

Superresoluutiomikroskopia biologian tutkimustyökaluna

LuK-tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemian tutkinto-ohjelma (LuK)

4 / 2024

Teemu Sebastian Tuominen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

Tuominen Sebastian TEEMU

Superresoluutiomikroskopia biologian tutkimustyökaluna

LuK-tutkielma 21 s.

Biokemia

4 / 2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Biologisessa tutkimuksessa havainnointi on aina ollut tärkeässä asemassa ja pienten yksityiskohtien tarkastelu on vaatinut uudenlaisia teknologisia ratkaisuja. Valomikroskopian diffraktiorajan ollessa rajoittunut 200 nm erotuskykyyn, fluoresenssimikroskopia on mahdollistanut korkeammat superresoluutiomikroskopian tekniikat 20 nm erotuskyvyllä ja parhaimmillaan 1 nm resoluutioon. Yleisimpien superresoluutiomikroskopian tekniikoiden kuten stimuloitun emission vaimennusmikroskopia, sekä yksittäisen molekyylin lokalisaatiomikroskopiitekniikat kuten, stokastinen optinen rekonstruktio-mikroskopia ja valoaktivoitu lokalisaatiomikroskopia hyödyntäminen biologisessa tutkimuksessa on osoittautunut äärimmäisen arvokkaaksi, superresoluutiomikroskopian-tekniikoiden mahdollistaman suuren erotuskyvyn. Käyttämällä fluoroforeja kuten orgaanisia leimamolekyylejä, fluoresoivia proteiineja, metalli-kelaattileimoja sekä kvanttipisteitä ja niiden ominaisuuksia eri käyttökohteiden mukaisesti, voidaan selvittää solun rakenteiden ja proteiinien toimintaa tarkkuudella, joka ei valomikroskopian 200 nm erotuskyvyn myötä olisi mahdollista. Erilaisten superresoluutiomikroskopianteekniikoiden ja älykkään fluoroforien valinnan avulla on mahdollista selvittää, kuinka solun ja eliön aineenvaihdunta toimii. Solujen proteiini-interaktioiden tutkimuksella on selvitetty mahdollisia lääkkeen vaikutuskohtia monille taudeille kuten Alzheimerin taudilla ja syöpäsairauksille.

Sisältö

1. Johdanto.....	1
2. Yleiset superresoluutiomikroskopian tekniikat	3
2.1. Stimuloidun emission vaimennusmikroskopia	3
2.2. Yksittäisen molekyylin lokalisaatiomikroskopia	7
3. Leimateknologiat ja fluoroforit.....	8
3.1. Fluoresoivat proteiinit.....	9
3.2. Orgaaniset fluoresoivat leimat.....	11
3.3. Metalliligandileimat.....	13
3.4. Kvanttipisteet.....	13
4. Biologisten tapahtumien tutkiminen.....	14
4.1. Solutason tapahtumat	14
4.2. Superresoluution hyödyntäminen lääkekehityksessä	17
5. Yhteenveto	20

Lyhenteet ja avaintermit

SRM = Superresoluutiomikroskopia

STED = Stimuloidun emission vaimennusmikroskopia (engl. *Stimulated Emission Depletion*)

SMLM = Yksittäisen molekyylin lokalisaatiomikroskopia (engl. *Single-Molecule Localization Microscopy*)

valoaktivoitu lokalisaatiomikroskopia (engl. *Photoactivated Localization Microscopy*)

PALM

STORM = Stokastinen optinen rekonstruktio-mikroskopia (engl. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*)

Diffraktio = Valon aaltoluonteen aiheuttamaa valon leviämistä esteiden ja aukkojen ohitse

Kromaattinen aberraatio = Valon lyhyet aallonpituudet taittavat enemmän kuin pitkät aallonpituudet väliaineessa

Airy levy (engl. *Airy disk*) = Optiikan käsite pyöreän aukon tuottamasta diffraktiokuvista

FRET = Försterin resonanssienergiansiirto (engl. *Förster resonance energy transfer*), missä 2 lähellä olevaa fluoroforia voi aktivoida toista, jos emission aallonpituus vastaa toisen aktivaatio aallonpituutta

Fluorofori = Fluoresoiva kemiallinen yhdiste, joka virittyessään emittoi valoa

Kromofori = Molekyylin väristä vastaava osa, josta värinä aistittava aallonpituus heijastuu

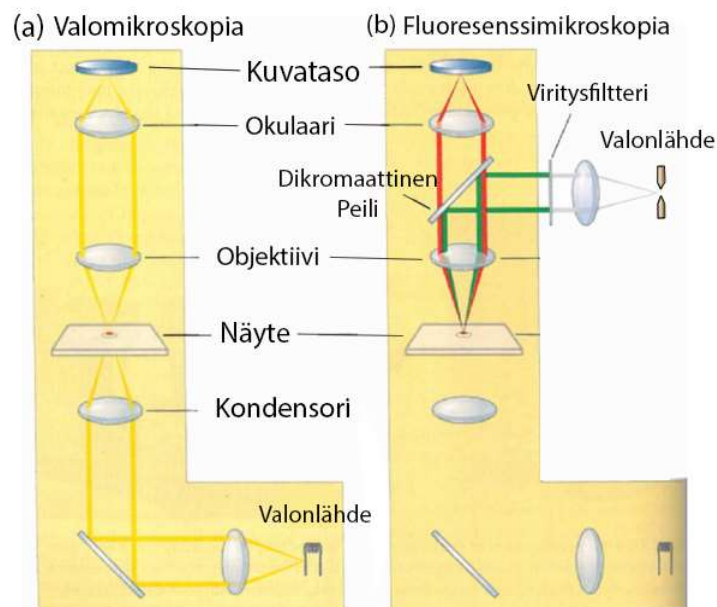
Koetin (engl. *Probe*) = Yhdiste, joka tarttuu kohteeseen fluoresoivan molekyylin kanssa

Kvanttipiste = Puolijohteellisia nanokristalleja, joilla on optisia ja elektronisia ominaisuuksia

Numeerinen aperttuuri NA = Objektiivin kyky vastaanottaa valoa. $NA = (n) \sin \Theta$, jossa (n) on taitekerroin näytteen ja objektiivin välillä. Θ on maksimaalinen valon tulokulma näytteestä objektiiviin.

1. Johdanto

Biologian tutkimuksessa havainnointi on tärkeä tapa saada uutta tietoa tutkittavasta kohteesta. Havainnointimme on rajoittunut silmiemme erotuskykyyn ja pienempien kuin 1 mm kohteiden tarkempi tarkastelu vaatii visuaalisesti suurentavien apuvälineiden, kuten mikroskoopin käyttöä. Valomikroskooppi on laite, millä ohut läpikuultava näyte nähdään 10-1000x suurennoksena, riippuen käytettyjen objektiivien ja okulaarien suurennuskertoimista. Lasilevyllä olevan näytteen alapuolen valonlähde valaisee näytteen, jolloin valon kulku estyy osittain näytteen rakenteiden vuoksi. Tutkittavan näytteen rakenteet estävät valon vapaan kulkeutumisen ja muodostavat kuvan, mikä koostuu tummista ja kirkkaista alueista. Osa valosta absorboituu tutkittavaan näytteeseen ja absorboimaton valo kulkeutuu näytteen lävitse omalla aallonpituudella, joka nähdään värinä. Mikroskoopin valoa taittava osa on objektiivi, jonka sisäiset kuperat ja koverat lasit taittavat valoa manipuloiden polttopistettä lähemmäksi, siten levittäen valon suuremmalle alueelle suurentaen valon muodostaman kuvan. Okulaari eli silmäpala on puolestaan osa, joka taittaa objektiivin ohjaaman valon detektorille tai silmän muotoon sopivaksi. (kuva 1)



Kuva 1: valomikroskoopin ja fluoresenssimikroskoopin toimintaperiaate. a) Valomikroskopiassa valolähteen valo kohdennetaan kondensoriin, joka säätelee valon kohdistumista näytteeseen. Näytteen lävitse ja siitä heijastuva valo kohdentuu objektiivin, jossa objektiivin sisäiset linssit ohjaavat valonsäteet polttopistettä muuttamalla suurentaen kuvan kuvatasaalle. b) Fluoresenssimikroskopiassa valonlähteenä

käytetään näytteen fluoroforeja, jotka virittyvät laserin vaikutuksesta. Näytteen fluoroforien emission kulkeutuu objektiivin ja sitä kautta kuvatasolle. Muokattu kohteesta ([Lodish ja muut 2016.](#))

Fluoresenssimikroskoopi kykenee parempaan resoluutioon kuin valomikroskoopi, johtuen sen toimintaperiaatteesta. Fluoresenssimikroskoopin hyödyntämät leimamolekyylit emittoivat kapea-alaisesti valon aallonpituuksia, mikä vähentää muun aallonpituuden aiheuttamaa häiriötä, saaden näytteen leimatut rakenteet näkymään paremmin, kun taas valomikroskoopi hyödyntää valkoisen valon aallonpituuksia 400–700 nm, joista molemmat ääripäät taittuvat väliaineessa eri tavalla aiheuttaen kromaattista aberraatiota ja diffraktiota. Kromaattinen aberraatio on valon aallonpituuksien erilaista taittumista väliaineessa, valon lyhyet aallonpituudet taittuvat enemmän kuin pitkät aallonpituudet. Diffraktio on valon aaltoluonteesta aiheutuvaa valon leviämistä esteiden ja aukkojen ohitse. Fluoresenssimikroskopiassa diffraktio interferenssikuvioista käytetään nimitystä Airyn levy (*engl. Airy disk*). Valon aaltoluonteen aiheuttaman diffraktion vuoksi on mahdotonta erottaa kohteita, jotka ovat alle puolet valon aallonpituuden etäisyydellä toisistaan Abben diffraktiorajan määrittämänä (*engl. Abbe's Diffraction Limit*) ([Abbe 1876.](#)) Resoluutio eli erotuskyky on siten osittain valon aallonpituuden rajoittama. Tätä luonnonlakia on kuitenkin mahdollista kiertää paremman erotuskyvyn saamiseksi.

Fluoresenssimikroskopia kiertää diffraktiorajaa käyttämällä valoa emittoivia leimamolekyylejä eli fluoroforeja, joiden sijainti on mahdollista määrittää tarkemmin kuin mitä valon aallonpituus sallisi. Fluoroforit ovat fluoresenssiin kykeneviä yhdisteitä. Niiden sijainti on mahdollista määrittää tarkasti, koska valo emittoituu jokaiseen suuntaan, osa valosta päätyy objektiivin kautta detektorille ja saadaan kuvattua valopiste. Valon muodostaman piste himmenee pisteen reunoja kohden diffraktion vuoksi. Piste, josta valon intensiteetti havaitaan vahvimmin, on fluoroforin sijainti (kuva 3a). Fluoroforin ollessa kohteen pinnalla voidaan määrittää kohteen muoto ja vertaamalla fluoroforin sijaintia sen läheisiin fluoroforeihin, saadaan määritettyä kohteen pintarakenne. Fluoresenssimikroskopiassa käytetään leimamolekyyleinä orgaanisia- ja lantanoidikelaatti-leimoja ([Cho ja muut 2018.](#)), sekä proteiineja kuten vihreää fluoresoiva proteiinia (*engl. Green Fluorescent protein, GFP*) (Patterson ja muut 1997). Fluoroforit virittyvät emittoimaan tietyn aallonpituuden laserin vaikutuksesta yhdisteelle ominaista aallonpituutta; emissio- ja aktivaatiospektri on kullekin yhdisteelle

ominainen. Soluun tai sen soluelimiin liitetyt leimamolekyylit aktivoidaan leimalle ominaisella viritysaallonpituuden laserilla, mikä saa leiman emittoimaan valokvantin. Leiman emission havainnointi tapahtuu mikroskooppiin liitetyn detektorin avulla. Näytteestä saadusta kuvasta nähdään soluelinten olemassaolo, sijainti, rakenne ja liike.

Superresoluutiomikroskopia (engl. Superresolution microscopy, SRM) käyttää fluoresenssimikroskopialle ominaisia leimattuja yhdisteitä älykkäästi, jolla saavutetaan alle diffraktiorajan resoluutio. Yksittäisen molekyylin emissio nähdään paremmin suurella resoluutiolla kuin monen samanaikaisen molekyylin emission. Ensimmäinen SRM-tekniikka kehitettiin Max Planckin instituutissa Stefan Hell työryhmineen, ja hän sai siitä yhdessä Eric Betzigin ja William E. Moernerin kanssa kemian Nobel-palkinnon vuonna 2014. ([Nobel 2014](#))

SRM:n hyödyntäminen biologian tutkimuksessa on kiihtynyt viimeisen 20 vuoden aikana. Uusia SRM-tekniikoita kehittyi jatkuvasti, mikä avaa paremman näköalan biologisiin tapahtumiin. Tutkielman tarkoitus on selvittää toimintaperiaate ja käyttömahdollisuudet SRM-tekniikoille, kuten stimuloitun emission vaimennusmikroskopia (engl. Stimulated Emission Depletion, STED), yksittäisen molekyylin lokalisaatiomikroskopia (engl. Single-Molecule Localization Microscopy, SMLM), stokastinen optisen rekonstruktio-mikroskopia (engl. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM), mitä erilaisia leimatekniikoita on, sekä kuinka leimateknologia yhdessä SRM:n kanssa on mullistanut biologisen tutkimuksessa ennen näkemättömässä mittakaavassa.

2. Yleiset superresoluutiomikroskopian tekniikat

2.1. Stimuloitun emission vaimennusmikroskopia

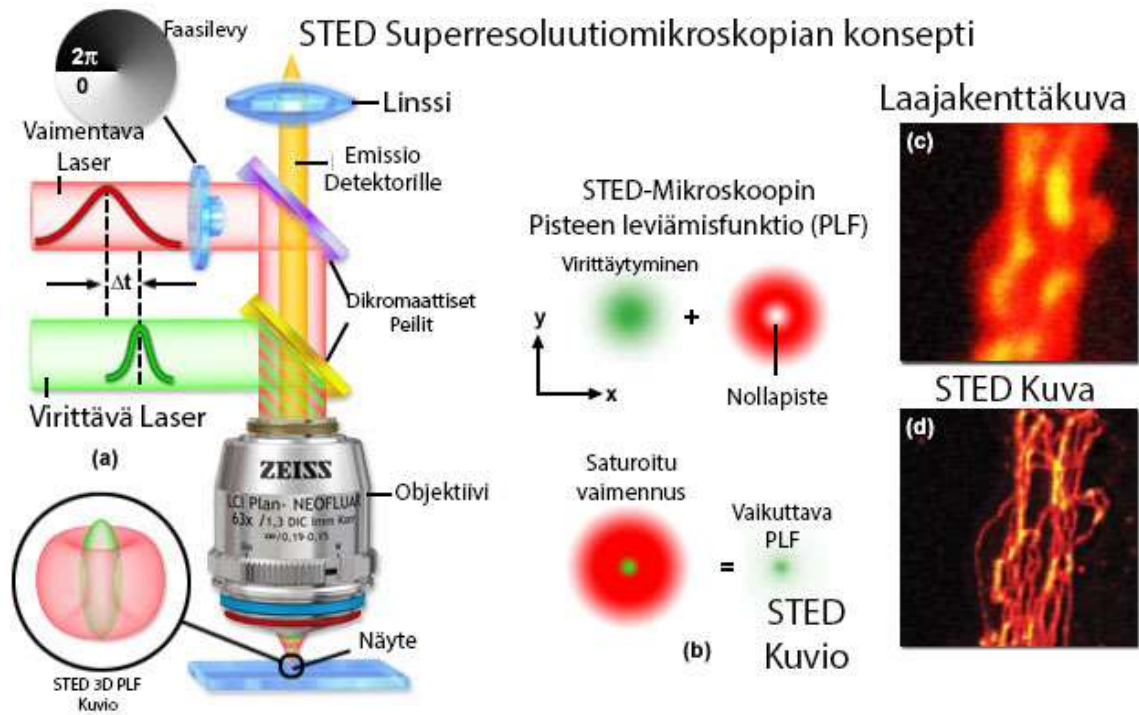
STED on yksi SRM-tekniikka, jolla saadaan mikroskoopilla otettujen kuvien resoluutio alle diffraktiorajan (kuva 2c, kuva 2d). Se tapahtuu näytteen leimojen eri aikaisella aktivoinnilla ja käyttämällä pisteen leviämiskäyrää (engl. Point Spread Function, PSF) ([Rust ja muut 2006](#).) Molekyylit voidaan näin erottaa suurella spatiaalisella resoluutiolla, sillä se ei ole resoluutorajan määräämä. ([Qu ja muut 2004](#)). Spatiaalinen resoluutio eli kuvantamismenetelmän pienin mahdollinen etäisyys kahden tunnistettavissa olevan kohteen välillä. STED perustuu näytteen fluoroforien samanaikaiseen virittämiseen ja stimuloitun emission vaimennukseen (kuva 2a).

Näytteen emittoivien fluoroforien virittyminen tapahtuu tyypillisesti laserilla, jossa STED-laser samanaikaisesti vaimentaa fluoroforeja donitsin muotoisella alueella päästäten vain donitsin keskeltä tulevan fluoresenssin lävitse. ([Klar ja muut 2000](#)). STED-laserin donitsin muotoisella alueella virittäytyneiden leimojen emissio vaimennetaan, kun taas donitsin keskelle emissiota vaimentavan laserin vaikutusalue ei ylety diffraktion valonmäärään eksponentiaalisen vähenemisen takia (kuva 2b) ([Heine ja muut 2017](#)). Valikoiva leimojen sammuttaminen ja kytkeminen päälle mahdollistaa superresoluution estämällä lähekkäin olevien leimojen aiheuttaman valolähteiden yhdistymisen (kuva 2) ([Herbert ja muut 2012](#)).

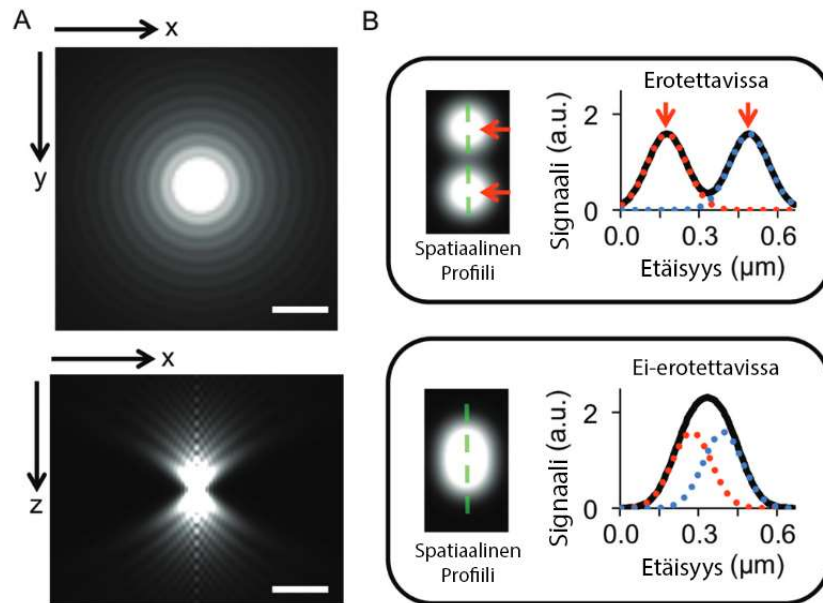
Lähekkäin olevat valonlähteet saavat aikaan valon aaltojen yhdistymisen ja käyttäytymisen yhdessä, mistä seuraa, että valonlähteitä on mahdoton erottaa toisistaan (kuva 2c, kuva 3b). Valon leviäminen ja muodostuminen kuvatasolla kuten detektorilla tunnetaan nimellä pisteen leviämiskäyrä (engl. Point Spread Function, PSF) (kuva 2b, kuva 3). STED- ja virittävä laser kohdentavat samalle akselille kuin mikroskoopin objektiivi. Näytettä tutkiessa voidaan siten nähdä kerralla vain STED:n muodostaman donitsin keskeltä objektiiviin pääsevä emissio. Näytteen pintaa skannaamalla, selvitetään näytteen leimojen sijainti pienellä alueella tarkasti. (kuva 4) Leiman emission intensiteetistä päätellään leiman todennäköisin sijainti, kun pisteiden etäisyys on suurempi kuin Abben diffraktioraja, eli puolet valon aallonpituudesta. Vertaamalla emission detektoinnista saatua dataa voidaan selvittää proteiinin pinnan muodot (kuva 2b, kuva 4a, kuva 4b) ([Träger ja Hell 2007](#).)

STED-tekniikan huonona puolen on pitkä laserin valotusaika, joka vahingoittaa fluoroforeja voimakkaasti. Rakenteen kuvaamiseen kuluu myös paljon aikaa, sillä kuvaamistapahtuma ei ole välitön. Kuvausprosessiin kuuluu valotus, joka määrittää kauanko detektorin sensori ottaa sisäänsä fluoresoivien yhdisteiden valoa. Pitkään valotetussa kuvassa sensori ottaa vastaan valoa pidempään ja siten muodostuneesta kuvasta tulee kirkkaampi ja selkeämpi. Lyhyesti valotetusta kuvasta tulee puolestaan tumma eikä siitä erota rakenteita. Kuvan prosessoinnista tietokoneella kuluu myös merkittävä osa ajasta, sillä tietokoneen tulee yhdistää tuhannet kuvat, joissa fluoresoivien yhdisteiden sijaintitietoja yhdistetään yhdeksi kuvaksi. Hyötynä yhdistetyssä kuvassa on kuitenkin saavutettu superresoluutio, joka on kymmenkertainen verrattuna tavanomaisiin mikroskopian menetelmiin. Menetelmä sopii sekä kuolleille

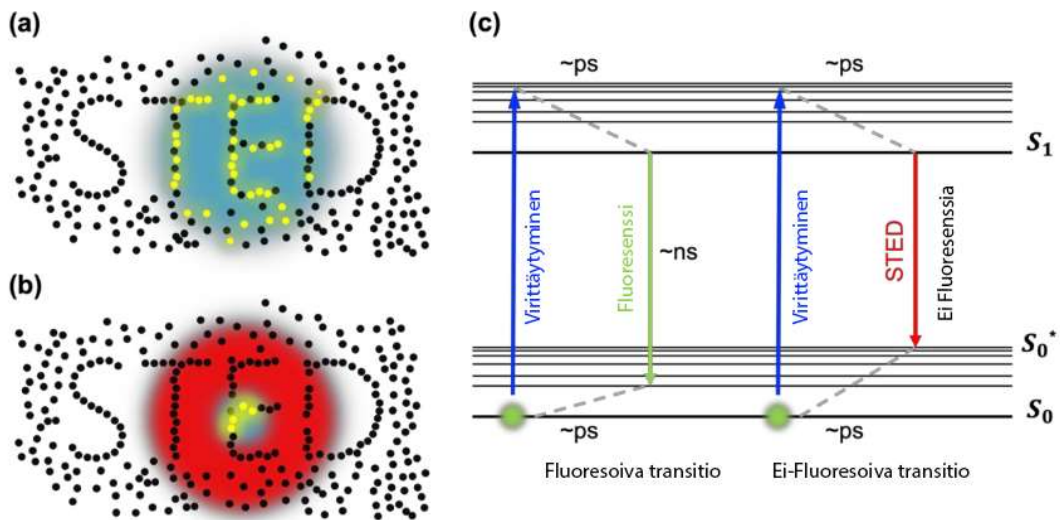
että eläville näytteille, vaikka pitkät kuvausajat voivat aiheuttaa oksidatiivista stressiä fluoroforien tuottamien happiradikaalien muodossa. STED-teknikka itsessään aiheuttaa myös huomattavasti enemmän valovauriota sen vaimentavan laserin vuoksi, minkä voimakkuus on yleisesti 3–5 kertaa suurempi kuin tavanomainen virittävän laser. ([Wäldchen ja muut 2015.](#))



kuva 2. Stimuloidun emission vaimennusmikroskopia STED:n toimintaperiaate. a) STED mikroskoopin kuva, jossa virittävä laser aktivoi näytteen fluoroforit, vaimentava laser sammuttaa donitsin muotoisella alueella näytteen fluoroforeja, mistä b) aktivoituneet fluoroforit emittoivat valoa, vaimentavan laserin donitsin keskeltä. c) Laajakenttäkuva (widefield image) mikrotubuluksista, jossa resoluutio on diffraktiorajoittunut. d) Sama (c)-kuvan alue STED-teknikalla kuvattuna, mistä erotetaan selkeämmin mikrotubulusten muodostamat rakenteet kuin laajakenttäkuvassa. Muokattu kuvasta ([Zeiss 2023](#)).



kuva 3. Pisteiden leviämiskäyrän (engl. Point Spread Function, PSF) aiheuttama resoluutiokäytännön raja. A) Yksittäisen fluoroforin emittoivan Airyn levyjen diffraktiokuvion leviämien X ja Y akselleilla. Alemmassa kuvassa, kahden lähellä olevan fluoroforin Airyn levy, jossa esiintyy diffraktion interferenssikuvioita X ja Z akselleilla. Abben diffraktiokäytännön raja estää pisteiden sijaintien määrittämisen tarkasti. B) Näkyvän valon aallonpituudella pisteet voivat olla 200–350 nm etäisyydellä toisistaan ja vielä erotettavissa. Punainen nuoli kuvastaa etäisyyttä, jossa keskipisteiden erottaminen toisistaan on mahdollista. Vihreä katkoviiva kuvastaa pisteen valoprofiilia. Muokattu kuvasta ([Herbert ja muut 2012](#)).



kuva 4. Stimuloidun emissioita vaimennusmikroskopia STED:ssä käytettyjen fluoroforien virttäytymisen vaimentaminen. a) Näytteessä olevien leimojen fluoresenssi ilman vaimennusta. b) Näytteessä olevien leimojen fluoresenssi käyttämällä STED-laseria. c) Jablonskin diagrammi virttätasojen fluoresoivasta ja ei-fluoresoivasta muutoksesta. Muokattu kuvasta ([Jeong ja muut 2021](#)).

2.2. Yksittäisen molekyylin lokalisaatiomikroskopia

SMLM on STED:sta kehitetty tekniikka, jonka etuna toimii sen kyky tarkastella yksittäistä emittoivaa molekyyliä. SRM-tekniikkojen resoluutio on molekyyalitasolla 20 nanometrin kokoluokkaa ja parhaimmillaan STED/SMLM yhdistelmätekniikoilla jopa 1 nanometrin resoluutioon. ([Balzarotti ja muut 2017](#); [Gwosch ja muut 2020](#)). SMLM-tekniikoista yleisimmät ovat valoaktivoitu lokalisaatiomikroskopia (engl. Photoactivated Localization Microscopy, PALM) ja stokastisoptinen lokalisaatiomikroskopia (engl. Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM). ([Betzig ja muut 2006](#); [Rust ja muut 2006](#)).

PALM:ssa näyte on leimattu valoaktivoituvalla yhdisteellä. PALM:n toiminta perustuu satunnaisten kohdeleimojen jatkuvaan, mutta lyhyeen aktivaatioon. Esimerkiksi fluoroforit voidaan aktivoida aallonpituudella 405 nm, jolloin leimojen fluoroforit aktivoituvat, jonka jälkeen leimat virittyvät 561 nm laserilla ja leimat emittoivat valoa 580–590 nm aallonpituudella, jota kuvataan, kunnes fluoroforit ovat himmenneet. Kuvauksen jälkeen aktivaatio ja emission kuvaus toistetaan, kunnes koko rakenne on kuvattu tai leimat ovat palaneet loppuun, eikä niitä enää voi uudelleenaktivoida. Lopuksi saadut kuvat yhdistetään, mistä nähdään kaikki emittoivat leimat ja tutkittavan kohteen pintarakenne 10 nm:n resoluutiolla. ([Betzig ja muut 2006](#).)

STORM:ssa vältetään fluoroforien tuhoutuminen toisin kuin PALM:ssa. STORM:ssa kaksi erilaista fluoroforia on kiinnitettyä toisiinsa. Rustin ja muiden tutkimuksessa käytettiin syaniini-nimistä Cy5-fluoroforia, joka voidaan kytkeä fluoresoivan ja sammuneen muodon välillä reversiibelisti eri valon aallonpituuksilla. Tutkimuksessa punainen laser sai aikaan Cy5-fluoroforin emittoimaan valoa ja sammutti sen. Vihreä laser puolestaan käänsi sammuneen muodon takaisin fluoresoivaksi. Säätämällä millä etäisyydellä toinen Cy3-fluorofori on kiinni Cy5:ssä, vaikutetaan siihen, kuinka nopeasti Cy5 palautuu. Fluoroforin välitön sammuminen suojaa sitä valkaisuefektiltä, jossa valo vahingoittaa fluoroforia. Fluoroforin sammuminen suojaa siten kromoforia, ja fluorofori voidaan kytkeä päälle useita satoja kertoja. Kaikkien tähän mennessä mainittujen SRM-tekniikoiden kyky saavuttaa superresoluutio perustuu selektiiviseen fluoroforien sammuttamiseen ja aktivoimiseen. Tällä STORM-metodilla Rust ja muut saavuttivat 20 nm:n resoluution ja data osoittaa mahdollisuuden parantaa resoluutiota entisestään. (Rust ja muut 2006.) Modernimmassa suorassa stokastisoptinen lokalisaatiomikroskopia (engl. Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) dSTORM:ssa käytetään

vilkkuvia fluoroforeja, yhdessä fluoroforien elinikää ja toimintaa parantavan puskuriliuoksen kanssa. Puskuriliuos tasaa kaasu-nestefaasin taitekerrointa ja vähentää reagoivan hapen määrää liuoksessa, hapen sitoutuessa glukoosiin. ([Goossen-Schmidt ja muut 2020](#); [Heilemann ja muut 2008](#).)

SMLM-tekniikoiden huonona puolena on niiden vaativuus ja pitkä kuvausaika. PALM ja STORM-tekniikat vaativat erikoisleimoja, jotka voidaan sammuttaa ja pistää päälle. Kuvausaika on pitkä, sillä kuvan saamiseen kuluu aikaa 0,5–1 sekuntia ja kuvia pitää ottaa tuhansia, jotta koko näytteen rakenne on kuvattu. Pitkällä kuvausajalla mahdollisuus vahingoittaa fluoroforia kasvaa, mikä puolestaan alentaa maksimaalista spatiaalista resoluutiota. PALM-tekniikka soveltuu erityisesti eläville soluille proteiinileimoja käyttäessä, kun taas STORM sopii paremmin kuolleiden näytteiden kuvaamiseen vilkkuvien fluoroforien vuoksi. Vilkkuvien fluoroforien käyttö vaatii erikoisliuoksia, jotka suojaavat fluoroforeja vaurioitumiselta sekä ylläpitävät vilkkumista mahdollistavaa reaktiota. Lyhyemmät laserpulssit sopivat kuitenkin yleisesti paremmin elävien solujen tarkasteluun verrattuna STED-tekniikkaan. ([Wäldchen ja muut 2015](#).)

3. Leimateknologiat ja fluoroforit

Fluoroforit ovat kemiallisia yhdisteitä tai proteiineja, jotka kykenevät emittoimaan valoa virittyessään yhdisteelle ominaisen valon aallonpituuden vaikutuksesta. Organiset fluoroforit ovat yleensä pieniä, noin 20–80 atomin kokoisia, molekyyliä. Fluoroforeina toimivat proteiinit ovat useiden satojen kilodaltonien painoisia molekyyliä, jotka ovat suuria verrattuna pieniin emittoiviin yhdisteisiin, kuten pienikokoiseen orgaaniseen luminoli yhdisteeseen. Fluoroforin elektronien virittäytyminen saa elektronit virittymään korkeammalle energiatasolle. Korkean energiatason ollessa epävakaa elektroni hyppää takaisin alemmalle energiatasolle vapauttaen ylimääräisen energian valokvanttina, joka havaitaan valona (kuva 4c). Fluoroforit ovat rakenteeltaan aromaattisia ja sisältävät useita pii-sidoksia, mikä mahdollistaa elektronien delokalisaation. Fluoroforeja on alkujaan löydetty luonnosta vihreänä fluoresoivan proteiinin GFP:n muodossa, joka eristettiin *Aequorea victoria* -meduusasta. GFP:n löytymisen jälkeen on löydetty ja kehitetty useita fluoresoivia proteiineja. Fluoroforit yleensä kiinnitetään tutkittavaan kohdeproteiiniin eri tavoin (kuva 5).

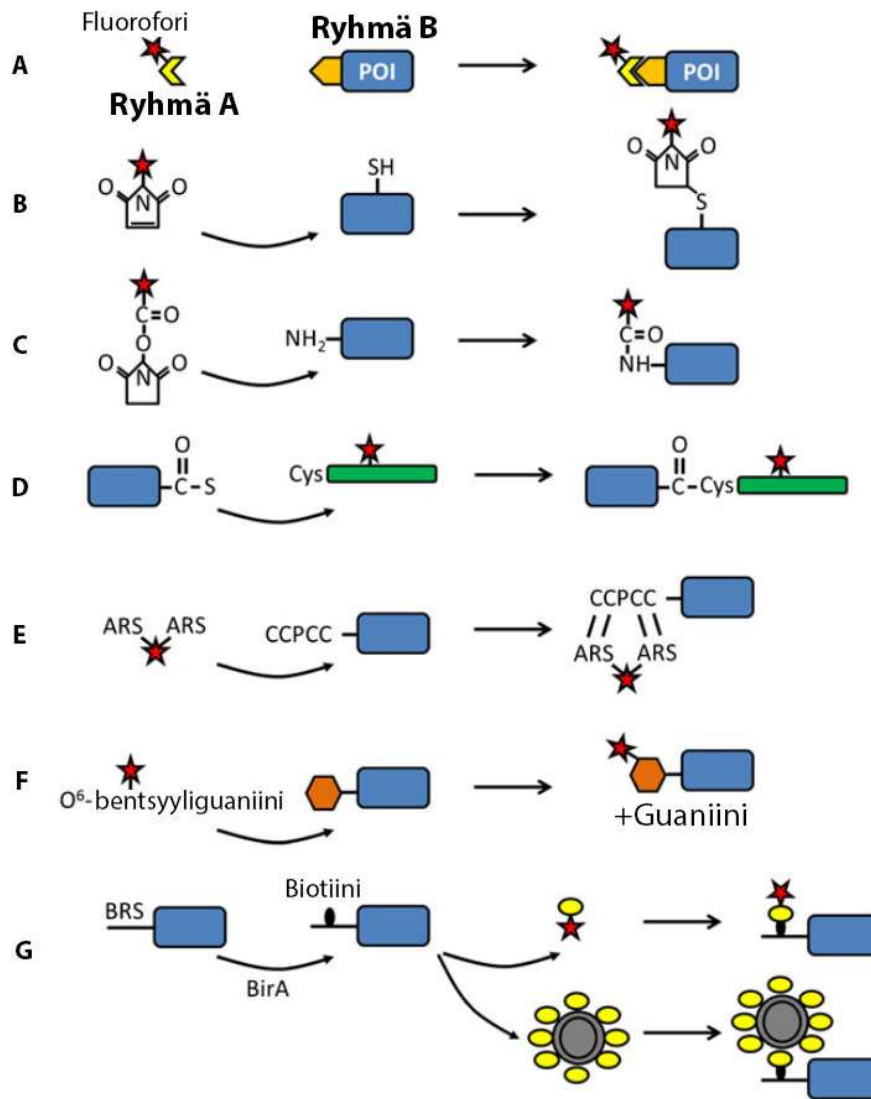
Fluoroforit himmenevät ja vahingoittuvat intensiivisessä valossa johtuen valkaisu-efektistä (engl. Photobleaching). Fluoroforin himmeneminen tarkoittaa, että fluoroforin kyky emittoida valoa on heikentynyt. Fluorofori vahingoittuu kohdatessaan liian energettisiä fotoneita, jolloin virittymisen purkautuminen saattaa kohdistaa energian epäspesifisesti yhdisteen omiin sidoksiin, mistä puhutaan fotodissosiaatiosta. Fluoroforin rakennemuutos johtaa emission heikentymiseen ja sen loppumiseen. ([Zhang ja muut 2020](#)). Fluoroforien vääränlainen virityksen purkautuminen voi johtaa myös happiradikaalien muodostumiseen, mitkä vahingoittavat fluoroforia ja solua. ([Wäldchen ja muut 2015](#)).

Fluoroforeilla on määritelty suureita, joilla niiden ominaisuuksia vertaillaan toisiinsa ja eri käyttökohteita varten ([Ruhlandt ja muut 2020](#)). Näitä ominaisuuksia ovat kvanttisaanto, virityskerroin, aktivaatiospektri ja emissiospektri. Kvanttisaanto (engl. Quantum yield) on suhdeluku emittoituneiden ja absorboituneiden fotonien välillä. Kvanttisaanto 1,0 tarkoittaa sitä, että jokaista absorboitua fotonia kohden yksi fotoni emittoituu. Virityskerroin (engl. Extinction coefficient) on kerroin, joka kuvastaa yhdisteen kykyä absorboida yhdisteelle ominaista valon aallonpituutta. Fluoresenssin aktivaatiospektri on valon aallonpituus, jolla fluorofori viritetään. Fluoroforin emissiospektri on valon aallonpituus, jota fluorofori emittoi. ([Bittel ja muut 2016](#).)

3.1. Fluoresoivat proteiinit

Fluoresoivat proteiinit (engl. *Fluorescent proteins*, FP) ovat laaja luokka proteiiniperäisiä fluoroforeja, joista erityisesti GFP-johdannaisilla fluoroforeilla on voimakkaasti konservoitunut β -tynnyrirakenne. ([Baumann ja muut 2008](#)). FP:a käytetään muun muassa bakteeritransformaation onnistumisen varmistamisessa. ([Deutch 2019](#)). Biokuvantamisessa fluoresoiva proteiini voidaan tuottaa solussa suoraan tutkittavaa proteiinia koodaavaan geeniin niin sanottuna fuusioproteiinina. Fuusioproteiinin tuottaminen solussa mahdollistaa äärimmäisen tarkan kohdeproteiinin seurannan sillä alueella ainoat emittoivat yhdisteet ovat tutkittavia kohteita. Ongelmana fluoresoivissa fuusioproteiineissa on niiden vähäinen kirkkaus ja heikko fotostabiilius, joka haittaa fuusioproteiinien käyttöä biologisessa tutkimuksessa erityisesti SRM-tekniikoiden parissa. ([Jeong ja muut 2021](#).)

Yleisin ja tunnetuin FP on GFP. Fluoresoivien proteiinin geneettisen sekvenssin selvittäminen on mahdollistanut paranneltujen sekä uusien versioiden kehittämisen. Aiheuttamalla satunnainen tai kohdennettu pistemutaatio GFP:tä koodaavaan geeniin, on saatu aikaan erilaisia GFP mutantteja, joista monet ovat olleet toimimattomia ja osalle on puolestaan ilmennyt uusia haluttuja ominaisuuksia. Myös monista muista GFP:n kaltaisista FP:sta pyritään kehittämään uudenlaisia versioita. FP:a on kehitetty monille eri aallonpituuksille. Valoaktivoituvat FP:t voidaan jakaa ryhmiin, irreversiibelisti ja reversiibelisti fotoaktiiviset. Irreversiibelisti ja reversiibelisti fotoaktiivisen FP:n aktivointi laserilla saattaa FP:n pimeään tilaan (engl. dark state), jossa FP ei absorboi valoa eikä siten kykene emittoimaan valoa. Irreversiibelisti fotoaktiiviset FP:t siirtyvät pysyvästi pimeään tilaan, kun taas reversiibelisti fotoaktiiviset voidaan kytkeä päälle ja pois päältä. Kolmantena ryhmänä on valomuuntuvat fluoroforit, jotka puolestaan kykenevät emittoimaan täysin eri aallonpituutta aktivoiduttuaan. ([Zhou ja Lin 2013.](#)) Reversiibelisti fotoaktiiviset FP:t soveltuvat SMLM-tekniikoihin kuten PALM ja STORM, niiden fluoresoivan ja ei-fluoresoivan konformaation vaihto-ominaisuuden vuoksi. ([Jeong ja muut 2021](#)).



Kuva 5. Erilaiset proteiinin leimaustyyppit. A) Ryhmän A ja fluoresoivan yhdisteen liittäminen tutkittavaan proteiiniin ryhmään B, komplementaarisen reaktion avulla. B) Maleidimi-konjugoidun fluoroforin reaktio tutkittavan proteiinin kysteiinisivuketjun kanssa. C) Sukkinimidyyliesteri-konjugoidun fluoroforin reaktio tutkittavan proteiinin sivuketjun amiinin kanssa. D) Peptidiligaatio tioesterin muodostaman rikkisillan kautta tutkittavaan fluoresoivaan proteiiniin. E) Itsestään sitoutuva tetrakysteiinileima sitoutuu bis-ARSeeni fluoreseiiniin F) Leimatun O⁶-bentsyyliguaaniinin katkaisu proteiiniin sidotulla SNAP-tag:lla. Reaktio sitoo jäljelle jääneen leimatun O⁶-bentsyylin proteiiniin konjugoituen sen SNAP-tag:iin kovalenttisesti. G) Tutkittavan proteiinin biotynointi biotiinia tunnistavan sekvenssin, biotiinin ja biotiini-ligaasi BirA:n reaktiossa. streptavidini-fluorofori konjugoituu tutkittavaan proteiinin biotiiniin tai kvanttipisteeseen. Muokattu kuvasta ([Toseland 2013](#)).

3.2. Orgaaniset fluoresoivat leimat

Orgaaniset fluoresoivat leimat ovat aromaattisia ja usein monimutkaisesti konjugoituneita yhdisteitä. Orgaanisten fluoresoivien leimojen etu on niiden pieni koko, fotostabiilius, kirkkaus ja monimuotoiset molekyyliarakenteet. Fluoresoivilla leimoilla on paljon käyttökohteita, muun muassa membraanileimat, DNA-leimat, proteiinileimat

(kuva 6) ja sensorileimoja, kuten pH-leimat, ionileimat ja biologisiin tapahtumiin reagoivia leimoja. Yhdisteiden pieni kokoluokka mahdollistaa myös solurakenteisiin ujuttautumisen. Solukalvolle kiinnitettävät leimat muistuttavat rakenteeltaan fosfolipidejä ja hyödyntävät lipidikalvon hydrofobisia voimia sitoutuessaan kalvostolle. DNA-leimat kuten DAPI (4',6-diamidiino-2-fenyyli-indoli) sitoutuvat pitkittäin DNA-juosteiden adeniini-tymiini emästen motiivin viereen, DNA:n pienten välien (engl. Minor groove) väliin. ([Lakowicz 2006.](#))

Fluoresoivat sensorileimat ovat erikoisleimoja, joiden fluoresenssiaktiivisuus liittyy biologiseen tapahtumaan tai muuttujaan kuten pH, ionipotentiaalin, kalsiumin muutokseen tai proteaasi-aktiivisuuteen. Proteiini-proteiini interaktioissa, kuten entsyymien ja substraatin reaktion tutkimisessa, molemmat entsyymi sekä substraatti voidaan leimata fluoresoivilla leimoilla. Entsyymien ja substraatin leimat tulee olla erilaiset siten että, toisen proteiinileiman emissiospektri on toisen proteiinileiman aktivaatiospektrillä. Kun proteiinit ovat tarpeeksi lähellä toisiaan Försterin resonanssienergiansiirto (FRET) siirtää viritetyn fluoroforin energian lähelle olevalle toiselle fluoroforille ja emittoituu toisen fluoroforin emissioaallonpituudella, jos toinen fluorofori on kaukana, energia emittoituu normaalisti fluoresenssina. FRET mekanismia käytetään proteiinikompleksien muodostumisen ja aineenvaihduntareaktioiden tutkimisessa. ([Geddes ja Lakowicz 2005.](#))

Leimamolekyylejä voidaan konjugoida vasta-aineisiin, jolloin saadaan vasta-aineleimoiksi kutsuttuja proteiinileimoja (kuva 5b, 5c, 5d). Vasta-aineleima tarttuu kyseiselle vasta-aineelle spesifiseen proteiiniin, jolloin kyseinen proteiini leimaantuu. Vasta-aineleimoilla voidaan leimata solun ulkoisia rakenteita kuten reseptoreja tai pintaproteiineja. Vasta-aineleimojen käytössä on ongelmana, kuinka leimamolekyylillä kiinnitetään vasta-aineen proteiinirakenteeseen ja onko leima kiinnitetty haluttuun paikkaan. Vasta-aineet leimataan käyttämällä vasta-aineen aminohapposivuketjujen funktionaalisia ryhmiä linkkinä kiinnitettävälle leimamolekyylille. Vasta-aineen amino- ja karboksyyli-pää voidaan leimata käyttämällä kondensaatioreaktiota, jossa vesimolekyylillä lohkeaa irti. Aminohappojen sivuketjujen kondensaatioreaktiossa fluoresoiva leimamolekyylillä ja aminohappo muodostaa kovalenttisen sidoksen. Fluoresoiva leima voidaan liittää myös lysiinin sivuketjun aminopäähän ja glutamiinihapon tai aspartaattihapon sivuketjun karboksyyli-päähän (kuva 5c). Kysteiiniin rikkivetyyn

leimattaessa aminohapon rikkisillat hapetetaan leimauksen mahdollistamiseksi, mutta rikkisiltojen pelkistyminen voi muuttaa proteiinin kuten vasta-aineen tertiäaristä rakennetta (kuva 5b, 5d). Rikkivetyjen välillä tapahtuu hapetusreaktio, jossa rikkiatomit reagoivat keskenään muodostaen kovalenttisen sidoksen. Vasta-aineen glykosyloitujen sivuketjujen karbonyylipäiden ketoni ja aldehydit (-CHO, -C=O) voidaan hapettaa ja leimata fluoroforilla. ([Berg ja Fishman 2020.](#))

3.3. Metalliligandileimat

Metalliligandit ovat metalleja hyödyntäviä fluoroforeja, jotka kykenevät fluoresenssin lisäksi myös fosforensiin. Fosforensi on luminesenssin kaltaista pitkäaikaista emissiota, joka jatkuu aktivoivan aallonpituuden loputtua jopa päivien ajan, kun taas fluoresenssi kestää suunnilleen noin nanosekuntien ajan. Metalliligandien etuna on niiden pitkä emissioaika sekä suurempi ero absorptioon ja emission välillä. Metalliligandileimojen suuren Stokesin siirtymän ja pitkän fosforensiajan vuoksi leimat on helppo erottaa taustan emissiosta, mikä parantaa biokuvantamisen resoluutiota. Stokesin siirtymä on fluoroforin emissio- ja viritusaallonpituuksien välinen ero. Lantanoidikelaattileimat kuuluvat metalliligandileimoihin ja käyttävät metallina lantanoideja, kuten dysprosiumia, europiumia, samariumia ja terbiumia. Metalliligandileimat käyttävät puolestaan useimmiten sinkkiä tai nikkeliä. ([Du ja muut 2017.](#)) Lantanoidikelaatit soveltuvat immunomäärityksiin koska ne emittoivat valoa voimakkaasti ja pitkään ([Kokko ja muut 2007.](#)).

3.4. Kvanttipisteet

Kvanttipisteet ovat puolijohteisia nanokristalleja, joiden kokoa muokkaamalla vaikutetaan kvanttipisteen elektronien käyttäytymiseen ([Murray ja muut 1992.](#)). Kvanttipisteet löydettiin alun perin 1981 tutkimuksessa kuparikristallien kasvatuksesta ja niiden vaikutuksesta lasin väriin; tämän jälkeen kvanttipisteitä on tutkittu enemmän ja niiden löytymisestä myönnettiin Nobelin palkinto 2023 ([Ekimov ja Onushcheko 1981, Nobel 2023.](#)). Muutamien tuhannen atomin koon vuoksi valo käyttäytyy kvanttipisteen sisällä kvanttimekaniikan erikoisia sääntöjä noudattaen, missä partikkelin kokoluokka muuttaa ominaisuuksia. Suuret 8 nanometrin kokoiset kvanttipisteet emittoivat punaista valoa, kun taas pienet 1 nanometrin kokoiset kvanttipisteet sinistä valoa. ([Murray ja muut 1992.](#))

Kvanttipisteiden käyttöä biologisessa tutkimuksessa on hidastanut kvanttipisteillä yleisesti käytettyjen raskasmetallien myrkyllisyys. ([Wang ja muut 2015](#)). Raskasmetallittomat hiilipohjaiset kvanttipisteet ovat osoittautuneet mahdollisiksi korvaajiksi raskasmetallisille kvanttipisteille niiden erinomaisen bioyhteensopivuuden vuoksi. ([Tian ja muut 2020](#)). Hiili- ja grafeenipohjaisten kvanttipisteiden on myös osoitettu olevan kirkkaampia kuin DAPI-leimamolekyylillä sekä kvanttipisteitä on mahdollista muokata emittoimaan eri aallonpituuksia, soveltuen siten erityisen hyvin fluoresenssimikroskopiaan. ([Choppadandi ja muut 2021](#).) SRM-tekniikoissa vilkkuvien kvanttipisteiden stabiilius, kapea emissiospektri, pitkäikäinen emissio ja erinomainen kirkkaus tuo merkittävän hyödyn kvanttipisteen detektointiin taustasignaalista jopa 10-kertaisella erolla. ([Urban ja muut 2021](#)).

4. Biologisten tapahtumien tutkiminen

4.1. Solutason tapahtumat

SRM:n tekniikat auttavat selvittämään solujen, soluelinten, proteiini- ja lipidirakenteiden sijaintia, toimintaa sekä aineenvaihdunnallisia reaktioita 20–100 nanometrin kokoluokassa. ([Betzig ja muut 2006](#); [Heine ja muut 2017](#); [Rust ja muut 2006](#)). SRM-tekniikoita hyödyntämällä on saatu selvitettyä esimerkiksi soluliikkeitään vaikuttavia tekijöitä, kuten että on mahdollista poiketa tyypillisestä proteiinin kuljetusreitistä endoplasmakalvostolta mitokondrion ulkokalvostolle. Tutkimalla ihmisen sytomegaloviruksen viraalia mitokondriolokalisoituneita apoptoosi-inhibiittoreita (engl. viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis) on saatu selville, että signaaliankkuroidut mitokondriolinkitettyt membraaniproteiinit (engl. mitochondria-associated membranes, MAM) voivat käyttää hydrofobisia vuorovaikutuksia ohittaakseen tyypillisenä pidetyn endoplasmakalvosto-mitokondrioreitin kulkeutuessaan endoplasmakalvostolta mitokondrion ulkokalvostolle. ([Salka ja muut 2017](#).)

STED-tekniikkaa käyttämällä on saatu selvitettyä endoplasmakalvoston rakennetta erotuskyvyllä, joka ei ole ollut mahdollista konfokaalimikroskopian diffraktiorajan vuoksi. ([J. Li ja muut 2022](#)) Selvitettiin HeLa-solujen endoplasmakalvoston rakenteita, joiden muutokset uskotaan olevan syynä moniin sairauksiin. Tutkimuksen leimamolekyylinä käytettiin hiilipohjaista kvanttipistettä, joka syntesoiitiin fenyylialaniinin ja o-

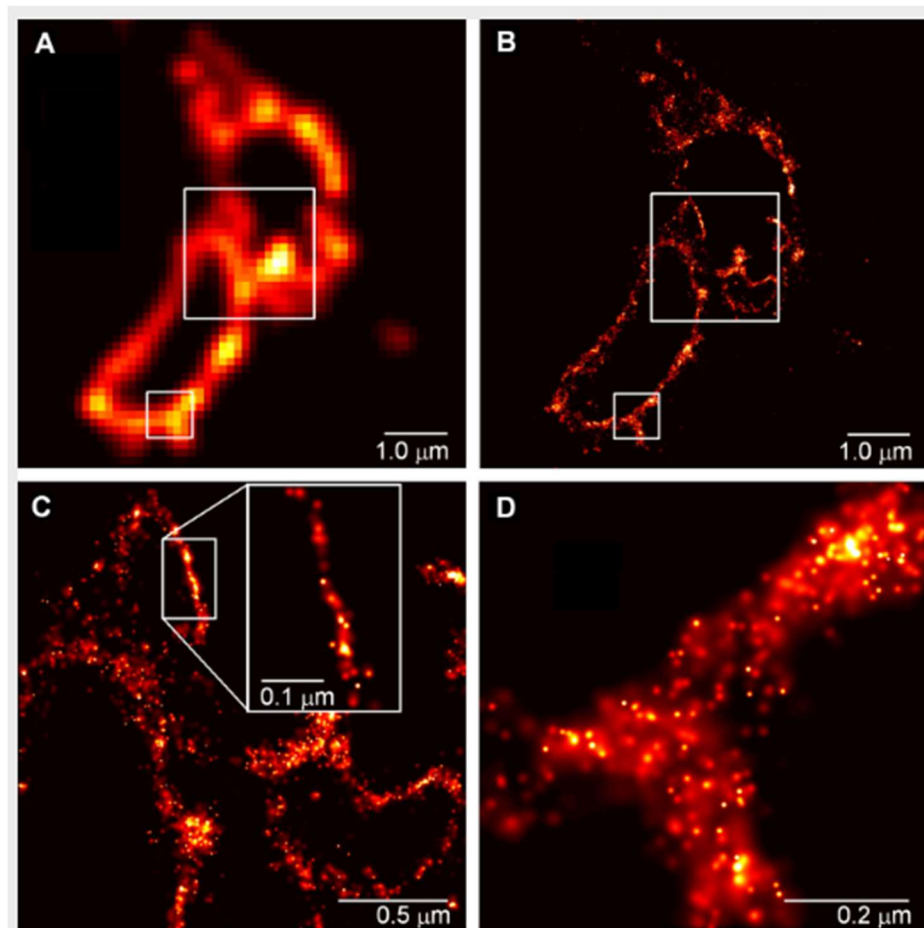
fenyyleenidiamiinin reaktiossa. Hiilipisteet osoittivat alhaista sytotoksisuutta HeLa-soluissa ja kulkeutuivat solun sisälle endoplasmakalvostolle nopeasti. HeLa-solujen DNA leimattiin kaupallisella leimalla, mikä auttoi näkemään kromosomien kulkeutumisen solunjakautumisessa, samalla kun endoplasmakalvoston morfologia muuttui tumakalvon pilkkoutumisen myötä. Konfokaalimikroskopialla nähtiin endoplasmakalvoston muodostavan levymäisiä ja putkimaisia rakenteita, kun taas STED:llä nähtiin Endoplasmakalvoston muodostavan tiheitä putkimaisia rykelmiä ja kalvon huokosia. Tutkimuksessa syntesoitujen hiilipisteiden stabiilius ja kirkkaus osoittautui hyödylliseksi myös endoplasmakalvoston kolmiulotteisen rakenteen selvittämisessä, sillä normaalisti STED-laser vahingoittaa heikommin stabiileja fluoroforeja. Hiilipisteiden ollessa erittäin stabiileja, STED-tekniikalla voitiin kuvata kerroksittain endoplasmakalvoston rakenne, mikä avaa paljon mahdollisuuksia endoplasmakalvoston biologisten tapahtumien tutkimisen. ([J. Li ja muut 2022.](#))

SMLM-tekniikoita PALM ja dSTORM käyttämällä on saatu selvitettyä *Mycoplasma mycoides* alalaji *capri* -bakteerin ATPaasin sijainteja solussa. Perinteisellä fluoresenssimikroskoopeilla ei ole pystytty selvittämään mykoplasman toimintaa tarkasti bakteerin pienen koon vuoksi ja fluoresenssimikroskoopin diffraktiorajan takia. Leimaamalla Mykoplasman ATPaasin β -alaysikön ja mEos-fluoroforin fuusioproteiiniksi, saadaan fluoresenssisignaalia ATPaasin β -alaysikön sijainneista. Diffraktiorajoitetulla mikroskoopilla bakteereista ei saatu erityistä tietoa, sillä bakteerin koko on itsessään samaa kokoluokkaa kuin fluoresenssimikroskoopin maksimaalinen erotuskyky. ([Razin 1996](#); [Abbe 1876](#); [Rideau ja muut 2022.](#)) PALM-tekniikalla ATPaasin sijainnit paikallistettiin sytoplasman ulkoreunamille keskimäärin 41 nm tarkkuudella. dSTORM:lla on selvitetty solun pinnan immunoglobuliini-spesifisten proteaasien sijainteja. PALM menetelmällä kerättiin dataa proteiiniekspressiosta, josta nähtiin kuinka solujen kolmen eri plasmidin ekspressio vaihteli. Fluoresoivan fuusioproteiinin yliekspressiosta voitiin päätellä solujen koko, joista saatiin tiedot solujen koon normaalijakaumasta 107–1490 nm välillä, keskiarvon ollessa 754 nm. ([Rideau ja muut 2022.](#))

SRM tekniikoiden haittapuolena on niiden käyttämän valon aiheuttama vahinko eli fototoksisuus tutkimuskohteessa, erityisesti elävien kohteiden seurannassa. Valon vahingoittavuus kasvaa fotonien energieettisyyden kasvaessa ja aallonpituuden pienenemisen myötä. ([Wäldchen ja muut 2015.](#)) Valon vahingoittavat vaikutukset on

usein jätetty huomiotta tutkimuksissa, vaikka valon aiheuttama stressi saattaa muuttaa eliön käyttämiä metaboliareittejä ja siten johtaa tutkimusta harhaan. ([Zhang ja muut 2020](#)). Fototoksisuus perustuu happiradikaalien (engl. Reactive Oxygen Species) tuotantoon, jotka rikkovat solujen hapetus-pelkistysreaktiotiet, vahingoittaa DNA:ta ja lipideitä.

Betzig ja muut (2006) tekemässä tutkimuksessa käytettiin valoaktivoituvaa vihreänä fluoresoivaa proteiinia, PA-GFP:ta. Tutkimuksessa kuvattiin transfektoitujen COS-7-solujen lysosomeja tuottamalla soluissa transmembraanisia lysosomisia proteiineja CD63, joihin oli kiinnitettyinä ftoniaktivoituva kaede-fluorofori. Lysosomaalisen membraanin leimauksen onnistuminen varmistettiin samankaltaisella leimaustekniikalla, jonka tiedetään sitoutuvan lysosomiin. Totaalisen sisäisen heijastuman fluoresenssimikroskopiaa (engl. Total internal reflection fluorescence microscope, TIRF), verrattiin PALM-tekniikkaan. TIRF-tekniikalla havaittiin vain lysosomaalisen membraanin yleinen kalvon rakenne, mutta PALM-tekniikalla havaittiin pienempiä sivumembraaneja. Betzig ja muut (2006) olettivat pienempien sivumembraanien olevan lysosomin kanssakäymisissä olevia toisia lysosomeja tai myöhäisiä endosomeja. Tutkimuksessa selvitettiin myös dEosFP-leimattuja sytokromi-C oksidaaseja, mitkä ovat mitokondrion transmembraanisia elektronisiirtoketjun proteiineja. PALM-tekniikalla selvitettyt sytokromin-C oksidaasien sijainnit esitettiin läpäisyelektronimikroskoopilla saadun mitokondriokuvan päälle, mistä nähtiin yli 5500 molekyylin sijainnit mitokondrion pinnalla. Proteiinien sijainnin selvittäminen tällä tarkkuudella ei olisi ollut mahdollista perinteisellä fluoresenssimikroskopiolla (kuva 6). ([Betzig ja muut 2006.](#))



kuva 6 TIRF:lla ja PALM:lla kuvattujen COS-7 solujen lysosomaaliselle kalvolle ekspressoituvat Kaedeleimatut transmembraaniproteiinit CD63:t. A) TIRF:lla kuvattu lysosomi. B) PALM:lla kuvattu TIRF:iä vastaava alue. C) kuvan B suurempi neliö suurennettuna. Kuvasta erotetaan CD63 esiintyvän noin 10 nm etäisyydellä toisistaan, mitä TIRF mikroskoopilla ei eroteta. D) Kuvan B pienempi neliö. Kuvasta erotetaan selvästi CD63 proteiinien sijainnit membraanilla. ([Betzig ja muut 2006.](#))

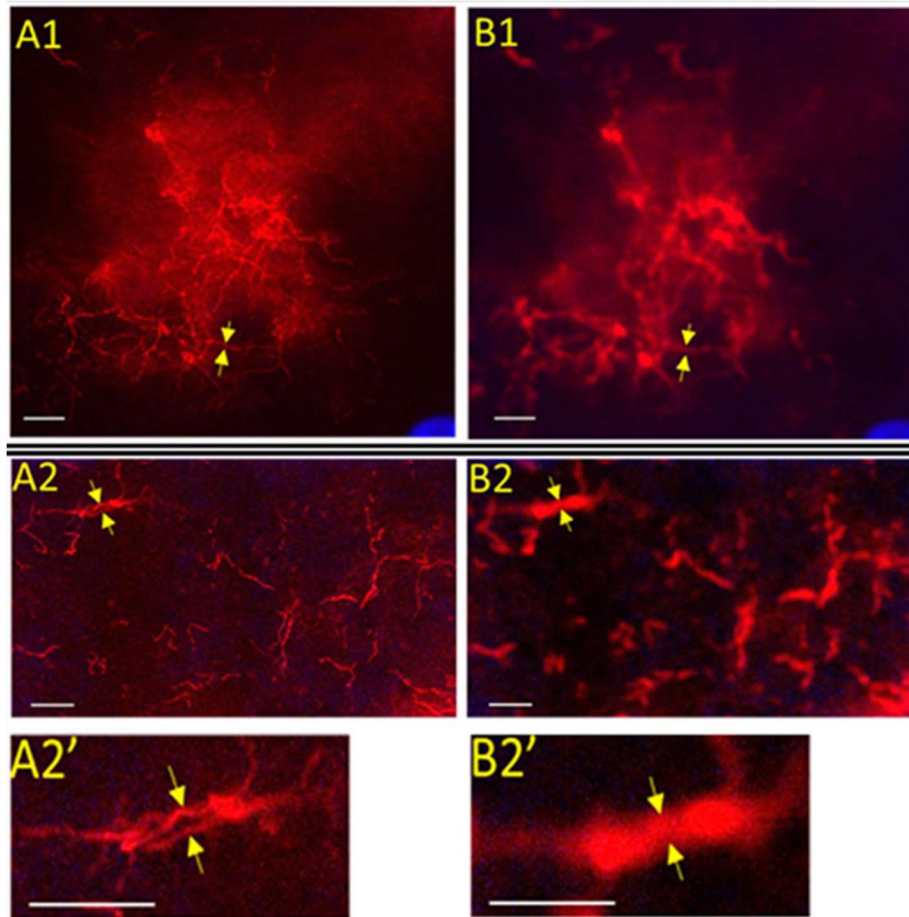
4.2. Superresoluution hyödyntäminen lääkekehityksessä

Lääkekehityksessä SRM-tekniikoita käytetään esimerkiksi kehittämään lääkkeitä neurodegeneratiivisiin sairauksiin, kuten Alzheimerin, Parkinsonin ja Huntingtonin taudin hoitamiseksi. SRM-tekniikoita käytetään myös selvittämään mahdollisten antimikrobiaalisten peptidien käyttöä lääkkeinä tuberkuloosia vastaan. SRM:n käyttö lääkkeiden kehityksessä perustuu sairauden toiminnan selvittämiseen sekä lääkeaineiden vaikutusten tarkkailuun.

Dementia on aivoja tuhoava sairaus, mistä Alzheimerin tauti on yleisin ikäihmisillä esiintyvä demencian muoto. Alzheimerin tautia aiheuttaa hermosolujen ulkopuolelle kertyvät beeta-amyloidiplakit ja Tau proteiinin hyperfosforyloituneen muodon lisääntyminen solun sisällä. Beeta-amyloidiplakit ja Taun hyperfosforyloitunut

patogeeninen muoto vaikeuttaa hermosolun normaalia toimintaa ja ajan kanssa vahingoittaa solua. ([Dimou ja muut 2023.](#)) Tau-proteiinin tehtävä terveessä fysiologiassa on sitoutua tubuliinin heterodimeerien väliseen hydrofobiseen taskuun ja tukea mikrotubuluksen suoraa konformaatiota vaikuttaen siten solun morfologiaan. ([Kadavath ja muut 2015](#)). β -amyloidiplakit muodostuvat väärin proteolysoituneesta β -amyloidi esiasteesta (engl. Amyloid- β Precursor Protein, APP).

Tutkimuksessa Johansson ja muut (2023) selvittivät STED:llä rekombinantti ihmisvasta-aineeseen kiinnitetyllä orgaanisella fluoroforilla, kuinka APP proteolysoituu $A\beta$:ksi 3 \times Tg-AD hiiren aivoissa. Hiirellä oli 3 ihmisen mutanttigeeniä preseniliini-1 (PS1) M146V mutaatiolla, tau P301L mutaatiolla ja APP:tä koodaavan geenin KM670/671NL kaksoismutaatiolla. Fluoroforien aktivointi tapahtui 405, 640 nm lasereilla ja STED 775 nm pulssilaserilla. Johansson ja muut saavuttivat parhaimmillaan 29 nanometrin erotuskyvyn β -amyloidifibrilleille. Konfokaalimikroskoopilla Johansson ja muut eivät erottaneet hienorakenteita 60–70 nm:n kokoluokassa. STED-tekniikka mahdollisti Johansson ja muiden tutkimuksessa jopa päällekkäisten β -amyloidifibrillien erottamisen toisistaan SRM-tekniikoiden suuren spatiaalisen resoluution vuoksi, kun taas konfokaalimikroskopiassa Johansson ja muut kokivat kuvan sameaksi (kuva 7). ([Johansson ja muut 2023.](#))



kuva 7 3xTgAD hiiren aivojen β -amyloidiplakin muodostaman kertymän kuvaaminen STED ja konfokaalimikroskoopilla. A1) STED-tekniikalla kuvattu alue, jossa keltaisilla nuolilla olevaa aluetta tarkastellaan. B1) Konfokaalimikroskoopilla kuvattua kuva A1 vastaava alue. A2) STED-kuvasta huomataan β -amyloidiplakeista koostuvat kaksi juostetta. B2) Konfokaalikuvan β -amyloidiplakin muodostamat juosteet eivät erotu toisistaan. A2') Suurennettu kuva A2:sta, mistä nähdään selvästi β -amyloidiplakista koostuva kaksijuosteinen rakenne. B2') Konfokaalimikroskoopilla kuvatusta β -amyloidiplakin muodostamasta kaksijuosteisesta rakenteesta juosteita ei voida erottaa toisistaan, sillä kuva on diffraktiorajoittunut. Muokattu ([Johansson ja muut 2023.](#))

SRM-tekniikoilla voidaan selvittää myös monia muita biologisia tapahtumia kuten infektiosairauksia. Esimerkiksi hepatiitti B viruksen kulkeutumista solussa, jossa selvitettiin Hepatiitti B:n hyödyntävän takaisinkulkeutuvaa signalointia ([Y.-Y. Li ja muut 2023.](#)), tai syöpäsairauksia kuten ihmisen peräsuolen syöpää. ([Ilgen ja muut 2014.](#)) tutkimuksessa selvitettiin parafiiniin sidotun peräsuolisyövän mitokondrioproteiinien levinneisyyttä kudoksissa diagnostisiin sekä terapeutisiin tarkoituksiin. Superresoluution hyödynnettiin jopa 17-vuotta vanhoihin säilöttyihin näytteisiin ja osoittautui toimivaksi tavaksi uudistaa kuvamateriaalia korkeammalla erotuskyvyllä. Tutkimuksissa HER2 kasvuhormoni leimattiin erilaisilla leimoilla ja

mikroskooppitekniikoita vertailtiin toisiinsa, SRM-tekniikkana käytettiin STED:ia. Ilgen ja muut saivat selville STED:n olevan hyödyllinen proteiinien lokalisointiin nanoluokassa. Saatujen kuvien laatua rajoitti kudoksenäytteiden kirurgisen leikkausprosessin onnistuneisuus ja kudoksenäytteen eheys, joka ei vastannut tarkasti säädeltyä laboratoriotasoa. ([Ilgen ja muut 2014.](#))

Tutkimuksessa Deshpande ja muut (2020) selvittivät STED-tekniikalla tuberkuloosia aiheuttavan *Mycobacterium tuberculosis*, (MTB) mykobakteerin kasvua inhiboivaa ja antimikrobiaalista peptidiä LL-37. Tutkimuksessa selvitettiin LL-37 peptidin sisäänottoa, sijaintia ja toimintaa MTB:ssä sekä makrofageissa. MTB on solunsisäinen bakteeri, joka käyttää isäntänään ihmisen makrofageja. MTB omaa huonosti yhdistettä läpäisevän soluseinän, joka suojaa bakteeria antimikrobiaalisilta yhdisteiltiltä. MTB:n solukalvon pääkomponentti lipoarabinomannaani (engl. Lipoarabinomannan) on kohde antimikrobiaalisille peptideille kuten LL-37:lle. TAMRA-fluorofori konjugoitiin kiinni LL-37 peptidiin (kuva 5c). Tutkimuksessa selvisi infektoimattomien makrofagien kykenevän ottamaan sisäänsä LL-37-TAMRA varhaisiin endosomeihin, ja niiden lopulta päätyvän lysosomeihin sekä endosomeihin. LL37-TAMRA:n sijainteja selvitettiin sekä konfokaalimikroskoopilla että STED-mikroskoopilla, joista ensimmäisellä saaduista kuvista ei voitu havaita tarkkoja leimatun proteiinin sijaintia, kun taas STED-tekniikalla saatiin selvitettyä peptidin sijainti noin 35 nanometrin tarkkuudella. MTB:n infektoimissa makrofageissa LL-37 esiintyi myös LAMP-1-positiivisissa vesikkeleissä, jonka muoto tutkijoiden mukaan vastasi mykobakteerille omaista sauvamaista muotoa. LL-37-TAMRA:n antimikrobiaalista kykyä selvitettiin infektoimalla makrofageja MTB:llä 72 tunnin ajan ja lyysaamalla solut. Infektoituneista makrofageista eristetyt MTB:t lisättiin 7H11 agarmaljalle kasvamaan, mistä selvitettiin soluja olevan tilastollisesti merkitsevästi vähemmän ($p < 0,05$), kuin soluja, joihin ei ollut lisätty antimikrobiaalista LL-37-TAMRA. Tutkimus osoittaa SRM-tekniikoiden hyödyn lääkekehityksessä erityisesti antimikrobiaalisten peptidien tarkastelussa, mikä on tärkeää lääkeresistenttien tuberkuloosikantojen lisääntyessä. ([Deshpande ja muut 2020.](#))

5. Yhteenveto

Superresoluutio hyödyt biologisessa tutkimuksessa ovat valtavat, mahdollistaen käytännössä rajattoman kohteiden erotuskyvyn muihin ei-SRM kuvantamismenetelmiin

verrattuna. SRM-tekniikoiden kehitys on jatkuvaa ja erotuskyky paranee uusien tekniikoiden myötä. STED-mikroskopian huonona puolena on sen vaatiman laserin voimakkuus, laserin liiallinen valovoima vahingoittaa fluoroforeja sekä itse näytettä aiheuttaen rakenteellista vahinkoa yhdisteissä sekä oksidatiivista stressiä elävissä näytteissä, muuttaen eliön aineenvaihduntaa. STORM ja PALM ovat kehittyneempiä SRM-tekniikoita, jotka hyödyntävät valikoivasti sammutettavia ja päälle kytkettäviä fluoroforeja, josta saadut kuvat yhdistetään yhdeksi kuvaksi, jossa erotuskyky on valtava verrattuna perinteisiin kuvantamismenetelmiin. Fluoroforeja on moniin tarkoituksiin sekä käyttökohteisiin. Kvanttipisteet ovat fluoroforeista teknologisesti kehittyneimpiä ja eksoottisimpia niiden kvanttiluonteen vuoksi. Kvanttipisteet mahdollistavat tarkemman kuvantamisen kirkkautensa ansiosta, mikä nopeuttaa solun rakenteiden kuvantamista. Fluoresoivien proteiinien käyttö mahdollistaa puolestaan helpon tavan selvittää tutkittavan proteiinin sijainteja solussa fuusioimalla fluoresoiva proteiini tutkittavaan proteiiniin, mikä puolestaan auttaa tutkijoita ymmärtämään solun moninaisten rakenteiden käyttäytymistä. Fluoresoivia proteiineja hyödynnetään myös paljon rakennebiologiassa, jossa selvitetään solujen tukirangan muuntautumista solun eri elämän vaiheissa.

SRM-tekniikoiden käyttö lääkekehityksessä on osoittautunut valtavan hyödylliseksi, niiden kyvyn erottaa kymmenenkertaisesti paremmin kuin tavanomaiset mikroskopian menetelmät, SRM:n 20nm:n resoluutioon verrattuna valomikroskopian 200 nm:n resoluutioon. SRM-tekniikoiden huomattavasti parempi erotuskyky tarjoaa mahdollisuuden tarkastella tutkittavia kohteita äärimmäisen lähellä toisiaan, mikä ei ole ollut mahdollista valomikroskopiolla. Biologisten komponenttien tarkastelu 20 nm tarkkuudella mahdollistaa muun muassa proteiini-interaktioiden tutkimisen, kuten lääkeyhdisteiden sitoutumisen ja metabolian tarkkailun elävissä soluissa. Fluoresenssimikroskopian resoluutio ei yllä samaan mittaluokkaan kuin SRM-tekniikoilla, jonka vuoksi fluoresenssimikroskopia ei sovellu yhtä hyvin lääkekehitykseen. Vanhojen näytteiden tarkastelu biopankeista SRM:n suurella erotuskyvyllä mahdollistaa tiedon modernisoinnin ja valtavan mahdollisuuden korkealaatuisen tiedon keräämisen tekoälyjärjestelmille.

Lähteet

- Abbe, E., Lawson, H. & Fripp, H. E. (1876) Proceedings of the Bristol Naturalists' Society: A Contribution to the Theory of the Microscope and the Nature of Microscopic Vision. s. 200–261. Bristol Naturalists' Society, Bristol. <https://play.google.com/store/books/details/Proceedings_of_the_Bristol_Naturalists_Society_Vol?id=TC8UAAAAYAAJ&gl=US> (Luettu 27.12.2023)
- Balzarotti, F., Eilers, Y., Gwoch, 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.
- Baumann, D., Cook, M., Ma, L., Mushegian, A., Sanders, E., Schwartz, J. & Yu, C. R. (2008) A family of GFP-like proteins with different spectral properties in lancelet Branchiostoma floridae. *Biol Direct* **3**:28.
- Berg, E. A. & Fishman, J. B. (2020) Labeling Antibodies. *Cold Spring Harb Protoc* **2020**:099242.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J. & Hess, H. F. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**:1642–1645.
- Bittel, A. M., Nickerson, A., Saldivar, I. S., Dolman, N. J., Nan, X. & Gibbs, S. L. (2016) Methodology for Quantitative Characterization of Fluorophore Photoswitching to Predict Superresolution Microscopy Image Quality. *Sci Rep* **6**:29687.
- Choppadandi, M., Guduru, A. T., Gondaliya, P., Arya, N., Kalia, K., Kumar, H. & Kapusetti, G. (2021) Structural features regulated photoluminescence intensity and cell internalization of carbon and graphene quantum dots for bioimaging. *Mater Sci Eng C* **129**:112366.
- Cho, U., Riordan, D. P., Ciepla, P., Kocherlakota, K. S., Chen, J. K. & Harbury, P. B. (2018) Ultrasensitive optical imaging with lanthanide lumiphores. *Nat Chem Biol* **14**:15–21.
- Deshpande, D., Grieshaber, M., Wondany, F., Gerbl, F., Noschka, R., Michaelis, J. & Stenger, S. (2020) Super-Resolution Microscopy Reveals a Direct Interaction of Intracellular Mycobacterium tuberculosis with the Antimicrobial Peptide LL-37. *Int J Mol Sci* **21**:6741.
- Deutch, C. E. (2019) Transformation of Escherichia coli with the pGLO Plasmid: Going beyond the Kit. *Am Biol Teach* **81**:52–55.
- Dimou, E., Katsinelos, T., Meisl, G., Tuck, B. J., Keeling, S., Smith, A. E., Hidardi, E., Lam, J. Y. L., Burke, M., Lövestam, S., Ranasinghe, R. T., McEwan, W. A. & Klenerman, D. (2023) Super-resolution imaging unveils the self-replication of tau aggregates upon seeding. *Cell Rep* **42**:112725.

- Du, K., Niu, S., Qiao, L., Dou, Y., Zhu, Q., Chen, X. & Zhang, P. (2017) A highly selective ratiometric fluorescent probe for the cascade detection of Zn²⁺ and H₂PO₄⁻ and its application in living cell imaging. *RSC Adv* **7**:40615–40620.
- Ekimov, A. & Onushcheko, A. (1981) Quantum Size Effect in Three-Dimensional Microscopic Semiconductor Crystals. *ZhETF Pis Ma Redaktsiiu* **34**:363.
- Geddes, C. D. & Lakowicz, J. R. (Toim.) (2005) *Advanced Concepts in Fluorescence Sensing: Part B: Macromolecular Sensing*. (Vsk. 10). Boston, MA: Springer US.
- Goossen-Schmidt, N. C., Schnieder, M., Hüve, J. & Klingauf, J. (2020) Switching behaviour of dSTORM dyes in glycerol-containing buffer. *Sci Rep* **10**:13746.
- Gwosch, K. C., Pape, J. K., Balzarotti, F., Hoess, P., Ellenberg, J., Ries, J. & Hell, S. W. (2020) MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. *Nat Methods* **17**:217–224.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P. & Sauer, M. (2008) Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angew Chem Int Ed* **47**:6172–6176.
- Heine, J., Reuss, M., Harke, B., D'Este, E., Sahl, S. J. & Hell, S. W. (2017) Adaptive-illumination STED nanoscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:9797–9802.
- Herbert, S., Soares, H., Zimmer, C. & Henriques, R. (2012) Single-Molecule Localization Super-Resolution Microscopy: Deeper and Faster. *Microsc Microanal* **18**:1–11.
- Ilgen, P., Stoldt, S., Conradi, L.-C., Wurm, C. A., Rüschoff, J., Ghadimi, B. M., Liersch, T. & Jakobs, S. (2014) STED super-resolution microscopy of clinical paraffin-embedded human rectal cancer tissue. *PloS One* **9**:e101563.
- Jeong, S., Widengren, J. & Lee, J.-C. (2021) Fluorescent Probes for STED Optical Nanoscopy. *Nanomater Basel Switz* **12**:21.
- Johansson, B., Oasa, S., Muntsant Soria, A., Tiiman, A., Söderberg, L., Amandius, E., Möller, C., Lannfelt, L., Terenius, L., Giménez-Llort, L. & Vukojević, V. (2023) The interwoven fibril-like structure of amyloid-beta plaques in mouse brain tissue visualized using super-resolution STED microscopy. *Cell Biosci* **13**:142.
- Kadavath, H., Hofele, R. V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E. & Zweckstetter, M. (2015) Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:7501–7506.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. & Hell, S. W. (2000) Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci* **97**:8206–8210.
- Kokko, L., Lövgren, T. & Soukka, T. (2007) Europium(III)-chelates embedded in nanoparticles are protected from interfering compounds present in assay media. *Anal Chim Acta* **585**:17–23.

Lakowicz, J. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy. Principles of Fluorescent Spectroscopy, 3rd Edn* (Vsk. 1).

Li, J., Zhang, L., Chen, J., Zhang, R., Liu, Z., Zhao, J., Liu, B., Han, M-Y., Han, G. & Zhang, Z. (2022) One-step synthesized amphiphilic carbon dots for the super-resolution imaging of endoplasmic reticulum in live cells. *RSC Adv* **12**:19424–19430.

Li, Y.-Y., Kuroki, K., Shimakami, T., Murai, K., Kawaguchi, K., Shirasaki, T., Nio, K., Sugimoto, S., Nishikawa, T., Okada, H., Orita, N., Takayama, H., Wang, Y., Thi Bich, P. D., Ishida, A., Iwabuchi, S., Hashimoto, S., Shimaoka, T., Tabata, N., Watanabe-Takahashi, M., Nishikawa, K., Yanagawa, H., Seiki, M., Matsushima, K., Yamashita, T., Kaneko, S. & Honda, M. (2023) Hepatitis B Virus Utilizes a Retrograde Trafficking Route via the Trans-Golgi Network to Avoid Lysosomal Degradation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **15**:533–558.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. & Martin, K. C. (2016) *Molecular Cell Biology: Light Microscopy: Exploring Cell Structure and Visualising Proteins within Cells*, 8. painos, s. 139–156. Macmillan Learning, New York.

Murray, C., Norris, D. & Bawendi, M. (1992) Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706–8715. *J Am Chem Soc - J AM CHEM SOC* **115**.

Nobel (2014) Surpassing the limitations of the light microscope. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/press-release/>>. (Luettu 24.2.2024)

Nobel (2023) They planted an important seed for nanotechnology. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2023/press-release/>>. (Luettu 25.2.2024)

Qu, X., Wu, D., Mets, L. & Scherer, N. F. (2004) Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:11298–11303.

Razin, S. & Baron, S. (1996) *Medical Microbiology: Mycoplasmas*. 4. painos. Kappale 37. University of Texas, Galveston. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7637/>>. (Luettu 25.2.2024)

Rideau, F., Villa, A., Belzanne, P., Verdier, E., Hosy, E. & Arfi, Y. (2022) Imaging Minimal Bacteria at the Nanoscale: A Reliable and Versatile Process to Perform Single-Molecule Localization Microscopy in Mycoplasmas. *Microbiol Spectr* **10**:e0064522.

Ruhlandt, D., Andresen, M., Jensen, N., Gregor, I., Jakobs, S., Enderlein, J. & Chizhik, A. I. (2020) Absolute quantum yield measurements of fluorescent proteins using a plasmonic nanocavity. *Commun Biol* **3**:1–7.

Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* **3**:793–795.

Salka, K., Bhuvanendran, S., Wilson, K., Bozidis, P., Mehta, M., Rainey, K., Sesaki, H., Patterson, G. H., Jaiswal, J. K. & Colberg-Poley, A. M. (2017) Superresolution Imaging

Identifies That Conventional Trafficking Pathways Are Not Essential for Endoplasmic Reticulum to Outer Mitochondrial Membrane Protein Transport. *Sci Rep* **7**:16.

Tian, X., Zeng, A., Liu, Z., Zheng, C., Wei, Y., Yang, P., Zhang, M., Yang, F. & Xie, F. (2020) Carbon Quantum Dots: In vitro and in vivo Studies on Biocompatibility and Biointeractions for Optical Imaging. *Int J Nanomedicine* **15**:6519–6529.

Toseland, C. P. (2013) Fluorescent labeling and modification of proteins. *J Chem Biol* **6**:85–95.

Träger, F. & Hell, S. (2007) Springer Handbook of Lasers and Optics: Optics far Beyond the Diffraction Limit: Stimulated Emission Depletion Microscopy. s. 1091–1097. Springer, New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-30420-5_16>. (Luettu 28.12.2023)

Urban, J. M., Chiang, W., Hammond, J. W., Cogan, N. M. B., Litzburg, A., Burke, R., Stern, H. A., Nilsson, B. L. & Krauss, T. D. (2021) Quantum Dots for Improved Single-Molecule Localization Microscopy. *J Phys Chem B* **125**:2566–2576.

Wang, H., Liu, Z., Gou, Y., Qin, Y., Xu, Y., Liu, J. & Wu, J.-Z. (2015) Apoptosis and necrosis induced by novel realgar quantum dots in human endometrial cancer cells via endoplasmic reticulum stress signaling pathway. *Int J Nanomedicine* **10**:5505–5512.

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.

Zeiss. The Stimulated Emission Depletion (STED) Concept. <<https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution/stedconcept/indexflash.html>>. (Luettu 28.12.2023)

Zhang, Z.-J., Wang, K.-P., Mo, J.-G., Xiong, L. & Wen, Y. (2020) Photodynamic therapy regulates fate of cancer stem cells through reactive oxygen species. *World J Stem Cells* **12**:562–584.

Zhou, X. X. & Lin, M. Z. (2013) Photoswitchable fluorescent proteins: Ten years of colorful chemistry and exciting applications. *Curr Opin Chem Biol* **17**:682–690.