

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

# PAWEŁ POMORSKI

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN Zakład Biochemii Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Pasteura 3, 02-093 Warszawa E-mail: p.pomorski@nencki.gov.pl

# NAGRODA NOBLA Z CHEMII ZA ROK 2014: ZA "OPRACOWANIE METOD SUPERROZDZIELCZYCH W MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ", ERIC BETZIG, WILLIAM MOERNER I STEFAN HELL



Ryc. 1. Od lewej: Eric Betzig, Stefan Hell i William Moerner.

Ubiegłoroczna nagroda Nobla z dziedziny chemii przyznana za "opracowanie metod superrozdzielczych w mikroskopii fluorescencyjnej" powędrowała do trójki uczonych: Erica Betziga z Instytutu Medycznego Howarda Hughesa, Williama Moernera z Uniwersytetu Stanforda i Stefana Hella z EMBL (Rvc. 1). Zanim opiszemy tu nagrodzone dokonania bohaterów artykułu, należy się czytelnikowi kilka wyjaśnień. Po pierwsze, czemu mikroskopia fluorescencyjna jest tak ważna, że postępy w tej właśnie dziedzinie technik badawczych zaowocowały nagrodą Nobla. Po drugie zaś, czym jest zdolność rozdzielcza mikroskopu (a szerzej każdego układu optycznego) i w jaki sposób można jej istnienie obejść.

Wiele procesów badanych przez współczesną naukę zachodzi w skali niedostępnej dla naszej bezpośredniej obserwacji. Istnieje zatem potrzeba posiadania urządzeń technicznych pozwalających obserwować obiekty

o wymiarach znacznie mniejszych niż to, co widzimy nieuzbrojonym okiem. Nie należy się zatem dziwić, że osiągnięcia w rozwoju mikroskopii już w przeszłości owocowały nagrodami Nobla. W 1903 r. Richard Zsigmondy opracował "ultramikroskop", pozwalający obserwować cząstki koloidów w świetle, co przyniosło mu w 1925 r. nagrodę Nobla z chemii. Następnym dokonaniem, docenionym w 1953 r. przez Komitet Noblowski było skonstruowanie kontrastu fazowego, pozwalającego na obserwację obiektów kompletnie przezroczystych, uwalniając biologów od konieczności barwienia właściwie całego badanego materiału. Konstruktor kontrastu fazowego, Frits Zernike, musiał czekać na nagrodę ponad 20 lat, od publikacji swojego pomysłu, która nastapiła w 1932 r. Jeszcze dłużej czekał Ernst Ruska, konstruktor pierwszego mikroskopu elektronowego, który powstał w 1938 r., a nagrodą Nobla uhonorowany został dopiero w 1986 r., czyli ponad pół wieku później.

O ile mikroskop był narzędziem niezbędnym do zgłębiania mikroświata i rozwój nauk przyrodniczych byłby bez niego niemożliwy, to klasyczna mikroskopia optyczna pozostawia z punktu widzenia współczesnej biologii molekularnej sporo do życzenia. Nowoczesne narzędzie pomiarowe musi bowiem charakteryzować się specyficznością molekularną, pozwalającą na lokalizację pojedynczych cząsteczek białek i kwasów nukleinowych o określonej sekwencji oraz musi posiadać rozdzielczość przestrzenną określaną w nano, a nie mikroskali. Nie miejsce tu na szczegółowe omawianie historii mikroskopii fluorescencyjnej, trzeba jednak powiedzieć, że rozwijała się ona długo i współczesne mikroskopy fluorescencyjne są wynikiem wielu nakładających się udoskonaleń, rozpoczętych pracami E. Brumberga, który już w latach 50. ubiegłego wieku zauważył, że wykorzystanie fluorescencji pozwala na oświetlenie preparatu przez obiektyw i tak powstały mikroskop epifluorescencyjny tworzy urządzenie o unikatowej wygodzie stosowania. Dopiero jednak połączenie epifluorescencji ze stworzoną przez A. Coonsa i M. Kaplana metodą immunocytochemii, w której do specyficznych przeciwciał podłącza się cząsteczki barwnika fluorescencyjnego i uzyskuje znacznik, pokazujący dystrybucję ściśle określonej cząsteczki w mikroskali, dało narzędzie potrzebne biologom molekularnym, aby przejść od badań in vitro do studiów in vivo.

Wydawało by się, że mikroskopia fluorescencyjna jest zatem metodą pozwalającą nanieść wiedzę o składzie molekularnym materii ożywionej i procesach w niej zachodzących na przestrzenną strukturę żywych komórek. Niestety nie do końca. Przeszkoda jest ograniczona rozdzielczość mikroskopów optycznych (w tym fluorescencyjnych, a właściwie dowolnego układu optycznego), która wynika bezpośrednio z zasad optyki geometrycznej, a właściwie z jednej z nich, znanej jako Zasada Fermata. Mówi ona, że "Promień świetlny poruszający się (w dowolnym ośrodku) od punktu A do punktu B przebywa zawsze drogę optyczną, na której przebycie potrzeba czasu najkrótszego". Odwracając tę zasadę: jeśli dwa punkty w preparacie tworzą jeden punkt w obrazie, to znaczy, że nie można rozróżnić czasu przebiegu promienia świetlnego od tego punktu do każdego z wyjściowych punktów w preparacie. Musimy także pamiętać, że światło ma naturę falową i żeby punkty rozróżnić, to różnica drogi optycznej między każdym z nich a obrazem musi być większa od długości fali użytego światła. Trzeba tu zwrócić uwagę, że fakt ograniczenia zdolności rozdzielczej urządzenia optycznego nie jest konsekwencją konstrukcji tego urządzenia, ale natury światła wykorzystanego do obserwacji. Wzór na dokładną wartość rozdzielczości obiektywu mikroskopowego opublikował po raz pierwszy Ernst Abbe w 1873 r. (ABBE 1873) (chociaż Hermann von Helmholtz przypisuje wyprowadzenie tego wzoru działającemu

pół wieku wcześniej Joseph-Louis Lagrange-'owi). Nie miejsce tu na przytaczanie szczegółowych wzorów, ale istotna jest wartość zdolności rozdzielczej uzyskiwanej przez współczesne mikroskopy optyczne. Wynosi ona około połowy długości fali światła, w której dokonuje się obserwacji. W przypadku mikroskopu fluorescencyjnego jest to połowa długości fali emitowanej przez fluorofor. Jako, że zakres fal widzialnych, to mniej więcej od 400 do 700 nm, zdolność rozdzielcza mikroskopu optycznego nie przekracza 200 nm. Czy to dużo czy mało? Wydawałoby się, patrząc z perspektywy makroświata, mierzonego w milimetrach czy metrach, to bardzo mało. Jednak z punktu widzenia molekularnej struktury świata ożywionego jest to wartość niewystarczająca. Dla przykładu przyjrzyjmy się strukturze cytoszkieletu, jednej z najczęściej obrazowanych struktur subkomórkowych. Składa się on, między innymi, z mikrotubul i mikrofilamentów aktynowych. Są to białkowe struktury włókniste o średnicy, odpowiednio 25 nm i nieco poniżej 10 nm. Jak widać, mikroskop optyczny nie rozróżni dwóch mikrofilamentów, nawet jeśli będą one leżeć w odległości kilkunastu średnic jeden od drugiego. Wydawałoby się więc, że mikroskop optyczny nie jest właściwym narzędziem do obserwacji materii ożywionej na tak niskim poziomie. Nie jest to do końca prawdą i tu musimy wprowadzić pojęcie superrozdzielczości.

Na wstępie zadajmy sobie pytanie, co się dzieje, gdy obserwujemy pojedynczy obiekt o wymiarach mniejszych niż zdolność rozdzielcza urządzenia optycznego? Czy go widać? Każdy z łatwościa może przeprowadzić takie doświadczenie. Wystarczy w pogodną noc spojrzeć w rozgwieżdżone niebo. Co zatem widzimy, jeśli obiekty są tak małe, że nie możemy dostrzec ich kształtu ani wymiarów? Okazuje się, że w takim przypadku to, co widzimy, nie zależy od tego co oglądamy, ale od instrumentu optycznego, którego używamy, czyli naszego oka. Obraz, który widzimy, to plamka Airy'ego, nazwana tak na cześć angielskiego astronoma Georga Biddella Airy'ego, choć wcześniej już wiedziano, że gwiazdy wyglądają jak koliste obiekty otoczone przez naprzemienne ciemne i jasne pierścienie.

W 1981 r., amerykański biolog i mikroskopista, Robert Day Allen (ALLEN i współaut. 1981) oraz Shinya Inoue (INOUE 1981), obaj pracujący w Woods Hole Marine Biology Laboratory, zastąpili przy swych mikroskopach aparaty fotograficzne kamerami wideo i Allen opracował elektroniczny system wzmacniania kontrastu obrazu AVEC-DIC (ang. Allen Video Enhanced Contrast for DIC Nomarski optics). Narzędzie stworzone przez Allena pozwoliło na badanie ruchu pęcherzyków po mikrotubulach *in vitro*, w którym osiągnięto dokładność pomiaru położenia pęcherzyka poniżej 10 nm (SCHNAPP i współaut. 1988). W ten oto sposób pokazano, że choć nie możemy zobaczyć kształtu obiektu mniejszego niż zdolność rozdzielcza urządzenia, to możemy praktycznie dowolnie dokładnie określić jego położenie. Droga do mikroskopii superrozdzielczej była otwarta.

Nagrodzeni uczeni podążali w kierunku przełamania bariery Abbego odrębnymi ścieżkami, wychodząc z zupełnie różnych założeń. Nowoczesna mikroskopia fluorescencyjna tworzy obraz na dwóch etapach: najpierw światło, ogniskowane przez obiektyw wzbudza fluorochrom w preparacie, a następnie ten fluorochrom emituje światło, które posłuży do tworzenia obrazu. Eric Betzig i William E. Moerner, pracując niezależnie, starali się opracować taką metodykę obserwacji świecenia floroforu, aby wydobyć z niego informację o położeniu pojedynczych świecących cząsteczek. Stefan W. Hell z kolei skupił się na opracowaniu tak precyzyjnej metody oświetlania preparatu, by wzbudzać fluorescencję w bardzo małych obszarach preparatu, znacznie mniejszych niż zdolność rozdzielcza. Od strony konstrukcyjnej, prace Erica Betziga i Williama E. Moernera doprowadziły do udoskonalania mikroskopu szerokiego pola, zaś Stefan W. Hell pracował nad rozwojem mikroskopu konfokalnego.

Niezależnie jednak od tego, jakie rozwiązanie techniczne przyjęli badacze, podążając ścieżką wytyczoną przez RD Allena, musieli doprowadzić do sytuacji, w której oglądaliby fluorescencję pojedynczych cząsteczek barwnika. Wtedy mogli ustalić ich dokładne położenie na płaszczyźnie obrazowania i wykorzystać je do stworzenia obrazu wysokiej rozdzielczości. Tradycyjny obraz fluorescencyjny tworzony jest jednak przez tysiące cząsteczek świecącego fluoroforu. Pochodzące z nich sygnały nakładają się i tworzą ciągły obraz. Istnieje tylko jeden sposób, aby dokładnie ustalić ich położenie: trzeba je obserwować po kolei.

Pierwszy krok w tym kierunku wykonał William Moerner, który już w latach 80. ubiegłego wieku zajął się spektroskopią pojedynczych cząsteczek fluoroforów. W 1997 r. opublikował pracę w Nature, w której opisy-

wał nietypowe białko fluorescencyjne, jakie otrzymał od innego noblisty, Rogera Tsiena (DICKSON i współaut. 1997). Zielone białko fluorescencyjne (GFP), ma zazwyczaj dwie długości światła, które je może wzbudzać, odpowiadające zjonizowanej i niezjonizowanej formie barwnika. W latach 90. laboratorium Tsiena pracowało nad mutantami natywnych GFP w celu opracowania barwników o różnych właściwościach fluorescencyjnych. Dwa konstrukty, określane roboczo przez Tsiena jako T203F i T203Y, miały na tyle dziwną charakterystykę, że Tsien poprosił Moernera o pomoc. Uzyskane wyniki były bardzo ciekawe, bo okazało się, że wzbudzanie barwnika światłem 488nm prowadziło najpierw do mrugania, a potem do zaniku fluorescencji. Co ważniejsze, napromieniowanie światłem 405 nm przywracało barwnik do stanu wyjściowego. W ten sposób otrzymano pierwsze białko fluorescencyjne, które można było optycznie włączać i wyłączać. Na bazie tego odkrycia powstała klasa białek fluorescencyjnych określana jako PA-FP (ang. photoactivated fluorescent proteins). To one umożliwiły przełamanie bariery rozdzielczości w mikroskopii szerokiego pola (NIENHAUS i NIENHAUS 2014).

Jak już wcześniej powiedzieliśmy, aby dokładnie określić położenie plamki Airy'ego odpowiadającej fluorescencji pojedynczej cząsteczki barwnika, trzeba ją obserwować pojedynczo. Jednocześnie obraz w mikroskopie fluorescencyjnym tworzony jest przez sygnał z tysięcy cząsteczek. Fluorescencja jest zjawiskiem losowym. Określony poziom światła powoduje określone prawdopodobieństwo wzbudzenia i emisji fotonu. To samo dotyczy przełączania PA-FP. Można zatem tak dobrać poziom światła "wyłączającego" cząsteczki PA-FP, by prawdopodobieństwo wygaszenia barwnika było wysokie, ale znacząco różne od jedności. Przy dobrze dobranej wartości intensywności światła wygaszającego ujrzymy zamiast obrazu konstelację pojedynczych punktów. To sygnał z pojedynczych cząsteczek barwnika. Można teraz precyzyjnie określić ich położenie i całą procedurę właczania-wyłączania pobudliwości barwnika powtórzyć. Znów zobaczymy konstelację punktów, ale jako że zjawisko ma charakter losowy, beda to inne punkty. Co więcej, po skończonej liczbie cykli zobaczymy w ten sposób sygnał pochodzący ze wszystkich zawartych w preparacie cząsteczek fluorochromu (Ryc. 2). Metoda ta określona została jako stochastyczna mikroskopia



Ryc. 2. Zasada działania mikroskopii stochastycznej.

A. Mikrofilament aktynowy o średnicy ~10 nm. B. Ten sam filament zabarwiony barwnikiem fluorescencyjnym, każda cząsteczka daje obraz o średnicy 200 nm. C. Dla każdej cząsteczki zostaje odnaleziony środek i D. w miejscu odnalezionego środka wstawiony zostaje punkt o rozmiarze niepewności pomiaru położenia środka.

superrozdzielcza (Ryc. 3). Pierwszy działający dzięki niej mikroskop został skonstruowany przez Erica Betziga i nazwany PALM (ang. photoactivated localization microscopy, mikroskopia lokalizacji fotoaktywacyjnej) (BET-ZIG i współaut. 2006). PALM to pierwszy mikroskop używający metody stochastycznej, ale wcale nie jedyny. Pokrótce trzeba tu przedstawić bestiariusz metod stochastycznych i ich nic nie mówiących nazw-skrótowców. Są one wynikiem zainteresowania komercyjnego mikroskopią superrozdzielczą i aktywnościa patentowa oraz produkcyjna w tym obszarze. Chronologicznie, drugą po PALM konstrukcją był STORM (ang. stochastic optical reconstruction microscopy, stochastyczna mikroskopia rekonstrukcyjna) (RUST i współaut. 2006). Różnica między tymi dwoma konstrukcjami nie wynikała z



Ryc. 3. Różnica w rozdzielczości mikroskopii stochastycznej i tradycyjnej mikroskopii szerokiego pola.

Obraz jądra komórki nowotworu kości. Widocznych jest około 70 tysięcy cząsteczek histonu H2A (czerwony, barwiony RFP) i 50tys cząsteczek białka Snf2H, uczestniczącego w przebudowie struktury chromatyny (zielony, GFP). Pole optyczne 470 µm<sup>2</sup> o głębi 600 nm. (GUNKEL i współaut. 2009) za Andy Nestl na licencji CC. Uznanie autorstwa na tych samych warunkach.

samej zasady tworzenia obrazu, ale z rodzaju użytych cząsteczek fluorescencyjnych. W PALM używa się fotoaktywowalnych białek fluorescencyjnych, zaś w STORM fotoprzełączalnych par fluoroforów drobnocząsteczkowych (orginalnie Cy5 i Cy3). Zarówno PALM, jak i STORM zostały oparte o wykorzystanie innej, wysoce zaawansowanej techniki mikroskopowej, a mianowicie TIRF (ang. total internal reflection microscopy, mikroskopia całkowitego odbicia wewnętrznego). Stało się tak, gdyż metoda stochastyczna pozwala rozróżniać cząsteczki barwnika w płaszczyźnie obrazu, ale nie w osi Z mikroskopu. Aby zagwarantować brak wzbudzania cząsteczek fluoroforu poza płaszczyzną ostrości, użyto techniki, która polega na wzbudzaniu fluorescencji światłem wchodzącym do szkiełka podstawowego pod tak dużym katem, by uległo ono całkowitemu odbiciu. Wedle optyki klasycznej, takie światło nigdy nie wnika do preparatu i nie powinno wzbudzać w nim świecenia. Zgodnie z mechaniką kwantową, powstaje jednak na granicy szkła fala ewanescencyjna, która może na bardzo małym (około 100 nm) dystansie wzbudzać fluorochrom. Dzięki temu TIRF charakteryzuje się niesłychanie cienkim skrawkiem optycznym, wręcz stworzonym do technik takich jak

PALM. Ma jednak swoje wady; przede wszystkim pozwala wizualizować tylko te struktury, które znajdują się na skraju preparatu. Aby uniknąć tego problemu stworzono technikę fPALM, która jest połączeniem PALM z mikroskopią konfokalną. Z kolei dSTORM (ang. direct STORM) różni się od STORM wykorzystaniem pojedynczej cząsteczki drobnocząsteczkowego fluorochromu, która może ulegać utlenianiu i redukcji pod wpływem światła. Dodatkowo, aby uniknąć naruszania prawa o znakach towarowych, firmy używaja synonimów obecnych na rynku technik i tak na przykład dSTORM jest znany również jako GSD (ang. ground state depletion microscopy, mikroskopia usuwania stanu podstawowego). Z punktu widzenia użytkownika, nadal najistotniejszy jest jednak wybór pomiędzy technikami z rodziny PALM, przeznaczonymi do pracy z białkami fluorescencyjnymi, i STORM, lepszymi do drobnocząsteczkowych barwników sprzęganych z przeciwciałami.

Techniki stochastyczne całkiem wygodnie da się zastosować również do tworzenia obrazów 3D. Tu trzeba jeszcze raz podkreślić, że obraz superrozdzielczy nie powstaje w mikroskopie, tylko jest obliczany i konstruowany dla sumy zlokalizowanych cząsteczek barwnika fluorescencyjnego. W miarę oddalania się od płaszczyzny ostrości krawędzie obrazu dla każdego z punktów stają się rozmyte. Jeśli teraz wprowadzimy w szlak optyczny słabą soczewkę cylindryczną (taką, której powierzchnia jest wycinkiem cylindra, a nie sfery jak to ma miejsce w przypadku większości soczewek), to nabiera ciekawej własności: w miarę oddalania się od płaszczyzny ostrości obraz punktu wydłuża się względem jednej z osi, oś ta zależy od tego czy obiekt znajduje się pod, czy nad płaszczyzną ostrości. Badając położenie i kształt obrazu możemy zatem zlokalizować cząsteczkę barwnika w trzech wymiarach.

Nieco wcześniej, bo w latach 90. ubiegłego wieku zaczął pracę nad mikroskopem superrozdzielczym Stefan Hell. Ten urodzony w Rumunii uczony niemiecki wpadł na swój pomysł podczas stażu na fińskim uniwersytecie w Turku, na którym przebywał w latach 1993-1996. Skonstruowany przez Hella przyrząd to mikroskop konfokalny ze zmodyfikowanym systemem wzbudzania fluorescencji. Opisując stochastyczną mikroskopię superrozdzielczą, zwróciliśmy uwagę, że opiera się ona na pomyśle, by cząsteczki fluorochromu oglądać pojedynczo, jed-

na po drugiej. Nieco podobna zasada leży u samych podstaw mikroskopii konfokalnej (PAWLEY 2006). W mikroskopie konfokalnym preparat jest obserwowany punkt po punkcie w sekwencji czasowej, a obraz jest następnie rekonstruowany w pamięci komputera z zarejestrowanych jasności pojedynczych punktów. Pomysł Stefana Hella był prosty: jeśli uda nam się wzbudzić fluorescencję w obszarze mniejszym niż zdolność rozdzielcza mikroskopu, to będziemy mogli zrekonstruować obraz konfokalny o takiej rozdzielczości, jak wielkość obszaru wzbudzanego (Ryc. 4). Jak jednak tego dokonać, skoro te same prawa optyki dotyczą fali wzbudzającej i wzbudzanej? Stefan Hell (HELL i WICHMANN 1994) wykorzystał tu zjawisko emisji wymuszonej, zachodzącej we fluoroforze (stad nazwa mikroskopu STED od ang. stimulated emission depletion, czyli wygaszanie przez emisję wymuszoną). Emisja wymuszona jest zjawiskiem znanym od dawna, przewidziana została teoretycznie przez Alberta Einsteina i opiera się na niej, między innymi, działanie laserów. Polega ona na tym, że jeśli na wzbudzony atom padnie foton o energii wzbudzenia, to atom wyemituje drugi foton, identyczny z padają-



Ryc. 4. Różnica w rozdzielczości mikroskopii STED i tradycyjnej mikroskopii konfokalnej.

Obraz przedstawia białka poru jądrowego: czerwono zabarwioną nukleoporynę gp210, na zielono białka kanału centralnego. Za portalem Wikimedia Commons użytkownik Tassekaffee, licencja CC Uznanie Autorstwa.



Ryc. 5. Zasada działania spiralnej płytki fazowej.

cym. Wydajność emisji wymuszonej zależy od intensywności wzbudzającego ją strumienia światła. Barwnik fluorescencyjny, który ma całe spektrum możliwych wzbudzeń można w ten sposób zmusić do emisji ściśle określonej długości fali, w przypadku mikroskopu STED, znacząco przesuniętej ku czerwieni, w porównaniu z maksimum emisji spontanicznej. Jeśli teraz nałożymy na siebie dwie wiązki laserowe: wymuszającą i pobudzającą, to ich fotony będą padać na te same cząsteczki barwnika. W mikroskopie STED na ścieżce optycznej wiązki wymuszającej umieszczona jest spiralna płytka fazowa, która powoduje, że gaussowska (najjaśniejsza w środku) wiązka laserowa zamienia się w wiązkę o przekroju obwarzanka (pierścieniową, ciemną w środku, Ryc. 5). Tam, gdzie wiązka wymuszająca jest jasna, barwnik fluorescencyjny emituje światło zgodne z wiązką wymuszającą. Tam, gdzie jej intensywność jest mała (w samym środku), barwnik emituje fotony spontanicznie. Jako, że długość fali światła wymuszonego jest znacząco większa niż maksimum fluorescencji spontanicznej, można je łatwo odciąć odpowiednim filtrem barierowym. Wielkość obszaru wzbudzania fluorescencji spontanicznej zależy w takiej sytuacji od stosunku intensywności wiązek. Teoretycznie można w ten sposób wzbudzać dowolnie mały obszar preparatu i przy gęstym skanowaniu uzyskiwać dowolnie dużą rozdzielczość obrazu. Ciekawostką może być fakt, że taka konstrukcja mikroskopu została opatentowana w 1986 r. w Związku Radzieckim przez Viktora A. Okhonina (patent no. SU1374922A1) i patent ten był znany, o czym świadczy fakt cytowania w licznych patentach zachodnich. Nie ma jednak dowodów, by Stefan Hell wiedział o istnieniu patentu, gdy w latach 90. rozpoczynał prace, które doprowadziły go do Nagrody Nobla.

Opracowanie mikroskopii superrozdzielczej otwiera zupełnie nowe perspektywy w naukach o życiu. Obserwacja struktury w nanoskali pozwoli na obserwacje struktur białkowych w ich rzeczywistej skali. Nie ma jednak róży bez kolców. Mikroskopia superrozdzielcza jest generalnie niewydajna, większość energii wkładanej w obrazowanie jest paradoksalnie zużywana na wygaszanie, a nie wzbudzanie fluorescencji. To w znacznym stopniu ogranicza prędkość obrazowania. Drugim, poważnym ograniczeniem tej metody jest możliwa gestość barwienia struktur. Cząsteczka białka fluorescencyjnego ma jedną grupę aktywną i będzie widoczna jako pojedynczy punkt, niezależnie od tego z jaką rozdzielczością będzie obrazowany preparat. Co więcej, będzie się ona znajdować tam, gdzie białko fluorescencyjne, a nie tam gdzie znajduje się białko znakowane i ta odległość będzie się stawać tym bardziej istotna, im większą rozdzielczość obrazowania uzyskamy. W jeszcze większym stopniu dotyczy to metod immunocytochemicznych, w których pomiędzy badanym białkiem czy jego domeną a fluoroforem znajdują się dwa przeciwciała (rozmiar przeciwciała to około 15 nm, więc barwnik może się znajdować nawet 30 nm od badanego białka). Puentylizm obrazów superrozdzielczych nie jest zatem wynikiem szumu, do którego jesteśmy przyzwyczajeni w mikroskopii konfokalnej, ale immanentną cechą obserwowanych obiektów. Wszystkie te wady nie zmniejszają jednak ogromnego postępu w obrazowaniu biologicznym, jaki odbywa się dzięki opracowaniu fluorescencyjnych metod superrozdzielczych i w najbliższych latach będziemy świadkami ich rozpowszechniania, ograniczonego jedynie wysokimi kosztami sprzętu i dużymi wymaganiami co do umiejętności użytkowników.

### NAGRODA NOBLA Z CHEMII ZA ROK 2014: ZA "OPRACOWANIE METOD SUPERROZDZIELCZYCH W MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ", ERIC BETZIG, WILLIAM MOERNER I STEFAN HELL

#### Streszczenie

Niniejszy artykuł opisuje prace Erica Betziga, Stefana W. Hella i Williama E. Moernera, które doprowadziły ich do Nagrody Nobla z dziedziny chemii "za stworzenie metod superrozdzielczych w mikroskopii fluorescencyjnej". Na wstępie przedstawię pokrótce problem rozdzielczości układów optycznych oraz omówione szczególne znaczenie mikroskopii fluorescencyjnej w rozwoju nauk o życiu. Następnie omówię postęp prowadzący do obejścia limitu rozdzielczości optycznej i przedstawiona zasada działania mikroskopii PALM, stworzonej przez Erica Betziga. Podkreślona zostanie rola cząsteczek fotoprzełączalnych barwników fluorescencyjnych w tych pracach i rola Williama E. Moernera w ich tworzeniu. Na koniec omówię mikroskop konfokalny STED, zbudowany przez Stefana W. Hella.

## 2014 NOBLE PRIZE IN CHEMISTRY: ERIC BETZIG, WILLIAM MOERNER AND STEFAN HELL FOR THE DEVELOPMENT OF SUPER-RESOLVED FLUORESCENCE MICROSCOPY

### Summary

In this paper we describe works of Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner which lead them to the Nobel Prize in Chemistry "for the development of super-resolved fluorescence microscopy". The problem of resolution in optics is shortly discussed as well as the importance of fluorescence microscopy in life sciences. The way of how to bypass

optical resolution is described as well as basic ideas underlying PALM microscopy by Eric Betzig are introduced. The use of photoswitchable fluorescent dyes is emphasized together with role of William E. Moerner in their development. Finally, the construction of STED confocal microscope built by Stefan W. Hell is presented.

- ABBE E., 1873. Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen "Wahrnehmung. und der mikroskopischen Arch. für Mikroskopische Anat. 9, 413-468.
- ALLEN R. D., ALLEN N. S., TRAVIS J. L., 1981. Video-enhanced contrast, differential interference con-trast (AVEC-DIC) microscopy: a new method ca-pable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of Allogromia laticollaris. Cell Motil. 1, 291-302.
- DETZIG E., PATTERSON G. H., SOUGRAT R., LINDWASSER O. W., OLENYCH S., BONIFACINO J. S., DAVIDSON M. W., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J., HESS H. F., 2006. Im-
- W., LIPFINCOTF-SCHWARTZ J., HESS H. F., 2000. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science 313, 1642-1645.
  DICKSON R. M., CUBITT A. B., TSIEN R. Y., MOERNER W. E., 1997. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. Nature 388, 355-358.
  GUNKEL M., ERDEL F., RIPPE K., LEMMER P., KAUFMANN R., HÖRMANN C., AMBERGER R., CREMER C., 2009.
- R., HÖRMANN C., AMBERGER R., CREMER C., 2009. Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. Biotechnol. J. 4, 927-938.

- HELL S. W., WICHMANN J., 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence mi-
- croscopy. Opt. Lett. 19, 780. INOUE S., 1981. Video image processing greatly enhances contrast, quality, and speed in polariza-tion-based microscopy. J. Cell Biol. 89, 346–356. NIENHAUS K., NIENHAUS G. U., 2014. Fluorescent pro-
- Reinhaus G., Nienhaus G. C., 2014. Hubbestein pro-teins for live-cell imaging with super-resolution. Chem. Soc. Rev. 43, 1088-1106.
  PAWLEY J. (red.), 2006. Handbook of Biological Con-focal Microscopy. Springer, New York.
  RUST M. J., BATES M., ZHUANG X., 2006. Sub-diffrac-tion for the state of the state.
- tion-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat. Methods 3, 793-795.
- SCHNAPP B. J., GELLES J., SHEETZ M. P., 1988. Nanometer-scale measurements using video light microscopy. Cell Motil. Cytoskel. 10, 47-53.