

NAGRODA NOBLA Z CHEMII W 2014 ROKU ZA ROZWÓJ WYSOKOROZDZIELCZEJ MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ

THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2014 FOR THE DEVELOPMENT OF SUPER-RESOLVED FLUORESCENCE MICROSCOPY

Kaja Frączkowska *

Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Katedra Inżynierii Biomedycznej, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

* e-mail: kaja.fraczkowska@pwr.edu.pl

STRESZCZENIE

Możliwości obrazowania za pomocą mikroskopów optycznych przez długi czas były ograniczone przez tzw. limit dyfrakcji Abbego. Skutkiem istnienia tej granicy jest fakt, że za pomocą mikroskopii świetlnej nie można osiągnąć lepszej rozdzielczości niż połowa długości fali światła. Za obejście tej granicy przy pomocy cząsteczek fluorescencyjnych i zastosowanie specjalnej techniki obrazowania mikroskopowego, Królewska Szwedzka Akademia Nauk zdecydowała o przyznaniu Nagrody Nobla z chemii w 2014 roku trzem naukowcom – Stefanowi W. Hellowi, Williamowi E. Moernerowi oraz Ericowi Betzigowi. Ich prace doprowadziły do skonstruowania mikroskopu fluorescencyjnego o wysokiej rozdzielczości oraz przyczyniły się do rozwoju technik obrazowania pojedynczych molekuł (stimulated emission depletion microscopy STED). Nastąpił wtedy prawdziwy przełom w technikach mikroskopowych, który umożliwił mikroskopii optycznej spojrzeć w nanoświat.

Słowa kluczowe: Nagroda Nobla 2014, STED, Stefan W. Hell, Eric Betzig, William E. Moerner, limit dyfrakcji Abbego, mikroskopia optyczna

ABSTRACT

The imaging capabilities using optical microscopes for a long time have been limited by the so-called Abbe's diffraction limit. According to it, light microscopy cannot achieve resolution better than a half of the light wavelength. For overcoming this limit by using the fluorescent molecules and special microscopic imaging techniques, The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award Stefan W. Hell, William E. Moerner and Eric Betzig the Nobel Prize in Chemistry in 2014. Their works led to the development of super-resolution fluorescence microscopy and single-molecule imaging techniques (stimulated emission depletion microscopy STED). It was a real breakthrough in microscopy techniques that enabled optical microscopy look into the nanoworld.

Keywords: Nobel Prize 2014, STED, Stefan W. Hell, Eric Betzig, William E. Moerner, Abbe's diffraction limit, optical microscopy

1. Wstęp

W 1873 roku Ernst Abbe określił tzw. limit dyfrakcji mikroskopii optycznej [1]. Ogólnie rzecz biorąc, niemożliwe jest obserwowanie za pomocą mikroskopu optycznego obiektów mniejszych niż $0,2 \mu\text{m}$, czyli około połowy długości fali świetlnej. Przez ponad sto lat sądzono, że ominięcie limitu dyfrakcji w przypadku mikroskopii optycznej jest nieosiągalne.

Stefan W. Hell, William E. Moerner oraz Eric Betzig zostali Laureatami Nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 2014 roku za to, że zdołali obejść limit Abbego, przez długi czas ograniczający mikroskopy świetlne. Dzięki ich osiągnięciom mikroskopia optyczna może obecnie zajrzeć w nanoświat.

Nagrodzone zostały dwie odrębne metody. W 2000 roku, pierwszy z Noblistów, 52-letni Niemiec Stefan W. Hell opracował pierwszy mikroskop fluorescencyjny STED (ang. *Stimulated Emission Depletion Microscopy*) o wyjątkowo wysokiej rozdzielczości. Z kolei pracujący niezależnie dwaj Amerykanie 61-letni William E. Moerner oraz 54-letni Eric Betzig stworzyli podwaliny drugiej metody, zwanej mikroskopią pojedynczych molekuł. Po raz pierwszy była ona zastosowana przez Betziga w 2006 roku. W chwili otrzymania Nagrody Nobla Stefan W. Hell był związany z dwiema instytucjami: Max Planck Institute for Biophysical Chemistry w Getyndze oraz German Cancer Research Center w Heidelbergu. William E. Moerner w momencie przyznania Nagrody Nobla pracował na Uniwersytecie Stanforda w USA, natomiast Eric Betzig był pracownikiem w jednostce badawczej Instytutu Medycznego Howarda Hughesa – Janelia Farm Research Campus [2].

2. Wysokorozdzielcza mikroskopia fluorescencyjna

2.1. Limit dyfrakcji Abbego

Rozdzielczość mikroskopii świetlnej ograniczona jest przez zjawisko dyfrakcji (ugięcia fali) oraz rozpraszania fali świetlnej. Podczas przechodzenia wiązki światła przez obiektyw ulega ona ogniskowaniu do małego punktu. Niemniej jednak zjawisko dyfrakcji sprawia, że wiązka świetlna nie tworzy nieskończonego małego punktu, a jedynie rozmytą plamkę ogniskową o skończonej wielkości, zwaną punktową funkcją rozmycia (ang. *point spread function* – PSF) (p. rys. 1a). Owo zjawisko obserwuje się dla każdej długości fali, dlatego przez długi okres czasu sądzono, że jest on nie do ominięcia. Mechanizmy odpowiedzialne za rozmycie plamki ogniskowej po raz pierwszy opisał Abbe (równanie 1) [1]:

$$d(xy) = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (1)$$

gdzie:

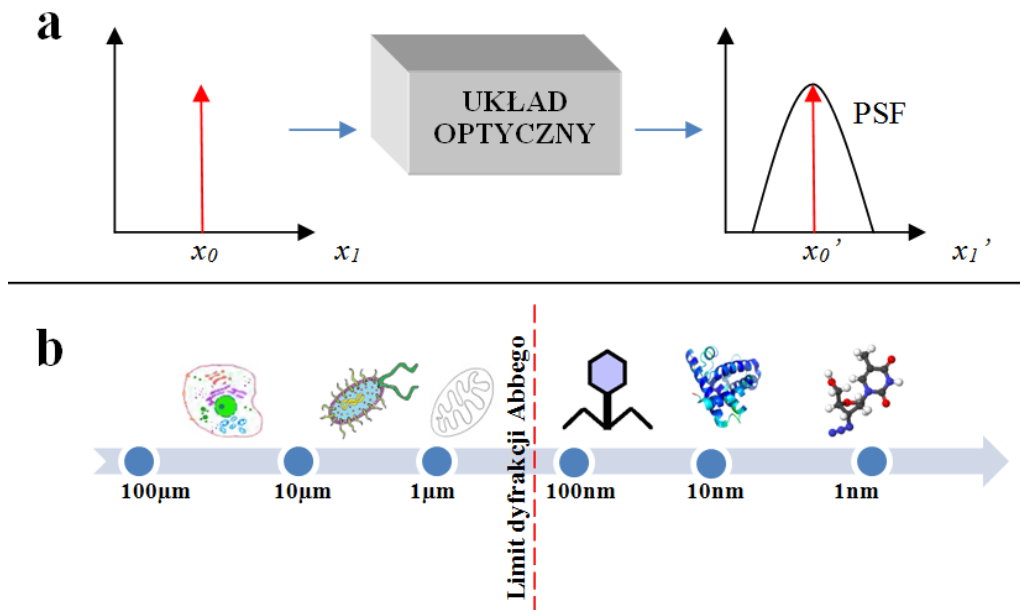
$d(xy)$ – rozdzielczość w płaszczyźnie XY;

λ – długość fali światła przechodzącego przez obiektyw;

n – współczynnik załamania światła;

α – kąt aperturowy soczewki obiektywu.

Konsekwencją limitu Abbego jest fakt, że za pomocą mikroskopu optycznego nie można odróżnić dwóch elementów, które dzieli dystans mniejszy niż połowa długości fali w płaszczyźnie XY. Innymi słowy, gdy na badaną próbkę pada światło o długości fali 400 nm, to uzyskamy rozdzielczość ok. 200 nm. Jeśli jakieś struktury będą od siebie oddalone o mniej niż 200 nm, zaobserwujemy je wtedy jako jeden obiekt. Wiele struktur komórkowych ma znacznie mniejsze rozmiary niż granica rozdzielczości mikroskopu świetlnego i w związku z tym na obrazie mają one postać rozmytych plam, lub są po prostu niedostrzegalne (p. rys. 1b).



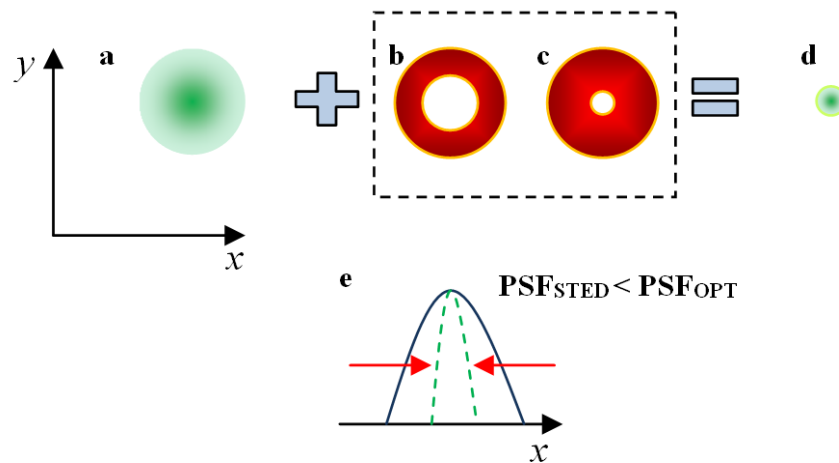
Rys. 1. a) PSF wiązki światła po przejściu przez układ optyczny; b) wielkość obiektów w porównaniu do limitu Abbego, rysunek wykonany na podstawie informacji zawartych w [3]

Limit dyfrakcji Abbego obowiązuje w dalszym ciągu w klasycznej mikroskopii optycznej. Ograniczenie to udało się jednak ominąć trzem naukowcom. Eric Betzig, Stefan W. Hell i William E. Moerner zostali nagrodzeni Nagrodą Nobla za przeniesienie mikroskopii optycznej do nanowymiarów poprzez zastosowanie specjalnych cząsteczek fluorescencyjnych. Mikroskopia stała się zatem nanoskopią.

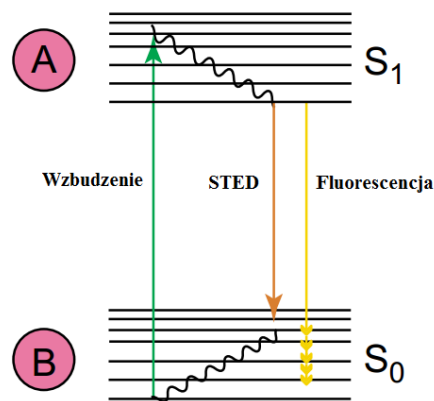
2.2. Mikroskopia fluorescencyjna STED

Na początku ostatniej dekady XX wieku, Stefan W. Hell wysnuł kontrowersyjną teorię, że przekroczenie limitu Abbego jest nie tylko możliwe, ale i wykonalne. Zdał sobie sprawę z tego, że możliwe jest zbudowanie urządzenia, które będzie skanowało próbkę nanometr po nanometrze poprzez zastosowanie wymuszonej fluorescencji prowadzącej do wygaszenia fluorochromów. W 1994 roku opublikował pracę teoretyczną, w której przedstawił zasady funkcjonowania mikroskopii fluorescencyjnej STED i warunki przeprowadzania eksperymentów za jej pośrednictwem [4]. Na podstawie obliczeń wykazał, że za pomocą tej metody można uzyskać rozdzielczość rzędu 35 nm. W roku 2000, Hell przeprowadził obrazowanie m.in. bakterii *E. coli* i drożdży *S. cerevisiae*, otrzymując rozdzielczość niespotykaną nigdy wcześniej w przypadku mikroskopii optycznej. Udowodnił tym samym, że jego teoretyczne rozważania mają odzwierciedlenie w praktyce [5].

W odróżnieniu od tradycyjnej mikroskopii konfokalnej, mikroskop STED wykorzystuje dwie wiązki laserowe – wiązkę wzbudzącą i wiązkę STED. Wiązka lasera o małym natężeniu wzbudza fluorochromy do świecenia. Zgodnie z limitem Abbego powstaje rozmyta plamka (p. rys. 2a). Wiązka STED dużym natężeniem, rosnącym we wszystkich kierunkach od centrum, ma kształt pierścienia i otacza wiązkę wzbudzącą. Ponadto światło wiązki STED jest przesunięte w kierunku fal dłuższych w porównaniu do wiązki wzbudzającej (p. rys. 2b,c). Powoduje to szybkie przejście wzbudzonych pierwszą wiązką fluorochromów z wibracyjnego singletowego stanu wzbudzonego (S_1) do wysokoenergetycznego wibracyjnego stanu podstawowego (S_0), z którego gwałtownie powracają do niskoenergetycznego wibracyjnego stanu podstawowego (p. rys. 3) [6]. Proces ten, w połączeniu z optymalną sekwencją impulsów wzbudzających, prowadzi do wygaszenia całej fluorescencji za wyjątkiem środka plamki o średnicy rzędu kilku nanometrów (p. rys. 2d). Skutkiem tego jest znaczne zwężenie PSF (p. rys. 2e). Jest ona tym mniejsza im większa jest intensywność wiązki STED. Mikroskop skanuje całą próbkę, punkt po punkcie, w ten sposób uzyskujemy obraz wysokiej rozdzielczości [7].



Rys. 2. a) pole wzbudzenia; b) pierścień świecenia STED; c) obszar wygaszania fluorescencji; d) rzeczywista PSF; e) porównanie PSF STED i klasycznej mikroskopii optycznej. Rysunek wykonany na podstawie informacji zawartych w [8]



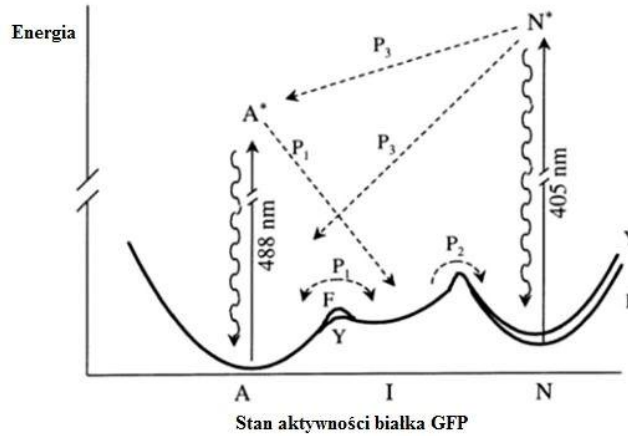
Rys. 3. Diagram Jabłońskiego dla STED; A – singletowy stan wzbudzony, S_1 ; B – singletowy stan podstawowy, S_0 [5]

2.3. Mikroskopia pojedynczych molekuł

Mikroskopia pojedynczych molekuł (ang. *Single-Molecule Microscopy*) jest kolejną metodą nagrodzoną Nagrodą Nobla, pod którą podwaliny położyli William E. Moerner oraz Eric Betzig. W większości metod analitycznych, na przykład podczas pomiaru absorpcji lub emisji światła, pomiarowi podlegają jednocześnie miliony cząsteczek obecnych w badanej próbce. Rezultaty takich pomiarów stanowią wypadkową właściwości wszystkich molekuł. Przez długi czas naukowcy jedynie marzyli o możliwości mierzenia właściwości pojedynczych cząsteczek. Nic więc dziwnego, że osiągnięcie Moernera, który jako pierwszy w 1989 roku zmierzył absorpcję światła pojedynczej molekule, stało się prawdziwym przełomem w mikroskopii optycznej [9]. Zarejestrował on widmo absorpcji pojedynczej cząsteczki pentacenu w domieszkowanym kryształ p-terpenylu w temperaturze ciekłego azotu (4K). W celu osiągnięcia zamierzonego celu, Moerner wykorzystał dwie nowe techniki spektroskopii z modulacją częstotliwości (ang. *Frequency Modulation Spectroscopy*): *FM Stark double modulation* (FMS) oraz *FM ultrasound double modulation* (FMUS). Dzięki takiemu połączeniu możliwe było usunięcie sygnałów pochodzących z tła. Dokonanie Moernera zainspirowało wielu naukowców, również Erica Betziga oraz otworzyło drzwi dla rozwoju nowych technik, opartych na badaniu pojedynczych cząsteczek.

W 1997 roku Moerner zastosował do obrazowania świecące na zielono białko GFP (ang. *green fluorescence protein*), występujące naturalnie u meduz *Aequorea victoria* [10]. Udało mu się uzyskać taką odmianę tego białka, która daje się „włączać” i „wyłączać”. Kiedy białko było wzbudzone

światłem o długości fali 488 nm emitowało fluorescencję, która po pewnym czasie zanikała i nie pojawiała się mimo wtórnej próby wzbudzenia. Okazało się jednak, że światło o długości fali 405 nm reaktywuje białko, które pod wpływem fali świetlnej o długości 488 nm może ponownie emitować fluorescencję (p. rys. 4).



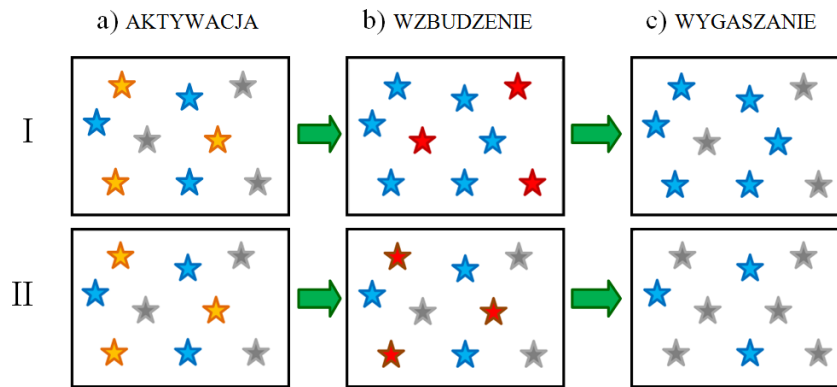
Rys. 4. Właściwości spektralne zmutowanego białka GFP [10]

W eksperymencie tym Moerner unieruchomił białko GFP w polimerowym żelu, tak aby odległość pomiędzy każdą z molekuł białka była większa niż limit dyfrakcji Abbego ($0,2 \mu\text{m}$). Takie ułożenie białek umożliwiło zwykłemu mikroskopowi optycznemu obserwację świecenia pojedynczych molekuł. Moerner swoim odkryciem wykazał, że istnieje możliwość optycznej kontroli świecenia poszczególnych fluoroforów.

W 1993 roku E. Betzig zastosował skaningowy mikroskop bliskiego pola (ang. *Near-field Scanning Optical Microscopy* – NSOM) do badania świecenia pojedynczych cząsteczek karbo-cyjaniny [11]. W metodzie tej promień światła emitowany jest z bardzo cienkiej sondy, której odległość od próbki wynosi zaledwie kilka nanometrów. Taki rodzaj mikroskopii jest w stanie przełamać barierę dyfrakcji, jednak obarczony on jest wieloma słabymi punktami. Jednym z nich jest krótki zasięg wiązki świetlnej, przez co obrazowanie struktur wewnątrzkomórkowych jest bardzo trudne w realizacji.

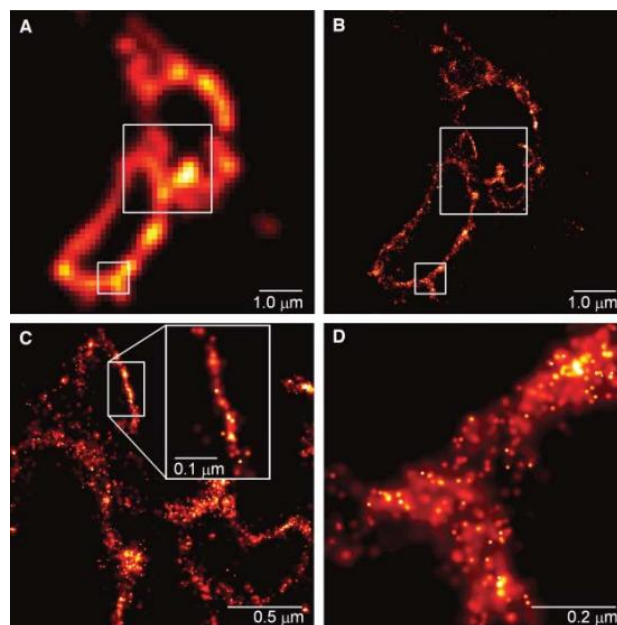
Dwa lata później Betzig opisał nowy sposób na osiągnięcie wysokiej rozdzielczości obrazowania [12]. Rozwiązanie, które zaproponował, polegało na określeniu pozycji dużej liczby punktów świetlnych o znanych właściwościach spektralnych w dwóch krokach. W pierwszym etapie, świecenie każdego zbioru cząsteczek o tych samych właściwościach spektralnych obrazowane jest osobno. Następnie można wyznaczyć środki PSF dla każdego zarejestrowanego punktu. Uzyskane obrazy nakładano na siebie, otrzymując w rezultacie obraz o bardzo wysokiej rozdzielczości. Niemniej jednak, metoda ta wciąż była obciążona pewnymi problemami praktycznymi, jak na przykład brak wystarczającej liczby fluoroforów o rozróżnialnych właściwościach optycznych.

W 2006 roku Betzig rozwinął wysokorozdzielczą technikę obrazowania mikroskopowego polegającego na „włączaniu” i „wyłączaniu” cząsteczek fluorochromów PALM (ang. *Photoactivated Localization Microscopy*) [13]. W metodzie tej, zamiast różnokolorowych fluorochromów, wykorzystuje się różnice w czasie zaniku świecenia białek. Pod wpływem promieniowania o długości fali 404 nm mały zbiór rozproszonych losowo cząsteczek zmutowanego białka GFP ulega aktywacji, po czym przy długości fali 480 nm białka te emitują fluorescencję, dzięki czemu można ustalić lokalizację każdego z punktów świecenia. Gdy pierwszy zbiór białek GFP ulegnie nieodwracalnemu wygaszeniu, kolejny może zostać aktywowany i tak dalej, dopóki wszystkie grupy nie zostaną zobrazowane (p. rys. 5).



Rys. 5. Zasada pomiarów mikroskopią PALM, a) część białek ulega aktywacji; b) białka emitują fluorescencję; c) białka ulegają nieodwracalnemu wygaszeniu. Rysunek na podstawie informacji zawartych w [13]

W ten sposób uzyskuje się obraz badanej struktury z bardzo wysoką rozdzielczością. Rysunek 6 przedstawia ekspresję białka lizosomalnego CD63 [13]. Zdjęcie na rysunku 6a wykonane jest metodą mikroskopii całkowitego wewnętrznego odbicia (*ang. Total Internal Reflection Fluorescence Microscope – TIRFM*), natomiast pozostałe za pośrednictwem PALM. Warto zauważyć, że skala na rysunku 6d jest bliska limitowi Abbego.



Rys. 6. Rozkład białka lizosomalnego (CD63) znakowanego białkiem GFP: A) bez i B) z wykorzystaniem techniki PALM; C) duży kwadrat z sekcji B w powiększeniu; D) mały kwadrat z sekcji B w powiększeniu [13]

3. Sylwetki noblistów

3.1. Stefan W. Hell

Stefan W. Hell urodził się 23 grudnia 1962 roku w Arad w zachodniej Rumunii. W 1987 roku ukończył studia magisterskie z fizyki na Uniwersytecie w Heidelbergu. Na tej samej uczelni uzyskał stopień doktora (1990) oraz habilitację (1996) w dziedzinie fizyki. Na początku lat 90. XX wieku podzielił się swym pomysłem na ominięcie limitu Abbego, spotkał się jednak ze sceptycyzmem profesury, dlatego w 1993 roku ruszył do Finlandii [14]. Pracował na Uniwersytecie w Turku. W tym czasie, był również pracownikiem naukowym brytyjskiego Uniwersytetu w Oksfordzie. W 1994 roku, Hell opublikował teoretyczną pracę opisującą podstawy mikroskopii STED [2], za co dostał propozycję posady w Instytucie Chemii Biofizycznej Maxa Plancka w Getyndze i mógł powrócić do

Niemiec. W 2002 roku został jednym z dyrektorów tej placówki. Był laureatem wielu nagród, między innymi Nagrody Międzynarodowej Komisji Optyki (2000), Leibniz Prize (2008), Nagrody Otto Hahna (2009) i Nagrody Rodziny Hansenów (2011) [15]. W 2000 roku rozwinął w praktyce mikroskopię STED, za co otrzymał Nagrodę Nobla z chemii w 2014 roku [3].

3.2. William E. Moerner

William E. Moerner urodził się 24 czerwca 1953 roku w Kalifornii (USA). Na Uniwersytecie Waszyngtońskim ukończył studia licencjackie z fizyki, inżynierii elektrycznej i matematyki. Następnie ukończył studia magisterskie oraz doktorskie z fizyki na Uniwersytecie Cornella. W 1981 roku przeprowadził się do Kalifornii, gdzie podjął pracę w IBM (ang. *International Business Machines Corporation*). Z firmą tą był związany przez kolejne 13 lat. W międzyczasie (1998) uzyskał tytuł profesora chemii na Uniwersytecie Stanforda, na którym pracuje do dzisiaj [16]. W 1989 r. Moerner, jako pierwszy w historii dokonał pomiaru absorpcji światła pojedynczej molekuly [6]. Kilka lat później do obrazowania zastosował świecące na zielono białko GFP, wyizolowane od meduz *Aequorea victoria*. Udało mu się uzyskać odmianę tego białka, dającą się „włączać” i „wyłączać” w zależności od długości fali wiązki światła [7]. Te dokonania przyniosły mu Nobla. Jest członkiem Narodowej Akademii Nauk, laureatem wielu nagród oraz autorem licznych publikacji.

3.3. Eric Betzig

Eric Betzig urodził się 13 stycznia 1960 roku w Ann Arbor, w stanie Michigan (USA). W 1983 roku ukończył studia licencjackie z fizyki w Kalifornijskim Instytucie Technologicznym w Pasadenie. Następnie udał się na Uniwersytet Cornella, gdzie zdobył stopień magistra (1985) i doktora (1988). Przez kolejne sześć lat pracował w Bell Laboratories w Murray Hill (New Jersey) [17]. Podobnie jak Hell i Moerner, Betzig zaczął myśleć nad pokonaniem granicy Abbego. Jednak brak powodzenia oraz specyfika świata akademickiego wkrótce go zmęczyły. W 1996 roku porzucił karierę naukowca i zaczął pracować w firmie ojca, produkującej maszyny do wytwarzania części samochodowych [14]. Po pewnym czasie Betzig stracił pracę, co zaowocowało powrotem do nauki i wynalazkiem na miarę Nobla – nanoskopem PALM [13]. Od 2005 r. Betzig pracuje w jednostce badawczej Instytutu Medycznego Howarda Hughesa – Janelia Farm Research Campus.

4. Podsumowanie

Osiągnięcia naukowe Laureatów Nobla z chemii w 2014 roku spowodowały prawdziwy przełom w badaniach na poziomie komórkowym. Umożliwiły mikroskopii optycznej zajrzenie w do tej pory niedostępny nanoświat pojedynczych. Stosowane dotychczas mikroskopy świetlne nie pozwalały na badanie struktur mniejszych niż 0,2 μm (limit dyfrakcji Abbego). Uhonorowanym naukowcom udało się ominąć tę barierę, co pozwoliło obserwować obiekty na poziomie nanometrów. Ponadto za pomocą tych technik można obecnie uzyskać inne ważne dane, jak np. informacje o załamaniu czy transmisji fal świetlnych na dowolnej głębokości komórki. Istnieją co prawda inne techniki mikroskopowe, które umożliwiają obserwację struktur komórkowych z rozdzielczością poniżej limitu Abbego, takie jak mikroskopia sił atomowych (AFM) czy mikroskopia elektronowa, ale eksperymenty z zastosowaniem tych technik są bardzo trudne do przeprowadzenia na żywych komórkach. Do tego często wymagane jest utrwalenie i/lub zastosowanie kontrastu, co skutkuje zabiciem komórki.

Mikroskopia STED znajduje szerokie zastosowanie w naukach biomedycznych i farmaceutycznych. Poprzez przyłączenie fluorochromu do cząsteczki leku można obserwować dynamikę i kinetykę oddziaływania substancji. Innym przykładem jest zastosowanie nanoskopii fluorescencyjnej w badaniach nad chorobami nowotworowymi, chorobą Parkinsona czy Alzheimerem. Warto dodać, że mikroskopia STED umożliwia przeprowadzenie badań na żywych komórkach [18], a co ważniejsze nawet na żywych organizmach [19]. Być może już wkrótce część z obecnie nękających ludzkość problemów natury medycznej, dzięki przełomowym technikom nanoskopowym, zostanie rozwiązana.

LITERATURA

- [1] E. Abbe: *Beiträge zur Theori des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, Archiv fur mikroskopische Anatomy, vol. 9, 1873, s. 413–418.
- [2] The Nobel Prize In Chemistry 2014
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/
- [3] Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2014. Super-resolved fluorescence microscopy
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/advanced-chemistryprize2014.pdf
- [4] S.W. Hell, J. Wichman: *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion-microscopy*, Optics Letters, vol. 19, 1994, s. 780–782.
- [5] T.A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S.W. Hell: *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., vol. 97, 2000, s. 8206–8210.
- [6] S.W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs: *Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy*, Current Opinion in Neurobiology, vol.14, 2004, s. 599–609.
- [7] S.W. Hell, K. Willig, M. Dyba, S. Jakobs, L. Kastrop, V. Westphal: *Nanoscale resolution with focused light: STED and other RESOLFT microscopy concepts*, [w:] J.B. Pawley (ed.) *Handbook of Biological Confocal Microscopy* 3rd edition, Springer-Verlag, New York, 2006, s. 571–579.
- [8] B. Huang, M. Bates, X. Zhuang: *Super-resolution fluorescence microscopy*, Annual Review of Biochemistry, vol. 78, 2009, s. 993–1016.
- [9] W.E. Moerner, L. Kador: *Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid*, Physical Review Letters, vol. 62, 1989, s. 2535–2538.
- [10] R.M. Dickson, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien, W.E. Moerner: *On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein*, Nature, vol. 388, 1997, s. 355–358.
- [11] E. Betzig, R.J. Chichester: *Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy*, Science, vol. 262, 1993, s. 1422–1425.
- [12] E. Betzig: *Proposed method for molecular optical imaging*, Optics Letters, vol. 20, 1995, s. 237–239.
- [13] E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H.F. Hess: *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*, Science, vol. 313, 2006, s. 1642–1645.
- [14] How the optical microscope became a nanoscope
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/popular-chemistryprize2014.pdf
- [15] Stefan W. Hell: Curriculum Vitae Prof. Dr. Stefan W. Hell
http://www.leopoldina.org/fileadmin/redaktion/Mitglieder/CV_Hell_Stefan_EN.pdf
- [16] William E. Moerner: Curriculum Vitae
http://web.stanford.edu/group/moerner/cv/moerner_current.pdf
- [17] Eric Betzig: Curriculum vitae
<http://www.janelia.org/sites/default/files/CV%20Eric%20Betzig%200911.pdf>
- [18] U.V. Nägerl, K.I. Willig, B. Hein, S.W. Hell, T. Bonhoeffer: *Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy*, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., vol. 105, 2008, s. 18982–18987.
- [19] S. Berning, K.I. Willig, H. Steffens, P. Dibaj, S.W. Hell: *Nanoscopy in a Living Mouse Brain*, Science, vol. 335, 2012, s. 551.

otrzymano / submitted: 15.12.2014
wersja poprawiona / revised version: 22.12.2014
zaakceptowano / accepted: 29.12.2014