

Superrozlišení v optické mikroskopii

Nobelova cena za chemii za rok 2014

Jaromír Plášek, Praha

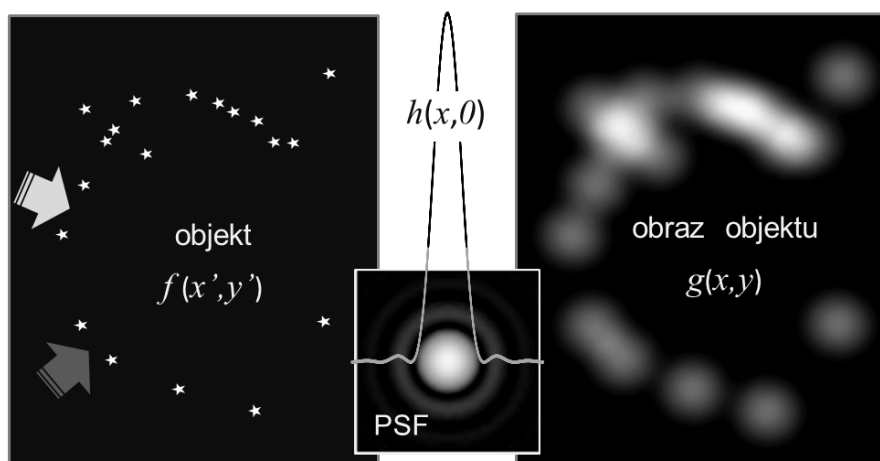
Bez světelné mikroskopie by nemohla vzniknout buněčná biologie. Významnou roli hrála tato metoda též v materiálovém výzkumu a dalších vědních oborech, jakož i v mnoha praktických činnostech. Od konce 19. století je zásluhou ERNSTA ABBEHO známo, že rozlišovací schopnost optických mikroskopů je rovna zhruba polovině vlnové délky použitého světla. V minulých dvou desetiletích však vzniklo několik převratných metod založených na spojení optických mikroskopů s lasery jako zdroji světelného záření a s počítači sloužícími jak k řízení experimentů, tak ke zpracování obrazů. Důležitou roli zde sehrál také pokrok ve značení buněčných struktur fluorescenčními proteiny i dalšími fluorescenčními sondami. Kombinací zmíněných tří faktorů se podařilo zlepšit rozlišovací schopnost optických mikroskopů natolik, že místo o mikroskopii můžeme dnes již mluvit o nanoskopii. Tento fakt a jeho význam pro další pokrok na poli biochemie a buněčné biologie vedl k tomu, že letošní Nobelova cena za chemii byla udělena STEFANU HELLOVI, ERIKU BETZIGOVÍ a WILLIAMU W. MOERNEROVI — třem vědcům, kteří se rozhodujícím způsobem zasloužili o vývoj nových metod superrezoluční optické mikroskopie. Hell byl oceněn za objev principu a prokázání praktické použitelnosti skenovací fluorescenční mikroskopie, která redukuje nežádoucí efekt ohybu světla pomocí stimulované emise, a Moerner za přínos k rozvoji monomolekulární fluorescenční mikroskopie i objev fotoaktivovatelných fluorescenčních proteinů, které pak Betzig jako první použil pro superrezoluční lokalizační mikroskopii [7]. V následujícím článku je podán stručný výklad principu těchto metod.

1. Rozlišovací schopnost optických mikroskopů: připomenutí základních pojmů

Rozlišovací schopnost optických mikroskopů je omezena difrakčními jevy, které jsou důsledkem vlnové povahy světla. Zářící bod, byť libovolně malý, se proto zobrazí jako difrakční obrazec, který v případě objektivů s kruhovou aperturou má podobu Airyho disku obklopeného sadou koncentrických kroužků, jejichž jas progresivně klesá s pořadovým číslem vedlejšího maxima. Připomeňme si navíc, že průměr prvního difrakčního minima ohraničujícího Airyho disk se zmenšuje s rostoucím průměrem apertury a naopak roste se zvětšující se vlnovou délkou světla. Obrazu bodového zdroje světla říkáme impulzová odezva (anglicky point spread function, PSF).

Standardní mikroskopie je jednou z forem celoplošného zobrazování (v angličtině se používá termín wide-field microscopy), které se vyznačuje tím, že všechny body zobra-

Prof. RNDr. JAROMÍR PLÁŠEK, CSc., Matematicko-fyzikální fakulta UK, Fyzikální ústav, Ke Karlovu 3, 121 60 Praha 2, e-mail: plasek@karlov.mff.cuni.cz

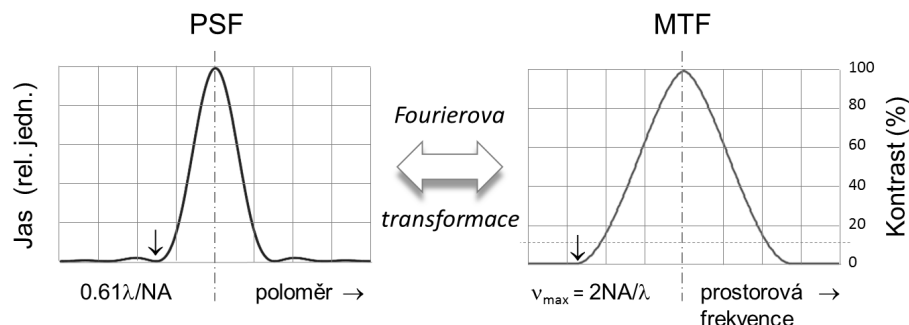


Obr. 1. Vztah mezi objektem a jeho obrazem, který je rozostřený ohybem světla procházejícího aperturou objektivu. Pozorovaný obraz (vpravo) je součtem jasů Airyho disků odpovídajících individuálním bodům objektu (vlevo). Uprostřed je zobrazen celý difrakční obrazec PSF, kde vedle centrálního Airyho disku jsou vidět i vedlejší lokální minima a maxima včetně profilu jejich intenzity. Abychom se vyhnuli přesvětlení obrazu objektu v místech, kde se překrývají obrazy více bodů, musel být v pravém obrázku snížen jas PSF natolik, že vedlejší maxima již nejsou patrná a vidíme pouze středy Airyho disků, kterým odpovídá černou barvou zvýrazněná část grafu $h(x, 0)$. Tmavá široká šipka v levém obrázku mívá na dva sousední body, jejichž vzdálenost je těsně pod hranicí teoretické rozlišovací schopnosti mikroskopu. Světlá šipka naopak označuje body ležící těsně nad touto hranicí.

zovaného objektu pozorujeme současně. Výsledný obraz je pak superpozicí PSF individuálních bodů zobrazovaného objektu. Pokud se navíc jedná o záření nekoherentní (jako je tomu v případě fluorescenční mikroskopie, které se týkají superrezoluční metody oceněné Nobelovou cenou za rok 2014), má taková superpozice podobu prostého součtu jasů ilustrovaného na obr. 1. Konvenční rozlišovací schopnost optického mikroskopu přitom odpovídá takové vzdálenosti d dvou bodů, při které se polohy maxim jejich Airyho disků nacházejí v místě prvního minima sousední impulzové odezvy (tzv. Rayleighovo kritérium). Platí

$$d = 0.61\lambda/NA, \quad (1)$$

kde λ je vlnová délka světla ve vakuu a NA numerická apertura objektivu, definovaná známým výrazem $NA = n \sin \alpha$ (n je index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem preparátu, α je polovina maximálního vrcholového úhlu kužele paprsků přicházejících do objektivu z předmětového bodu ležícího na optické ose mikroskopu). Vedle této hodnoty odvozené Lordem Rayleighem se alternativně uvádí i hodnota $d = 0.5\lambda/NA$ pocházející od Ernsta Abbeho. Malý číselný rozdíl mezi uvedenými hodnotami je však z hlediska praktické mikroskopie nepodstatný a rozdílem



Obr. 2. Radiální profil impulzové odezvy (PSF), který je funkcí prostorových souřadnic, a modul jeho Fourierovy transformace (neboli MTF), který je funkcí prostorových frekvencí. Čárkovaná úsečka indikuje hodnotu MTF, která odpovídá prostorové frekvenci rovnající se převrácené hodnotě průměru Airyho disku.

mezi Rayleighovou a Abbeho teorií se zde proto nemusíme zabývat. Naproti tomu je však třeba zdůraznit, že PSF je ve skutečnosti objektem třírozměrným, přičemž Airyho disk s přilehlými kroužky představuje pouze řez tímto objektem daný rovinou ostrého obrazu bodového zdroje světla. Axiální rozlišovací schopnost mikroskopu (také bývá někdy označovaná jako longitudinální nebo vertikální) je definována obdobným způsobem jako rozlišovací schopnost laterální, a to jako axiální vzdálenost prvního lokálního minima od centrálního maxima, která je rovna

$$z = 2n\lambda/(NA)^2. \quad (2)$$

Pro libovolný objektiv je tedy axiální rozlišovací schopnost horší než rozlišovací schopnost laterální.

Z matematického hlediska představuje rozložení jasu v obraze dvojrozměrného objektu $g(x, y)$ konvoluci

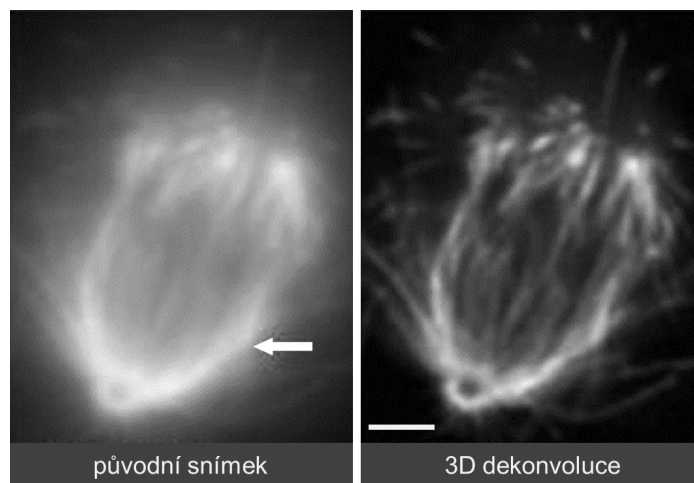
$$g(x, y) = f(x, y) * h(x, y), \quad (3)$$

kde $h(x, y)$ je funkce impulzové odezvy (translačně invariantní v rovině obrazu) a $f(x, y)$ je jas zvětšeného obrazu, který bychom získali pomocí ideální zobrazovací soustavy bez efektu difrakce ($x = Mx'$, $y = My'$ a M je zvětšení). Aplikací Fourierovy transformace na obě strany této rovnice a použitím konvolučního teorému dospějeme k důležitému vztahu mezi Fourierovými spektrálními reprezentacemi funkcí $g(x, y)$, $f(x, y)$ a $h(x, y)$:

$$G(\nu_x, \nu_y) = F(\nu_x, \nu_y)H(\nu_x, \nu_y), \quad (4)$$

kde ν_x a ν_y jsou prostorové frekvence.

Komplexní funkce prostorových frekvencí $H(\nu_x, \nu_y)$ se v teorii optického zobrazování nazývá optická přenosová funkce, neboli **OTF** (z anglického Optical Transfer Function). Její modul, viz obr. 2, kterému se říká funkce přenosu kontrastu **MTF** (Modulation Transfer Function), má výsadní postavení mezi charakteristikami optických zobrazovacích soustav, neboť popisuje, s jakým poměrem kontrastů v obrazové a předmětové rovině je možné zobrazit harmonické mřížky o různých prostorových



Obr. 3. Ukázka použití 3D dekonvoluce k potlačení neostrých obrazů z mimoohniskových rovin: dělící se žabí buňka z tkáňové kultury XLK2 odvozené od larválních ledvin (fluorescenční mikroskopie imunofluorescenčně označených mikrotubulů mitotického vřeténka). K dekonvoluci byla použita data z celkem 70 obrázků buňky snímáných s vertikálním krokem $0.2\ \mu\text{m}$. Původní snímek vlevo představuje náhodně vybraný optický řez blízko středu buňky, vpravo je obraz jemu odpovídající zaostřené roviny, který byl pomocí 3D dekonvoluce zbavený pozadí pocházejícího od neostrých obrazů sousedních rovin. Velikost bílé úsečky je $2\ \mu\text{m}$. Bílá šipka se týká dalších obrázků z původní publikace, zde nevyužitých. Upraveno podle [41].

frekvencích. Na obr. 2 také vidíme, že tento kontrast klesá na desetinu kontrastu objektu, pokud prostorová perioda harmonické mřížky je rovna průměru Airyho disku (a prakticky na nulu, pokud tuto periodu zmenšíme na 80% průměru Airyho disku). Této situaci odpovídá hraniční prostorová frekvence ν_{max} rovnající se $2NA/\lambda$, která představuje alternativní míru rozlišovací schopnosti obyčejných optických mikroskopů.

Pro nižší prostorové frekvence, při kterých se hodnota MTF dostatečně liší od nuly, lze pomocí nejrozličnějších dekonvolučních metod na základě rovnice (4) a známé PSF (buď změřené, nebo počítačově modelované) vylepšovat kontrast mikroskopických obrazů a tím i detegovatelnost jejich nejjemnějších detailů. Velmi populární jsou například algoritmy, které umožňují potlačit rozostřené obrazy mimoohniskových rovin 3D objektů v sériích snímků získaných při postupném zaostřování mikroskopu do měnící se hloubky objektu, viz obr. 3.

Tento obrázek navíc ilustruje triviální skutečnost, že v důsledku sníženého kontrastu zobrazení zaostřené roviny na pozadí neostrých obrazů mimoohniskových rovin zpravidla dochází k podstatnému snížení reálné laterální rozlišovací schopnosti obyčejných mikroskopů oproti jejich teoretické rozlišovací schopnosti.

2. Celoplošné zobrazování versus skenovací metody

V roce 1957 získal MARVIN MINSKY patent na princip skenovacího konfokálního mikroskopu, jehož první prakticky použitelná verze však vznikla teprve koncem šedesátých let zásluhou MOJMÍRA PETRÁNE a MILANA HADRAVSKÉHO z Lékařské fakulty UK

v Plzni. Při konfokální mikroskopii je pozorovaný vzorek skenován postupně bodovým zdrojem světla, přičemž záření vycházející z osvětleného bodu vzorku se dostává k detektoru až po průchodu konfokální dírkovou aperturou. Tato apertura účinně potlačuje světlo z nezaostřených mimoohniskových rovin, což umožňuje zobrazovat optické řezy trojrozměrnými vzorky, viz například [31].

V současné době je většina konfokálních mikroskopů vyráběna speciálně pro aplikace s excitací fluorescence fokusovaným laserovým paprskem. Efektivní impulzová odezva takového mikroskopu, PSF_{conf} , je pak součinem laterálního profilu intenzity fokusovaného laserového paprsku, PSF_{exc} , a impulzové odezvy bodu emitujícího fluorescence, PSF_{em} . Pokud není spektrální posuv mezi vlnovou délkou excitace a vlnovou délkou fluorescence příliš velký, platí pro laserové paprsky s Gaussovým profilem intenzity

$$\text{PSF}_{\text{exc}} \approx \text{PSF}_{\text{em}}, \quad \text{neboli} \quad \text{PSF}_{\text{conf}} \approx (\text{PSF}_{\text{em}})^2. \quad (5)$$

To znamená, že přechod od celoplošného zobrazování ke skenovací konfokální mikroskopii je doprovázen výrazným zúžením efektivní impulzové odezvy, a tím i výsledné laterální a axiální teoretické rozlišovací schopnosti mikroskopu. Jejich hodnoty jsou v tomto případě rovny

$$d_{\text{conf}} \approx 0.4\lambda/\text{NA}, \quad (6a)$$

$$z_{\text{conf}} \approx 1.4n\lambda/(\text{NA})^2, \quad (6b)$$

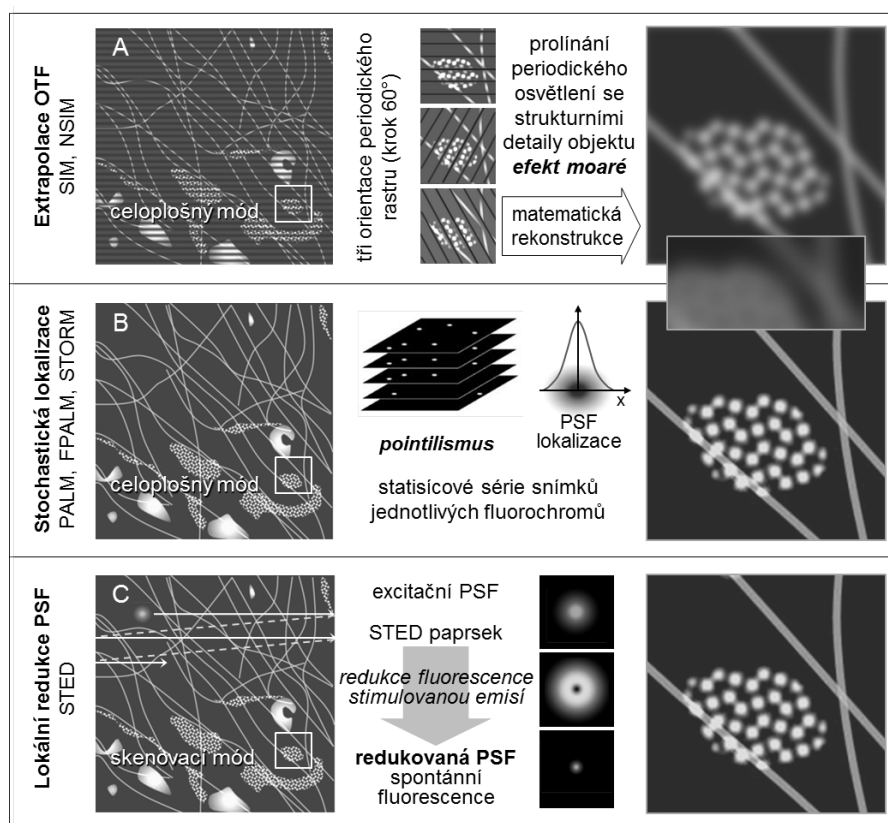
což oproti mikroskopům s celoplošným zobrazováním reprezentuje zlepšení o faktor rovnající se $\sqrt{2}$. Hlavní přínos konfokální mikroskopie ovšem spočívá v potlačení příspěvku rozostřených obrazů mimoohniskových rovin, díky čemuž se můžeme i při zobrazování 3D objektů prakticky přiblížit k teoretickým hodnotám rozlišovací schopnosti uvedeným v rovnicích (6a), (6b). Zlepšení rozlišovací schopnosti o faktor $\sqrt{2}$ však ještě neřadí konfokální mikroskopii k superrezolučním metodám.

3. Tři hlavní strategie současné superrezoluční optické mikroskopie

Na obr. 4 jsou představeny tři úspěšné strategie, které v současnosti umožňují realizovat superrezoluční mikroskopii na úrovni použitelné v praxi. Jedná se o mikroskopii se strukturním osvětlením, stochastickou lokalizační mikroskopii a skenovací STED mikroskopii.

Základní varianta mikroskopie se strukturním osvětlením (Structured Illumination Microscopy – SIM) spočívá v osvětlení vzorku excitačním světlem ve formě mřížky s harmonickým profilem jasu (zpravidla se k tomu využívá interference zkřížených laserových paprsků). Po nasnímání série takových snímků se třemi různými orientacemi excitačního rastru v kombinaci se třemi až pěti jeho lineárními posunutími o třetinu resp. pětinu prostorové periody, následuje analýza OTF, která umožňuje extrapolovat MTF optického zobrazovacího systému za mezní prostorovou frekvenci standardní celoplošné mikroskopie, $2\text{NA}/\lambda$. Při použití harmonického osvětlení lze však dospět pouze k dvojnásobné laterální rozlišovací schopnosti [11]. K dosažení opravdového superrozlišení jsou zapotřebí složitější aplikace strukturního osvětlení, jako je například SSIM (Saturated SIM) nebo NL-SIM (Non-Linear SIM) [12], [32].

Lokalizační mikroskopie slouží k superrezolučnímu zobrazování objektů obarvených fluorescenčními sondami. Využívá toho, že fluoreskující molekuly vzdálené od sebe



Obr. 4. Tři hlavní strategie superrezoluční mikroskopie: A. celoplošný mód s periodickým strukturním osvětlením (SIM), B. celoplošný mód se stochastickým zobrazováním individuálních zářících bodů (PALM, FPALM a STORM), C. skenovací mód s redukcí periferní zóny PSF stimulovanou emisí (STED). Ve třech obrázcích levého sloupce je schematicky znázorněna vnitřní struktura hypotetické buňky s mikrotubulárními vlákny a granulárními útvary. Vložené bílé rámečky lokalizují polohu oblasti zobrazené ve zvětšené podobě v pravém sloupci. Vzhled zvětšených obrázků zjednodušeně naznačuje rozdílné možnosti jednotlivých metod. Zatímco obyčejná SIM metoda nabízí pouze dvojnásobné zlepšení rozlišovací schopnosti, které znamená výrazné zlepšení oproti standardní celoplošné mikroskopii (viz vložený segment), ale není ještě dostatečné pro realistické zobrazení rozměrů jemných buněčných struktur, B i C umožňují nanoskopické zobrazení mikrotubulů a dalších struktur o rozměrech blízkých k 20 nm. Volně podle [34].

méně, než je konvenční rozlišovací schopnost objektivu, lze za určitých podmínek zobrazovat individuálně v rámci nahodilého výběru založeného například na aktivaci fluorescence, což po několika tisících až desítkách tisíc opakování umožní postupnou lokalizaci všech molekul fluorescenční sondy. Jelikož přesnost této lokalizace může být výrazně lepší, než je samotná rozlišovací schopnost mikroskopu, získáme takto velmi přesnou mapu rozložení sondy ve vzorku, která představuje superrezoluční obraz fluoreskujícího objektu. Přesnost lokalizace jednotlivých molekul samozřejmě výrazně

závisí na velikosti obrazového šumu, který klesá s celkovým počtem detegovaných fotonů, z nichž se skládá změřená PSF. Pro cca 10^6 fotonů se přesnost lokalizace blíží k 1 nm [30].

STED mikroskopie (**ST**imulated **E**mission **D**epletion – redukce fluorescence stimulovanou emisí) je v podstatě variantou skenovací laserové konfokální fluorescenční mikroskopie s druhým laserovým paprskem fokusovaným kolineárně do stejného místa jako paprsek excitační. Tento druhý paprsek, kterému budeme říkat redukční, má v ohnisku prstencový profil intenzity s prakticky nulovou intenzitou uprostřed. Excitované molekuly nacházející se v zóně ozařované světelným prstencem tak mohou být přinuceny k přechodům do základního stavu stimulovanou emisí místo vyzáření spontánní fluorescence. Jelikož spontánní fluorescenci lze od stimulované emise spektrálně i prostorově oddělit, dojde tímto způsobem k redukci efektivní fluorescenční PSF, přičemž její průměr bude ze zřejmých příčin progresivně klesat s jasnem světelného prstence vyvolávajícího stimulovanou emisí.

Společným a současně klíčovým atributem všech tří výše uvedených superrezolučních metod je to, že se jedná o metody fluorescenční, opírající se o důmyslné využití fotochemických nebo fotofyzikálních vlastností fluorochromů.

4. Celoplošná mikroskopie se strukturním osvětlením (SIM)

Na popisné úrovni lze princip SIM objasnit analogií se zobrazováním moaré obrazců, které vznikají překrytím dvou odlišných rastrů, viz obr. 5A. Při snižování rozlišovací schopnosti optické soustavy nevyhnutelně nastane situace, kdy samotné rastry se již zobrazit nepodaří, zatímco příslušný moaré efekt bude stále dobře viditelný, viz obr. 5B. Díky moaré tedy zůstává v obraze zachována informace o existenci rastrů o prostorových frekvencích vyšších, než optická soustava dokáže přímo zobrazit.

Abychom z moaré získali též kvantitativní informaci, musíme pomocí Fourierovy transformace přejít k jejich frekvenční reprezentaci. Pro jednoduchost začneme s lineárním režimem, ve kterém je jas objektu úměrný intenzitě osvětlení $o(x, y)$. Jas zobrazovaného objektu pak bude roven součinu

$$f_{\text{SIM}}(x, y) = f(x, y)o(x, y), \quad (7)$$

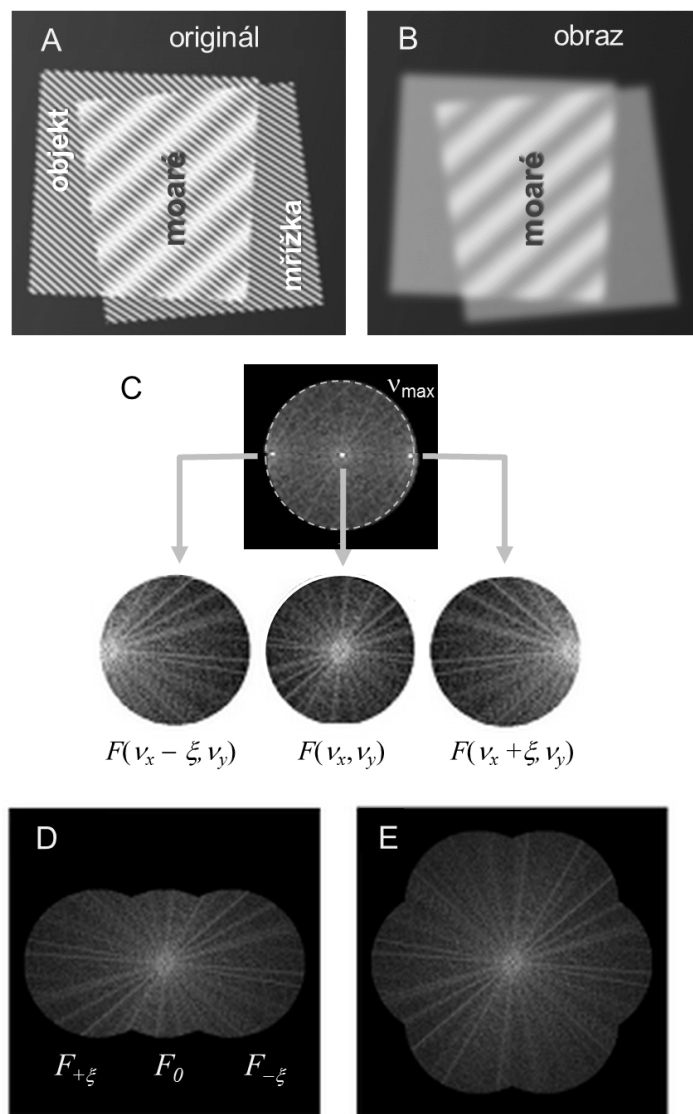
kde $f(x, y)$ je jas objektu při rovnoměrném osvětlení. Obrazem strukturně osvětleného objektu tedy bude konvoluce

$$g(x, y) = [f(x, y)o(x, y)] * h(x, y), \quad (8)$$

pro jejíž Fourierovu transformaci platí

$$G(\nu_x, \nu_y) = [F(\nu_x, \nu_y) * O(\nu_x, \nu_y)]H(\nu_x, \nu_y). \quad (9)$$

V případě osvětlení s profilem harmonické mřížky o prostorové frekvenci ξ definované ve směru osy x použijeme $o(x, y) = 1 + \cos(2\pi\xi x)$. Fourierova transformace takové harmonické mřížky, $O(\nu_x, \nu_y)$, je součtem tří Diracových impulzů při frekvencích 0 a $\pm\xi$. Ve Fourierově transformaci $G(\nu_x, \nu_y)$ se proto k funkci $F(\nu_x, \nu_y)$ přičtou dva spektrálně posunuté obrazy $F(\nu_x - \xi, \nu_y)$ a $F(\nu_x + \xi, \nu_y)$. Aby bylo možné rozložit takovou funkci $G(\nu_x, \nu_y)$ na komponenty $F(\nu_x, \nu_y)$, $F(\nu_x - \xi, \nu_y)$ a $F(\nu_x + \xi, \nu_y)$, je třeba



Obr. 5. Princip mikroskopie se strukturním osvětlením. A. Ukázka moaré efektu vznikajícího překryvem dvou mřížek; B. zobrazení moaré pomocí optické soustavy s rozlišovací schopností menší, než vyžaduje prostorová frekvence mřížek; C. modelový příklad Fourierovy reprezentace objektu osvětleného harmonickou mřížkou o prostorové frekvenci $\nu_{\max}$ a její rozklad na jednu základní a dvě frekvenčně posunuté komponenty (zobrazeny jsou moduly příslušných komplexních funkcí); D. extrapolace Fourierovy transformace $F(\nu_x, \nu_y)$ na rozšířený spektrální interval $\langle -2\nu_{\max}, 2\nu_{\max} \rangle$; E. Kombinace extrapolovaných Fourierových transformací získaných pomocí tří orientací osvětlovací mřížky. Vytvořeno s použitím [8].

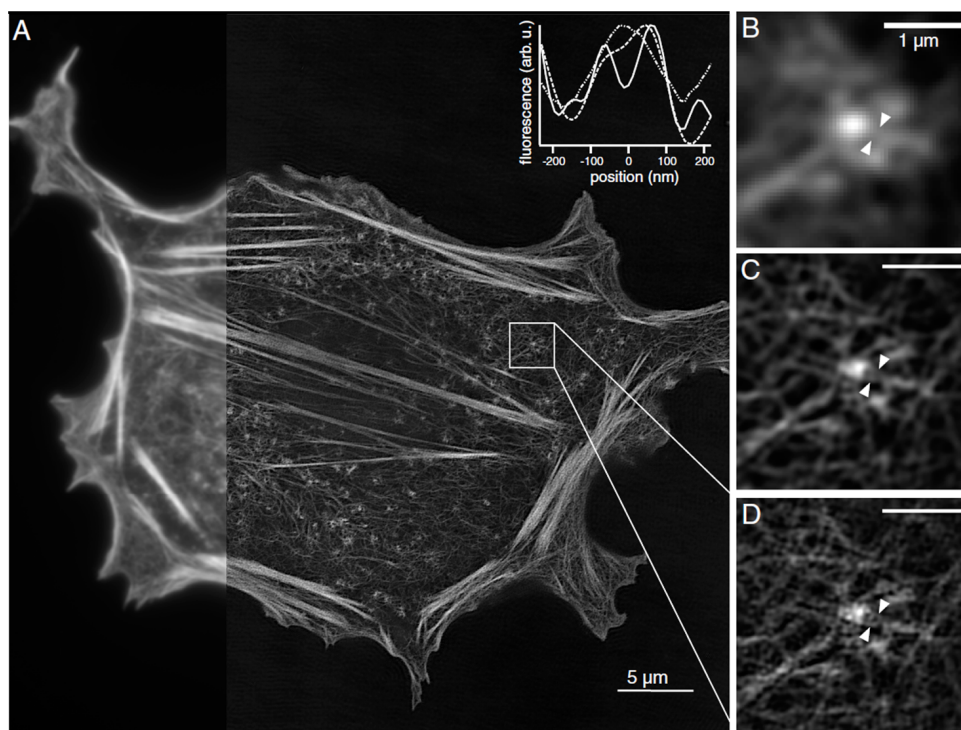
ji napřed podělit optickou přenosovou funkcí $H(\nu_x, \nu_y)$ a Fourierovu transformaci obrazu strukturně osvětleného objektu získat pro několik translací rastru osvětlení o definované zlomky jeho prostorové periody (obvykle tři až pět). Tím získáme několik navzájem souvisejících komplexních funkcí se stejným modulem, avšak odlišnými fázovými spektry, mezi kterými existují známé rozdíly dané velikostí laterálního posuvu rastru. Jak ilustruje obr. 5C, spektrálně posunuté komponenty $F(\nu_x - \xi, \nu_y)$ a $F(\nu_x + \xi, \nu_y)$ obsahují vysokofrekvenční křídla, která by v neposunutém spektru $F(\nu_x, \nu_y)$ už ležela za hranicí $\nu_{\max}$. Po srovnání a překrytí navzájem si odpovídajících úseků tří dílčích složek Fourierovy transformace harmonicky osvětleného objektu nakonec získáme funkci $F(\nu_x, \nu_y)$ extrapolovanou na rozšířený spektrální interval $(\nu_{\max} - \xi, \nu_{\max} + \xi)$, obr. 5D. Tato extrapolace se provádí pro tři různé orientace lineárního rastru natočené v krocích po 60° , viz obr. 5E. Aplikujeme-li pak na celou extrapolovanou funkci $F(\nu_x, \nu_y)$ inverzní Fourierovu transformaci, získáme dvojrozměrný obraz objektu se zvýšenou laterální rozlišovací schopností, která v mezním případě modulační frekvence $\xi = \nu_{\max}$ bude rovna dvojnásobku hodnoty dosažitelné při obyčejném celoplošném zobrazení. Výše popsaná základní metoda se samozřejmě týká pouze ideálních 2D objektů (například monovrstev latexových kuliček nebo obrazů buněk snímáných TIRF mikroskopií, viz obr. 6 a jeho popis). Lze ji však úspěšně aplikovat také na reálné 3D vzorky, a to cestou snímání série obrazů zaostřených do různé hloubky vzorku osvětleného trojrozměrným rastrem [13], [35].

K dosažení lepší než dvojnásobné laterální rozlišovací schopnosti je třeba použít osvětlovací rastry s anharmonickým profilem intenzity, díky kterému se v jejich Fourierových obrazech vedle frekvence ξ spojené se základní prostorovou frekvencí rastru objeví i její vyšší harmonické násobky $m\xi$. Nelineárního profilu osvětlovacího rastru lze dosáhnout buď skrze saturaci fluorescence při velmi intenzivním buzení, kdy intenzita fluorescence přestává být úměrná intenzitě excitace (metoda S-SIM [1]), nebo šetrnější NL-SIM metodou vhodnou i pro biologické objekty, která však je méně univerzální kvůli značení studovaných objektů fotokonverzními fluorescenčními proteiny [32]. Obě tyto metody umožnily posunout rozlišovací schopnost SIM metody k hodnotě ≈ 50 nm. V souvislosti s úchvatnou kvalitou NL-SIM obrazů cytoskeletu CHO buněk oproti klasické celoplošné fluorescenční mikroskopii se však sluší upozornit na to, že se nejedná výhradně o efekt zvýšené laterální rozlišovací schopnosti. Přinejmenším v případě obyčejné lineární SIM metody, obr. 6C, ke kvalitě zobrazení výrazně přispívá též mírné zlepšení axiální rozlišovací schopnosti následované potlačením jasu mimoohniskového pozadí. Významnou roli nepochybně hraje též dekonvoluční zaostření obrazů v rámci Fourierových transformací, na nichž je založena extrapolace $F(\nu_x, \nu_y)$.

Mikroskopie se strukturním osvětlením dnes již patří k příslušenství mikroskopů nabízených více výrobcí a můžeme se s ní setkat v řadě tuzemských laboratoří (např. N-SIM Nikon, SR-SIM Zeiss Elyra, DeltaVision OMX od GE Healthcare Life Sci.).

5. Lokalizační superrezoluční mikroskopie

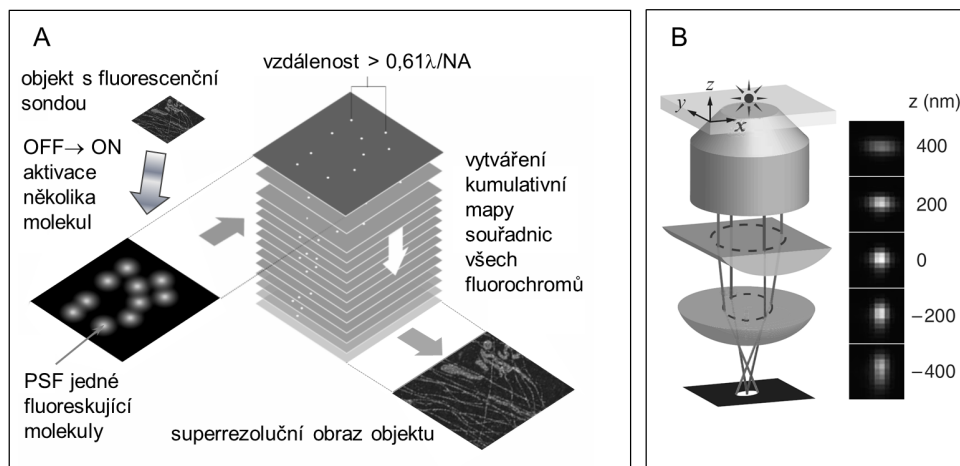
Vznik lokalizační superrezoluční mikroskopie úzce souvisí s pokrokem ve vývoji citlivých detekčních metod, které umožnily provádět fluorescenční mikroskopii na úrovni jednotlivých molekul [28]. K dosažení superrozlišení je však navíc třeba zajistit, že nedojde k současnému zobrazování dvou blízkých molekul s překrývajícími se PSF.



Obr. 6. Aktinový cytoskelet savčí CHO buňky (jedná se o buněčnou linii odvozenou z křeččích vaječníků) označený fotokonverzním fluorescenčním proteinem Dronpa a zobrazený nelineární NL-SIM metodou s použitím TIRF mikroskopu (Total Internal Reflection Fluorescence: fluorescence vzorku je excitována evanescentní vlnou v submikronové vrstvě přiléhající ke krycímu sklíčku). A. Celoplošný NL-SIM obraz vzorku; vlevo je ukázka kvality zobrazení pomocí obyčejné TIRF mikroskopie. Následují zvětšené obrazy čtvercové výseče pořízené B. obyčejnou celoplošnou TIRF mikroskopií, C. lineární SIM metodou a D. nelineární NL-SIM metodou. Graf normalizovaných profilů jasu mezi šipkami obrázků B–D vložený do A ukazuje, že dvě vlákna nacházející se mezi těmito šipkami jsou zřetelně rozlišena pouze v případě NL-SIM metody (plná linie), zatímco v případě obyčejné TIRF metody (tečkovaná linie) ani lineární SIM metody (čárkovaná linie) je rozlišit nejde. Převzato z [32].

V praxi to zpravidla znamená, že v daném okamžiku smí fluoreskovat pouze jediná z desítek až stovek molekul nacházejících se uvnitř okruhu o poloměru odpovídajícím konvenční rozlišovací schopnosti mikroskopu. Princip funkční monomolekulární mikroskopie, který je schematicky znázorněn na obr. 7A, byl publikován v roce 2006 nezávisle třemi různými laboratořemi pod názvy PALM — PhotoActivation Localization Microscopy [3], FPALM — Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy [18] a STORM — Stochastic Optical Reconstruction Microscopy [33].

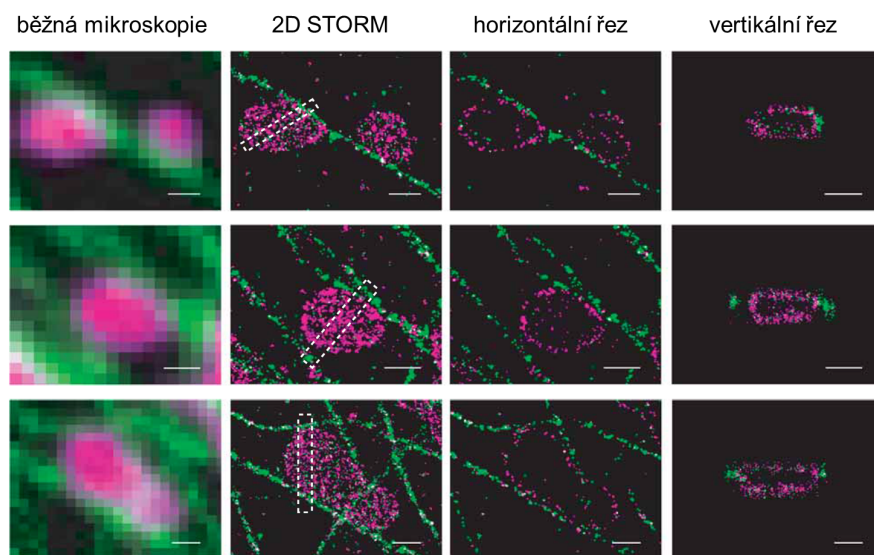
PALM a FPALM představují nanoskopické zobrazování buněčných struktur označených fotoaktivovatelnými fluorescenčními proteiny, jako je například Dronpa s fluorochromem, který lze ozařováním intenzivním modrozeleným světlem (≈ 490 nm) opakovaně převést do nefluoreskující trans-konformace a pak ozářením fialovým světlem



Obr. 7. Princip lokalizační superrezoluční mikroskopie. A. V objektu obsahujícím fotoaktivovatelnou nebo fotoregulovatelnou fluorescenční sondu je malý počet nahodile vybraných a dostatečně navzájem vzdálených fluorochromů přepnut aktivacím světelným pulzem do fluorescenčního stavu. Z jejich centroidních souřadnic je pak po několika desítkách tisíc opakování takové lokalizace vytvořen superrezoluční obraz distribuce fluorescenční sondy ve studovaném objektu. B. Axiální lokalizace fluorochromů použitá ve 3D STORM. Zjednodušené optické schéma ilustruje princip určení z -souřadnice fluorochromu z astigmatické formy PSF vznikající po vložení válcové čočky před projekční čočku promítající PSF na citlivou EMCCD kameru (electronmultiplying charge-coupled device). Vpravo je vertikální kalibrace elipticity astigmatické PSF. Upraveno podle [22].

(≈ 400 nm) vrátit zpět do silně fluoreskující cis-konformace s maximy excitačního a emisního spektra u rovnými 503 nm a 518 nm [2]; základní informace o fluorescenčních proteinech se nacházejí v příloze *Struktura a vlastnosti fluorescenčních proteinů*. Aby se nahodile aktivovala jen nepatrná frakce z celkového počtu potenciálních zdrojů fluorescence, je třeba přepínat fotoaktivovatelné fluorescenční sondy do fluorescenčního stavu světelným pulzy o velmi nízké intenzitě. Po přepnutí fluorochromů do fluorescenčního stavu jsou pak za konstantního buzení snímány v integračním režimu individuální PSF souboru aktivovaných fluorescenčních proteinů, a to po celou dobu, dokud jejich fluorescence zcela nezanikne v důsledku fotodegradačního procesu (photobleaching). Fotodegradované fluorescenční proteiny se již v dalších fotoaktivacích cyklech nemohou samozřejmě uplatnit, což usnadňuje postupnou lokalizaci všech molekul fluorescenční sondy a superrezoluční zobrazení jejich prostorového rozložení.

V první variantě STORM byla místo fluorescenčních proteinů použita pomaleji fotodegradovatelná organická barviva s fotoregulovatelnou (photoswitchable) fluorescencí, která lze světelnými pulzy vhodných parametrů (často se jedná o odlišné vlnové délky) přepínat z fluorescenčního (on) do nefluorescenčního (off) stavu a naopak. Tyto fluorochromy fungují v párech, kde jeden z nich je zdrojem lokalizačního signálu, zatímco druhý se pouze podílí na aktivaci systému přepnutého do stavu „off“ vypínacím světelným pulzem aplikovaným na začátku každého nového kroku generování



Obr. 8. Dvoubarevná 3D STORM nanoskopie mitochondrií (fialové) a mikrotubulů (zelené) opičích ledvinových buněk BSC-1: imunofluorescenční značení mitochondrií protilátkou k mitochondriálnímu proteinu Tom20 s a mikrotubulů protilátkou k β -tubulinu s fotoregulovatelnými kyaninovými fluorochromy Alexa405-Cy5 (mitochondrie) a Alexa488-Cy5 (mikrotubuly). Tři náhodně vybraná místa s několika mitochondriemi a tubulinovými vlákny ukazují rozdíl v kvalitě zobrazení pomocí standardní celoplošné mikroskopie, 2D STORM a 3D STORM. V případě 3D STORM odpovídají axiální řezy horizontální pozici vyznačené bílým čárkovaným rámečkem. Axiální pozice vybraných ukázek horizontálních řezů nejsou vyznačeny. Délka měřítky je 500 nm. Barevná verze obrázku je k dispozici pouze v online verzi tohoto článku. Reprinted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods, copyright 2008, ref. [21].

frakce lokalizovatelných molekul. Specifické značení konkrétních buněčných proteinů fotoregulovatelnými sondami se provádí imunofluorescenčním způsobem, kdy fluorochromy jsou chemicky připojeny k protilátkám proti studovaným buněčným proteinům. Buňky mají trojrozměrnou stavbu, k jejímuž zobrazování je třeba dosáhnout superrozlišení ve všech třech dimenzích. Potřebujeme proto lokalizovat centroidní polohy individuálních PSF nejen v horizontální rovině (x, y), ale též ve směru axiální osy z . Na obr. 7B je ukázka jednoho elegantního způsobu vyvinutého pro metodu STORM. Využívá se k tomu astigmatického zobrazení molekul sondy realizovaného pomocí válcové čočky přidané před kameru mikroskopu. PSF bodového zdroje se tím změnil z kruhově symetrické na eliptickou, přičemž její elipticita roste se vzdáleností molekuly od zaostřené roviny a navíc v navzájem kolmých směrech pro molekuly ležící pod a nad touto rovinou. Ukázka nanoskopického zobrazení buněčných struktur metodou 3D STORM je na obr. 8. Jedná se o mitochondrie a mikrotubuly savčí buňky zobrazené s laterálním rozlišením 20 až 30 nm a axiálním rozlišením 60 až 70 nm.

Během osmi let, která uplynula od prvních úspěšných demonstrací praktické použitelnosti stochastických superrezolučních metod, bylo testováno velké množství fo-

toaktivovatelných proteinů a fotoregulovatelných fluoroforů [19], [20], [29], přičemž u některých z nich se způsob generování frakce lokalizovatelných molekul může lišit od dvou výše popsaných metod [37]. V poslední době se proto pro všechny metody superrezoluční mikroskopie začíná prosazovat zastřešující název Single-Molecule Localization Microscopy (SMLM). Mezi nejpodstatnější atributy fluorescenčních sond vhodných pro SMLM je součin jejich molárního absorpčního koeficientu ε a kvantového výtěžku fluorescence Q , od kterého se odvíjí jejich schopnost emitovat dostatek fotonů pro bezpečnou centroidní analýzu PSF. Příkladem osvědčených fluorescenčních sond jsou syntetická kyaninová barviva Alexa 488 a Cy5 nebo barvivo ATTO 650 s parametry $\varepsilon \approx 10^5$ a $Q \geq 0.9$. Odpovídající hodnoty fluorescenčních proteinů jsou nezanedbatelně nižší ($\varepsilon \approx 15 - 85 \cdot 10^3$ a $Q \approx 0.05 - 0.8$). Detailní analýza pokroku v této oblasti však nemůže být náplní našeho krátkého přehledu. Nicméně je třeba se zmínit, že velké úsilí je orientováno na vývoj metod zkracujících celkovou dobu akumulace nanoskopických snímků na úroveň potřebnou pro pozorování nefixovaných živých buněk [4], [6], [19], [36], což neumožňovaly rané verze SMLM vyžadující až několik hodin sběru dat.

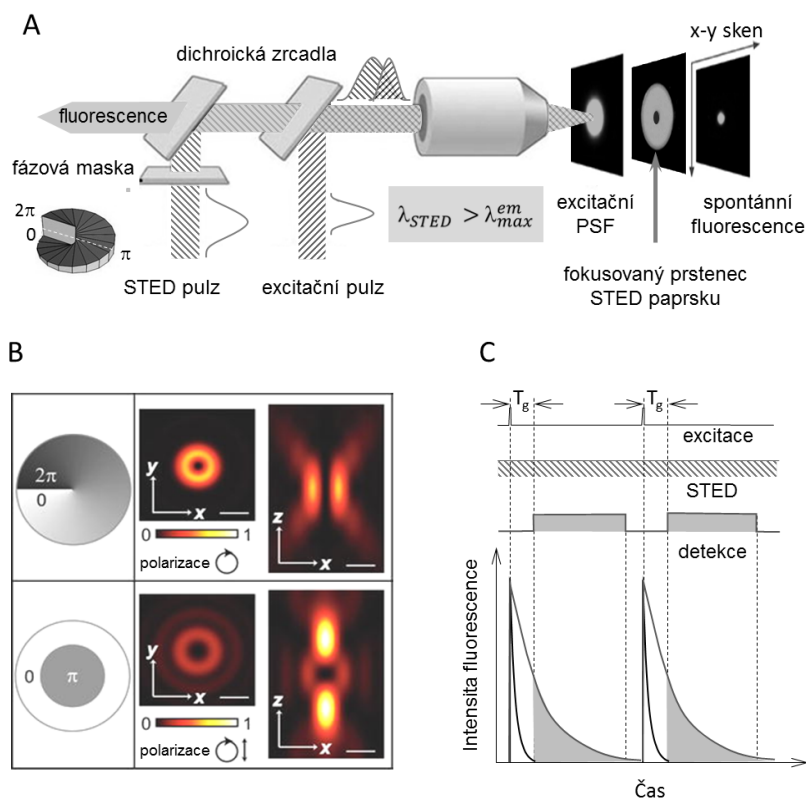
6. STED mikroskopie

Princip STED mikroskopie, při které je fluorescence z periferie PSF redukována stimulovanou emisí vyvolanou laserovým paprskem s prstencovým profilem intenzity, je schematicky znázorněn na obr. 9A. K vytvoření prstencového profilu intenzity v ohnisku redukčního STED paprsku slouží fázová maska, která mezi definované zóny laserového paprsku vnáší fázové rozdíly rovnající se π . K dosažení výrazného centrálního minima STED paprsku, které je optimální pro získání vysokého laterálního rozlišení, se používá spirální maska. K vytvoření obdobného minima ve vertikálním směru je naopak vhodnější anulární maska, viz obr. 9B. Metoda umožňující dosáhnout vysokého 3D rozlišení současně v horizontálním i vertikálním směru spočívá v rozdělení redukčního STED paprsku do dvou větví opatřených odlišnými fázovými maskami a následující rekombinaci různým způsobem fázově upravených paprsků [15]. I nejlepší dosažitelné axiální rozlišení poněkud horší než nejlepší rozlišení laterální, a to cca 2.5krát.

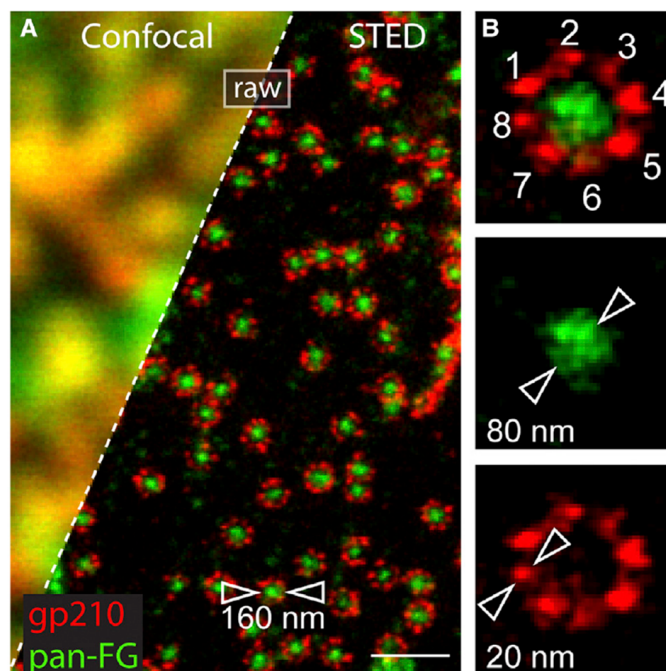
Pravděpodobnost zániku excitovaných stavů stimulovanou emisí roste s intenzitou redukujícího STED paprsku. S jeho intenzitou proto klesá konečný průměr oblasti, ve které po aplikaci STED pulzu zůstanou excitované molekuly schopné emitovat spontánní fluorescence. Tento průměr je zhruba nepřímě úměrný druhé odmocnině intenzity redukujícího záření, na které závisí rozlišovací schopnost STED mikroskopu, pro niž platí

$$d_{\text{STED}} \approx d / \sqrt{1 + \frac{I_{\text{max}}}{I_{\text{sat}}}}, \quad (10)$$

kde d je konvenční rozlišovací schopnost daného objektivu, I_{max} je maximální intenzita v ohniskovém prstenci redukčního paprsku (typicky se jedná o $0.1 - 1 \text{ GW/cm}^2$) a I_{sat} je intenzita, při které stimulovaná emise sníží kvantový výtěžek spontánní fluorescence na polovinu [16]. Tato relace naznačuje, že STED mikroskopie v principu nabízí libovolně velkou rozlišovací schopnost za předpokladu, že bude k vyvolání stimulované emise použito dostatečně intenzivní záření. Prakticky dosažitelná rozlišovací schop-



Obr. 9. Princip STED mikroskopie. A. Pulzní STED mikroskopie používající dva kolineární laserové paprsky synchronizovaných pulzních laserů (excitační paprsek a redukční STED paprsek), které jsou fokusovány stejným objektivem na skenovaný vzorek. STED pulz vyvolávající stimulovanou emisi následuje bezprostředně po pulzu excitačním a jeho ohniskový profil (definovaný průchodem paprsku přes fázovou masku) má podobu prstence. Na panelech napravo od objektivu jsou schematicky znázorněny profily intenzit excitačního paprsku, STED paprsku a redukované spontánní fluorescence. V periferní zóně excitované oblasti vzorku byly fluorochromy deexcitovány stimulovanou emisí vyvolanou prstencovým STED paprskem. B. Vztah mezi tvarem fázové masky a 3D distribucí intenzity v ohnisku redukujícího STED paprsku. Nahoře je spirální maska umožňující dosáhnout velkého laterálního rozlišení, avšak bez vertikální selekce ve směru osy z . Dole je maska anulární, která naopak umožňuje redukci excitovaných fluorochromů ve vertikálním směru, ovšem za cenu horšího laterálního rozlišení. Barevná verze obrázku je k dispozici pouze v online verzi tohoto článku. Upraveno podle [14]. C. Časová posloupnost excitace a detekce při hradlované STED mikroskopii. Excitace má podobu pulzů o šířce výrazně menší, než je střední doba dohasínání spontánní fluorescence, a STED paprsek má konstantní intenzitu, která se v čase nemění. Fluorescence je registrována se zpožděním T_g za excitačním pulzem, když intenzita rychleji dohasínající fluorescence fluorochromů ozařovaných STED paprskem se již blíží k nule (černá křivka), zatímco spontánní fluorescence z centra excitační stopy, kde nedochází ke stimulované emisi, má ještě stále dostatečně vysokou intenzitu (šedá křivka s výplní).



Obr. 10. Nanoskopické zobrazení proteinových komplexů vytvářejících póry v jaderné bláně žabích buněk. Bylo použito dvojbarevné imunofluorescenční značení protilátkou glykoproteinu gp210 a protilátkami proti komplexu proteinů uprostřed póru s fluorofory Abberior STAR635P a Atto594 (chemickou strukturu výrobce nepublikuje), které emitují v červené a oranžové oblasti spektra s takovým překryvem emisních spekter, že bylo možné pro redukci jejich spontánní fluorescence použít stejný STED laser. A. Levý obrázek – póry zobrazené obyčejným konfokálním mikroskopem; pravý obrázek – STED zobrazení pórů s rozlišením ≈ 20 nm (kruhy oktamerů glykoproteinu gp210 zvýrazněné červenou barvou) a centrálních komplexů proteinů jaderného póru ≈ 30 nm (zvýrazněno zelenou barvou). Barevná verze obrázku je k dispozici pouze v online verzi tohoto článku. B. Jeden jaderný pór s oktagonálním komplexem osmi molekul gp201 a centrálním komplexem dalších proteinů o celkovém průměru ≈ 80 nm. Převzato z [10].

nost STED mikroskopů přesto zůstává v nanometrové škále v důsledku více faktorů. Konkrétně se jedná o aberace objektivů (při standardní mikroskopii zcela zanedbatelné), rozptyl světla v objemných 3D vzorcích a v neposlední řadě též o fotostabilitu fluorochromů. V případě diamantu s luminiscenčními centry typu dusík–vakance bylo dosaženo laterálního rozlišení ≈ 6 nm, zatímco u biologických vzorků se syntetickými organickými barvivy se jedná o ≈ 20 nm nebo o 50 až 70 nm při použití fluorescenčních proteinů, viz obr. 10 jako příklad. Při základní STED mikroskopii je fluorescence z periferie PSF redukována stimulovanou emisí. Později bylo úspěšně demonstrováno, že podobné redukce PSF lze dosáhnout i několika dalšími způsoby, jako je použití fotoregulovatelných fluorochromů (metoda RESOLFT) nebo excitace fluorochromů do metastabilních nefluorescenčních stavů (GSDM) [5], [23].

První funkční STED mikroskopy používaly pulzní lasery jak pro excitaci, tak

pro vyvolání stimulované emise. Pulzní STED lasery se totiž vyznačují dostatečně vysokou intenzitou světelných pulzů vyvolávajících stimulovanou emisi při relativně nízké střední energii záření dopadajícího na vzorek, což je příznivý stav z hlediska nežádoucího fotochemického poškození studovaných objektů. Nutnost časové synchronizace světelných pulzů generovaných dvěma lasery (po každém excitačním pulzu musí bezprostředně následovat redukční STED pulz, viz obr. 9A) představuje nezanedbatelný technický problém zvyšující cenu STED systémů. Proto se objevily též systémy s kontinuálními STED lasery (CW-STED), které však mají nižší rozlišovací schopnost než pulzní systémy, neboť kvůli minimalizaci fotopoškození vzorků musí používat nižší intenzity redukujícího záření. Přímočarý postup založený na prostém zvyšování intenzity redukčního paprsku lze výrazně vylepšit hradlovanou detekcí fluorescence, obr. 9C. Hradlovaná STED mikroskopie (gated STED, *g*-STED) využívá toho, že stimulovaná emise vede kromě snižování intenzity spontánní fluorescence i ke zkrácení její střední doby dohasínání. Při vhodně zvoleném zpoždění intervalu detekce oproti excitačnímu pulzu lze tudíž dosáhnout toho, že detektor bude registrovat pouze fluorescenci z redukované centrální zóny i při takových intenzitách kontinuálního STED laseru, které by obyčejné CW-STED metodě nezajistily dostatečně vysoké rozlišení [40]. Oba hlavní způsoby dosažení vysokého 3D rozlišení — hradlovaná detekce a kombinovaný efekt dvou fázových masek — byly uplatněny v dosud nejvýkonnějším STED mikroskopu firmy Leica Microsystems, která má patentová práva na STED mikroskopy. Jedná se o model TCS SP8 STED 3X.

Pro buněčnou biologii je kromě vysoké rozlišovací schopnosti mikroskopu důležitá také možnost zkoumat živé buňky. Doba akumulace jednoho superrezolučního snímku pochopitelně závisí na rozměrech skenované oblasti. Pokud nás zajímají dynamické děje, musíme se spokojit s pohledem na menší část vzorku a tím zkrátit dobu snímání. Z hlediska zkoumání dynamických jevů v živých buňkách je STED mikroskopie perspektivnější než metody lokalizační. V současnosti představuje nejrychlejší nanoskopickou metodu až s 80 snímky za minutu při rozlišení 60 až 80 nm [9].

7. Závěr

Proč byl pokrok na poli superrezoluční mikroskopie oceněn Nobelovou cenou za chemii, nikoli za fyziku, jak by kvůli blízkému vztahu s optikou mnozí očekávali? Abychom to pochopili, musíme si uvědomit, jak významnou oblastí chemie je dnes biochemie. Superrezoluční fluorescenční mikroskopie kombinovaná se současnými možnostmi specifického značení buněčných struktur fluorescenčními proteiny i dalšími fluorescenčními sondami je mocným nástrojem, od kterého se očekává příliv dříve nedostupných poznatků o komplexní souhře buněčných molekul v nanometrovém měřítku. To s vysokou pravděpodobností změní převratným způsobem náš pohled na mnohé biologické procesy, jimiž jsou předurčovány charakteristické znaky a vlastnosti různých forem života.

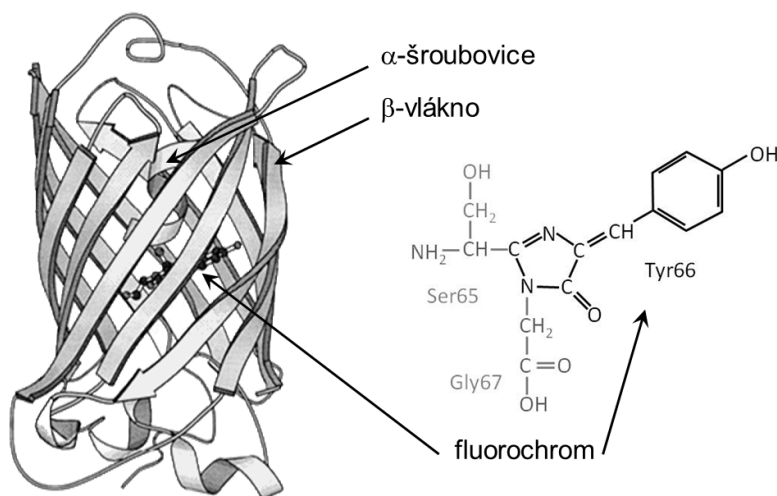
Již dnes lze najít v literatuře příklady prvních zajímavých výsledků získaných pomocí superrezoluční mikroskopie, jako je třeba nový model aktin-spektrinového cytoskeletu nervových vláken [27]. Nové superrezoluční metody se v budoucnosti nepochybně uplatní nejen v buněčné biologii, ale i v jiných vědních oborech. Například princip STED mikroskopie byl úspěšně testován jako perspektivní metoda pro nanolitografii produkující detaily o rozměrech blízkých 50 nm [23].

Podrobnější informace o superrezolučních metodách optické mikroskopie lze najít v řadě nedávno publikovaných přehledových článků, například [17], [19], [24], [25], [29], [38], [42]. Obsáhlý seznam literatury týkající se těchto metod je také k dispozici na webu výrobce STED mikroskopů: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/>, viz Super-Resolution/Papers and Articles on the Nobel Prize in Chemistry 2014.

Příloha: Struktura a optické vlastnosti fluorescenčních proteinů

Optická fluorescenční mikroskopie je z hlediska buněčné biologie výjimečná tím, že umožňuje pozorovat živé buňky a jejich vnitřní struktury s obrazovým kontrastem generovaným na molekulární úrovni na základě specifického připojování fluorescenčních sond k vybraným buněčným strukturám, a to buď pomocí imunofluorescenčních metod nebo pomocí fluorescenčních proteinů. Uvádí se, že zhruba 80% všech zobrazení buněk a jejich struktur publikovaných v biologických časopisech vzniká v současné době právě pomocí fluorescenční mikroskopie [19]. Fluorescenční proteiny jsou pro současnou biologii natolik významné, že za „objev a vylepšení zeleného fluorescenčního proteinu“ byla v roce 2008 udělena O. Shimamurovi, M. Chalfiemu a R. Tsienovi Nobelova cena za chemii.

Přírodní zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein — GFP, izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, kterému se tak říká, protože při ozáření modrým světlem emituje nazelenalou fluorescenci) je poměrně malá bílkovina složená z pouhých 238 aminokyselin. Má zajímavé prostorové uspořádání ve tvaru barelu o délce ≈ 4.2 nm a průměru ≈ 4.2 nm, zformovaného z jedenácti β -vláken, která obklopují jednu jednu α -šroubovici nacházející se zhruba v ose β -barelu, viz obr. 11. Fluoroforem



Obr. 11. Struktura zeleného fluorescenčního proteinu. Fluorochrom p-hydroxybenzyliden-imidazilonin je zvýrazněn černě. Šedou barvou jsou vyznačeny zbytky molekul serinu a glycinu. Upraveno podle [39].

tohoto proteinu je heterocyklická sloučenina *p*-hydroxybenzyliden-imidazilonin, která vzniká za přítomnosti kyslíku spontánní autokatalytickou chemickou reakcí tří sousedních aminokyselin — serinu (Ser65), tyrosinu (Tyr66) a glycinu (Gly67), které jsou při sbalování β -barelu natlačeny do prostorového uspořádání umožňujícího takovou reakci. Tento fluorofor má hlavní absorpční maximum při 400 nm a emisní maximum při 505 nm. Po objevu zeleného fluorescenčního proteinu bylo genetickými metodami brzy vytvořeno velké množství jeho variant s rozdílnou svítivostí, fotostabilitou a barvou fluorescence [39], jejichž prostorová struktura je však GFP velmi podobná.

M. Chalfiemu se navíc podařilo dokázat, že k syntéze GFP i jeho mutantních variant může docházet také v buňkách jiných organismů, než jsou medúzy. Následovně vznikly rutinní molekulárně-biologické metody umožňující připojovat ke genům nejrozličnějších bílkovin DNA, která kóduje fluorescenční proteiny. Jejich syntéza pak v buňkách vede k tvorbě fúzních bílkovin s geneticky připojenou fluorescenční sondou, která odhaluje jak lokalizaci označených bílkovin v buňce, tak jejich lokální koncentraci. Jelikož fluorescenční proteiny nejsou pro buňky toxické a funkci označených molekul zpravidla téměř neovlivňují a navíc je lze používat ve více spektrálně rozlišitelných formách umožňujících odlišné barevné kódování různých buněčných bílkovin, jsou možnosti použití fluorescenčních proteinů skutečně fascinující. Nová kategorie fotoaktivovatelných proteinů (viz stručný přehled v práci [26]) vhodných pro superre-zoluční mikroskopii pak význam fluorescenčních proteinů pro buněčnou biologii ještě víc posílila.

Poděkování. Za cenné připomínky děkuji prof. RNDr. Petru Malému, DrSc. Tato publikace vznikla v rámci Programu rozvoje vědních oblastí na Univerzitě Karlově č. P45 – Fyzika.

L i t e r a t u r a

- [1] AFTAB, O., FRYKNAS, M., ZHANG, X.N., DE MILITO, A., HAMMERLING, U., LINDER, S., LARSSON, R., GUSTAFSSON, M.G.: *Label-free detection and dynamic monitoring of drug-induced intracellular vesicle formation enabled using a 2-dimensional matched filter*. Autophagy 10 (2014), 57–69.
- [2] ANDRESEN, M., STIEL, A.C., TROWITZSCH, S., WEBER, G., EGGELING, C., WAHL, M.C., HELL, S.W., JAKOBS, S.: *Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007), 13005–13009.
- [3] BETZIG, E., PATTERSON, G.H., SOUGRAT, R., LINDWASSER, O.W., OLENYCH, S., BONIFACINO, J.S., DAVIDSON, M.W., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., HESS, H.F.: *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science 313 (2006), 1642–1645.
- [4] COX, S., JONES, G.E.: *Imaging cells at the nanoscale*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45 (2013), 1669–1678.
- [5] CREMER, C., MASTERS, B.R.: *Resolution enhancement techniques in microscopy*. Eur. Phys. J. H. 38 (2013), 281–344.
- [6] DESCHOUT, H., SHIVANANDAN, A., ANNIBALE, P., SCARSELLI, M., RADENOVIC, A.: *Progress in quantitative single-molecule localization microscopy*. Histochem. Cell Biol. 142 (2014), 5–17.

- [7] EHRENBERG, M.: *Scientific background on the Nobel Prize in chemistry 2014. Super-resolved fluorescence microscopy*. The Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm, 2014.
- [8] FIOLKA, R.: *Seeing more with structured illumination microscopy*. *Methods Cell Biol.* **123** (2014), 295–313.
- [9] FREEBODY, M.: *STED microscopy: a new chapter in light imaging*. *BioPhotonics* **9** (2013), 26–29.
- [10] GOETTFFERT, 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.* **105** (2013), L1–L3.
- [11] GUSTAFSSON, M. G. L.: *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. *J. Microsc.* **198** (2000), 82–87.
- [12] GUSTAFSSON, M. G. L.: *Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005), 13081–13086.
- [13] GUSTAFSSON, M. G. L., SHAO, L., CARLTON, P. M., WANG, C. J. R., GOLUBOVSKAYA, I. N., CANDE, W. Z., AGARD, D. A., SEDAT, J. W.: *Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination*. *Biophys. J.* **94** (2008), 4957–4970.
- [14] HARKE, B., BIANCHINI, P., VICIDOMINI, G., GALIANI, S., DIASPRO, A.: *Stimulated emission depletion (STED) microscopy*. In: *Encyclopedia of Biophysics*, Roberts, G. C. K. (Ed.), Springer, New York, 2013, 2470.
- [15] HARKE, B., ULLAL, C. K., KELLER, J., HELL, S. W.: *Three-dimensional nanoscopy of colloidal crystals*. *Nano Letters* **8** (2008), 1309–1313.
- [16] HELL, S. W.: *Far-field optical nanoscopy*. *Science* **316** (2007), 1153–1158.
- [17] HELL, S. W.: *Far-field optical nanoscopy*. In: *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology*, Graslund, A., Rigler, R., Widengren, J. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 2010, 365.
- [18] HESS, S. T., GIRIRAJAN, T. P. K., MASON, M. D.: *Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy*. *Biophys. J.* **91** (2006), 4258–4272.
- [19] HUANG, B., BABCOCK, H., ZHUANG, X. W.: *Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells*. *Cell* **143** (2010), 1047–1058.
- [20] HUANG, B., BATES, M., ZHUANG, X.: *Super-resolution fluorescence microscopy*. *Ann. Rev. Biochem.* **78** (2009), 993–1016.
- [21] HUANG, B., JONES, S. A., BRANDENBURG, B., ZHUANG, X.: *Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution*. *Nat. Methods* **5** (2008), 1047–1052.
- [22] HUANG, B., WANG, W., BATES, M., ZHUANG, X.: *Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy*. *Science* **319** (2008), 810–813.
- [23] KLAR, T. A., WOLLHOFEN, R., JACAK, J.: *Sub-Abbe resolution: from STED microscopy to STED lithography*. *Phys. Scr.* **T162** (2014), 014049, doi:10.1088/0031-8949/2014/T162/014049.
- [24] KUSUMI, A., TSUNOYAMA, T. A., HIROSAWA, K. M., KASAI, R. S., FUJIWARA, T. K.: *Tracking single molecules at work in living cells*. *Nat. Chem. Biol.* **10** (2014), 524–532.

- [25] LEUNG, B. O., CHOU, K. C.: *Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology*. Appl. Spectrosc. 65 (2011), 967–980.
- [26] LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., PATTERSON, G. H.: *Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging*. Trends Cell Biol. 19 (2009), 555–565.
- [27] MAGLIONE, M., SIGRIST, S. J.: *Seeing the forest tree by tree: super-resolution light microscopy meets the neurosciences*. Nat. Neurosci. 16 (2013), 790–797.
- [28] MOERNER, W. E.: *New directions in single-molecule imaging and analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007), 12596–12602.
- [29] PATTERSON, G., DAVIDSON, M., MANLEY, S., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.: *Superresolution imaging using single-molecule localization*. Annu. Rev. Phys. Chem. 61 (2010), 345–367.
- [30] PERTSINIDIS, A., ZHANG, Y., CHU, S.: *Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements*. Nature 466 (2010), 647–651.
- [31] PLÁŠEK, J.: *Konfokální mikroskop*. Vesmír 74 (1995), 4.
- [32] REGO, E. H., SHAO, L., MACKLIN, J. J., WINOTO, L., JOHANSSON, G. A., KAMPS-HUGHES, N., DAVIDSON, M. W., GUSTAFSSON, M. G. L.: *Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109 (2012), E135–E143.
- [33] RUST, M. J., BATES, M., ZHUANG, X.: *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nat. Methods 3 (2006), 793–795.
- [34] SCHERMELLEH, L., HEINTZMANN, R., LEONHARDT, H.: *A guide to super-resolution fluorescence microscopy*. J. Cell Biol. 190 (2010), 165–175.
- [35] SHAO, L., KNER, P., REGO, E. H., GUSTAFSSON, M. G. L.: *Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination*. Nat. Methods 8 (2011), 1044–1046.
- [36] SMALL, A. R., PARTHASARATHY, R.: *Superresolution localization methods*. Annu. Rev. Phys. Chem. 65 (2014), 107–125.
- [37] THOMPSON, M. A., LEW, M. D., MOERNER, W. E.: *Extending microscopic resolution with single-molecule imaging and active control*. Annu. Rev. Biophys. 41 (2012), 321–342.
- [38] TOOMRE, D., BEWERSDORF, J.: *A new wave of cellular imaging*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 26 (2010), 285–314.
- [39] TSIEN, R. Y.: *The green fluorescent protein*. Annu. Rev. Biochem. 67 (1998), 509–544.
- [40] VICIDOMINI, G., SCHOENLE, A., TA, H., HAN, K. Y., MONERON, G., EGGELING, C., HELL, S. W.: *STED nanoscopy with time-gated detection: theoretical and experimental aspects*. PLOS ONE 8 (2013), e54421, doi: 10.1371/journal.pone.0054421.
- [41] WALLACE, W., SCHAEFER, L. H., SWEDLOW, J. R.: *A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy*. Biotechniques 31 (2001), 1076–1097.
- [42] WEISSHART, K., DERTINGER, T., KALKBRENNER, T., KLEPPE, I., KEMPE, M.: *Super-resolution microscopy heads towards 3D dynamics*. Adv. Opt. Tech. 2 (2013), 211–231.