

# Microscòpia de superresolució

Més enllà de les lleis de la física

Escrit per

**Carles Rentero, Anna Álvarez-Guaita, Meritxell Reverter i Carles Enrich**

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències.  
Facultat de Medicina-Clínic. Universitat de Barcelona (UB)

**Des de fa més de tres-cents anys, la biologia cel·lular ha fet servir imatges obtingudes mitjançant microscopis òptics per entendre l'organització i el funcionament de les cèl·lules. Tanmateix, des de l'època de Z. Jansen, H. Jansen, R. Hooke i A. van Leeuwenhoek hi ha hagut una barrera en la microscòpia òptica que els físics, de la mà dels enginyers i dels biòlegs, no han pogut superar: el límit de resolució dels microscopis. O, per ser més acurats, no fins avui.**

**Els darrers anys s'han dissenyat i desenvolupat nous microscopis i metodologies que, basats en diferents aproximacions, permeten superar aquest límit a partir del fet de treure avantatge de les característiques físiques de les ones de llum i dels fluoròfors.**

**D**es de l'inici de la microscòpia òptica, l'evolució de les tècniques de contrastament i de marcatge ha estat contínua, de manera que permet el marcatge d'àcids nucleics i d'òrgànuls cel·lulars específics. Amb la implantació i perfecció de la microscòpia de fluorescència, a més, s'han pogut marcar molècules específiques (proteïnes, lípids, etc.) i detectar-les individualment. Amb el treball conjunt dels biòlegs i dels enginyers, s'han pogut desenvolupar tècniques per visualitzar les molècules marcades en cèl·lules i organismes vius, cosa que permet estudiar la migració cel·lular i la distribució de molècules i d'òrgànuls cel·lulars, predir interaccions moleculars, etc. No obstant això, el límit de resolució dels microscopis òptics, de prop de 250-300 nanòmetres, és un obstacle en aquests estudis en què les proteïnes, els lípids i molts òrgànuls tenen una mida molt inferior (vegeu la figura 1).

## La física del límit

Les lleis físiques que regeixen els microscopis van ser descrites a la fi del segle XVII per Verdet, Abbe i Rayleigh en diferents treballs. Aquests autors es van adonar que el poder de resolució, que és la distància més petita entre dos objectes puntuals que encara permet diferenciar-los individualment, és dependent de fonaments físics i no de limitacions tècniques. Així, un cop assolit el límit de resolució, el simple fet de

millorar la qualitat dels components òptics d'un microscopi no permet veure-hi més detalls. Els seus estudis teòrics van descriure que la resolució dels microscopis (en nanòmetres) està limitada per la difracció de la llum i segueix les fórmules següents:

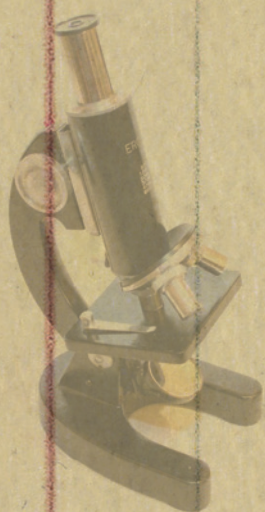
Resolució en el pla focal ( $x, y$ ),

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha)} = \frac{\lambda}{2NA} \quad [\text{equació 1}]$$

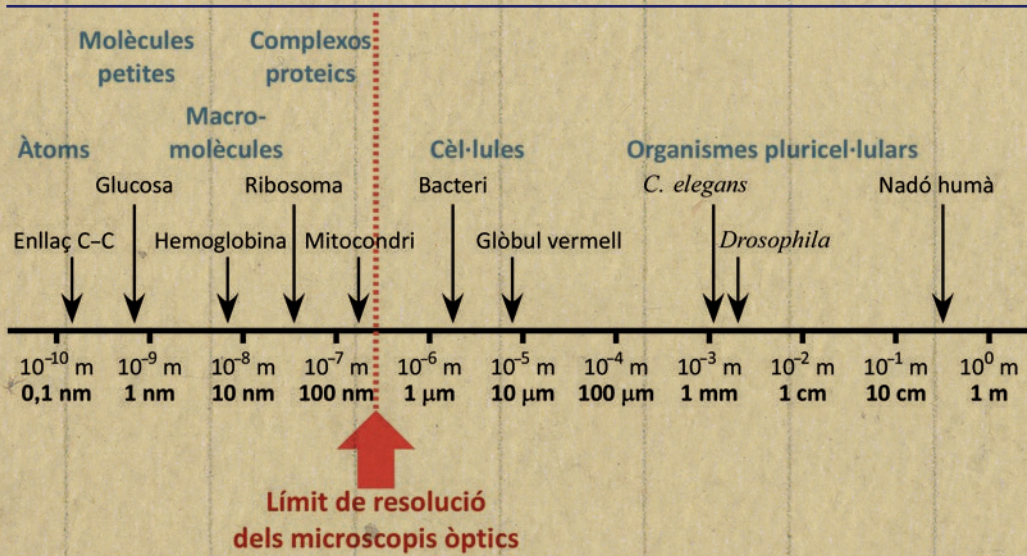
Resolució en l'eix òptic ( $z$ ),

$$d = \frac{n \lambda}{NA^2} \quad [\text{equació 2}]$$

on  $\lambda$  és la longitud d'ona de la llum,  $NA$  és l'obertura numèrica de l'objectiu i  $n$  és l'índex de refracció del medi per on passa la llum.







◀ **Figura 1.** Límit de resolució. Mides de cèl·lules i de components cel·lulars en escala logarítmica amb relació al límit de resolució dels microscopis òptics.

La resolució pràctica dels microscopis es pot quantificar analitzant la funció de dispersió d'un punt (PSF o *point spread function*, 'funció de distribució del punt') al microscopi, que descriu com de desdibuixat (o borrós) es veu un objecte puntual (una molècula única fluorescent, per exemple) en ser observat a través d'un microscopi. Així, quan la llum és enfocada per l'objectiu d'un microscopi, l'ona de llum forma un punt d'una mida definida per la difracció. La gràfica de la intensitat en l'espai d'aquest punt és la PSF (vegeu la figura 2). La resolució d'un microscopi és l'amplada de la corba PSF a la meitat de l'altura màxima.

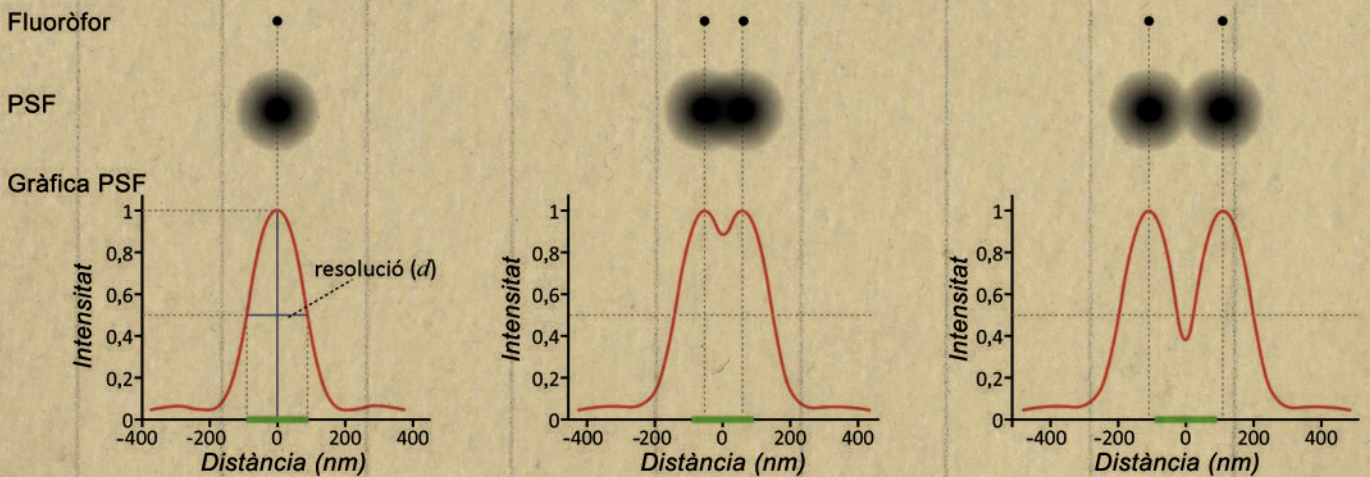
D'acord amb les fórmules anteriors i considerant les condicions més òptimes pel que fa a la longitud d'ona ( $\lambda$  més curtes que la llum ultraviolada són incompatibles amb mostres biològiques) i a l'obertura numèrica (els objectius d'alta NA arriben fins a 1,49 NA), la resolució està limitada a uns 200-250 nanòmetres en el pla focal i 500-700 nanòmetres en l'eix axial.

Fer servir electrons en lloc de fotons va ser la solució de la microscòpia electrònica per a millorar la resolució dels microscopis al principi del segle xx. Seguint els mateixos principis físics, però amb unes longituds d'ona 10.000 vegades més curtes, la microscòpia electrònica permet una resolució dos ordres de magnitud major que la microscòpia òptica. No obstant això, les tècniques de microscòpia electrònica no permeten estudiar cèl·lules o teixits vius, no tenen tanta flexibilitat de marcatge específic com la microscòpia òptica, la preparació de la mostra no és senzilla i requereixen equipaments i personal molt especialitzats. Així, la millora de la resolució dels microscopis òptics ha estat el desig prohibit per a la majoria dels biòlegs cel·lulars.

**Microscòpia de superresolució**

Els darrers anys s'han desenvolupat diferents estratègies de superresolució que treuen profit de les propietats específiques de la llum als sistemes òptics (TIRFM i SIM) i de les propietats fotofísiques dels fluoròfors (PALM/STORM

▼ **Figura 2.** La resolució dels microscopis ( $d$ ) és la capacitat de distingir dos objectes que es troben molt a prop, i es pot calcular com l'amplada de la corba d'intensitat de la PSF a la meitat de la seva altura. Si dos punts són a una distància inferior a  $d$ , no es poden distingir individualment.





i STED). Tant la microscòpia TIRFM com la SIM permeten la visualització dels fluoròfors convencionals amb un increment notable de la resolució axial (TIRFM) o duplicant tant la resolució en el pla focal com en l'axial (SIM). La microscòpia PALM/STORM, també coneguda per *puntillisme*, pel moviment dels pintors neo-impressionistes que es basa a pintar amb punts de colors, aconsegueix resolucions de prop de 20 nanòmetres en el pla focal i de 60 en el pla axial per mitjà de l'encesa diferencial dels fluoròfors de la mostra. La microscòpia STED, de la seva banda, assoleix resolucions properes a 50 nanòmetres gràcies a la depleció de la fluorescència emesa mitjançant un làser específic.

### Microscòpia TIRFM

Als anys vuitanta del segle passat es va dissenyar la microscòpia TIRFM (de l'anglès *total internal reflection fluorescence microscopy*) per estudiar amb especial detall la superfície de les cèl·lules, sense que faci nosa el soroll de fons de la fluorescència de les estructures internes (Axelrod, 2001). Aquesta és una tècnica de microscòpia de fluorescència que permet il·luminar específicament només els fluoròfors que es troben en la secció òptica per sobre de la interfase entre dos medis amb diferents índexs de difracció (vidre o medi aquós; vegeu la figura 3). Per aconseguir-ho, el feix d'un làser és dirigit obliquament a la interfase amb un angle incident per sobre d'un angle crític. Sota aquestes condicions, la llum és totalment reflectida i es crea una ona evanescent estable que es propaga paral·lela a la interfase i es dissipa exponencialment amb la distància. La fondària de pene-

tració més enllà del vidre que s'aconsegueix és de 100 a 200 nanòmetres, i així només els fluoròfors propers a la interfase entre el vidre i el medi de muntatge aquós reben prou energia per excitar-se i emetre fluorescència.

D'encà quan es va començar a desenvolupar, s'han fet nombrosos estudis amb microscòpia TIRFM, que permet la caracterització dels processos d'exocitosi i d'endocitosi i de l'adhesió cel·lular al substrat i l'estudi de receptors i canals iònics de la membrana plasmàtica (Schneckenburger, 2005; Mattheyses, 2010).

### Microscòpia SIM

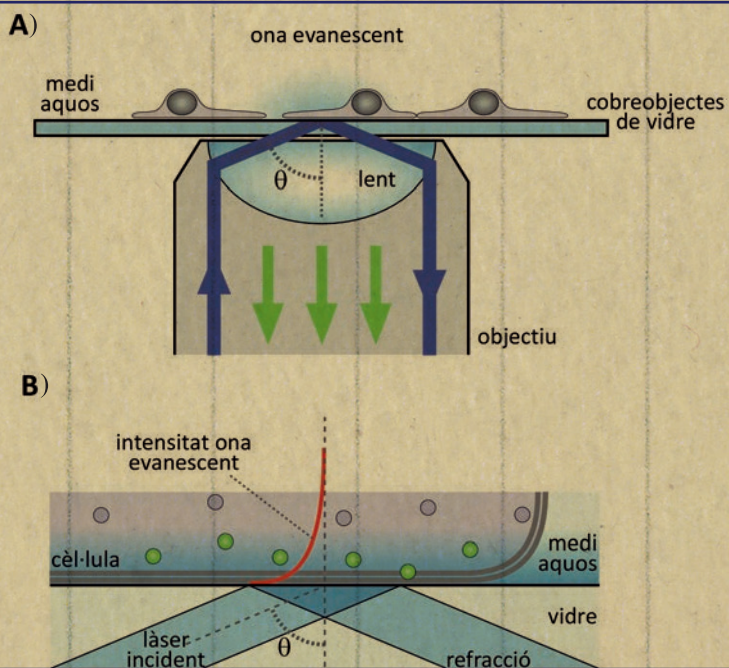
La microscòpia SIM (de l'anglès *structured illumination microscopy*) es basa a fer servir llum estructurada per excitar la mostra, és a dir, que la llum presenta un patró espacial d'alta freqüència. En microscòpia de fluorescència, quan una mostra amb estructures petites s'il·lumina de manera convencional, apareixen patrons d'interferència, com el cas dels patrons de *moiré* (us heu fixat que, quan a la televisió, sistema que mostra la imatge estructurada, algú porta un vestit amb ratlles, sembla que aquestes deixin de ser paral·leles i s'entrecreuin? Aquests són els patrons d'interferència de *moiré*). Quan s'aplica llum estructurada en diferents orientacions i s'agafen imatges per cadascuna d'aquestes, la modulació espacial addicional produïda pels patrons d'excitació permet millorar la resolució espacial de la imatge reconstruïda. El processament de les diferents imatges fent servir algoritmes permet obtenir imatges d'alta resolució (Gustafsson, 2005).

Els nous microscopis SIM en 3D i d'alta velocitat estan permetent la visualització de mostres de fluorescència convencionals, i ja estan apareixent publicacions on s'estudia el nucli cel·lular, el citosquelet o els mitocondris (Shao, 2011; Schermelleh, 2010).

### Microscòpia PALM/STORM

La microscòpia PALM (de l'anglès *photoactivated localization microscopy*) i la microscòpia STORM (de l'anglès *stochastic optical reconstruction microscopy*) es basen en la detecció i localització amb precisió nanomètrica de molècules fluorescents individuals en una mostra (Betzig, 2006; Rust, 2006). Aquest tipus de microscòpia permet assolir una resolució de 10-20 nanòmetres en el pla focal. La PALM i la STORM són especialment útils per a l'estudi d'esdeveniments que tenen lloc a la membra-

▼ **Figura 3.** Esquema de la microscòpia TIRF. A) En un objectiu per TIRF, el làser (en blau) arriba en angle a la superfície del cobreobjectes. Aquest és reflectit totalment quan hi ha diferència entre l'índex de refracció del vidre (lents de l'objectiu, oli d'immersió i cobreobjectes) i del medi de muntatge (medi aquós). B) Quan el làser és reflectit, es forma una ona evanescent que decau en intensitat exponencialment amb la distància i només excita els fluoròfors (en verd) a menys de 150 nanòmetres de la interfase medi aquós/vidre.



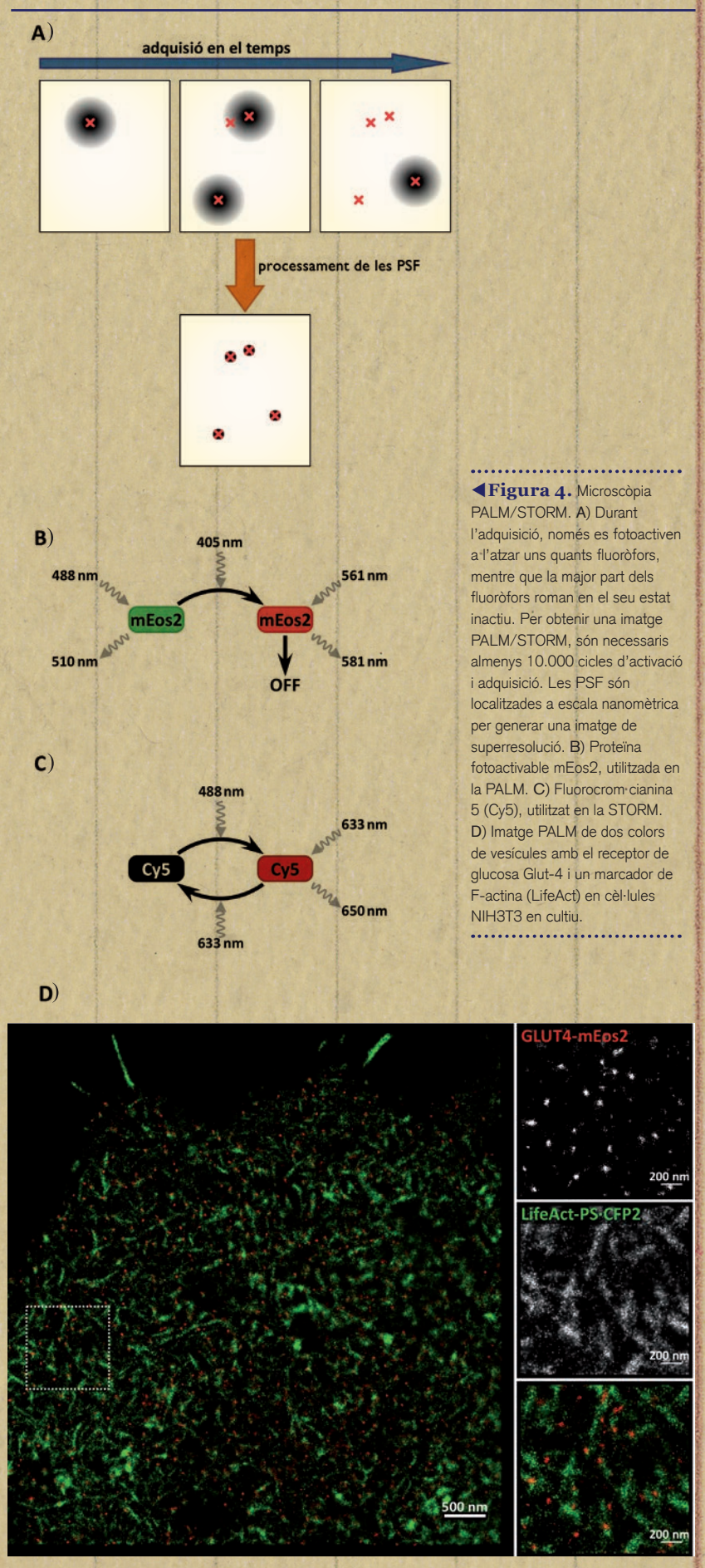


na plasmàtica, ja que típicament es combinen amb la microscòpia TIRFM, que limita el volum d'excitació a 100-150 nanòmetres de la superfície del portaobjectes i redueix el soroll de fons, malgrat que també es fa servir amb il·luminació de fluorescència convencional. Alhora, el desenvolupament de la STORM 3D permet assolir resolucions de 50-60 nanòmetres en la dimensió axial (Xu, 2012). Nous avenços com el desenvolupament de fluoròfors fotoconvertibles, de càmeres o detectors d'alta sensibilitat i d'algoritmes de localització de partícules fan que aquesta microscòpia es pugui aplicar a diversos àmbits del món científic.

Les microscòpies PALM i STORM es basen en la separació temporal de l'excitació de molècules properes, que fa que només una part d'aquestes pugui ser detectada en un moment determinat. Aquest procés consisteix en l'activació a l'atzar de molècules fluorescents (fotoactivables o fotoconvertibles) d'una manera seqüencial. Inicialment, la major part de les proteïnes fluorescents es troba en el seu estat inactiu (sense emissió). Utilitzant un pols de llum a diferent longitud d'ona, una petita fracció d'aquestes es fotoactiva o es fotoconverteix, la qual cosa permet l'adquisició de la fluorescència emesa fins que es fotoblanqueja i s'inactiva (vegeu la figura 4). La fluorescència de molècules individuals activades és captada (en forma de PSF a través del microscopi) i localitzada en unes coordenades concretes. Aquest procediment es repeteix milers de vegades, i la localització amb precisió subnanomètrica dels centres de les PSF permet obtenir un patró de coordenades (imatge PALM/STORM) de la major part de les molècules marcades. La imatge que s'obté amb la PALM/STORM és una composició de cada una de les coordenades de cada molècula individualitzada.

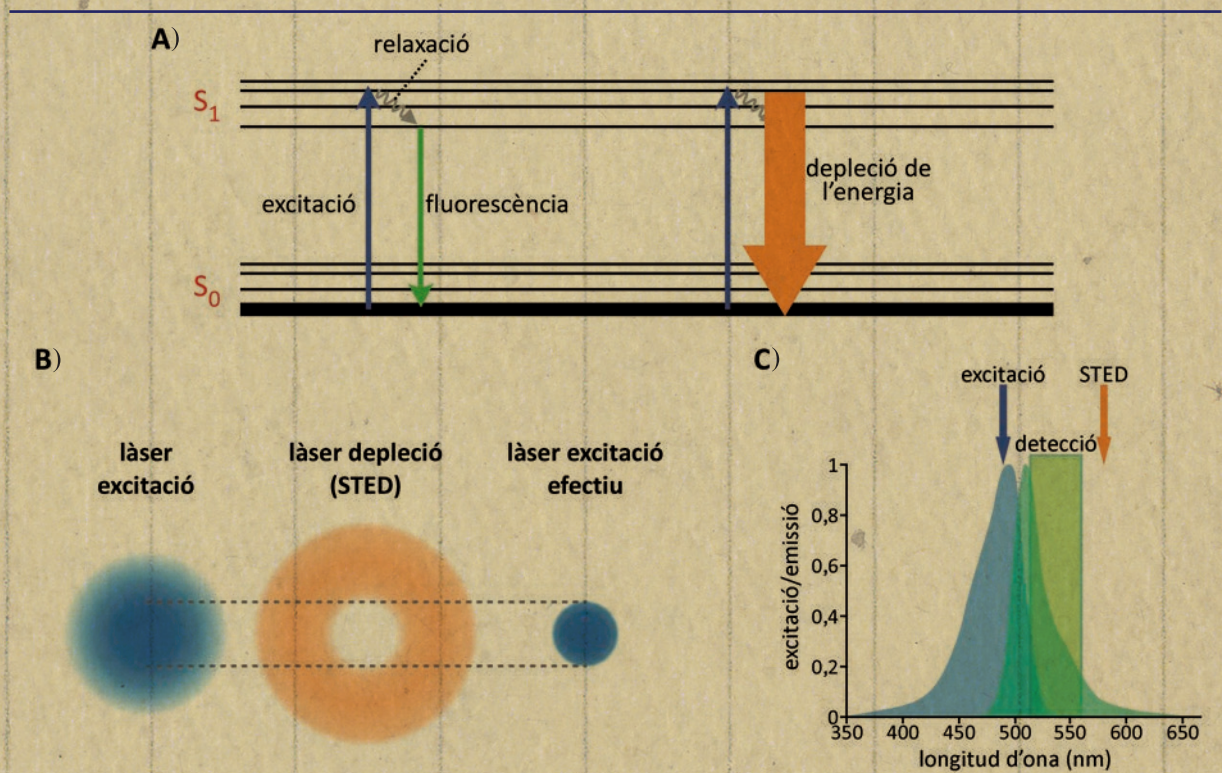
La microscòpia PALM/STORM es duu a terme mitjançant una gran varietat de molècules fotoactivables o fotoconvertibles que inclouen des de fluoròfors fins a proteïnes fluorescents. La diferència entre ambdues tècniques rau en el fet que la PALM utilitza proteïnes fluorescents fotoactivables o fotoconvertibles, mentre que la STORM utilitza anticossos marcats amb fluoròfors.

Amb la microscòpia PALM/STORM s'ha pogut estudiar amb gran precisió la xarxa cortical del citosquelet d'actina, l'estructura de les adhesions focals, mitocondris, vesícules d'endocitosi, l'organització de proteïnes de senyalització



**Figura 4.** Microscòpia PALM/STORM. A) Durant l'adquisició, només es fotoactiven a l'atzar uns quants fluoròfors, mentre que la major part dels fluoròfors roman en el seu estat inactiu. Per obtenir una imatge PALM/STORM, són necessaris almenys 10.000 cicles d'activació i adquisició. Les PSF són localitzades a escala nanomètrica per generar una imatge de superresolució. B) Proteïna fotoactivable mEos2, utilitzada en la PALM. C) Fluorocrom-cianina 5 (Cy5), utilitzat en la STORM. D) Imatge PALM de dos colors de vesícules amb el receptor de glucosa Glut-4 i un marcador de F-actina (LifeAct) en cèl·lules NIH3T3 en cultiu.





▲ **Figura 5.** A) Diagrama de Jablonski on es mostra l'estat energètic dels fluoròfors durant l'adquisició d'imatges. Normalment, el fluoròfor s'excita i passa a un estat energètic superior, des d'on es relaxa i torna al seu estat de repòs emetent fluorescència. Quan s'hi aplica un làser de depleció, aquest fluoròfor perd la seva energia sense emetre fluorescència. B) Esquema de la secció del làser d'excitació i del làser de depleció en la microscòpia STED, i la secció de l'àrea d'excitació efectiva. C) Diagrama d'excitació i emissió de la GFP, i els làsers d'excitació i de depleció utilitzats en la microscòpia STED.

a la membrana plasmàtica, etcètera (Xu, 2012; van de Linde, 2008; Williamson, 2011).

**Microscòpia STED**

Una altra estratègia en la millora de la resolució dels microscopis és reduir l'àrea d'irradiació (excitació) a nivells per sota del límit de resolució. Una manera d'aconseguir-ho és reduir la mida del feix del làser efectiu per l'excitació, com, per exemple, en el cas de la microscòpia STED (de l'anglès *stimulated emission depletion*). El que fa innovadora aquesta tècnica és la presència d'un làser en forma d'anell (*donut*) que permet augmentar la resolució a uns 50 nanòmetres (Willig, 2006).

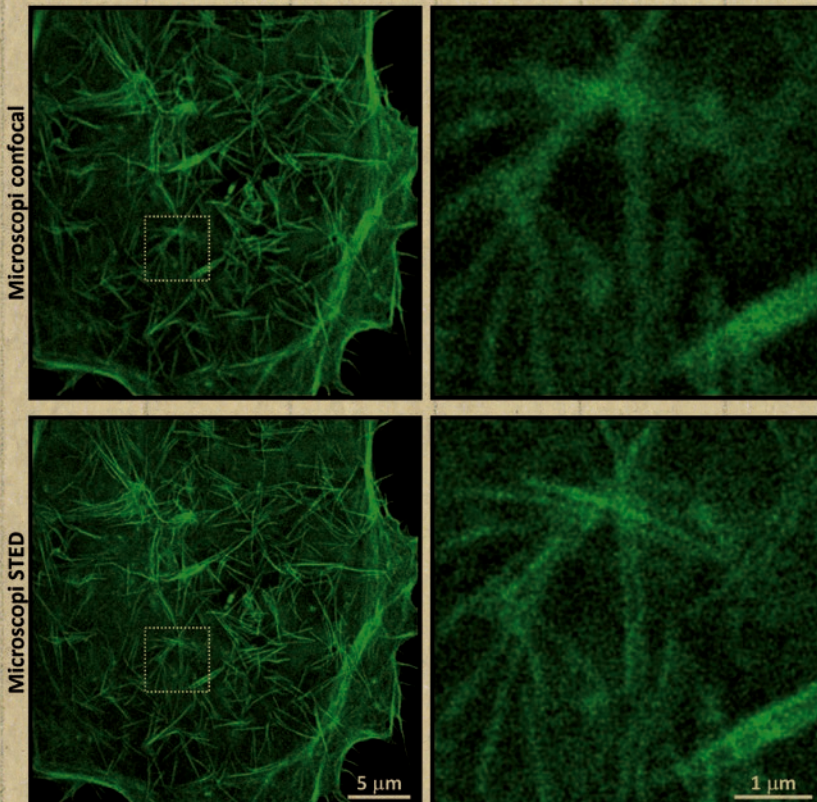
Els fluoròfors, quan reben llum a la seva longitud d'ona d'excitació, capten l'energia i passen a un nivell d'energia superior ( $S_1$ ; vegeu la figura 5.A). Passats uns quants nanosegons, els fluoròfors es relaxen i emeten espontàniament aquesta energia en forma de fluorescència, i retornen al seu estat de repòs ( $S_0$ ). Alternativament, els fluoròfors també poden retornar al seu estat de repòs mitjançant emissió estimulada, que és el principi en el qual es basa la STED. Quan un fluoròfor en estat excitat és irradiat amb un feix làser de longitud d'ona similar a la llum que emet, pot retornar immediatament al seu estat de repòs sense emetre fluorescència.

En la microscòpia STED, els fluoròfors presents en la mostra són excitats amb un làser

convencional com en la microscòpia confocal. Alhora, s'hi aplica un segon làser en forma de *donut*, l'anomenat *feix de depleció*, que se superposa al feix d'excitació només a la perifèria d'aquest (vegeu la figura 5.B). El làser de depleció emet fotons amb una longitud d'ona superior a la del feix d'excitació, que coincideix amb la diferència d'energia entre l'estat de repòs i l'estat d'excitació dels fluoròfors. Com a conseqüència, els fluoròfors són desexcitats i retornen al seu estat de repòs. Així es limita el senyal fluorescent només a la part central del feix d'excitació.

Diferents estudis amb microscòpia STED han desemmascarat una major complexitat en processos biològics com ara els mecanismes de fusió de membranes en neurones tant en cèl·lules fixades com en neurones vives (Saka, 2012) i han permès obtenir imatges de més resolució del citosquelet (Kasper, 2010; vegeu la figura 6). La microscòpia STED també ha permès visualitzar estructures subcel·lulars com ara els *rafts* lipídics en combinar-la amb la FCS (*fluorescence correlation spectrometry*) (Eggeling, 2009). Kai Simons va proposar el 1988 el model dels *rafts* lipídics per a les membranes cel·lulars, en el qual es postulava que certs lípids i proteïnes de les membranes biològiques podrien formar agregats per facilitar la transmissió cel·lular de senyals. Aquestes estructures *raft*, d'uns 30-50 nm de diàmetre, finalment han pogut ser detectades amb un microscopi STED.





visualitzar molècules o estructures amb una resolució de prop de 20-50 nanòmetres ens permet fer correlacions espacials entre receptors, entre receptors i els seus lligants, dissecar estructures com ara les adhesions focals o estudiar les proteïnes implicades en mecanismes com ara les sinapsis neuronals. Els biòlegs cel·lulars que utilitzen actualment els sistemes de superresolució poden veure coses que mai no van ser capaços de veure amb una claredat sense precedents. Amb aquests microscopis es poden resoldre òrgans i veure'n, *in vivo*, la «biologia». Podríem dir que no sola-

.....  
**Figura 6.** Imatge confocal i imatge STED del marcador de F-actina LifeAct marcat amb YFP (cedit pel laboratori del Dr. R. Wedlich, de l'Institut Max Planck) en cèl·lules HeLa en cultiu. Imatges cedides per l'Advanced Light Microscopy Unit (ALMU) del Centre de Regulació Genòmica de Barcelona.  
 .....

L'impacte de la microscòpia de superresolució en la biologia cel·lular és encara imprevisible, però creiem fermament que és una tecnologia transformadora. La possibilitat de

ment s'està començant a reescriure la biologia cel·lular, sinó que els avanços que es poden esperar només estan limitats per la imaginació dels científics que utilitzen l'equip. I

## Referències bibliogràfiques

- AXELROD, D. (2001). «Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology». *Traffic*, núm. 2, p. 764-774.
- BETZIG, E. [et al.] (2006). «Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution». *Science*, núm. 313, p. 1642-1645.
- EGGELING, C. [et al.] (2009). «Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cells». *Nature*, núm. 457, p. 1159-1163.
- GUSTAFSSON, M. G. (2005). «Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution». *PNAS*, núm. 102, p. 13081-13086.
- KASPER, R. [et al.] (2010). «Single-molecule STED microscopy with photostable organic fluorophores». *Small*, núm. 6, p. 1379-1384.
- LINDE, S. van de [et al.] (2008). «Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores». *Journal of Structural Biology*, núm. 164, p. 250-254.
- MATTHEYSES, A. L. [et al.] (2010). «Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist». *Journal of Cell Science*, núm. 123, p. 3621-3628.
- RUST, M. J. [et al.] (2006). «Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)». *Nature Methods*, núm. 3, p. 793-795.
- SAKA, S.; RIZZOLI, S. O. (2012). «Super-resolution imaging prompts re-thinking of cell biology mechanisms. Selected cases using stimulated emission depletion microscopy». *Bioessays*. [En premsa]
- SCHERMELLEH, L. [et al.] (2008). «Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy». *Science*, núm. 320, p. 1332-1336.
- SCHNECKENBURGER, H. (2005). «Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications». *Current Opinion in Biotechnology*, núm. 16, p. 13-18.
- SHAO, L. [et al.] (2011). «Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination». *Nature Methods*, núm. 8, p. 1044-1046.
- WILLIAMSON, D. J. [et al.] (2011). «Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events». *Nature Immunology*, núm. 12, p. 655-662.
- WILLIG, K. I. [et al.] (2006). «STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis». *Nature*, núm. 440, p. 935-939.
- XU, K. [et al.] (2012). «Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton». *Nature Methods*, núm. 9, p. 185-188.

## Carles Enrich

(Barcelona, 1952)



és catedràtic de biologia cel·lular de la UB i investigador de l'IDIBAPS; dirigeix el Grup d'Endocitosi, Tràfic i Senyalització.

## Carles Rentero

(Barcelona, 1976)



és investigador al laboratori del doctor Enrich i va entrar en contacte amb els primers microscopis no comercials de superresolució durant la seva estada postdoctoral a Austràlia.

## Anna Álvarez-Guaita Meritxell Reverter

(Barcelona, 1986) (Barcelona, 1984)



són llicenciades en biologia per la UPF i la UB, respectivament, i estan elaborant la tesi doctoral sota la direcció de Carles Rentero i Carles Enrich. El camp d'interès del grup és entendre els mecanismes i el funcionament cel·lular pel que fa a senyalització, endocitosi i transport vesicular i té com a eines de treball habituals les microscopies de fluorescència confocal, de superresolució i electrònica.