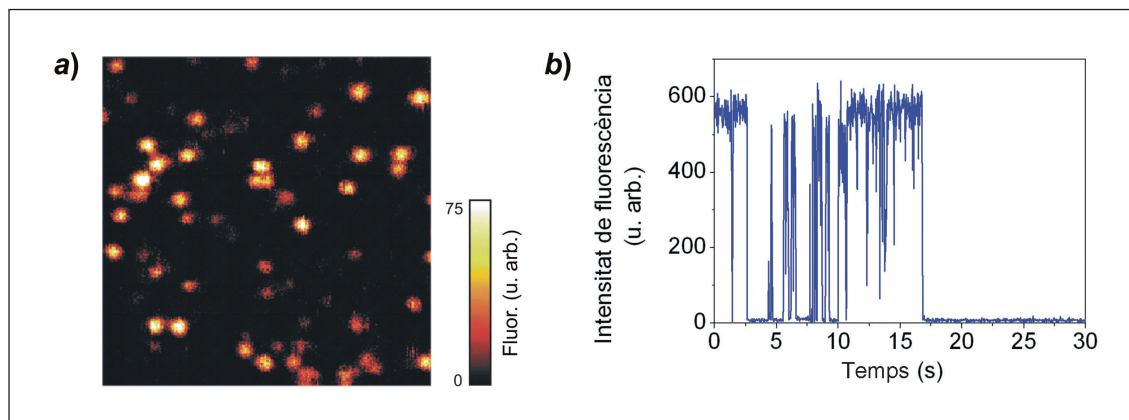


FIGURA 3. a) Imatge de fluorescència de molècules individuals de *N,N'*-bis(*sec*-butil)terriren-3,4:11,12-tetracarboxidiimida dispersades en una capa prima de polimetilmetacrilat ($\lambda_{exc} = 632,8 \text{ nm}$; $10 \times 10 \mu\text{m}$). b) Evolució de la intensitat emesa per una d'aquestes molècules en ser excitada de manera contínua.

l'obtenció d'aquest resultat va requerir treballar a temperatures d'heli líquid (1,6 K) i l'ús de tècniques de detecció de doble modulació, el treball de Moerner va suposar una revolució en el camp de la microscòpia i de l'espectroscòpia, ja que va fer plantejar-se per primer cop a la comunitat científica la possibilitat d'estudiar el comportament òptic de la matèria amb una precisió molecular. De fet, només un any més tard, Michel Orrit va demostrar al seu laboratori del Centre National de la Recherche Scientifique, a Bordeus (França), que l'ús de tècniques de fluorescència també permetia detectar el senyal òptic de molècules individuals de pentacè dins de cristalls de *p*-terfenil a baixes temperatures i, a més, fer-ho de manera directa i amb uns resultats molt millors (figura 2b) [8].

Aquests treballs inicials de Moerner i Orrit van estimular la realització d'un gran nombre d'estudis posteriors destinats a enregistrar i analitzar les propietats òptiques de molècules individuals mitjançant microscòpia de fluorescència, la qual cosa va donar lloc a un nou camp de recerca que s'ha denominat *espectroscòpia de fluorescència de molècules individuals (single-molecule fluorescence spectroscopy)*. Aquest camp ha evolucionat enormement durant els darrers vint-i-cinc anys i, avui dia, permet enregistrar de manera senzilla i rutinària un gran nombre de paràmetres experimentals associats a l'emissió d'una sola molècula en fase condensada i en condicions ambientals [9, 10]. A tall d'exemple, la figura 3a mostra una imatge típica de fluorescència de molècules individuals, corresponent a fluoròfors de terriendiimida immobilitzats en una capa prima polimèrica. Cadascun dels patrons brillants i circulars de la imatge correspon a l'emissió d'una sola d'aquestes molècules, la qual cosa es pot demostrar analitzant l'evolució

temporal de la seva emissió (figura 3b). Així, en il·luminar contínuament la zona de la mostra on es troba una d'aquestes molècules, el senyal de fluorescència emès oscil·la intermitentment entre un valor constant (~ 600) i el soroll de fons, la qual cosa és deguda a les transicions reversibles (per exemple, a $t = 2,5 \text{ s}$) i irreversible (a $t = 17 \text{ s}$) entre el seu estat fluorescent i altres estats no radiatius (com ara estats de triplet o el producte no fluorescent resultant de la seva fotodegradació). Aquesta intermitència en l'emissió fa palesa la naturalesa quàntica de l'espècie sota observació i, per tant, indica que una sola molècula està sent detectada.

L'espectroscòpia de fluorescència de molècules individuals és, avui dia, una tècnica de microscòpia molt ben establerta i que pràcticament es pot aplicar a l'estudi de qualsevol mostra [10]. Això és degut al fet que: i) no requereix un equipament gaire més sofisticat que un microscopi de fluorescència tradicional equipat amb bons elements òptics, fonts d'irradiació làser i detectors d'alta sensibilitat; ii) tot i que només permet mesurar senyals per a molècules amb bones propietats fluorescents (és a dir, elevats coeficients d'absortivitat i rendiments quàntics de fluorescència), el desenvolupament d'un gran ventall de fluoròfors i de tècniques de marcatge fa possible investigar gairebé qualsevol sistema d'interès a escala molecular, independentment de les seves propietats òptiques (per exemple, acoblant un fluoròfor adient a una biomolècula no fluorescent). Ara bé, el fet de poder detectar l'emissió d'una sola molècula és només el primer pas cap a l'aplicació de la microscòpia òptica a l'estudi de la matèria a escala nanomètrica. Aquest objectiu requereix no només augmentar-ne la sensibilitat, sinó també la resolució espacial.

La resolució espacial de la microscòpia òptica

A la figura 4a-4c es mostren les imatges de fluorescència de molècules individuals obtingudes per a fluoròfors de terrilendiimida dispersats en una capa prima polimèrica a tres valors de concentració diferents: $\sim 0,5$, ~ 5 i ~ 50 molècules/ μm^2 . Tot i que en els tres casos es mesuren senyals fluorescents, només en la imatge enregistrada per a la concentració més baixa s'obtenen patrons aïllats per a cadascuna de les molècules de terrilendiimida a la mostra. En canvi, a mesura que s'augmenta la concentració, aquests patrons comencen a sobreposar-se i, finalment, és impossible distingir els uns dels altres. Per tant, per a densitats massa elevades de fluoròfors, és impossible resoldre espacialment els senyals corresponents a molècules diferents, malgrat que es disposi de la sensibilitat suficient per detectar aquests senyals. Dit d'una altra forma, aquestes molècules (o qualsevol altre tipus d'objecte en una mostra) només podran ser distingides en una imatge de microscòpia si la separació entre elles és més gran que la resolució espacial de la tècnica emprada.

Desafortunadament, la resolució espacial de la microscòpia òptica és limitada, tal com van establir a final del segle XIX diversos científics, com Ernst Abbe i Lord Rayleigh [11]. Pel

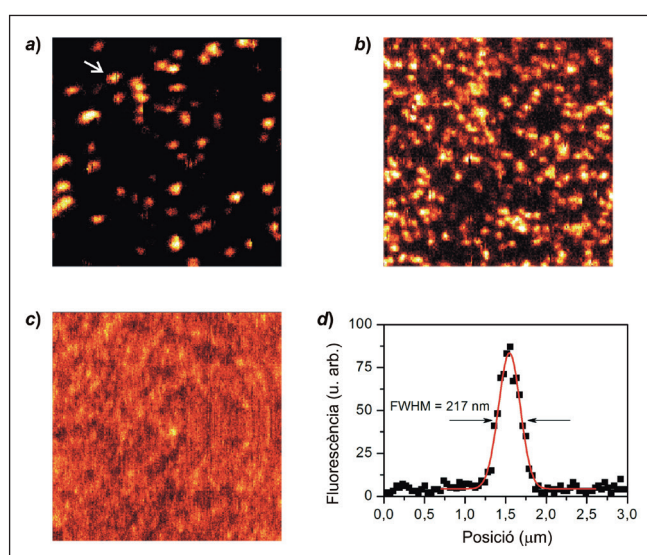


FIGURA 4. a-c) Imatges de fluorescència de molècules individuals de *N,N*-bis(sec-butil)terrylen-3,4:11,12-tetracarboxydiimida dispersades en capes primes de polimetilmetacrilat [$\lambda_{\text{exc}} = 632,8$ nm; $10 \times 10 \mu\text{m}$]; a) $\sim 0,5$ molècules/ μm^2 , b) ~ 5 molècules/ μm^2 i c) ~ 50 molècules/ μm^2 . d) Perfil d'intensitat de fluorescència per al senyal marcat amb una fletxa a a), que presenta una amplada de ~ 217 nm. Aquesta amplada és molt més gran que la mida de la molècula detectada ($\sim 1,5$ nm) i està controlada per la resolució lateral del microscopi.

que fa a la resolució en el pla de la mostra (resolució lateral, d_{lateral}), es pot estimar mitjançant el que es coneix com a *lleilímit de difracció d'Abbe* [11]:

$$d_{\text{lateral}} = \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha} \quad (1)$$

En aquesta equació, λ és la longitud d'ona d'excitació de la mostra i $n \sin \alpha$ és l'obertura numèrica (NA) de l'objectiu emprat, que depèn de l'índex de refracció del medi que hi ha entre la mostra i l'objectiu (n) i de l'angle d'obertura de l'objectiu (α). Aquests mateixos paràmetres també limiten la resolució en la direcció perpendicular al pla de la mostra (resolució axial, d_{axial}), tal com s'indica a l'equació següent [11]:

$$d_{\text{axial}} = \frac{2 \lambda}{(n \sin \alpha)^2} \quad (2)$$

Si assumim que treballem amb fluoròfors que s'exciten amb llum visible (~ 400 - 700 nm) i amb els millors objectius possibles (NA $\sim 1,4$), d'aquestes expressions podem deduir que la resolució espacial de la microscòpia òptica és de ~ 150 - 250 nm en el pla de la mostra (és a dir, $\sim \lambda/2$) i de ~ 400 - 700 nm en la direcció axial. Això implica que el senyal que s'obté per a un objecte de mida nanomètrica en microscòpia òptica (per exemple, una molècula) no reflecteix les seves dimensions reals, sinó la resolució del microscopi emprat (figura 4d), i que, per tant, dos d'aquests objectes no podran ser identificats de forma separada en una imatge, si la distància entre ells és inferior al centenar de nanòmetres, tal com es mostra a la figura 4a-4c.

És per aquest motiu que s'han dedicat molts esforços al desenvolupament de mètodes que millorin la resolució de la microscòpia òptica. Per exemple, mètodes com la microscòpia confocal [12], la microscòpia amb excitació multifotònica [13] o la microscòpia 4Pi [14] han permès optimitzar lleugerament la resolució òptica, especialment en la direcció axial. Malauradament, cap d'aquestes tècniques permet trencar veritablement el límit de difracció d'Abbe i, en conseqüència, obtenir informació d'una mostra amb una resolució sub- 100 nm. Per tant, superar aquest límit s'ha convertit en el somni de molts investigadors en el camp de la microscòpia.

El primer intent satisfactori d'assolir aquest objectiu es va aconseguir mitjançant la microscòpia òptica d'escombratge de camp proper (*near-field scanning optical microscopy*, NSOM)

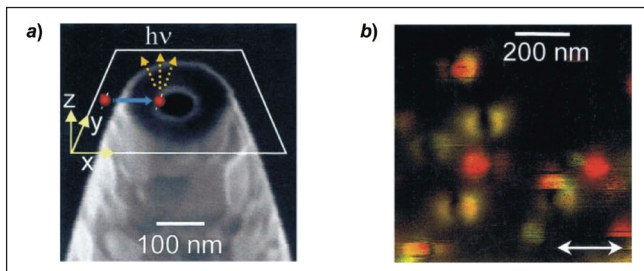


FIGURA 5. a) Imatge de la punta d'una fibra de NSOM, que té una obertura circular de mida nanomètrica (~ 70 nm) a través de la qual s'exciten les molècules amb el camp evanescent creat. b) Imatge de NSOM de molècules individuals d'un fluoròfor de carbocianina dispersades en una capa prima polimèrica ($\lambda_{exc} = 514$ nm). L'amplada dels senyals enregistrats és de ~ 85 nm, un valor molt inferior al que s'obtidria amb la microscòpia de fluorescència tradicional limitada per difracció (~ 190 nm). Reproduït de [17] amb permís.

[15, 16], una tècnica derivada d'aplicar els principis de les microscòpies de sonda de proximitat, com l'AFM, al camp de la microscòpia òptica. En un microscopi NSOM, la mostra no és excitada de forma remota mitjançant un objectiu, com a la microscòpia òptica tradicional (és a dir, amb el camp llunyà de la llum), sinó mitjançant el camp evanescent creat en una obertura de dimensions nanomètriques situada a l'extrem d'una fibra òptica acoblada a la font d'irradiació (és a dir, amb el camp proper de la llum; figura 5a) [17]. Aquest component de la radiació electromagnètica no està limitat per la llei de difracció d'Abbe, de manera que les dimensions laterals de la zona de la mostra que és excitada només depenen de la mida de l'obertura i de la distància de separació entre la fibra i la mostra. Així doncs, si tant la mida com la separació són prou petites, es poden obtenir imatges de la mostra amb una resolució lateral sub-100 nm, la qual cosa significa una millora considerable respecte de la microscòpia òptica tradicional de camp llunyà (figura 5b) [17]. Ara bé, això requereix que la fibra actuï com a sonda de proximitat i se situï de forma controlada a distàncies nanomètriques de la mostra. En conseqüència, es tracta d'una tècnica força complexa des del punt de vista experimental i que només subministra informació òptica de la superfície d'una mostra. Això ha fet que, malgrat que permet arribar a detectar senyals de molècules fluorescents individuals per sota del límit de difracció d'Abbe i en condicions ambientals [18], la microscòpia NSOM no s'hagi convertit en una tècnica d'ús general i hagi quedat restringida a l'estudi de superfícies, especialment a mesura que s'han anat desenvolupant altres tècniques que milloren la resolució espacial de la microscòpia òptica tradicional. Aquestes són les tècniques que constitueixen la microscòpia de fluorescència amb superresolució i que han estat reconegudes amb el Premi Nobel de Química 2014.

Les tècniques de microscòpia de fluorescència amb superresolució es poden dividir en dos grans grups: la microscòpia de fluorescència de molècules individuals amb superresolució i la microscòpia de fluorescència de grups de molècules amb superresolució, les quals es basen en les idees i els treballs pioners de Betzig i Hell, respectivament.

La microscòpia de fluorescència de molècules individuals amb superresolució

Des de l'inici, l'activitat científica de Betzig ha estat moguda per l'afany de millorar la resolució espacial de la microscòpia òptica. Així, el seu treball de tesi doctoral a la Universitat Cornell (EUA, 1983-1988) i la seva posterior activitat com a investigador als AT & T Bell Laboratories (EUA, 1988-1994) i a NSOM Enterprises (EUA, 1994-1996) es van centrar en el desenvolupament, l'optimització i l'aplicació de la tècnica NSOM [16, 18, 19]. Va ser cap al final d'aquest període que Betzig va publicar un article a la revista *Optics Letters* suggerint una metodologia alternativa per aconseguir superar el límit de difracció en microscòpia òptica sense la necessitat de recórrer a l'ús de sondes de proximitat [20]. Tot i que l'article no va tenir gaire ressò aleshores, les idees que s'hi recullen són les que han donat lloc a la microscòpia de fluorescència de molècules individuals amb superresolució.

La figura 6 mostra de forma esquemàtica el mètode proposat per Betzig per tal de millorar la resolució lateral de la microscòpia òptica de camp llunyà [20]. En una mostra amb molècules fluorescents separades a curta distància, la imatge de fluorescència limitada per difracció que s'obtidria en condicions normals és la que es presenta a la figura 6a, on es fa impossible distingir la posició d'unes respecte de les altres. Per tal de millorar aquesta situació, el que va suggerir Betzig és: i) aconseguir detectar la fluorescència d'aquestes molècules de forma individual i separada, i obtenir el senyal limitat per difracció de cadascuna d'elles de manera aïllada (figura 6b); ii) localitzar les coordenades de cadascuna de les molècules a la mostra mitjançant la posició central del senyal obtingut (figura 6c), tal com es pot fer prenent el màxim de la distribució espacial d'intensitats de cada senyal com la mostrada a la figura 4d; iii) reconstruir la imatge de fluorescència de la mostra substituint els senyals mesurats per a cada molècula per

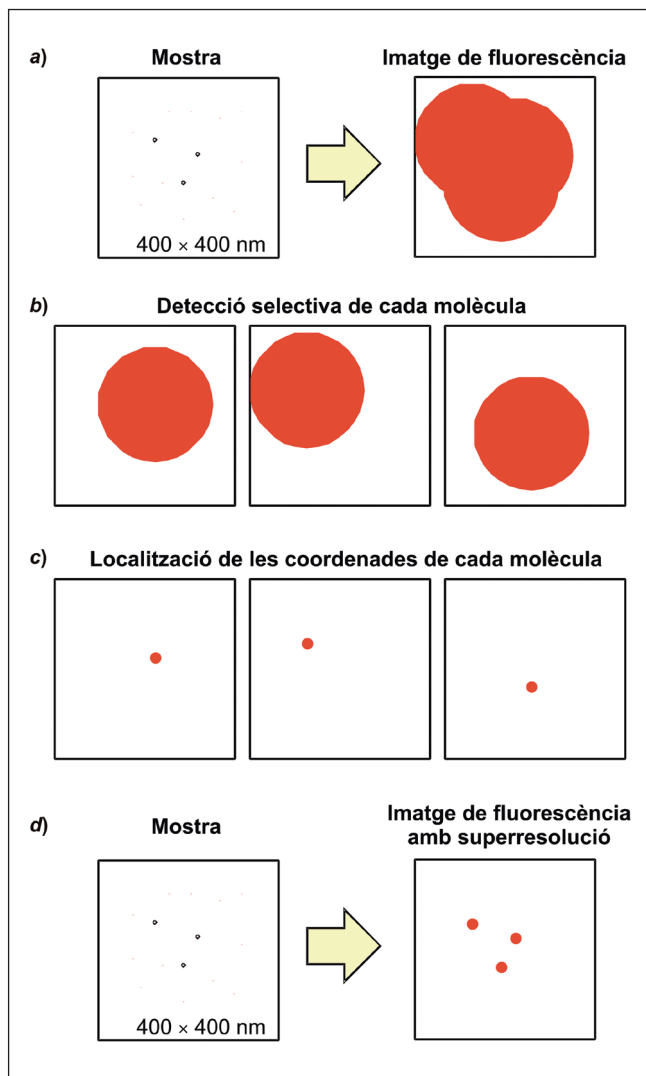


FIGURA 6. Representació esquemàtica de la metodologia proposada per Betzig per millorar la resolució lateral de la microscòpia òptica que ha donat lloc a la microscòpia de fluorescència de molècules individuals amb superresolució [20]. A tall d'exemple, es mostra l'aplicació d'aquesta metodologia per a l'estudi d'una àrea de 400×400 nm que conté tres molècules fluorescentes.

les coordenades centrals determinades (figura 6d). És evident que, d'aquesta manera, es pot obtenir una imatge amb una resolució lateral molt superior a la de la microscòpia òptica tradicional i que només està limitada per la precisió amb què es pot determinar la posició de cada molècula a partir del seu senyal limitat per difracció.

Ara bé, per assolir aquest objectiu mitjançant la metodologia proposada per Betzig, s'han de complir tres requisits:

a) Disposar d'una tècnica amb prou sensibilitat per detectar el senyal òptic d'una sola molècula. Tal com s'ha comentat,

la millor manera de complir aquesta condició és mitjançant l'espectroscòpia de fluorescència de molècules individuals desenvolupada a partir dels treballs de Moerner i Orrit.

b) Optimitzar el nombre de fotons detectats per a cadascuna de les molècules d'interès de la mostra, ja que aquest paràmetre és el que controlarà la precisió amb què es determinaran les seves coordenades espacials. Així, en absència de soroll, aquesta precisió (Δx) pot ser estimada mitjançant l'equació (3), on σ és la distribució estàndard del perfil d'intensitats de fluorescència del senyal detectat per a una molècula (és a dir, $\frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$) i N és el nombre de fotons enregistrats per aquest senyal [21]:

$$\Delta x = \frac{\sigma}{N^{1/2}} \quad (3)$$

Per tant, si augmentem la relació senyal-soroll de la mesura, Δx pot arribar a ser infinitament petit; a la pràctica, menor de 20 nm (és a dir, menor de $\sim \lambda/25$).

c) Aconseguir separar la detecció de cadascuna de les molècules de la mostra, de manera que es determinin de forma aïllada els seus senyals de fluorescència limitats per difracció fins i tot quan aquestes molècules es troben separades per distàncies nanomètriques. A l'article original, Betzig proposava dur a terme aquest objectiu utilitzant molècules amb diferents característiques òptiques (per exemple, amb diferents espectres d'absorbància o fluorescència). Evidentment, això implicaria que la mostra estigués constituïda per múltiples fluoròfors diferents, la qual cosa és poc versemblant per a casos reals d'interès. Aquest és, per tant, el pas limitant de la metodologia proposada per Betzig i el que va fer que no fos portada a la pràctica fins a l'any 2006.

L'any 1996, Betzig va abandonar la carrera científica i es va posar a treballar a l'empresa de maquinària de la seva família, on va romandre fins al 2002. Va ser llavors que va decidir reprendre la seva activitat acadèmica, per a la qual cosa necessitava desenvolupar una nova línia de recerca d'alt impacte que li facilités l'admissió en alguna institució universitària o centre de recerca. I, per fer-ho, va decidir centrar-se en les idees exposades en l'article a *Optics Letters* de l'any 1995. Durant aquells anys en què havia estat fora de l'àmbit científic, el camp de l'espectroscòpia de molècules individuals havia progressat enormement, i va ser en un dels articles publicats

en aquell període que es va inspirar per dur a terme la implementació de la microscòpia de fluorescència de molècules individuals amb superresolució. Es tractava d'un article de Moerner, que havia estudiat als laboratoris de la Universitat de Califòrnia a San Diego (EUA) l'emissió de la proteïna verda autofluorescent (*green fluorescent protein*, GFP) en l'àmbit de les molècules individuals [22]. De manera similar al que ja era conegut per a altres fluoròfors, Moerner va observar que aquestes proteïnes també mostraven intermitències reversibles en la seva emissió (figura 7a), però, a més, que aquest comportament era degut a la transició fotoinduïda i controlable entre diferents estats del cromòfor de la GFP. És a dir, Moerner va descobrir que es podia «encendre» o «apagar» l'emissió d'aquestes proteïnes a voluntat mitjançant la irradiació amb llum de longitud d'ona adient (figura 7b), una situació que posteriorment també s'ha observat per a altres proteïnes autofluorescents [23].

Sobre la base d'aquests resultats, Betzig va idear una manera diferent per assolir el requisit fonamental de la seva metodologia de superresolució: separar la detecció de cadascuna de les molècules de la mostra en el temps i fer-les «encendre» i «apagar» de manera aleatòria durant diferents instants de la mesura. És a dir, recollir un gran nombre d'imatges de la mateixa mostra al llarg del temps, de manera que, en un moment determinat, només una o unes poques d'aquestes molècules emetin fluorescència i, així, sigui possible la mesura dels seus senyals limitats per difracció de forma aïllada. Per demostrar la viabilitat d'aquesta proposta, i en col·laboració amb el seu antic company als AT & T Bell Laboratories, Harald F. Hess, Betzig va estudiar mostres de proteïnes autofluorescents que, com havia demostrat Moerner, podien ser fotoactivades i fotodesactivades reversiblement. És per aquest motiu que van anomenar la tècnica *microscòpia de localització fotoactivada* (*photoactivated localization microscopy*, PALM) [24] i, com que en aquell moment encara no treballaven a cap institució científica, van construir el primer microscopi PALM al menjador de la casa de Hess [25]. Gràcies a aquests esforços i als resultats que van obtenir, tant Betzig com Hess van ser contractats pel Howard Hughes Medical Institute, on encara treballen.

La figura 8a resumeix els fonaments de la tècnica PALM, que es basa en el marcatge de les molècules d'interès amb proteïnes autofluorescents [24]. Si combinem de manera adient diferents fonts d'irradiació per fotoactivar, fotodesactivar i de-

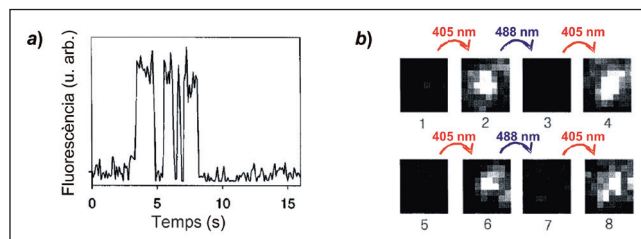


FIGURA 7. a) Evolució de la intensitat emesa per una molècula de GFP en ser il·luminada contínuament a $\lambda_{exc} = 488$ nm, on s'observa la formació seqüencial d'estats fluorescents i no fluorescents. b) Imatge del senyal fluorescent d'una molècula de GFP en ser sotmesa a cicles d'irradiació a $\lambda_{exc} = 405$ nm (la qual cosa fomenta el pas de l'estat no fluorescent al fluorescent de la proteïna) i a $\lambda_{exc} = 488$ nm (la qual cosa induïx el procés invers). Les vuit imatges van ser adquirides amb $\lambda_{exc} = 488$ nm. Reproduït de [22] amb permís.

tectar aquestes proteïnes, només algunes són fluorescents en cada instant de la mesura. Per tant, si enregistrem un gran nombre d'imatges successives per a la mateixa mostra, aconseguim determinar de forma separada el senyal de fluorescència i les coordenades espacials de cadascuna. Finalment, totes aquestes coordenades s'apleguen per construir la corresponent imatge de fluorescència amb superresolució. L'enorme millora en la resolució lateral resultant queda demostrada a la figura 8b [24], en què es comparen les imatges de microscòpia de fluorescència convencional i PALM per a les proteïnes de membrana d'una cèl·lula marcades amb proteïnes autofluorescents. En particular, la resolució lateral aconseguida per a la imatge PALM és de ~ 10 - 20 nm, és a dir, ~ 10 - 20 vegades superior respecte a la resolució lateral de la microscòpia de fluorescència convencional limitada per difracció.

La descoberta de la tècnica PALM per part de Betzig i Hess va donar el tret de sortida al desenvolupament de moltes altres microscòpies de fluorescència de molècules individuals amb superresolució basades en els mateixos principis: l'ús de molècules fluorescents que aleatòriament s'«encenen» i s'«apaguen» en una mostra per permetre la seva detecció i localització individual amb una precisió menor de 20 nm mitjançant l'enregistrament d'imatges successives [26]. Per aquest motiu, també se les anomena *microscòpies de localització estocàstica*. Entre les més importants d'aquestes tècniques, es troben la microscòpia òptica estocàstica de reconstrucció (*stochastic optical reconstruction microscopy*, STORM) [27], la microscòpia de localització per fotoactivació de fluorescència (*fluorescence photoactivation localization microscopy*, FPALM) [28] o la microscòpia directa STORM (*direct STORM*, dSTORM) [29]. És important remarcar que el que fa possible la superresolució en aquest tipus de microscòpies no és la instrumentació ù-

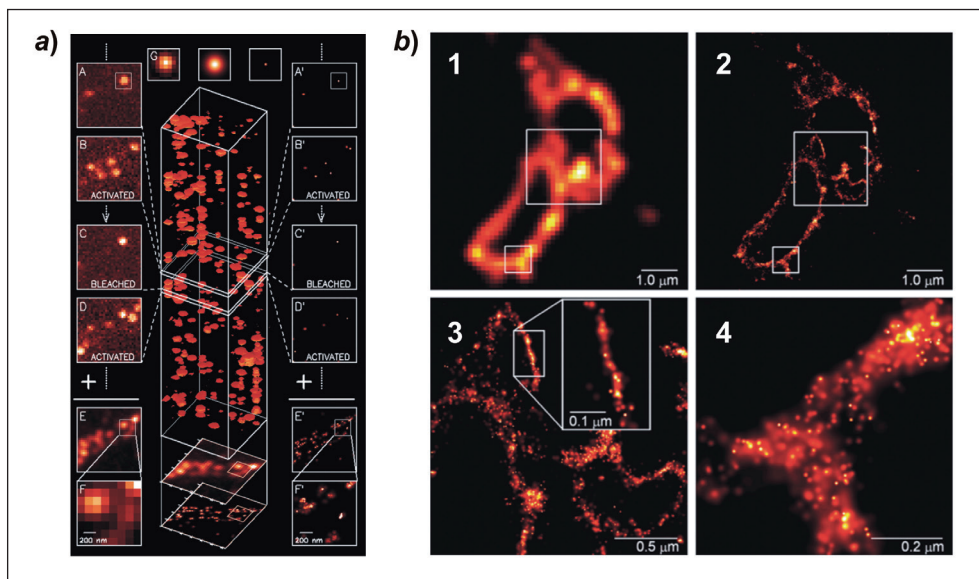


FIGURA 8. a) Representació dels fonaments de la tècnica PALM per a la detecció amb superresolució de proteïnes autofluorescents fotoactivables. A la part central, de dalt a baix, s'observen els senyals limitats per difracció detectats per a cadascuna de les molècules fluorescents de la mostra en imatges successives utilitzant $\lambda = 405 \text{ nm}$ per fotoactivar els fluoròfors i $\lambda = 561 \text{ nm}$ per detectar-los i fotodesactivar-los. Algunes d'aquestes imatges es mostren a la part esquerra de la figura, mentre que a la part dreta es presenten les imatges resultants de substituir els senyals de fluorescència de les molècules detectades per les seves coordenades espacials. b) Imatges de fluorescència de les proteïnes de membrana CD63 d'una cèl·lula COS-7 marcades amb proteïnes autofluorescents de tipus Kaede. A 1 i 2 es comparen les imatges de microscòpia de fluorescència convencional i PALM obtingudes per a la cèl·lula, respectivament. A 3 i 4 es mostren imatges PALM de regions més petites de la mostra. L'obtenció d'aquestes imatges PALM per enregistrament i tractament de milers d'imatges de fluorescència consecutives va requerir un temps de mesura d'entre 2 i 12 hores. Reproduït de [24] amb permís.

litzada, sinó la capacitat d'activar i desactivar l'emissió de molècules fluorescents, és a dir, el seu comportament fotoquímic. Per tant, els fonaments d'aquestes tècniques es troben en el desenvolupament de sistemes (bio)químics que presentin les propietats adients, com ara proteïnes autofluorescents fotoactivables (PALM, FPALM), fluoròfors orgànics fotoreduïbles en presència de tiols (STORM, dSTORM) o interruptors moleculars fluorescents fotoinduits, entre d'altres [26, 30].

La microscòpia de fluorescència de grups de molècules amb superresolució

De manera similar a Betzig, la trajectòria científica de Hell també ha estat focalitzada des de l'inici a explorar els límits de la microscòpia òptica. Així, els estudis de doctorat a la Universitat de Heidelberg (Alemanya, 1987-1990) i l'activitat postdoctoral a l'European Molecular Biology Laboratory, a Heidelberg (Alemanya, 1991-1993), es van centrar en el

desenvolupament i l'aplicació de noves tècniques de microscòpia que milloressin la resolució espacial en la direcció axial, com la microscòpia confocal [31], la microscòpia 4Pi [14] o la microscòpia 4Pi amb excitació multifotònica [32]. De fet, d'aquests dos darrers tipus de microscòpies, en va ser un dels inventors, i amb elles es poden assolir valors de d_{axial} al voltant dels 100 nm. Però va ser l'any 1994, quan treballava a la Universitat de Turku (Finlàndia, 1993-1996), que Hell va publicar, conjuntament amb Jan Wichmann, un article a la revista *Optics Letters* on proposava el desenvolupament d'una nova tècnica que permetés trencar el límit de difracció d'Abbe i reduir enormement la resolució lateral de la microscòpia òptica de camp llunyà [33]. De forma anàloga a l'article de Betzig del 1995, es va tractar únicament d'una proposta teòrica, que més tard Hell seria el primer a portar a la pràctica i que constituïria els fonaments de la microscòpia de fluorescència de grups de molècules amb superresolució.

La figura 9 mostra de manera gràfica la metodologia proposada per Hell i Wichmann, que presenta dos aspectes en comú amb la que un any més tard descriuria Betzig: i) es basa en l'ús de la microscòpia de fluorescència; ii) preveu minimitzar

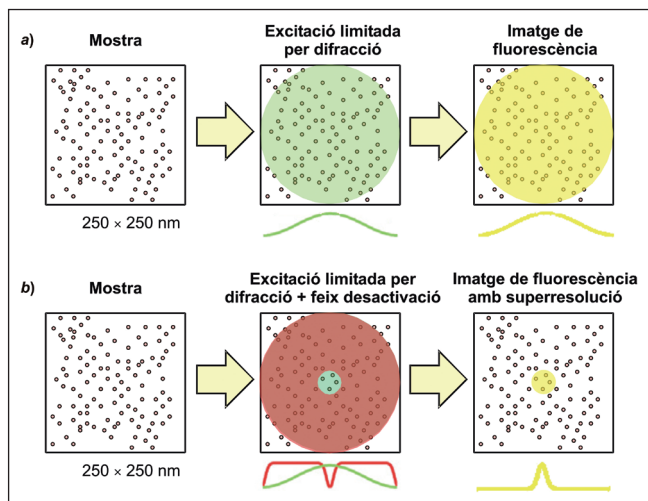


FIGURA 9. Representació de la metodologia proposada per Hell i Wichmann per trencar el límit d'Abbe en microscòpia de fluorescència [33]. a) Imatge de fluorescència convencional obtinguda per a una mostra amb una elevada concentració de fluoròfors a causa de les dimensions limitades per difracció de la regió il·luminada amb un objectiu ($d_{\text{lateral}} \sim \lambda/2$). b) Imatge de fluorescència amb superresolució resultant d'irradiar la mostra amb dos feixos simultanis: un de convencional amb una distribució d'intensitats gaussiana per excitar les molècules (feix verd) i un altre amb una secció transversal amb forma d'anell que desactiva l'emissió de les molècules irradiades (feix vermell). En conseqüència, es detectarà selectivament l'emissió d'aquelles molècules que es trobin a la zona central del volum irradiat, on no hi ha superposició entre els dos feixos i que tindrà unes dimensions molt inferiors a $\lambda/2$.

d_{lateral} tot aconseguint «apagar» part de les molècules que són excitades en el volum focal del microscopi. La diferència, però, rau en la manera com s'aconsegueix aquesta desactivació de la fluorescència i, eventualment, la millora en resolució espacial. Tal com ja s'ha comentat, en una mostra amb una elevada concentració de fluoròfors ($>> 1$ molècula/ μm^2), l'ús d'un objectiu per focalitzar la llum d'excitació dona lloc a un volum focal limitat per difracció (és a dir, amb un diàmetre de la secció transversal de $\sim \lambda/2$). Per tant, un elevat nombre de molècules seran excitades i detectades a la vegada, la qual cosa evitarà que la resolució lateral de la imatge sigui millor que uns pocs centenars de nanòmetres (figura 9a). Per solucionar aquest problema, Hell i Wichmann van proposar irradiar la mostra amb dos feixos de llum simultanis, les dimensions dels quals, un cop focalitzats, estarien igualment limitades per difracció. La secció transversal del primer d'aquests feixos tindria la forma circular habitual i serviria per excitar i detectar les molècules fluorescents d'interès (feix verd, figura 9b). El segon, en canvi, presentaria un node d'intensitats a la zona central (per exemple, amb una secció transversal amb forma d'anell) i s'utilitzaria per desactivar la fluorescència de les molècules irradiades (feix vermell, figura 9b). Per tant, en solapar tots dos feixos sobre la mostra, l'emissió només hauria

de provenir de la zona central de la regió focal, on les molècules no s'han «apagat» (figura 9b). Això resulta en una millora immediata de la resolució lateral, que només està limitada per dos factors interrelacionats: i) com de petita es pot fer aquesta zona central en què el segon feix no se superposa amb el primer; ii) com d'eficient és la desactivació de l'emissió de les molècules irradiades amb el segon feix.

Tal com es pot observar a la figura 9, la tècnica descrita per Hell i Wichmann no requereix la localització dels senyals limitats per difracció de molècules individuals per separat, i els senyals finals que s'obtenen amb $d_{\text{lateral}} \ll \lambda/2$ poden provenir de més d'un fluoròfor a la vegada. D'aquí ve que se l'anomeni *microscòpia de fluorescència de grups de molècules amb superresolució*, tot i que també es pugui aplicar a la detecció de molècules individuals. Pel mateix motiu, la imatge amb superresolució final obtinguda no és una reconstrucció realitzada a partir de les dades de milers d'imatges obtingudes prèviament, com en el cas de la microscòpia PALM i similars, sinó que s'enregistra directament en escombrar els dos feixos d'irradiació sobre la mostra d'interès. Dit d'una altra manera, la mesura s'ha de poder dur a terme en un temps molt més reduït. Ara bé, per poder-la aplicar, la metodologia de Hell i Wichmann ha d'aconseguir complir dos requisits fonamentals:

a) Poder modular la secció transversal del feix utilitzat per desactivar l'emissió de les molècules irradiades, de manera que creï un node d'intensitats a la zona central. Avui dia, això és possible utilitzant elements òptics relativament simples.

b) Dissenyar un mecanisme fotoquímic que permeti «apagar» de forma eficient les molècules irradiades per aquest feix, la qual cosa constitueix el punt clau de la microscòpia de fluorescència de grups de molècules amb superresolució. A l'article original del 1994, Hell i Wichmann van proposar assolir aquest objectiu mitjançant la desactivació de l'estat excitat de les molècules per emissió estimulada (*stimulated emission depletion*, STED), per la qual cosa van denominar la seva tècnica *microscòpia STED*.

La figura 10a representa el funcionament del procés STED per a una molècula orgànica fluorescent amb estats electrònics fonamental i excitat de tipus singlet (S_0 i S_1). En microscòpia de fluorescència, normalment es generen estats interns excitats de S_1 per irradiació, que a continuació es relaxen vibracionalment i rotacional fins a l'estat intern fonamental de S_1 .

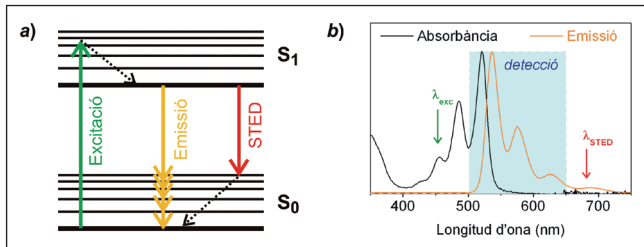


FIGURA 10. a) Esquema dels estats implicats en l'excitació, l'emissió espontània i la desactivació per STED d'un fluoròfor orgànic. b) Espectres d'absorbància i emissió d'un compost fluorescent orgànic en solució. Les longituds d'ona d'excitació i desactivació per STED i el rang espectral de detecció que s'utilitzarien en un experiment típic de microscòpia es mostren a la figura.

Des d'aquest estat, es produeix la transició radiativa fins a \$S_0\$ i l'emissió espontània de fotons d'energia inferior als d'excitació que són detectats. El procés STED consisteix a irradiar la molècula durant el temps de vida d'aquest estat radiatiu (~ 1-10 ns) amb un segon feix de llum (feix STED), l'energia del qual ha de coincidir amb la transició cap a un estat intern molt excitat de \$S_0\$, és a dir, sintonitzat a la banda de baixes energies del seu espectre d'emissió. Això promourà el decaïment de \$S_1\$ mitjançant l'emissió estimulada de fotons d'igual energia que els del feix STED, i competirà d'aquesta manera amb el procés de decaïment espontani. Si la intensitat d'aquest feix és prou gran, el mecanisme de relaxació per STED estarà molt més afavorit i aconseguirem suprimir el procés d'emissió espontània. Per tant, si davant del detector del microscopi colloquem un filtre que només transmeti els fotons emesos per \$S_1\$ de més energia que els del procés d'emissió estimulada (figura 10b), el resultat final serà que no hi arribarà cap senyal i, en conseqüència, semblarà que la molècula irradiada pel feix STED ha estat «apagada».

Tal com s'ha descrit, el mecanisme STED pot ser aplicat de manera universal per a qualsevol fluoròfor; la seva eficiència només depèn del fet d'aconseguir irradiar la mostra amb intensitats d'excitació prou grans per convertir el procés d'emissió estimulada en l'única via de desactivació de \$S_1\$. És a dir, la regió de la mostra des de la qual es detectarà fluorescència no estarà limitada per difracció, sinó per la distribució d'intensitats del feix STED al volum focal. De fet, això permet reescriure la llei límit de difracció d'Abbe i proposar una nova expressió per avaluar la resolució lateral de la microscòpia STED [34]:

$$d_{\text{lateral}} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\text{STED}}/I_{\text{sat}}}} \quad (4)$$

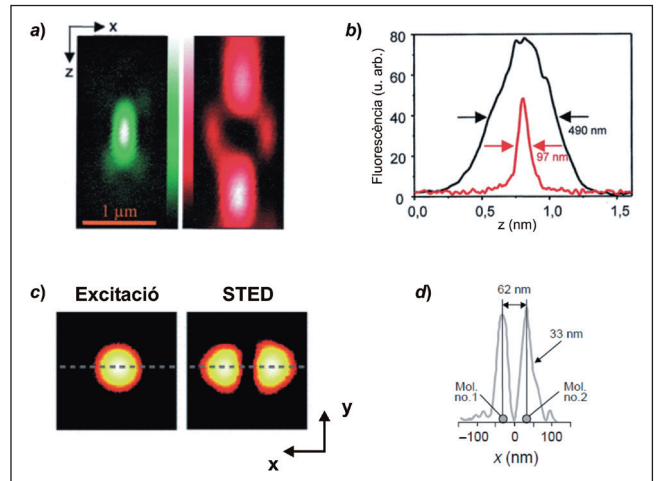


FIGURA 11. a) Distribució d'intensitats del feix d'excitació (verd) i del feix STED (vermell) al pla focal xz utilitzades per mesurar les imatges de microscòpia d'una mostra concentrada de partícules fluorescents [35]. b) Distribució d'intensitats de fluorescència en la direcció axial determinada per aquesta mostra en absència (en negre, imatge de microscòpia convencional) i presència del feix STED (en vermell, imatge de microscòpia STED). Reproduït de [35] amb permís. c) Funcions de distribució d'intensitats del feix d'excitació i del feix STED al pla focal xy utilitzades per mesurar les imatges de microscòpia d'una mostra de molècules fluorescents [36]. d) Distribució d'intensitats de fluorescència en la direcció x del pla focal determinada per a dues molècules d'aquesta mostra que es troben separades únicament per 62 nm. Reproduït de [36] amb permís.

En aquesta expressió, \$I_{\text{STED}}\$ és la màxima intensitat del feix STED i \$I_{\text{sat}}\$ és la intensitat requerida perquè la probabilitat del procés STED sigui la mateixa que la del procés d'emissió estimulada. Per tant, si \$I_{\text{STED}}/I_{\text{sat}} \rightarrow \infty\$, \$d_{\text{lateral}}\$ s'hauria de poder disminuir infinitament. A l'article del 1994, Hell i Wichmann predeien que, a la pràctica, \$d_{\text{lateral}}\$ es podria reduir fins als 35 nm, amb aquesta tècnica [33]. En realitat, el mateix Hell ha demostrat valors de resolució lateral menors que aquest límit i propers als 10 nm utilitzant la microscòpia STED [34].

La primera demostració experimental de microscòpia STED la va realitzar Hell l'any 2000 al seu laboratori del Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, a Göttingen (Alemanya). A causa del seu bagatge en el desenvolupament de la microscòpia 4Pi, el primer estudi amb la tècnica STED es va centrar a demostrar la millora de la resolució axial (i, en menor mesura, lateral) de la microscòpia òptica [35]. D'aquesta manera, es va aconseguir una millora de fins a cinc cops en \$d_{\text{axial}}\$ (figura 11a). Tres anys més tard, variant la distribució d'intensitats del feix STED, Hell va assolir per primer cop resolucions laterals sub-50 nm amb la tècnica STED (figura 11b) [36], la qual cosa va fer, per tant, realitat les seves prediccions del 1994 i va demostrar definitivament que era possible trencar el límit de difracció d'Abbe de la microscòpia òptica de camp llunyà.

Des de llavors, el mateix Hell ha encapçalat el desenvolupament i l'aplicació de la microscòpia de fluorescència de grups de molècules amb superresolució, que ha abastat principalment tres fronts:

a) L'exploració dels límits de la tècnica no només en l'àmbit de la resolució espacial, sinó també de la velocitat d'adquisició d'imatges i de la sensibilitat [37].

b) La demostració de mecanismes de desactivació fotoinduits de molècules fluorescents diferents del procés STED que puguin aplicar-se a aquest tipus de microscòpia i que requereixin la irradiació amb feixos de menor intensitat, com ara la població d'estats de triplet de llarga durada (*ground state depletion*, GSD) o la conversió a isòmers no fluorescents [34]. Tots aquests mecanismes i les seves corresponents microscòpies de fluorescència de grups de molècules amb superresolució s'han generalitzat sota l'acrònim RESOLFT (*reversible saturable optically linear fluorescence transition*), i totes es basen en la capacitat de fotoconvertir reversiblement els fluoròfors entre estats fluorescents i no fluorescents, és a dir, en les especials propietats fotofísiques i fotoquímiques de les molècules fluorescents [34].

c) La transformació en una eina d'ús general per a l'estudi de la matèria a escala nanomètrica i, en especial, de sistemes biològics [37].

Conclusions

El treball pioner de William E. Moerner en el camp de la detecció de molècules individuals i les idees i els experiments d'Eric Betzig i Stefan W. Hell han permès desenvolupar durant els darrers vint anys la microscòpia de fluorescència amb superresolució, una descoberta per la qual han estat guardonats amb el Premi Nobel de Química 2014. Es tracta d'un conjunt de tècniques que permeten estendre la resolució espacial de la microscòpia òptica fins a l'escala nanomètrica i, per tant, posar-la al nivell de la d'altres tipus de nanoscòpies, com ara la microscòpia de sonda de proximitat i l'electrònica, tal com es mostra a la figura 12 per a dos exemples recents. A causa de la combinació d'aquesta resolució espacial sense precedents i els avantatges inherents de les tècniques òptiques per abordar l'estudi dels sistemes vius, s'espera que la microscòpia de fluorescència amb superresolució revolucioni

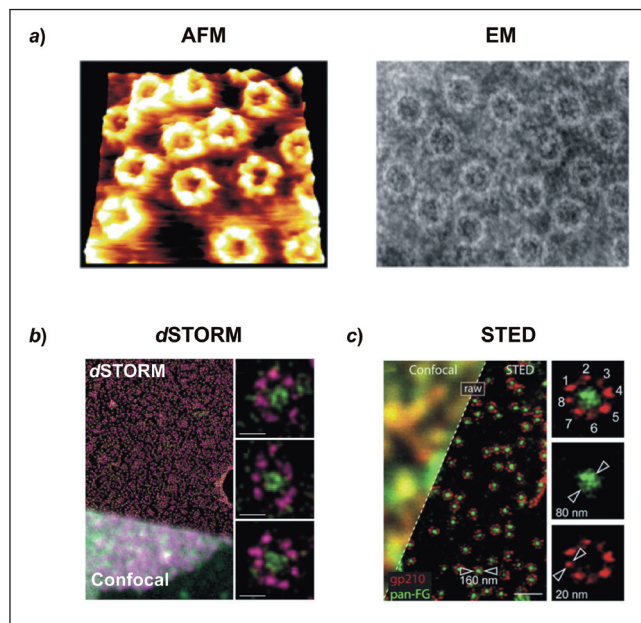


FIGURA 12. a) Imatges de microscòpia de forces atòmiques [38] i de microscòpia electrònica (EM) [39] dels complexos de porus nuclears de *Xenopus*. Aquests complexos es troben ancorats a la membrana nuclear mitjançant vuit homodímers de la proteïna gp210, que s'organitzen de forma cilíndrica i amb una simetria octogonal i delimiten el perímetre exterior del porus. Reproduït de [38] i [39] amb permís. b–c) Imatges de microscòpia dSTORM [39] (b) i STED [40] (c) d'aquests mateixos complexos, l'interior i els dímers de gp210 dels quals han estat funcionalitzats amb fluoròfors que emeten en diferents zones espectrals. A diferència de la microscòpia de fluorescència confocal convencional, les microscòpies de fluorescència amb superresolució utilitzades permeten identificar complexos de porus individuals i visualitzar-ne l'estructura interna amb una resolució gairebé molecular (~ 15–20 nm). Reproduït de [39] i [40] amb permís.

la biologia i la medicina durant els propers anys. I això serà possible gràcies a les especials propietats fotoquímiques de les molècules fluorescents, que són el fonament en què es basa la microscòpia de fluorescència amb superresolució per trencar els límits físics establerts a final del segle XIX per a la resolució espacial de la microscòpia òptica.

Agraïments

Algunes de les imatges que es mostren en aquest article han estat enregistrades al nostre grup de recerca pels doctors Rafael Sánchez i Roser Gras, la recerca dels quals ha estat finançada pel Ministeri d'Economia i Competitivitat (projectes CTQ2006-01040, CTQ2009-07469 i CTQ2012-30853), per la Unió Europea (projecte MERG-CT-2004-513601) i per la Universitat Autònoma de Barcelona. També voldria mostrar el meu agraïment als doctors Niek F. van Hulst i Maria F. García-Parajó, que van dirigir la meua estada postdoctoral a la

Universitat de Twente (Països Baixos) en el camp de l'espectroscòpia de fluorescència de molècules individuals durant el període 2001-2004. Va ser llavors que vaig entrar en contacte amb els primers estudis en l'àrea de la microscòpia de fluorescència amb superresolució i vaig poder conèixer William E. Moerner i Stefan W. Hell, dos dels guardonats amb el Premi Nobel de Química 2014.

Referències i altres fonts

- [1] *Nobelprize.org. The Official Web Site of the Nobel Prize: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/* [Consulta: 28 agost 2015].
- [2] STELZER, E. H. K. «Better imaging through chemistry». *Cell*, núm. 159 (2014), p. 1243-1246.
- [3] BINNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, C.; WEIBEL, E. «Surface studies by scanning tunneling microscopy». *Phys. Rev. Lett.*, núm. 49 (1982), p. 57-61.
- [4] BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. «Atomic force microscopy». *Phys. Rev. Lett.*, núm. 56 (1986), p. 930-934.
- [5] BRADBURY, S.; BRACEGIRDLE, B. *Introduction to light microscopy*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
- [6] KUBITSCHKE, U. (ed.). *Fluorescence microscopy: From principles to biological applications*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2013.
- [7] MOERNER, W. E.; KADOR, L. «Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid». *Phys. Rev. Lett.*, núm. 62 (1989), p. 2535-2538.
- [8] ORRIT, M.; BERNARD, J. «Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in *p*-terphenyl crystal». *Phys. Rev. Lett.*, núm. 65 (1990), p. 2716-2719.
- [9] MOERNER, W. E.; ORRIT, M. «Illuminating single molecules in condensed media». *Science*, núm. 283 (1999), p. 1670-1676.
- [10] TINNEFELD, P.; SAUER, M. «Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: challenges for chemistry and influence on biology». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 44 (2005), p. 2642-2671.
- [11] HAO, X.; KUANG, C.; GU, Z.; WANG, Y.; LI, S.; KU, Y.; LI, Y.; GE, J.; LIU, X. «From microscopy to nanoscopy via visible light». *Light Sci. Appl.*, núm. 2 (2013), p. e108.
- [12] CREMER, C.; CREMER, T. «Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field». *Microsc. Acta*, núm. 81 (1978), p. 31-44.
- [13] DENK, W.; STRICKLER, J.; WEBB, W. W. «Two-photon laser scanning fluorescence microscopy». *Science*, núm. 248 (1990), p. 73-76.
- [14] HELL, S.; STELZER, E. H. K. «Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope». *J. Opt. Soc. Am. A*, núm. 9 (1992), p. 2159-2166.
- [15] POHL, D. W.; DENK, W.; LANZ, M. «Optical stethoscopy: image recording with resolution $\lambda/20$ ». *Appl. Phys. Lett.*, núm. 44 (1984), p. 651-653.
- [16] BETZIG, E.; TRAUTMAN, J. K.; HARRIS, T. D.; WEINER, J. S.; KOSTELAK, R. L. «Breaking the diffraction barrier — optical microscopy on a nanometric scale». *Science*, núm. 251 (1991), p. 1468-1470.
- [17] HULST, N. F. van; VEERMAN, J.-A.; GARCÍA-PARAJÓ, M. F.; KUIPERS, L. «Analysis of individual (macro)molecules and proteins using near-field optics». *J. Chem. Phys.*, núm. 112 (2000), p. 7799-7810.
- [18] BETZIG, E.; CHICHESTER, R. J. «Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy». *Science*, núm. 262 (1993), p. 1422-1426.
- [19] BETZIG, E.; TRAUTMAN, J. K. «Near-field optics: microscopy, spectroscopy and surface modification beyond the diffraction limit». *Science*, núm. 257 (1992), p. 189-195.
- [20] BETZIG, E. «Proposed method for molecular optical imaging». *Optics Lett.*, núm. 10 (1995), p. 237-239.
- [21] THOMPSON, R. E.; LARSON, D. R.; WEBB, W. W. «Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes». *Biophys. J.*, núm. 82 (2002), p. 2775-2783.
- [22] DICKSON, R. M.; CUBITT, A. B.; TSIEN, R. Y.; MOERNER, W. E. «On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescence protein». *Nature*, núm. 388 (1997), p. 355-358.
- [23] NIENHAUS, G. U.; WIEDENMANN, J. «Structure, dynamics and optical properties of fluorescent proteins: perspectives for marker development». *ChemPhysChem*, núm. 10 (2009), p. 1369-1379.
- [24] BETZIG, E.; PATTERSON, G. H.; SOUGRAT, R.; WOLF LINDWASSER, O.; OLENYCH, S.; BONIFACINO, J. S.; DAVIDSON, M. W.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; HESS, H. F. «Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution». *Science*, núm. 313 (2006), p. 1642-1645.
- [25] AMATO, I. «Squint busters». *Chem. Eng. News*, núm. 84 (2006), p. 49-52.
- [26] KLEIN, T.; PROPERT, S.; SAUER, M. «Eight years of single-molecule localization microscopy». *Histochem. Cell Biol.*, núm. 141 (2014), p. 561-575.
- [27] RUST, M. J.; BATES, M.; ZHUANG, X. W. «Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)». *Nat. Methods*, núm. 3 (2006), p. 793-795.

- [28] HESS, S. T.; GIRIRAJAN, T. P.; MASON, M. D. «Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy». *Biophys. J.*, núm. 91 (2006), p. 4258-4272.
- [29] HEILEMANN, M.; LINDE, S. van de; SCHUTTPELZ, M.; KASPER, R.; SEEFELDT, B.; MUKHERJEE, A.; TINNEFELD, P.; SAUER, M. «Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 47 (2008), p. 6172-6176.
- [30] HA, T.; TINNEFELD, P. «Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging». *Annu. Rev. Phys. Chem.*, núm. 63 (2012), p. 595-617.
- [31] HELL, S.; WITTING, S.; VONSCHICKFUS, M.; VANRESANDT, R. W. W.; HUNKLINGER, S.; SMOLKA, E.; NEIGER, M. «A confocal beam scanning white-light microscope». *J. Microscopy*, núm. 163 (1991), p. 179-187.
- [32] HELL, S.; STELZER, E. H. K. «Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation». *Optics Commun.*, núm. 93 (1992), p. 277-282.
- [33] HELL, S.; WICHMANN, J. «Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy». *Optics Lett.*, núm. 19 (1994), p. 780-782.
- [34] HELL, S. «Far-field optical nanoscopy». *Science*, núm. 316 (2007), p. 1153-1158.
- [35] KLAR, T. A.; JAKOBS, S.; DYBA, M.; EGNER, A.; HELL, S. «Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, núm. 97 (2000), p. 8206-8210.
- [36] HELL, S. «Towards fluorescence nanoscopy». *Nat. Nanotech.*, núm. 21 (2003), p. 1347-1355.
- [37] BLOM, H.; WIDENGREN, J. «STED microscopy – towards broadened use and scope of applications». *Curr. Op. Chem. Biol.*, núm. 20 (2014), p. 127-133.
- [38] KRAMER, A.; LIASHKOVICH, I.; OBERLEITHNER, H.; LUDWIG, S.; MAZUR, I.; SHAHIN, V. «Apoptosis leads to a degradation of vital components of active nuclear transport and a dissociation of the nuclear lamina». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, núm. 105 (2012), p. 11236-11241.
- [39] LÖSCHBERGER, A.; LINDE, S. van de; DABAUVALLE, M.-C.; RIEGER, B.; HEILEMANN, M.; HKROHNE, G.; SAUER, M. «Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution». *J. Cell Sci.*, núm. 125 (2012), p. 570-575.
- [40] GÖTTFERT, F.; WURM, C. A.; MUELLER, V.; BERNING, S.; CORDES, V. C.; HONIGMANN, A.; HELL, S. W. «Coaligned dual-channel STED nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution». *Biophys. J.*, núm. 105 (2013), p. L01-L03.



J. Hernando

Jordi Hernando (Barcelona, 1974) es va llicenciar en ciències químiques per la Universitat de Barcelona l'any 1996, i va realitzar-hi la tesi doctoral, sota la direcció dels doctors Miguel González i Ramón Sayós (2000), en el camp de la cinètica i la dinàmica de reaccions químiques. Després d'una estada postdoctoral al grup del professor Niek F. van Hulst a la Universitat de Twente (Països Baixos), on es va formar en l'espectroscòpia de fluorescència de molècules individuals, es va incorporar al Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, primer com a investigador Ramón y Cajal (2004) i després com a professor agregat (2008). Actualment, la seva activitat de recerca se centra en la síntesi de molècules i materials fotoactius i en la seva caracterització a escala macro- i nanoscòpica.