

IL NOBEL PER LA CHIMICA ALLA SUPER-RISOLUZIONE IN MICROSCOPIA

Roberto Righini

Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff"

Università di Firenze

roberto.righini@unifi.it

Il Nobel per la Chimica 2014 è stato assegnato a tre scienziati che sono riusciti a spingere la microscopia ottica oltre il limite della diffrazione di Abbe, ritenuta finora invalicabile, ottenendo una risoluzione superiore ai 0,2 micrometri, pari cioè alla metà della lunghezza d'onda della luce



I premi Nobel per la Chimica 2014: Eric Betzig, Stefan W. Hell e William E. Moerner

La realizzazione dei primi microscopi nel 17° secolo aprì agli scienziati la possibilità di studiare direttamente lo sconfinato mondo della microbiologia, facendo del microscopio uno degli strumenti fondamentali della ricerca. Lo sviluppo tecnologico e scientifico ha portato nel tempo alla continua diminuzione delle dimensioni minime degli oggetti osservabili al microscopio ottico. Nel 1873 Ernst Abbe dimostrò che questa corsa alla visualizzazione del più piccolo necessariamente si doveva fermare di fronte ad un limite invalicabile, il limite di diffrazione: la risoluzione spaziale non può essere migliore della metà della lunghezza d'onda della luce utilizzata per l'osservazione. Per un microscopio ottico, il limite di Abbe si colloca quindi a circa 200 nanometri.

Riuscire a visualizzare oggetti e strutture di dimensioni inferiori a 100 nanometri è, d'altra parte, di fondamentale importanza per ricercatori che operano in svariati settori della scienza, a partire da quello dei materiali per finire alle cellule viventi. Particolarmente in quest'ultimo ambito è essenziale poter osservare direttamente il comportamento delle singole proteine per poterne comprendere il ruolo nei complessi meccanismi vitali. Certamente altri tipi di microscopia, quella elettronica e quella a forza atomica *in primis*, sono in grado di raggiungere una risoluzione molto superiore ai 200 nm, ma quasi sempre o portano alla distruzione del campione, o non possono essere usate per osservare l'interno di sistemi viventi.

Eric Betzig, Stefan W. Hell e William E. Moerner sono riusciti a spingere la microscopia ottica oltre il limite di diffrazione di Abbe. Il limite in realtà resta assolutamente valido; i tre scienziati, operando indipendentemente, hanno trovato modi per eluderne le conseguenze, mettendo le fondamenta di quella che è nota come *microscopia di fluorescenza a super-risoluzione*. Per le loro scoperte hanno ricevuto il Premio Nobel per la Chimica 2014.

Malgrado i risultati ottenuti dai tre ricercatori sostanzialmente si equivalgono, gli approcci usati sono diversi.

Il primo ad incamminarsi sulla strada della super-risoluzione ottica fu Stefan Hell. Dopo il Dottorato conseguito a Heidelberg, lavorando all'Università di Turku (Finlandia) nel campo della microscopia di fluorescenza, formulò la prima proposta su come sarebbe stato possibile andare oltre il limite di diffrazione di Abbe. La sua idea era basata sull'effetto di *emissione stimolata*: un sistema molecolare che si trovi in uno stato eccitato, se irradiato con una luce di appropriata lunghezza d'onda, viene forzato ad emettere tutta l'energia in eccesso, ritornando allo stato fondamentale. La sua fluorescenza viene così istantaneamente spenta. Nel metodo da lui proposto nel 1994, cui dette il nome di *Stimulated Emission Depletion (STED)*, un impulso di luce laser eccita tutte le molecole fluorescenti contenute nel campione, mentre un appropriato impulso di un secondo laser spegne la fluorescenza di tutte le molecole, eccetto quelle contenute in un volumetto di dimensioni nanometriche posto nel mezzo. Questo secondo fascio laser ha una sezione trasversale a forma di ciambella (la densità di fotoni va a zero nel centro della sezione). Sovrapposto al fascio d'eccitazione (la cui sezione ha forma circolare), spegne la fluorescenza ovunque, salvo che nella piccola regione posta nel centro. Solo questo volumetto viene quindi visualizzato dal microscopio. Facendo muovere i due raggi laser (solidali tra di loro) su tutta la superficie del campione e registrando continuamente la luce emessa, si ottiene un'immagine complessiva.

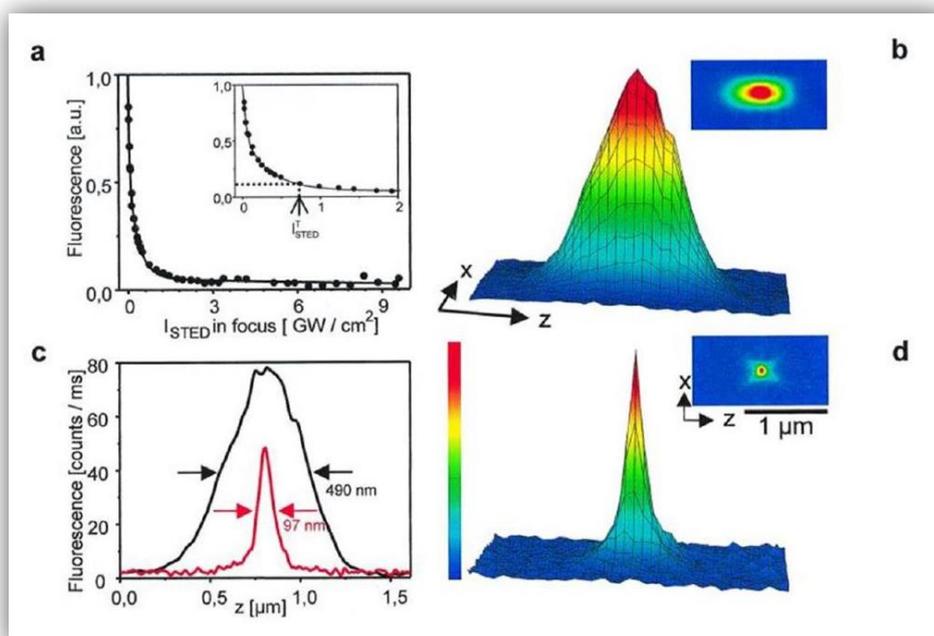


Fig. 1

a) Diminuzione dell'intensità di fluorescenza all'aumentare dell'intensità STED; b) dimensione dell'immagine di fluorescenza in assenza di STED; c) dimensione dell'immagine di fluorescenza in presenza di STED; d) confronto della risoluzione spaziale nei due casi (da T.A. Klar, S. Jakobs, A. Egner, S.W. Hell, PNAS, 2000, **97**, 8206)

Tornato in Germania al Max-Planck di Göttingen, Hell si dedicò a tradurre in pratica la sua idea. Nel 2000 Hell raggiunse finalmente l'obiettivo di far funzionare un *microscopio STED*, riuscendo ad ottenere un'immagine del batterio *E. coli* con una risoluzione mai raggiunta fino ad allora con un microscopio ottico.

L'idea che sta alla base del lavoro degli altri due premiati, Moerner e Betzig, è sostanzialmente diversa, e si basa sulla spettroscopia di singola molecola.

William E. Moerner fu il primo al mondo che, nel 1989, quando lavorava al centro di ricerca dell'IBM a San Jose, California, rivelò la luce di fluorescenza prodotta da una singola molecola. Trasferitosi all'Università di California a San Diego, venne in contatto con la ricerca qui svolta sulla proteina fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP). La proteina, estratta da una medusa fluorescente, ha la proprietà di potersi legare ad altre proteine all'interno di cellule viventi, rendendole visibili. Moerner verificò che una variante della proteina, eccitata con luce a 488 nanometri, cominciava a *fluorescere*, ma dopo un po' la fluorescenza scompariva. Scopri tuttavia che la fluorescenza poteva essere riattivata illuminando la GFP con luce a 405 nanometri. In altre parole, la fluorescenza della GFP poteva essere accesa e spenta a volontà. Nel lavoro su *Nature* del 1997 dimostrò che, disperdendo la GFP in un gel in concentrazione tale che la distanza media tra le proteine fosse superiore al limite di diffrazione di Abbe (200 nm), era possibile rivelare la fluorescenza delle singole molecole e controllarne per via ottica lo stato "acceso/spento".

Questi risultati ottenuti da Moerner furono di sostanziale sostegno all'attività dell'altro premiato, Eric Betzig. Quando Betzig lavorava ai Bell Laboratories nel New Jersey si era occupato di microscopia in campo vicino. In questa metodologia la luce emessa da una punta sottilissima illumina il campione che si deve trovare a pochi nanometri da essa. Anche questa tecnica permette di andare oltre il limite di diffrazione, ma ha grandissime limitazioni: per esempio, nel caso di sistemi cellulari, è evidente che non può permettere di visualizzare strutture che si trovino al di sotto della superficie. Betzig, ispirato dalle ricerche di Moerner, pubblicò nel 1995 su *Optics Letters* una sua prima idea su come superare più convenientemente il limite di Abbe: si basava sull'impiego di molecole che *fluorescono* a lunghezze d'onda diverse. Se si fa sì che tutte le molecole dello stesso colore siano disperse nel campione in modo che la loro distanza media sia maggiore di 200 nm, la loro posizione può essere determinata con precisione per mezzo di un microscopio. Sovrapponendo immagini ottenute a colori diversi, l'immagine complessiva che ne risulta raggiunge così una risoluzione di gran lunga migliore del limite di Abbe. Successivamente Betzig abbandonò la ricerca attiva per quasi un decennio, finché nel 2005 si imbatté nella letteratura scientifica riguardante la GFP. Questo risvegliò il suo interesse per il superamento del limite di

diffrazione, rendendogli chiaro che questo tipo di proteine era lo strumento che avrebbe permesso di realizzare l'idea che aveva avuto dieci anni prima. Con una differenza sostanziale: invece di usare molecole che *fluorescono* a lunghezze d'onda diverse, sfruttò la fluorescenza emessa in tempi diversi. Ritornato alla ricerca attiva al Janelia Research Campus in Virginia, nel 2006 pubblicò su *Science* l'immagine a super-risoluzione della membrana esterna del lisosoma, su cui aveva accoppiato le proteine fluorescenti. Nell'esperimento, la fluorescenza era eccitata da un impulso di luce molto debole, in modo che solo una frazione delle molecole cominciasse a *fluorescere*. La densità di tali molecole era talmente bassa che la distanza media tra loro era nettamente superiore al limite di Abbe; la loro posizione era registrata con precisione dal microscopio. La procedura veniva ripetuta molte volte, fornendo ogni volta un'immagine riguardante molecole fluorescenti diverse. Alla fine, dalla sovrapposizione delle immagini ottenne l'immagine a super-risoluzione della membrana (PALM, *Photoactivated Localization Microscopy*).

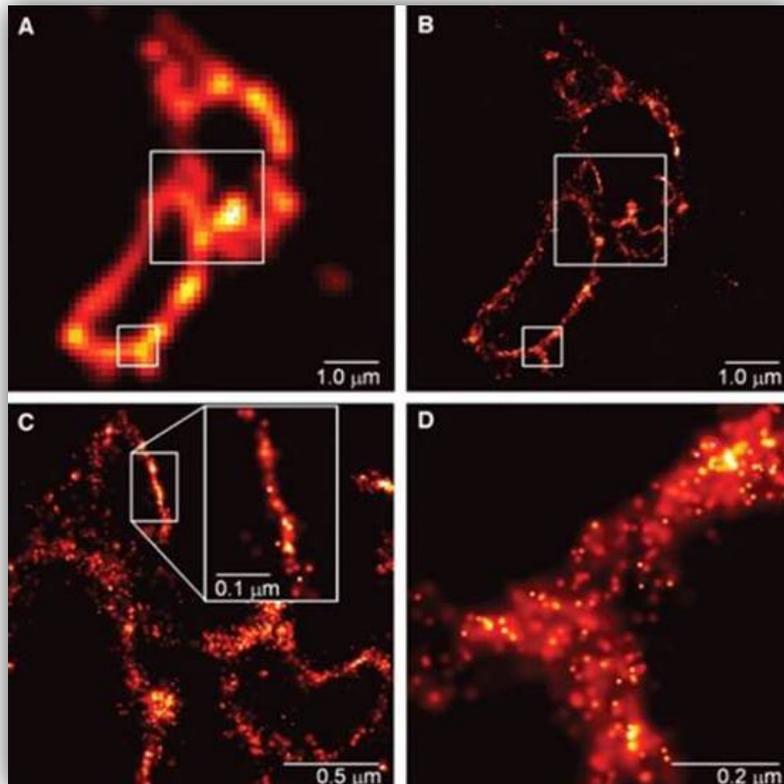


Fig. 2

A) Immagine della membrane di lisosoma ottenuta con microscopio a fluorescenza convenzionale; B) stessa immagine ottenuta con microscopio a super-risoluzione PALM; C) e D) ingrandimenti dei due riquadri in (B). L'immagine in (D) mostra chiaramente come il limite di Abbe ($0,2 \mu\text{m}$) sia abbondantemente superato (da E. Betzig et al., *Science*, 2006, **313**, 1642)

A meno di quindici anni dalla prima realizzazione, la microscopia in super-risoluzione è ormai disponibile sul mercato con apparecchiature commerciali prodotte dalle principali industrie nel campo dell'ottica avanzata. La ricerca, soprattutto in biologia cellulare e in neurobiologia, utilizza largamente queste nuove tecniche, aprendo la prospettiva di passi avanti sostanziali in biologia e in medicina.