

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

©2019 г. А. С. МИШИН, К. А. ЛУКЪЯНОВ

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. II. Сканирующая наноскопия. III. Локализационная
наноскопия. IV. 3D-наноскопия. V. Функциональная наноскопия.
VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Наблюдение за живыми клетками предоставляет исследователям богатую информацию, получить которую не представляется возможным никакими другими методами. Вследствие этого, световая микроскопия уже сотни лет продолжает оставаться актуальным инструментом биологов. Флуоресцентная микроскопия позволяет выявлять целевые клеточные структуры, достигая очень высокой специфичности и чувствительности [1]. Появление в 90-х годах прошлого века

Принятые сокращения: 3B – Bayesian analysis of bleaching and blinking, Байесовский анализ мигания и фотообесцвечивания; EM-CCD – electron-multiplying charge-coupled device, прибор с зарядовой связью с электронным усилением; FAP – fluorogen-activating protein, флуороген-активирующий белок; FLINC – fluorescence fluctuation increase by contact, увеличение флуктуаций флуоресценции при контакте; GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок; LLSM – lattice light sheet microscopy, микроскопия светового листа с дискретным освещением; PAINT – points accumulation for imaging in nanoscale topography, накопление точек для имиджинга наноразмерной топографии; RESOLFT – reversible saturable/switchable optical linear fluorescence transitions, обратимые насыщаемые/переключаемые оптические линейные переходы флуоресценции; sCMOS – scientific complementary metal-oxide-semiconductor, комплементарная структура металл–оксид–полупроводник для научных съемок; SIM – structured illumination microscopy, микроскопия структурированного освещения; SMLM – single molecule localization microscopy, микроскопия локализации одиночных молекул; SOFI – super-resolution optical fluctuation imaging, имиджинг оптических флуктуаций со сверхвысоким разрешением; SRRF – super-resolution radial fluctuations, сверх-разрешающие радиальные флуктуации; STED – stimulated emission depletion, истощение флуоресценции вынужденным излучением.

Адрес для корреспонденции: mishin@ibch.ru

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 16-14-10364).

технологий генетически кодируемых флуоресцентных меток (GFP и других флуоресцентных белков) привело к революционному развитию методов анализа белков в живой клетке [2]. Прямая визуализация внутриклеточной локализации, динамики и взаимодействия целевых белков в режиме реального времени позволила решить множество фундаментальных вопросов и создать принципиально новые системы скрининга лекарственных средств [3, 4].

Основным недостатком оптической микроскопии является относительно низкое пространственное разрешение получаемых изображений. Фундаментальные процессы дифракции света приводят к невозможности разделения точечных объектов, расположенных ближе определенного расстояния. Этот феномен был впервые описан Эрнстом Аббе в 1873 г. и получил название дифракционного предела или предела Аббе [5].

При наблюдении точечного источника с помощью оптического микроскопа, зависимость распределения освещенности от координат в плоскости изображения описывается с помощью так называемой функции рассеяния точки (point spread function, PSF). Для оптической системы без аберраций функция рассеяния точки представляет собой центральный максимум и ряд побочных максимумов, расположенных симметрично относительно оптической оси. Диаметр центрального максимума, также называемого диском Эри, ограничен соотношением $1,22 \lambda/NA$, где λ – длина волны света, NA – числовая апертура оптической системы. Числовая апертура в широкопольной микроскопии в свою очередь ограничена показателем преломления среды, таким образом изображение точечного источника флуоресценции всегда оказывается больше длины волны света. Как видно из формулы, помимо оптических характеристик среды (коэффициент преломления) и объектива микроскопа (числовая апертура), теоретический предел пространственного разрешения зависит от длины волны света: чем короче волна, тем лучше разрешение. Например, при прочих равных условиях флуоресцентной микроскопии, возбуждение фиолетовым лазером 405 нм обеспечивает разрешение в 1.56 раза больше, чем возбуждение красным лазером 633 нм. Однако работа с биологическими объектами в ультрафиолетовой и фиолетовой областях спектра затруднена из-за интенсивной аутофлуоресценции и, в случае живых клеток, чрезвычайно высокой фототоксичности, которые являются следствием большого количества эндогенных молекул, поглощающих коротковолновый свет. Для типичных условий флуоресцентной микроскопии зеленых флуорофоров (возбуждение синим светом 488 нм, объектив с числовой апертурой 1.40 и масляной

иммерсией) разрешение составляет приблизительно 200 нм в плоскости XY и 500 нм по оси Z [5].

Долгое время считалось, что для визуализации клеточных структур меньшего размера может быть использована только электронная микроскопия, позволяющая достигать нанометрового разрешения [6, 7]. Несмотря на неоценимый вклад этого метода в понимание тонкой клеточной организации, электронная микроскопия неприменима к прижизненному исследованию клеток.

В 90-х годах 20-го века стали появляться технологии флуоресцентной микроскопии, позволяющие получать разрешение лучше, чем дифракционный предел. Например, методы 4Pi и I²M использовали облучение образца когерентным светом через два светосильных объектива напротив друг друга для улучшения разрешения по оси Z в несколько раз [8–10]. Вследствии технической сложности оборудования и последующей математической обработки изображений, а также неудобства работы с биологическими образцами между близко стоящими объективами данные микроскопические системы не получили широкого распространения.

Существенное улучшение разрешения в плоскости XY достигается в методе микроскопии структурированного освещения (Structured Illumination Microscopy, SIM) [11]. SIM использует дифракционную решетку для создания на образце регулярного паттерна возбуждающего света в виде близко расположенных полос. Получение серии широкопольных изображений при различных углах поворота решетки и последующая математическая обработка позволяет реконструировать изображение, в котором разрешение улучшено приблизительно в два раза. Преимуществами SIM являются достаточно быстрое получение изображений, возможность использования обычных флуорофоров и многоцветного мечения, что делает этот метод прекрасным применимым для микроскопии живых клеток. Вместе с тем, относительно небольшое улучшение разрешения (теоретический предел – всего в два раза) отодвинуло SIM на второй план с появлением намного более эффективных методов сверхразрешающей флуоресцентной микроскопии, описанных ниже.

По-настоящему революционным прорывом в увеличении разрешающей способности флуоресцентной микроскопии можно считать разработку двух групп методов: первая на основе истощения флуоресценции вынужденным излучением (Stimulated Emission Depletion, STED) [12], и вторая на основе локализации одиночных молекул (Single Molecule Localization Microscopy, SMLM) [13–15]. Важно, что эти подходы по сути не имеют теоретического предела достигаемого

пространственного разрешения, которое в «идеальных» условиях (высокая мощность лазера, яркий фотостабильный флуорофор) может достигать нескольких нанометров. Такое разрешение сопоставимо с размерами белков и меток, используемых в биологии (например, флуоресцентных белков и антител, меченных красителями) и, следовательно, не требует дальнейшего улучшения. Изобретение этих подходов было отмечено Нобелевской премией по химии 2014 г. Эрику Бетцигу, Штефану Хеллу и Уильяму Мернеру [16]. Принципы STED и SMLM подробно описаны во множестве обзоров, например [5, 17–21]. В настоящем обзоре мы фокусируемся на обсуждении вариантов этих методов, пригодных для изучения живых клеток. Какие основные трудности встречается исследователь в этой области? Во-первых, захват изображения должен происходить быстро – быстрее, чем характерные времена динамических изменений изучаемой клеточной структуры и движения самой клетки. Во-вторых, фототоксичность облучения должна быть сведена к минимуму. Этого можно достигнуть путем снижения интенсивности и времени облучения, а также использования длинноволнового света. К сожалению, большая часть методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (наноскопии) требует световых потоков очень высокой интенсивности (до 10^3 – 10^4 Вт/см² для SMLM и до 10^7 – 10^8 Вт/см² для STED), длительного (минуты-часы) получения серий из 10^3 – 10^5 изображений (SMLM), и/или облучения коротковолновым светом для фотоконверсии меток (SMLM). Ниже мы опишем методические приемы, позволяющие в значительной мере преодолевать эти проблемы, хотя на сегодняшний момент «идеального» метода быстрого и щадящего получения изображений нанометрового разрешения еще не создано.

II. СКАНИРУЮЩАЯ НАНОСКОПИЯ

МИКРОСКОПИЯ STED

Метод STED использует два коллинеарных лазерных пучка, один для возбуждения флуоресценции, а другой – для ее тушения во внешней области светового пятна за счет вынужденного излучения (рис. 1А). Гасящий (STED) лазер сфокусирован в форме кольца («пончика») вокруг возбуждающего пучка; внутренний диаметр этого кольца, где флуоресценция не подавляется, нелинейно уменьшается с увеличением мощности STED-лазера. Несомненным преимуществом STED микроскопии является высокая скорость съемки (как при обычной лазерной сканирующей микроскопии). Это делает ее хорошо применимой для анализа живых динамических систем, например,

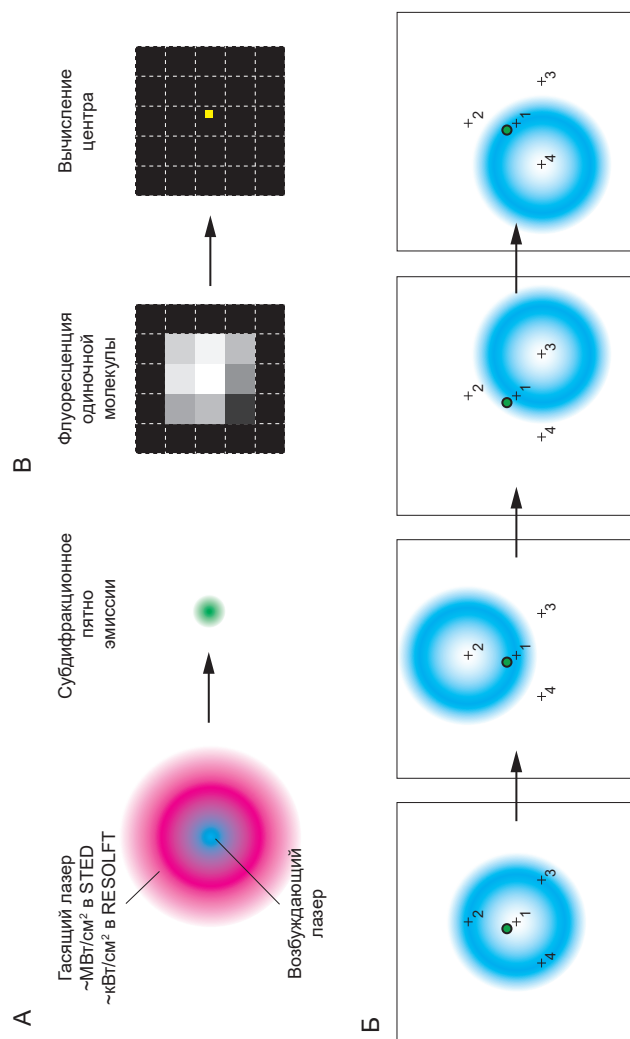


Рис. 1. Схемы некоторых методов преодоления дифракционного барьера. (А) Методы STED и RESOLFT используют гасящий лазер в форме кольца («пончика»), что приводит к сужению пятна эмиссии до субдифракционного размера. (Б) Метод MINFLUX определяет координаты флуоресцирующей одиночной молекулы (зеленый кружок) путем измерения интенсивностей ее флуоресценции при четырех положениях (обозначены крестами 1, 2, 3 и 4) возбуждающего лазера в форме кольца (синий «пончик») субдифракционного размера (50–200 нм). Интенсивность сигнала зависит от положения молекулы относительно кольцевого градиента интенсивности возбуждающего света, что позволяет картировать положение молекулы с очень высокой точностью. (В) Метод локализационной микроскопии SMLM основан на детекции одиночных молекул (слева: показан фрагмент матрицы детектора 5×5 пикселей, размер пикселя > 100 нм), и последующем вычислении центра распределения светового пятна (желтый прямоугольник размером $\ll 100$ нм, справа).

выброса везикул с нейромедиаторами в синапсах [22]. Хотя многоцветная STED-микроскопия затруднена из-за нежелательного пересечения длин волн возбуждающих и гасящих лазеров, подбор красителей позволяет решить эту проблему и проводить двухцветную микроскопию живых клеток с разрешением лучше 50 нм [23]. Вместе с тем, для достижения субдифракционного разрешения 30–50 нм приходится использовать очень высокие интенсивности STED-лазера – порядка 10–100 МВт/см². Хотя обычно применяется STED-лазер в красной области спектра (например, 594 нм), такой интенсивный световой поток приводит к быстрому фотообесцвечиванию красителей и возникновению фототоксических эффектов.

Частичным решением данной проблемы является STED с импульсными лазерами и времяразрешенной детекцией (gated STED) [24]. За счет регистрации эмиссии только с ожидаемым временем жизни флуоресценции можно снижать интенсивность STED-лазера в 3–10 раз без потери разрешения.

Сужение области сканирования до небольших (субдифракционного размера) полей зрения оказалось чрезвычайно эффективным способом снизить фотообесцвечивание красителя в микроскопии STED [25]. При таком подходе, названном MINFIELD, флуорофоры, остающиеся внутри кольца гасящего лазера, не подвергаются воздействию максимального светового потока и гораздо дольше остаются флуоресцентными. Так например, сканирование области 200 × 200 нм², соответствующей одиночной ядерной поре, позволяет достичь увеличения фотостабильности на порядок по сравнению со сканированием целого ядра при тех же параметрах, и в результате получить изображение меченных белков комплекса ядерной поры с большим разрешением или в динамике.

МИКРОСКОПИЯ RESOLFT

Тушение флуоресценции в микроскопии STED достигается за счет воздействия STED-лазера на обычные флуорофоры в возбужденном состоянии (время жизни – несколько наносекунд), что требует очень высоких интенсивностей света. Для фотопереклюаемых флуоресцентных белков с обратимой конверсией между флуоресцентным и темновым состояниями такое тушение достигается светом на порядки меньшей интенсивности. Это было использовано при создании метода сверхразрешающей микроскопии, названного RESOLFT (reversible saturable/switchable optical linear fluorescence transitions) [26]. Оптическая схема микроскопа для RESOLFT сходна с таковой для STED, с гасящим лазером сфокусированным в виде кольца вокруг

пятна возбуждающего лазера. Однако мощность гасящего лазера в RESOLFT на несколько порядков ниже, чем в STED, и составляет приблизительно 1–10 кВт/см², что соответствует типичным уровням облучения в конфокальной микроскопии.

Основными требованиями к фотопереключаемым флуоресцентным белкам для RESOLFT являются способность к многократному (несколько сотен раз) переключению между темновым и флуоресцентным состояниями, а также как можно более высокая скорость переключения. Прошло несколько лет с первой демонстрации принципиальной схемы RESOLFT в 2005, прежде чем были получены первые флуоресцентные белки, обеспечивающие приемлемые характеристики для микроскопии живых клеток – Dreiklang [27], rsEGFP [28] и rsEGFP2 [29]. Эти белки обладают эмиссией в зеленой-желтой области спектра, а их фотоконверсия осуществляется синим и фиолетовым светом (rsEGFP и rsEGFP2), либо фиолетовым и ультрафиолетовым светом (Dreiklang). Был также получен мономерный красный белок rsCherryRev1.4, обратимое переключение которого зеленым и синим светом обеспечивало проведение RESOLFT микроскопии целевых клеточных белков [30]. Наконец, недавно были описаны точечные мутанты мономерного красного флуоресцентного белка FusionRed [31] – rsFusionRed1, 2 и 3, демонстрирующие фотоконверсию из флуоресцентного в темное состояние под действием оранжевого света (590 нм) и обратно – под действием зеленого света (514 нм) [32]. Эти белки, особенно rsFusionRed2 и rsFusionRed3, обладают повышенной скоростью фотоконверсии, по сравнению с rsCherryRev1.4 и другими известными красными фотопереключаемыми белками. Важно, что они позволяют использовать относительно длинноволновый свет (>510 нм) и избегать облучения образца синим и фиолетовым светом, необходимым для других фотопереключаемых белков. Это существенно (на порядок) снижает фототоксичность проведения RESOLFT, как было показано количественным анализом повреждений геномной ДНК, возникающих в процессе получения изображений [32].

Главной проблемой микроскопии RESOLFT является низкая скорость сканирования, ограниченная скоростью фотоконверсии флуоресцентных белков. Если в STED микроскопии тушение происходит практически моментально, то фотоконверсия флуоресцентного белка в темное состояние требует, по крайней мере, несколько сотен микросекунд. Это в сотни раз замедляет сканирование по сравнению с обычной конфокальной и STED микроскопией, и делает возможным получение сверхразрешенных изображений только небольших участков живой клетки.

Для решения этой проблемы была предложена специальная схема облучения образца, создающая множество (десятки тысяч) «колец» гасящего света [33]. Сканирование таким паттерном вместо одиночного луча позволяет получать изображения живых клеток целиком в секундной шкале. Данная схема «высоко параллелизованного RESOLFT» применима как для зеленых, так и для красных фото-переключаемых белков, а также для их комбинации в двухцветном варианте RESOLFT [30].

МИКРОСКОПИЯ MINFLUX

Новая концепция, сочетающая в себе преимущества STED и SMLM, была недавно разработана в лаборатории Штефана Хелла [34]. Метод, названный MINFLUX, основан на детекции небольшого числа фотонов от единичной молекулы при ее возбуждении световым пучком в форме кольца («пончика») с центральной зоной субдифракционного размера (такое кольцо получают тем же способом, что и гасящий луч для STED/RESOLFT) (рис. 1Б). Поскольку позиция кольца на поле зрения точно определена, для вычисления координат флуорофора достаточно всего нескольких фотонов, испущенных молекулой при ее возбуждении вблизи центра светового кольца при четырех положениях последнего (центр и вершины вписанного в кольцо треугольника). Получаемое разрешение зависит от диаметра светового кольца и числа детектированных фотонов (чем меньше диаметр и больше количество фотонов, тем лучше разрешение). Разрешающая способность MINFLUX намного превосходит таковую STED и SMLM. Так, при диаметре светового кольца 50 нм достаточно всего 30 и 500 фотонов для получения разрешения 5 и 1 нм, соответственно. MINFLUX характеризуется также чрезвычайно высоким временным разрешением (субмиллисекундная шкала). Быстрота, сверхвысокое разрешение и автоматическое перемещение луча за счет обработки результатов в реальном времени делает MINFLUX прекрасным инструментом для слежения за движением целевой молекулы. При этом молекулярный трекинг может производиться как в нанометровой шкале (внутри кольца), так и в микронной шкале путем перемещения центра кольца возбуждающего света вслед за движущейся молекулой. Это было продемонстрировано на примере слежения за подвижностью рибосом в живых бактериальных клетках [34]. Следует подчеркнуть, что MINFLUX хорошо подходит для получения изображений только малых полей зрения, сопоставимых по размеру с диаметром светового кольца.

III. ЛОКАЛИЗАЦИОННАЯ НАНОСКОПИЯ

В своем «классическом» варианте, локализационная микроскопия одиночных молекул SMLM достигает субдифракционного разрешения за счет математического вычисления центра изображения эмиссии от одной молекулы (рис. 1B). Для построения изображения, целевая структура (например, белок) должна быть помечена флуорофором, способным к переходу между темновым и флуоресцентным состояниями. Обычно, такой переход индуцируется облучением светом, т.е. флуорофоры (флуоресцентные белки или синтетические красители) являются фотоактивируемыми [19]. Для сбора информации о локализации множества молекул проводят многочисленные последовательные циклы перевода ограниченного числа молекул флуорофора во флуоресцентное состояние, их детекции, и фотообесцвечивания. В результате собираются и подсчитываются данные о локализациях 10^4 – 10^6 целевых молекул, что позволяет построить флуоресцентное изображение со сверхвысоким разрешением (10–50 нм).

Методы локализационной микроскопии одиночных молекул наименее применимы к исследованиям в живых клетках среди всех вариантов флуоресцентной наноскопии. Действительно, с точки зрения алгоритма реконструкции изображений, принципиальным является достижение таких условий, в которых одиночные флуорофоры хорошо различимы и не перекрываются на каждом отдельном кадре, причем оптимальная длительность наблюдения каждого из флуорофоров – 1 кадр. Обеспечить такой режим съемки нетрудно в случае фиксированных клеток: используют особые буферные растворы, поддерживающих большую часть флуорофоров в нефлуоресцентном состоянии (например, в результате восстановления) и/или стабилизирующих долгоживущие темновые состояния (например, триплетные) в процессе съемки. Контроль числа флуорофоров на кадр достигается с помощью коротковолнового лазера, возвращающего небольшой доле молекул способность к флуоресценции в результате фотохимической реакции.

Уже из такого краткого описания становится понятно, что подобные условия плохо сочетаются с нормальной клеточной физиологией: сильные восстановители, длительная съемка, интенсивное облучение. Тем не менее, по каждому из проблемных пунктов в отдельности предложены решения, специфические для наноскопии живых клеток.

Вместо использования специальных буферов в SMLM живых клеток применяют специальные «фотоактивируемые» флуоресцентные белки, спектральные свойства которых можно контролировать

светом. Такие белки в живых клетках находятся преимущественно в одном спектральном состоянии, например, нефлуоресцентом для PA-GFP [35] и PA-TagRFP [36] или зеленом для Dendra [37], EosFP [38], mMaple [39] и их многочисленных улучшенных вариантов (таких как Dendra2, mEos3.2). Используя облучение коротковолновым лазером, можно переключать эти флуоресцентные белки в другое спектральное состояние (зеленое для PA-GFP, красное для PA-TagRFP, Dendra2, mEos3.2) и управлять числом наблюдаемых молекул на кадр. К сожалению, до сих пор не создано фотоактивируемых флуоресцентных белков, пригодных для SMLM, с контролем спектральных свойств без использования фототоксичного УФ-облучения.

ПРАЙМИРОВАННАЯ ФОТОКОНВЕРСИЯ

Многообещающим для снижения фототоксичности в SMLM выглядит недавнее (2015) открытие «праймированной» фотоконверсии Dendra2 и многих других фотоактивируемых флуоресцентных белков. Было обнаружено, что Dendra2 переходит в красную флуоресцентную форму при одновременном облучении синим (488 нм) и красным (730 нм) светом [40] более эффективно, чем при облучении только синим светом. Такая фотоактивация названа в статье «праймированной». При этом заметного эффекта красного света на фотоактивацию, индуцированную по традиционной схеме (облучение светом с длиной волны около 405 нм) обнаружить не удалось. Путем перебора различных времен задержки между синими («праймирующим») и красным («фотоактивирующим») лазерами установили, что такая фотоконверсия происходит через долгоживущее (более 4 мс) состояние хромофора. В более поздних работах спектр действия активирующего света был уточнен [41, 42]: как оказалось, заметный эффект (увеличение выхода фотоактивации в 2–10 раз) достигается в диапазоне от 600 до 800 нм (максимумы 700–750). Также было предположено, что неизвестное долгоживущее состояние хромофора, ответственное за такой тип фотоконверсии – это триплет [42, 43]. Недавно впервые была показана возможность использования «праймированной» фотоконверсии для прижизненной локализационной микроскопии одиночных молекул на примере белка Dendra2 [41] без использования фототоксичного [44] лазера 405 нм. Для большинства фотоактивируемых белков, родственных Dendra, EosFP, и Kaede в настоящее время получены мутанты с улучшенной способностью к «праймированной» фотоконверсии [42]. В целом, использование комбинации синего и красных лазеров вместо УФ выглядит многообещающе в развитии локализационной микроскопии одиночных молекул в живых клетках.

СПОСОБЫ КОНТРОЛЯ ПЛОТНОСТИ ФЛУОРОФОРОВ НА КАДР

Если отказаться от идеи жесткой ковалентной связи флуорофора-маркера и целевой структуры, то число вспышек одиночных флуорофоров на кадр можно подбирать, постепенно добавляя флуорофор извне. В таком случае отпадает необходимость использовать какое-либо дополнительное облучение. Впервые такая реализация SMLM была продемонстрирована для получения изображений мембран с помощью красителей, обладающих сродством к липидному бислою [45]. Удивительной особенностью предложенного метода, названного авторами PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) является то, что изменение спектральных свойств флуорофора при связывании с целевой структурой не является строго необходимым, а лишь улучшает соотношение сигнал-шум: изображение медленно диффундирующего (связанного с целевой структурой) флуорофора обладает достаточным контрастом по отношению к быстро диффундирующим свободным молекулам флуорофора в растворе. Недавно был разработан класс мембранных красителей на основе силикородамина, способных к спонтанному переходу во флуоресцентное состояние в небольшой доле молекул [46]. Эти красители, названные HIDE (high-density, environment-sensitive) обладают дальнекрасной флуоресценцией и могут быть использованы для специфического мечения различных мембранных органелл – митохондрий, эндоплазматического ретикулума, плазматической мембраны. Поскольку образование небольшого пула флуоресцентных молекул происходит спонтанно, локализационная микроскопия с красителями HIDE не нуждается ни в фотоактивации, ни в специальных буферных растворах, а заключается в прямой детекции таких событий при возбуждении красным лазером (642 нм) при стандартных физиологических условиях. Это позволяет снизить как фототоксичность, так и фотообесцвечивание красителя и проводить длительные наблюдения за динамикой целевых мембран в живых клетках со сверхвысоким разрешением [46]. Появилась целая группа сходных методов, с использованием интеркалирующих красителей на ДНК, а также гибридизации коротких олигонуклеотидных зондов, один из которых связан с целевой структурой, а другой – с флуорофором. Эти методы, известные в литературе как DNA-PAINT [47], способны потеснить другие методы окраски для SMLM, но пока применимы только для фиксированных клеток. Во всех перечисленных случаях контроль числа локализаций осуществляется путем изменения концентрации флуорофора в растворе. Аналогично могут быть применены белки-репортеры, обратимо связывающие и изменяющие

спектральные свойства флуорофоров в комплексе. Впервые такая система мечения (т.н. флуороген-активирующие белки, FAP [48]) были созданы на базе одноцепочечных фрагментов антител, обратимо связывающих флуорогенные красители малахитовый зеленый и некоторые другие. Зная константу диссоциации комплекса флуороген-белок, можно даже при использовании флуорогенов, проникающих строго внутрь клетки (модифицированный малахитовый зеленый), достигнуть необходимой для SMLM частоты событий связывания с целевой белковой структурой [49]. Недавно была предложена аналогичная система на основе бактериального белка липокалина, обратимо связывающего флуороген, схожий с хромофором GFP [50]. В отличие от малахитового зеленого, флуороген, примененный в данном случае, свободно проходит сквозь клеточную мембрану как внутрь, так и наружу. Из-за сходства с PAINT авторы назвали систему мечения Protein-PAINT, и показали возможность прижизненной наноскопии по типу SMLM с эффективным контролем числа событий на кадр за счет изменения концентрации флуорофора в среде.

ФЛУКТУАЦИОННАЯ НАНОСКОПИЯ

Стохастическое мигание единичных флуорофоров приводит к незначительным флуктуациям сигнала, заметным на фоне перекрывающихся флуорофоров даже на плотно помеченных образцах. Использование специальных флуорофоров, в которых большая доля молекул переходит между флуоресцентным и долгоживущими нефлуоресцентными состояниями, приводит к усилению таких флуктуаций. Однако, крайне низкая амплитуда изменений по отношению к общему уровню сигнала делает детерминистический анализ, принятый в локализационной микроскопии одиночных молекул, практически невозможным. Тем не менее, попытки улучшить пространственное разрешение с помощью математической обработки столь незначительных изменений сигнала не прекращаются. В настоящее время выработано два основных подхода для обработки серий изображений с высокой плотностью мечения для улучшения пространственного разрешения: детерминистический анализ серий изображений, и анализ корреляции сигнала в пространстве и времени. Сразу отметим, что требования к способу съемки изображений аналогичны требованиям локализационной микроскопии: увеличение выбирается таким образом, чтобы пятно, соответствующее функции рассеяния точки, перекрывало сразу несколько элементов матрицы камеры, так что эффективные размеры пикселя полученного изображения составляют 90–160 нм в образце. Также, является предпочтительным облучение образца в условиях

полного внутреннего отражения. Выбор подходящих камер ограничен EM-CCD, более дешевые sCMOS-камеры, успешно используемые в локализационной микроскопии, для данных методов не подходят из-за сложностей описания шума индивидуальных элементов матрицы.

В первом случае предпринимается попытка анализа не отдельных кадров, а учета сигнала во всех последовательных изображениях. Действительно, за исключением собственного шума камеры, все изменения сигнала можно отнести к тому или иному флуорофору, в том случае если за выбранное время 1) флуорофор как минимум один раз перешел между темновым и флуоресцентными состояниями, в том числе в результате необратимого обесцвечивания, 2) длительность такого перехода составила не менее одного кадра, 3) флуорофор не переместился за время съемки. Очевидно, что последнее требование особенно трудно реализуемо при наблюдении живых клеток, поэтому для анализа приходится ограничиваться десятками последовательных кадров. Наибольшую известность получила реализация данного подхода с использованием Байесовских вероятностей [51]. При этом проводится случайных перебор и сравнение множества конкурирующих статистических гипотез о переходе между флуоресцентным и нефлуоресцентным состояниями в каждом пикселе, в каждый момент времени, и с учетом ожидаемой функции рассеяния точки. Авторы назвали свой метод Байесовским анализом мигания и фотообесцвечивания (Bayesian analysis of Bleaching and Blinking), или сокращенно, «3В». Анализ останавливают при достижении требуемого улучшения разрешения. Ввиду колоссальных требований к компьютерным ресурсам, алгоритм 3В применяется на практике крайне редко, однако общее направление, безусловно, верно – постараться учесть все доступные в эксперименте данные. Поскольку основная проблема такого анализа связана с недоступностью необходимых компьютерных ресурсов, можно ожидать улучшений на уровне эффективности алгоритма. Так, недавно было достигнуто 17-кратное ускорение обработки изображений [52] по сравнению с 3В, и продемонстрировано разрешение около 50 нм на живых клеточных структурах при временном разрешении менее 2 с.

Также, на удивление простыми в реализации и, одновременно, эффективными являются приемы извлечения изображений флуорофоров в низкой плотности из изображений с высокой плотностью, что сводит задачу к классической локализационной микроскопии. Такая обработка может быть основана на простом вычитании групп последовательных кадров в алгоритмах BaLM [53] и gSHRImP [54], либо на использовании дополнительных фильтров – вейвлетов Хаара в алгоритме HAWK [55].

Следующая группа методов анализа флуктуаций флуоресцентного сигнала в плотно помеченных образцах опирается на предположение: изменения сигнала от флуорофоров, в отличие от фонового, а также электронного шума камеры, коррелированы во времени. Также как и в случае 3В-анализа, подразумевается стабильное положение флуорофора в пространстве, а также его многократные переходы между темновым и флуоресцентными состояниями. Поскольку сигнал флуорофоров хорошо коррелирован во времени, в отличие от фонового сигнала или шумов камеры, то используя уже только этот факт можно улучшить соотношение сигнал-шум в изображении. Однако для улучшения разрешения используется совместный анализ корреляции сигнала в соседних пикселях. Действительно, поскольку изображение функции рассеяния точки перекрывает сразу несколько элементов матрицы детектора, а амплитуда изменений оказывается наибольшей в пикселе, ближайшем к ее центру, то и автокорреляционная функция возрастает в этом пикселе наиболее быстро. Анализ корреляционных функций с использованием кумулянтов высокого порядка для получения сверхразрешенных изображений известен в литературе как SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging), и первоначально продемонстрирован на примере мигания квантовых точек [56]. Дальнейшее развитие аналитической модели в основе метода позволило улучшить пространственное разрешение в 2 и более раз [57], а также применить метод в живых клетках [58] с использованием фотопереключаемых флуоресцентных белков. Строго говоря, улучшение разрешения SOFI не ограничено в рамках используемой аналитической модели, однако на практике предел определяется шумом камеры а также числом и амплитудой вспышек индивидуальных флуорофоров. Понимание важности для SOFI способности флуорофора к спонтанному миганию в шкале времени, сопоставимой с выдержкой камер (1–50 мс), привело к созданию специальных флуоресцентных белков [59], оптимизированных для этого метода. Также были отмечена способность некоторых красных флуоресцентных белков к спонтанному миганию [60] при низких интенсивностях облучения ($< 100 \text{ Вт/см}^2$), что может быть использовано для сверхразрешения по методу SOFI в живых клетках. Как и 3В, алгоритм SOFI в целом направлен на анализ всей доступной информации в серии изображений, и, по мере включения дополнительных факторов в аналитическую модель, снижается выраженность артефактов, а качество реконструкции изображения возрастает. Как было сказано выше, в идеале флуорофор должен многократно переходить между

темновым и флуоресцентным состояниями за время съемки. Однако, флуорофор может перейти в долгоживущее состояние и полностью разрушиться в результате фотообесцвечивания, соответственно снизится и амплитуда сигнала в SOFI. Также, флуорофоры в живых клетках, безусловно, перемещаются, как за счет диффузии, так и в результате кооперативного движения клеточных структур. Учет диффузии [61] и фотообесцвечивания [62] являются недавними существенными улучшениями метода. Но наибольший потенциал SOFI скрыт в возможности оценки вклада в конечное изображение флуорофоров со сходным спектром, но различными вероятностями переходов, обуславливающих их мигание, а также разной яркостью во флуоресцентном состоянии [63]. Такая информация может быть использована как для получения многоканальных изображений, так и для применения флуоресцентных индикаторов в сверхразрешающей микроскопии [64] и изучения белок-белковых взаимодействий [65]. В прошлом году вышла работа, в которой впервые было продемонстрировано разделение SOFI-сигналов от спектрально близких зеленых флуоресцентных белков [66] в живых клетках.

Другой метод анализа флуктуаций, SRRF (super-resolution radial fluctuations) [67], ставит во главу угла форму изображения функции рассеяния точки, а именно, ее высокую симметричность относительно центра. Пиксели реального изображения программно разбиваются на множество дополнительных пикселей, и для каждого из них вычисляется и сохраняется введенная авторами метрика, отражающая сходимость градиентов интенсивности сигнала в соседних пикселях к данному пикселю. Таким образом, оценивается вероятность того, что флуорофор находится именно в данном пикселе; расчеты повторяются для всех кадров в серии изображений. Далее, аналогично методу SOFI, оценивается корреляция сигнала во времени, при этом вклад фона снижается.

АРТЕФАКТЫ В ИЗОБРАЖЕНИЯХ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Методы анализа флуктуаций сигнала SOFI и SRRF объединяет полнота использования информации в исходном изображении. В методе локализационной микроскопии часть сигнала попросту отбрасывается на основании выбора, например от слишком тусклых флуорофоров, перекрывающихся флуорофоров, или по иным причинам не удовлетворяющая требованиям различных фильтров. В методах SOFI и SRRF весь сигнал используется для построения изображения сверхвысокого разрешения.

Тем не менее, в этих методах используются нелинейные преобразования данных, что может привести к появлению артефактов в

изображении сверхвысокого разрешения, особенно в участках со слабым, или наоборот, сильным сигналом, по сравнению со всем изображением. К таким артефактам относятся, например, появление различных сетчатых рисунков, искусственное сближение близко расположенных структур. Чтобы подобрать алгоритм обработки, наиболее подходящий для конкретного эксперимента по сверхразрешению в живых клетках, желательно использовать специальные инструменты сравнения полученных изображений сверхвысокого и дифракционно-лимитированного разрешения. Среди наиболее полных инструментов такого рода следует отметить программный пакет NanoJ-SQUIRREL [68], позволяющий проводить всестороннюю оценку качества полученных изображений, оценивать достигнутое разрешение и обнаруживать артефакты.

IV. 3D-НАНОСКОПИЯ

До сих пор мы не уделяли внимания проблеме установления координат флуорофора со сверхвысоким разрешением сразу по всем осям (X , Y , и Z). Отметим, что оптическая схема современного флуоресцентного микроскопа обладает заметно лучшим латеральным разрешением (то есть, в координатах XY), по сравнению с разрешением по оси Z (аксиальным разрешением). В той или иной степени такое отличие наблюдается во всех вариантах оптической микроскопии и связано, прежде всего, с наблюдением образца только с одной стороны – со стороны объектива. Отчасти, проблема решается в сканирующих конфокальных микроскопах за счет последовательной съемки с фокусом на разной глубине образца и коррекции трехмерного изображения на этапе компьютерной обработки. Однако, когда речь заходит о микроскопии сверхвысокого разрешения, проблема изотропного разрешения приобретает принципиально новый уровень сложности. Например, в STED-наноскопии дополнительным требованием становится форма пятна STED-лазера. Выигрывают в аксиальном разрешении оптические схемы, использующие сразу два объектива, сфокусированных на образце с разных сторон (например, 4Pi [8]), однако для исследования живых клеток с высоким разрешением такая конструкция микроскопа подходит плохо. Использование двух объективов позволяет приблизиться к достижению изотропного разрешения и в различных вариантах наноскопии, что было реализовано в STED [69], RESOLFT [70] и SMLM [71]. Однако для наиболее популярного объекта клеточных биологов – живых клеток, культивируемых на покровном стекле, необходимы другие принципы построения микроскопа.

В локализационной микроскопии самый популярный способ установления координаты молекулы по оси Z – это использование эффекта астигматизма, т.е. предсказуемого искажения формы функции рассеяния точки при использовании специальных цилиндрических линз перед детектором, при нахождении флуорофора выше или ниже фокальной плоскости. Степень такого искажения легко учесть на уровне алгоритмов при реконструкции изображения [72]. Однако предел оценки положения флуора ограничен сотнями нанометров, что подходит для наиболее уплощенных частей распластанной клетки, например ламеллоподии. Кроме того, как и в широкопольной флуоресцентной микроскопии, наблюдение утолщенных участков образца приводит и к возрастанию фонового сигнала от флуорофоров вне фокальной плоскости, что сказывается на достигаемом разрешении.

В поисках универсального подхода к наблюдению всей толщи клетки со сверхразрешением был выработан пожалуй наиболее перспективный на сегодняшний день подход: использование так называемых световых листов. В настоящее время это одна из самых бурно развивающихся областей микроскопии. Простейший вариант – режим HILO (Highly Inclined and Laminated Optical sheet), который можно реализовать в TIRF-микроскопах с использованием светосильных объективов ($NA > 1.49$) при небольшом отклонении от угла полного внутреннего отражения [73]. При этом возбуждающий свет распространяется в образце в виде тонкого листа, толщиной в несколько микрон, наклоненного по отношению к фокальной плоскости, что значительно снижает фоновый сигнал. Однако поле зрения, доступное для сканирования в методе HILO, крайне ограничено. В отличие от исследования крупных образцов, использование дополнительных объективов для создания световых листов при наблюдении такого маленького объекта, как клетка, затруднено из-за размеров самих объективов и ограниченности их рабочего отрезка. Например, были использованы такие необычные схемы облучения образца, как отражение света от кантилевера атомно-силового микроскопа, подведенного непосредственно к изучаемой живой клетке [74]. В настоящее время наиболее перспективной можно считать схему облучения с использованием так называемых лучей Бесселя, создаваемых с использованием особых аксиконических линз. Такая схема носит название микроскопии светового листа с дискретным освещением, LLSM [75] (lattice light sheet microscopy). При этом достигается крайне низкая дифракция светового листа внутри образца, толщина порядка 1 мкм, и возможность сканировать области зрения в десятки микрон без перемещения образца. Комбинация LLSM и нелинейных версий

SIM с использованием фотоактивируемых флуоресцентных белков уже сейчас позволяет достигать изотропного разрешения порядка 100 нм в живых клетках [76]. В настоящее время сразу несколько научных групп ведут активные разработки, направленные на объединение методов облучения с помощью световых листов и STED [77] а также адаптации алгоритмов анализа плотно помеченных структур.

V. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ НАНОСКОПИЯ

Флуоресцентные индикаторы, в особенности генетически кодируемые, являются одним из важнейших инструментов клеточной биологии. Созданы индикаторы различных клеточных метаболитов, физиологически важных ионов, сигнальных молекул, pH, мембранного потенциала, сенсоры ферментативных активностей протеаз и многие другие. Как правило, сигнал сенсора – это изменение интенсивности, или изменение соотношения интенсивности при различных длинах волн возбуждения флуоресценции. Для многих метаболитов принято определять сигнал во всей клетке, без учета внутриклеточного распределения метаболитов. В то же время для некоторых метаболитов, например перекиси водорода, показана выраженная компартментализация продукции и ограниченная внутриклеточная диффузия [78]. Это лишь один из примеров вопросов, на которые можно ответить, комбинируя наноскопию и флуоресцентные индикаторы. Однако до сих пор примеры успешного совмещения наноскопии и биосенсоров можно буквально пересчитать по пальцам.

STED-микроскопия является наиболее простой в реализации для подобных исследований, что и было впервые продемонстрировано с помощью генетически кодируемого индикатора перекиси водорода *HuPer2* на модели эндоцитоза. В данной работе было обнаружено, что различная концентрация перекиси водорода обнаруживается в участках цитоплазмы на расстоянии порядка 100 нм. При этом использовался лишь один канал детекции. Недавно разработаны pH-сенсоры *SRpHi*, специально оптимизированные для STED [79]. С их помощью были показаны изменения pH в индивидуальных эндосомах, при этом, как оказалось, многие эндосомы, похожие на трубчатые структуры при наблюдении под конфокальным микроскопом, оказались рядом индивидуальных эндосом при использовании режима STED. К сожалению, сенсоры *SRpHi* не являются полностью генетически кодируемыми, а представляют собой конъюгат pH-нечувствительной краски и pH-чувствительного флуоресцентного белка, доставляемый в клетку с помощью TAT-пептидов. Хотя такой

сенсор трудно назвать универсальным и подходящим для многих экспериментальных моделей, существенно, что в данной работе была использована схема облучения, совместимая со многими полностью генетически кодируемыми флуоресцентными индикаторами: быстрое последовательное облучение лазерами 405 и 490 нм для получения рациометрического сигнала, и один STED-лазер с длиной волны света 590 нм.

Химические флуоресцентные индикаторы также могут быть использованы в прижизненной наноскопии. Так, визуализируя хромофоры, которые становятся флуоресцентными только в результате той или иной клеточной ферментативной активности, можно детально реконструировать тонкую структуру микродоменов, в которых такая активность осуществляется. Недавно опубликованный химический индикатор активности клеточных эстераз [80] стал первой успешной демонстрацией такого подхода.

SOFI-наноскопия была использована при анализе белок-белковых взаимодействий [65], а именно, взаимодействия Ca^{2+} -чувствительного белка STIM1 и ORA1 (субъединицы депо-управляемого Ca^{2+} -канала) в участках контакта цитоплазматической мембраны и мембраны эндоплазматического ретикулума. При этом использовался подход, известный как бимолекулярная флуоресцентная комплементация, то есть восстановление полностью функционального флуоресцентного белка из его частей, слитых с двумя целевыми белками, взаимодействие которых необходимо изучить. При использовании фотоактивируемого флуоресцентного белка или белка с выраженными флуктуациями сигнала, можно получить изображение интересующего участка клетки, где произошло взаимодействие целевых белков, с улучшенным разрешением, используя SMLM или SOFI, соответственно. Сам по себе такой подход не нов: уже получены и используются сплит-варианты фотоактивируемых белков PA-mCherry [81] и mEos3.2 [82] для изучения белок-белковых взаимодействий с помощью SMLM. Однако использование метода SOFI представляется интересным из-за более низкой интенсивности облучения живой клетки в процессе съемки.

Недавно было обнаружено, что при сближении в пространстве двух флуоресцентных белков, один из которых обладает явно выраженным миганием, некоторые параметры таких флуктуаций (амплитуда, характеристические времена) могут изменяться в широких пределах. Опубликован модельный сенсор протеинкиназной активности [64] на основе такого эффекта, названного авторами FLINC (FLuorescence fluctuation Increase by Contact, увеличение флуктуаций флуоресценции при контакте). В данном сенсоре сближение флуо-

ресцентного белка Dronpa и флуоресцентного белка TagRFP-T значительно увеличивает флуктуации сигнала последнего, которые и так достаточны для реконструкции сверхразрешенного изображения с помощью алгоритма SOFI [60]. Изменения характера флуктуации флуоресценции FLINC-сенсора отражаются на времени корреляции сигнала – параметра, доступного для анализа при использовании алгоритма SOFI. Таким образом, исследователю становится доступны и сигнал сенсора, и сверхразрешенное изображение, причем без необходимости радиометрических измерений. В данной работе удалось наблюдать микродомены активности протеинкиназы A с линейными размерами менее 350 нм. Хотя природа эффекта, лежащего в основе FLINC, не ясна, как и не определена точная зависимость величины эффекта от расстояния между TagRFP-T и Dronpa, можно ожидать появления новых сенсоров, устроенных по сходному принципу, или повторяющих строение широко используемых FRET-сенсоров.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентную микроскопию сверхвысокого разрешения можно по праву считать главным достижением последних десятилетий в области микроскопии. За последние годы произошел значительный прогресс в развитии этих методов. Появились принципиально новые оптические схемы, такие как MINFLUX и LLSM. Были предложены новые алгоритмы обработки изображений для эффективного извлечения информации о точном положении флуорофоров при высокой плотности мечения, например SOFI, SRRF, HAWK. Наконец, разрабатываются новые поколения ярких и фотостабильных флуорофоров, как синтетических, так и генетически кодируемых.

Многие работы в области сверхвысокого разрешения посвящены развитию самих методов и используют биологические модели только для демонстрации возможностей метода. Тем не менее, уже сейчас можно сказать, что флуоресцентная наноскопия дает беспрецедентные возможности для изучения тонкой организации клетки. Не претендуя на исчерпывающий обзор, приведем лишь несколько ярких примеров открытий, сделанных с помощью этого подхода.

Было обнаружено, что в отростках нейронов и глиальных клеток актиновый цитоскелет организован в виде поперечных колец под мембраной, расположенных на расстоянии 190 нм по всей длине отростков [83–87]. Такая топология, очень логичная с точки зрения обеспечения устойчивости трубчатых отростков от бокового сжатия (вспомним аналогичные конструкторские решения этой проблемы в

виде колец жесткости в шланге пылесоса и пр.), оставалась неизвестной до последнего времени. В частности, несмотря на богатую историю изучения нейронов с помощью электронной микроскопии, кольца актина не были выявлены этим подходом, вероятно, вследствие отсутствия удобных методов мечения конкретных белков. Напротив, сочетание сверхвысокого разрешения и специфического мечения целевых белков во флуоресцентной наноскопии позволило открыть эти структуры и, более того, построить детальную модель взаимного расположения актина, спектрина и аддуцина, а также продемонстрировать, что многие другие белки (анкирины, калиевые и натриевые каналы, белки адгезии) позиционируются на мембране в соответствии с кольцами актина.

Изучение организации синапса с помощью флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения привело к формулированию концепции «наноколонн» – выровненных напротив друг друга зон выброса везикул с нейротрансмиттером на пресинаптической мембране и рецепторов на постсинаптической мембране [88, 89]. Предполагается, что такая организация может ускорять прохождение сигнала через синапс.

При изучении организации митохондриальных крист (складок внутренней мембраны митохондрий) с помощью SMLM с трекингом движения одиночных молекул было показано, что диффузия мембранных белков происходит внутри одной кристы без перехода с одной кристы на другую [90]. Следует отметить, что получить такие данные для живой динамической системы субдифракционного размера ранее не представлялось возможным.

Сочетание SMLM и микрофлюидной системы позволило изучить процесс взаимодействия стволовых клеток крови (hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC) и эндотелия [91]. Первые фазы закрепления (tethering) и перекатывания (rolling) HSPC на стенках сосудов в кровотоке определяются взаимодействием селектинов эндотелия и их лигандов (CD44) на мембране HSPC. Было обнаружено, что при этом происходит реорганизация нанокластеров CD44, меняющих форму с округлых на сильно вытянутую. Двухцветная наноскопия позволила также продемонстрировать полную колокализацию актина с нанокластерами CD44. Данная работа показала функциональную необходимость ранее неизвестной реорганизации рецепторов и цитоскелета в нанометровой шкале для корректного прохождения фаз закрепления и перекатывания HSPC на эндотелии.

Применение SMLM для изучения тонкой организации хроматина позволило сформулировать новую модель, согласно которой нук-

леосомы собраны в «гнезда» (clutch), размер которых увеличивается в ходе клеточной дифференцировки [92]. В другой работе удалось выявить прямые корреляции между размерами и степенью компактизации хроматина и его эпигенетическим статусом [93]. Важно отметить, что трехмерная организация и компактизация хроматина эукариотической клетки до сих пор представляет загадку, несмотря на десятилетия интенсивных исследований. Во многом это определяется многочисленными артефактами, возникающими при выделении хроматина из клеток и его последующего изучения *in vitro*. Таким образом, флуоресцентная наноскопия хроматина, особенно в живых клетках, представляется «идеальным» инструментом установления 3D организации и функциональных динамических изменений этой крайне сложной структуры.

Дальнейшее развитие методологии флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения в сторону быстрого и низкотоксичного получения изображений максимального разрешения представляется крайне важным для изучения динамических событий в живых клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lichtman, J.W., Conchello J.-A. (2005) Fluorescence microscopy, *Nat. Methods*, **2**, 910–919.
2. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., Prasher, D. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, **263**, 802–805.
3. Mishin, A.S., Belousov, V.V., Solntsev, K.M., Lukyanov, K.A. (2015) Novel uses of fluorescent proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **27**, 1–9.
4. Morris, M.C. (2013) Fluorescent biosensors – probing protein kinase function in cancer and drug discovery, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 1387–1395.
5. Huang, B., Bates, M., Zhuang, X. (2009) Super-resolution fluorescence microscopy, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 993–1016.
6. Bozzola, J.J., Russell, L.D. (1999) *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*, Jones & Bartlett Learning, 670 p.
7. Zhou, Z.H. (2008) Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **18**, 218–228.
8. Hell, S., Stelzer, E.H.K. (1992) Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation, *Opt. Commun.*, **93**, 277–282.
9. Gustafsson, M.G., Agard, D.A., Sedat, J.W. (1999) I5M: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution, *J. Microsc.*, **195**, 10–16.
10. Bewersdorf, J., Schmidt, R., Hell, S.W. (2006) Comparison of I5M and 4Pi-microscopy, *J. Microsc.*, **222**, 105–117.
11. Gustafsson, M.G. (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy, *J. Microsc.*, **198**, 82–87.
12. Hell, S.W., Wichmann, J. (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluores-

- cence microscopy, *Opt. Lett.*, **19**, 780–782.
13. Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacio, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H.F. (2006) Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution, *Science*, **313**, 1642–1645.
 14. Rust, M.J., Bates, M., Zhuang, X. (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), *Nat. Methods*, **3**, 793–795.
 15. Hess, S.T., Girirajan, T.P.K., Mason, M.D. (2006) Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy, *Biophys. J.*, **91**, 4258–4272.
 16. Möckl, L., Lamb, D.C., Bräuchle, C. (2014) Super-resolved fluorescence microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **53**, 13972–13977.
 17. Hell, S.W. (2007) Far-field optical nanoscopy, *Science*, **316**, 1153–1158.
 18. Klementieva, N.V., Zagaynova, E.V., Lukyanov, K.A., Mishin, A.S. (2016) The Principles of Super-Resolution Fluorescence Microscopy (Review), *Sovremennye tehnologii v medicine*, **8**, 130–140.
 19. Klementieva, N.V., Bozhanova, N.G., Zagaynova, E.V., Lukyanov, K.A., Mishin, A.S. (2017) Fluorophores for single-molecule localization microscopy, *Russ. J. Bioorganic Chem.*, **43**, 227–234.
 20. Sahl, S.J., Hell, S.W., Jakobs, S. (2017) Fluorescence nanoscopy in cell biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 685–701.
 21. Vicidomini, G., Bianchini, P., Diaspro, A. (2018) STED super-resolved microscopy, *Nat. Methods*, **15**, 173–182.
 22. Willig, K.I., Rizzoli, S.O., Westphal, V., Jahn, R., Hell, S.W. (2006) STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis, *Nature*, **440**, 935–939.
 23. Bottanelli, F., Kromann, E.B., Allgeyer, E.S., Erdmann, R.S., Wood, Baguley, S., Sirinakakis, G., Schepartz, A., Baddeley, D., Toomre, D.K., Rothman, J.E., Bewersdorf, J. (2016) Two-colour live-cell nanoscale imaging of intracellular targets, *Nat. Commun.*, **7**, 10778.
 24. Vicidomini, G., Moneron, G., Han, K.Y., Westphal, V., Ta, H., Reuss, M., Engelhardt, J., Eggeling, C., Hell, S.W. (2011) Sharper low-power STED nanoscopy by time gating, *Nat. Methods*, **8**, 571–573.
 25. Göttfert, F., Pleiner, T., Heine, J., Westphal, V., Görlich, D., Sahl, S.J., Hell, S.W. (2017) Strong signal increase in STED fluorescence microscopy by imaging regions of subdiffraction extent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, 2125–2130.
 26. Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., Hell, S.W. (2005) Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 17565–17569.
 27. Brakemann, T., Stiel, A.C., Weber, G., Andresen, M., Testa, I., Grotjohann, T., Leutenegger, M., Plessmann, U., Urlaub, H., Eggeling, C., Wahl, M.C., Hell, S.W., Jakobs, S. (2011) A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 942–947.
 28. Grotjohann, T., Testa, I., Leutenegger, M., Bock, H., Urban, N.T., Lavoie-Cardinal, F., Willig, K.I., Eggeling, C., Jakobs, S., Hell, S.W. (2011) Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP, *Nature*, **478**, 204–208.
 29. Grotjohann, T., Testa, I., Reuss, M., Brakemann, T., Eggeling, C., Hell, S.W., Jakobs, S. (2012) rsEGFP2

- enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells, *Elife*, **1**, e00248.
30. Lavoie-Cardinal, F., Jensen, N.A., Westphal, V., Stiel, A.C., Chmyrov, A., Bierwagen, J., Testa, I., Jakobs, S., Hell, S.W. (2014) Two-color RESOLFT nanoscopy with green and red fluorescent photochromic proteins, *Chemphyschem*, **15**, 655–663.
 31. Shemiakina, I.I., Ermakova, G.V., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Evans, R.A., Souslova, E.A., Staroverov, D.B., Gorokhovatsky, A.Y., Putintseva, E.V., Gorodnicheva, T.V., Chepurnykh, T.V., Strukova, L., Lukyanov, S., Zaraksky, A.G., Davidson, M.W., Chudakov, D.M., Shcherbo, D. (2012) A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity, *Nat. Commun.*, **3**, 1204.
 32. Pennacchietti, F., Serebrovskaya, E.O., Faro, A.R., Shemyakina, I.I., Bozhanova, N.G., Kotlobay, A.A., Gurskaya, N.G., Bodén, A., Dreier, J., Chudakov, D.M., Lukyanov, K.A., Verkhusha, V.V., Mishin, A.S., Testa, I. (2018) Fast reversibly photoswitching red fluorescent proteins for live-cell RESOLFT nanoscopy, *Nat. Methods*, **15**, 601–604.
 33. Chmyrov, A., Keller, J., Grotjohann, T., Ratz, M., d'Este, E., Jakobs, S., Eggeling, C., Hell, S.W. (2013) Nanoscopy with more than 100,000 «doughnuts», *Nat. Methods*, **10**, 737–740.
 34. Balzarotti, F., Eilers, Y., Gwosch, K.C., Gynnå, A.H., Westphal, V., Stefani, F.D., Elf, J., Hell, S.W. (2017) Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes, *Science*, **355**, 606–612.
 35. Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J. (2002) A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells, *Science*, **297**, 1873–1877.
 36. Subach, F.V., Patterson, G.H., Renz, M., Lippincott-Schwartz, J., Verkhusha, V.V. (2010) Bright monomeric photoactivatable red fluorescent protein for two-color super-resolution sptPALM of live cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6481–6491.
 37. Gurskaya, N.G., Verkhusha, V.V., Shcheglov, A.S., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Lukyanov S., Lukyanov K.A. (2006) Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 461–465.
 38. Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Röcker, C., Salih, A., Spindler, K.-D., Nienhaus G.U. (2004) EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 15905–15910.
 39. McEvoy, A.L., Hoi, H., Bates, M., Platonova, E., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Davidson, M.W., Ewers, H., Liphardt, J., Campbell, R.E. (2012) mMaple: a photoconvertible fluorescent protein for use in multiple imaging modalities, *PLoS One*, **7**, e51314.
 40. Dempsey, W.P., Georgieva, L., Helbling, P.M., Sonay, A.Y., Truong, T.V., Haffner, M., Pantazis, P. (2015) In vivo single-cell labeling by confined primed conversion, *Nat. Methods*, **12**, 645–648.
 41. Klementieva, N.V., Lukyanov, K.A., Markina, N.M., Lukyanov, S.A., Zagaynova, E.V., Mishin, A.S. (2016) Green-to-red primed conversion of Dendra2 using blue and red lasers, *Chem. Commun.*, **52**, 13144–13146.
 42. Mohr, M.A., Kobitski, A.Y., Sabater, L.R., Nienhaus, K., Obara, C.J., Lippincott-Schwartz, J., Nienhaus, G.U., Pantazis, P. (2017) Rational Engineering of Photoconvertible Fluorescent Proteins for Dual-Color Fluorescence Nanoscopy Enabled by a Triplet-State Mechanism of Primed Conversion, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **56**, 11628–11633.

43. Turkowyd, B., Balinovic, A., Virant, D., Gözl Carnero, H.G., Caldana, F., Endesfelder, U. (2017) A general mechanism of photoconversion of green-to-red fluorescent proteins based on blue and infrared light reduces phototoxicity in live-cell single-molecule imaging, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*,
44. Wäldchen, S., Lehmann, J., Klein, T., van de Linde, S., Sauer, M. (2015) Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy, *Sci. Rep.*, **5**, 15348.
45. Sharonov, A., Hochstrasser, R.M. (2006) Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 18911–18916.
46. Takakura, H., Zhang, Y., Erdmann, R.S., Thompson, A.D., Lin, Y., McNellis, B., Rivera-Molina, F., Uno, S.-N., Kamiya, M., Urano, Y., Rothman, J.E., Bewersdorf, J., Schemm, A., Toomre, D. (2017) Long time-lapse nanoscopy with spontaneously blinking membrane probes, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 773–780.
47. Jungmann, R., Steinhauer, C., Scheible, M., Kuzyk, A., Tinnefeld, P., Simmel, F.C. (2010) Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami, *Nano Lett.*, **10**, 4756–4761.
48. Szent-Gyorgyi, C., Schmidt, B.F., Schmidt, B.A., Creeger, Y., Fisher, G.W., Zakel, K.L., Adler, S., Fitzpatrick, J.A.J., Woolford, C.A., Yan, Q., Vasilev, K.V., Berget, P.B., Bruchez, M.P., Jarvik, J.W., Waggoner, A. (2008) Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 235–240.
49. Yan, Q., Schwartz, S.L., Maji, S., Huang, F., Szent-Gyorgyi, C., Lidke, D.S., Lidke, K.A., Bruchez, M.P. (2014) Localization microscopy using noncovalent fluorogen activation by genetically encoded fluorogen-activating proteins, *Chemphyschem*, **15**, 687–695.
50. Bozhanova, N.G., Baranov, M.S., Klementieva, N.V., Sarkisyan, K.S., Gavrikov, A.S., Yampolsky, I.V., Zagaynova, E.V., Lukyanov, S.A., Lukyanov, K.A., Mishin, A.S. (2017) Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal, *Chem. Sci.*, **8**, 7138–7142.
51. Cox, S., Rosten, E., Monypenny, J., Jovanovic-Talisman, T., Burnette, D.T., Lippincott-Schwartz, J., Jones, G.E., Heintzmann, R. (2012) Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics, *Nat. Methods*, **9**, 195–200.
52. Xu, F., Zhang, M., He, W., Han, R., Xue, F., Liu, Z., Zhang, F., Lippincott-Schwartz J., Xu P. (2016) Live cell single molecule-guided Bayesian localization super resolution microscopy, *Cell Res.*, **27**, 713.
53. Burnette, D.T., Sengupta, P., Dai, Y., Lippincott-Schwartz, J., Kachar, B. (2011) Bleaching/blinking assisted localization microscopy for super-resolution imaging using standard fluorescent molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 21081–21086.
54. Simonson, P.D., Rothenberg, E., Selvin, P.R. (2011) Single-molecule-based super-resolution images in the presence of multiple fluorophores, *Nano Lett.*, **11**, 5090–5096.
55. Marsh, R.J., Pfisterer, K., Bennett, P., Hirvonen, L.M., Gautel, M., Jones, G.E., Cox, S. (2018) Artifact-free high-density localization microscopy analysis, *Nat. Methods*,
56. Dertinger, T., Colyer, R., Iyer, G., Weiss, S., Enderlein, J. (2009) Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 22287–22292.
57. Dertinger, T., Colyer, R., Vogel, R., Enderlein, J., Weiss, S. (2010)

- Achieving increased resolution and more pixels with Superresolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI), *Opt. Express*, **18**, 18875–18885.
58. Dedecker, P., Mo, G.C.H., Dertinger, T., Zhang, J. (2012) Widely accessible method for superresolution fluorescence imaging of living systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 10909–10914.
 59. Zhang, X., Chen, X., Zeng, Z., Zhang, M., Sun, Y., Xi, P., Peng, J., Xu, P. (2015) Development of a Reversibly Switchable Fluorescent Protein for Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI), *ACS Nano*, **9**, 2659–2667.
 60. Klementieva, N.V., Pavlikov, A.I., Moiseev, A.A., Bozhanova, N.G., Mishina, N.M., Lukyanov, S.A., Zagaynova, E.V., Lukyanov, K.A., Mishin, A.S. (2017) Intrinsic blinking of red fluorescent proteins for super-resolution microscopy, *Chem. Commun.*, **53**, 949–951.
 61. Vandenberg, W., Dedecker, P. (2017) Effect of probe diffusion on the SOFI imaging accuracy, *Sci. Rep.*, **7**, 44665.
 62. Peeters, Y., Vandenberg, W., Duwé, S., Bouwens, A., Lukeš, T., Ruckebusch, C., Lasser, T., Dedecker, P. (2017) Correcting for photodestruction in super-resolution optical fluctuation imaging, *Sci. Rep.*, **7**, 10470.
 63. Geissbuehler, S., Bocchio, N., Dellagiacomia, C., Berclaz, C., Leutenegger, M., Lasser, T. (2012) Mapping molecular statistics with balanced super-resolution optical fluctuation imaging (bSOFI), *Optical Nanoscopy*, **1**, 4.
 64. Mo, G.C.H., Ross, B., Hertel, F., Manna, P., Yang, X., Greenwald, E., Booth, C., Plummer, A.M., Tenner, B., Chen, Z., Wang, Y., Kennedy, E.J., Cole, P.A., Fleming, K.G., Palmer, A., Jimenez, R., Xiao, J., Dedecker, P., Zhang, J. (2017) Genetically encoded biosensors for visualizing live-cell biochemical activity at super-resolution, *Nat. Methods*, **14**, 427–434.
 65. Hertel, F., Mo, G.C.H., Duwé, S., Dedecker, P., Zhang, J. (2016) RefSOFI for Mapping Nanoscale Organization of Protein-Protein Interactions in Living Cells, *Cell Rep.*, **14**, 390–400.
 66. Duwé, S., Vandenberg, W., Dedecker, P. (2017) Live-cell monochromatic dual-label sub-diffraction microscopy by mt-pcSOFI, *Chem. Commun.*, **53**, 7242–7245.
 67. Gustafsson, N., Culley, S., Ashdown, G., Owen, D.M., Pereira, P.M., Henriques, R. (2016) Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations, *Nat. Commun.*, **7**, 12471.
 68. Culley, S., Albrecht, D., Jacobs, C., Pereira, P.M., Leterrier, C., Mercer, J., Henriques, R. (2018) Quantitative mapping and minimization of super-resolution optical imaging artifacts, *Nat. Methods*, **15**, 263–266.
 69. Schmidt, R., Wurm, C.A., Jakobs, S., Engelhardt, J., Egner, A., Hell, S.W. (2008) Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells, *Nat. Methods*, **5**, 539–544.
 70. Böhm, U., Hell, S.W., Schmidt, R. (2016) 4Pi-RESOLFT nanoscopy, *Nat. Commun.*, **7**, 10504.
 71. Shtengel, G., Galbraith, J.A., Galbraith, C.G., Lippincott-Schwartz, J., Gillette, J.M., Manley, S., Sougrat, R., Waterman, C.M., Kanchanawong, P., Davidson, M.W., Fetter, R.D., Hess, H.F. (2009) Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 3125–3130.
 72. Huang, B., Wang, W., Bates, M., Zhuang, X. (2008) Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy, *Science*, **319**, 810–813.
 73. Tokunaga, M., Imamoto, N., Sakata-Sogawa, K. (2008) Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells, *Nat. Methods*, **5**, 159–161.

74. Gebhardt, J.C.M., Suter, D.M., Roy, R., Zhao, Z.W., Chapman, A.R., Basu, S., Maniatis, T., Xie, X.S. (2013) Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells, *Nat. Methods*, **10**, 421–426.
75. Chen, B.-C., Legant, W.R., Wang, K., Shao, L., Milkie, D.E., Davidson, M.W., Janetopoulos, C., Wu, X.S., Hammer, J.A. 3rd, Liu, Z., English, B.P., Mimori-Kiyosue, Y., Romero, D.P., Ritter, A.T., Lippincott-Schwartz, J., Fritz-Laylin, L., Mullins, R.D., Mitchell, D.M., Bembenek, J.N., Reymann, A.-C., Böhme, R., Grill, S.W., Wang, J.T., Seydoux, G., Tulu, U.S., Kiehart, D.P., Betzig, E. (2014) Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution, *Science*, **346**, 1257998.
76. Li, D., Shao, L., Chen, B.-C., Zhang, X., Zhang, M., Moses, B., Milkie, D.E., Beach, J.R., Hammer, J.A. 3rd, Pasham, M., Kirchhausen, T., Baird, M.A., Davidson, M.W., Xu, P., Betzig, E. (2015) ADVANCED IMAGING. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics, *Science*, **349**, aab3500.
77. Yu, W., Ji, Z., Dong, D., Yang, X., Xiao, Y., Gong, Q., Xi, P., Shi, K. (2016) Super-resolution deep imaging with hollow Bessel beam STED microscopy: Super-resolution deep imaging with GB-STED microscopy, *Laser Photonics Rev.*, **10**, 147–152.
78. Mishina, N.M., Tyurin-Kuzmin, P.A., Markvicheva, K.N., Vorotnikov, A.V., Tkachuk, V.A., Laketa, V., Schultz, C., Lukyanov, S., Belousov, V.V. (2011) Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally?, *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 1–7.
79. Richardson, D.S., Gregor, C., Winter, F.R., Urban, N.T., Sahl, S.J., Wiliig, K.I., Hell, S.W. (2017) SRpHi ratiometric pH biosensors for super-resolution microscopy, *Nat. Commun.*, **8**, 577.
80. Halabi, E.A., Thiel, Z., Trapp, N., Pinotsi, D., Rivera-Fuentes, P. (2017) A Photoactivatable Probe for Super-Resolution Imaging of Enzymatic Activity in Live Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 13200–13207.
81. Nickerson, A., Huang, T., Lin, L.-J., Nan, X. (2014) Photoactivated localization microscopy with bimolecular fluorescence complementation (BiFC-PALM) for nanoscale imaging of protein-protein interactions in cells, *PLoS One*, **9**, e100589.
82. Liu, Z., Xing, D., Su, Q.P., Zhu, Y., Zhang, J., Kong, X., Xue, B., Wang, S., Sun, H., Tao, Y., Sun, Y. (2014) Super-resolution imaging and tracking of protein-protein interactions in sub-diffraction cellular space, *Nat. Commun.*, **5**, 4443.
83. Xu, K., Zhong, G., Zhuang, X. (2012) Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons, *Science*, **339**, 452–456.
84. D'Este, E., Kamin, D., Göttfert, F., El-Hady, A., Hell, S.W. (2015) STED Nanoscopy Reveals the Ubiquity of Subcortical Cytoskeleton Periodicity in Living Neurons, *Cell Rep.*, **10**, 1246–1251.
85. He, J., Zhou, R., Wu, Z., Carrasco, M.A., Kurshan, P.T., Farley, J.E., Simon, D.J., Wang, G., Han, B., Hao, J., Heller, E., Freeman, M.R., Shen, K., Maniatis, T., Tessier-Lavigne, M., Zhuang, X. (2016) Prevalent presence of periodic actin-spectrin-based membrane skeleton in a broad range of neuronal cell types and animal species, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 6029–6034.
86. Leterrier, C., Potier, J., Caillol, G., Debarnot, C., Rueda, Boroni, F., Dargent, B. (2015) Nanoscale Architecture of the Axon Initial Segment Reveals an Organized and Robust Scaffold, *Cell Rep.*, **13**, 2781–2793.
87. D'Este, E., Kamin, D., Balzarotti, F., Hell, S.W. (2016) Ultrastructural

- anatomy of nodes of Ranvier in the peripheral nervous system as revealed by STED microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, E191–E199.
88. Nair, D., Hossy, E., Petersen, J.D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., Sibarita, J.-B. (2013) Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95, *J. Neurosci.*, **33**, 13204–13224.
89. Tang, A.-H., Chen, H., Li, T.P., Metzbowler, S.R., MacGillavry, H.D., Blanpied, T.A. (2016) A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors, *Nature*, **536**, 210–214.
90. Appelhans, T., Richter, C.P., Wilkens, V., Hess, S.T., Piehler, J., Busch, K.B. (2012) Nanoscale organization of mitochondrial microcompartments revealed by combining tracking and localization microscopy, *Nano Lett.*, **12**, 610–616.
91. AbuZineh, K., Joudeh, L.I., Al Alwan, B., Hamdan, S.M., Merzaban, J.S., Habuchi, S. (2018) Microfluidics-based super-resolution microscopy enables nanoscopic characterization of blood stem cell rolling, *Sci Adv*, **4**, eaat5304.
92. Ricci, M.A., Manzo, C., Garcia-Parrajo, M.F., Lakadamyali, M., Cosma, M.P. (2015) Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo, *Cell*, **160**, 1145–1158.
93. Boettiger, A.N., Bintu, B., Moffitt, J.R., Wang, S., Beliveau, B.J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Mirny, L.A., Wu, C.-T., Zhuang, X. (2016) Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states, *Nature*, **529**, 418–422.