

Czy można obejść prawa fizyki? O metodach super-rozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej

STRESZCZENIE

Nauki biologiczne w coraz większym szczególe odkrywają podstawy życia. Jest to między innymi możliwe przez rozwój metod badawczych, które umożliwiają poznawanie świata w skali nanometrowej. Mikroskopia optyczna, dziedzina mająca ogromny wkład w aktualny stan wiedzy, w swojej rozdzielczości jest ograniczona limitem Abbego. Limit ten wynika z fundamentalnych właściwości falowego światła. Dzięki staraniom naukowców, limit ten można obejść, czego dowodem są techniki STED oraz MINFLUX. Technika STED umożliwia obrazowanie z rozdzielczością do 40 nm, natomiast technika MINFLUX pozwala na osiągnięcie rozdzielczości nawet 2 nm. Obydwie techniki wymagają oznakowania biologicznych celów molekularnych znacznikami fluorescencyjnymi i umożliwiają obrazowanie w żywych komórkach. To umożliwia badanie dynamicznych procesów biologicznych. Artykuł zawiera wprowadzenie do technik super-rozdzielczych STED oraz MINFLUX, a ich użyteczność została przedstawiona na przykładzie badań ruchu kinezyiny po mikrotubulach techniką MINFLUX.

WPROWADZENIE

Nazwa „mikroskopia” zdradza poniekąd czym dziedzina się zajmuje. Pojęcie mikro- wywodzi się od słowa *mikros* z klasycznej greki i oznacza mały, -skopia natomiast pochodzi od *skopein*, czyli obserwować. Dodatkowo, przedrostek „mikro” jest oficjalnym przedrostkiem SI i oznacza jedną milionową. Wynioskować można, że mikroskopia zajmuje się obserwacją mikroświata, czyli takiego, którego podstawową jednostką będzie mikrometr – jedna milionowa metra. Wraz z rozwojem dziedziny i coraz większym zaawansowaniem nauki, wachlarz technik mikroskopowych bardzo się rozrósł, umożliwiając obrazowanie nie tylko mikroświata, ale również świata w nanoskali. Podczas gdy początkowo dziedzina mikroskopii w głównej mierze była kojarzona z mikroskopią optyczną, z czasem powstały metody pozwalające na badanie świata niedostępnego dla ludzkiego oka przy użyciu rozmaitych innych metod, takich jak STM (skaningowy mikroskop tunelowy), AFM (mikroskop sił atomowych) itp., [1] które nie wykorzystują światła w celu uzyskania obrazu, lecz inne zjawiska fizyczne. W tej pracy skupię się na mikroskopii fluorescencyjnej, a dokładniej na super-rozdzielczych technikach umożliwiających obrazowanie układów o rozmiarach nanometrowych.

MIKROSKOPIA OPTYCZNA

Za twórców pierwszego mikroskopu uważa się Zachariasa Jenseena oraz jego ojca Hansa. Mikroskop, który stworzyli pod koniec XV wieku składał się z dwóch soczewek umocowanych na teleskopowo połączonych rurach i umożliwiał 10-krotne powiększenie. Schemat takiego układu jest widoczny na rycinie 1.

Z powodu niskiej rozdzielczości pierwszy mikroskop nie znalazł zastosowania i dopiero Antonie van Leeuwenhoek stworzył układ jednosoczewkowy z uchwytem na próbkę, pozwalający osiągnąć 270-krotne powiększenie. Van Leeuwenhoek był pierwszym człowiekiem, który zobaczył między innymi czerwone krwinki. W 1665 roku Robert Hooke jako pierwszy wykorzystał określenie „komórka” w opisie próbki cienkiej warstwy korku. Do swoich badań wykorzystywał bardziej skomplikowane układy od Leeuwenhoekia.

Przez następne 200 lat budowa mikroskopów nie zmieniła się w dużym stopniu. Głównym powodem ograniczonego rozpowszechnienia się mikroskopii były słabej jakości obrazy, spowodowane nieoptymalnie wykonaną optyką. Konsekwencją był rozmyty obraz wynikający z aberracji sferycznej (ogniskowa soczewki jest zależna od przesunięcia promienia przechodzącego przez soczewkę względem osi optycznej soczewki) oraz rozdzielanie kolorów spowodowane

Adrian Rüfli✉

Pracownia Testów i Obrazowania Molekularnego, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2021_527

✉ autor korespondujący: arufli@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: MINFLUX, STED, mikroskopia super-rozdzielcza, mikroskopia fluorescencyjna

WYBRANE RODZAJE TECHNIK MIKROSKOPII OPTYCZNEJ

Techniki mikroskopii optycznej charakteryzują się zastosowaniem promieniowania elektromagnetycznego z zakresu widzialnego. Innymi słowy poprzez odpowiednią manipulację światłem widzialnym uzyskujemy powiększony obraz. To, w jaki sposób oświetlamy próbkę oraz manipulujemy światłem podróżującym z próbki do naszego oka, definiuje podrodzaj stosowanej techniki.

MIKROSKOPIA JASNEGO ORAZ CIEMNEGO POLA

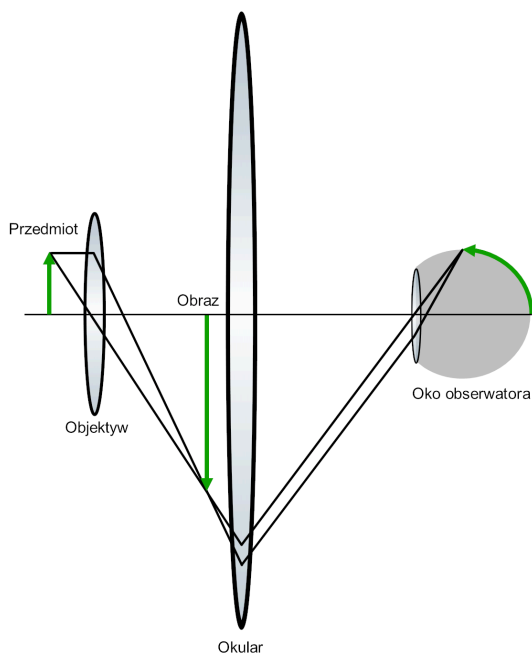
Mikroskopia jasnego pola to podstawowa i najstarsza technika mikroskopowa. Polega na oświetleniu próbki przez źródło promieniowania. Następnie światło rozproszone oraz nierozproszone przez próbkę jest zbierane i powiększane przez obiektyw. Obraz widoczny przez okular składa się z przyciemnionego obiektu na jasnym tle. Oznacza to, że kontrast między obiektem a tłem jest bardzo niski, co znacznie utrudnia rozpoznanie szczegółów badanej próbki.

Aby zwiększyć kontrast opracowano mikroskopię ciemnego pola. Obraz pozyskany tą metodą charakteryzuje się ciemnym tłem oraz jasnym obiektem. Dodatkowo, często niewidoczne w mikroskopii jasnego pola elementy i szczegóły są wyraźnie rozpoznawalne. Wyżej opisany efekt uzyskuje się poprzez wprowadzenie współosiowo krążka w wiązkę światła oświetlającego próbkę. Światło oświetlające jest skupiane w płaszczyźnie próbki, dlatego umieszczenie odpowiedniej wielkości krążka w jego osi doprowadzi do usunięcia części promieni. Gdy w płaszczyźnie próbki nie znajduje się żaden rozpraszający obiekt, światło nie dostanie się do obiektywu, ponieważ krążek blokuje światło, które padało by na soczewkę obiektywu. Dopiero umieszczenie rozpraszającej światło próbki spowoduje rozproszenie części promieni umożliwiając ich dostanie się do obiektywu. Dzięki temu w obiektywie widoczne będą jedynie fotony, które uległy interakcji z próbką, tym samym zwiększając kontrast [4].

MIKROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

Obok technik mikroskopowych powstałych z mikroskopii pola jasnego warto zwrócić uwagę na mikroskopię fluorescencyjną. Określenie „mikroskopia fluorescencyjna” jest bardzo szerokie i obejmuje wszelkie techniki wykorzystujące zjawisko fluorescencji jako źródło sygnału obrazowania [5].

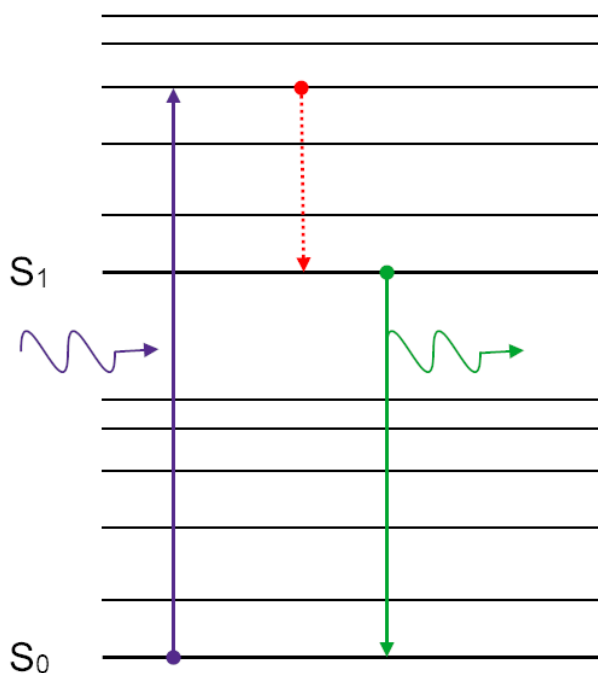
Fluorescencja jest zjawiskiem fizycznym i stanowi jeden z rodzajów interakcji światło – materia. Aby dana substancja była fluorescencyjna, musi zawierać odpowiednie układy elektronowe w strukturze. Główną cechą tych układów jest możliwość absorpcji energii fotonu wzbudzającego. Nadmiar energii jest następnie wypromieniowany jako foton o mniejszej energii od fotonu wzbudzającego. Innymi słowy, wymagany jest układ posiadający co najmniej dwa stany energetyczne: stan podstawowy oraz stan wzbudzony. W technikach mikroskopii fluorescencyjnej, sygnał fluorescencyjny często pochodzi od cząsteczek zawierają-



Rycina 1. Schemat optyczny podstawowego mikroskopu optycznego składającego się z dwóch soczewek. Obraz rzekomy widziany okiem jest odwrócony względem obserwowanego przedmiotu. Wartość powiększenia uzyskiwanego takim układem jest równa iloczynowi powiększenia obydwu soczewek.

aberracją chromatyczną (zależność współczynnika załamania światła od długości fali światła, w efekcie ogniskowa danej soczewki jest zależna od długości fali światła promienia przechodzącego przez nią). Dopiero w 1830 roku Joseph Jackson Lister wraz z Williamem Tulleyem stworzyli układ korygujący te podstawowe wady [2]. W efekcie od 1830 roku komórki stały się jednym z głównych przedmiotów badań biologii oraz medycyny.

Dzięki możliwości obserwacji życia na poziomie mikroorganizmów rozwój biologii bardzo przyspieszył. Przed powstaniem mikroskopii ludzkość nie posiadała narzędzi do zrozumienia mechanizmów fizjologicznych naszych ciał lub pochodzenia chorób. Naukowcy byli ograniczeni w badaniu ludzkiego organizmu do szczegółów rozróżnialnych ludzkim okiem. To właśnie mikroskop pozwolił na stwierdzenie istnienia bakterii, grzybów jednokomórkowych, różnorodnych mikroorganizmów czy nawet plemników. Procesy fizjologiczne były poznane tylko powierzchownie, a mikroskop umożliwił ich dogłębne zrozumienie. Bez mikroskopii nie powstałyby inne wynalazki, lekarstwa, szczepionki, itp. Co istotne, mikroskopia odgrywa kluczową rolę nie tylko w biologii, ale także w innych dziedzinach nauki: od kontroli jakości w przemyśle, przez narzędzia umożliwiające tworzenie zminiaturyzowanych układów elektronicznych, takich jak telefony komórkowe, zastosowania w analizie składu próbek geologicznych czy metalurgii [3]. Bez cienia wątpliwości, każdy człowiek będący częścią cywilizacji, codziennie korzysta z ułatwień wynikających z zastosowania mikroskopii.



Rycina 2. Przedstawienie układu z wieloma poziomami energetycznymi. Poziomy S_0 jest poziomem podstawowym, natomiast poziom S_1 jest poziomem wzbudzonym. Pozostałe poziomy przedstawiają stany oscylacyjne. Foton wzbudzający przedstawiony fioletową, pofalowaną strzałką powoduje wzbudzenie do poziomu oscylacyjnego w stanie wzbudzonym. Wytracanie energii poprzez np. wibracje, powoduje przejście do poziomu S_1 w stanie wzbudzonym i jest przedstawione jako czerwona, przerywana strzałka. Ten proces jest powodem przesunięcia Stokesa polegającego na tym, że wyemitowany foton (zielona, pofalowana strzałka) ma niższą energię od fotonu wzbudzającego.

cych organiczne fluorofory. Organiczny fluorofor to część cząsteczki posiadająca wcześniej wspomniany układ z co najmniej dwoma poziomami energetycznymi. Poziomy energetyczne odnoszą się do właściwości elektronowych i zostały schematycznie przedstawione na rycinie 2. Dany fluorofor posiada stan podstawowy, czyli stan, w którym znajduje się z największym prawdopodobieństwem przy braku czynników wzbudzających. Taki fluorofor posiada liczbę poziomów energetycznych o wyższej energii. Różnica energii stanu podstawowego i stanu wzbudzonego jest równa energii potrzebnej do wzbudzenia fluoroforu ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. To oznacza, że w przypadku fluorescencji foton wzbudzający dany fluorofor musi posiadać energię odpowiadającą przerwie energetycznej między stanem podstawowym a stanem wzbudzonym. Ta energia jest ściśle zdefiniowana dla danego układu i wynika z kwantowej natury materii oraz oddziaływań w skali cząsteczkowej. Fluorofor może znajdować się w stanie wzbudzonym przez różny okres, w zależności od rodzaju układu. Dla typowych fluoroforów organicznych jest to czas z zakresu 10^{-10} – 10^{-7} s. Ta wartość jest nazywana czasem życia fluorescencji i podobnie jak przy rozpadzie radioaktywnym, opisuje rozkład prawdopodobieństwa czasu przebywania w stanie wzbudzonym i nie powinna być rozumiana jako dokładna wartość czasu życia każdego wzbudzonego fluoroforu danego układu. Podczas przebywania w stanie wzbudzonym cząsteczka traci energię. Energia cząsteczki jest tracona głównie w formie wibracji, jednak istnieje rów-

nież wiele mechanizmów powodujących stopniowe obniżenie energii wzbudzonego fluoroforu. Dlatego gdy dojdzie do emisji fotonu fluorescencji, energia tego fotonu przestaje być równa energii fotonu wzbudzenia. W efekcie długość fali emisji fluorescencji jest przesunięta w kierunku dłuższych fal światła w stosunku do fal wzbudzających. Dłuższe fale światła charakteryzują się niższą energią w porównaniu do krótszych fal. Sumując energię fotonu fluorescencyjnego oraz energię wytraconą przez wzbudzony fluorofor w sposób nieradiacyjny np. na drodze wibracji, otrzymamy energię odpowiadającą energii przerwy energetycznej między stanem wzbudzonym a stanem podstawowym, spełniając prawo zachowania energii. Przesunięcie długości fali emisji względem długości fali wzbudzenia jest nazywane przesunięciem Stokesa [6].

Jak wspomniano wcześniej, mikroskopia fluorescencyjna wykorzystuje fotony powstałe w procesie fluorescencji jako źródło sygnału. Oznacza to, że taki mikroskop obok obiektywu i okularu, musi być wyposażony w źródło wzbudzenia oraz system separujący promieniowanie wzbudzenia od promieniowania emisji. Często wykorzystywanym układem jest układ epi-fluorescencyjny. Przedrostek „epi” świadczy o tym, że promień wiązki wzbudzenia i układ detekcji emisji są po tej samej stronie próbki. Jako źródło promieniowania wzbudzenia wykorzystywane są lampy ksenonowe, lampy rtęciowe, lasery, diody LED, itp., w połączeniu z odpowiednimi filtrami. Układ detektora często jest wyposażony w zwierciadło dichroiczne, czyli zwierciadło przepuszczające np. jedynie fotony emisji fluorescencji. Fotony o długości fali wzbudzenia zostają odbite. Poprzez umieszczenie detektora za zwierciadłem dichroicznym jesteśmy w stanie rejestrować sygnał odpowiadający długości fali emisji próbki [5].

W większości przypadków badana próbka nie posiada wystarczającej ilości fluoroforów, aby móc ją zobrazować. Sygnał fluorescencji pochodzący od niespreparowanej znacznikami fluorescencyjnymi próbki jest nazywany autofluorescencją, czyli fluorescencją własną. Głównym atutem mikroskopii fluorescencyjnej jest możliwość stosowania specjalnych znaczników fluorescencyjnych. Taki znacznik jest cząsteczką fluorescencyjną posiadającą pewną specyficzność barwienia. Może wybiórczo wiązać się np. jedynie z daną tkanką, białkiem, cząsteczką, itd. Analogicznie, w mikroskopii jasnego pola stosowane jest wybarwienie np. metodą Grama, umożliwiające rozróżnienie bakterii ze względu na rodzaj budowy ściany komórkowej. Wiele lat rozwoju mikroskopii pozwoliło na zaprojektowanie i syntezę całej gamy barwników, umożliwiających selektywne barwienie celów biologicznych. W efekcie poprzez zastosowanie różnych barwników fluorescencyjnych można uzyskać nie tylko wysoki kontrast barwionego elementu próbki, ale również współlokalizować np. dwa białka wybarwione dwoma różnymi znacznikami.

MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Podstawowe techniki mikroskopii fluorescencyjnej nadal charakteryzują się ograniczoną rozdzielczością i kontrastem. Mikroskopia konfokalna znacząco polepszyła jakość obrazów oraz umożliwiła obrazowanie stosunko-

wo grubych próbek. Mikroskopia konfokalna w znaczący sposób polepsza kontrast, rozdzielczość oraz ogranicza zakres płaszczyzny ogniskowej, z której jest zbierane światło. Dzięki temu jest możliwe obrazowanie próbek o większym przekroju niż w mikroskopii epi-fluorescencyjnej. Możliwe jest również wykonywanie obrazów płaszczyzn xz lub yz (gdzie z to oś optyczna prostopadła do próbki) oraz tworzenie tzw. z -stosów, czyli serii obrazów, w których każdy kolejny ma nieco przesuniętą płaszczyznę ogniskową względem ostatniego, w efekcie obrazując trójwymiarową przestrzeń próbki. W przeciwieństwie do mniej rozwiniętych metod mikroskopowych, w mikroskopii konfokalnej stosuje się specjalne przesłony oraz odpowiedni układ umożliwiający dokładne sterowanie zarówno skupioną wiązką promieniowania wzbudzającego, jak i promieniowania emisji. Najczęściej stosuje się układ wykorzystujący skanowanie laserem lub z wirującym dyskiem. W efekcie podczas danego momentu pomiaru, miejsce wzbudzenia jak i miejsce zbierania sygnału są ściśle ograniczone w osiach x , y oraz z . W układzie skanującego lasera zarówno układ detekcji jak i układ wzbudzenia są przesuwane względem próbki i zbierane są informacje pomiarowe piksel po pikselu. Natomiast mikroskopy wykorzystujące wirujący dysk są wyposażone w dysk Nipkowa oraz mikrosoczewki. Dysk Nipkowa to wirująca tarcza wyposażona w szereg przysłon, czyli małych otworków ułożonych z lekkim przesunięciem względem siebie, wzdłuż promienia tarczy. Gdy dysk jest wprawiony w ruch obrotowy, światło przechodzące przez układ mikrosoczewek oraz przesłony jest rejestrowane przez detektor. W efekcie otrzymujemy obraz. Ze względu na to, że przysłony na tarczy ruszają się ruchem obrotowym, efektem rejestrowania fotonów z jednej przesłony będzie obraz o kształcie łuku.

LIMIT DYFRAKCJI ABBEGO

Korzystając z mikroskopu konfokalnego osiąga się granicę możliwości klasycznej mikroskopii optycznej. Przy wykorzystaniu optymalnego układu pomiarowego z obiektywem o wysokiej aperturze numerycznej nawet po zlokalizowaniu pojedynczego źródła fotonów, czyli np. pojedynczego fluoroforu, na obrazie pomiarowym nie będzie on rzeczywistych rozmiarów cząsteczki fluoryzującej czy fotonu. Sygnał pomiarowy będzie rozmytą plamą o ściśle zdefiniowanym rozkładzie przestrzennym, charakterystycznym dla danego układu optycznego oraz próbki. Ten rozkład jest nazywany funkcją rozmycia punktu (ang. *Point Spread Function*, PSF). Funkcja ta w bezpośredni sposób wpływa na rozdzielczość systemu. W optyce jako rozdzielczość rozumiana jest najmniejsza odległość między dwoma źródłami punktowymi fotonów, przy której jest możliwe ich rozróżnienie. PSF punktowego źródła fotonów w wyidealizowanej sytuacji przyjmuje formę plamki Airy'ego, czyli okrągłej plamy o malejącej intensywności wzdłuż jej promienia, otoczonej pierścieniami. Plamka Airy'ego jest efektem dyfrakcji, czyli natury falowej światła. W drugiej połowie XIX wieku Ernst Abbe zdefiniował teoretyczny limit rozdzielczości dla danego układu pomiarowego. Zauważył, że maksymalna rozdzielczość jest zależna od długości fali rejestrowanego światła, współczynnika załamania ośrodka oraz apertury numerycznej układu optycznego wykorzystywanego do rejestracji. Apertura numeryczna to kluczowa wielkość

charakteryzująca elementy optyczne, opisująca maksymalny kąt między osią optyczną a światłem skupianym przez soczewkę. Wzrost apertury numerycznej jest ściśle związany z polepszeniem rozdzielczości. Dzieje się tak, ponieważ każdy foton niesie informację o próbce, w związku z tym strata fotonu jest równoważna ze stratą informacji. Wzór

$$d = \frac{\lambda}{2n\sin\theta} = \frac{\lambda}{2NA}$$

jest matematyczną reprezentacją wcześniej opisanej zależności, gdzie d to rozdzielczość systemu, λ to długość obserwowanej długości fali, n to współczynnik załamania światła ośrodka, θ to maksymalna wartość kąta między osią optyczną a trajektorią fotonu, pod którym foton może padać na obiektyw, NA to apertura numeryczna obiektywu.

Przy podstawieniu wartości typowych dla mikroskopów konfokalnych, wartość rozdzielczości d jest w przybliżeniu równa 200 nm i zwykle jest aproksymowana jako połowa długości obserwowanej fali światła. Taka wartość jest znacząco mniejsza od wielkości pojedynczej komórki, jednak nauka wraz z jej postępem, coraz częściej wymaga rozdzielczości z zakresu rozmiarów podstawowych cząsteczek biologicznych takich jak np. białka. Dlatego naukowcy opracowali szereg metod pozwalających na ominięcie limitu Abbego, z których część będzie przedstawiona poniżej [7].

RODZAJE TECHNIK MIKROSKOPII SUPER-ROZDZIELCZEJ

Jak wyżej wspomniano, naukowcy znaleźli sposoby na przekroczenie limitu Abbego, tym samym umożliwiając obrazowanie procesów mikroskopowych ze wcześniej niespotkaną szczegółowością. W dziedzinie mikroskopii super-rozdzielczej, techniki są dzielone na dwie główne podkategorie. Pierwszą podkategorią są metody deterministyczne, drugą jest mikroskopia stochastyczna. Nazwa pierwszej podkategorii świadczy o określoności metody. W metodach deterministycznych pozycje fluoroforów są wyznaczane poprzez pomiar bezpośredni. Aparatura pomiarowa dostarcza informacje w formie lokalizacji w obrębie pola widzenia. Ta informacja może być dostarczana np. w formie pikseli o wyższej intensywności w obrębie obrazu. Otrzymane piksele o wyższej intensywności niosą pełną informację pomiarową, a rozdzielczość poniżej limitu Abbego wynika z procesu pomiarowego. Przykładem deterministycznej techniki mikroskopii super-rozdzielczej jest technika STED (ang. *Stimulated Emission Depletion Microscopy*), która dokładniej będzie opisana w dalszej części tekstu. Obok techniki STED warto wspomnieć o technice SIM (ang. *Structured Illumination Microscopy*), gdzie próbka jest wzbudzana wiązką, która w płaszczyźnie próbki posiada ściśle określony wzór powstały w efekcie interferencji. Przykładem takiego wzoru mogą być prążki moiré. Poprzez matematyczną dekonwolucję szeregu obrazów otrzymuje się obraz super-rozdzielczy [8].

Drugą podkategorią jest mikroskopia stochastyczna. Stochastyczność, czyli losowość procesu wynika z wykorzystania znaczników fluorescencyjnych o bardzo specyficznych właściwościach fluorescencyjnych. Chemiczne właściwości znaczników charakteryzują się tym, że rozważając całą populację znaczników związanych z celami biologicznymi,

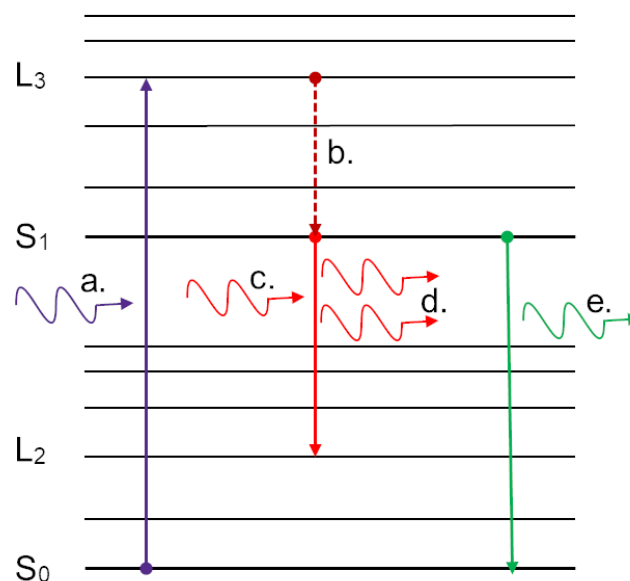
większość z nich, przez dominujący czas będzie w formie niewykazującej fluorescencji. Dzięki temu można przyjąć, że wykonując pojedynczy obraz, każda grupa pikseli o wyższej intensywności pochodzi od tylko jednego fluoroforu. Następnie przy wykorzystaniu odpowiednich algorytmów oraz znając PSF, możliwe jest matematyczne wyznaczenie najprawdopodobniejszej lokalizacji źródeł promieniowania danej grupy pikseli o wyższej intensywności. Po wykonaniu takiej operacji matematycznej, analizowany jest kolejny obraz tej samej próbki wykonany po wcześniej analizowanym obrazie. Widoczne na nim piksele wyższej intensywności będą pochodziły od nieco innej populacji fluorescencyjnie aktywnych znaczników. Proces jest przeprowadzany wielokrotnie, zwiększając prawdopodobieństwo zebrania sygnału ze wszystkich oznakowanych cząsteczek. Lokalizacje znaczników wyznaczone ze wszystkich obrazów, są następnie nakładane na pojedynczy obraz super-rozdzielczy. Głównym parametrem rozróżniającym metody stochastyczne jest rodzaj zastosowanych znaczników, czyli sposób uzyskiwania populacji cząsteczek aktywnych fluorescencyjnie oraz nieaktywnych. Przykładem mikroskopii stochastycznej są techniki SOFI (ang. *Super-resolution Optical Fluctuation Imaging*), PALM (ang. *Photoactivated Localization Microscopy*) oraz STORM (ang. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [8,9].

Obok wcześniej wymienionych podkategorii istnieją też metody, nie dające się jednoznacznie sklasyfikować. Jedną z nich, jest technika MINIFLUX (ang. *MINimal photon FLUXes*), która zostanie opisana w dalszej części [10].

MIKROSKOPIA STED

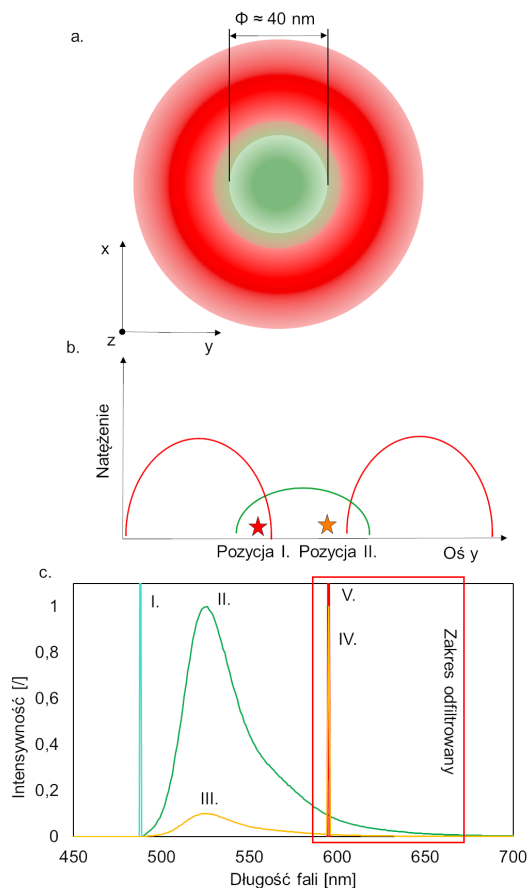
Nazwa STED pochodzi z języka angielskiego i jest skrótem od *stimulated-emission-depletion*, czyli stymulowanego wygaszania emisji. Technika powstała w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku pod kierownictwem Stefana Hella, który w roku 1994 opublikował pierwszy artykuł dotyczący swojego odkrycia [11]. Wprawdzie istnieje patent V.A. Okhonina, pracownika Instytutu Biofizyki Akademii Nauk ZSSR, złożony w 1986 roku, opisujący analogiczny pomysł, jednak to Stefanowi Hellowi przyznano w 2014 roku obok Erica Betziga oraz Williama E. Moerner Nagrodę Nobla za rozwój super-rozdzielczej mikroskopii fluorescencyjnej. Aby zrozumieć podstawy teoretyczne mikroskopii STED konieczne jest zrozumienie procesu nazywanego emisją wymuszoną. Schemat tego procesu jest przedstawiony na rycinie 3.

Obok absorpcji oraz emisji spontanicznej, emisja wymuszona to jedna z możliwości interakcji elektronów ze światłem. Fluorofor w stanie wzbudzonym może przejść do stanu podstawowego albo na drodze spontanicznej emisji fotonu, czyli fluorescencji, albo na drodze emisji wymuszonej. Podczas gdy emisja spontaniczna zachodzi samorzutnie, emisja wymuszona następuje pod wpływem interakcji wzbudzonego fluoroforu z fotonem inicjującym. Foton wyemitowany w procesie emisji wymuszonej jest spójny z fotonem inicjującym. Oznacza to, że obydwa fotony posiadają równą energię, fazę oraz polaryzację [6]. Jednak emisja wymuszona niekoniecznie musi zachodzić ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. W rzeczywistych systemach



Rycina 3. Wykres przedstawiający poziomy energetyczny: a. Foton wzbudza powodujący przejście ze stanu podstawowego do poziomu oscylacyjnego stanu wzbudzonego L_3 . b. Relaksacja bezpromienista do poziomu wzbudzonego S_1 . c. Foton inicjujący pochodzący z wiązki lasera wygaszającego. d. Para fotonów wynikających z emisji wymuszonej. Przejście energetyczne z poziomu wzbudzonego S_1 do poziomu oscylacyjnego L_2 . Fotony są ze sobą spójne, co oznacza, że długość promieniowania odpowiada długości fali lasera wygaszającego oraz jest równa różnicy energii poziomów S_1 oraz L_2 . e. Foton resztkowy będący rezultatem niewystarczającej mocy wiązki wygaszającej. Jego długość odpowiada długości fluorescencji emitera znajdującego się we wzbudzającym polu laserowym.

obok stanu podstawowego i stanów wzbudzonych istnieją również stany oscylacyjne, które znajdują się pomiędzy tymi stanami energetycznymi. Absorpcja fotonu wiąże się ze wzbudzeniem na jeden ze wcześniej wspomnianych stanów oscylacyjnych. Po wstępnej relaksacji bezpromienistej do podstawowego poziomu wzbudzonego S_1 , emisja wymuszona będzie polegała na przejściu z tego stanu do stanu o niższej energii. Różnica energetyczna poziomu, na którym proces emisji wymuszonej się rozpoczyna oraz poziomu, na którym emisja wymuszona się kończy odpowiada długości fali fotonu inicjującego. Jeżeli rozbudujemy układ mikroskopu konfokalnego, który jest wyposażony w laser wzbudzenia, o laser wygaszający, możemy wykorzystać emisję wymuszoną do stworzenia ograniczonej przestrzennie wiązki wzbudzenia. W tym celu należy odpowiednio zmodyfikować kształt wiązki lasera wygaszającego. Najczęściej wykorzystywanym kształtem wiązki w płaszczyźnie próbki jest kształt torusa (Ryc. 4 przedstawia podstawy techniki STED). Oznacza to, że wiązka lasera wygaszającego w płaszczyźnie próbki będzie przypominała obwarzanek, którego otwór będzie miał średnicę około 40 nm. Następnie przy nałożeniu wiązki wzbudzającej na wiązkę wygaszającą otrzymamy próbnik fluorescencyjny. Jeżeli wyznakujemy próbkę znacznikiem fluorescencyjnym, którego energia ekscytacji odpowiada energii wiązki lasera wzbudzającego, natomiast różnica energii stanu wzbudzonego i jednego z energetycznie niższych poziomów oscylacyjnych odpowiada energii wiązki wygaszającej, będziemy mogli zarejestrować jego fluorescencję z poniżejdyfrakcyjną rozdzielczością. Naprowadzając nasz próbnik fluorescencyjny na populację fluoroforów będziemy mieli do czynienia z dwoma zjawiskami fizycznymi. Jeżeli fluorofor znajduje się w obrębie środka



Rycina 4. Podstawy techniki STED. **a.** Schematyczne przedstawienie rzutu xy PSF próbnika fluorescencyjnego STED w płaszczyźnie ogniskowej. Czerwony torus przedstawia wiązkę wygaszającą, natomiast na zielono przedstawiona jest wiązka wzbudzenia. Efektywna średnica wiązki wzbudzającej została oznaczona symbolem Φ . **b.** Wykres natężenia pola laserowego od przemieszczenia w osi y . Na czerwono zaznaczona została wiązka wygaszająca, natomiast na zielono – wiązka wzbudzająca. Gdy badany fluorofor znajdzie się w pozycji I. (czerwona gwiazdka) dojdzie głównie do emisji wymuszonej. Dlatego jego emisja zostanie oddzielona od rejestrowanego obrazu. W tej pozycji jedynie bardzo mała ilość wyemitowanych fotonów będzie posiadała długość fali fluorescencji niewygaszonej. Ich ilość jest bezpośrednio zależna od mocy wiązki wygaszającej. Jeżeli fluorofor znajduje się w pozycji II. (pomarańczowa gwiazdka), będzie on oddziaływał jedynie z promieniowaniem wzbudzającym. Dzięki temu emisja fluorescencji będzie rejestrowana przez detektor. Centrum wzbudzające próbnika wynosi w przybliżeniu 40 nm i jest zależne od mocy wiązki wygaszającej. **c.** Widmo spektralne. Na turkusowo przedstawiona jest wiązka lasera wzbudzającego, którego maksimum jest oznaczone jako I. Kolorem zielonym przedstawione jest pasmo emisji fluorescencji znacznika. Maksimum tego pasma jest oznaczone jako II. Pomarańczowym kolorem zaznaczono emisję z obszaru wygaszanego. Lokalne maksimum zaznaczone III. jest efektem niewystarczającej mocy wiązki wygaszającej, natomiast maksimum IV. jest efektem zjawiska wymuszonej emisji pod wpływem lasera wygaszającego przedstawionego na czerwono oraz oznaczonego V. Czerwonym polem oznaczono zakres spektralny, który jest oddzielony od wiązki rejestrowanej detektorem. Moc wiązki wygaszającej jest około 100-krotnie większa od mocy wiązki wzbudzającej. Przy optymalnie dobranych warunkach pomiarowych maksimum lokalne III. będzie dążyło do zera, natomiast maksimum lokalne IV. będzie wykazywało większą intensywność.

torusa wiązki wygaszającej, będzie on napromieniowywany jedynie wiązką wzbudzającą. W efekcie fluorofor przejdzie do wyższego stanu oscylacyjnego stanu wzbudzonego, aby następnie przejść z powrotem do stanu podstawowego, czemu towarzyszyć będzie spontaniczna emisja fotonu fluorescencji. Jeżeli jednak rozważany fluorofor jest przesunięty względem środka wiązki wzbudzającej, będzie on ulegał działaniu zarówno wiązki wzbudzenia, jak i wiązki wygaszającej. Oznacza to, że jeżeli zostanie on wzbudzony

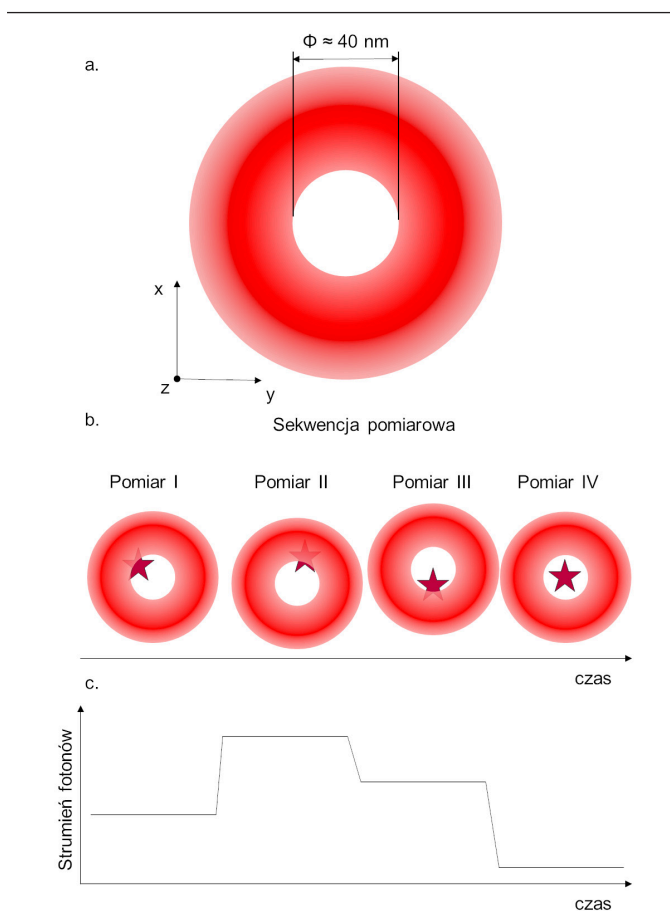
pod wpływem wiązki wzbudzającej i ulegnie relaksacji bezpromienistej do podstawowego poziomu wzbudzonego S_1 , foton wiązki wygaszającej może doprowadzić do procesu emisji wymuszonej ze stanu wzbudzonego do odpowiedniego poziomu oscylacyjnego stanu podstawowego. Energia fotonu wyemitowanego w procesie emisji wymuszonej będzie niższa, a więc przesunięta w stosunku do fotonu wyemitowanego przez fluorofor w centrum torusa o wyższej energii. Dzięki takiemu zabiegowi uzyskujemy rozdział spektralny fotonów wyemitowanych ze środka próbnika w stosunku do fotonów wyemitowanych z obrębu torusa wygaszającego. Jeżeli układ detekcji będzie wyposażony w optykę przepuszczającą jedynie długość fali fluorescencji pochodząca od fluoroforów z centrum, rozdzielczość uzyskanego obrazu będzie zależna od wielkości otworu torusa wygaszającego.

Jedną z głównych wad techniki STED jest wysoka moc wiązki wygaszającej, mogąca powodować fotowypalenie oraz zniszczenie próbki. Jeżeli zostanie wykorzystana wiązka o niższej mocy, prawdopodobieństwo wymuszonej emisji spada, na skutek czego część fluoroforów zlokalizowanych w obrębie torusa wygaszającego może ulec emisji spontanicznej, uniemożliwiając poniżejdyfrakcyjną rozdzielczość. Innymi słowy, uzyskana rozdzielczość jest zależna od mocy wiązki wygaszającej, a jej zmiana umożliwia regulację PSF. Dodatkowo, rozdzielczość techniki STED zależy od średnicy ograniczonej przestrzennie wiązki wzbudzenia. Ta wiązka wzbudzenia jest ograniczona torusem wygaszającym, którego kształt powstaje wskutek odpowiedniej modulacji wiązki laserowej. Modulacja wiązki laserowej polega na wykorzystaniu interferencji konstruktywnej oraz destruktywnej fal światła i również jest ograniczona dyfrakcją. Aktualny stan nauki nie pozwala na dalsze pomniejszenie efektywnej średnicy wiązki wzbudzającej.

Mikroskopia STED jest zaliczana do deterministycznych metod mikroskopii super-rozdzielczej, ponieważ położenie znaczników jest wyznaczane bezpośrednio próbnikiem fluorescencyjnym. Rejestrowany obraz nie wymaga żadnych dodatkowych operacji matematycznych, a rozdzielczość wynika bezpośrednio z aparatury pomiarowej [12].

MIKROSKOPIA MINIFLUX

Mikroskopia MINIFLUX znacząco różni się od poprzedzających ją technik mikroskopii super-rozdzielczych. Nazwa będąca skrótem od *MIN*imal *photon FLUX*es, czyli minimalnych strumieni fotonów, sugeruje mniejszą zależność rozdzielczości obrazu od ilości fotonów [10]. Jak wcześniej wytłumaczono, technika MINIFLUX łączy podejście deterministyczne z podejściem stochastycznym. Podobnie jak mikroskopia STED, mikroskop do techniki MINIFLUX zwykle bazuje na mikroskopie konfokalnym, rozbudowanym o układ kształtujący wiązkę próbnika świetlnego. W przeciwieństwie do techniki STED, nie korzysta się z emisji wymuszonej. Natomiast wiązka wzbudzenia jest formowana tak, by otrzymać w płaszczyźnie próbki torus. Zostało to schematycznie przedstawione na rycinie 5. Otrzymany torus charakteryzuje się centralnym minimum intensywności, otoczonym pierścieniem nasilającej się intensywności. Tak uformowana wiązka jest przesuwana po próbce, aż do za-



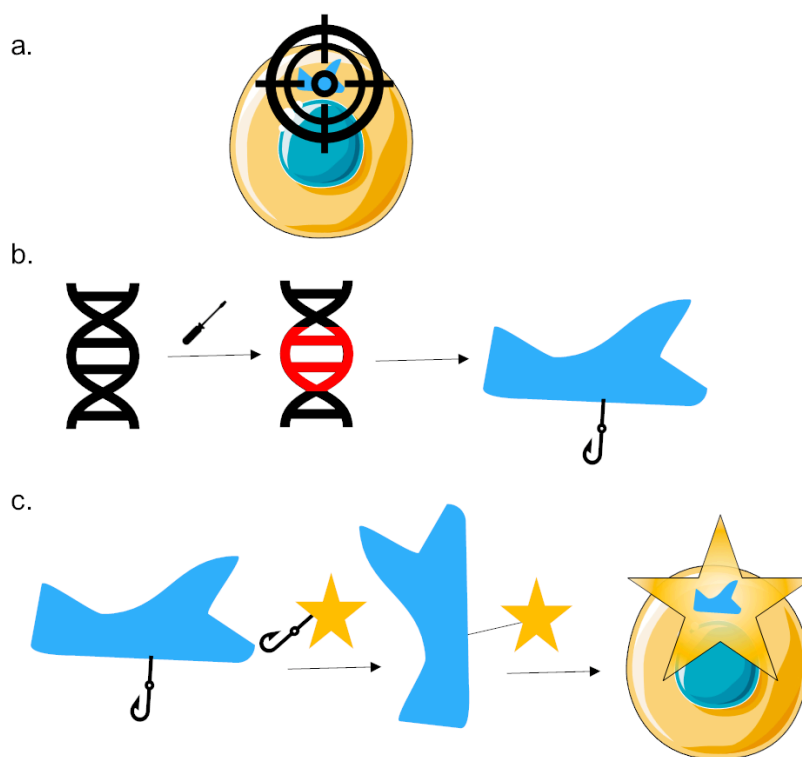
Rycina 5. Podstawy mikroskopii MINFLUX. **a.** Rzut xy w płaszczyźnie ogniskowej próbnika fluorescencyjnego. Na czerwono przedstawiony został rozkład wiązki. W centrum widoczne jest minimum natężenia pola laserowego. **b.** Schematyczne przedstawienie prostej sekwencji pomiarowej. Wykres przedstawia zmianę pozycji próbnika fluorescencyjnego podczas gdy pozycja fluoroforu jest stała. **c.** Wykres strumienia fotonów rejestrowanego przez detektor. Oś czasu oraz wartości natężenia strumienia fotonów wykresu c. odnoszą się do sekwencji pomiarowej przedstawionej w punkcie b. Im bliżej fluorofor znajduje się minimum próbnika fluorescencyjnego, tym mniejsza ilość fotonów jest rejestrowana przez detektor. Z tego wynika, że strumień fotonów jest odwrotnie proporcjonalny do uzyskanej rozdzielczości techniką MINFLUX.

rejestrowania sygnału fluorescencji, który jest równoważny z napotkaniem znacznika fluorescencyjnego. Po wstępnym zlokalizowaniu fluoroforu rozpoczyna się sekwencja triangulacyjna, podczas której próbnik fluorescencyjny jest przesuwany w ściśle zdefiniowany sposób, w co najmniej cztery pozycje pomiarowe. Rozważając idealny przypadek, w którym fluorofor znajduje się centralnie w minimum intensywności torusa próbnika wzbudzającego, detektor nie będzie rejestrował żadnych fotonów. Ponieważ funkcja opisująca rozkład przestrzenny intensywności torusa wzbudzającego jest znana, posiadanie wartości intensywności fluorescencji badanego znacznika z czterech pozycji pomiarowych umożliwia obliczenie dokładnej lokalizacji źródła fotonów. Dodatkowo, im lepiej jest oszacowana pozycja znacznika podczas wstępnej lokalizacji, tym mniejsza ilość fotonów będzie rejestrowana, ponieważ tym bliżej minimum intensywności torusa wzbudzającego znajduje się znacznik. Z tego wynika, że zależność rozdzielczości od fotonów fluorescencji jest odwrotnie proporcjonalna. Od tej prawidłowości wzięła się nazwa techniki. Dotychczas opisana procedura może być zakwalifikowana jako metoda deterministyczna. Jednak,

jeżeli dwa znaczniki znajdują się blisko siebie, sekwencja triangulacyjna nie będzie w stanie wyznaczyć pozycji i pomiar obydwu fluoroforów zostanie odrzucony. W tym miejscu naukowcy posiłkują się metodami stochastycznymi. W celu zapobiegania znalezieniu się dwóch aktywnych fluorescencyjnie cząsteczek w obrębie znacznika fluorescencyjnego stosuje się znaczniki mogące ulec fotoaktywacji lub znaczniki migotające. Dobranie cząsteczek jako znaczniki, które wykazują optymalne właściwości fizykochemiczne, umożliwia ograniczenie populacji aktywnych fluoroforów, tym samym pozwalając na pomiar metodą MINFLUX [10]. Połączenie podejścia stochastycznego oraz deterministycznego umożliwia otrzymanie rozdzielczości sięgającej 2 nm, podczas gdy długość typowego wiązania między dwoma atomami węgla o hybrydyzacji sp^3 wynosi 0,153 nm. Biocząsteczki zwykle składają się z dużej ilości atomów, np. trytyna, największe znane białko ludzkie, składa się z około 30 tysięcy reszt aminokwasowych. Dlatego technika MINFLUX jest potężnym narzędziem w rękach biologów, a jej rozdzielczość jest optymalna do badania procesów biomolekularnych.

ZNACZNIKI FLUORESCENCYJNE I ICH ZNACZENIE W SUPER-ROZDZIELCZEJ MIKROSKOPII

Rozważając metody mikroskopii fluorescencyjnej, obok zagadnień optyczno-technicznych, kluczową rolę odgrywają znaczniki fluorescencyjne [13]. To one pozwalają uzyskiwać obrazy super-rozdzielcze. Obok podstawowych parametrów, takich jak: długość fali wzbudzenia, czas życia fluorescencji oraz długość fali emisji, znaczniki można scharakteryzować uwzględniając sposób przełączania między stanem fluorescencyjnie aktywnym a nieaktywnym. Podczas gdy w technice STED preferowane są barwniki, które wykazują wysoką odporność na fotowysbielenie oraz są nieustannie w stanie fluorescencyjnym, w technice MINFLUX wymagane są fluorofory mogące zmieniać swój stan, czyli tak zwane fotoprzełączniki. Obok właściwości fotochemicznych, właściwości strukturalne znaczników są równie kluczowe. Dotychczas w artykule pomijany był temat sposobu znakowania celów molekularnych w próbkach biologicznych. Warto mieć na uwadze, że dla metod super-rozdzielczych, takich jak MINFLUX, wielkość cząsteczki znacznika ma istotne znaczenie. Często stosowane metody polegające na wykorzystaniu przeciwciał są nieoptymalne, ponieważ wielkość kompleksu przeciwciał może być istotnie większa od osiągalnej rozdzielczości. W związku z tym, otrzymywana rozdzielczość nie jest ograniczona limitem aparatury pomiarowej, lecz rozmiarem przeciwciała. Dlatego zostały rozwinięte między innymi metody SNAP-Tag[®], HALO-Tag[®] czy CLIP-Tag[™] [14]. Wszystkie te metody wymagają wprowadzenia w cel molekularny odpowiedniego znacznika, który nie jest fluorescencyjny. Proces w uproszczeniu jest przedstawiony na rycinie 6. Wprowadzenie znacznika często wymaga genetycznej modyfikacji badanego białka. Modyfikacja ta umożliwia następnie wprowadzenie odpowiedniego znacznika fluorescencyjnego, którego struktura chemiczna będzie powodowała wiązanie ze znacznikiem niefluorescencyjnym zmodyfikowanego genetycznie celu białkowego. Kompleks znacznika niefluorescencyjnego ze znacznikiem fluorescencyjnym jest dużo mniejszy i w



Rycina 6. Strategia obrazowania biologicznych celów molekularnych. **a.** Zidentyfikowanie celu molekularnego w komórce. **b.** Genetyczna modyfikacja prowadząca do ekspresji znacznika niefluorescencyjnego w celu przedstawionym na niebiesko. **c.** Wybarwienie próbki znacznikiem fluorescencyjnym przedstawionym jako gwiazdka, który wiąże się jedynie ze zmodyfikowanym celem molekularnym. W rezultacie istnieje możliwość lokalizacji celu molekularnego w komórce.

związku z tym jest optymalny dla technik takich jak MINFLUX.

RODZAJE FOTOPRZEŁĄCZNIKÓW

Znaczniki wykazujące właściwości fotoprzełączników można zakwalifikować w następujące kategorie: fotoaktywowalne, fotokonwertowalne, migotające oraz fotoprzełączalne. Rycina 7 schematycznie przedstawia działanie każdego omówionego rodzaju fotoprzełącznika.

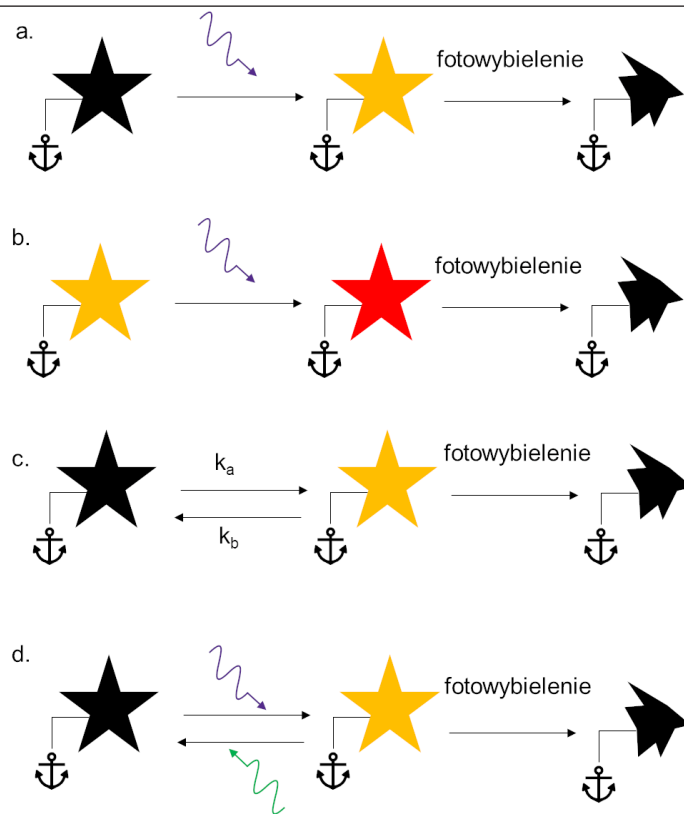
Fotoaktywowalne znaczniki w stanie początkowym są w stanie nieaktywnym fluorescencyjnie. Pod wpływem czynnika np. promieniowania odpowiedniej długości ulegają przekształceniu chemicznemu do formy aktywnej fluorescencyjnie. Po zarejestrowaniu ich sygnału ulegają nieodwracalnemu fotowybieleniu. Tego rodzaju znaczniki stanowią podstawę techniki PALM [13].

Fotokonwertowalne fluorofory w stanie pierwotnym wykazują fluorescencję o danej długości fali emisji. Pod wpływem promieniowania o odpowiedniej długości ulegają nieodwracalnemu przekształceniu chemicznemu, w efekcie, długość emisji ulega zmianie [13].

Migotające fluorofory (ang. *blinking fluorophores*) są w równowadze między dwoma formami, gdzie jedna jest formą aktywną fluorescencyjnie, a druga formą nieaktywną. W przeciwieństwie do poprzednich rodzajów fluoroforów, proces ma charakter odwracalny. W związku z tym, równowaga procesu może być przesunięta w kierunku jedne-

go z dwóch stanów. Położenie równowagi reakcji jest ściśle zależne od jej mechanizmu i w zależności od rodzaju mechanizmu, eksperymentator może wpłynąć na położenie równowagi. Przykładem mechanizmu może być równowaga kwasowo-zasadowa. W takim wypadku położenie równowagi reakcji jest zależne od pH badanej próbki oraz pK_a protonów biorących udział w reakcji. Położenie równowagi reakcji ściśle dyktuje populacje cząsteczek w stanie aktywnym i nieaktywnym fluorescencyjnie. Poprzez scharakteryzowanie różnorodnych procesów równowagowych szerokiej gamy znaczników migotających, można dobrać odpowiedni fluorofor, którego stosunek populacji aktywnych w stosunku do nieaktywnych form będzie optymalny. Znaczniki tego rodzaju mogą być wykorzystane w mikroskopii SOFI oraz MINFLUX [15].

Fotoprzełączalne znaczniki są podobne do fotoaktywowalnych znaczników. Różnią się od nich odwracalnością reakcji indukowaną promieniowaniem danej długości fali. Oznacza to, że mając cząsteczkę w stanie nieaktywnym, napromieniowanie jej promieniowaniem o długości A skutkuje przełączeniem jej w stan aktywny fluorescencyjnie. Gdy aktywna cząsteczka zostanie następnie poddana promieniowaniu o długości B, ulegnie ona przełączeniu do stanu nieaktywnego fluorescencyjnie. Teoretycznie przełączanie między stanami powinno być odwracalne, w praktyce cząsteczki po kilku cyklach mogą ulec fotowybieleniu. Fluorofory o takich właściwościach są stosowane w mikroskopii MINFLUX oraz STORM [13].



Rycina 7. Rodzaje fotoprzełączników. Symbol kotwicy przedstawia cel molekularny oznaczony znacznikiem fluorescencyjnym (gwiazdka). Dodatkowo, praktycznie każdy emiter fluorescencyjny może ulec fotowycieleniu, co jest przedstawione zniekształconą czarną gwiazdką **a**. Fotoaktywowalny fluorofor ze stanu nieaktywnego fluorescencyjnie przechodzi w stan aktywny pod wpływem fotonu (falowana, fioletowa strzałka). **b**. Fotokonwertowalny fluorofor zmienia długość emisji fluorescencji pod wpływem fotonu. **c**. Migotający fluorofor będący w równowadze. Stosunek stałych równowagi k_a/k_b opisuje prawdopodobieństwo znalezienia się danego fluoroforu w stanie aktywnym fluorescencyjnie. **d**. Fotoprzełączalny fluorofor ze stanu nieaktywnego może przejść do stanu aktywnego pod wpływem fotonu fioletowego, natomiast foton zielony powoduje powrót do stanu nieaktywnego.

PRZYKŁAD ZASTOSOWANIA TECHNIKI MINFLUX

Technika MINFLUX nie tylko umożliwia lokalizowanie cząsteczek, ale pozwala również na ich śledzenie. Ta funkcja została wykorzystana przez naukowców, którzy badali ruch białka motorycznego kinezyzna-1. Kinezyzny są znane z ich specyficznego sposobu poruszania się, przypominającego kroczenie po mikrotubulach w kierunku + wewnątrz komórki. Głównym zadaniem tego białka jest transport wewnątrzkomórkowy. Jedną z najpopularniejszych hipotez sugeruje, że ruch nie jest zasilany energią pozyskiwaną z hydrolizy cząsteczek ATP, lecz jest wynikiem ruchów Browna [16,17, 18]. Energia z hydrolizy ATP służy blokowaniu zmiany zwrotu ruchu, niczym zawór zwrotny. Ruch białka można porównać do osoby znajdującej się w morzu w pobliżu brzegu, trzymającej się liny biegnącej do lądu. Osoba jest twarzą skierowana do lądu i czeka na nadejście fali od tyłu. Energia fali jest następnie wykorzystana do przemieszczenia w kierunku brzegu. Gdy tylko woda zaczyna ponownie odpływać w kierunku morza, osoba łapie się ręką za linę, blokując oddalanie się od brzegu. Powtarzając sekwencję ruchów bez dużego wydatku energii osoba może wydostać się z wody. Kinezyzna jest dimerem, którego jedna podjednostka składa się z główki posiadającej domenę motoryczną oraz szyjki, która łączy się z szyjką drugiej podjednostki tworząc superhelisę. W eksperymencie z wykorzystaniem techniki MINFLUX naukowcy wykazali, że technika ta jest odpowiednia do badania zmian konformacyjnych biomolekuł dzięki możliwości ich śledzenia [16].

W pierwszym etapie eksperymentu jedna szyjka, będąca częścią superhelisy została oznakowana znacznikiem Alexa Fluor 488. Kontrolując stężenie ATP naukowcy byli w stanie regulować prędkość ruchu kinazy. Przy stężeniu 10 μM ATP, kinezyzna poruszała się z prędkością 280 nm/s. Śledzenie oznakowanej kinezyzny ujawniło, że wykonuje ona 4 nm półkroki oraz 8 nm kroki. Wartości pomiarowe były zbierane z rozdzielczością czasową 1 ms oraz rozdzielczością przestrzenną $\pm 1,7$ nm. W kolejnym etapie eksperymentu podwyższono stężenie ATP do poziomu fizjologicznego, czyli 1 mM. Prędkość kinezyzny wzrosła do 550 nm/s, a rozdzielczość czasowa okazała się być niewystarczająca do zarejestrowania półkroków. Rozkład wartości długości pojedynczego kroku uległ rozmyciu i wyniósł od 6 – 10 nm. Naukowcy uznali, że jest to spowodowane obrotem superhelisy podczas kroczenia. W celu potwierdzenia hipotezy oznakowali znacznikiem fluorescencyjnym obydwie szyjki kinazy. Wyniki potwierdziły hipotezę, ponieważ długość kroku znów wynosiła 8 nm. W kolejnym etapie, przy wykorzystaniu modelowania statystycznego oraz pomiarów techniką MINFLUX na kinezyynie z oznakowanymi obydwoma główkami, naukowcy postarali się odpowiedzieć na pytanie, czy ATP wiąże się do obu główek czy jedynie do związanej z mikrotubulą główki wiodącej. Zastosowana metoda wykazała zależność od stężenia ATP jedynie dla związanej główki wiodącej. Dodatkowo stosując wolno hydrolizujący analog ATP zauważyli, że czas, w którym główka jest niezwiązana z mikrotubulą nie ulega zmianie mimo

36-krotnemu obniżeniu prędkości kinezy. Oznacza to, że ATP hydrolizuje w momencie, w którym obydwie główki są złączone z mikrotubulą. W ostatnim etapie naukowcy stworzyli różne warianty kinezy, różniące się miejscem oznakowania. Dokładana analiza wyników umożliwiła na odtworzenie układu kinezy na mikrotubuli i stworzenia modelu trójwymiarowego. Badania wykazały, że w niezwiązanym stanie przejściowym superhelisa jest przesunięta ku prawej stronie względem kierunku ruchu oraz że ruch kinezy charakteryzuje się przejściem niezwiązanej z mikrotubulą główki nad związaną główką (ang. *hand-over-hand stepping*) w sposób symetryczny [19]. Opisanie eksperymenty były przeprowadzone w specjalnej komorze przepływowej, a umieszczenie znaczników na białku mogło wpłynąć na jego zachowanie, jednak technika MINFLUX umożliwia wykonywanie pomiarów również w żywych komórkach co zostało udowodnione przez grupę Jonasa Riesa w 2023 roku [20].

PODSUMOWANIE

Mikroskopia jest dziedziną, która dojrzeła wraz z ludzkością. Mimo jej historycznych początków nadal jest nieodzownym narzędziem w niezliczonych dziedzinach nauki, przemyśle, medycynie oraz wielu innych. W obliczu klasycznych metod mikroskopijnych, których rozdzielczość jest ograniczona limitem Abbego, niekonwencjonalny sposób myślenia naukowców pozwolił na obejście praw fizyki, czego dowodem jest technika MINFLUX charakteryzująca się rozdzielczością rzędu 2 nm oraz niespotykaną wcześniej wydajnością fotonową. Na niezwykle sukces technik mikroskopowych składa się zarówno postęp techniki, optyki, coraz głębsze zrozumienie procesów fotochemicznych oraz dostępność szerokiej gamy znaczników fluorescencyjnych. Te narzędzia umożliwiają zaspokojenie potrzeby coraz większej szczegółowości w nowoczesnych naukach biologicznych. Dodatkowo, MINFLUX stanowi ważne uzupełnienie metod, takich jak krystalografia lub mikroskopia krioelektronowa, umożliwiając pomiary w żywych komórkach i nie ograniczając się jedynie do metod nieuwzględniających dynamiki procesów biologicznych. Mimo wielu zalet super-rozdzielczej mikroskopii, jest to stosunkowo nowa dziedzina, która wymaga dopracowania zarówno aparatury pomiarowej, znaczników jak i protokołów przygotowania oraz pomiaru próbek i analizy uzyskanych danych. Przewyciężenie wcześniej wymienionych wyzwań pozwoli na jeszcze głębsze zrozumienie podstaw życia i umożliwi zobrazować świat nie pomijając najdrobniejszych, kluczowych szczegółów.

PIŚMIENNICTWO

1. Hawkes P W, Spence J C H (2019) Springer Handbook of Microscopy, Springer Cham
2. Croft W J (2006) Under the Microscope a brief history of microscopy, World Scientific Publishing Co Pte Ltd, Singapore
3. Amos B (2000) Lessons from the history of light microscopy. Nat Cell Biol 2: E151-E152
4. Mertz J (2019) Introduction to Optical Microscopy, Cambridge University Press, Cambridge
5. Combs Ch A, Shroff H (2017) Fluorescent Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods. Curr Protoc Neurosci 79: 2.11-2.1.25
6. Atkins P W, de Paula J (2016) Chemia Fizyczna, PWN, Warszawa
7. Lipson S G, Lipson H, Tannhauser D S (1995) Optical Physics, Cambridge University Press, Cambridge
8. Feng H, Wang X, Xu Z, Zhang X, Gao Y (2018) Single Cell Biomedicine, Springer, Singapore
9. Dertinger Th, Pallaoro A, Braun G, Ly S, Laurence T A, Weiss Sh (2013) Advances in Superresolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI). Q Rev Biophys 46: 210-221
10. Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch K C, Gynna A H, Westphal V, Stefani F D, Elf J, Hell S W (2016) Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. Science 355: 606-612
11. Hell S W, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt Lett 19: 780-782
12. Vicidomini G, Bianchini P, Diaspro A (2018) STED super-resolved microscopy. Nat Methods 15: 173-182
13. van de Linde S, Sauer M (2014) How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. Chem Soc Rev 43: 1076-1087
14. Hoelzel C A, Zhang X (2020) Visualizing and Manipulating Biological Processes by Using HaloTag and SNAP-Tag Technologies. ChemBioChem 21: 1935-1946
15. Rimmel M, Scheiderer L, Butkevich A N, Bossi M L, Hell S W (2023) Accelerated MINFLUX Nanoscopy, through Spontaneously Fast-Blinking Fluorophores. Small 19: 2206026
16. Fox R, Choi M (2001) Rectified Brownian motion and kinesin motion along microtubules. Phys Rev E 63: 051901
17. Kanada R, Kuwata T, Kenzaki H, Takada Sh (2013) Structure-based Molecular Simulations Reveal the Enhancement of Biased Brownian Motions in Single-headed Kinesin. PLoS Comput Biol 9: e1002907
18. Hwang W, Karplu M (2019) Structural basis for power stroke vs. Brownian ratchet mechanisms of motor proteins. PNAS 116: 19777-19785
19. Wirth J O, Scheiderer L, Engelhardt T, Engelhardt J, Matthias J, Hell S W (2023) MINFLUX dissects the unimpeded walking of kinesin-1. Science 379: 1004-1010
20. Degushi T, Iwanski M K, Schwntarra E-M, Heidebrecht Ch, Schmidt L, Heck J, Weihs T, Schnorrenberg S, Hoess Ph, Ries J (2023) Direct observation of motor protein stepping in living cells using MINFLUX. Science 379: 1010-1015

Can the laws of physics be circumvented? On methods of super-resolution fluorescence microscopy

Adrian Růfli✉

Laboratory of Molecular Assays and Imaging, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

✉corresponding author: arufli@ibch.poznan.pl

Keywords: MINFLUX, STED, super-resolution microscopy, fluorescence microscopy

ABSTRACT

Biological sciences are increasingly uncovering the foundations of life in greater detail, made possible by the development of research methods enabling exploration at the nanometer scale. Optical microscopy, a field with a significant contribution to current knowledge, is inherently limited by the Abbe limit, stemming from the fundamental wave properties of light. Through the efforts of scientists, this limit can be circumvented, as evidenced by STED and MINFLUX techniques. STED allows imaging with a resolution down to 40 nm, while MINFLUX enables resolution as fine as 2 nm. Both techniques require labelling of biological molecular targets with fluorescent markers and enable imaging in living cells, facilitating the study of dynamic biological processes. This article provides an introduction to super-resolution techniques STED and MINFLUX, demonstrating their utility through the example of studying kinesin movement along microtubules using the MINFLUX technique.

