



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Nanoscopía de fluorescencia con uso eficiente de fotones mediante el escaneo de mínimos de intensidad de luz

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Físicas

LUCIANO ANDRÉS MASULLO

Director de Tesis: Dr. Fernando D. Stefani

Consejera de Estudios: Dra. Andrea V. Bragas

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones en Bionanociencias, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Fecha de defensa: 30 de Agosto de 2021

A papá y mamá, por el amor, por el esfuerzo, por despertar en mí la pasión por el conocimiento, por el apoyo continuo.

Por todo.

Resumen

La microscopía de superresolución, o más exactamente las técnicas de nanoscopía de fluorescencia, han revolucionado la obtención de imágenes basadas en la fluorescencia alcanzando resoluciones en el rango nanométrico, mucho más allá del límite de difracción de la luz. El concepto clave es la conmutación de los fluoróforos entre un estado fluorescente y otro no fluorescente. Esta "conmutación on-off" permite la localización secuencial de un subconjunto de fluoróforos en la muestra con una precisión que supera el límite de difracción. La primera generación de nanoscopía de fluorescencia estaba compuesta por dos familias de técnicas: métodos dirigidos por coordenadas y métodos de localización estocástica. En los métodos dirigidos por coordenadas, como el Stimulated Emission Depletion (STED) o el REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions (RESOLFT), el proceso de desconexión es inducido por la luz y la imagen superresuelta se obtiene mediante el barrido de un campo óptico espacialmente modulado que controla la depleción de los fluoróforos en posiciones predefinidas de la muestra. En cambio, los métodos de localización estocástica, como la microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM) o la microscopía de localización fotoactivada (PALM), utilizan una iluminación uniforme. En este caso, se obtienen imágenes de fluoróforos individuales y bien separados que se encienden y apagan estocásticamente en la muestra. La imagen superresuelta se reconstruye utilizando las posiciones de cada fluoróforo medido, que se obtienen a partir de los ajustes de sus imágenes individuales a la función de dispersión de puntos del microscopio. Estas técnicas están ahora bien establecidas con microscopios comerciales de varias empresas disponibles en el mercado.

Aunque no existe un límite fundamental para la resolución espacial de estos métodos, en la práctica alcanzan entre 20 y 30 nm de resolución lateral debido al limitado número de fotones de fluorescencia detectables, impuesto principalmente por la fotodegradación de los fluoróforos. Naturalmente, es interesante alcanzar resoluciones más altas para acceder a la escala entre 1 y 20 nm. Especialmente interesante sería alcanzar el régimen de sub-

10 nm, ya que ese es el tamaño típico de las proteínas estructurales. Por lo tanto, estos métodos permitirían estudiar las estructuras proteicas supramoleculares con resolución molecular en condiciones biológicamente compatibles.

Por lo tanto, es interesante investigar las vías para conseguir métodos de nanoscopía de fluorescencia más eficientes con respecto a los fotones detectados. Recientemente, la técnica *Maximally INFormative LUminescence eXCitation* (MINFLUX) ha puesto en marcha una nueva generación de métodos de nanoscopía de fluorescencia que combina las ventajas de los métodos dirigidos por coordenadas y métodos de localización estocástica, para extraer la máxima información posicional de una única molécula utilizando un número mínimo de fotones. MINFLUX utiliza campos de excitación que comprenden un mínimo de intensidad para interrogar la posición de moléculas individuales y puede ofrecer de forma rutinaria una precisión de localización de ~ 1 nm. En esta Tesis, se presentan nuevos métodos eficientes en uso de fotones para localizar moléculas individuales con luz estructurada con un mínimo de intensidad.

El Capítulo 1 describe los fundamentos de la microscopía de fluorescencia y la nanoscopía de fluorescencia. Se presentan los principios comunes subyacentes. Se revisan los diferentes tipos de técnicas de nanoscopía, incluidos los desarrollos más recientes, y se resume el estado de la técnica en este campo.

En el Capítulo 2 se presenta el desarrollo de una versión paralelizada de la nanoscopía RESOLFT dirigida por coordenadas. Este microscopio utiliza una combinación de dos patrones de luz de campo amplio: una matriz de mínimos de luz y un patrón de focos múltiples. Este novedoso esquema de iluminación consigue una mayor sensibilidad al mejorar la detección de fotones y el rechazo del fondo, proporcionando la mejor combinación de campo de visión y resolución espacio-temporal reportada en microscopía de células vivas en el momento de escribir esta Tesis: 50 nm resolución lateral y tiempos de adquisición de 1 s para la obtención de imágenes de células enteras.

El Capítulo 3 describe la localización de moléculas fluorescentes individuales mediante una secuencia de exposiciones a patrones de luz estructurada. Se discuten los trabajos anteriores en este campo y se desarrolla y describe un marco matemático común que

utiliza la teoría de la Estimación de Máxima Verosimilitud (MLE). Este marco matemático sirve para comparar diferentes métodos y también facilita el diseño de nuevos esquemas experimentales. Como ejemplo, se proponen dos nuevos métodos de localización que combinan los puntos fuertes de los esquemas existentes.

En el Capítulo 4 se presenta una implementación novedosa y simplificada del concepto de localización MINFLUX. A diferencia de la implementación original, p-MINFLUX utiliza pulsos láser intercalados para suministrar los focos de excitación de forma toroidal a una velocidad de repetición máxima, generando así un barrido efectivo a escala de nanosegundos de los mínimos de luz. Utilizando sistemas modelo de origami de ADN tanto estáticos como dinámicos, demostramos su efectividad para la nanoscopía de localización de moléculas individuales y el *tracking* o seguimiento, respectivamente. La precisión de la localización de 1 – 2 nm se consigue con 2000 – 1000 fotones. Además, p-MINFLUX proporciona acceso al tiempo de vida de la fluorescencia. Hemos aplicado esta información para adquirir señales multiplexadas discernidas por el tiempo de vida y para realizar microscopía de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) con una resolución de 3 – 4 nm (precisión de localización de 1 – 2 nm), que es una resolución al menos un orden de magnitud mejor que la reportada previamente en imágenes de tiempo de vida.

En el Capítulo 5 se describe el desarrollo de un nuevo método de localización de moléculas individuales utilizando mínimos de luz. Al escanear un haz de luz que presenta un mínimo de intensidad (idealmente un cero) sobre una molécula individual fluorescente, la posición del emisor puede estimarse con precisiones equivalentes a MINFLUX o mejores. A diferencia del MINFLUX, que requiere montajes de gran complejidad técnica, este enfoque de escaneo rasterizado del mínimo de excitación puede implementarse directamente en cualquier microscopio de escaneo láser simplemente introduciendo un elemento óptico pasivo, como una placa de fase vortical, para obtener un foco en forma de toroide. Caracterizamos el rendimiento de este nuevo método mediante cálculos teóricos, simulaciones numéricas y experimentos de nanoscopía.

Por último, las conclusiones de esta Tesis y las perspectivas a futuro se desarrollan en el Capítulo 6.

Photon-efficient fluorescence nanoscopy by scanning light intensity minima

Abstract

Super-resolution microscopy, or more accurately fluorescence nanoscopy techniques have revolutionized fluorescence-based imaging reaching resolutions in the nanometer range, well beyond the diffraction limit of light. The key enabling concept is the switching of fluorophores between a fluorescent and a non-fluorescent state. This "on-off switching" enables the sequential localization of a subset of fluorophores on the sample with a precision beyond the diffraction limit. The first generation of fluorescence nanoscopy was composed of two families of techniques: coordinate targeted and coordinate stochastic methods. In coordinate targeted methods, such as Stimulated Emission Depletion (STED) or REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions (RESOLFT), the off-switching process is light-induced and the super-resolved image is obtained by scanning a spatially modulated optical field that controls the off-switching of fluorophores on predefined positions of the sample. In contrast, coordinate stochastic methods such as Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) or Photo-activated localization microscopy (PALM), use uniform illumination. In this case, individual and well-separated fluorophores are imaged as they switch on and off stochastically over the sample. The super-resolved image is reconstructed using the positions of each measured fluorophore, which are obtained from fits of their individual images to the point spread function of the microscope. These techniques are now well established with commercial microscopes available in the market from several companies.

Although there is no fundamental limit to the spatial resolution of these methods, in practice they hardly reach 20 to 30 nm of lateral resolution due to the limited number of detectable fluorescence photons, imposed mainly by the photo-degradation of fluorophores. Naturally, it is of interest to achieve higher resolutions in order to access to

the scale between 1 and 20 nm. Particularly interesting would be to reach the sub-10 nm regime because that is the typical size of structural proteins. Therefore, such methods would enable the study of supramolecular protein structures with molecular resolution under biologically compatible conditions.

It is therefore of interest to investigate routes for more photon-efficient methods of fluorescence nanoscopy. Recently, the technique Maximally INFormative LUminescence eXcitation (MINFLUX) has launched a new generation of fluorescence nanoscopy methods that combines the advantages of coordinate-stochastic and coordinate-targeted methods, to extract maximum positional information of a single molecule using minimal photon counts. MINFLUX uses excitation fields comprising an intensity minimum to interrogate the position of single molecules and can routinely deliver a localization precision of ~ 1 nm. In this Thesis, new photon-efficient methods to localize single molecules with structured light featuring a minimum of intensity are presented.

Chapter 1 describes the fundamentals of fluorescence microscopy and fluorescence nanoscopy. The common underlying principles are presented. The different types of nanoscopy techniques, including the most recent developments, are reviewed and the state of the art of the field is summarized.

In Chapter 2 the development of a parallelized version of the coordinate-targeted RESOLFT nanoscopy is presented. This microscope uses a combination of two widefield light patterns: an array of light minima and a multi-foci pattern. This novel illumination scheme achieves higher sensitivity by enhancing photon collection and background rejection, delivering the best reported combination of field of view and spatiotemporal resolution in live-cell microscopy at the time of writing this thesis: 50 nm lateral resolution and 1 s acquisition times for whole cell imaging.

Chapter 3 describes the localization of single fluorescent molecules by using a sequence of exposures to structured light patterns. Previous work on the field is discussed and a common mathematical framework using Maximum Likelihood Estimation (MLE) theory is developed and described. This mathematical framework serves as a way to benchmark different methods and also facilitates the design of new experimental schemes. As an

example, two new localization methods which combine the strengths of existing schemes are proposed.

A novel and simplified implementation of the MINFLUX localization concept is presented in Chapter 4. In contrast to the original implementation, p-MINFLUX uses interleaved laser pulses to deliver the doughnut-shaped excitation foci at a maximum repetition rate thus generating an effective nanosecond-scale scan of the light minima. Using both static and dynamic DNA origami model systems, we demonstrate its performance for single-molecule localization nanoscopy and tracking, respectively. Localization precision of 1 – 2 nm is achieved with 2000 – 1000 photon counts. In addition, p-MINFLUX provides access to the fluorescence lifetime. We have applied this information to acquire multiplexed signals discerned by lifetime and to perform fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) with 3-4 nm resolution (1-2 nm localization precision), that it is a resolution at least one order of magnitude better than previously reported in lifetime imaging.

In Chapter 5 the development of a new single-molecule localization method using light minima is described. By scanning a beam of light featuring an intensity minimum (ideally a zero) over a single fluorescent molecule, the position of the emitter can be estimated with precisions equivalent to MINFLUX or better. In contrast to MINFLUX, which requires set-ups of high technical complexity, this approach of raster scanning the excitation minimum can be directly implemented in any laser-scanning microscope simply introducing a passive optical element, such as a vortex phase plate, to obtain a doughnut-shaped focus. We characterize the performance of this new method through theoretical calculations, numerical simulations and nanoscopy experiments.

Finally, the conclusions of this Thesis and future perspectives are unfolded in Chapter 6.

Índice de contenidos

COMPLETE ENGLISH VERSION AT THE END OF THE SPANISH VERSION

Resumen	3
Índice de contenidos	9
1. Microscopía de fluorescencia y microscopía de fluorescencia de superresolución (nanoscopia)	12
1.1. La microscopía óptica y el límite de difracción	12
1.2. Fluorescencia	14
1.3. Microscopía de fluorescencia	18
1.4. Microscopía de súper resolución: activación y desactivación de fluoróforos	19
1.5. Nanoscopia de fluorescencia dirigida por coordenadas	21
1.6. Microscopía de localización de moléculas individuales	26
1.7. Microscopía de súper resolución sub-10 nm	31
1.8. Localización de moléculas individuales con iluminación estructurada secuencial	32
1.8.1. Excitación de luminiscencia de máxima información (MINFLUX)	33
1.8.2. Métodos de localización de moléculas individuales de campo amplio basados en cámaras que utilizan iluminación estructurada	37
1.8.3. STED mínimo (MINSTED)	42
1.9. Seguimiento orbital	44
2. Nanoscopia RESOLFT paralelizada en células vivas con mayor sensibilidad y resolución	47
2.1. Concepto y visión general	49
2.2. Proteínas fluorescentes objetivo y configuración óptica	53
2.3. Instrumentación, control y adquisición de datos	57
2.4. Adquisición de datos y reconstrucción de imágenes	58
2.5. Seccionamiento óptico mejorado	60
2.6. Optimización de la distancia de separación entre focos	62
2.7. Imágenes de súper resolución en células vivas	64
2.8. Imágenes 3D en células vivas	68
2.9. Registro de la dinámica en la nanoescala en células vivas	70
2.10. Discusión	73
2.11. Conclusiones y perspectivas	75
3. Localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial	78
3.1. Un marco común para la localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial (SML-SSI)	79
3.1.1. Estimación y precisión de la posición	83
3.2. Evaluación comparativa de diferentes métodos	87
3.2.1. Métodos orbitales	88
3.2.2. Métodos rasterizados	93

3.2.3.	Comparación entre RASTMAX y la localización basada en cámaras	99
3.2.4.	Comparación de los mejores desempeños	102
3.3.	Conclusiones y perspectivas	106
Apéndice 3.1	Derivación de $p_i(r_E)$ con fondo	109
4.	MINFLUX por pulsos intercalados	113
4.1.	Concepto y visión general de la aplicación experimental	113
4.2.	Configuraciones ópticas	116
4.2.1.	Configuración de Buenos Aires	118
4.2.2.	Configuración de Múnich	123
4.3.	Corrección de la deriva	124
4.4.	Medición del patrón de excitación	126
4.5.	Muestras de prueba basadas en origamis de ADN	129
4.5.1.	Plegado de estructuras de origamis de ADN	130
4.5.2.	Incubación de origamis de ADN	130
4.6.	Estimación de la posición y límite de Cramér-Rao	131
4.7.	Caracterización experimental de la precisión y exactitud de la localización	132
4.8.	Simulaciones de p-MINFLUX	135
4.8.1.	Descripción de las simulaciones de Monte Carlo	136
4.8.2.	Efecto de la desalineación del patrón de excitación	137
4.8.3.	Tiempos de llegada de los fotones e interferencia entre las ventanas de tiempo de detección	139
4.9.	Nanoscopía con información de tiempo de vida de fluorescencia	141
4.10.	Seguimiento de moléculas individuales en la nanoescala	144
4.11.	Discusión y perspectivas	147
Apéndice 4.1	Secuencias de origamis de ADN	149
5.	Localización de moléculas individuales mediante el escaneo de un mínimo de luz (RASTMIN)	161
5.1.	Implementación de RASTMIN en un microscopio confocal	162
5.1.1.	Escáner de haz	163
5.1.2.	Modulación de fase del haz de excitación	166
5.1.3.	Influencia de la deriva mecánica en la precisión de la localización	169
5.1.4.	Sistema de estabilización	171
5.2.	Simulaciones de localización y nanoscopía RASTMIN	178
5.3.	Evaluación de la precisión de RASTMIN con NPs fluorescentes	181
5.3.1.	Preparación de la muestra de NPs fluorescentes	183
5.4.	RASTMIN nanoscopy on DNA-origami samples	184
5.4.1.	DNA-origami samples nanofabrication	186
5.4.2.	DNA-origami samples preparation	186
5.5.	Conclusiones y perspectivas	187
6.	Conclusiones generales y perspectivas	190
	Agradecimientos	195
	Publicaciones derivadas de esta Tesis	199
	Referencias	201

Capítulo 1 - Microscopía de fluorescencia y microscopía de superresolución (nanoscopía)

1.1 La microscopía óptica y el límite de difracción

La microscopía óptica tiene un papel preponderante en las ciencias de la vida, ya que ofrece ventajas únicas: es mínimamente invasiva, lo que permite la microscopía en células y organismos intactos o incluso vivos, es extremadamente sensible cuando se combina con la marcación fluorescente y permite obtener imágenes tridimensionales dentro de las muestras biológicas. Sin embargo, tiene una limitación fundamental en cuanto a la resolución espacial alcanzable. Hasta hace aproximadamente 25 años, la obtención de una resolución nanométrica mediante sistemas ópticos de campo lejano fabricados con lentes convencionales se consideraba imposible.

Debido a la naturaleza ondulatoria de la luz, una fuente puntual en el espacio de la muestra producirá una imagen de difracción limitada de tamaño finito después de pasar por un sistema óptico. El patrón de difracción producido puede utilizarse, de hecho, para caracterizar el sistema óptico y se denomina función de dispersión del punto (*PSF* del inglés *Point Spread Function*). Para un sistema típico basado en una lente, se forma un patrón de disco de Airy en el espacio de la imagen, con un ancho total a la mitad del máximo (*FWHM*) dado por la fórmula de Abbe¹:

$$FWHM \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (1.1)$$

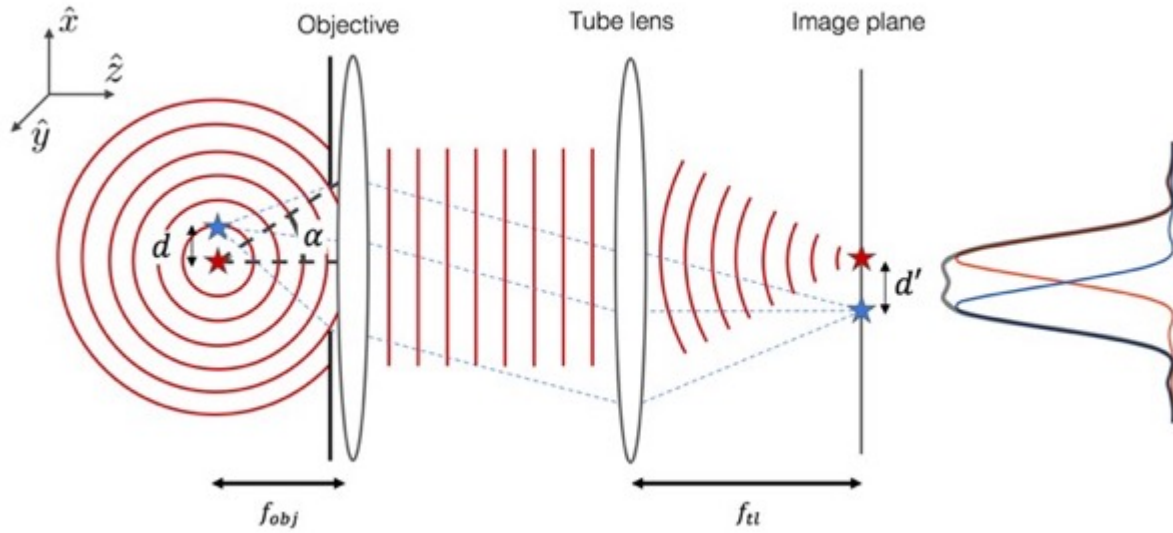


Figura 1.1 Sistema óptico limitado por difracción. Modelo simplificado de un microscopio óptico. Dos emisores puntuales incoherentes a distancia d son fotografiados por el sistema formado por el objetivo y la lente del tubo. En el plano de la imagen del microscopio se miden dos patrones de difracción a distancia $d' = M d$ donde M es el factor de aumento del microscopio.

En el contexto de la microscopía, la lente que limita la resolución del sistema es la primera partiendo de la muestra, esta lente (que en realidad es una combinación de diferentes lentes) se llama lente *objetivo*. En el caso de la luz visible y de las lentes objetivo de última generación, la PSF tiene un $FWHM_{xy} \approx 200 - 300$ nm lateralmente y $FWHM_z \approx 500 - 600$ nm axialmente. Estos patrones de difracción limitan la capacidad del sistema para discernir entre dos fuentes puntuales que están demasiado cerca en el espacio de la muestra, limitando así la resolución del sistema. Dos fuentes incoherentes de radiación electromagnética, separadas por una distancia menor que el FWHM producen dos patrones de difracción superpuestos (Figura 1.1).

Una norma ampliamente adoptada para definir la resolución de un microscopio óptico es el criterio de Rayleigh, que establece que la resolución lateral de un microscopio es

$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (1.2)$$

y la resolución axial es

$$\Delta z \approx \frac{\lambda}{n \sin \alpha} \quad (1.3)$$

Donde λ es la longitud de onda de emisión n es el índice de refracción del medio de la muestra y α es el ángulo de captación máximo de la primera lente (lente objetivo del microscopio). A menudo se expresa también en términos del parámetro $NA = n \sin \alpha$ llamado *apertura numérica* de una lente.

Las fórmulas (1.2, 1.3) dadas por el criterio de Raleigh son tales que el límite de resolución coincide aproximadamente con el *FWHM* del *PSF* del sistema óptico. Observamos que el establecimiento de un criterio de resolución basado exclusivamente en la *PSF* del sistema sólo puede ser aproximado, ya que la resolución real alcanzada experimentalmente dependerá también de otros parámetros como las aberraciones ópticas, la relación señal/ruido (*SNR*) y la relación señal/fondo (*SBR*).

1.2 Fluorescencia

Las moléculas fluorescentes o *fluoróforos* son compuestos químicos o elementos que pueden emitir luz después de absorberla². La imagen mecanocuántica más sencilla para representar el proceso de fluorescencia molecular es un sistema de tres niveles, como se representa en el diagrama de Jablonski de la Figura 1.2a: un estado singlete de base S_0

un estado singlete excitado S_1 y un estado triplete T_1 , cada uno de ellos dividido en estados vibracionales.

Las moléculas pueden pasar de S_0 a S_1 absorbiendo un fotón con una energía igual a la diferencia entre la energía de los dos estados moleculares. Esta diferencia de energía ΔE está relacionada con la longitud de onda del fotón λ a través de la relación Planck-Einstein²:

$$\Delta E = \frac{h c}{\lambda} \quad (1.4)$$

donde h es la constante de Planck y c es la velocidad de la luz en el medio donde tiene lugar la transición. El proceso de absorción se produce en la escala de tiempo del femtosegundo. A temperatura ambiente, la población de equilibrio de los estados vibracionales superiores es despreciable y la molécula decae al estado vibracional más bajo dentro de S_1 en un proceso de relajación vibracional que tiene lugar en unos pocos picosegundos. En este punto pueden ocurrir varios procesos. La molécula excitada puede decaer directamente a S_0 emitiendo un fotón de fluorescencia con una tasa de transición k_F . Alternativamente, puede decaer a S_0 de forma no radiativa por conversión interna, con tasa k_{nr} . La molécula puede realizar muchos ciclos como éste en el subespacio singlete y emitir un cierto número de fotones, es decir, la molécula es brillante.

Además, si existe un mecanismo para desaparecer dos espines de electrones (como el acoplamiento espín-órbita) y S_1 y T_1 comparten la misma geometría molecular para cierta energía, la molécula excitada puede sufrir un cruce entre sistemas (ISC) hacia la energía más baja T_1 . Debido a las reglas de selección de espín, las transiciones singlete-triplete están prohibidas por radiación³. La molécula queda entonces atrapada en el estado triplete hasta que se produce de nuevo el ISC. Durante este tiempo en T_1 la molécula se encuentra en un estado no fluorescente, es decir, permanece oscura.

Normalmente, las tasas de transiciones singlete-triplete (k_{ISC} y k_P) son mucho menores que las tasas de transición singlete-singlete. Entonces, los periodos brillantes en los que una molécula es capaz de absorber y emitir fotones de fluorescencia se ven interrumpidos por periodos oscuros en el rango de milisegundos a segundos, que son fácilmente discernibles cuando se sigue la fluorescencia de una molécula individual en el tiempo. Este efecto se conoce como parpadeo de tripletes o *blinking*⁴.

Los espectros de absorción y emisión de una molécula fluorescente se muestran esquemáticamente en la Figura 1.2b. La relajación de la energía vibracional dentro de S_1 y S_0 explica el desplazamiento espectral del espectro de emisión con respecto a la absorción hacia longitudes de onda más largas, llamado *desplazamiento de Stokes*². El desplazamiento de Stokes es generalmente de ~ 20 nm y permite, mediante filtros ópticos adecuados, la separación de la luz de excitación y emisión en los microscopios de fluorescencia.

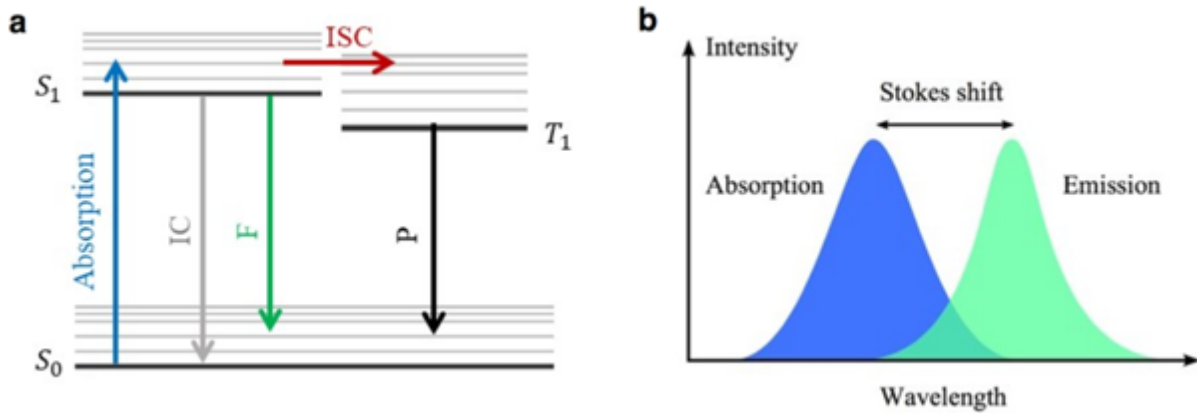


Figura 1.2 Fluorescencia. (a) Diagrama de Jablonski simplificado de los fenómenos de fluorescencia. S_0 : estado básico, S_1 : estado de excitación, ISC : cruce entre sistemas, IC : conversión interna. T_1 : estado triplete, P : fosforescencia (b) Espectros de absorción y emisión de una molécula de fluorescencia genérica. El desplazamiento de Stokes es la diferencia de longitud de onda entre los picos de absorción y emisión.

Las transiciones entre estados son independientes, estocásticas y sin memoria. Así, el tiempo transcurrido en cada estado entre transiciones sigue una distribución exponencial. El tiempo transcurrido en S_1 tras la absorción del fotón $\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr} + k_{ISC}}$ se suele denominar tiempo de vida del estado excitado o tiempo de vida de la fluorescencia, y suele ser entre 0.5 a 10 ns para los fluoróforos orgánicos y las proteínas fluorescentes. La eficiencia cuántica de la fluorescencia se define como $\phi = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_{ISC}}$. Dado que k_{ISC} suele ser mucho menor que k_F y k_{nr} se suele despreciar al calcular τ y ϕ .

La posibilidad de que los fluoróforos pasen de un estado fluorescente (brillante, ON) a uno no fluorescente (oscuro, OFF) es de gran importancia para la microscopía de superresolución. Aquí hemos descrito el parpadeo de tripletes, que es un mecanismo de parpadeo estocástico ON-OFF. El parpadeo estocástico ON-OFF es esencial para los métodos de superresolución basados en la localización de moléculas individuales, la llamada microscopía de localización de moléculas individuales, descrita en la Sección 1.6. Es importante señalar que también existen otros posibles mecanismos de parpadeo estocástico ON-OFF, como las reacciones redox reversibles⁵ o las (foto)isomerizaciones que rompen el sistema conjugado fotoactivo⁶.

Además, hay formas de inducir la transición de los fluoróforos a un estado oscuro impulsado por la luz. Este tipo de conmutación a OFF fotoinducida es esencial para los métodos de superresolución de coordenadas descritos en la Sección 1.5. Un mecanismo universal fotoinducido para producir el decaimiento de una molécula desde S_1 es la emisión estimulada. Aunque la emisión estimulada implica la emisión de un fotón, éste es de la misma energía exacta que la luz utilizada para inducir la transición. Entonces, esto puede separarse espectralmente de la emisión espontánea que ocurre en un rango espectral más amplio. Por tanto, en la práctica, la emisión estimulada funciona como una forma fotoinducida de suprimir la emisión espontánea detectable. Una vez más, existen otros mecanismos fotoinducidos para suprimir o desactivar la fluorescencia, como la isomerización fotoinducida o la depleción al estado fundamental.

Por último, es importante comentar que las moléculas excitadas también pueden sufrir reacciones químicas irreversibles que las hacen no fluorescentes. Este proceso, que suele

denominarse fotoblanqueo, limita el número total de fotones de fluorescencia que pueden detectarse de una molécula individual.

1.3 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia¹ es el tipo de microscopía óptica que utiliza compuestos fluorescentes como mecanismo de contraste para obtener imágenes de diferentes estructuras en las muestras. Las configuraciones típicas de la microscopía de fluorescencia se muestran en la figura 1.3. Aquí, la luz láser (en azul) se utiliza para excitar la fluorescencia de una muestra. Un espejo dicróico refleja el haz láser hacia la muestra y transmite la luz de longitudes de onda más largas, normalmente alrededor del máximo de emisión de fluorescencia, separando así la luz de excitación de la luz de emisión. Antes de que la luz llegue al detector, se suele utilizar un filtro de emisión adicional ajustado con mayor precisión al pico de emisión para bloquear aún más la luz de excitación y otras contribuciones de fluorescencia no específicas.

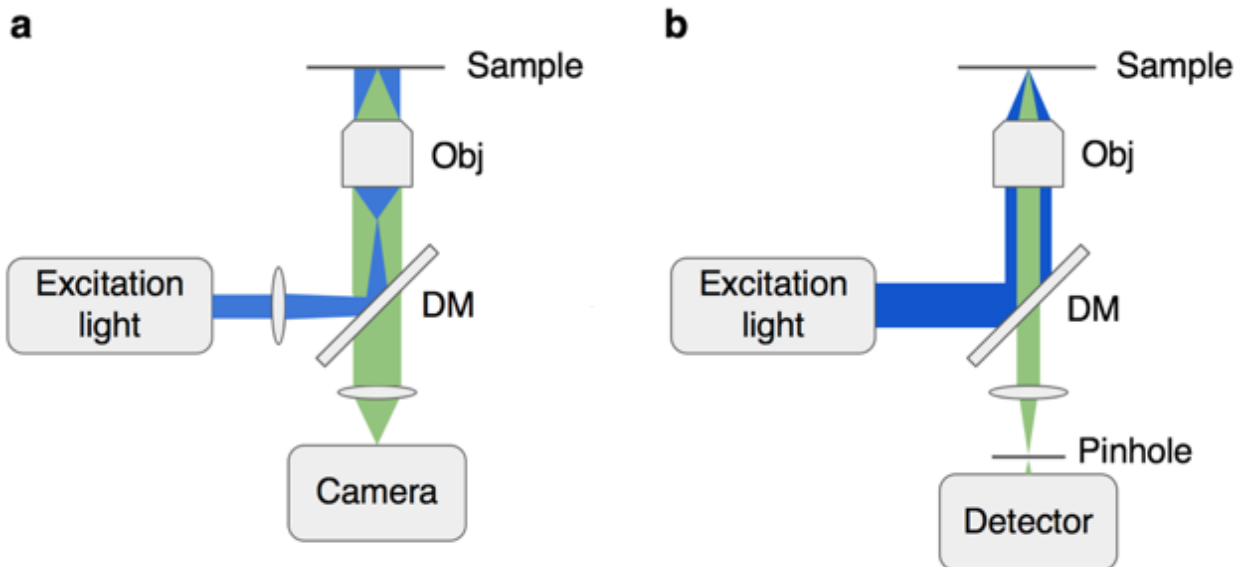


Figura 1.3 Microscopía de fluorescencia de difracción limitada. (a) Microscopio de fluorescencia de campo amplio. (b) Microscopio de fluorescencia de barrido (confocal).

Los microscopios pueden clasificarse según su esquema de excitación/detección en microscopios de campo amplio y de barrido (confocal)¹. En los primeros (Figura 1.3a), se ilumina una zona bastante amplia de la muestra y un detector pixelado (cámara) detecta la luz emitida por todos los marcadores iluminados. La microscopía de barrido (Figura 1.3b) adopta un enfoque alternativo: la iluminación se enfoca en un punto de la muestra y la imagen se reconstruye registrando la señal detectada durante un barrido del haz enfocado sobre la muestra. Además, en la microscopía *confocal* de barrido^{1,7}, se utiliza un filtro espacial compuesto por un orificio micrométrico o *pinhole* en el plano focal de detección para bloquear la emisión desenfocada. De este modo, la fluorescencia de fondo se reduce drásticamente en comparación con la microscopía de campo amplio y se mejora el contraste de la señal. La contrapartida de esta mejora del contraste es que, para adquirir una imagen completa, los puntos de iluminación (y detección) tienen que ser escaneados conjuntamente a través de la muestra para que el detector pueda medir la respuesta en cada posición.

1.4 Microscopía de superresolución: activación y desactivación de fluoróforos

Hasta principios de la década de 1990 se aceptaba generalmente que la única forma de mejorar drásticamente la resolución de las imágenes empleando la luz era utilizando la óptica de campo cercano⁸. Se realizaron esfuerzos en este sentido, incluyendo aplicaciones en biología^{9,10}. Aunque la obtención de imágenes de campo cercano es una técnica relevante en áreas como las ciencias de los materiales y la óptica integrada, su utilidad está limitada por su restricción a las superficies. Mientras tanto, se produjeron importantes avances en la microscopía de fluorescencia de campo lejano gracias a desarrollos como la

obtención de imágenes 3D de dos fotones¹¹, el descubrimiento de la GFP y sus variantes^{12,13} y la mejora de la sensibilidad de las mediciones que permitió la primera detección de moléculas fluorescentes individuales a temperatura ambiente^{14,15}.

La comprensión y posterior ingeniería de las posibles transiciones entre estados fluorescentes y no fluorescentes de los fluoróforos fue clave para desbloquear la resolución ilimitada en la microscopía de campo lejano. La idea que subyace a todas las técnicas de nanoscopía o de microscopía de superresolución es utilizar las transiciones moleculares para superar el límite de resolución¹⁶. Se produjo un cambio radical al concebir los fluoróforos no sólo como reporteros, sino también como herramientas propiamente dichas.

En los últimos años se han desarrollado varios métodos para superar el límite de difracción. Todos ellos se basan en la conmutación de los fluoróforos entre un estado fluorescente (ON) y un estado no fluorescente (OFF) (Figura 1.4a). Las moléculas en estado ON emiten fluorescencia detectable mientras que las moléculas en estado OFF no emiten una cantidad significativa de fluorescencia detectable. En este contexto, la fluorescencia detectable se refiere a cada montaje experimental particular, no se refiere a la capacidad intrínseca del fluoróforo de sufrir los procesos de absorción o emisión de fotones. La naturaleza (química, fotofísica, conformacional, etc.) de cada estado es diferente para cada método. Los métodos de nanoscopía de fluorescencia se agrupan comúnmente según su modo de lectura en dos familias. Las técnicas dirigidas por coordenadas tienen sus trayectorias de excitación/detección construidas en una configuración de barrido, de modo que sondan secuencialmente cada posición de la muestra con resolución nanométrica. Por otro lado, las técnicas de localización estocástica trabajan en una configuración de campo amplio, registrando estados intermitentes de emisión de fluorescencia de moléculas individuales que se producen en posiciones aleatorias de la muestra. A partir de cada señal de molécula individual detectada se determina la posición de la molécula. A continuación, se reconstruye una imagen superresuelta utilizando las posiciones determinadas de las moléculas individuales. Esta familia de técnicas también se conoce como microscopía de localización de moléculas individuales (SMLM del inglés *Single-Molecule Localization Microscopy*). A continuación se describen los dos grupos de técnicas de nanoscopía, junto

con algunas de las implementaciones más relevantes. Está fuera del alcance de esta Tesis revisar las aplicaciones de la microscopía de superresolución, para una extensa y excelente revisión sobre la nanoscopía de fluorescencia en biología celular nos remitimos a ¹⁷.

1.5 Nanoscopía de fluorescencia dirigida por coordenadas

En las técnicas dirigidas por coordenadas, un patrón de luz que rige las transiciones ON/OFF determina las coordenadas en las que la muestra puede emitir fluorescencia. Para ello, se escanean al menos dos patrones de luz superpuestos sobre la muestra. Uno de los patrones de luz excita los fluoróforos para la emisión de fluorescencia. El otro, llamado patrón de depleción, suprime la emisión de fluorescencia transfiriendo los fluoróforos a un estado no fluorescente (OFF). Normalmente, el patrón de depleción presenta un mínimo (idealmente un cero) de intensidad donde el patrón de excitación presenta un máximo, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1.4b para el caso bidimensional (2D). El patrón de excitación adopta la forma de un foco convencional (aproximadamente gaussiano) mientras que el patrón de depleción adopta la forma de un foco en forma de toroide. Aunque ambos focos están limitados por la difracción, la región de la muestra capaz de emitir fotones de fluorescencia se reduce efectivamente. Escaneando los patrones de excitación y depleción se obtiene una imagen superresuelta. Con este método, se han registrado resoluciones de ~ 20 nm en muestras biológicas, lo que constituye una mejora de un orden de magnitud con respecto a la microscopía limitada por difracción.

En 1994, el profesor Stefan Hell propuso la microscopía de depleción por emisión estimulada (STED)¹⁸, el primer método de este tipo y el primer concepto físico viable para superar fundamentalmente el límite de difracción en la microscopía basada en lentes convencionales. El microscopio STED utiliza la emisión estimulada como mecanismo para transferir los fluoróforos del estado excitado (ON) al estado base (OFF) (Figura 1.4c), inhibiendo eficazmente su emisión de fluorescencia. La luz de emisión estimulada se filtra

de la fluorescencia antes de llegar al detector, por lo que la *PSF* efectiva del microscopio se reduce considerablemente (Figura 1.4b). Este concepto fue demostrado experimentalmente por primera vez en 1999 por Stefan Hell y Thomas Klar¹⁹. Más tarde se desarrollaron varias técnicas, como la depleción al estado básico (GSD)²⁰, la microscopía de excitación con patrón saturado (SPEM)²¹ o la microscopía de iluminación estructurada saturada (no lineal) (SSIM o NL-SIM)²², siguiendo los mismos conceptos básicos de STED para lograr la superresolución, pero utilizando diferentes mecanismos para controlar las transiciones entre los estados ON y OFF.

Durante los últimos veinte años de desarrollo, se han realizado varios avances en la nanoscopía STED, entre los que se incluyen: i) la obtención de imágenes multicolor²³, ii) la superresolución 3D²⁴, iii) los patrones de depleción adaptativos para minimizar las intensidades de luz^{25,26}, iv) la óptica adaptativa para aplicaciones en tejidos profundos²⁷, v) la combinación con mediciones FRET basadas en la intensidad²⁸.

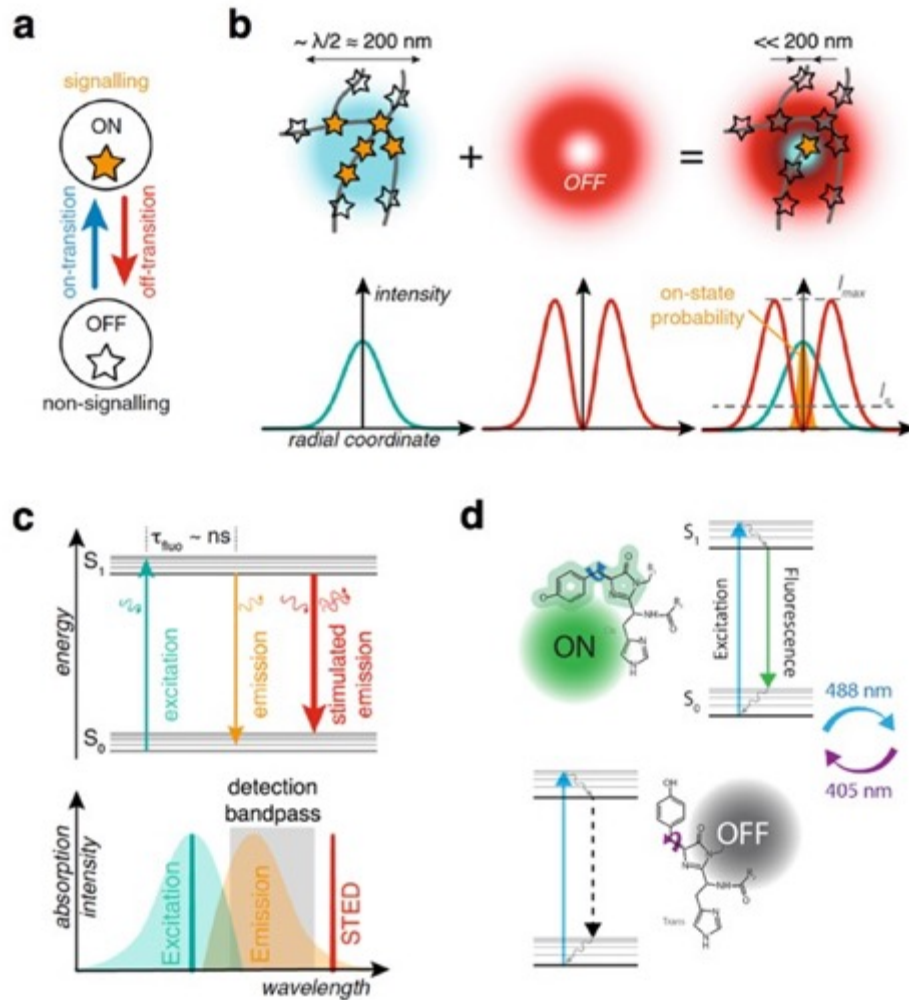


Figura 1.4 Nanoscopía de fluorescencia dirigida por coordenadas. (a) Las transiciones entre un estado fluorescente (ON) y un estado no fluorescente (OFF) son el concepto clave subyacente en todas las técnicas de superresolución. (b) Esquema conceptual de la nanoscopía dirigida por coordenadas: un haz de depleción que presenta un mínimo de intensidad se superpone con el haz de excitación que presenta un máximo. El haz de depleción suprime la emisión de fluorescencia en la periferia del máximo del haz de excitación, reduciendo así el área efectiva de la que se detecta la fluorescencia. (c) La nanoscopía STED utiliza la emisión estimulada como mecanismo de depleción. La longitud de onda de depleción está fuera de la región espectral de detección. (d) La nanoscopía RESOLFT explota la fotoisomerización cis-trans de las proteínas fluorescentes utilizando dos longitudes de onda diferentes, normalmente 405 y 488 nm. Figuras (a-c) adaptadas de ²⁹.

Desde su primera aplicación experimental en una investigación biológica³⁰, la nanoscopía STED se ha ido aplicando cada vez más en las ciencias de la vida y actualmente los nanoscopios STED están disponibles comercialmente. Para ilustrar el rendimiento de STED, en la figura 1.5 se presentan los resultados de proyectos secundarios sobre la obtención de imágenes con STED que se han llevado a cabo en el marco de este trabajo de Doctorado. La figura 1.5a muestra el esqueleto periódico asociado a la membrana (MPS) en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal³¹. Esta estructura supramolecular con un espacio característico de 190 nm entre las unidades proteicas no es visible con la microscopía convencional. Como proyecto secundario en colaboración con el grupo del Dr. Alfredo Cáceres (Instituto Ferreyra, Córdoba, Argentina) se estudió el papel de la MPS durante la degeneración neuronal. Para ello se realizaron imágenes correlativas en dos colores de espectrina (STED, rojo) y tubulina (campo amplio, verde) (Figura 1.5b). Se comprobó que la pérdida de la MPS es una condición previa necesaria para la degradación axonal, lo que sugiere que tiene un papel crucial en la estabilidad mecánica de las neuronas³².

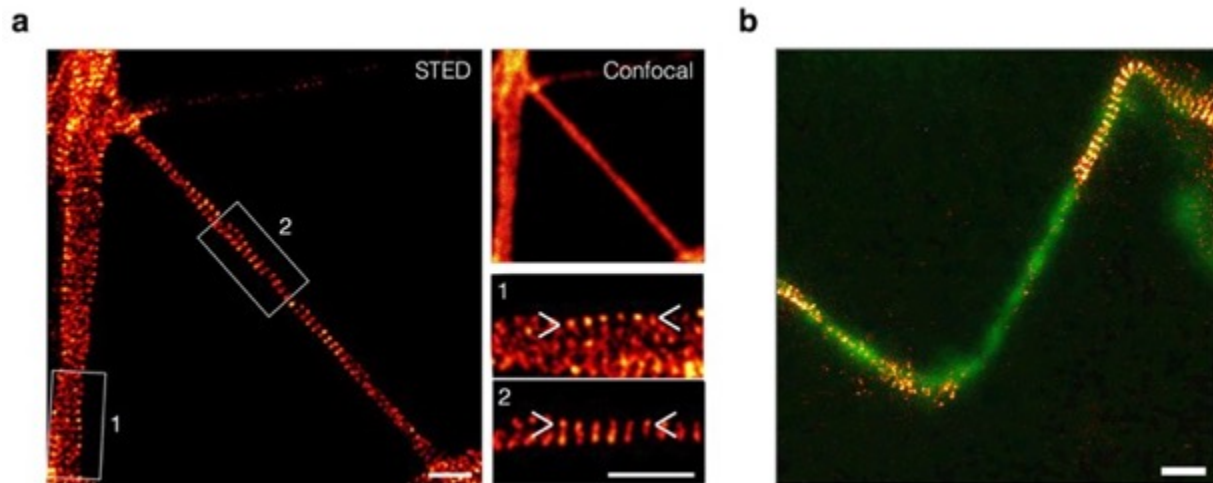


Figura 1.5 Ejemplos de aplicación de STED. (a) Proteína espectrina en el esqueleto periódico asociado a la membrana (MPS) en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG). En la imagen confocal que se muestra a modo de comparación, no se aprecia ninguna estructura periódica. En los recuadros 1 y 2 se muestran las áreas que presentan el MPS. Adaptado de ³¹. (b) Imagen de

dos colores de espectrina (STED) y α -tubulina (campo amplio). La espectrina se marcó con ATTO 647N y la α -tubulina con Alexa Fluor 488. Datos utilizados en ³¹, imagen no publicada.

Entre las diferentes técnicas de focalización de coordenadas, el método denominado nanoscopía RESOLFT^{33,34} es especialmente relevante. Siguiendo los mismos principios de STED, RESOLFT utiliza transiciones reversibles fotoinducidas (isomerizaciones cis-trans) en proteínas fluorescentes reversiblemente conmutables (rsFP, Figura 1.4d). RESOLFT permite obtener imágenes de especímenes vivos que expresan rsFP (por ejemplo, mutaciones de la GFP) a bajos niveles de luz, lo que lo convierte en el método de elección para la obtención de imágenes de células vivas en las que resulta relevante minimizar el fotodaño.

Un aspecto importante de la nanoscopía STED y RESOLFT es la resolución temporal. Dado que ambos métodos son técnicas de escaneo puntual, el tiempo necesario para adquirir una imagen escala cuadráticamente con el campo de visión (FOV) como en cualquier método de escaneo. Además, están intrínsecamente limitados por la velocidad de conmutación de las sondas fluorescentes. Mientras que en STED el mecanismo de conmutación, la depleción estimulada de la fluorescencia, ocurre en la escala \sim ns, en RESOLFT la isomerización cis/trans tiene lugar en la escala \sim ms, lo que la hace sustancialmente más lenta. Por ejemplo, las imágenes STED de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ pueden adquirirse normalmente en unos pocos segundos e incluso se ha demostrado a velocidad de vídeo³⁵ utilizando sistemas de escaneo rápidos y reduciendo el FOV a $2.5 \times 1.8 \mu\text{m}^2$. Por otro lado, una imagen RESOLFT equivalente tardaría $\sim 5 - 60$ min dependiendo de la proteína fluorescente utilizada. Por lo tanto, es interesante mejorar la resolución temporal de RESOLFT, sobre todo porque es la técnica más adecuada para estudiar la dinámica biológica a través de imágenes de células vivas debido a las dosis de luz mucho más bajas que se utilizan en comparación con STED (5-6 órdenes de magnitud menos) o las técnicas de localización de moléculas individuales compatibles con células vivas (1-3 órdenes de magnitud menos). El desarrollo de un RESOLFT paralelizado capaz de adquirir imágenes de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ en aproximadamente 1 s con ~ 50 nm resolución

espacial en células vivas formó parte de este trabajo de doctorado y se describirá en el Capítulo 2 de esta tesis.

1.6 Microscopía de localización de moléculas individuales

Las técnicas de microscopía de localización de moléculas individuales (SMLM) consisten en construir una imagen superresuelta a partir de las posiciones previamente determinadas de cada fluoróforo de la muestra (Figura 1.6). Aunque la imagen de un solo fluoróforo aislado tiene un patrón de intensidad dado por la *PSF* del sistema óptico, su posición puede determinarse con una precisión muy superior al límite de difracción. La incerteza de localización escala con la inversa de la raíz cuadrada del número de fotones detectados³⁶. Las imágenes convencionales de microscopía de fluorescencia son el resultado de la superposición de las señales de todos los marcadores iluminados (Figura 1.6b). Las técnicas de localización estocástica ganan resolución separando los marcadores a lo largo de la dimensión temporal y para ello se basan en fluoróforos que pueden cambiar entre un estado fluorescente (ON) y un estado no fluorescente (OFF). Las moléculas que se encuentran en una región limitada por la difracción pueden activarse en diferentes momentos, y ser visualizadas y localizadas individualmente.

En una adquisición típica (Figura 1.6c), los marcadores fluorescentes están inicialmente en estado OFF y se enciende un conjunto aleatorio en una concentración suficientemente baja para hacer posible la obtención de imágenes individuales. Mientras están encendidos, emiten fotones que se detectan con una cámara de alta sensibilidad, de modo que cada imagen de una molécula individual puede localizarse con una precisión por debajo del límite de la difracción. A continuación, estos fluoróforos se apagan y el proceso se repite con un nuevo conjunto aleatorio de marcadores hasta que se haya obtenido una imagen de un número suficientemente grande de moléculas de la muestra. Por último, se construye una imagen superresuelta a partir de las localizaciones recogidas en toda la adquisición (Figura 1.6d). Como la precisión de la localización es mejor que el límite de difracción, la

imagen reconstruida tiene una mejor resolución que las imágenes de fluorescencia convencionales. El SMLM puede ampliarse a 3D introduciendo elementos ópticos que produzcan una *PSF* dependiente de z y permitiendo así recuperar las (x, y, z) coordenadas del emisor individual^{37,38}.

Las diferentes técnicas de SMLM difieren en su mecanismo de activación. La microscopía de localización fotoactivable (PALM)^{39,40} se basa en proteínas fluorescentes fotoactivables que pueden ser activadas con luz de una determinada longitud de onda y luego excitadas con una longitud de onda diferente. La microscopía de depleción al estado básico seguida del retorno de la molécula individual (GSDIM)⁴¹ funciona con fluoróforos estándar y utiliza el estado triplete de la molécula como estado oscuro. La microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM)^{42,43} utiliza moléculas fluorescentes sintéticas que pueden cambiar fotoquímicamente a un estado oscuro reversible de larga duración. Por último, la acumulación puntual para la obtención de imágenes de la topografía en la nanoescala (PAINT)^{44,45} se basa en la unión transitoria de marcadores a la estructura de interés.

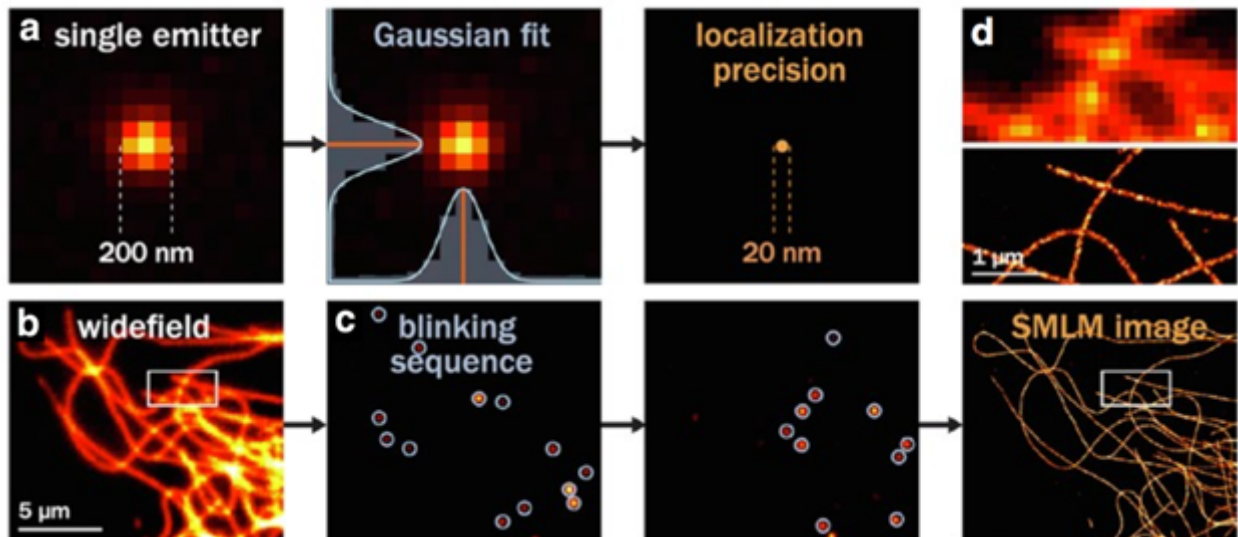


Figura 1.6 Microscopía de localización de moléculas individuales (SMLM). (a) Imagen limitada por difracción de una única molécula fluorescente. Un ajuste de una función gaussiana permite estimar la posición del emisor individual con una precisión mejor que el límite de

difracción. **(b)** Imagen de campo amplio, limitada por difracción, de una estructura subcelular. Todas las moléculas fluorescentes de la muestra están en estado ON. **(c)** Tras transferir idealmente todas las moléculas al estado oscuro (OFF), se recuperan pequeños subconjuntos de moléculas individuales dispersas en el estado ON. Las moléculas individuales se visualizan individualmente en una secuencia de tiempo y, finalmente, todas las posiciones estimadas se representan en una imagen de superresolución. **(d)** La imagen SMLM proporciona una mejora significativa de la resolución en comparación con su contraparte limitada por difracción. Adaptado de ⁴⁶.

Las precisiones de localización típicas que se consiguen con SMLM convencional están en el rango $\sim 10 - 30$ nm en las dimensiones laterales y $\sim 20 - 60$ nm en la dimensión axial. Siguiendo un criterio equivalente al de Rayleigh, la resolución es por tanto un factor de ~ 2 peor que la precisión alcanzada. Una fórmula bien establecida⁴⁷ que estima la precisión de la localización σ_{loc} como función de los parámetros experimentales es:

$$\sigma_{loc}(N) \gtrsim \sqrt{\frac{2\sigma_a^2}{N} \left(\frac{16}{9} + \frac{8\pi\sigma_a^2 b^2}{Na^2} \right)} \quad (1.5)$$

Con $\sigma_a^2 = \sigma_{PSF}^2 + a^2$ donde $\sigma_{PSF} = \frac{FWHM}{2.35} \approx \frac{\lambda}{4.7 NA}$ para la imagen gaussiana de la molécula individual. Para la luz visible y los objetivos de $NA = 1.2 - 1.5$, típicamente $\sigma_{PSF} = 80 - 150$ nm; a es el tamaño del píxel de la cámara dividido por el aumento del microscopio, b^2 son los fotones de fondo esperados por píxel y N son la fluorescencia total que compone la imagen de la molécula. Hay que tener en cuenta que, aunque esta fórmula proporciona una estimación muy útil de la precisión de localización esperada, se derivó modelando el ruido del proceso de multiplicación de electrones y de la lectura típica de una cámara EM-CCD. Deberían utilizarse otros tipos de modelos de ruido para detectores basados en principios físicos diferentes, como las cámaras sCMOS, por ejemplo.

En resumen, para una determinada longitud de onda y NA los factores limitantes más importantes en SMLM son: i) el número limitado de fotones detectados por cada emisor, normalmente $N \sim 10^2 - 10^3$ para una proteína fluorescente conmutable y $N \sim 10^3 - 10^4$

para un fluoróforo orgánico; ii) la sensibilidad/ruido de los detectores utilizados; y iii) el tamaño físico de la sonda de etiquetado, que debe ser mucho menor que la resolución deseada.

SMLM tiene la ventaja de ser relativamente sencillo en términos de hardware e instrumentación en comparación con el STED/RESOLFT, por lo que se ha convertido, por amplia diferencia, en el método de superresolución más utilizado. Con muchos montajes construidos a medida en todo el mundo, una variedad de sistemas comerciales e incluso implementaciones de bajo costo ($\sim 5K - 30K USD$)⁴⁸⁻⁵⁰, SMLM se está aplicando a una gran variedad de problemas biológicos.

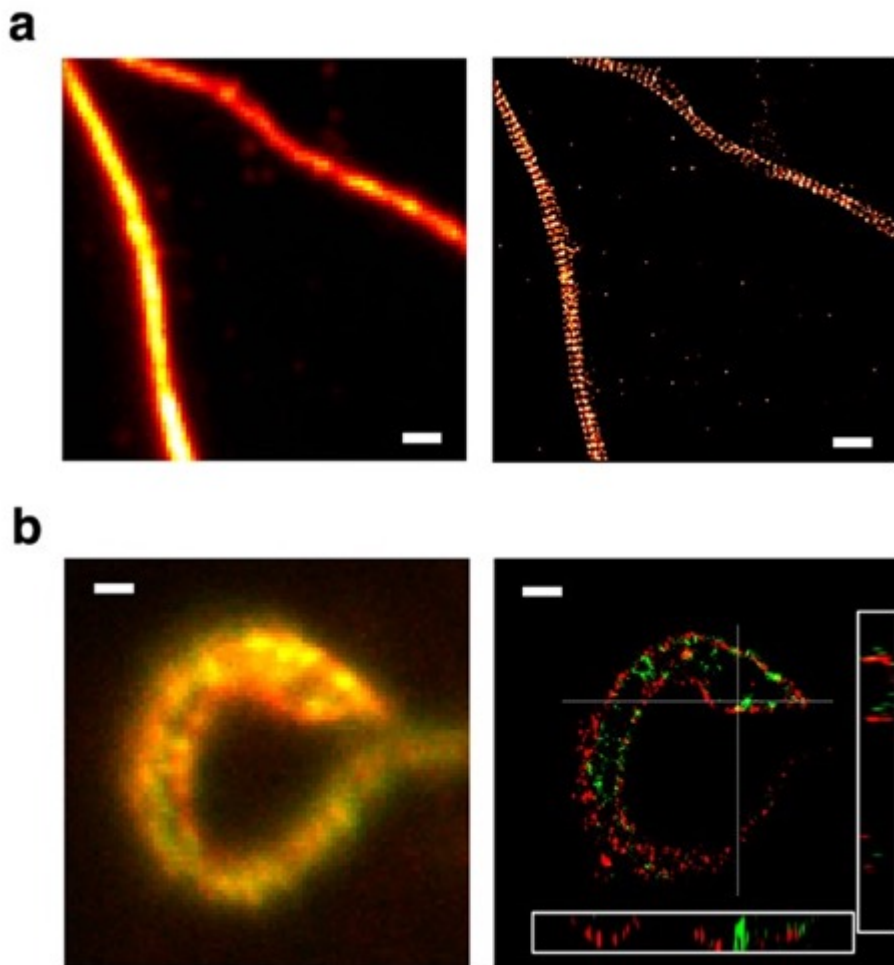


Figura 1.7 Ejemplos de aplicación de SMLM. (a) Campo amplio a un color (izquierda) y STORM 2D (derecha) de la proteína espectrina distribuida en el citoesqueleto periódico asociado a la membrana. La proteína espectrina está marcada con Alexa Fluor 647. Datos utilizados en ⁵¹, imagen no publicada. (b) Campo amplio de dos colores (izquierda) y STORM 3D (derecha) de las proteínas mucina (verde) y trans-sialidasa (rojo) en un parásito de *Trypanosoma cruzi*. La mucina está marcada con Alexa Fluor 565 y la trans-sialidasa con Alexa Fluor 647. Los cortes XZ e YZ se muestran en los recuadros blancos. La profundidad axial es de 600 nm. Datos no publicados. Todas las barras de escala: 1 μm .

Es importante señalar que la resolución temporal está intrínsecamente limitada en las técnicas SMLM debido al registro secuencial de la posición de las moléculas individuales. De hecho, podría considerarse que la mejora de la resolución espacial de SMLM se produce a expensas de tiempos de adquisición más elevados. Los tiempos típicos de adquisición son del orden de varios minutos a decenas de minutos. La aplicación de SMLM en vivo (principalmente PALM) a la obtención de imágenes sigue siendo un gran desafío y se han reportado muy pocas aplicaciones exitosas (ver por ejemplo ^{52,53}). En la práctica, la gran mayoría de los estudios de SMLM se realizan en muestras fijadas.

Para ilustrar el rendimiento de SMLM, se presentan en la Figura 1.7 algunos resultados de proyectos secundarios sobre imágenes de STORM que se han realizado en el marco de este trabajo de Doctorado. La Figura 1.7a muestra imágenes de STORM en 2D a un color de la organización de la espectrina en el MPS de las neuronas del hipocampo. Como parte de este proyecto, se obtuvieron imágenes del MPS mediante STED y STORM y se desarrolló un software de código abierto para el análisis de imágenes de estructuras supramoleculares periódicas⁵¹. En la figura 1.7b se muestra otro ejemplo. Las imágenes 3D de STORM en dos colores permitieron visualizar la organización a nanoescala de las proteínas mucina (verde) y trans-sialidasa (rojo) en la membrana de *Trypanosoma cruzi*. Mientras que, a partir de la microscopía de fluorescencia convencional y del análisis de colocalización estándar⁵⁴ se podría concluir, en principio, que estas dos proteínas colocalizan en gran medida en la membrana del parásito, la microscopía STORM de superresolución permite resolver los distintos grupos de estas proteínas en la membrana y estudiar su tamaño, distribución y relación. Estos resultados fueron parte de una

colaboración con el grupo del Dr. Oscar Campetella en el IIB-UNSAM (Buenos Aires, Argentina) y aún no han sido publicados en una revista con proceso de revisión por pares.

1.7 Microscopía de súper resolución de menos de 10 nm

El límite de resolución alcanzado por la primera generación de métodos de superresolución, tanto SMLM como de coordenadas dirigidas, viene determinado por el número total de fotones de fluorescencia detectables, es decir, por la fotoestabilidad de los fluoróforos. Entonces, conceptualmente, hay dos formas posibles de sortear esta limitación: obtener más fotones de fluorescencia desde una posición determinada en la muestra o extraer más información del limitado presupuesto de fotones. Recientemente, se han explorado ambas estrategias. Una forma de obtener más fotones de fluorescencia de posiciones específicas de una muestra es a través de DNA-PAINT. Aquí, la hibridación transitoria programable de secuencias cortas de ADN de simple cadena marcadas con fluorescencia se explota para interrogar posiciones de la muestra con múltiples fluoróforos, y fotones de fluorescencia prácticamente ilimitados^{45,55}. DNA-PAINT, combinado con algoritmos de localización análogos a los utilizados en otras técnicas de nanoscopía estocástica, proporciona una resolución espacial muy por debajo de los 10 nm⁵⁶⁻⁵⁸.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se informó de una estrategia para obtener mayores precisiones de localización con cantidad de fotones limitados. El llamado método MINFLUX⁵⁹ combina los conceptos de nanoscopía dirigida por coordenadas y estocástica por coordenadas para alcanzar una resolución de 1 nm. La publicación de MINFLUX inspiró el desarrollo de una serie de técnicas que utilizan iluminación estructurada para inyectar información en el proceso de localización. Aunque estas técnicas deben considerarse técnicas de localización de moléculas individuales, se diferencian de la primera generación de métodos estocásticos en que la iluminación utilizada no es homogénea, sino que está cuidadosamente estructurada para mejorar la precisión de la localización. Aquí optamos por describirlas como una familia de técnicas bajo el nombre de localización de

moléculas individuales con iluminación estructurada secuencial (SML-SSI). Los métodos SML-SSI tienen el potencial de convertirse en los mejores métodos para acceder a la escala de resolución sub-10 nm con presupuestos de fotones limitados.

1.8 Localización de una molécula individual con iluminación estructurada secuencial

En los últimos 5 años ha surgido una nueva familia de métodos que denominaremos localización de moléculas individuales por iluminación estructurada secuencial (SML-SSI). Algunos de estos métodos han sido revisados recientemente⁶⁰ y son el marco principal en el que se ha desarrollado el trabajo de los Capítulos 3, 4 y 5 de esta Tesis.

Los métodos SML-SSI utilizan el principio clave de la microscopía SMLM: la estocasticidad de las transiciones ON/OFF, de manera que sólo se mide la señal de una molécula a la vez y se estima su posición. Pero, a diferencia de la SMLM basada en cámara, mejoran la tasa de información (información *por fotón*) que proporciona la medición al interrogar la posición molecular con una secuencia de patrones de iluminación estructurados. Además, los SML-SSI no requieren detectores tipo cámara y pueden realizarse con detectores puntuales como los fotodiodos de avalancha.

Se puede considerar que los métodos SML-SSI consisten en **dos mediciones independientes**: i) La medición de los patrones de luz de excitación que se realiza típicamente con nanopartículas fluorescentes y que puede repetirse de manera de obtener SNR prácticamente ilimitada y ii) La medición limitada en SNR de los fotones procedentes del emisor fluorescente individual ($N \sim 10^2 - 10^4$). Esta es una distinción clave con el SMLM basado en cámaras y las técnicas dirigidas por coordenadas en las que el conocimiento preciso y exacto de la luz de excitación no está relacionado con la resolución alcanzada de forma tan directa.

Utilizando la información del patrón de excitación, la precisión de la localización puede mejorarse tanto en la dimensión lateral como en la axial por factores que van de 2 a 10 veces con respecto al SMLM estándar basado en cámaras, alcanzando así el rango de escala sub-10 nm.

1.8.1 Excitación de Luminiscencia de Máxima Información (MINFLUX)

La Excitación de Luminiscencia de Máxima Información (MINFLUX) fue el primer método en fusionar explícitamente la localización de moléculas individuales con patrones de iluminación estructurados secuenciales de luz que excitan el emisor dentro de un evento de estado ON. Utilizando cuatro exposiciones a un haz en forma de toroide, la posición de un fluoróforo se infiere a partir de los recuentos de fotones registrados correspondientes a cada exposición (Figura 1.8a). Tres de las exposiciones están organizadas en un patrón triangular, y la cuarta exposición se sitúa en el centro. MINFLUX es el método de localización de moléculas individuales más eficiente desde el punto de vista de los fotones que se ha descrito hasta ahora. Puede alcanzar precisiones de localización equivalentes a las de SMLM utilizando $\sim 20 - 100$ veces menos fotones, o, alternativamente, aumentar la precisión de localización muy por debajo de 10 nm utilizando sólo $N \sim 500 - 1000$ fotones detectados.

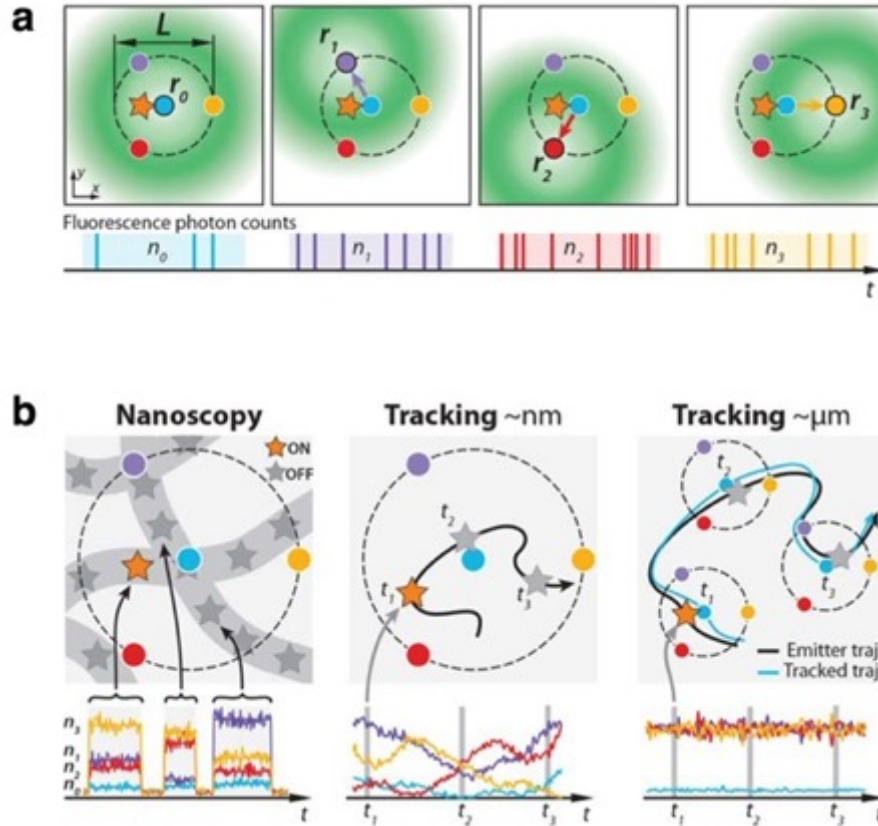


Figura 1.8 Excitación de Luminiscencia de Máxima Información (MINFLUX). (a) La intensidad del haz de excitación se modula y desvía de forma que se sitúa secuencialmente en las cuatro posiciones del plano focal (denotadas por puntos azules, violetas, rojos y amarillos), que delimitan un área de medición de diámetro L . Los fotones emitidos por la molécula fluorescente (estrella) se detectan con un sensor de conteo de fotones individuales para cada posición del haz toroidal (n_0, n_1, n_2, n_3) y se utilizan para extraer la localización molecular. (b) Diferentes aplicaciones del MINFLUX: i) nanoscopía, ii) seguimiento a escala nanométrica, iii) seguimiento a escala micrométrica. Adaptado de ⁵⁹.

Como para cualquier otro método de localización de moléculas individuales, la precisión de localización alcanzable de MINFLUX depende de parámetros experimentales como la SNR y la SBR. Curiosamente, en MINFLUX no hay ninguna limitación fundamental relacionada con la longitud de onda de la luz o el NA del microscopio. La precisión de la localización sigue generalmente la relación aproximada $\sigma \sim \frac{L}{\sqrt{N}}$ donde L es un parámetro geométrico que define el tamaño del patrón de excitación (Figura 1.8a) y N es el número

total de fotones detectados en las cuatro exposiciones. El parámetro L controla la resolución. Utilizando valores de L por debajo del límite de la difracción que suelen estar en el rango de 50 - 100 nm, se pueden alcanzar precisiones de localización de unos pocos nanómetros con recuentos de fotones moderados. En última instancia, para un número determinado de fotones de fluorescencia detectados N la precisión de localización alcanzada vendrá determinada por el SBR porque impone un límite al L mínimo utilizable. Las derivas mecánicas no corregidas durante la medición también pueden poner un límite a la precisión de localización alcanzable. En el momento de escribir esta Tesis, MINFLUX es el único método de microscopía de fluorescencia que puede lograr rutinariamente ~ 1 nm precisión de localización con $N \leq 1000$ fotones detectados utilizando moléculas fluorescentes estándar y basándose únicamente en un proceso de emisión de fluorescencia lineal, lejos de la saturación.

Como se muestra en la Figura 1.8b, la localización de una molécula individual mediante MINFLUX puede utilizarse para al menos tres aplicaciones: i) en combinación con el parpadeo estocástico ON-OFF, pueden obtenerse imágenes superresueltas localizando las moléculas de a una a la vez; ii) puede seguirse la trayectoria de una molécula individual dentro de la región de localización de tamaño L (seguimiento a escala nanométrica); y iii) si el emisor sale de la zona de tamaño L , el patrón de excitación puede volver a centrarse periódicamente en la última posición estimada de la molécula para realizar el seguimiento a escalas más largas.

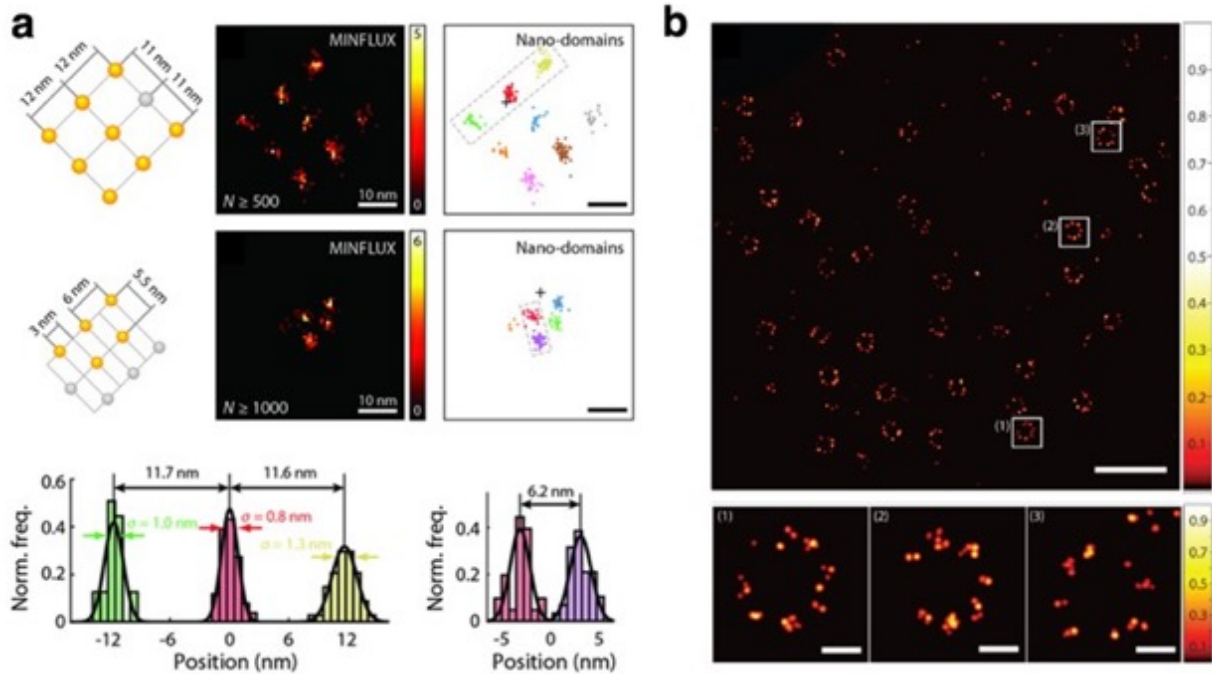


Figura 1.9. Aplicaciones del MINFLUX. (a) Estructuras de origami de ADN con fluoróforos Alexa Fluor 647 a 12 nm y 6 nm de distancia son resueltas claramente por MINFLUX. Adaptado de ⁶¹. (b) Complejo poro-nuclear (CPN) visualizado con MINFLUX. La estructura de 8 pliegues y las subunidades separadas por ~ 12 nm se resuelven claramente. La resolución en este caso está limitada principalmente por el tamaño de los marcadores. Adaptado de ⁶².

MINFLUX se ha demostrado en sistemas modelo (estructuras de origami de ADN)⁶¹⁻⁶³ como se muestra en la Figura 1.9a, en células fijas y vivas^{61,62,64} como se muestra en la Figura 1.9b, y recientemente se ha extendido a las tres dimensiones⁶². Además, recientemente se han publicado varias aplicaciones en sistemas biológicos⁶⁴⁻⁶⁶.

En MINFLUX, la señal procedente de moléculas individuales en el estado ON fuera de la región de interés puede interpretarse erróneamente y conducir a falsas localizaciones. Esto se superó con un esquema adaptativo en tiempo real rápido (escale de los 100 μs) en el que la transición ON/OFF de las moléculas es conducida por un láser de activación 405 nm láser^{62,67}. Se realiza una localización preliminar utilizando haces gaussianos en un área de ~ 200 nm de diámetro y luego se realizan zooms sucesivos con haces en forma de toroide para localizar eficazmente la molécula.

Una vez que se ha interrogado una zona y se han registrado suficientes moléculas, el patrón de excitación se traslada a la siguiente zona y se repite la secuencia. Utilizando este procedimiento siguiendo una cuadrícula, pueden adquirirse imágenes de mayor tamaño. Sin embargo, el procedimiento es muy lento en la práctica, lo que lleva a tiempos de adquisición de ~ 60 min para campos de visión de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Una versión paralelizada de MINFLUX debería ser posible, pero aún no se ha implementado.

La implementación experimental original de MINFLUX se basa en un hardware complejo que incluye múltiples sistemas de escaneo en tiempo real basados en FPGA y múltiples sistemas de iluminación y varios láseres para fines auxiliares (para un esquema de la configuración, véase la Figura S13 de ⁵⁹). Por otra parte, ningún software de control o análisis es de código abierto ni está disponible públicamente. Por estas razones y por el elevado coste de la versión comercial, aunque representa un muy importante avance en la nanoscopía de fluorescencia, el uso generalizado de MINFLUX se ha visto frenado.

Muy recientemente, la empresa que explota la transferencia tecnológica del microscopio MINFLUX original publicó un artículo en el que se describen los detalles técnicos y las capacidades de la versión comercialmente disponible⁶⁷. En el Capítulo 4 de esta Tesis, se describe una nueva implementación de código abierto de MINFLUX, que se basa en un montaje mucho más simple que logra la misma precisión de localización espacial que la implementación original al tiempo que proporciona una mayor resolución temporal y acceso a la información de la vida de fluorescencia⁶⁸.

1.8.2 Métodos de localización de moléculas individuales basados en cámaras y de campo amplio mediante iluminación estructurada

Para superar las limitaciones en *FOV* y velocidad de adquisición inherentes a las implementaciones actuales de MINFLUX, se han desarrollado versiones de SML-SSI

basadas en cámaras de campo amplio. Tres grupos de investigación desarrollaron de forma independiente SIMPLE⁶⁹, ROSE⁷⁰ y SIMFLUX⁷¹ que, a pesar de las diferencias en las implementaciones técnicas, tienen el mismo concepto en común: utilizan patrones de interferencia en dos direcciones ortogonales (Figura 1.10a) y al menos dos exposiciones en cada dirección (Figura 1.10b) para inferir la posición de las moléculas con una precisión de localización mejorada que resulta en un factor de ~ 2 veces mejor que la contraparte tradicional de SMLM (Figura 1.10c).

A diferencia de MINFLUX, la mejora de la precisión de la localización en SIMPLE/SIMFLUX/ROSE está limitada por el período mínimo del patrón de interferencia, que está limitado por la difracción. Es posible obtener una mayor precisión de localización⁶⁹ desplazando los patrones a distancias más pequeñas, pero en esta configuración sólo es útil una subárea efectiva del *FOV* a pesar de que todos los fluoróforos son iluminados simultáneamente. Para completar las localizaciones precisas en toda la región iluminada, habría que realizar varias adquisiciones en serie, lo que daría lugar a una medición que consumiría mucho tiempo y fotones. Sin embargo, aunque no se ha realizado aún, observamos que este enfoque podría implementarse en combinación con DNA-PAINT en el que los eventos ON-OFF son prácticamente infinitos. Una implementación exitosa de SIMPLE/SIMFLUX/ROSE con una mejora de la precisión mejor que un factor de ~ 2 aún no se ha implementado.

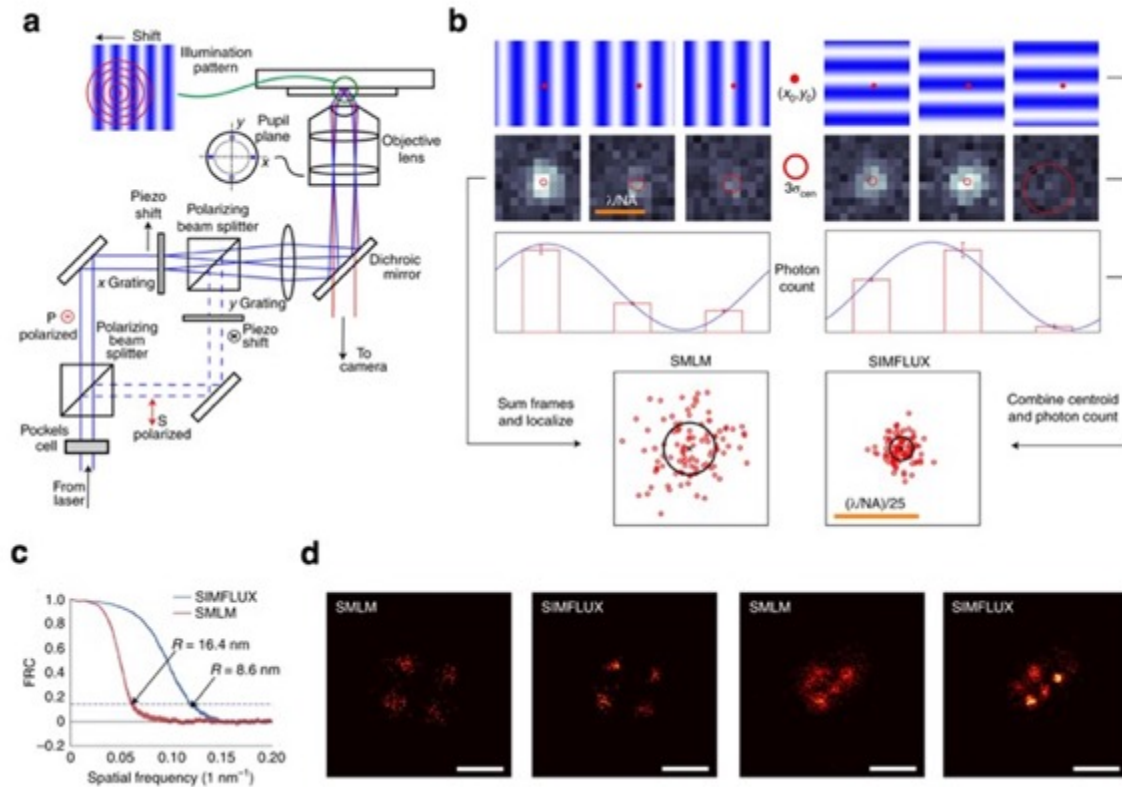


Figura 1.10 SIMFLUX. (a) Se crea un patrón de iluminación sinusoidal en una configuración de reflexión interna total mediante dos ondas evanescentes coherentes que se propagan en sentido contrario. La conmutación rápida entre dos patrones de líneas ortogonales se consigue colocando dos rejillas piezoeléctricas en los dos brazos de un divisor de haz polarizante. El camino óptico operativo se selecciona mediante una célula Pockels de conmutación de polarización. (b) Se registra un conjunto arbitrario de imágenes para cada orientación de los patrones ortogonales. En ⁷¹, se utilizaron tres imágenes por dirección, un total de seis imágenes. La combinación de las estimaciones del centroide de todos los cuadros adquiridos con el recuento de fotones en relación con cada desplazamiento del patrón mejora la precisión de la localización en un factor de alrededor de 2. (c) Curvas de correlación de anillos de Fourier con valores de resolución R . (d) Imágenes SMLM y SIMFLUX de cuadrículas de origamis de ADN con un espacio de 40 nm (izquierda) y 20 nm (derecha) entre los sitios de unión. Barras de escala: 50 nm. Adaptado de ⁷¹.

Mientras que SIMFLUX/ROSE/SIMPLE proporcionan una mejora en la precisión lateral de las localizaciones, la precisión axial potencial permanece inalterada respecto al SMLM estándar.

La microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) es un enfoque de campo amplio muy conocido para aumentar el contraste en la microscopía de fluorescencia que fue demostrado por primera vez⁷² por D. Axelrod en 1981. En TIRF, la muestra se ilumina en reflexión total interna, excitando así eficazmente los fluoróforos con las componentes evanescentes del campo electromagnético. La microscopía TIRF es una herramienta común utilizada en SMLM para aumentar el SBR a expensas de obtener imágenes de la muestra cerca del cubreobjetos. La precisión de la localización axial puede mejorarse teniendo en cuenta la iluminación dependiente de la profundidad y la eficiencia de colección que se produce en condiciones TIRF (Figura 1.11a). Este enfoque llamado SIMPLER⁷³ proporciona una precisión de localización isotrópica por debajo de los 10 nm cuando se combina con DNA-PAINT y es fácil de implementar en cualquier microscopio de fluorescencia TIRF, por lo cual, tiene potencial para ser adoptado rápidamente en cualquier laboratorio de microscopía con un montaje TIRF-SMLM. De forma análoga a MINFLUX, el aumento de la precisión de la localización se produce a expensas de *FOV* en este caso limitado por las condiciones TIRF a $\sim \lambda/2$ de la interfaz.

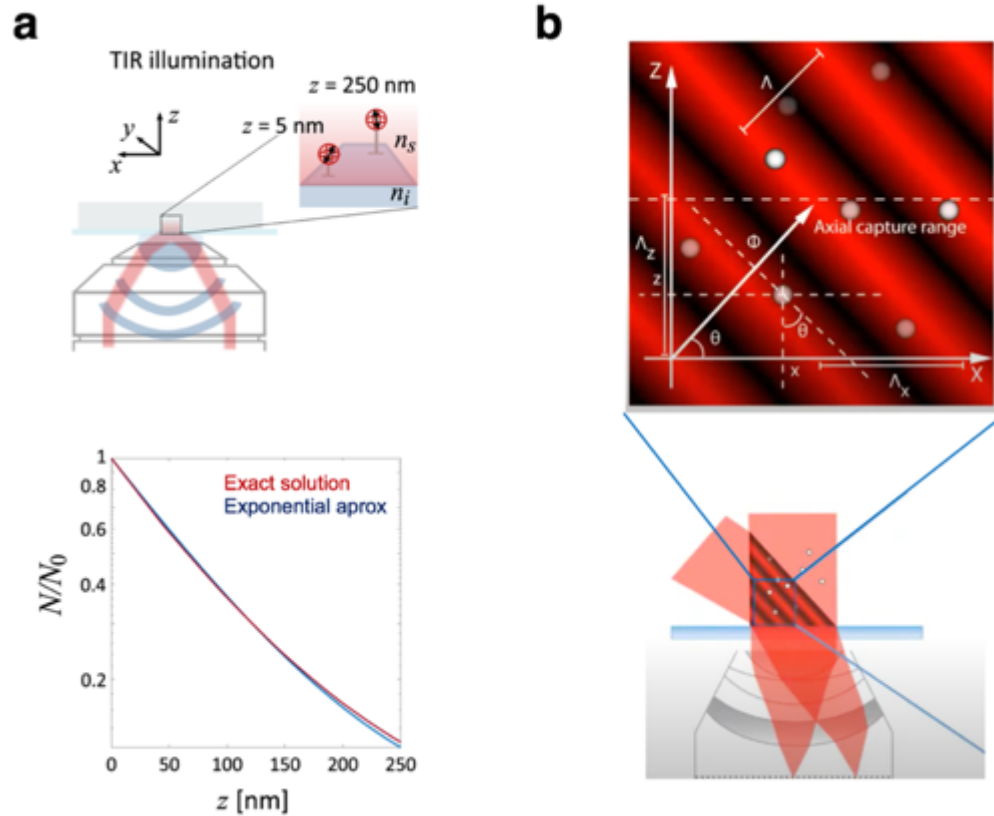


Figura 1.11 SIMPLER y ModLoc. (a) El decaimiento exponencial de la intensidad de iluminación en la microscopía TIRF, junto con un modelo de la emisión dependiente de z de los fluoróforos, puede utilizarse para estimar la posición axial de una molécula individual contando el número de fotones detectados. Adaptado de ⁷³ (b) Se pueden utilizar patrones de interferencia tridimensionales para excitar emisores individuales, modulando la fase de los patrones y realizando una iluminación secuencial, se puede estimar la coordenada (x, y, z) de los fluoróforos. Adaptado de ⁷⁴.

Se han desarrollado otros dos enfoques para aumentar la precisión de la localización en las tres dimensiones espaciales: ModLoc⁷⁴ y ROSE-Z⁷⁵. En ambos métodos se diseñan diferentes patrones de interferencia que tienen variaciones espaciales en (x, y, z) (Figura 1.11b). Al introducir diferentes fases en una secuencia de exposiciones, la posición de los emisores individuales puede inferirse con mayor precisión en tres dimensiones. En comparación con SIMPLER, ROSE-z y ModLoc tienen la ventaja de no estar limitados a la obtención de imágenes cerca del cubreobjetos, pero tienen la desventaja de requerir un

hardware especializado mucho más complejo y una caracterización cuidadosa y laboriosa de los patrones de interferencia.

1.8.3 STED mínimo (MINSTED)

El STED mínimo (MINSTED)⁷⁶ es un método de reciente aparición que combina el concepto de localización de moléculas individuales con iluminación estructurada secuencial con una PSF_{eff} efectiva de tamaño por debajo del límite de la difracción proporcionada por la nanoscopía STED (Figura 1.12a). La molécula se excita con el flanco de la PSF_{eff} como compromiso entre sensibilidad y SBR ⁷⁷ (Figura 1.12b). La medida de localización consiste en registrar la señal de fluorescencia a medida que la PSF_{eff} realiza un barrido circular alrededor del emisor fluorescente objetivo (Figura 1.12c). La iluminación MINSTED se actualiza en tiempo real mediante lazos de retroalimentación programados en electrónica FPGA para reducir continuamente la distancia entre el emisor único y el haz de excitación efectivo. La posición del emisor se infiere mediante un análisis de estimación específico y *ad hoc*.

La figura 1.12d muestra la localización de una molécula individual ATTO647N inmovilizada. Se representa el reposicionamiento iterativo del haz después de cada fotón detectado. La distribución de las localizaciones dentro de la región delimitada por el diámetro d_{min} se utiliza para estimar la precisión de la localización. La precisión de MINSTED se ha caracterizado mediante simulaciones y experimentos y es muy similar a la conseguida por MINFLUX, alcanzando precisión de localización de $\sim 1 - 3$ nm con $N \leq 2000$ fotones detectados.

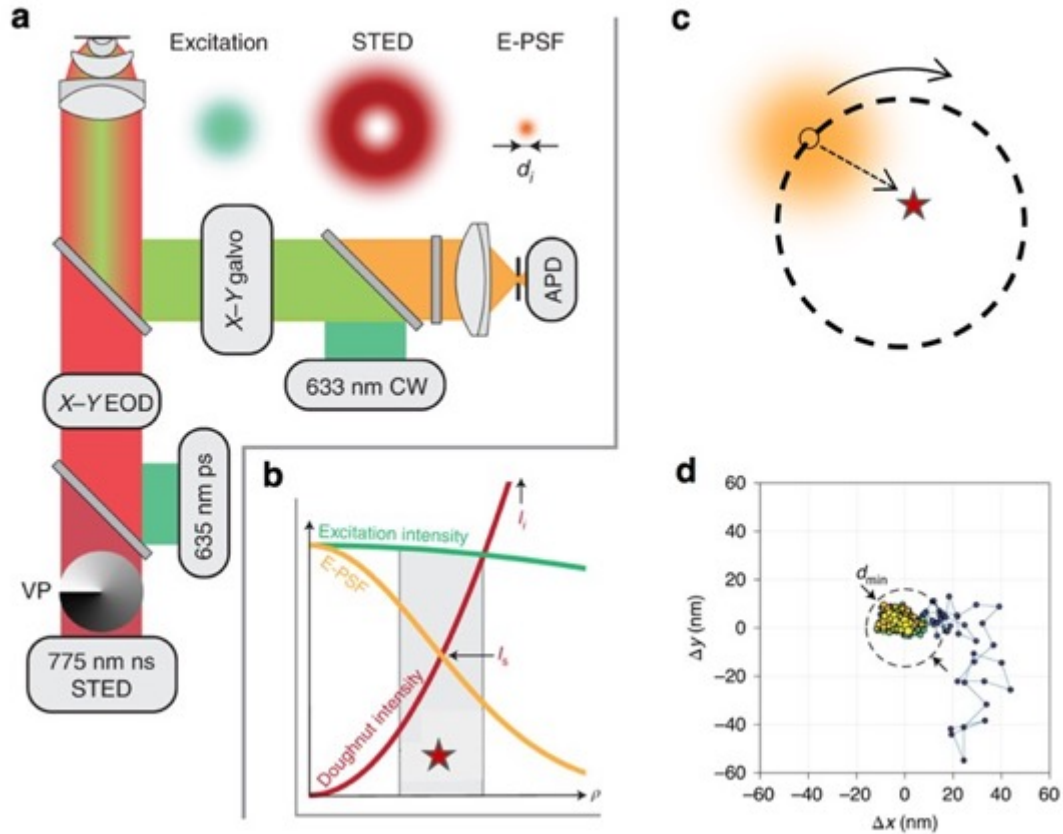


Figura 1.12 MINSTED. (a) Esquema simplificado del montaje MINSTED (b) Probabilidad normalizada de excitación (verde) y detección de fluorescencia, es decir, PSF efectiva (PSF_{eff} en naranja) en función de la distancia radial ρ desde el punto focal, junto con un perfil de intensidad no normalizado del haz de STED (rojo). (c) La PSF_{eff} (naranja) orbita alrededor del emisor individual. (d) Estimaciones iterativas de la posición del emisor. Adaptado de ⁷⁶.

Sin embargo, podría decirse que MINSTED es aún más complejo que MINFLUX debido a tres razones: i) intervienen tres procesos fotofísicos diferentes (fotoconmutación, fluorescencia y depleción estimulada), ii) deben operarse dos sistemas de escaneo rápido de forma sincronizada, uno que utiliza deflectores electroópticos para los haces de iluminación y otro que utiliza espejos galvanométricos para la detección, iii) en su implementación actual, las operaciones en la FPGA se llevan a cabo cada vez que se detecta un fotón, realizando las actualizaciones de reposicionamiento en tiempo real en el

rango de los $\sim 10 - 100 \mu\text{s}$, lo que requiere una respuesta electro-óptica muy rápida y de gran precisión.

1.9 Seguimiento orbital

En el año 2000, antes de la llegada de SMLM, y en el momento de las primeras demostraciones experimentales de STED, se propuso teóricamente un método para seguir el movimiento de partículas o moléculas fluorescentes individuales en 2D llamado Seguimiento Orbital (OT del inglés *Orbital Tracking*)⁷⁸ y posteriormente se implementó experimentalmente en una multitud de situaciones, incluyendo el seguimiento en 3D y combinaciones con espectroscopia de correlación de fluorescencia⁷⁹⁻⁸³. En OT, la señal de fluorescencia de una sola partícula o molécula se registra para un número de posiciones de un haz láser enfocado a lo largo de una trayectoria circular de alrededor de la molécula o partícula objetivo (Figura 1.13a). También se han descrito otros métodos de seguimiento de partículas individuales basados en exposiciones múltiples de haces enfocados desplazados, como la determinación de la posición de una sola partícula con cuatro enfoques^{84,85}, un método análogo a MINFLUX pero que utiliza máximos de luz. Hasta donde sabemos, estas técnicas de localización desarrolladas para el seguimiento no se han combinado con el parpadeo de moléculas individuales para obtener imágenes de superresolución.

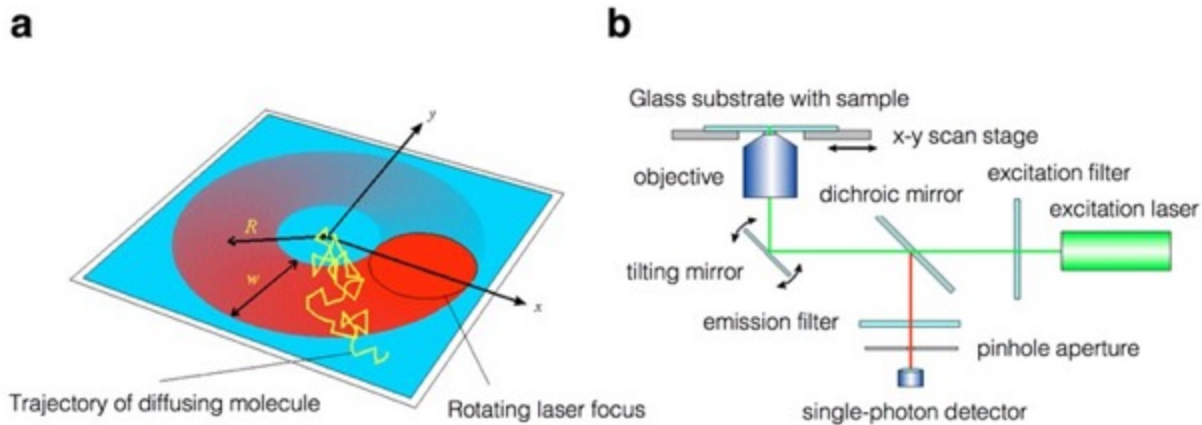


Figura 1.13 Seguimiento orbital. (a) Un foco láser gira alrededor (órbita) de un emisor individual, se registra la intensidad de luz detectada y se puede estimar la posición del emisor analizando la señal detectada. (b) Primera propuesta de implementación experimental de OT. Se utiliza un espejo móvil para mover el láser en una órbita, la excitación y la detección son las mismas que en un microscopio confocal típico. Adaptado de ⁷⁸.

OT se ha implementado en diferentes configuraciones basadas en microscopios de escaneo láser modificados (Figura 1.13b) y su precisión de localización se ha estudiado tanto teórica como experimentalmente^{86,87}. Los primeros trabajos informan una precisión lateral de $\sigma_{xy} \sim 15$ nm con $N \sim 1000 - 2000$ de fotones detectados^{86,87}. Sin embargo, observamos que en montajes más modernos se han notificado precisiones mayores, a saber $\sigma_{xy} \sim 4$ nm con $N \sim 1000 - 2000$ recuentos de fotones⁸¹.

Aunque OT no se considera un método de superresolución, observamos que, si se combina con una conmutación estocástica ON/OFF, podría utilizarse para la obtención de imágenes nanoscópicas, como se ha hecho con MINFLUX o MINSTED. En realidad, del mismo modo que la localización de una molécula individual a través del ajuste de su imagen a un modelo gaussiano no constituye *per se* un método de superresolución, el método de localización OT tampoco lo es. Sin embargo, más allá de las diferencias técnicas, los esquemas de localización mediante iluminación estructurada secuencial están profundamente relacionados. Demostraremos y desarrollaremos ampliamente este concepto en el Capítulo 3 de esta Tesis.

Capítulo 2 - Nanoscopía RESOLFT

paralelizada en células vivas con mayor sensibilidad y resolución

La observación de la interacción de las organelas y los complejos macromoleculares en el interior de las células y los tejidos vivos exige el desarrollo continuo de sistemas ópticos mínimamente invasivos que funcionen con una alta resolución espacio-temporal. En la actualidad, la resolución espacial de la nanoscopía de fluorescencia se aproxima a la nanoescala (1 – 50 nm) mediante el control óptico de los estados fluorescentes de las moléculas, ya sea de forma determinista o estocástica^{39,40,42,56,59,88}. Sin embargo, los enfoques actuales de la nanoscopía de fluorescencia, aunque sean potentes, suelen estar limitados por el requisito de altas dosis de luz, campos de visión pequeños o tiempos de registro lentos.

El problema de las altas dosis de iluminación se ha superado parcialmente mediante el uso de proteínas fluorescentes reversibles (rsFPs)⁸⁹⁻⁹⁴ en enfoques como la Transición Fluorescente Óptica Reversible (RESOLFT)^{33,34,95} como se explicó en la Sección 1.5. La conmutación ON/OFF de la fluorescencia dirigida por coordenadas de las rsFPs requiere intensidades en el rango de W–kW/cm² para producir imágenes con una resolución sub–100 nm resolución espacial. Sin embargo, las implementaciones de RESOLFT basadas en un microscopio confocal necesitan tiempos de registro muy largos para campos de visión moderadamente grandes.

Las implementaciones avanzadas de RESOLFT de campo amplio (WF)^{96,97} pueden alcanzar adquisiciones relativamente rápidas de grandes campos de visión. La técnica WF-RESOLFT se ha implementado con la siguiente secuencia de iluminación: i) las proteínas

fluorescentes se activan (se encienden) con una iluminación uniforme de campo amplio, ii) se transfieren parcialmente a un estado oscuro (se apagan) con la superposición de dos patrones de interferencia incoherentes de período $\sim \lambda/2NA$ que producen puntos de intensidad cero en las intersecciones de sus líneas de intensidad cero, iii) las rsFP en estado brillante se excitan con otra iluminación uniforme de campo amplio. De este modo, se generan zonas de emisión por debajo del límite de difracción. Las imágenes de superresolución se reconstruyen escaneando la muestra con respecto al arreglo estacionario de ceros mientras se detecta la fluorescencia con un arreglo de sensores (cámara sCMOS).

Sin embargo, no se ha explotado todo el potencial de un enfoque RESOLFT paralelizado: las imágenes WF-RESOLFT se han limitado principalmente a estructuras celulares brillantes en 2D. Esta limitación se deriva del hecho de que la iluminación uniforme utilizada para encender los rsFPs provoca una conmutación innecesaria y genera señal proveniente de planos desenfocados de la muestra, lo que dificulta el contraste de la imagen en muestras 3D. Además, dado que la paralelización viene determinada por la periodicidad del patrón de conmutación en OFF, incluso la señal generada por puntos emisores adyacentes en el plano focal se ve gravemente afectada por la interferencia de señal, especialmente en una implementación altamente paralelizada.

Otros enfoques como la Microscopía de Iluminación Estructurada No Lineal^{21,22,98} y su reciente implementación con Activación Patternada⁹⁹ también minimizan la dosis de iluminación si se aplican a las rsFP¹⁰⁰. En estos métodos, la información de superresolución está codificada en el espacio de frecuencias de la imagen y, por lo tanto, tiene que extraerse mediante un procesamiento intensivo de la imagen, que es propenso a los artefactos¹⁰¹. Esto es especialmente relevante en estructuras tenues con una baja relación señal/ruido (SNR), como en las células que exhiben niveles endógenos de expresión de rsFP y en muestras 3D donde la relación señal/fondo (SBR) es baja en una detección de campo amplio. Un nanoscopio capaz de registrar datos robustos, rápidamente y con una resolución espacial sub-100 nm en todo el espacio 3D de las células y los tejidos no se ha desarrollado aún.

Para superar estas limitaciones, desarrollamos MoNaLISA (Molecular Nanoscale Live Imaging with Sectioning Ability), un nanoscopio RESOLFT paralelizado en el que la luz de encendido y la luz de excitación se modulan espacialmente en un conjunto de focos múltiples para mejorar la sensibilidad y la resolución, permitiendo por primera vez capturar la dinámica interna de una célula viva completa con ~ 1 s resolución temporal. Los resultados presentados en este capítulo se han publicado en un artículo revisado por expertos¹⁰².

2.1 Concepto y visión general

Las imágenes de MoNaLISA se realizan con una secuencia de pulsos intercalados de haces modulados espacialmente (láseres CW, modulados en la escala de tiempo del milisegundo). La secuencia de iluminación es la siguiente: i) una matriz de puntos enfocados que se enciende (activación), que llamaremos "matriz multifocal", activa las rsFPs en regiones confinadas, ii) una matriz de ceros de intensidad luminosa apaga la periferia de la rsFP activada, confinando efectivamente las proteínas emisoras a un área de por debajo del límite de la difracción, iii) otra matriz multifocal excita la fluorescencia de las proteínas en el estado brillante generando así la señal de lectura. Una representación 1D de los patrones de iluminación se representa en la Figura 2.1a y una representación 2D en la Figura 2.1g.

El patrón de conmutación OFF, responsable de la superresolución, es esencialmente el mismo que en WF-RESOLFT y presenta ondas estacionarias con mínimos de intensidad en una periodicidad $P_{SW} \sim \lambda/2NA$. En principio, un P_{SW} lo más pequeño posible (la más alta NA) es deseable porque un patrón de interferencia más pronunciado permite utilizar menos luz total sobre la muestra para llevar las proteínas a su estado oscuro. De este modo, se envía menos luz a las células vivas, reduciendo el posible fotodaño. Tanto los patrones de encendido como los de lectura se componen de una rejilla cuadrada de N focos individuales^{103,104} separados por una distancia P_{MF} , tal que $P_{MF} = k P_{SW}$ donde k

es un número entero. Esta alineación de la secuencia de iluminación, genera una matriz cuadrada de focos emisores efectivos de subdifracción con una periodicidad dictada por $P_{MF} = k P_{SW}$. Los puntos emisores se visualizan en una matriz de sensores (cámara) y la señal se adquiere escaneando la muestra con respecto a la matriz estacionaria de focos de activación/lectura, tal como se hace en un microscopio confocal paralelizado¹⁰⁴. Debido a la paralelización, el escaneo de la platina consiste sólo en una pequeña área $A_{scan} = P_{MF}^2 = k^2 P_{SW}^2$.

En la microscopía confocal convencional se añade un microorificio (*pinhole* en inglés) delante del detector para filtrar la señal de fondo proveniente de planos desenfocados. Cuando se utiliza una cámara como fotodetector, una forma directa de obtener el equivalente a un *pinhole* es seleccionar computacionalmente los píxeles de los que se extraerá la señal y descartar la señal de otros píxeles. Esta operación es análoga a la detección con una apertura física de un microorificio y se denominará "*pinholing* digital"¹⁰⁵. En MoNaLISA se dispone una matriz de *pinholes* digitales para que sean confocales con la matriz de puntos emisores, generando así un seccionamiento óptico.

La ventaja clave de MONALISA radica en la posibilidad de separar los puntos emisores mediante la elección de un valor adecuado de k adecuado. Al elegir el valor de k hay que tener en cuenta que los fotones detectados proveniente de cada punto emisor (de tamaño sub-difracción) se visualizan en el sensor de la cámara como imágenes limitadas por difracción de un área de diámetro $\sim \lambda/NA$, lo que impone un límite mínimo de $k > 2$ para separar esas señales eficientemente.

Las implementaciones anteriores de WF-RESOLFT funcionan con una periodicidad de puntos emisores dictada únicamente por P_{SW} es decir, equivalente a utilizar $k = 1$. Por lo tanto, la extracción de la información requiere el uso de un *pinhole* digital muy pequeño en la detección o un desmezclado computacional intensivo, que causan una pérdida de señal (Figura 2.1b, gráfico de la derecha, área gris) que finalmente resulta en imágenes con bajo *SNR* o posibles artefactos debidos a los algoritmos de reconstrucción, respectivamente. Como ejemplo, el *pinhole* digital con una gaussiana con *FWHM* de

50 nm como se utilizó en anteriores implementaciones de WF-RESOLFT^{96,97} conduce a más de 60% de pérdida en SNR (Figura 2.1d, línea punteada gris) en comparación con el uso de un *pinhole* de $FWHM \sim 250$ nm, es decir, igual al tamaño de la PSF de emisión.

Por el contrario, utilizando $k > 2$ MoNaLISA permite separar claramente las señales procedentes de los puntos emisores mediante la aplicación de un *pinhole* digital óptimo con $FWHM \sim \lambda/2NA$. De este modo, la eficiencia de colección de fotones y el seccionamiento óptico pueden optimizarse sin comprometer la interferencia y la calidad de la imagen (Figura 2.1e, línea punteada verde). Aunque utilizar valores mayores de k es ventajoso para evitar la interferencia de señal y realizar un filtrado digital eficiente, tiene la desventaja de ampliar el área de escaneo necesaria para completar una imagen ya que $A_{scan} \propto k^2$. El valor óptimo k se evaluó experimentalmente en la sección 2.6.

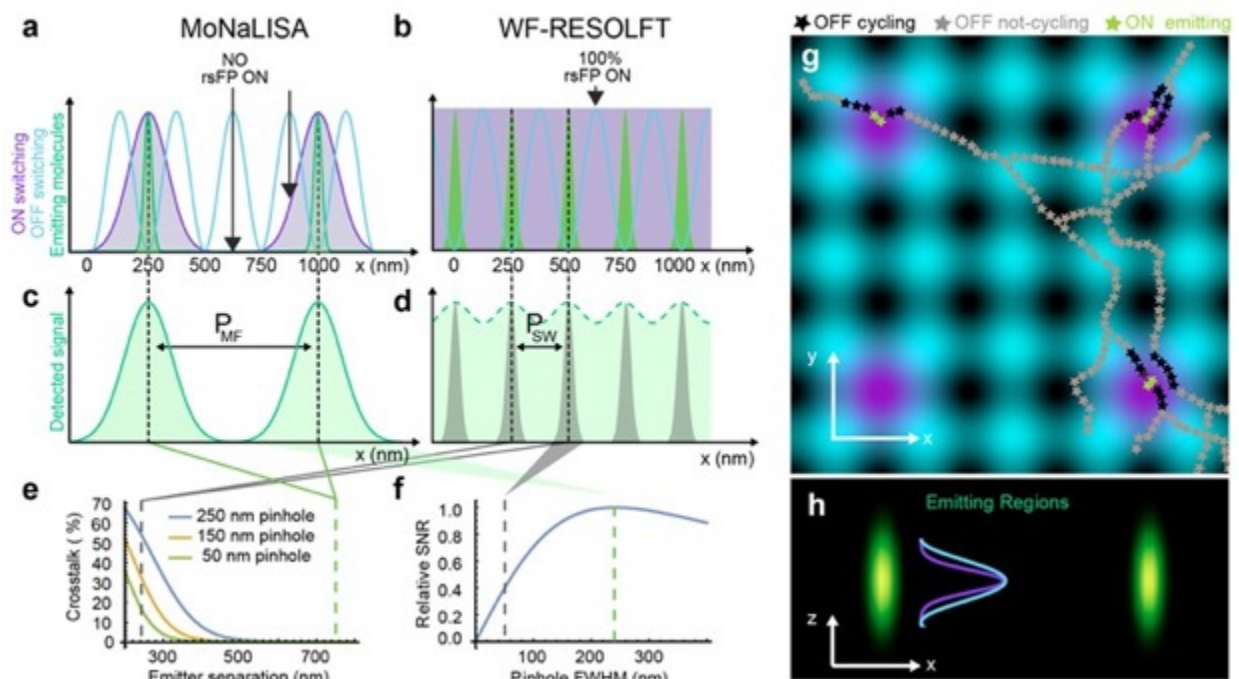


Figura 2.1 Esquema del RESOLFT multifocal paralelizado (MoNaLISA). (a) Iluminaciones MoNaLISA y (b) WF-RESOLFT y distribuciones de fluorescencia detectadas para MoNaLISA (c) y WF-RESOLFT (d). (e) La mayor separación de los focos $P_{MF} > P_{SW}$ en MoNaLISA permite

la detección de toda la señal de fluorescencia sin interferencias. (f) Eficacia de la colección de fluorescencia para diferentes tamaños de *pinhole* digital. El tamaño de 250 nm usado en MoNaLISA (línea discontinua verde) aumenta la colección de fotones y la SNR en comparación con el 50 nm de WF-RESOLFT (línea discontinua gris). (g) Representación 2D de la iluminación MoNaLISA descrita en (a): Encendido y excitación (violeta), apagado (azul). Se ilustran los filamentos que muestran rsFPs en diferentes estados. (h) Las iluminaciones multifocales proporcionan confinamiento de la fluorescencia (regiones emisoras en verde) en 3D como se muestra en la $x - z$ sección. La resolución axial se incrementa aún más por un proceso de dos pasos debido a la fotoactivación (violeta) seguida de la excitación de fluorescencia (azul).

La calidad de la imagen de MoNaLISA se ve reforzada por el ahorro de la fatiga de la conmutación ON-OFF. En efecto, su conmutación ON de múltiples focos conduce a una población de proteínas espacialmente confinada, capaz de interactuar con la luz de conmutación OFF, en las posiciones exactas donde se lee la señal. De este modo, la mayoría de las proteínas se mantienen en estado OFF y sólo unas pocas están expuestas a los máximos de intensidad de los patrones ON y OFF en el mismo ciclo, lo que es extremadamente importante para minimizar los ciclos innecesarios y el fotoblanqueo. Por el contrario, en WF-RESOLFT toda la población de rsFPs se expone repetidamente a los picos de intensidad de la luz de encendido y apagado, lo que provoca ciclos innecesarios, especialmente en 3D.

Además de ahorrar ciclos ON/OFF y mejorar la eficiencia de la detección, el uso de patrones de focos múltiples tanto para la conmutación ON como para la excitación de fluorescencia permite, por primera vez en un enfoque microscopía paralelizada basado en rsFPs, el seccionamiento óptico confocal y la resolución lateral sub-100 nm simultáneamente. Dos factores contribuyen a la capacidad de seccionamiento del nanoscopio. En primer lugar, la excitación focalizada y el *pinholing* digital en la detección rechazan la emisión desenfocada y mejoran el seccionamiento óptico como en cualquier sistema confocal. En segundo lugar, el confinamiento de la señal generada por la luz enfocada se ve reforzado por la absorción sucesiva de la luz enfocada de activación y de excitación por parte de las proteínas fluorescentes, lo que conduce a una dependencia cuadrática del proceso de emisión con respecto a las intensidades de iluminación. Esto

mejora tanto la resolución lateral como la axial, de forma análoga a lo que ocurre en la microscopia de dos fotones. Por lo tanto, llamaremos a la modalidad de imagen sin paso de conmutación a OFF "confocal mejorada" para dar cuenta de esta mejora en la resolución. Este efecto se describirá con más detalle en la sección 2.6.

2.2 Proteínas fluorescentes objetivo y configuración óptica

MoNaLISA se implementó para rsEGFP292 y dronpa(M159T)⁹³. Estas proteínas fluorescentes reversiblemente conmutables son conducidas a un estado brillante (ON) por luz de 405 nm y pueden volver a un estado oscuro (OFF) con luz de 488 nm. Su absorción fluorescente está en el rango 460 – 490 nm y la misma longitud de onda puede utilizarse para la conmutación a OFF y la excitación fluorescente.

El montaje experimental se describe en la Figura 2.2. La luz de activación se obtuvo de un diodo láser con una longitud de onda de 405 nm (Cobolt 06-01, 200 mW). La luz de apagado y excitación fluorescente se realizó con dos láseres de diodo 488 nm (Cobolt 06-01 200 mW). La salida de los tres láseres se limpió espectralmente con filtros de paso de banda (ZET 405/10 y ZET 488/10, Chroma) y luego se amplió con un telescopio (AC254-30-A-ML y AC254-300-A-ML, Thorlabs).

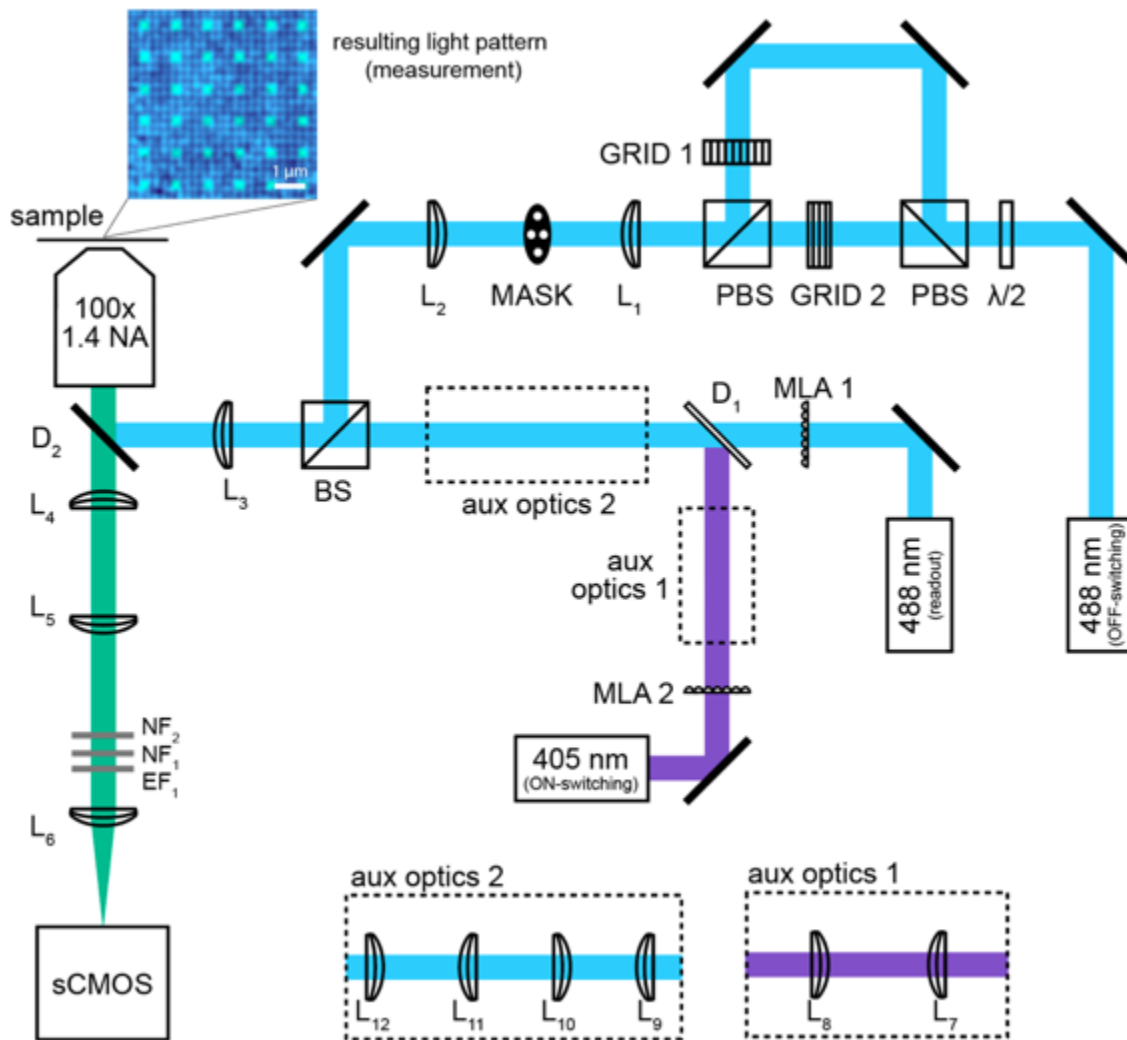


Figura 2.2 Representación esquemática del montaje óptico. MLA 1, MLA 2: conjuntos de microlentes, GRID 1, GRID 2: rejillas de difracción, PBS: divisor de haz polarizante, BS: divisor de haz no polarizante con 90/10 o 50/50 reflexión/transmisión, MASK: máscara construida a medida para dejar pasar sólo los órdenes 1 y -1 de los dos haces polarizados ortogonalmente, NF: filtro *notch*, EF: filtro de emisión, y D: espejo dicróico. L1: $f = 100$ mm, L2: $f = 300$ mm, L3: $f = 300$ mm, L4: $f = 250$ mm, L5: $f = 250$ mm, L6: $f = 200$ mm, L7: $f = 200$ mm. Óptica auxiliar 1. L9: $f = 200$ mm, L10: $f = 150$ mm, L11: $f = 250$ mm, L12: $f = 250$ mm. Óptica auxiliar 2. L7: $f = 100$ mm, L8: $f = 100$ mm

Los perfiles de los haces se limpian espacialmente con un pinhole (P20S, Thorlabs) en el foco intermedio del telescopio para obtener haces gaussianos con un ancho a mitad de altura de ~ 10 mm.

El haz de luz 405 nm y uno de los haces 488 nm haz se enfocan con las respectivas matrices de microlentes (MLA-150-5C-M, Thorlabs) que crean el patrón de multifocos. Posteriormente, para la trayectoria de la luz 405 nm se utiliza un telescopio auxiliar (Aux optics 1) para corregir un desajuste cromático en el aumento del sistema óptico. Los patrones multifocales de los haces 405 nm y el 488 nm se combinan en el mismo camino óptico mediante un espejo dicroico (ZT458RDC, Chroma). Un segundo conjunto de telescopios (Aux optics 2) se utiliza como óptica de relevo pero también para ajustar la periodicidad de los focos y el tamaño del haz de 488 nm. Por ejemplo, utilizamos lentes de distancias focales $f = 300$ mm (Thorlabs AC254-300-A-ML) y $f = 400$ mm (AC254-400-A-ML) para obtener un periodo de $P_{MF} = 750$ nm. Este plano intermedio se visualiza en la muestra mediante la lente de tubo (AC508-300-A-ML, Thorlabs) y el objetivo (HCX PC APO 100 \times /1,40-0,70 oil, Leica Microsystems), creando una iluminación de patrón de focos múltiples.

El patrón de conmutación en OFF se ha adaptado a partir de la implementación usada en WF-RESOLFT⁹⁶, ya que proporciona un conjunto robusto de ceros de intensidad manteniendo la simplicidad en la instrumentación. La luz colimada se dirige a través de una placa de media onda (B. Halle, Alemania) y un divisor de haz polarizado (Thorlabs CCM1-PBS251/M). La placa de media onda se ajusta para dividir por igual la luz según la orientación p y s . Después del divisor de haz de polarización (PBS), la luz se envía a través de redes de difracción de fase hechas a medida en SiO₂ con líneas de 437 nm de altura y un paso de 25 μ m (Laser Laboratorium Göttingen). Las rejillas se orientaron de forma que las líneas de la rejilla fueran paralelas a la polarización de la luz entrante. Después de las rejillas, las trayectorias de la luz se recombinaron con otro divisor de haz polarizante (Thorlabs CCM1PBS251/M). Las rejillas se colocaron en el plano focal posterior de un objetivo de $f = 100$ mm (AC254-100-A-ML, Thorlabs), la luz difractada se enfocó entonces hacia una máscara en la que se bloquearon todos los órdenes de

difracción excepto $+1$ y -1 ; estos órdenes se retransmitieron mediante un par de lentes (AC508-300-A-ML, Thorlabs) a cuatro puntos en el plano focal posterior del objetivo, donde se recombinaron y crearon dos patrones sinusoidales regulares incoherentes en direcciones perpendiculares con un periodo $P_{SW} = 250$ nm. El periodo de ambos patrones sinusoidales puede ajustarse cambiando la distancia focal del primer objetivo tras las rejillas. Para combinar la trayectoria de la luz de encendido/excitación con la trayectoria de la luz de apagado utilizamos un divisor de haz no polarizante 10/90 (CCM1-BS028/M, Thorlabs). Elegimos esta relación para compensar el hecho de que la ingeniería óptica con rejillas de difracción y filtros espaciales del patrón de conmutación en OFF es mucho menos eficiente que las microlentes que producen los conjuntos multifocales.

Las trayectorias de los haces de encendido, excitación y apagado se reflejan con espejo dicróico (ZT488RDC, Chroma) en el objetivo. La luz de fluorescencia procedente de la muestra es transmitida por el mismo dicróico y se utiliza un telescopio auxiliar (L4, L5) como óptica de relevo. En el funcionamiento a un color, la luz se dirige entonces a través de filtros *notch* 405 y 488 nm (ZET405NF y ZET488NF, Chroma), un filtro de emisión de fluorescencia de pasabanda (ET535/70, Chroma) y, finalmente, la imagen se transmite a una cámara sCMOS (ORCA Flash 4.0 V2, Hamamatsu) mediante un $f = 200$ mm lente (AC254-200-A-ML, Thorlabs). El patrón de luz resultante puede visualizarse y caracterizarse utilizando una muestra fluorescente cubierta con una fina capa de moléculas fluorescentes excitables a 405 y 488 nm. En la Figura 2.2 se muestra, a modo de ejemplo, una pequeña porción de una medición del patrón.

Para la previsualización de muestras añadimos una trayectoria de campo amplio, que puede alternarse con la iluminación principal de las imágenes de MoNaLISA volteando un espejo motorizado. Para el encendido y la excitación utilizamos 405 nm (láser de diodo de picosegundos BDL-405, Becker y Hickl) y 473 nm luz láser (50 mW, 04-01, 473 nm, Cobolt) que se coliman y expanden mediante un telescopio (AC508-30-A-ML y AC508-250-A-MLThorlabs) y luego se enfocan en el plano focal posterior del objetivo mediante la misma lente utilizada en la trayectoria óptica multifocal descrita anteriormente (AC508-300-A-ML, Thorlabs).

Esta implementación experimental de MoNaLISA contó con un $P_{SW} = 250$ nm y $N = 4356$ focos. P_{MF} se probó experimentalmente en 500 nm ($k = 2$), 750 nm ($k = 3$), y 1250 nm ($k = 5$).

2.3 Instrumentación, control y adquisición de datos

Los tres láseres (encendido, apagado y lectura) pueden encenderse y apagarse digitalmente a través de una tarjeta DAQ (National Instruments NIDAQ PCI 6371). El mismo dispositivo DAQ se utiliza para sincronizar la secuencia de pulsos láser, la lectura de la cámara y el escaneo. El láser de lectura se sincroniza con la exposición de la cámara sCMOS para detectar la emisión de fluorescencia. El barrido de la muestra se realiza con una platina piezoeléctrica (Nanomax TS, Thorlabs Inc.). La duración y la secuencia de los pulsos láser, la potencia de salida de los láseres, el tiempo de exposición de la cámara y todos los demás parámetros relevantes pueden controlarse a través de una interfaz gráfica de usuario que forma parte de nuestro propio proyecto de control de microscopios de código abierto desarrollado en Python y basado inicialmente en *Tormenta*¹⁰⁶. Este proyecto de software es un esfuerzo para contribuir a la comunidad de código abierto y proporciona una alternativa al software comercial disponible para el control de microscopios de barrido. Está en constante desarrollo y la configuración actual está disponible en <https://github.com/TestaLab>. El software utiliza adaptaciones de los controladores de instrumentos disponibles, aportados generosamente por otros miembros de la comunidad de código abierto <https://github.com/pearu/pylibnidaqmx>, https://github.com/ZhuangLab/storm-control/tree/master/sc_hardware/hamamatsu, <https://github.com/LabPy/lantz>.

El patrón de multifocos debe identificarse en el sensor de la cámara para definir los píxeles del pinholing digital. Esto se logró con un algoritmo de alineación que obtiene las coordenadas de alineación realizando una correlación entre el patrón de referencia de multifocos y una imagen de una muestra.

2.4 Adquisición de datos y reconstrucción de imágenes

Una medición MoNaLISA consiste en adquirir una serie de fotogramas de la cámara, cada una de las cuales corresponde a un paso del escaneo de la platina. En el caso de las imágenes 2D, el escaneo de la platina se realiza sobre un área $A_{scan} = P_{MF}^2 = k^2 P_{SW}^2$ en pasos regulares. Cada fotograma de la cámara contiene la señal de un número de puntos emisores de tamaño sub-difracción determinados por los patrones de luz de encendido y apagado (Figura 2.3a). Cuando se adquieren imágenes, los puntos emisores de tamaño subdifracción aparecen como señales limitadas por la difracción en el sensor de la cámara. (Figura 2.3b). Una serie de píxeles alrededor de cada señal definen los pinholes digitales (línea de puntos en la figura 2.3b). Hemos utilizado 9 x 9 píxeles, que corresponden a un área de $585 \times 585 \text{ nm}^2$ en la muestra. La señal dentro de cada pinhole digital se ajusta (cuadrados mínimos) a una función gaussiana con $FWHM = \lambda/2NA$ más un fondo constante. La amplitud neta de la señal se asigna a la posición del paso de escaneo. A continuación, el proceso se repite para todos los fotogramas de la cámara del escaneo para completar una imagen superresuelta.

La modelización de los datos de cada pinhole digital como una gaussiana con fondo tiene en cuenta el hecho de que las muestras fotografiadas suelen ser tridimensionales. Las contribuciones de la señal de los planos desenfocados se consideran como un fondo constante.

Es interesante señalar que este procedimiento de pinholing digital con múltiples píxeles de un detector de matriz es superior a una detección confocal con un pinhole físico porque contiene más información sobre la distribución de la intensidad de la señal. Observamos que puede ser posible perfeccionar el modelo, por ejemplo con funciones que podrían representar mejor las señales desenfocadas o el ruido de la cámara sCMOS. Además, en lugar del método de diferencia mínima de cuadrados, se podría utilizar un enfoque de Estimador de Máxima Verosimilitud.

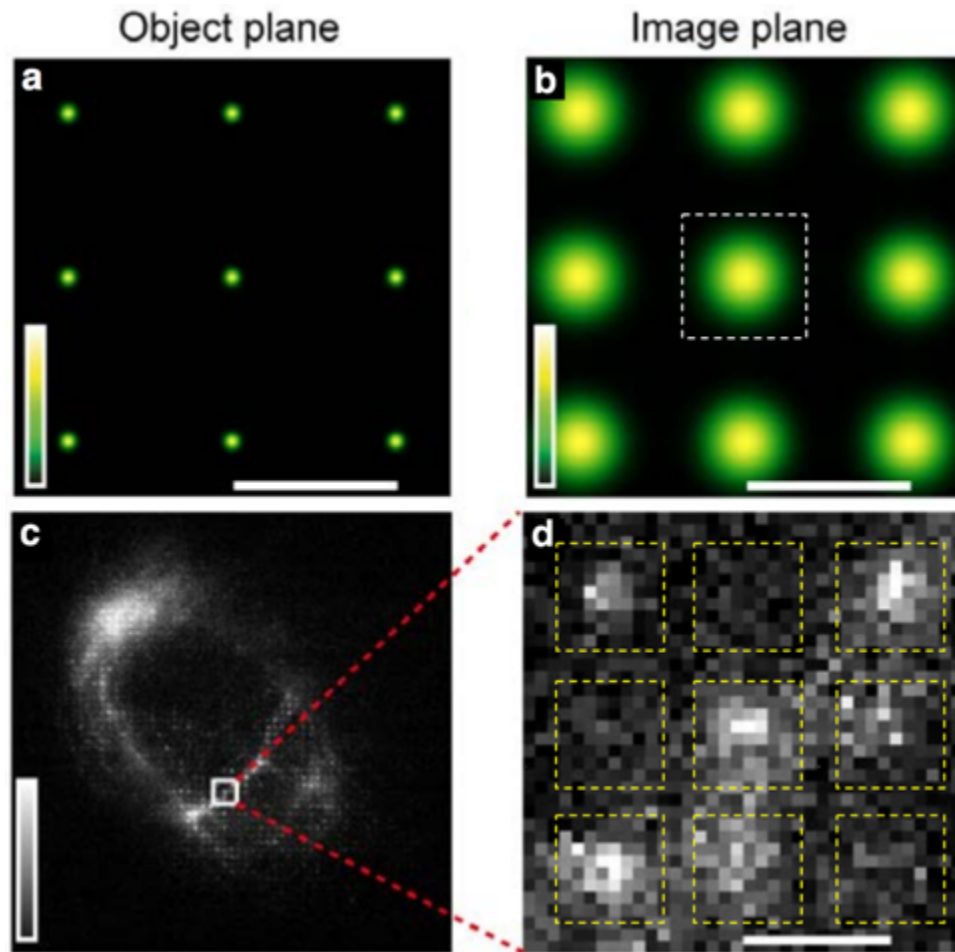


Figura 2.3 Reconstrucción de imágenes. (a) Esquema de los puntos emisores subdifracción en una región de la muestra. (b) Esquema de las imágenes en el sensor de la cámara de los puntos emisores de subdifracción de (a). El cuadrado con línea de puntos indica el pinhole digital para la señal central. (c) Imagen cruda de un fotograma de una medición. (d) Detalle de una pequeña región de (c) que comprende la señal de $3 \times 3 = 9$ puntos emisores subdifracción. Los agujeros digitales correspondientes están marcados por las líneas de puntos amarillas. Barras de escala: 750 nm.

Durante la adquisición de cada fotograma, las rsFPs pasan por ciclos entre sus estados ON-OFF provocando que una fracción de ellas sufra una transición a un estado no fluorescente permanente (fotoblanqueo). Para compensar esto, se puede implementar una corrección de fotoblanqueo en la reconstrucción de las imágenes. En un fotograma

determinado, la corrección consiste en normalizar las señales de cada pinhole digital dividiéndolas por la señal media del fotograma.

Debido a la conmutación negativa de los rsFP utilizados en este esquema MoNaLISA, hay emisión de luz durante la fase de conmutación en OFF. Esta luz fluorescente llegará al sensor de la cámara antes de que se exponga a la señal de fluorescencia útil y provocará un tipo específico de ruido causado por la carga atrapada en los píxeles. Se descubrió que la cantidad de carga atrapada depende de los píxeles, lo que significa que las distintas zonas de la imagen final, detectadas en diferentes píxeles del sensor, pueden mostrar ligeras variaciones de intensidad. Resolvimos este problema identificando primero el valor base medio de cada píxel durante un escaneo, causado por las características de ruido inherentes a ese píxel. Para ello, creamos una imagen media de todos los fotogramas recogidos durante una adquisición y creamos un mapa de los píxeles con más ruido y su valor base medio. Esta imagen se puede sustraer de cada fotograma de datos en crudo para minimizar el efecto de este fenómeno.

2.5 Seccionamiento óptico mejorado

La capacidad de seccionamiento óptico de MoNaLISA proviene de los patrones de iluminación enfocados de conmutación en ON y de lectura. El patrón de luz de conmutación OFF es uniforme en la dirección axial y no proporciona ninguna capacidad de seccionamiento. Cabe destacar que, dado que la fluorescencia detectada depende de la absorción concomitante de la luz de conmutación en ON y de la luz de lectura, presenta una dependencia casi cuadrática de la iluminación. El volumen emisor efectivo puede estimarse como el producto de la PSF de encendido y la PSF de lectura. Para la dimensión axial tenemos:

$$Exp\left(-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_{\text{eff}}^2}\right) \approx Exp\left(-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_{405}^2}\right) \times Exp\left(-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_{488}^2}\right) \quad (2.1)$$

$$\sigma_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{\sigma_{405}^2 \times \sigma_{488}^2}{\sigma_{405}^2 + \sigma_{488}^2}} \quad (2.2)$$

Donde $\sigma = \frac{\text{FWHM}_z}{2.355}$ y $\text{FWHM}_z \approx \frac{2\lambda}{NA^2}$. Así, para una $NA = 1.4$ tendremos $\sigma_{405} = 175$ nm, $\sigma_{488} = 211$ nm y $\sigma_{\text{eff}} = 136$ nm. Esto da lugar a una anchura máxima axial efectiva a mitad de altura de $\text{FWHM}_{z_{\text{eff}}} = 2.355 \sigma_{z_{\text{eff}}} \approx 320$ nm que es ~ 1.4 veces mejor que lo que se esperaría de un microscopio confocal convencional operado a 488 nm utilizando la misma óptica.

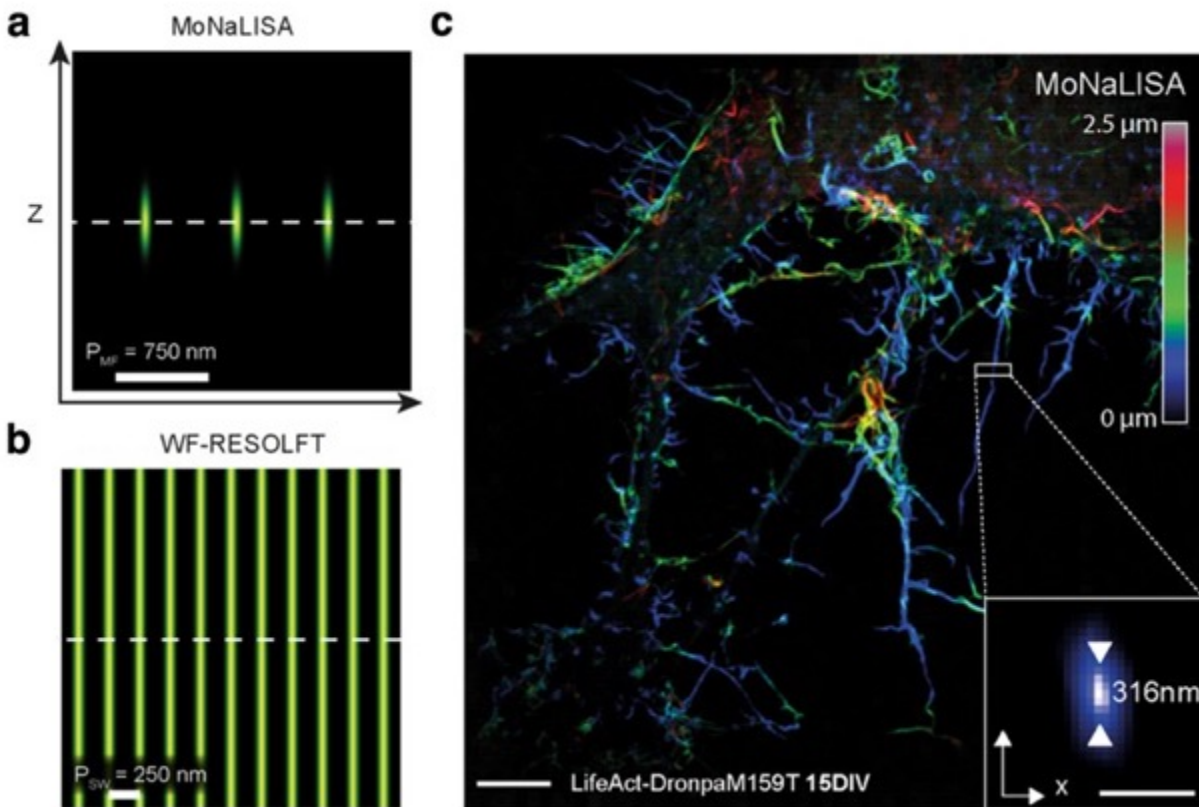


Figura 2.7. Confinamiento espacial de la emisión de fluorescencia en MoNaLISA y WF-RESOLFT. Distribución espacial calculada de los volúmenes de emisión para MoNaLISA (a) y WF-RESOLFT (b) mostrando un claro confinamiento de la señal a lo largo del eje óptico para MoNaLISA. (c) Imagen 3D de MoNaLISA de una neurona del hipocampo de 15 DIV que expresa

LifeAct-DronpaM159T. Barra de escala: 5 μm . El recuadro es la $x - z$ proyección máxima de un filamento de actina. Un ajuste gaussiano de la extensión axial del filamento da como resultado un FWHM de 316 nm. Barra de escala: 500 nm.

La figura 2.7a muestra la distribución espacial calculada en el plano xz de los volúmenes emisores para MoNaLISA, y la Figura 2.7b para el WF-RESOLFT convencional. Dado que la capacidad de seccionamiento óptico de MoNaLISA no depende de la luz de apagado, el mismo montaje puede utilizarse para obtener imágenes utilizando únicamente los patrones de luz de encendido y lectura. A estas imágenes las llamaremos "confocal mejorada".

La Figura 2.7c muestra un ejemplo de imagen 3D MoNaLISA de actina filamentosa en una neurona del hipocampo que expresa LifeAct-DronpaM159T, donde se determinó que el seccionamiento axial era $\sigma_{z_{\text{eff}}} \approx 316$ nm.

2.6 Optimización de la distancia de separación entre focos

Pequeñas separaciones P_{MF} (pequeñas k) son deseables porque consiguen una mayor paralelización y, por tanto, una mayor rapidez en la obtención de imágenes, pero pueden dar lugar a una mayor interferencia y/o comprometer la capacidad de seccionamiento óptico del sistema. Por otro lado, los sistemas muy grandes P_{MF} garantizan una baja interferencia de señal y un buen seccionamiento óptico, pero el escaneo necesario para obtener una imagen completa escala cuadráticamente con P_{MF} por lo que se reduce considerablemente la velocidad de obtención de imágenes.

Evaluamos experimentalmente el efecto de P_{MF} calculando la cantidad de fondo detectado en las imágenes confocales mejoradas. La figura 2.8 muestra imágenes de células U2OS que expresan endógenamente vimentina-rsEGFP2 obtenidas bajo las tres modalidades: campo amplio convencional, confocal mejorada y MoNaLISA. Encontramos que a $P_{MF} =$

500 nm ($k = 2$) el fondo desenfocado sigue siendo visible en la imagen confocal mejorada (Figura 2.8a). Para $P_{MF} = 750$ nm ($k = 2$) observamos un claro efecto de seccionamiento óptico (Figura 2.8b), que no mejora al aumentar P_{MF} a 1250 nm ($k = 5$). Por lo tanto, en todas las mediciones se utilizó $P_{MF} = 750$ nm se utilizó en todas las mediciones.

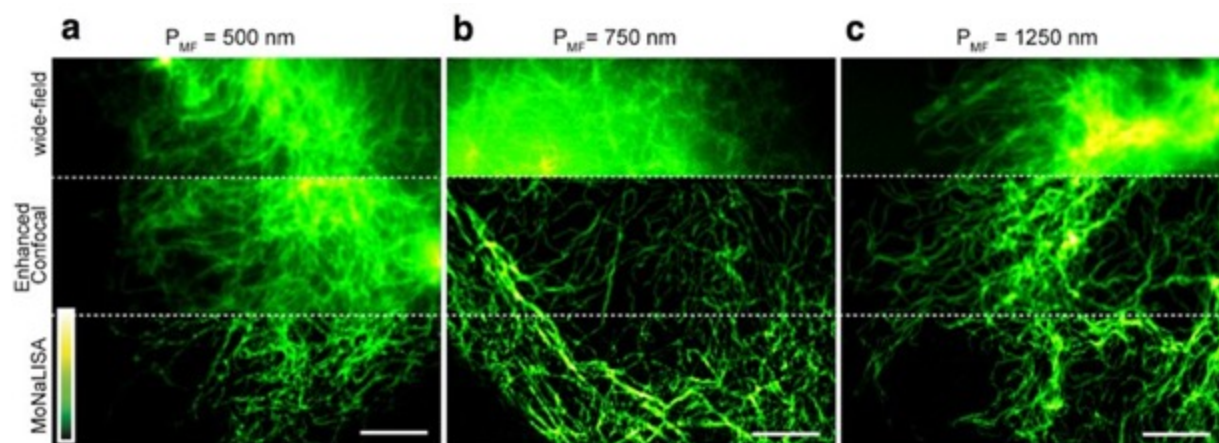


Figura 2.8. Imágenes de MoNaLISA con diferentes periodicidades de multifocos P_{MF} . Todas las imágenes muestran células U2OS que expresan endógenamente vimentina-rsEGFP2. Las tres células de (a), (b) y (c) fueron fotografiadas con diferentes P_{MF} : 500 nm (a), 750 nm (b) y 1250 nm (b) y el mismo patrón de conmutación OFF con $P_{SW} = 250$ nm. Además, cada célula se registró con diferentes modalidades de imagen: campo amplio (sección superior), confocal mejorada (sección central) y MoNaLISA (sección inferior). Barras de escala: 5 μ m.

A partir de esta caracterización experimental, junto con otros cálculos y simulaciones que se realizaron y que se describen en ¹⁰², podemos concluir que, a diferencia de las implementaciones anteriores de RESOLFT paralelizadas, MoNaLISA tiene un rendimiento equivalente al de un RESOLFT de escaneo puntual en términos de sensibilidad, seccionamiento óptico y resolución, pero aumenta masivamente la velocidad de obtención de imágenes ($\sim 1 - 2$ s frente a $\sim 10 - 60$ min) al paralelizar la adquisición por un factor > 4000 . En las siguientes secciones, se presentarán los resultados de las imágenes 3D y dinámicas de lapso de tiempo de diferentes sistemas biológicos.

2.7 Imágenes de superresolución en células vivas

El rendimiento de MoNaLISA para obtener imágenes superresueltas en células vivas se evaluó adquiriendo y analizando imágenes de células U2OS vivas que expresaban vimentina-rsEGFP2 endógena (Figura 2.4a). Las imágenes MoNaLISA se obtuvieron con las siguientes intensidades de luz (I) y tiempos de pulso (T) para la activación, el apagado y la lectura: $I_{on} = 540 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 350 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 1.5 \text{ ms}$, $I_{readout} = 800 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 1.5 \text{ ms}$.

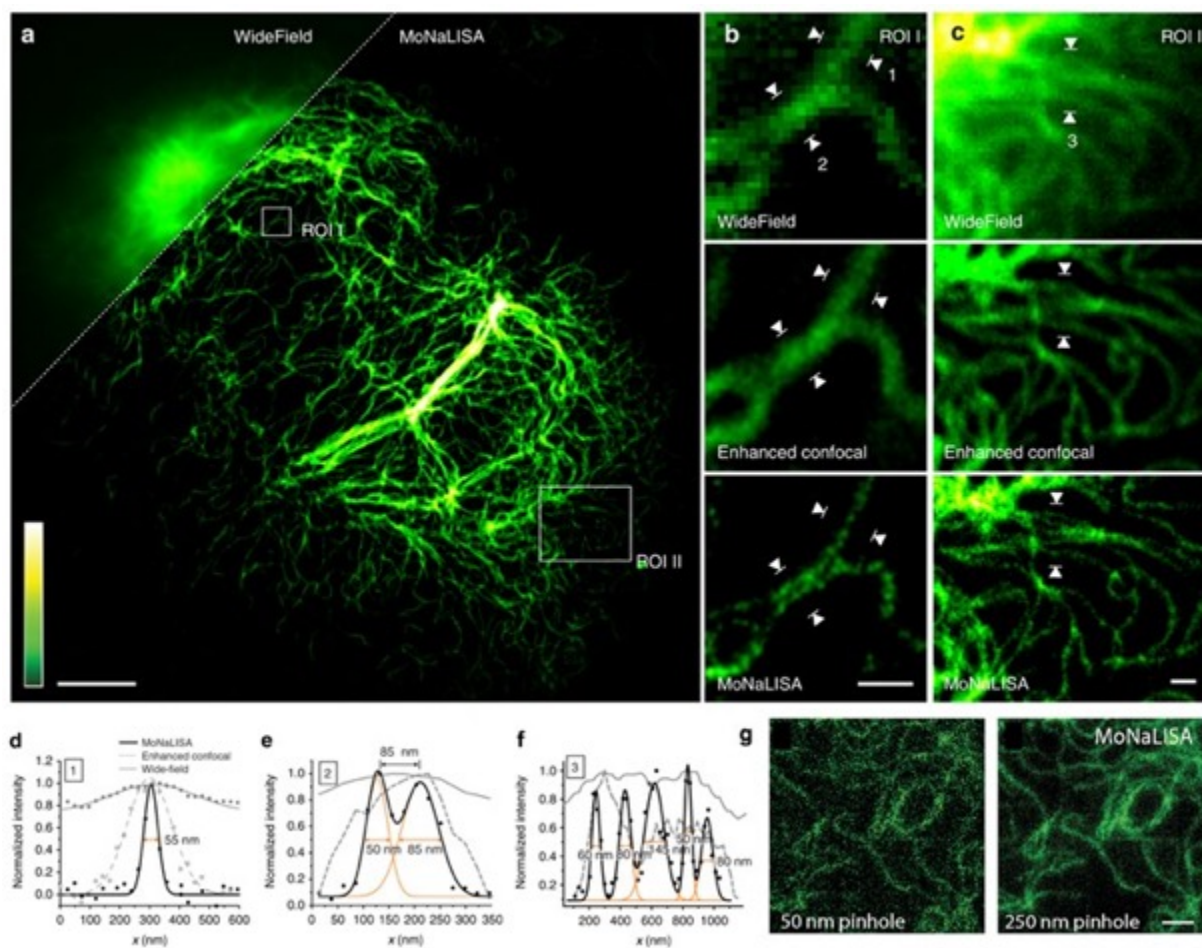


Figura 2.4. Resolución espacial y contraste de la imagen. (a) Imagen superresuelta de vimentina-rsEGFP2 endógena en una célula U2OS viva. Esquina superior izquierda en modo de

campo amplio limitado por difracción (recuadro). Barra de escala de 5 μm . **(b)** y **(c)** Regiones ampliadas que muestran imágenes de campo amplio, confocal mejorada y MoNaLISA. Barra de escala de 500 nm. **(d)** Perfiles de intensidad normalizados representativos (cuatro líneas promediadas) medidos a lo largo de los filamentos marcados con las puntas de flecha blancas no. 1 en **(b)**. Los ajustes gaussianos de los datos muestran un FWHM de 55 ± 5 nm, 180 ± 10 nm y 335 ± 45 nm para las imágenes en modo MoNaLISA, confocal mejorado y de campo amplio, respectivamente (\pm s.e.m.). **(e)** Perfiles de intensidad normalizados (cuatro líneas promediadas) medidos a través de los filamentos marcados con las puntas de flecha blancas no. 2 en **(b)**. El ajuste gaussiano (línea negra) para los dos filamentos muestra un FWHM de 50 ± 5 nm y 85 ± 10 nm, respectivamente, y una separación de 85 ± 5 nm (\pm s.e.m.). **(f)** Perfil de intensidad normalizado medido en **(c)** a través de las flechas blancas. Los datos de MoNaLISA muestran cinco filamentos distintos que no pueden resolverse utilizando imágenes confocales o de campo amplio. **(g)** Imagen generada con un pinhole digital de 50 nm, como se utiliza habitualmente en WF-RESOLFT para minimizar la interferencia de señal, comparada con la imagen reconstruida con un pinhole digital gaussiano con un FWHM de 250 nm utilizado en MoNaLISA.

Las imágenes fueron reconstruidas a partir de 900 fotogramas crudos registrados al realizar un escaneo de $P_{MF} \times P_{MF}$ (750 x 750) nm² con pasos de 25 nm. Cada fotograma en crudo se basa en una duración de ciclo de conmutación dentro de 1.6–3.5 ms, lo que da lugar a resoluciones temporales de 1.4–3.2 s por imagen de superresolución. Las imágenes MoNaLISA resolvieron claramente tramos de vimentina endógena con tamaños de hasta 45–65 nm (Figura 2.4b-f), que habrían sido indistinguibles en el campo amplio e incluso en las imágenes confocales mejoradas adquiridas sin la conmutación en OFF. Es importante destacar que el contraste mejorado nos permitió obtener imágenes de filamentos pequeños y tenues, que se habrían perdido con las implementaciones anteriores de WF-RESOLFT debido a la menor SNR causada por la colección ineficiente de fotones (Figura 2.4g) y el fondo desenfocado.

Proporcionamos una cuantificación robusta y estadísticamente significativa de la resolución midiendo no un solo filamento aislado, sino un conjunto representativo en la imagen (Figura 2.5a-b). La estimación de la resolución se obtiene, por tanto, a partir del histograma de la anchura de los filamentos de vimentina (Figura 2.5c), lo que da como resultado $\Delta x = 55 \pm 10$ nm.

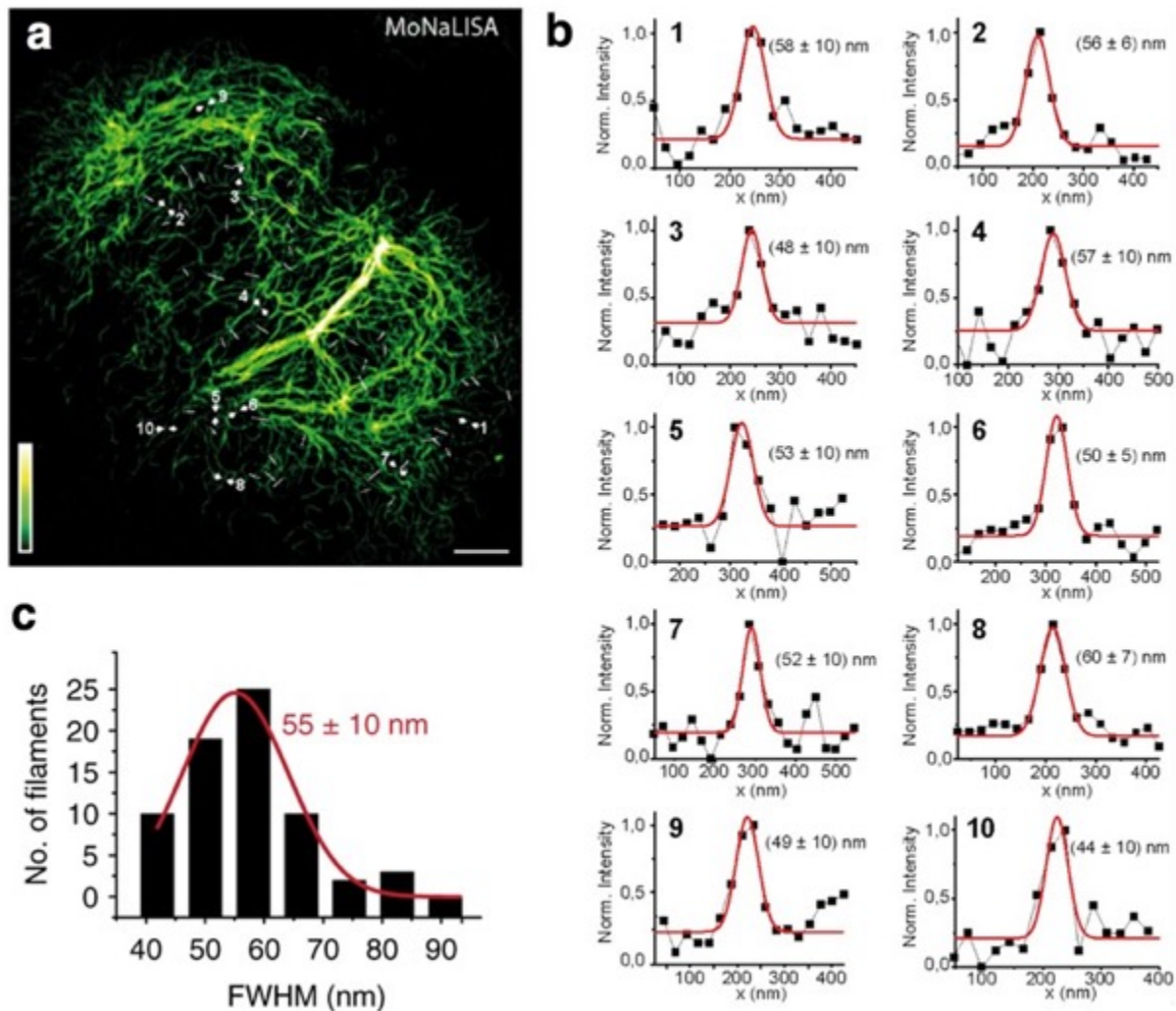


Figura 2.5 Cuantificación de la resolución espacial. (a) Imagen MoNaLISA de células U2OS vivas que expresan endógenamente vimentina-rsEGFP2. Barra de escala: 5 μ m. En la imagen se muestran perfiles de líneas medidos representativos, cada perfil es el promedio de líneas de 4 px de ancho correspondientes a una longitud de filamentos de 100 nm. Los valores *FWHM* se utilizaron para estimar la resolución del sistema óptico. (b) La intensidad medida ajustada con curvas gaussianas y relacionadas *FWHM* para 10 perfiles de líneas representativos de los filamentos de vimentina que están marcados en la imagen de (a). (c) Histograma de 70 anchos de filamentos independientes medidos en la imagen de (a), el valor medio es de 55 ± 10 nm (media ± std).

A continuación, estudiamos sistemáticamente la dependencia de la resolución de la intensidad de luz de conmutación en ON y en OFF. En primer lugar, encontramos la intensidad de luz de conmutación en ON más baja en la que más del 90% de las proteínas se recuperan al estado fluorescente, es decir, el nivel de saturación (Figura 2.6a). Esta intensidad de luz de conmutación en ON es óptima, ya que niveles más altos de potencia no darán lugar a una ganancia de señal y sólo contribuirán al fotodeterioro de la muestra y al fondo de fluorescencia.

Posteriormente, con esta potencia óptima de conmutación en ON, modulamos la potencia de luz de conmutación en OFF. La figura 2.6b muestra la dependencia de la resolución en función de la potencia de conmutación OFF para $P_{MF} = 1250$ nm y $P_{SW} = 250$ nm ($k = 5$) y $P_{SW} = 312.5$ nm ($k = 4$). Como era de esperar, encontramos que las periodicidades más pequeñas permiten resoluciones más altas a potencias más bajas y encontramos que ~ 50 nm era la resolución más alta que podíamos alcanzar sin comprometer la SNR. En la Figura 2.6c se muestran imágenes representativas con potencias de luz OFF crecientes (de izquierda a derecha).

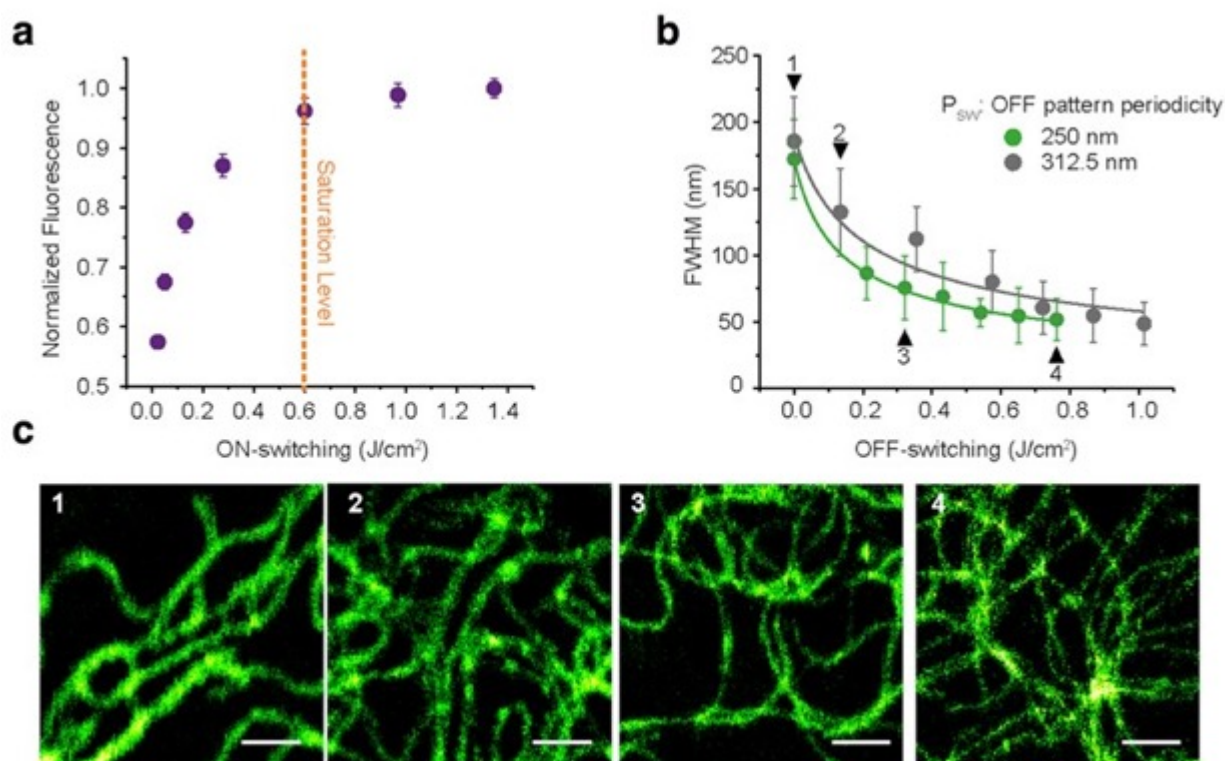


Figura 2.6. Cinética de conmutación y resolución espacial. (a) Cinética de conmutación en función de las dosis de luz a 405 nm. Los experimentos se realizan en células U2OS que expresan endógenamente vimentina-rsEGFP2. Cada punto de datos es la media de 10 ciclos de la proteína (\pm std). En cada ciclo la rsFPs se ilumina a 488 nm por 50 ms en $170 \text{ W}/\text{cm}^2$ para apagarla tras un encendido inicial con 405 nm luz por 1 ms a diferentes potencias. (b) Dependencia de la resolución espacial de las dosis de luz de conmutación a OFF para dos periodicidades diferentes del patrón de OFF (P_{SW}). El patrón OFF con la menor P_{SW} permite alcanzar una resolución comparable con menos dosis de luz. Cada punto de datos de resolución resulta de la media del *FWHMs* del ajuste de 25 – 30 filamentos. Cada perfil es el promedio de las líneas adyacentes correspondientes a una longitud de filamentos de 80 – 140 nm. (c) Cuatro imágenes representativas grabadas con diferentes iluminaciones OFF. Barra de escala: 1 μm .

2.8 Imágenes 3D en células vivas

La mayor captación de fotones y la mínima fatiga permitieron la adquisición de múltiples secciones ópticas de células vivas en una gran variedad de muestras biológicas. Un primer

ejemplo se muestra en la Figura 2.9a, donde demostramos el rendimiento de seccionamiento óptico de MoNaLISA y la resolución lateral súper resuelta en una secuencia de 28 cuadros súper resueltos espaciados 100 nm a lo largo de la dimensión axial en una neurona del hipocampo. Los filamentos de actina cruzados en las neuronas que no se distinguen en la imagen limitada por difracción (Figura 2.9b) se resuelven claramente con MoNaLISA (Figura 2.9c) y se muestran separados por ~ 120 nm.

La obtención de imágenes volumétricas también se extendió en el tiempo para estudiar la reorganización completa de una colonia de células madre (Figura 2.9d). Se realizaron otros experimentos en tejidos organotípicos, que se describen en el apartado¹⁰² lo que demuestra la gran versatilidad y la amplia aplicabilidad del método. Observamos que, el aumento de la profundidad de la imagen se puede lograr con el uso de lentes objetivo glicerol/agua con un collar de corrección para corregir las aberraciones esféricas o mediante el uso de la óptica adaptativa^{107,108}.

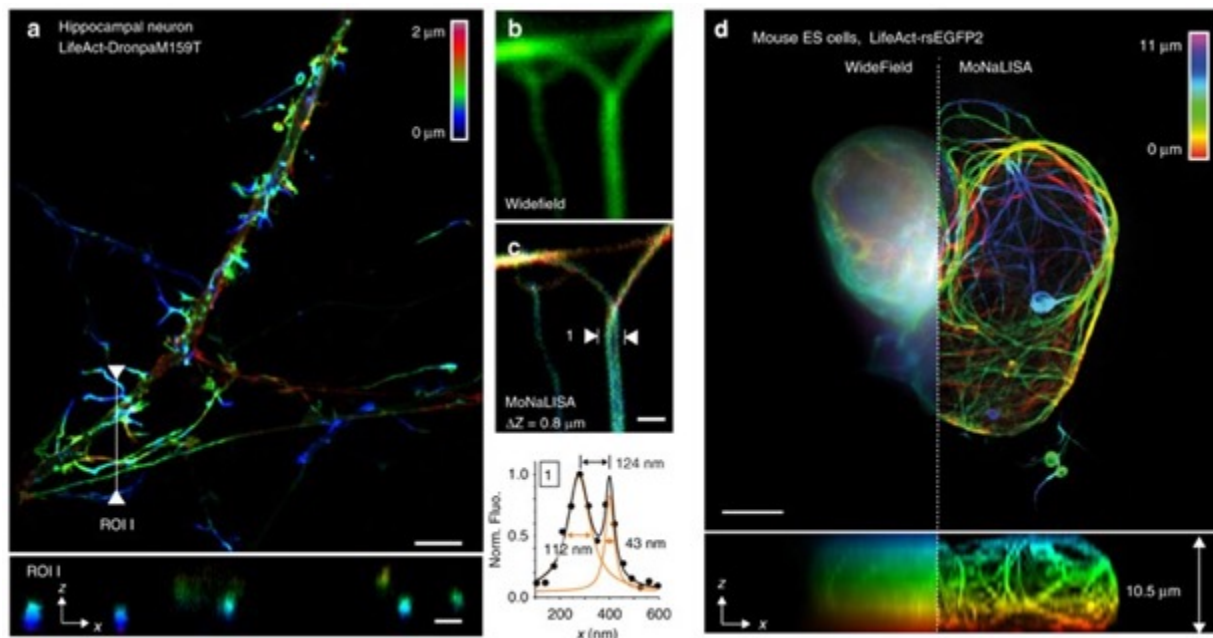


Figura 2.9. Imágenes 3D en células vivas. (a) Volúmenes 3D de 15 neuronas DIV que expresan LifeAct-DronpaM159T con MoNaLISA. El corte óptico fino revela la información de profundidad codificada por colores en las proyecciones máximas x - y y x - z . Barra de escala: $5 \mu\text{m}$. (b) y (c)

Comparación entre imágenes de campo amplio y MoNaLISA de una neurona que expresa LifeAct-EGFP2. Los perfiles de línea medidos en la imagen MoNaLISA se promediaron en cuatro líneas y se ajustaron con una gaussiana. **(d)** Colonia de células ES de ratón que abarca $30 \times 30 \times 11 \mu\text{m}^3$ en el modo de imagen volumétrica. Los pasos de escaneo son 35 nm en x - y y 500 nm en z . Las imágenes muestran estructuras finas en toda la profundidad z (derecha), ocultas en la comparación de campo amplio (izquierda).

Las intensidades de luz y los tiempos de pulso para la activación, la desactivación y la lectura para las mediciones de la figura 2.9a-c fueron: $I_{on} = 540 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 720 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 1.0 \text{ ms}$, $I_{readout} = 1000 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 1.5 \text{ ms}$. Para las mediciones de la figura 2.9e, fueron $I_{on} = 400 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 360 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 1.0 \text{ ms}$, $I_{readout} = 1000 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 1.5 \text{ ms}$.

2.9 Dinámica en la nanoescala registrada en células vivas

MoNaLISA es también una herramienta adecuada para estudiar el reordenamiento en la nanoescala de las células vivas a lo largo del tiempo con marcadores codificados genéticamente mediante transfecciones. Se puede encontrar una descripción detallada de los protocolos de transfección en ¹⁰². En la Figura 2.10a-d se muestran varios ejemplos, en los que se muestran series de 30 – 50 imágenes superresueltas de diferentes tipos de células. Los cambios estructurales en las células epiteliales vivas (Figura 2.10a-b) y en las neuronas del hipocampo (Figura 2.10c-e) se desvelaron mediante la monitorización de la dinámica de la actina en las ventanas temporales de segundos y minutos.

Algunas de las características dinámicas que pudimos registrar en las células vivas son: i) la formación de pequeños bucles de actina (Figura 2.10b), ii) la creación de espinas dendríticas en forma de copa (Figura 2.10d), iii) la formación de ramificaciones de actina

con un tamaño de paso inferior a 80 nm (Figura 2.10e), que se han seguido a lo largo del tiempo sin pérdida de resolución espacial ni de calidad de imagen. Además, aplicamos imágenes MoNaLISA para examinar el deslizamiento continuo de las mitocondrias por encima y por debajo de cada una (Figura 2.10f). Los cambios finos en su morfología durante la fusión y la fisión se captan en varias grabaciones volumétricas secuenciales a lo largo de segundos. La estructura hueca de las mitocondrias, no distinguible en la microscopía limitada por difracción, puede verse en todos los puntos temporales de MoNaLISA 3D.

Las representaciones en formato de película de los datos de secuencias temporales de imágenes descritos en este capítulo están disponibles en línea en ¹⁰². Las intensidades de luz y los tiempos de impulso para la activación, el apagado y la lectura de las mediciones de la figura 2.10 se variaron y optimizaron empíricamente. Sin embargo, todos ellos se mantuvieron en el rango $I_{on} = 260 - 830 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.25 - 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 290 - 750 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 0.6 - 1.5 \text{ ms}$, $I_{readout} = 1000 - 2500 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 0.75 - 1.5 \text{ ms}$.

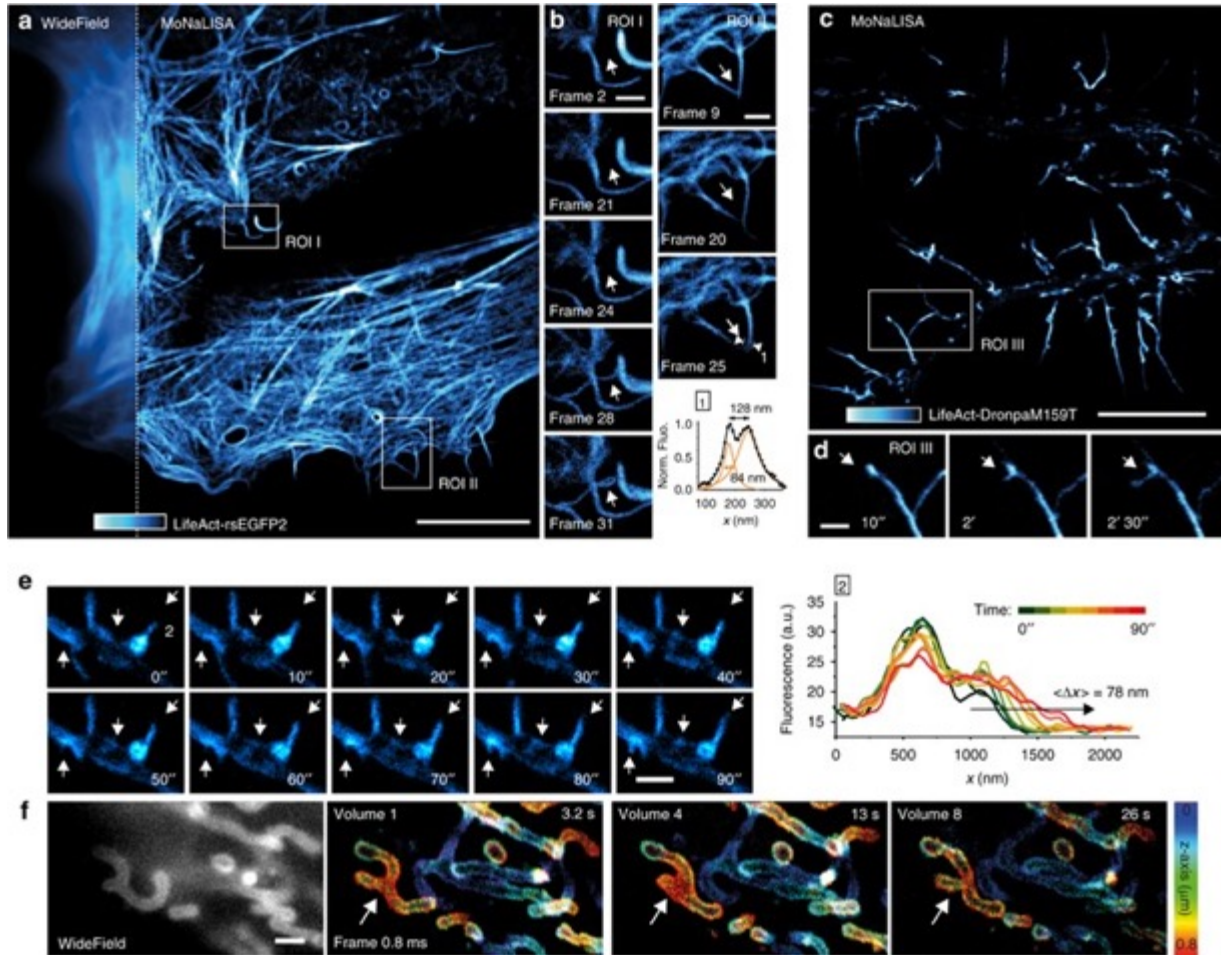


Figura 2.10. Imágenes dinámicas de células vivas a nanoescala. (a) Células epiteliales que expresan LifeAct-rsEGFP2 en comparación con la imagen de campo amplio (recuadro). Barra de escala: 10 μm. (b) Las regiones ampliadas I y II desvelan la dinámica de los pequeños filopodios en crecimiento observados durante 3 min para un total de 45 fotogramas, cada uno adquirido en 3.9 s. Barra de escala: 1 μm. (c) Neuronas vivas del hipocampo infectadas con LifeAct-DronpaM159T mostrando las disposiciones de actina en las dendritas y espinas dendríticas. Barra de escala: 10 μm. (d) La región III ampliada resalta el reclutamiento de moléculas de actina en una espina, que lentamente amplía su cabeza en forma de copa a lo largo de 19 fotogramas (flecha izquierda), cada uno adquirido en 3.4 s. Barra de escala: 1 μm. (e) Dinámica de los filopodios dendríticos que emergen de las densidades de actina en el eje dendrítico en una neurona a las 8 DIV. Las flechas destacan la dinámica y la redistribución de la actina. El gráfico muestra la elongación a lo largo del tiempo de los filopodios 2 y revela incrementos nanométricos a lo largo del tiempo. El perfil de cada línea se promedió sobre un 100 nm ancho. (f) Imágenes de lapso de tiempo de la membrana externa de las mitocondrias marcadas con rsEGFP2-Omp25. La dinámica

volumétrica mitocondrial se registra de forma continua a lo largo de segundos. La información axial está codificada por colores. La grabación de un solo cuadro es 0.83 s, volumen 3.3 s. Barra de escala: 1 μm .

2.10 Discusión

El campo de la microscopía de fluorescencia ha evolucionado rápidamente, y diferentes técnicas han logrado resultados notables en términos de superresolución espacial, velocidad, reducción de la dosis de luz, contraste y seccionamiento óptico en la obtención de imágenes de células vivas.

Las recientes implementaciones de la iluminación estructurada, como iSIM¹⁰⁹, son considerablemente más rápidas que MoNaLISA, alcanzando tiempos de adquisición de hasta ~ 10 ms por fotograma. Sin embargo, a pesar de su impresionante resolución temporal, están esencialmente limitadas por la difracción y la ganancia en términos de resolución espacial es un factor de $\sim \sqrt{2}$ con respecto a su homólogo limitado por la difracción dado el mismo objetivo de NA. Por ejemplo, las caracterizaciones de la resolución espacial de iSIM informan 213 ± 26 nm para las imágenes crudas y 145 ± 14 nm después de la deconvolución para las dimensiones laterales¹⁰⁹, lo que es 2-4 veces peor que las imágenes de MoNaLISA. Otra implementación del concepto SIM en Reflexión Interna Total (TIRF-SIM)¹¹⁰, cuando se combina con NA ultra alta⁹⁹ y longitudes de onda cortas, informa de imágenes adquiridas en segundos y con una resolución espacial teóricamente calculada que se aproxima a los sub-100 nm. Sin embargo, en estos casos, como en cualquier otra técnica TIRF, la obtención de imágenes está ligada al cristal de cobertura, lo que limita su aplicación a cuestiones biológicas relacionadas con las membranas. En cambio, MoNaLISA puede alcanzar todo el volumen celular, incluso en los tejidos. El PA-NL-SIM⁹⁹ tiene una resolución teórica de 45 nm con una resolución temporal de 0.5 – 1 s que son valores muy similares a los reportados en nuestro trabajo. Sin embargo, hay dos aspectos importantes que deben tenerse en cuenta: en primer lugar, PA-NL-SIM sigue

basándose en un esquema TIRF, lo que significa que, al igual que TIRF-SIM, está intrínsecamente limitado a la obtención de imágenes en la superficie del cubreobjetos. En segundo lugar, se han dado pocas o ninguna prueba experimental de la resolución teórica de 45 nm¹⁰¹. Se ha afirmado que PA-NL-SIM, en combinación con el esquema de iluminación de lámina de luz de enrejado denominado LLS-PA-NL-SIM⁹⁹, consigue una superresolución espacialmente anisotrópica de 118 × 230 × 170 nm (x, y, z). Así, esta implementación muestra una verdadera superresolución no lineal solamente en una dimensión. El tiempo de adquisición de LLS-PA-NL-SIM para una mejora de la superresolución en 1D es de aproximadamente 2.5 s (un volumen que contiene 28 cortes con imágenes en 70.5 s), lo que es comparable e incluso más largo que en las imágenes MoNaLISA.

STED¹⁸ es potencialmente el método de superresolución más rápido sin límite de difracción y se ha demostrado que funciona en muestras vivas incluso a velocidad de video³⁵. Sin embargo, la velocidad de grabación sólo puede alcanzarse en un pequeño campo de visión debido a la implementación del escaneo puntual. Un tiempo de grabación de un campo de visión de 45 x 45 μm² en STED tardaría entre 20 y 40 veces más que en la grabación paralela de MoNaLISA. Se ha informado de una versión paralelizada de STED^{111,112} pero, hasta donde sabemos, no se ha demostrado en muestras vivas ni en grabaciones de secuencias temporales. Además, como STED se basa en el mecanismo de depleción por emisión estimulada, las mediciones requieren intensidades de luz (MW-GW/cm²) que son notoriamente varios órdenes de magnitud superiores a las utilizadas en MoNaLISA (W-kW/cm²).

Los métodos de localización de moléculas individuales, como por ejemplo PALM/STORM/FPALM^{39,40,42} y las técnicas 3D derivadas, como iPALM¹¹³⁻¹¹⁵, 3D STORM basada en *PSF* astigmática³⁷, los multiplanos¹¹⁶ u otros métodos de ingeniería de *PSF*³⁸ son muy eficaces en términos de resolución espacial, pero comprometen la velocidad de registro y por eso la mayoría de estos experimentos se realizan con muestras fijadas. Se han realizado esfuerzos para aplicar métodos de localización de moléculas individuales a la obtención de imágenes de células vivas; por ejemplo, se aplicó con éxito

el método 3D STORM para obtener imágenes de vesículas recubiertas de clatrina con resolución temporal de $1 - 2 \text{ s}$ ^{53,117}. Sin embargo, las estructuras que necesitan una mayor densidad de marcación para ser resueltas comprometerán inevitablemente la velocidad de registro, sobre todo debido a la relación de compromiso intrínseca en el concepto entre la resolución espacial, que requiere un alto número de localizaciones, y el tiempo de adquisición.

Por último, WF-RESOLFT⁹⁶ puede alcanzar resoluciones temporales de $\sim 1 \text{ s}$ por fotograma, lo que es comparable a MoNaLISA, pero carece de seccionamiento óptico y es mucho menos eficiente en la captación de fotones, lo que disminuye el contraste de la imagen y la calidad general. De hecho, se ha informado de un aumento de la longitud del ciclo de conmutación para mejorar la SNR a costa de reducir la resolución temporal a $\sim 17 \text{ s}$ por fotograma⁹⁷. Además, ni el WF-RESOLFT ni el PA-NL-SIM, ambos basados en la rsFP, han sido demostrados, hasta donde sabemos, a niveles endógenos de expresión de proteínas fluorescentes.

En resumen, aunque diferentes técnicas existentes son tan buenas o mejores que MoNaLISA en una o algunas de las métricas relativas a la obtención de imágenes de superresolución de células vivas, ninguna técnica hasta la fecha presenta de manera simultánea las ventajas de nuestro enfoque en términos de dosis mínimas de luz, seccionamiento óptico, tamaño del campo de visión, resolución espacial y flexibilidad para visualizar estructuras en toda la célula.

2.11 Conclusiones y perspectivas

Hemos demostrado que nuestro microscopio multifocal RESOLFT paralelizado, MoNaLISA, permite estudiar células y tejidos vivos enteros en 3D con una combinación sin precedentes de resolución espacio-temporal y dosis mínimas de luz. El uso eficaz de los ciclos de conmutación ON-OFF en combinación con el seccionamiento óptico intrínseco y

la colección óptima de fotones permitió obtener imágenes de estructuras subcelulares a escala nanométrica a niveles de expresión endógenos y fisiológicamente relevantes, que se habrían perdido en implementaciones anteriores. La resolución temporal aún no alcanza el límite planteado por la cinética de conmutación del rsFP⁹². Una tecnología de cámara más rápida, así como la condensación de las adquisiciones en una sola exposición de la cámara, como en la SIM instantánea¹⁰⁹, tienen el potencial de maximizar la velocidad de registro de MoNaLISA.

Este trabajo se desarrolló en una estancia de investigación de un año (2016) en el grupo de la profesora Ilaria Testa en el Science for Life Lab, KTH en Estocolmo, Suecia. Mi principal contribución al proyecto fue el desarrollo del concepto del método, el diseño del sistema óptico, la construcción del montaje experimental y el desarrollo de la instrumentación y el software de control. También realicé mediciones en células vivas para cuantificar la resolución espacio-temporal del microscopio y participé sustancialmente en el desarrollo de los algoritmos del software de reconstrucción de imágenes. Tras mi regreso a Buenos Aires participé en el diseño del resto de los experimentos del proyecto, en el análisis de los datos y en la redacción del manuscrito.

Desde su publicación en 2018, el grupo de la profesora Ilaria Testa, junto con sus colaboradores, ha seguido mejorando, ampliando y aplicando el trabajo de microscopía RESOLFT paralela presentado en esta Tesis. Algunos de los proyectos exitosos inmediatos posteriores han sido: i) la implementación de MoNaLISA con rsFP desplazada al rojo¹¹⁸ haciendo que el método sea aún más compatible con las células vivas, ii) la ampliación de la superresolución sub-100 nm a las tres dimensiones¹¹⁹, iii) los estudios neuronales de la organización tubular del RE y las interacciones mitocondria-RE en diferentes compartimentos de células neuronales vivas¹²⁰. Otras mejoras, como las grabaciones multicolor, los campos de visión más amplios ($> 200 \times 200 \mu\text{m}^2$) y combinaciones con métodos de molécula única se están investigando actualmente.

Capítulo 3 - Localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial

Desde que fue técnicamente posible, la localización de moléculas fluorescentes individuales ha sido clave para obtener información sobre los procesos biológicos más allá de los promedios del conjunto. Por ejemplo, las mediciones de seguimiento de una molécula individual proporcionan una visión única de las trayectorias moleculares que, de otro modo, quedarían ocultas en el comportamiento promedio de un conjunto de moléculas no sincronizadas¹²¹⁻¹²⁵. Otra aplicación importante de la localización de moléculas individuales son los métodos de microscopía de localización de moléculas individuales (SMLM), que se revisaron en la sección 1.5.

El rendimiento de la SMLM está limitado por la fotoestabilidad de los fluoróforos^{36,126,127}. Lo más habitual es que la localización de una molécula individual se realice utilizando una iluminación uniforme, y que la posición de la molécula se determine a partir de un ajuste a su imagen grabada con un conjunto de fotodetectores como una cámara EM-CCD o CMOS. Con este enfoque, la precisión de la localización lateral de los fluoróforos orgánicos en condiciones biológicamente compatibles se sitúa normalmente en el rango de 10 – 50 nm. Recientemente, con el objetivo de alcanzar mayores precisiones de localización (sub-10 nm) con el presupuesto de fotones disponible, se han desarrollado una serie de métodos, como MINFLUX, SIMFLUX, ROSE o MINSTED, en los que se interroga a emisores individuales con una secuencia de patrones de luz espacialmente modulados. Estos métodos se han revisado brevemente en la sección 1.8. A primera vista, debido a las diferencias en la estructura de la luz de excitación, la instrumentación, los protocolos de medición y los métodos de análisis de datos, cada uno de estos métodos puede parecer

único. En este capítulo, mostramos cómo estas técnicas pueden considerarse casos especiales de un concepto común de localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial (SML-SSI). Además, la generalización incluye métodos más antiguos de localización y seguimiento de moléculas individuales, como el seguimiento orbital, revisado en la sección 1.9. Presentamos un marco analítico común para SML-SSI y lo utilizamos para realizar una evaluación comparativa justa entre los métodos y para identificar nuevos métodos de localización de moléculas individuales que reúnan los puntos fuertes de las técnicas disponibles.

3.1 Un marco común para la localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial (SML-SSI)

La figura 1a muestra de forma esquemática los componentes esenciales de la SML-SSI. Un campo de excitación espacialmente estructurado $I(\mathbf{r})$ se desplaza secuencialmente a lo largo de una secuencia de K posiciones \mathbf{r}_i ($1 \leq i \leq K$). Aquí trataremos el problema de localización bidimensional (2D). Naturalmente, el formalismo puede reducirse fácilmente a la localización en 1D o extenderse a la localización en 3D. En 2D, las K posiciones \mathbf{r}_i pueden ser arbitrarias dentro del plano de interés pero no deben estar alineadas para evitar ambigüedades obvias de localización. Llamaremos a la secuencia de $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ el "patrón de excitación", y \mathbf{r}_E la posición del emisor cuya posición se quiere determinar. Para cada $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ el emisor se expone a una intensidad local específica $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ y emite fluorescencia con una intensidad determinada, que a su vez corresponde a un valor esperado de fotones detectados (λ_i) durante un tiempo de integración determinado en el experimento. Los recuentos de fotones de fluorescencia medidos se denotan por n_i que se supone tienen distribución de Poisson con media λ_i . Esta última es una excelente aproximación para los fotodiodos de avalancha (APD) modernos con cuentas oscuras y

ruido de lectura despreciables. La posición del emisor se determina a partir de la secuencia de medidas de intensidad $\bar{n} = [n_1, n_2, \dots, n_K]$ y teniendo en cuenta el valor conocido de $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$. La relación entre $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ y λ_i se supone que es lineal (emisión alejada de la saturación).

Aunque en este capítulo trataremos $I(\mathbf{r})$ como una función conocida, subrayamos que los métodos SML-SSI consisten en realidad en dos mediciones de igual importancia (1) Una caracterización detallada del campo de luz de excitación $I(\mathbf{r})$ en la que se pueden recoger fotones casi ilimitados (es decir $N > 10^6$, SNR alta) porque se utilizan emisores muy brillantes (es decir, NPs fluorescentes), y (2) una medición con conteo de fotones limitados (es decir $N < 10^3$, baja SNR) excitando secuencialmente el emisor único (es decir, el fluoróforo orgánico o la proteína fluorescente), cuya posición es desconocida, con el previamente determinado $I(\mathbf{r})$ colocado en diferentes posiciones \mathbf{r}_i .

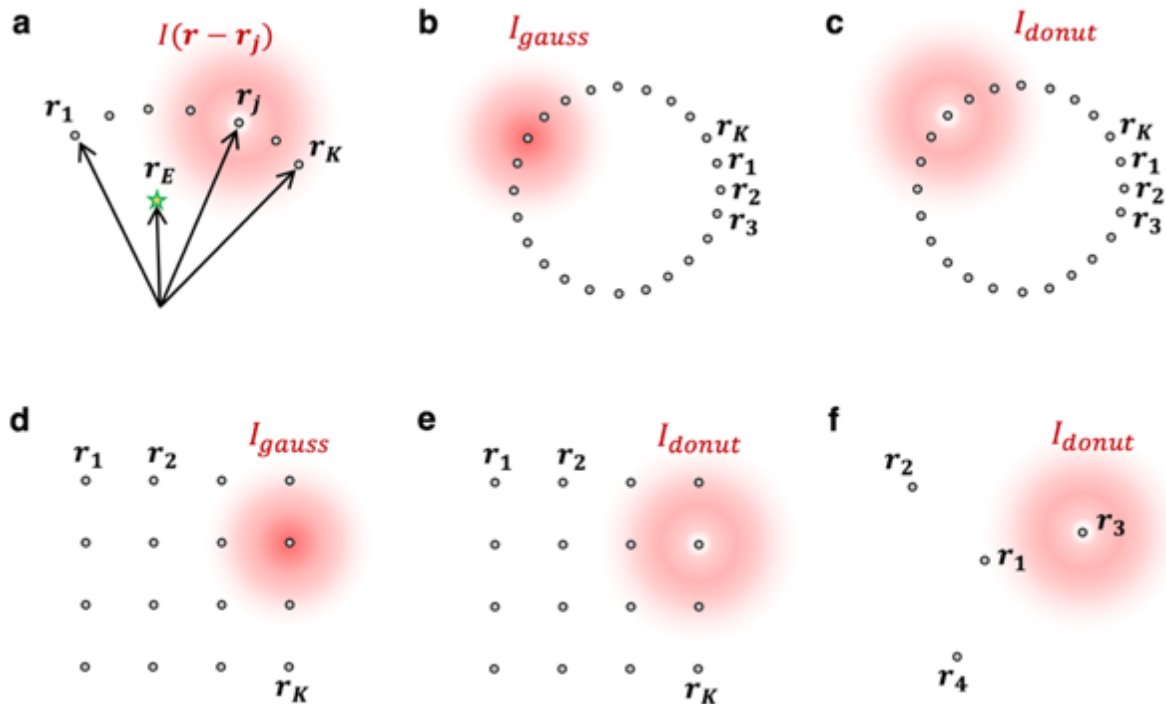


Figura 3.1 Marco común para la localización de moléculas individuales con iluminación estructurada secuencial (SML-SSI). (a) Esquema que muestra los parámetros esenciales de una medición SML-SSI en 2D. \mathbf{r} define la posición en el plano de interés. $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ es el campo de excitación estructurado situado en la posición \mathbf{r}_i . El campo de excitación se coloca secuencialmente en K posiciones \mathbf{r}_i ($1 \leq i \leq K$). En cada posición del campo de excitación se registra la intensidad de un emisor situado en \mathbf{r}_E se registra. (b-f) Ejemplos de configuraciones de mediciones SML-SSI utilizando un máximo (I_{Gauss}) o un mínimo (I_{donut}) de luz.

Cualquier método de SML-SSI puede describirse completamente mediante $I(\mathbf{r})$ y el conjunto de \mathbf{r}_i . Nos ocuparemos de los métodos que utilizan haces láser focalizados, que pueden clasificarse en dos categorías según que el foco tenga un máximo central o un mínimo central (idealmente un cero) de intensidad. Para nuestro análisis, los campos de excitación focalizados con un máximo central se describirán con una función gaussiana:

$$I_{Gauss}(\mathbf{r}) = A_0 e^{-4 \ln 2 \frac{r^2}{FWHM^2}} \quad (3.1)$$

y los campos de excitación con un cero central, aquí llamados focos en forma de donut, se describirán como

$$I_{donut}(\mathbf{r}) = A_0 4e \ln 2 \frac{r^2}{FWHM^2} e^{-4 \ln 2 \frac{r^2}{FWHM^2}} \quad (3.2)$$

Mientras que para los siguientes cálculos utilizaremos el idealizado $I_{Gauss}(\mathbf{r})$ y $I_{donut}(\mathbf{r})$ observamos que el análisis puede realizarse con cualquier otra forma de $I(\mathbf{r})$, especialmente con funciones que describan con mayor precisión los patrones de iluminación determinados experimentalmente.

En cuanto a la secuencia de posiciones de excitación \mathbf{r}_i consideraremos también dos tipos: secuencias orbitales que encierran un área (como se hace en el seguimiento orbital), y secuencias de escaneo de trama que cubren un área (como se hace en la microscopía de escaneo de barrido). Las combinaciones variables de I_{Gauss} , I_{donut} y la secuencia de \mathbf{r}_i pueden usarse para definir cualquier SML-SSI con haces enfocados, incluyendo todos los métodos reportados y cualquier nueva concepción.

Las figuras 1b a 1e muestran algunos ejemplos de configuraciones de mediciones SML-SSI. La figura 1b muestra esquemáticamente la combinación utilizada para el seguimiento orbital clásico (OT)^{78,79,128}, a saber I_{Gauss} excitación desplazada secuencialmente sobre K posiciones a lo largo de un círculo. En la práctica, el rendimiento óptimo en OT se consigue con un radio de la órbita cercano a la mitad de la anchura máxima de la mitad (FWHM) de I_{gauss} ^{77,79,128}. El número de exposiciones K puede variar desde unas pocas hasta un registro de intensidad cuasi-continuo. El llamado Single-Molecule Confocal Laser Tracking (SMCT)⁸³ puede considerarse como un caso especial de seguimiento orbital con $K = 6$. MINSTED⁷⁶ es, en esencia, otra expresión de OT que consigue una mayor precisión de localización al utilizar un campo de excitación efectivamente más pequeño, producido por la combinación de un haz de excitación normal y un haz de depleción en forma de donut, al igual que en la microscopía STED^{18,129}. Por lo tanto, el campo de excitación de MINSTED puede describirse por $I_{Gauss}(\mathbf{r})$ con un FWHM por debajo del límite de difracción. Alternativamente, la OT podría realizarse con $I_{donut}(\mathbf{r})$ como se muestra esquemáticamente en la Figura 3.1c. Llamaremos a este método OTMIN. Hasta ahora, no se ha propuesto ni implementado.

La secuencia de \mathbf{r}_i también puede organizarse en un barrido rasterizado para cubrir un área, como se muestra en la Figura 3.1d para $I_{Gauss}(\mathbf{r})$. Esta configuración, denominada aquí RASTMAX, se ha aplicado recientemente en un microscopio confocal convencional¹³⁰. En este marco, proponemos un nuevo método en el que $I_{donut}(\mathbf{r})$ se escanea sobre un área rectangular, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1e; llamaremos a este nuevo esquema RASTMIN. Por último, la figura 3.1f muestra el

esquema de MINFLUX 2D en el que $I_{donut}(\mathbf{r})$ se desplaza en cuatro posiciones: una exposición central y tres más que forman un triángulo equilátero alrededor de la posición central^{59,68}. El MINFLUX 2D puede clasificarse como un método de barrido rasterizado porque el patrón de excitación utilizado es el mínimo necesario para cubrir un área.

3.1.1 Estimación y precisión de la posición

La estimación de la posición molecular a partir de las mediciones de intensidad $\bar{n} = [n_1, n_2, \dots, n_K]$ y $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ puede hacerse de innumerables maneras, y muchas de ellas se han implementado en los diversos métodos citados anteriormente. Por ejemplo, en el rastreo orbital, la posición del emisor se ha estimado analizando las señales de intensidad cuasi-continuas mediante el análisis de Fourier⁷⁹ o mediante la triangulación de señales de intensidad discretas⁸³. En MINFLUX^{59,68}, o en la localización de una sola partícula con cuatro enfoques⁸⁴, la posición del emisor se obtiene mediante un estimador de máxima verosimilitud con cuatro medidas de intensidad. Otros métodos como MINSTED⁷⁶ utilizan funciones y rutinas de análisis ad-hoc.

Lo ideal es que el estimador de posición sea no sesgado y preciso. Independientemente del estimador utilizado, utilizando la matriz de información de Fisher, puede calcularse una precisión máxima teórica para un estimador de posición no sesgado en forma de un límite inferior teórico para la varianza del estimador, el llamado límite de Cramér-Rao (CRB)¹³¹. En este caso, utilizaremos el estimador de máxima verosimilitud para determinar la posición del emisor a partir de \bar{n} y $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ ya que es, por lejos, el enfoque más utilizado en la estimación estadística debido a su buen rendimiento; en general es consistente y alcanza asintóticamente la CRB¹³¹. Los estudios sobre la deconvolución en microscopía mostraron que el MLE es más preciso que los algoritmos basados en cuadrados mínimos, especialmente para los datos limitados a nivel cuántico, es decir, los datos con distribución de Poisson con bajos niveles de señal^{132,133}. Más recientemente, el rendimiento de la MLE para la localización de una molécula individual se ha validado en enfoques basados en

cámaras¹³⁴⁻¹³⁶, así como en enfoques de iluminación estructurada secuencial, como la localización 3D de cuatro enfoques⁸⁴ o MINFLUX⁶¹.

La función de verosimilitud \mathcal{L} para la posición del emisor puede expresarse como

$$\mathcal{L}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n}) = \frac{N!}{\prod_{i=1}^K n_i!} \prod_{i=1}^K p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})^{n_i} \quad (3.3)$$

donde $N = \sum_{i=1}^K n_i$ es el número total de fotones detectados, y $p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$ es el parámetro multinomial para cada exposición:

$$p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \frac{I(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}-\mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}-\mathbf{r}_j)} \quad (3.4)$$

definida como la relación entre la intensidad del campo de excitación en la posición del fluoróforo para la exposición actual y la suma de todas las intensidades de exposición. En presencia de fondo, definido por la relación señal/fondo (SBR) la ec. (3.4) se convierte en

$$p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \frac{SBR(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})}{SBR(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})+1} \frac{I(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}-\mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}-\mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})+1} \frac{1}{K} \quad (3.5)$$

donde

$$SBR(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \frac{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}-\mathbf{r}_j)}{\sum_{j=1}^K I_b(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})} = \frac{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}-\mathbf{r}_j)}{K I_b} \quad (3.6)$$

Aquí hemos supuesto que la contribución de fondo es igual para todas las exposiciones y no depende de la posición del emisor. En el Apéndice 3.1, al final de este capítulo, se describe una derivación detallada de la ecuación (3.5). $SBR(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$ puede calcularse a partir

de una suposición (o determinación experimental) de SBR en el centro del patrón de excitación, $SBR(\mathbf{0})$, como

$$SBR(\mathbf{r}_E) = SBR(\mathbf{0}) \frac{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{0} - \mathbf{r}_j)} \quad (3.7)$$

A continuación, utilizaremos $SBR(\mathbf{0}) \equiv SBR$ como parámetro escalar para la evaluación comparativa de los diferentes métodos.

Para la MLE, es práctico utilizar la función logaritmo de la verosimilitud, es decir $l(\mathbf{r}_E|\bar{n}) = \ln(\mathcal{L}(\mathbf{r}_E|\bar{n}))$:

$$l(\mathbf{r}_E) = \sum_{i=0}^K \ln(p_i(\mathbf{r}_E)) n_i \quad (3.8)$$

ya que nos interesa encontrar el valor de \mathbf{r}_E que maximice la función. En la ecuación (3.8) se han omitido todas las constantes aditivas porque son irrelevantes para la estimación de máxima verosimilitud de la posición del emisor, que se calcula como sigue:

$$\widehat{\mathbf{r}}_E^{MLE} = \arg \max (l(\mathbf{r}_E)) \quad (3.9)$$

En general, SML-SSI proporciona estimaciones de posición de alta precisión sólo para las moléculas que se encuentran en las proximidades del patrón de excitación. Por lo tanto, se necesita información adicional, previa y de menor precisión sobre la posición del emisor para colocar el patrón de excitación de tal manera que la posición del emisor pueda ser estimada con alta precisión. La función de verosimilitud puede modificarse para incluir esta información *a priori* de la siguiente manera:

$$\mathcal{L}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n}) = \frac{N!}{\prod_{i=1}^K n_i!} \prod_{i=1}^K p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})^{n_i} f(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) \quad (3.10)$$

Donde la función $f(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$ incluye la información previa sobre la posición del emisor. La función de verosimilitud logarítmica se convierte entonces en

$$l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n}) = \sum_{i=1}^K n_i \ln p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n}) + \ln f(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) \quad (3.11)$$

Donde, de nuevo, se han eliminado todos los términos constantes ya que sólo nos interesa el máximo de la función $l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n})$. Observamos que f puede depender de un conjunto independiente de cuentas de fotones utilizado para determinar la posición de la molécula con poca precisión.

Para el problema 2D, se tiene $\mathbf{r}_{\mathbf{E}} = (x, y)$ y la matriz de información de Fisher es

$$\mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n}) = -E \left(\begin{bmatrix} \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n})}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n})}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n})}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{n})}{\partial y^2} \end{bmatrix} \right) \quad (3.12)$$

que utilizando la ec. (3.11) se puede expresar como

$$\mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \mathcal{J}_{SML-SSI} + \mathcal{J}_{prior} = N \sum_{i=1}^K \frac{1}{p_i} \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial p_i}{\partial x}\right)^2 & \frac{\partial p_i}{\partial x} \frac{\partial p_i}{\partial y} \\ \frac{\partial p_i}{\partial y} \frac{\partial p_i}{\partial x} & \left(\frac{\partial p_i}{\partial y}\right)^2 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 \ln f}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 \ln f}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 \ln f}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 \ln f}{\partial y^2} \end{bmatrix} \quad (3.13)$$

Por último, el límite inferior para la matriz de covarianza de la posición estimada del emisor en función de la posición real del emisor, $\Sigma_{cov}(\mathbf{r}_E)$ puede obtenerse a partir de la desigualdad de Cramér-Rao:

$$\Sigma_{cov}(\mathbf{r}_E) \geq \Sigma_{CRB}(\mathbf{r}_E) = \mathcal{J}(\mathbf{r}_E)^{-1} \quad (3.14)$$

Los autovalores de Σ_{cov} y Σ_{CRB} se denotan como σ_x^2 y σ_y^2 . Es una práctica común representar Σ_{cov} y Σ_{CRB} como elipses con las direcciones de los ejes principales dadas por los vectores propios de las matrices y la longitud de los ejes dada por $2\sigma_x$ y $2\sigma_y$ respectivamente. Para simplificar, en este capítulo tomaremos la media aritmética de los valores propios de $\mathcal{J}(\mathbf{r}_E)^{-1}$ como medida de la precisión máxima media:

$$\sigma_{CRB}(\mathbf{r}_E) = \sqrt{\frac{1}{2}tr[\Sigma_{CRB}(\mathbf{r}_E)]} = \sqrt{\frac{1}{2 \det[\mathcal{J}(\mathbf{r}_E)]}tr[\mathcal{J}(\mathbf{r}_E)]} \quad (3.15)$$

En general, $f(\mathbf{r}_E)$ reduce la incertidumbre en la estimación de la posición. Para visualizar esto, se puede considerar que cualquier *prior* puede expresarse, al menos aproximadamente, como una función gaussiana o similar centrada en la posición estimada, cuyo logaritmo tiene una segunda derivada que siempre es negativa.

La implementación de este marco matemático, es decir, todas las funciones y scripts utilizados en este trabajo, está escrita en Python y es totalmente de código abierto. Se puede encontrar en <https://github.com/lumasullo/sml-ssi> y en <https://github.com/Stefani-Lab/sml-ssi>. Todos los cálculos y simulaciones pueden reproducirse fácilmente siguiendo las instrucciones de los repositorios.

3.2 Evaluación comparativa de los diferentes métodos

A continuación, comparamos el rendimiento teórico de diferentes métodos de escaneo orbital y rasterizado, incluyendo las técnicas reportadas y las nuevas propuestas. Para cada método, mostramos un mapa 2D ejemplar de $\sigma_{CRB}(\mathbf{r}_E)$ para un conjunto de parámetros experimentales realistas ($N = 500$ fotones detectados, $SBR = 5$) y luego calculamos el promedio de σ_{CRB} ($\bar{\sigma}_{CRB}$) dentro de un campo de visión circular (FOV) concéntrico con el patrón de excitación.

El tamaño del patrón de excitación es un parámetro relevante para todos los métodos. Aquí lo parametrizaremos por L el diámetro de la órbita o la diagonal de la trama, para los métodos orbitales o de barrido, respectivamente. Para un campo de visión (FOV) con un diámetro de $0.75 L$ que es una región de localización adecuada para todos los métodos, evaluamos $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de N y SBR . En todos los casos, utilizamos un *prior* gaussiano $f(\mathbf{r}_E)$ que representa una localización previa aproximada del emisor ($\sigma_{prior} = 50$ nm), que es un paso común de todos los experimentos reales de este tipo. No se analiza el coste en fotones de esta información previa, ya que sería el mismo para todos los métodos; estaría en el rango $N = 50 - 100$ dependiendo del procedimiento utilizado.

3.2.1 Métodos orbitales

En primer lugar, analizamos los métodos orbitales mediante I_{gauss} de excitación. Observamos que, teóricamente, la precisión de la localización utilizando haces gaussianos aumenta indefinidamente con L . Sin embargo, en la práctica, la caída de SBR conduce a un valor de compromiso de la órbita aproximadamente igual al $FWHM$ ^{77,79}. Por lo tanto, todos los métodos orbitales que utilizan un haz gaussiano se estudiarán para $L = FWHM$.

La figura 3.2a muestra un mapa de la precisión de localización (σ_{CRB}) para el seguimiento orbital (OT) con $L = FWHM = 300$ nm, $K = 100$, $N = 500$ y $SBR = 5$. El rendimiento es aproximadamente plano en zonas de hasta $\sim L^2$. Este comportamiento también es

evidente en las curvas de $\bar{\sigma}_{CRB}$ frente al tamaño del FOV para OT ($L = 300$ nm) y MINSTED ($L = 100$ nm y $L = 50$ nm) en la figura 3.2b. Para el caso de $L = 50$ nm se observa que la incertidumbre de localización aumenta hasta 20 – 30 nm para $FOV > 5L$. Se observa un comportamiento similar para todas las implementaciones de seguimiento orbital escaladas por L .

Las figuras 3.2c y 3.2d muestran el $\bar{\sigma}_{CRB}$ sobre un FOV con un diámetro de $0.75 L$ en función de SBR y N respectivamente. Tanto la versión continua (línea sólida) como la discreta (estrellas) muestran comportamientos casi idénticos y están fuertemente influenciados por el tamaño de $FWHM = L$, lo que explica la mayor precisión alcanzada con MINSTED. Alcanzar una precisión de 1 nm con $N = 1000 - 3000$ sólo es posible con $L < 100$ nm es decir, mediante STED o cualquier otra forma de conseguir campos de excitación efectivos por debajo de la difracción.

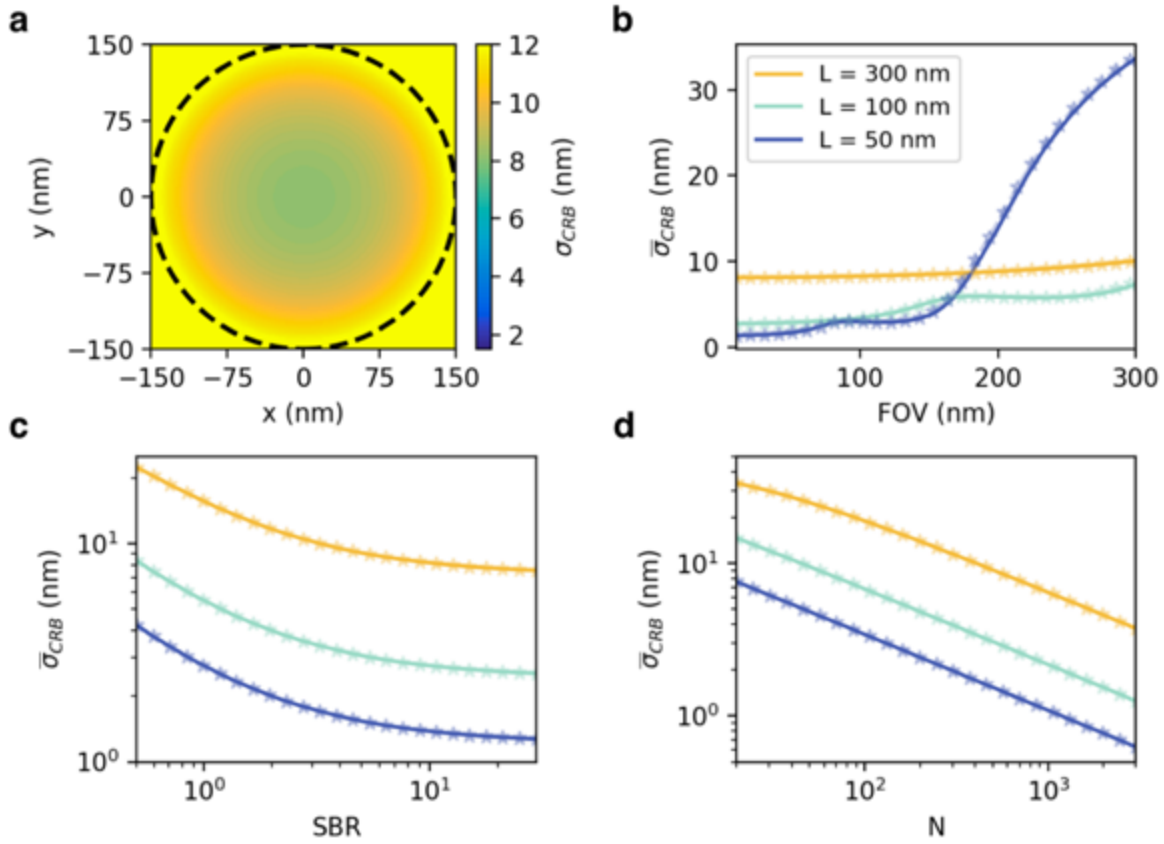


Figura 3.2 Seguimiento orbital, seguimiento confocal de una molécula y MINSTED.

(a) Mapa de precisión $\sigma_{CRB}(x, y)$ para $L = FWHM = 300$ nm, $K = 100$. La línea negra de puntos indica la órbita. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de FOV para) para tres valores de $L = FWHM$. (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de N . Parámetros: $K = 100$ (sólido) y $K = 6$ (estrellas), $N = 500$, $SBR = 5$, a menos que se indique lo contrario.

También en las figuras 3.2b-d, se muestra el rendimiento de estos métodos para $K = 6$ (líneas punteadas). En particular, el caso de difracción limitada ($L = 300$ nm) con $K = 6$ corresponde al método reportado como SMCT⁸³. La precisión de localización teórica alcanzada con sólo 6 exposiciones es prácticamente la misma que con un registro de señal cuasi-continuo ($K = 100$).

A continuación, analizamos el rendimiento de un método que presenta un mínimo de intensidad en el haz de excitación (I_{donut}) y una secuencia orbital de exposiciones. Hasta donde sabemos, este método no se ha realizado experimentalmente. Lo denominaremos Seguimiento Orbital con un Mínimo (OTMIN).

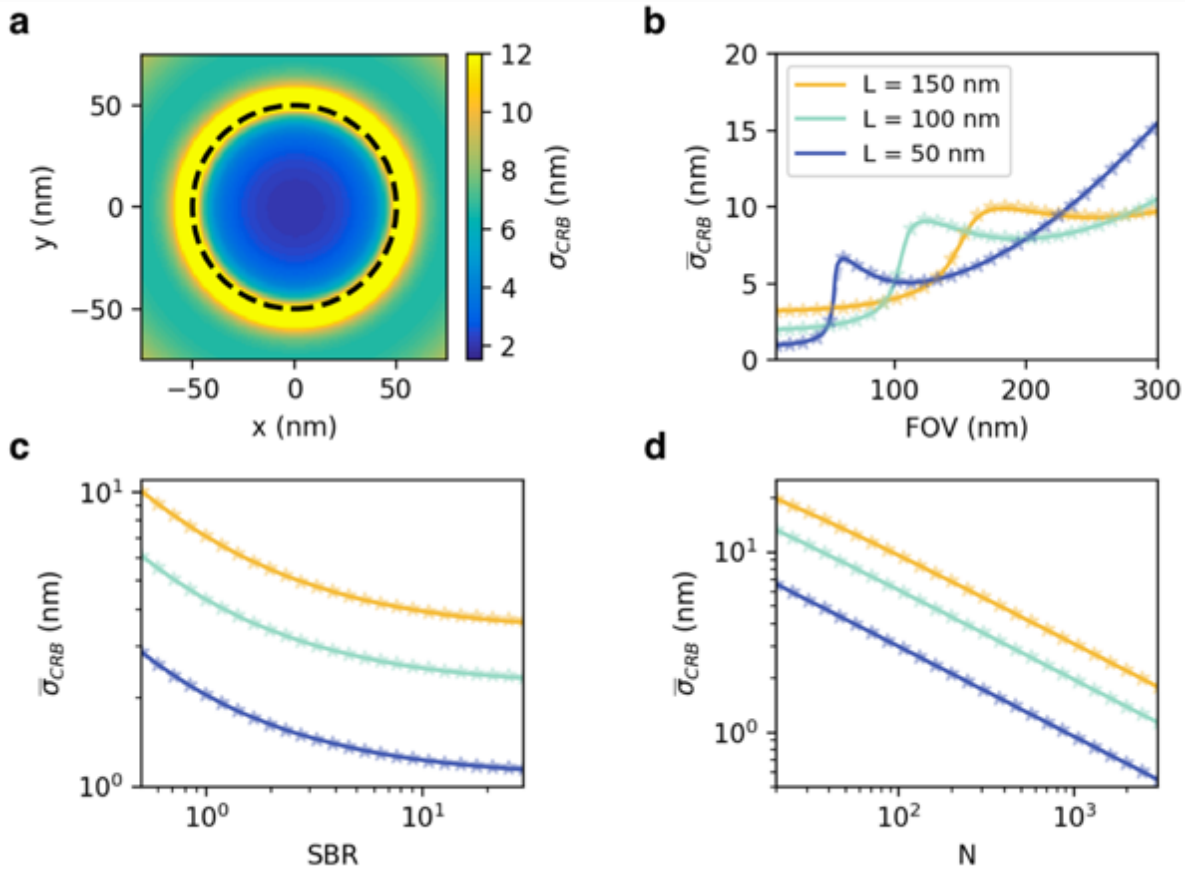


Figura 3.3 Seguimiento orbital con un mínimo de intensidad. (a) Mapa de precisión $\sigma_{CRB}(x, y)$ para $L = 100$ nm. La línea negra de puntos indica la órbita. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función del FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de N . Parámetros $K = 100$ (sólido) y $K = 6$ (estrellas), $FWHM = 300$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$, a menos que se indique lo contrario.

La figura 3.3a muestra un mapa 2D de σ_{CRB} para OTMIN con $L = 100$ nm y $K = 100$. A diferencia de OT, OTMIN puede realizarse con órbitas de tamaño arbitrariamente pequeño sin necesidad de aplicar técnicas de subdifracción. OTMIN proporciona localizaciones precisas en la parte interior de la órbita. Notablemente, en la región cercana a la órbita el σ_{CRB} aumenta rápidamente. Las simulaciones de Monte-Carlo confirman que el estimador OTMIN es preciso y alcanza la CRB en la parte interior del área definida por la órbita (Figura 3.4a), pero se vuelve impreciso e inexacto en las proximidades de la órbita (Figura 3.4b). No obstante, esta región imprecisa es muy estrecha. Experimentalmente, podría evitarse inyectando información a la medición para utilizar una *FOV* limitada a la zona de buen comportamiento, por ejemplo, recentrando periódicamente el patrón en tiempo real.

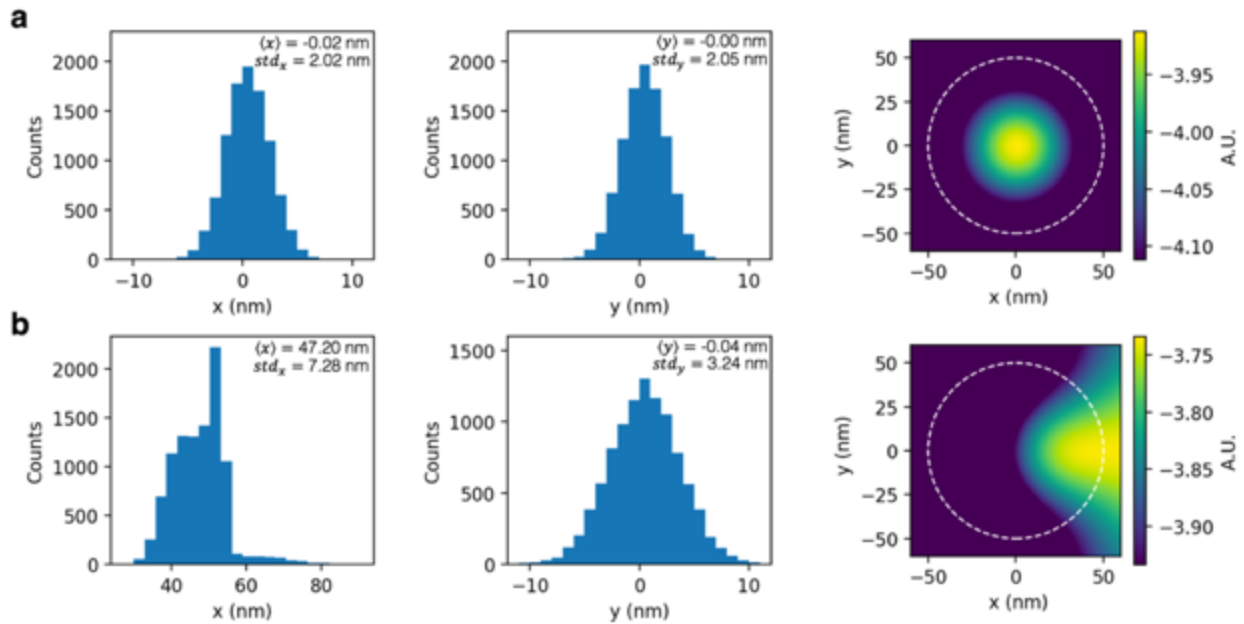


Figura 3.4 Localizaciones simuladas para OTMIN. Estimaciones de x , estimación de y y la función de verosimilitud media utilizando OTMIN con $L = 100$ nm para (a) $\mathbf{r}_E = (0, 0)$ y (b) $\mathbf{r}_E = (50, 0)$. Los valores de CRB para (a) $\sigma_{CRB_x} = 2.01$ nm, $\sigma_{CRB_y} = 2.01$ nm. Parámetros: $N = 500$, $SBR = 5$. Tamaño de la simulación: 10000 muestras para cada posición.

La figura 3.3b muestra las curvas de $\bar{\sigma}_{CRB}$ frente al tamaño del FOV para OTMIN con $L = 50, 100$ y 150 nm para $K = 100$ (sólido) y $K = 6$ (estrellas). La mejor precisión de localización alcanzable de OTMIN mejora con valores decrecientes de L (para una constante $FWHM = 300$ nm del haz enfocado). Este aumento de la precisión de localización a costa de limitar la FOV es una característica común a todos los métodos que utilizan un mínimo de intensidad. Experimentalmente, el límite máximo de la contracción L es la disminución de SBR . Mientras que el FOV puede tener un tamaño por debajo de la difracción, los volúmenes de iluminación y detección siguen estando limitados por la difracción. Así, para una intensidad de iluminación dada, la reducción de L a dimensiones de subdifracción reduce la excitación y la emisión de fluorescencia de los emisores, pero la contribución de fondo permanece constante.

En todos los casos, para $K = 100$ (sólido) o $K = 6$ (estrellas) y un FOV tamaño de hasta $0.75 L$ la precisión media de localización de OTMIN sigue siendo notablemente alta. Por ejemplo, para $N = 500$ y $SBR = 5$ OTMIN alcanza una precisión media de $\bar{\sigma}_{CRB} < 2$ nm con $L = 100$ nm o $\bar{\sigma}_{CRB} < 1$ nm con $L = 50$ nm (Figura 3.3c-d). Este nivel de rendimiento es sólo comparable a la mejor precisión de localización registrada, alcanzada con MINFLUX. OTMIN podría ser de especial interés para varios laboratorios del mundo que ya disponen de configuraciones de OT. Su precisión de localización podría incrementarse significativamente simplemente añadiendo una máscara de fase adecuada al camino de excitación para generar un foco con un mínimo central.

3.2.2 Métodos rasterizados

MINFLUX, utilizando sólo cuatro exposiciones ($K = 4$) con el patrón de excitación I_{donut} puede considerarse como la expresión mínima de un método de barrido. Tres de las exposiciones delimitan un área que se sondea con una sola exposición central. El rendimiento de MINFLUX se ha estudiado exhaustivamente tanto teórica como experimentalmente^{61,62}. Aquí reproducimos (por completitud) y ampliamos los resultados

teóricos comunicados. Sin embargo, observamos que nuestros cálculos incluyen la dependencia espacial de $SBR(x, y)$ en lugar de utilizar la aproximación de una constante $SBR(x, y) = SBR(0, 0)$. La figura 3.5a muestra un mapa de σ_{CRB} para MINFLUX con $L = 100$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$, $FWHM = 300$ nm. La figura 3.5b muestra las curvas de $\bar{\sigma}_{CRB}$ frente al tamaño del FOV para $L = 50, 100$ y 150 nm ($N = 500$ y $SBR = 5$), la exposición central de MINFLUX resuelve directamente los problemas de OTMIN cerca del borde de la órbita. Como ya se ha reportado, MINFLUX ofrece la mejor precisión de localización en el centro del patrón de excitación; una característica común a todos estos métodos. Por ejemplo, con $N = 500$, $SBR = 5$ y $L = 100$ nm la precisión media es de $\bar{\sigma}_{CRB} = 2.7$ nm para un $FOV = 0.75 L$ mientras que la precisión en el centro del patrón de excitación es $\sigma_{CRB}(0, 0) = 2.0$ nm. La precisión de localización de MINFLUX es la mejor demostrada hasta la fecha, alcanzando $\bar{\sigma}_{CRB} < 1$ nm para $L = 50$ nm y $N \geq 800$, $SBR \geq 5$ (Figura 3.5d). Cabe destacar que a medida que L la precisión en el centro del patrón de excitación aumenta, pero $\bar{\sigma}_{CRB}(FOV)$ crece más rápidamente (Figura 3.5b), especialmente fuera de la región definida por el patrón de excitación. Por ejemplo $\bar{\sigma}_{CRB}(FOV = 200 \text{ nm}) \sim 6$ nm para $L = 100$ nm mientras que $\bar{\sigma}_{CRB}(FOV = 200 \text{ nm}) \sim 10$ nm para $L = 50$ nm.

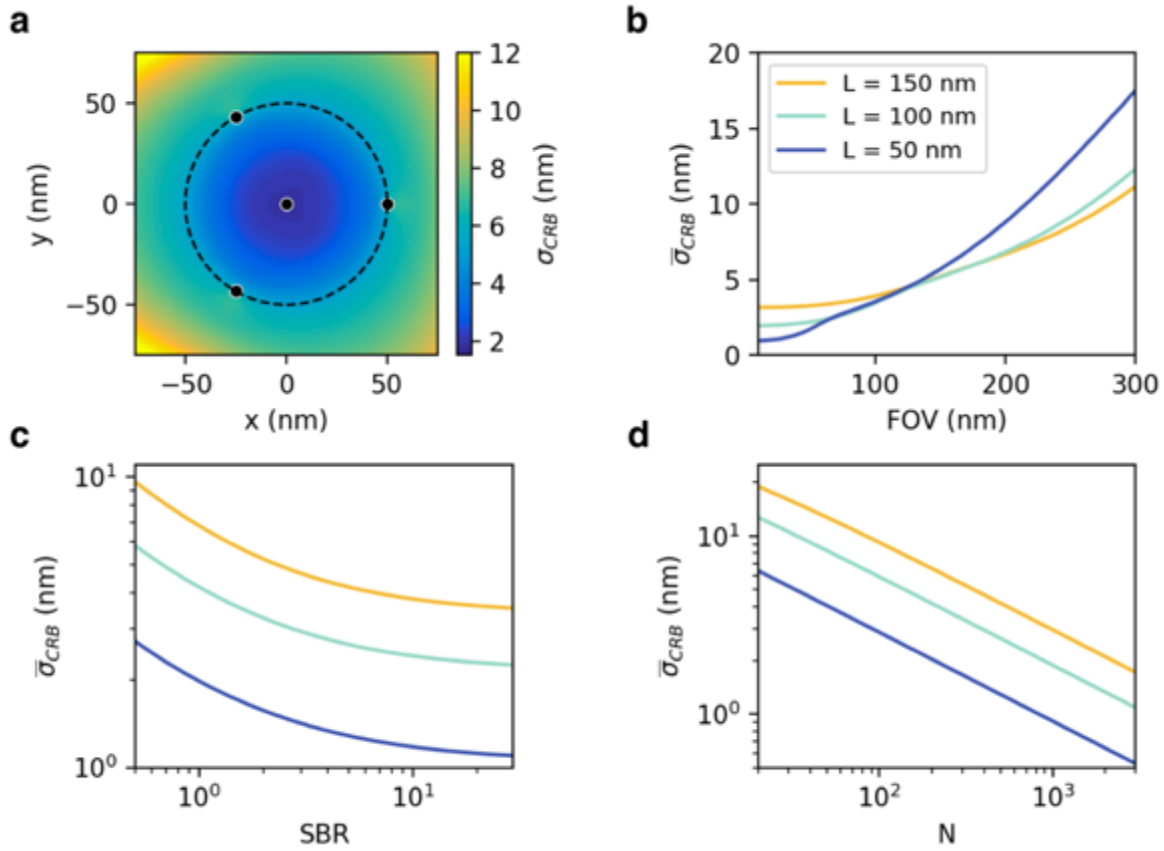


Figura 3.5 MINFLUX. (a) Mapa de precisión $\sigma_{CRB}(x, y)$ para $L = 100$ nm. La línea de puntos negra indica un círculo de diámetro L , los puntos negros indican las posiciones \mathbf{r}_i de las exposiciones. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función del FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de N . Parámetros: $K = 100$, $FWHM = 300$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$ a menos que se indique lo contrario.

Otro método de este tipo consiste en utilizar exposiciones de un mínimo de intensidad organizadas en una trama rectangular. Hasta donde sabemos, este método no ha sido reportado ni teórica ni experimentalmente. Lo denominaremos escaneo RASTER con un Mínimo (RASTMIN). La figura 5a muestra un mapa 2D de $\sigma_{CRB}(x, y)$ para RASTMIN con $L = 100$ nm, $N = 500$ y $SBR = 5$. Al igual que ocurre con MINFLUX, las exposiciones centrales en RASTMIN resuelven el problema del área de mal comportamiento que aparece en OTMIN para $FOV \sim L$ (Figura 3.6b).

El rendimiento de RASTMIN en términos de SBR (Figura 3.6c) y N (Figura 3.6d) es muy similar al de MINFLUX y OTMIN, alcanzando su mejor rendimiento para $SBR > 5$ y alcanzando precisiones de ~ 1 nm para $N = 500$ y $N = 1000$ para $L = 50$ nm y $L = 100$ nm respectivamente (Figura 3.6d).

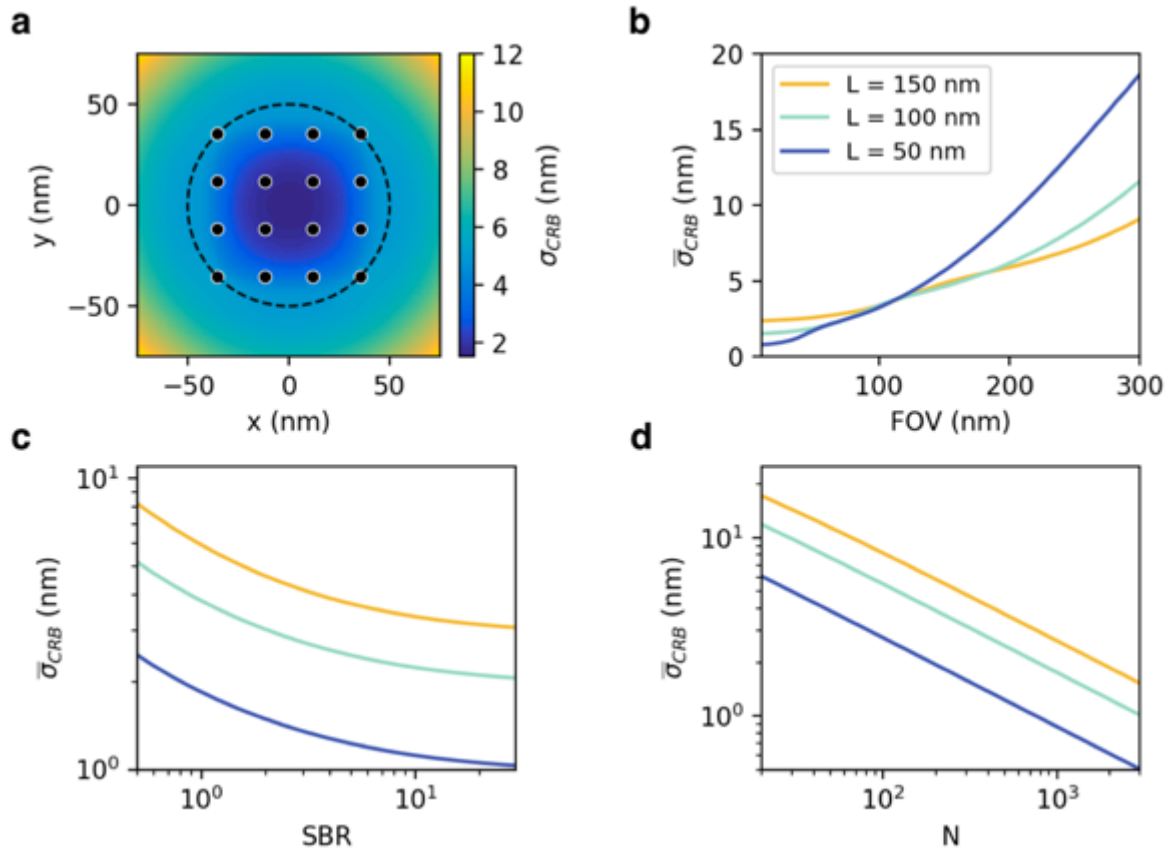


Figura 3.6 Escaneo rasterizado con un mínimo. (a) Mapa de precisión $\sigma_{CRB}(x, y)$ para $L = 100$ nm. La línea de puntos negra indica un círculo de diámetro L y los puntos negros indican las posiciones r_i de las exposiciones. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función del FOV. (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de SBR. (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de N . Parámetros: $K = 16$, $FWHM = 300$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$ a menos que se indique lo contrario.

En principio, RASTMIN puede realizarse en cualquier microscopio de escaneo láser (confocal), ya que están preparados para realizar escaneos de trama rectangular. La única modificación de hardware necesaria sería incluir una máscara de fase en la trayectoria del haz de excitación para producir un foco con un mínimo central (idealmente un cero) de intensidad. De este modo, la potencia de la localización con mínimos de intensidad podría ponerse a disposición de un número significativamente mayor de sistemas ópticos disponibles en muchos laboratorios. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para lograr una precisión de localización nanométrica se requiere una estabilización activa o sistemas de corrección de deriva con una precisión nanométrica.

También analizamos el rendimiento de la contraparte de RASTMIN utilizando máximos de excitación. Para un tamaño suficientemente grande L este método es equivalente a la imagen convencional de escaneo láser (confocal) y a la localización del emisor único, que ha sido reportado recientemente por el grupo de Jörg Enderlein y denominado SMLM de vida de fluorescencia confocal (FL-SMLM)¹³⁰. Sin embargo, para no dar a entender que la confocalidad o la detección resuelta en tiempo de picosegundos son condiciones necesarias para este método, lo denominaremos RASTMAX como un enfoque más general que incluiría cualquier técnica que escanee un máximo (gaussiano) de luz sobre un único emisor.

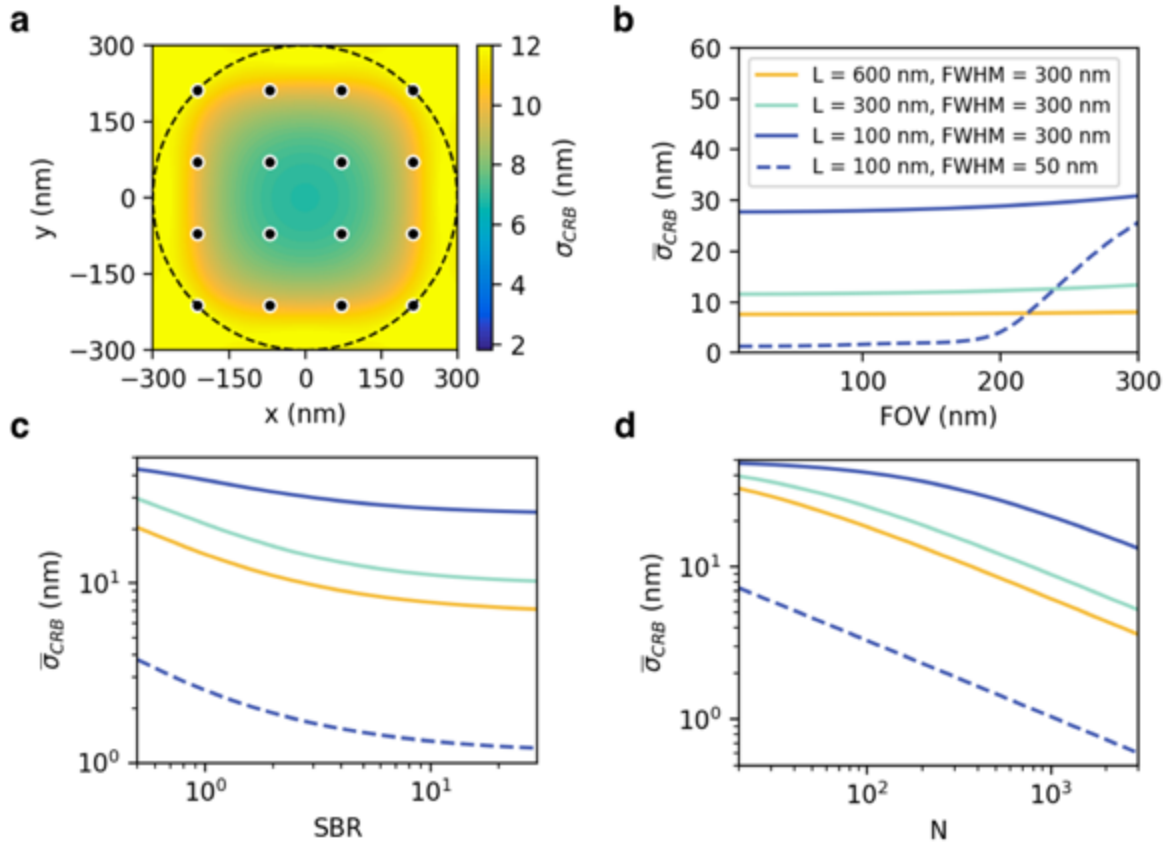


Figura 3.7 Escaneo rasterizado con un máximo. (a) Mapa de precisión $\sigma_{CRB}(x, y)$ para $L = 600$ nm. La línea de puntos negra indica un círculo de diámetro L y los puntos negros indican las posiciones r_i de las exposiciones. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función del FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de N . Parámetros: $K = 16$, $N = 500$, $SBR = 5$ a menos que se indique lo contrario. $FWHM = 300$ nm (líneas sólidas), $FWHM = 50$ nm (línea de puntos).

La figura 3.7a muestra un mapa de σ_{CRB} para RASTMAX con $FWHM = 300$ nm, $L = 600$ nm, $N = 500$ y $SBR = 5$. Dentro de la región de interés definida por $FOV = 0.75 L$ la precisión media de la localización oscila entre 7 a 9 nm. Al contrario de lo que ocurre en RASTMIN, los patrones de excitación más pequeños que el $FWHM$ del haz de excitación disminuyen la precisión alcanzada por RASTMAX (Figura 3.7b, líneas continuas). Dado un determinado $FWHM$ encontramos que $L < FWHM$ da malos resultados en términos de precisión porque la parte del haz de excitación con más

sensibilidad, los flancos del foco gaussiano, no se utilizan para excitar al emisor. El uso de $L \gg FWHM$ tampoco es óptimo porque la mayoría de las exposiciones no excitarían al emisor de forma eficiente y sólo contribuirían a añadir fondo a la medida. Por lo tanto, una situación óptima viene dada por $L \sim 2 FWHM$.

Es interesante analizar RASTMAX con máximos de excitación sub-difracción, obtenidos por ejemplo mediante STED. Hasta donde sabemos, aún no se ha realizado un esquema de nanoscopia de este tipo, aunque se han comunicado resultados experimentales de nanoscopia STED en moléculas individuales inmovilizadas^{28,137}. Estudiamos el rendimiento potencial de tal método considerando un esquema RASTMAX con $FWHM = 50$ nm y $L = 100$ nm. Como se puede ver en la Figura 3.7b (azul, línea punteada) tal método tiene el potencial de alcanzar precisiones comparables a MINSTED. Los cálculos indican que ~ 1 nm debería alcanzarse una precisión para $N \sim 1000$ con un $SBR = 5$ (Figura 3.7d).

La precisión de RASTMAX en función de FOV se mantiene bastante constante hasta $FOV = 2L$ donde empieza a disminuir, principalmente debido a la caída de la SBR relativa. Esto es evidente en la Figura 3.7b para el caso de $FWHM = 50$ nm y $L = 100$ nm. El mismo comportamiento se encuentra para los otros ejemplos, escalados por L ($FWHM$). Por otra parte, la precisión en función de SBR decae de forma similar a los otros métodos (Figura 3.7c). Aunque RASTMAX limitado por la difracción no alcanza las precisiones de MINFLUX, OTMIN y RASTMIN, debería superar significativamente a SMLM basado en la cámara. La razón de ello es que el proceso de medición en un detector con conteo de fotones individuales, como un APD, está bien descrito por el ruido de Poisson, mientras que la detección con una cámara implica otras fuentes de ruido que comprometen la precisión de la localización en números de fotones relativamente bajos¹²⁶.

3.2.3 Comparación entre RASTMAX y la localización basada en cámaras

Al comparar estos dos métodos, es importante señalar que se basan en dos fenómenos físicos diferentes. SML-SSI obtiene la información de la posición molecular a partir de la absorción de la luz. Las diferencias en la excitación molecular en cada exposición de la secuencia conducen a diferentes intensidades de emisión de fluorescencia que se detectan con un único fotodetector. Por el contrario, en la localización de una molécula individual basada en una cámara, la iluminación es uniforme y toda la información sobre la posición molecular se obtiene a partir de la emisión angular de fotones registrada como imagen en un conjunto de fotodetectores (cámara). A pesar de ello, existen similitudes en su estimación de posición y en su rendimiento.

En la localización de moléculas individuales basada en cámaras, los fotones emitidos se detectan en cada píxel de la cámara con una cierta probabilidad relacionada con la intensidad de la imagen en ese píxel, que puede aproximarse mediante una función gaussiana, en este caso correspondiente a la función de dispersión de puntos del sistema óptico. Así, siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el apartado 3.1.1, podemos escribir

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{SBR(\mathbf{r}_E)}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{1}{K} \quad (3.16)$$

Donde $\mathbf{r}_i = (x_i, y_i)$ define la posición central del i píxel de la cámara y $\mathbf{r}_E = (x_E, y_E)$ es la posición del emisor. $Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ es la integral de la intensidad de la imagen gaussiana sobre el área del i -ésimo píxel:

$$Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i) = \int_{y_i - \frac{a}{2}}^{y_i + \frac{a}{2}} \int_{x_i - \frac{a}{2}}^{x_i + \frac{a}{2}} Gauss(x - x_E, y - y_E) dx dy \quad (3.17)$$

Con

$$Gauss(x - x_E, y - y_E) = A_{Gauss} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(x - x_E)^2}{\sigma_{PSF}^2}\right) \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(y - y_E)^2}{\sigma_{PSF}^2}\right) \quad (3.18)$$

donde a es la anchura y la altura de los píxeles (se supone que son cuadrados), σ_{PSF} define el tamaño de la gaussiana PSF (que se supone simétrica) relacionado con el $FWHM$ por la ecuación $FWHM \approx 2.35 \sigma_{PSF}$ y A_{Gauss} es una amplitud que se cancelará al calcular $p_i(\mathbf{r}_E)$. La contribución de fondo esperada λ_b se supone de nuevo constante, igual para todos los píxeles.

La analogía entre RASTMAX y un enfoque basado en la cámara se hace evidente. La integral de la ecuación (3.17) puede aproximarse mediante $a^2 Gauss(x - x_E, y - y_E)$. Entonces, la ecuación (3.16) se convierte en

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{SBR(\mathbf{r}_E)}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{1}{K} \quad (3.19)$$

Que es formalmente igual a la ecuación (3.5) con $I = I_{Gauss}$. En ambos casos la distribución de los fotones detectados es gaussiana. En un caso debido a una iluminación gaussiana y en el otro debido a una imagen gaussiana.

La figura 3.8 muestra ejemplos de simulaciones de localización de moléculas individuales basadas en cámaras utilizando la ecuación (3.16) y RASTMAX, tanto para $N = 500$ y $SBR = 5$. La diferencia de longitud de onda debida al desplazamiento de Stokes esperado

se despreció y se utilizó el mismo $FWHM = 300$ nm en ambos casos. Como era de esperar, la precisión de la localización alcanzada por ambos métodos es prácticamente idéntica.

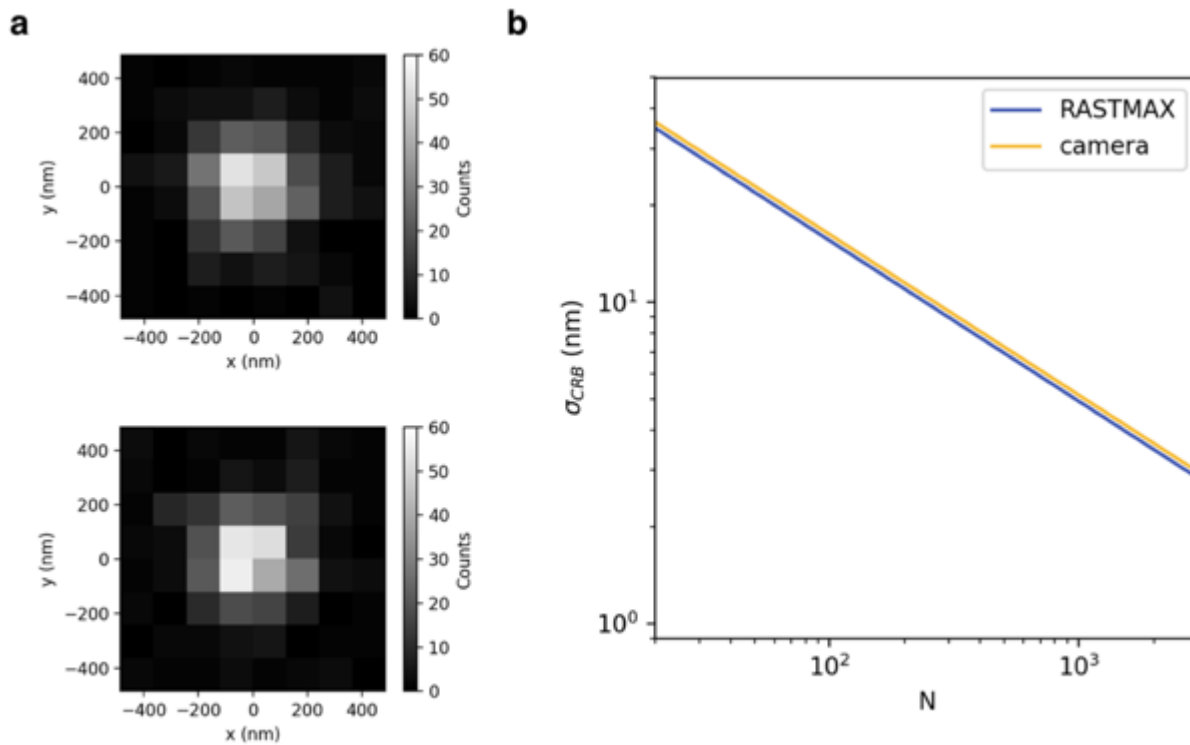


Figura 3.8. Comparación entre RASTMAX y la localización de SM basada en cámara. (a) Simulación de un experimento de localización de una molécula en una excitación de campo amplio, detección basada en cámara (arriba) y un barrido de trama con un haz gaussiano en la excitación y un solo detector (abajo). Parámetros: $N = 500$, $SBR = 5$. (b) $\sigma_{CRB}(0,0)$ en función de N para RASTMAX y la localización basada en la cámara. $SBR = 5$. No se utilizó ningún *prior* en el CRB calculado para cada método.

En la práctica, los enfoques basados en cámaras no pueden alcanzar este nivel de precisión. Los valores comunicados suelen ser un factor de 2 a 3 veces peor^{127,138}. La razón es que las cámaras presentan otras fuentes de ruido además del ruido fundamental de Poisson.

3.2.4 Comparación de los mejores desempeños

Por último, realizamos una comparación entre los métodos reportados y los nuevos en condiciones óptimas para cada uno de ellos. La figura 3.9 resume estos resultados. Los métodos ya conocidos (OT, MINSTED, MINFLUX, RASTMAX) se evaluaron utilizando las mejores combinaciones de parámetros que se han realizado experimentalmente. Para los nuevos métodos (OTMIN, RASTMIN), elegimos parámetros óptimos que son realizables experimentalmente. Un $FWHM = 300$ nm se utilizó para todos los focos limitados por la difracción. Cuando se utilizó un máximo de intensidad de sub-difracción (MINSTED) consideramos un $FWHM = 50$ nm. Cada método se evaluó para el valor más eficaz y realista de L : $L_{OT} = 300$ nm, $L_{RASTMAX} = 600$ nm, y $L_{MINSTED} = L_{MINFLUX} = L_{RASTMIN} = L_{OTMIN} = 50$ nm. En todos los casos, $SBR = 5$ y un recuento total de fotones $N = 500$ fueron considerados.

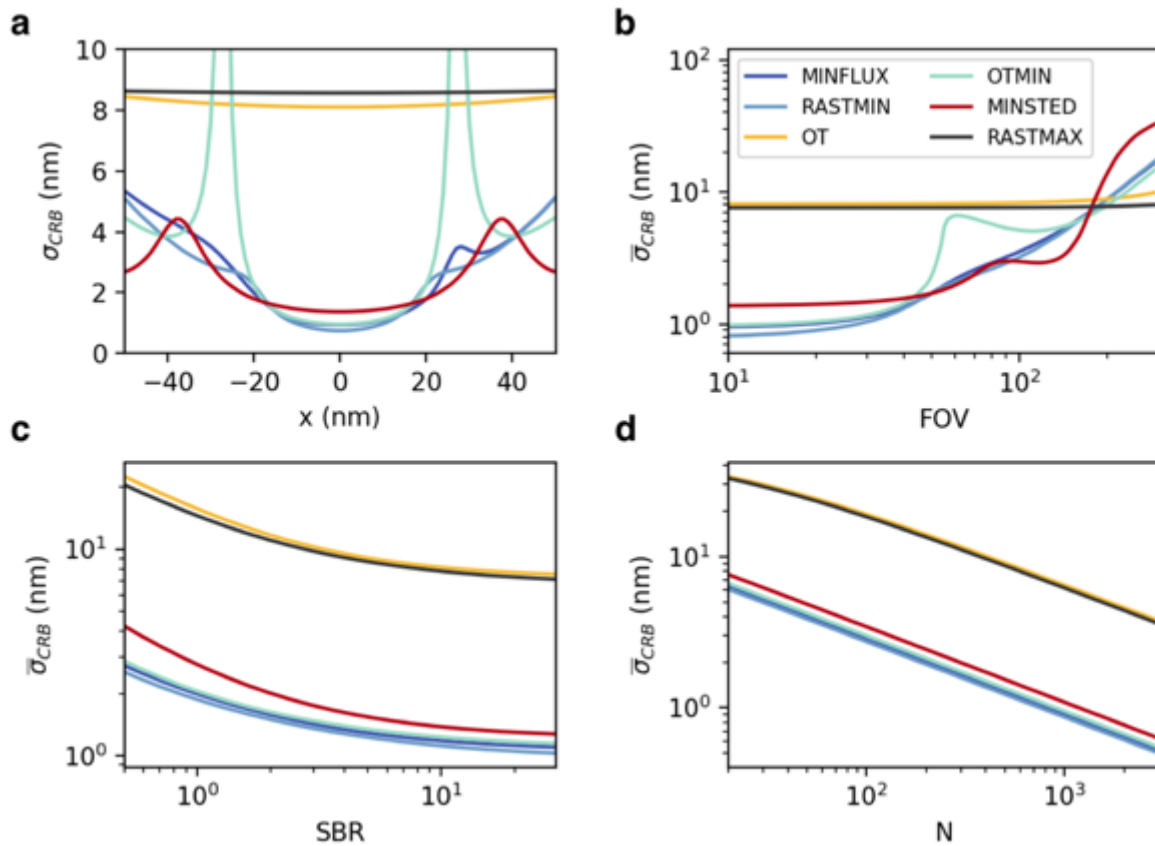


Figura 3.9. Comparación de los diferentes métodos. (a) Perfil 1D ($y = 0$) del mapa de precisión $\sigma_{CRB}(x, y)$ para todos los métodos utilizando sus parámetros realistas de mejor rendimiento. A $FWHM = 300$ nm se utilizó para todos los focos limitados por la difracción. Para MINSTED se consideró un $FWHM = 50$ nm. L : $L_{OT} = 300$ nm, $L_{RASTMAX} = 600$ nm, y $L_{MINSTED} = L_{MINFLUX} = L_{RASTMIN} = L_{OTMIN} = 50$ nm. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función del FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ en función de N . Otros parámetros: $N = 500$, $SBR = 5$ a menos que se indique lo contrario.

Entre los métodos que utilizan la excitación limitada por difracción, los que utilizan un mínimo de intensidad logran una ~ 5 veces mejor precisión que los que utilizan un máximo, independientemente de la secuencia de exposiciones (Figura 3.9a). Los métodos que utilizan máximos de excitación por subdifracción (es decir, MINSTED) pueden lograr una precisión de hasta ~ 1 nm mediante la ingeniería de una PSF efectiva muy por debajo del límite de difracción de la luz.

En general, todas las técnicas presentan el mejor rendimiento en la región central del patrón de excitación, en un área de aproximadamente el 75-80% del rango definido por el L (Figura 3.9b). En este sentido, los métodos que presentan máximos son más robustos y tienen un buen rendimiento en regiones más amplias del espacio.

Para $SBR > 5$, la precisión de la localización de todas las técnicas es siempre mejor que el 75% de la precisión ideal para el infinito SBR (Figura 3.9c). Números detallados sobre el análisis de la precisión con respecto a SBR y FOV se indican en la Tabla 3.1. Los métodos que utilizan un mínimo de intensidad son $\sim 10 - 20$ veces más eficientes en cuanto a los fotones, alcanzando una precisión a escala molecular ($\sigma_{CRB} \sim 1$ nm) con $N \sim 1000$. Los métodos que utilizan un máximo de intensidad están limitados a $\sigma_{CRB} \sim 3 - 5$ nm para $N = 1000 - 3000$ y requieren presupuestos de fotones mucho más altos ($N \geq 30000$) para lograr $\sigma_{CRB} \sim 1$ nm.

CONFIGURACIÓN	$\sigma_{CRB}(r_E = \mathbf{0})$	$\bar{\sigma}_{CRB}$	$SBR = 10000$	$SBR = 5$
MINFLUX L 50	0.94	1.29	1.05	1.29
MINFLUX L 100	1.96	2.65	2.16	2.65
MINFLUX L 150	3.16	4.18	3.39	4.18
OTMIN L 50	0.96	1.34	1.09	1.34
OTMIN L 100	2.00	2.77	2.22	2.77
OTMIN L 150	3.23	4.36	3.43	4.36
OTMIN L 50 K 6	0.96	1.34	1.10	1.34
OTMIN L 100 K 6	2.00	2.78	2.28	2.78
OTMIN L 150 K 6	3.23	4.38	3.51	4.38
RASTMIN L 50	0.74	1.23	0.97	1.23
RASTMIN L 100	1.52	2.47	1.93	2.47
RASTMIN L 150	2.35	3.71	2.88	3.71
RASTMAX L 100	27.73	27.87	24.26	27.86
RASTMAX L 300	11.56	12.44	9.80	12.44
RASTMAX L 600	7.59	8.69	6.72	8.69
RASTMAX L 100, FWHM 50	1.28	1.47	1.13	1.47
OT L 50 (MINSTED)	1.37	1.54	1.22	1.54
OT L 100 (MINSTED)	2.73	3.07	2.43	3.07
OT L 300	8.1	9.07	7.23	9.07
OT L 50 K 6 (SMCT)	1.37	1.54	1.22	1.54
OT L 100 K 6 (SMCT)	2.73	3.07	2.43	3.07
OT L 300 K 6 (SMCT)	8.1	9.07	7.23	9.07

Tabla 3.1. Comparación del rendimiento de varios esquemas de SML-SSI- Columna 1: Método SML-SSI y parámetro L . Columna 2: precisión de localización en el centro del patrón de excitación $\sigma(r_E = (0,0))$. Columna 3: precisión media $\bar{\sigma}_{CRB}$ sobre un FOV correspondiente a un área circular de diámetro $0,75 L$ en $SBR = 5$ y $N = 500$. Columna 4: precisión media $\bar{\sigma}_{CRB}$ en $SBR = 10000$ (considerada como infinita) y $N = 500$. Columna 5: precisión media $\bar{\sigma}_{CRB}$ en $SBR = 5$ y $N = 500$. Todos los valores están en nm.

3.3 Conclusiones y perspectivas

Hemos presentado un marco general para la descripción de todas las técnicas de localización de moléculas individuales que utilizan una secuencia de excitaciones estructuradas. En particular, el formalismo se desarrolla para los haces focalizados que presentan un máximo o un mínimo central de intensidad. Bajo este marco, basado en la teoría de la información y la estimación de máxima verosimilitud, realizamos una comparación justa entre los métodos utilizando el límite de Cramér-Rao, que es independiente del estimador utilizado para inferir la posición del emisor. Sólo se consideró el ruido de disparo de Poisson de los recuentos de fotones. De este modo, calculamos la máxima precisión de localización posible, que es alcanzable con los detectores modernos de recuento de fotones individuales, como los fotodiodos de avalancha. Naturalmente, el análisis podría ampliarse para representar otros detectores incluyendo fuentes de ruido adicionales. Otra ventaja del marco matemático es la posibilidad de incluir formalmente la información previa necesaria en estos métodos para prelocalizar las moléculas. Aunque nos hemos centrado en la localización en 2D, es sencillo generalizar el análisis a tres dimensiones.

El marco común facilita el diseño de nuevos enfoques. Aquí presentamos dos nuevos esquemas de localización de una molécula individual: OTMIN y RASTMIN. Ambos esquemas alcanzan la máxima precisión de localización, similar a la de MINFLUX, y tienen el potencial de ser implementados en sistemas ópticos existentes con pequeños cambios. OTMIN podría implementarse en cualquier configuración de OT simplemente añadiendo una máscara de fase adecuada para diseñar un foco de luz con un mínimo. Un enfoque similar puede utilizarse para implementar RASTMIN en cualquier microscopio de escaneo láser (confocal). Creemos que estos dos enfoques, y RASTMIN en particular, pueden contribuir significativamente a una aplicación más amplia de la nanoscopía de fluorescencia con resolución a escala molecular.

Encontramos que todos los enfoques que presentan un mínimo de intensidad tienen un rendimiento similar en la región central del patrón de excitación. Independientemente de la geometría del patrón de excitación, superan a los métodos que presentan un máximo de intensidad en al menos un factor de 5, alcanzando una precisión a escala molecular (~ 1 nm) con sólo $N \sim 1000$ fotones detectados en un $SBR = 5$.

En la práctica, RASTMAX (o SMLM confocal) proporciona una mejora significativa sobre el SMLM basado en cámaras en términos de precisión. Esto se debe al hecho de que la detección de fotones con los fotodiodos de avalancha actuales incluye casi únicamente ruido de Poisson, mientras que las cámaras EM-CCD o sCMOS presentan un sustancial ruido adicional de lectura en sus píxeles.

Todos estos métodos podrían beneficiarse de enfoques iterativos y adaptativos que actualicen la secuencia de excitaciones con nueva información sobre la posición del emisor, como se hizo con MINFLUX⁶². Además, aunque la detección confocal no es necesaria, podría ser ventajosa para obtener mayores SBR condiciones. También observamos que la compensación activa de xyz compensación de la deriva podría ser clave para alcanzar las mayores precisiones de localización.

Los métodos que utilizan patrones de excitación efectivos subdifracción, como MINSTED o una combinación de RASTMAX y STED, pueden lograr precisiones de localización tan buenas como los métodos que utilizan mínimos de luz. Sin embargo, hay que mencionar que en estos experimentos el número total de fotones de fluorescencia detectados N suele corresponder a un número mucho mayor de ciclos de excitación-emisión que en las mediciones convencionales, con la consiguiente tensión en la fotoestabilidad del emisor.

En el apartado 3.1 hemos subrayado que cualquier método SML-SSI consiste en realidad en dos mediciones: **(1)** una medición de alta SNR del patrón de excitación $I(\mathbf{r})$ y **(2) una medición de** moléculas individuales de baja SNR de $\{n_i\}$ recuentos de fotones. Aunque la medición **(1)** puede realizarse de varias maneras, la forma natural de hacerlo es medir $I(\mathbf{r})$ sobre una cuadrícula de píxeles. Así, en RASTMIN y RASTMAX, las dos mediciones toman la forma de dos imágenes de $I(\mathbf{r})$, una con alta SNR y alta resolución **(1)** y otra,

eventualmente desplazada, y con baja SNR y baja resolución (2). En RASTMIN, esta conceptualización hace especialmente sencilla la comprensión de la dependencia de la precisión de la localización σ_{CRB} con L . En el caso 2D, la imagen de un mínimo está bien aproximada por un paraboloides. Entonces, la imagen de la molécula individual RASTMIN de $I(\mathbf{r})$ es un paraboloides, y como tal, sigue siendo autosimilar a medida que L disminuye. Además, para un número determinado de fotones detectados, la SNR será constante. Por lo tanto, la incertidumbre de la localización en términos de "píxeles en la imagen" será constante, pero los píxeles son más pequeños, lo que reduce la incertidumbre real medida en unidades de longitud.

Por último, señalamos que otros estimadores de posición podrían ser más adecuados que el MLE por diferentes razones (eficiencia computacional para cálculos en tiempo real, estimadores no sesgados a bajo N , etc.). Sin embargo, creemos que nuestro enfoque explica a fondo las similitudes y diferencias fundamentales entre los diferentes métodos existentes y también será una poderosa herramienta para diseñar, desarrollar y combinar nuevos métodos y experimentos de localización de una molécula individual.

Apéndice 3.1 Derivación de $p_i(\mathbf{r}_E)$ con el fondo

Si suponemos un ruido de Poisson puro y fijamos el número de fotones detectados en N el conjunto de fotones medidos resultante tiene una distribución multinomial $n_i \sim \text{multinomial}(p_i, N)$. En ausencia de fondo, los parámetros multinomiales p_i vienen dados por

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E)}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)} = \frac{I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} \quad (\text{A3.1})$$

Es la relación entre la intensidad de excitación de la i -ésima exposición y la suma del resto de las exposiciones. Aquí, una relación lineal entre los recuentos de fotones detectados esperados en cada exposición λ_i y la intensidad $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ se asume. Esta es una muy buena aproximación para la microscopía de fluorescencia dentro del régimen lineal (lejos de la saturación). En el caso de los métodos que utilizan otras transiciones fotofísicas, la relación lineal se seguirá manteniendo con la intensidad de excitación *efectiva* $I_{eff}(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$.

En presencia de fondo la ecuación (A3.1) toma la forma

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E) + \lambda_{b_i}(\mathbf{r}_E)}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E) + \lambda_{b_j}(\mathbf{r}_E)} \quad (\text{A3.2})$$

Siguiendo las definiciones estándar, ahora podemos definir una función de relación señal/fondo

$$SBR(\mathbf{r}_E) \equiv \frac{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)}{\sum_{j=1}^K \lambda_b(\mathbf{r}_E)} = \frac{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)}{K \lambda_b} \quad (\text{A3.3})$$

donde hemos supuesto $\lambda_{b_i}(\mathbf{r}_E) = \lambda_b \quad \forall i$ es decir, que el fondo detectado no depende de la posición del emisor único \mathbf{r}_E y que todas las contribuciones de fondo de cada exposición son aproximadamente iguales. Esta es una muy buena aproximación a una situación experimental en la que la mayor parte del fondo provendrá de la autofluorescencia desenfocada procedente de un contexto biológico o del cubreobjetos u otros componentes ópticos. Además, el tamaño limitado por la difracción del volumen de detección es considerablemente mayor que el patrón de excitación, normalmente sub-difracción. Así, el fondo generado por el campo de excitación $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ es prácticamente independiente de la posición \mathbf{r}_i .

Por lo tanto, utilizando que $SBR K \lambda_b = \sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)$ podemos reescribir

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E) + \lambda_b}{SBR K \lambda_b + K \lambda_b} = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E) + \lambda_b}{K \lambda_b (SBR + 1)} \quad (\text{A3.4})$$

Multiplicando y dividiendo por $\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)$ y utilizando la definición (A3.3) obtenemos

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E) + \lambda_b}{K \lambda_b (SBR + 1)} \frac{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)} = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E)}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)} \frac{SBR}{(SBR + 1)} + \frac{1}{K(SBR + 1)} \quad (\text{A3.5})$$

Y por lo tanto,

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{SBR(\mathbf{r}_E)}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{1}{K} \quad (\text{A3.6})$$

donde escribimos explícitamente la dependencia de SBR con la posición del emisor.

Capítulo 4 - MINFLUX por pulsos intercalados

El método de localización de moléculas individuales MINFLUX representó un gran avance, ya que puede ofrecer de forma rutinaria una precisión de localización de aproximadamente 1 nm con los presupuestos de fotones habituales de los fluoróforos en condiciones ambientales⁶¹⁻⁶³. Sin embargo, su aplicación generalizada se ha visto frenada debido a la gran complejidad técnica de su implementación experimental. En este capítulo, describimos el MINFLUX intercalado pulsado (p-MINFLUX), una novedosa realización experimental de código abierto del MINFLUX que es más fácil de implementar en los microscopios confocales existentes equipados con una detección de recuento de fotones individuales relacionada con el tiempo (TCSPC), sólo modificando la trayectoria de excitación del microscopio. No se requiere una óptica de barrido rápido ni una electrónica de matriz de puertas programable en campo (FPGA). Además, en comparación con el MINFLUX original, el p-MINFLUX tiene la ventaja adicional de dar acceso a la información sobre el tiempo de vida del estado excitado, que es un parámetro relevante en la espectroscopia de moléculas individuales porque permite multiplexar las mediciones de un solo color¹³⁹ y proporciona información sobre el entorno del fluoróforo y sus interacciones con otras moléculas o materiales^{140,141}.

Los resultados presentados en este capítulo se han publicado en un artículo revisado por expertos⁶⁸.

4.1 Concepto y aplicación experimental

MINFLUX interroga la posición de una molécula individual fluorescente con una secuencia de mínimos espacialmente desplazados (idealmente ceros) de intensidad. Matemáticamente, MINFLUX puede describirse con el marco presentado en el capítulo 3 para la localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial (SML-SSI), donde la máxima precisión de localización teóricamente alcanzable también se discute en la sección 3.2.2. En la Figura 4.1a se muestra de forma esquemática la secuencia y la distribución espacial de los cuatro focos en forma de rosquilla utilizados en este trabajo para la localización 2D de moléculas individuales. Los cuatro focos en forma de rosquilla definen un campo de visión efectivo de forma casi circular con un diámetro L por debajo del límite de difracción. Las implementaciones anteriores de MINFLUX utilizaban el mismo esquema de excitación, producido por el desplazamiento de un haz de onda continua entre las cuatro posiciones con un escáner electro-óptico. En cambio, en p-MINFLUX, el patrón de excitación se genera con pulsos láser intercalados¹⁴². La figura 4.1b muestra un esquema del montaje experimental, cuyo núcleo es un microscopio de fluorescencia confocal con modificaciones en el camino de excitación. El haz de excitación se divide en cuatro utilizando divisores de haz. Cada haz se acopla a una fibra óptica de diferente longitud, ajustada para introducir retrasos de tiempo $\Delta t = T/4$ entre los haces. Los tiempos de llegada resultantes de los cuatro pulsos son $\tau_i = \tau_0 + i * \Delta t$ haciendo que los pulsos intercalados tengan un retardo uniforme dentro de un período del tren de pulsos original T . Para nuestra fuente láser con una tasa de repetición $f = 20$ MHz ($T = 50$ ns), el retardo entre cada uno de los cuatro pulsos de excitación se fija en 12.5 ns. Tras el desacoplamiento de las fibras, los cuatro haces retardados se coliman. Cada trayectoria del haz tiene espejos independientes que permiten la alineación espacial de los cuatro focos en forma de rosquilla en el patrón de excitación MINFLUX. Los cuatro haces se recombinan y pasan por una placa de fase $0 - 2\pi$ de vórtice (VPP) y la óptica de polarización para crear focos en forma de rosquilla en la muestra con un objetivo de microscopio. En la sección 4.2 se ofrecen más detalles sobre el montaje y el software de control.

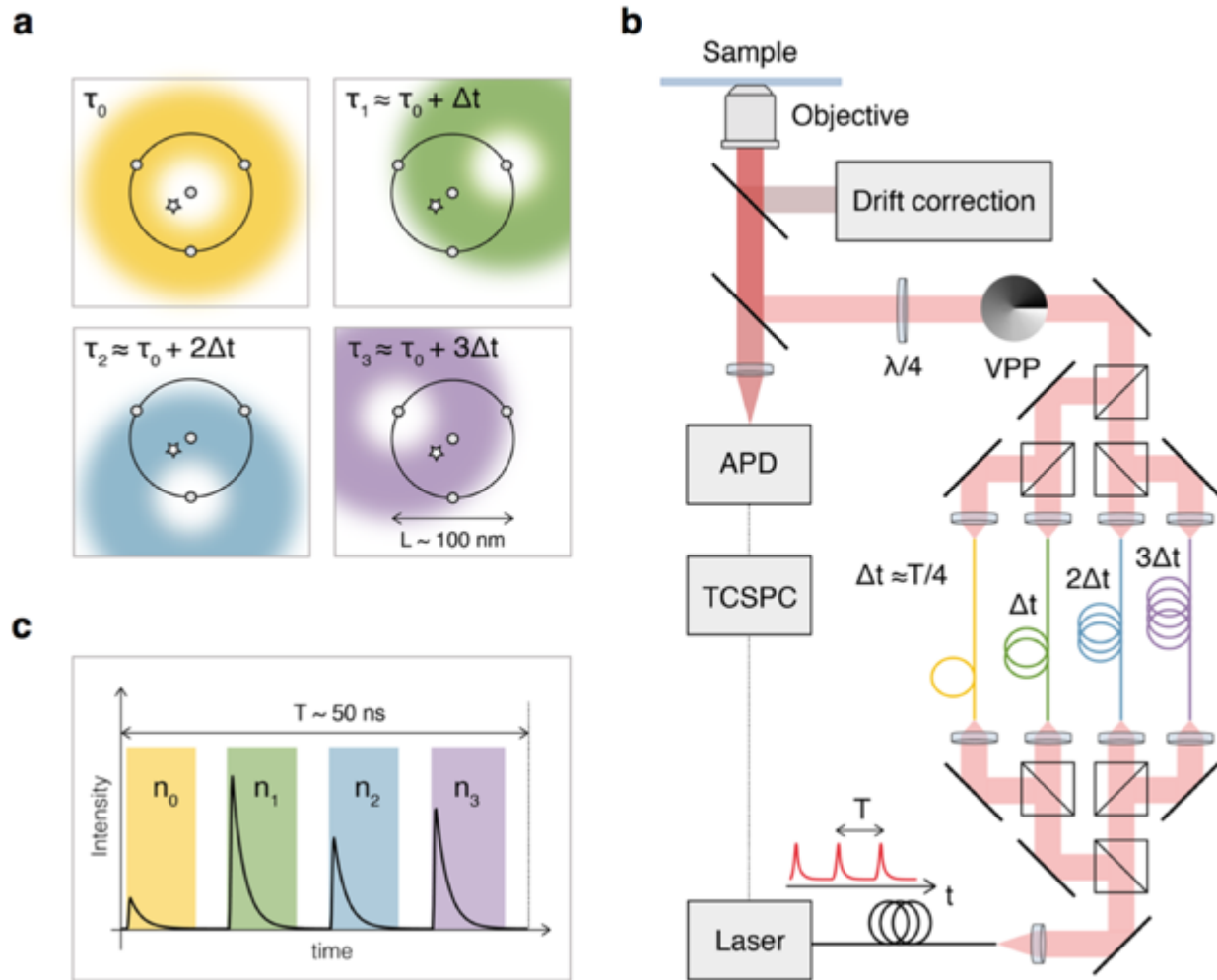


Figura 4.1 Descripción del concepto p-MINFLUX y del sistema experimental. (a) Cuatro haces pulsados intercalados en forma de rosquilla se enfocan sobre la muestra dispuestos en un patrón triangular con el cuarto haz colocado en el centro del triángulo. El tiempo de llegada de cada pulso se denota como τ_i . La posición de una única molécula fluorescente situada entre las posiciones de los puntos láser se indica con una estrella. (b) Esquema del montaje p-MINFLUX que detalla la vía de excitación utilizada para generar los focos de rosquilla intercalados por pulsos y retrasados por Δt . (c) Señal esquemática de los recuentos de fotones detectados dentro de un período (T) de la fuente láser original.

La posición relativa entre la muestra y el objetivo se estabiliza con una corrección activa *xyz* de la deriva mediante la obtención de imágenes de nanopartículas fiduciaros con una cámara independiente. La posición de las nanopartículas fiduciaros se registra y se utiliza finalmente para las correcciones de deriva posteriores al procesamiento. La corrección de

las derivas mecánicas es esencial para lograr la máxima precisión en la localización. Los detalles se analizan en la sección 4.3.

El camino de detección del dispositivo experimental no presenta diferencias con respecto a un microscopio confocal con resolución temporal del tiempo de llegada de fotones individuales. La luz de fluorescencia de la muestra se selecciona espectralmente utilizando divisores de haz dicróicos convencionales y filtros de paso de banda, y se detecta con un fotodiodo de avalancha (APD). Las señales de los fotones detectados en el APD se leen con un dispositivo de conteo de fotones individuales resuelto en el tiempo (TCSPC) sincronizado con la fuente láser. De este modo, las ventanas de tiempo de detección dentro del periodo T pueden definirse para cada uno de los pulsos de excitación (Figura 4.1c). Integrando los conteos de fotones de las ventanas de detección durante un tiempo determinado, se obtiene un vector de recuentos $\bar{n} = (n_0, n_1, n_2, n_3)$ que se utiliza para recuperar la posición de la molécula mediante una estimación de máxima verosimilitud. Naturalmente, la información del tiempo de vida del estado excitado también está disponible en cada una de las cuatro ventanas de tiempo de detección (Figura 4.1c). La configuración se controla con un software dedicado de código abierto escrito en Python, llamado PyFLUX (detalles en la sección 4.2). Se utilizó un software personalizado para analizar los datos del TCSPC y obtener las estimaciones de la posición del emisor con MINFLUX.

4.2 Configuraciones ópticas

Se construyeron dos versiones del microscopio p-MINFLUX y están en pleno funcionamiento. Una en el laboratorio del Prof. Fernando Stefani en el CIBION de Buenos Aires, Argentina, y la otra en el laboratorio del Prof. Philip Tinnefeld en la LMU de Múnich, Alemania.

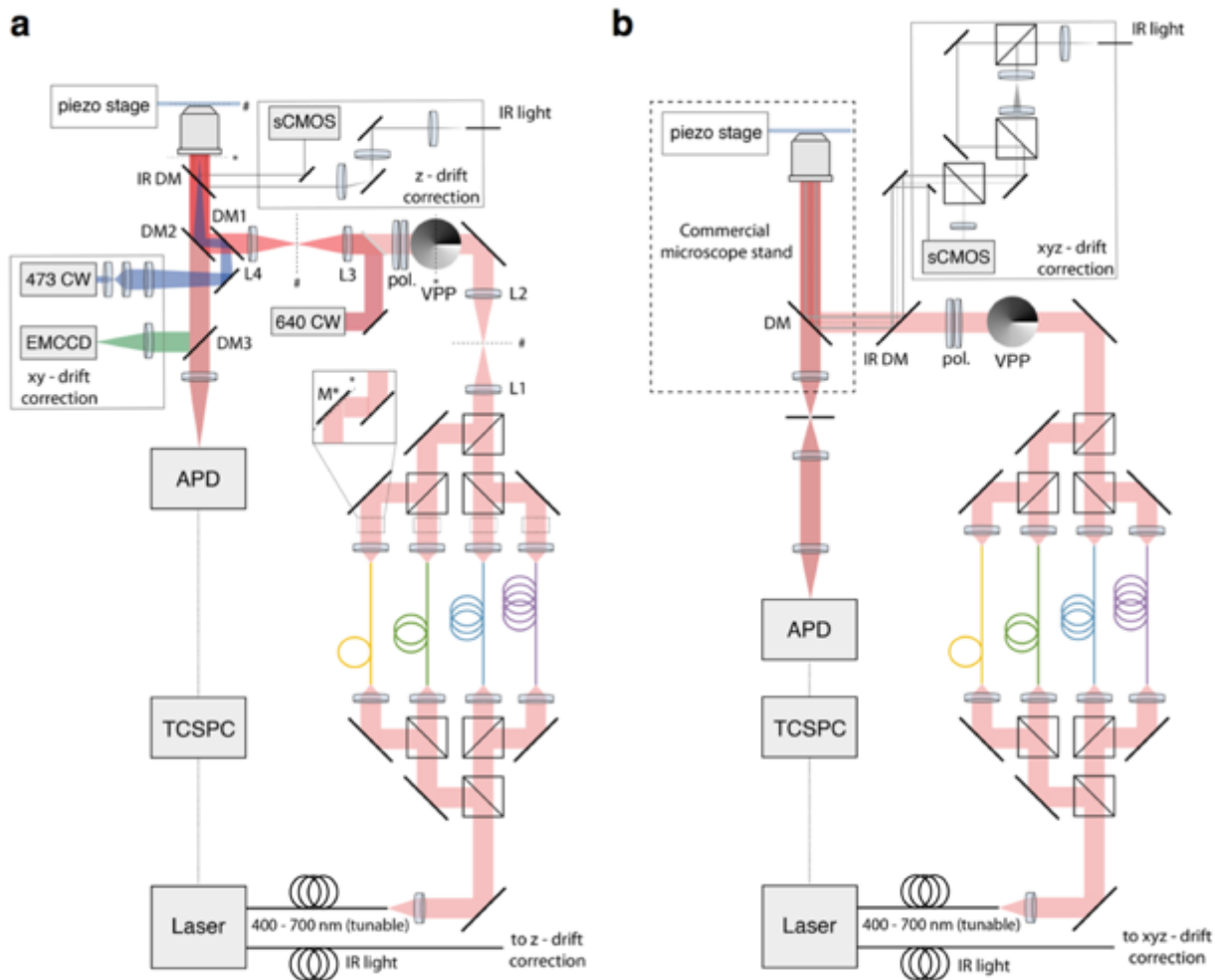


Figura 4.2 (a) Montaje p-MINFLUX construido en Buenos Aires. Láser: Fianium SC 400-4 (NKT Photonics), 640 CW: Lambda mini Evo, RGB Photonics GmbH, 473 CW: GEM 473, Laser Quantum, etapa piezo: NanoMax 300 con controlador BPC303, Thorlabs Inc.), Lente 1 (L1), L2, L3, L4: AC254-300-A-ML (Thorlabs Inc.), VPP: V-633-10, Vortex Photonics, Polarizador (pol.) WPH05M-633 y WPQ05M-633, Thorlabs Inc.), Espejo dicroico (DM1): ZT532/640RPC-UF, Chroma Technology Corporation, DM2: ZT532/640RPC, Chroma Technology Corporation, IR DM: T750SPXRXT-UF1, Chroma Technology Corporation, DM3: ZT532RDC, Chroma Technology Corporation, EMCCD: iXon DV887 (Andor), sCMOS: ThorCam DCC1240C (Thorlabs Inc.), Fotodiodo de avalancha (APD): SPCM-AQR-13 (PerkinElmer Optoelectronics), conteo de fotones individuales resuelto en el tiempo (TCSPC): PicoHarp 300 (PicoQuant GmbH). **(b) Montaje p-MINFLUX construido en Munich.** Láser: SuperK Fianium FIU-15 (NKT Photonics GmbH), etapa piezoeléctrica: P733.3CD (Physik Instrumente (PI) GmbH), VPP: V-532-20-1 (Vortex Photonics) pol: WPQ05M-532 y WPH532M-532, Thorlabs GmbH, IR DM: ZT 785 SPXXR (Chroma Technology Corp.), DM: ZT532RDC - STED (Chroma

Technology Corp.), sCMOS: Zelux, (Thorlabs GmbH), APD: SPCM-AQRH-16-TR (Excelitas Technologies GmbH & Co. KG), TCSPC: HydraHarp 400, PicoQuant GmbH).

4.2.1 Configuración de Buenos Aires

Excitación. Se utiliza un láser supercontinuo (Fianium SC 400-4, NKT Photonics) para la excitación con pulsos de ~ 80 ps de ancho (FWHM) y una tasa de repetición de $\frac{1}{T} = 40$ MHz. El espectro de emisión va entre $\lambda \sim 420$ nm a $\lambda \sim 2000$ nm y la salida del sistema láser es un haz colimado y no polarizado. La luz infrarroja con $\lambda > 1064$ nm es filtrada por un espejo dicróico (BLP01-1064R-25, Semrock Inc.). Una pequeña fracción de la luz infrarroja se envía a un fotodiodo rápido fabricado a medida que detecta la llegada de los pulsos láser. El resto de la luz infrarroja lejana se desecha. La luz de longitud de onda infrarroja cercana ($\sim 750 - 1024$ nm) se separa del haz principal (T750SPXRXT-UF1, Chroma Technology Corporation) y se acopla a una fibra multimodo para utilizarla en la óptica de corrección de la desviación axial. De la luz visible restante, se selecciona una banda de ~ 20 nm alrededor de 642 nm para la excitación de fluorescencia con un filtro óptico (ZET642/20x, Chroma Technology Corporation).

La intensidad de la luz se controla utilizando un flipper con un filtro ND montado (MFF101/M y NDK01, Thorlabs Inc.) y un filtro ND continuo (NDC-50C-2, Thorlabs Inc.). A continuación, el haz de excitación se divide mediante un divisor de haz polarizado (PBS) (CCM1-PBS251/M, Thorlabs Inc.). Los dos haces tienen estados de polarización ortogonales. Cada uno de los haces se envía a un divisor de haz no polarizante 50:50 (CCM1-BS013/M, Thorlabs Inc.). Este sistema de división del haz genera dos pares de haces con cada par compartiendo la polarización lineal ortogonal.

Los cuatro haces se acoplan en fibras que mantienen la polarización (PM630-HP, Thorlabs Inc.). Cada una de las fibras tiene una longitud diferente, aprox. 1.3 m, 2.6 m, 3.9 m, y 5.2 m que generan el $T/4$ retardo de tiempo entre los pulsos. La luz linealmente polarizada

que sale de las fibras se refleja con espejos dieléctricos (BB1-E02, Thorlabs Inc.) en el sistema de combinación de haces. Los cuatro haces se combinan mediante tres divisores de haz no polarizados 50:50 (CCM1-BS013/M, Thorlabs Inc.) utilizados como combinadores de haz. Los ejes de polarización lineal se ajustan mediante la rotación de los acopladores de salida de fibra (60FC, Schäfter + Kirchhoff GmbH).

Los haces recombinados son enfocados por una lente L1 $f = 300$ mm (AC254-300-A-ML, Thorlabs Inc.) a un plano conjugado con el plano focal posterior (BFP) del objetivo del microscopio. La lente L1 es la primera de cuatro lentes idénticas que forman un sistema doble de $4f$. Entre L2 y L3 se coloca un VPP (V-633-10, Vortex Photonics) en el plano conjugado con el plano focal posterior (BFP) del objetivo. Los planos conjugados se indican con * y # en la figura 4.2a. El VPP crea el foco en forma de rosquilla en el plano focal del objetivo de inmersión en aceite (CFI Plan Fluor 100x, NA = 1,4, Nikon Instruments Inc.). La polarización circular es necesaria para crear los mínimos de intensidad en el centro de los focos en forma de rosquilla y se consigue mediante la combinación de $\frac{\lambda}{2}$ y $\frac{\lambda}{4}$ (WPH05M-633 y WPQ05M-633, Thorlabs Inc.) que se colocan cerca de L3. La quiralidad de la polarización circular debe coincidir con la quiralidad de la VPP para conseguir un mínimo de intensidad en los haces enfocados¹⁴³, por lo que la recombinación de los haces no pudo realizarse con un PBS, lo que daría lugar a una mezcla de dos haces con polarización circular izquierda y dos haces con polarización circular derecha.

Los cuatro haces pulsados intercalados comparten el patrón de excitación de rosquilla. Los espejos M* están situados en el plano conjugado con el VPP y el BFP y permiten desplazar espacialmente cada uno de los haces pulsados-intercalados cambiando sus ángulos de inclinación sin cambiar su posición lateral respecto al VPP. Esto permite asegurar casi la misma modulación de fase en el plano de Fourier para los cuatro haces y alinear los cuatro haces independientemente para obtener el patrón de excitación (EP) deseado en el plano de la muestra. Además, se puede colocar un pinhole en el plano conjugado de la muestra antes del VPP para limpiar los haces de posibles distorsiones en los divisores de haz utilizados para la recombinación.

Se añadió al montaje un sistema confocal auxiliar consistente en un láser de diodo de onda continua (Lambda mini Evo, RGB Photonics GmbH) que emite a $\lambda = 640$ nm para proporcionar una excitación con un perfil de haz gaussiano. Utilizando un divisor de haz de película 92:8 (BP108, Thorlabs Inc.), la luz láser colimada se acopla a la trayectoria óptica de excitación.

Detección. La luz emitida por la muestra es recogida por el objetivo. Pasa por un espejo dicróico (ZT532/640RPC, Chroma Technology Corporation) que refleja los haces de excitación. Los filtros notch bloquean la luz de excitación de los haces de excitación rojos (ZET642NF, Chroma Technology Corporation), de la excitación azul de campo amplio (ZET473NF, Chroma Technology Corporation) y el haz infrarrojo reflejado (NF808-34, AHF Analysentechnik AG).

La emisión de fluorescencia se enfoca con una lente de tubo (AC254-50-A-ML, Thorlabs Inc.) sobre un fotodiodo de avalancha (APD) (SPCM-AQR-13, PerkinElmer Optoelectronics). El APD detecta los fotones con una eficiencia cuántica del 90% a $\lambda = 650$ nm. Proporciona una resolución temporal de 350 ps (FWHM) en la detección de los fotones individuales y presenta en promedio 150 cuentas oscuras por segundo. La señal digital del APD se envía a una unidad TCSPC (PicoHarp 300, PicoQuant). El temporizador interno de la unidad TCSPC correlaciona la señal de detección de fotones del APD con la señal del fotodiodo que detecta la llegada de cada pulso láser de excitación. Para cada fotón detectado, devuelve un tiempo absoluto desde el inicio de la medición y el tiempo transcurrido desde el último pulso láser. La resolución temporal de la unidad TCSPC es 8 ps y el tiempo muerto tras la detección de un fotón es, según el fabricante, de < 95 ns.

Corrección de la deriva. El sistema óptico que proporciona la estabilización z emplea la luz infrarroja cercana acoplada en una fibra multimodo. Tras la atenuación y la limpieza (ET705/72M y T750SPXRXT-UF1, Chroma Technology Corporation), la luz infrarroja se envía hacia el objetivo. El haz colimado entra en el objetivo por el borde de la apertura focal posterior. Tras reflejarse en la interfaz de la muestra y el cubreobjetos, la luz IR sale del objetivo paralela al haz IR incidente. La luz reflejada pasa por una lente de tubo

(AC254-150-A-ML, Thorlabs Inc.) y se enfoca en una cámara CMOS (ThorCam DCC1240C, Thorlabs Inc.). La posición en la cámara CMOS del haz reflejado depende directamente de la distancia de separación muestra-objetivo. A través de una calibración con la platina piezoeléctrica, determinamos que la posición relativa muestra-objetivo puede ser monitoreada con una precisión mejor que 10 nm y una resolución temporal de 20 ms, limitada por la velocidad de adquisición de fotogramas de la cámara. Esto permitió la corrección activa de la deriva axial con un lazo de retroalimentación, manteniendo la variación de la distancia de separación muestra-objetivo menor que 10 nm durante horas.

La estabilización lateral de la muestra se realiza mediante el seguimiento de nanopartículas fluorescentes verdes (FluoSpheres 0,2 μm Crimson, Thermo Fisher Scientific) incluidas en la muestra como marcadores fiduciaros, utilizando una configuración independiente de campo amplio. La iluminación se realiza a 473 nm (GEM 473, Laser Quantum). La emisión de fluorescencia de las cuentas fiduciaros se refleja selectivamente en un espejo dicróico (ZT647RDC, Chroma Technology Corporation) y se enfoca en una cámara EMCCD (iXon DV887, Andor) mediante una lente tubular (AC254-300-A-ML, Thorlabs Inc.). Se utiliza un filtro notch (ZET473NF, Chroma Technology Corporation) para bloquear la luz de excitación residual que llega a la cámara. El procesamiento de los datos para la estabilización xy se explica en la sección 4.3.

Instrumentación y control. El núcleo del sistema de control de los instrumentos es una tarjeta de adquisición de datos (tarjeta DAQ) (ADwin Gold II, Jäger GmbH) que sirve de convertidor analógico-digital y digital-analógico. La *ADwin* permite programar sus canales de salida para el control directo de los dispositivos conectados desde un ordenador. El *ADwin* recibe y procesa los datos de recuento de fotones en bruto del APD que se utilizan para crear una imagen a partir del escaneo confocal. Además, se conecta al controlador piezoeléctrico y a los obturadores electromecánicos (MediaLas STP 8xl, spectrabeam.de) que se utilizan para cerrar o abrir las diferentes trayectorias del haz. La platina piezoeléctrica (NanoMax 300 con controlador BPC303, Thorlabs Inc.) posiciona la muestra en las tres dimensiones con una resolución de 5 nm o mejor cuando funciona en modo de lazo cerrado.

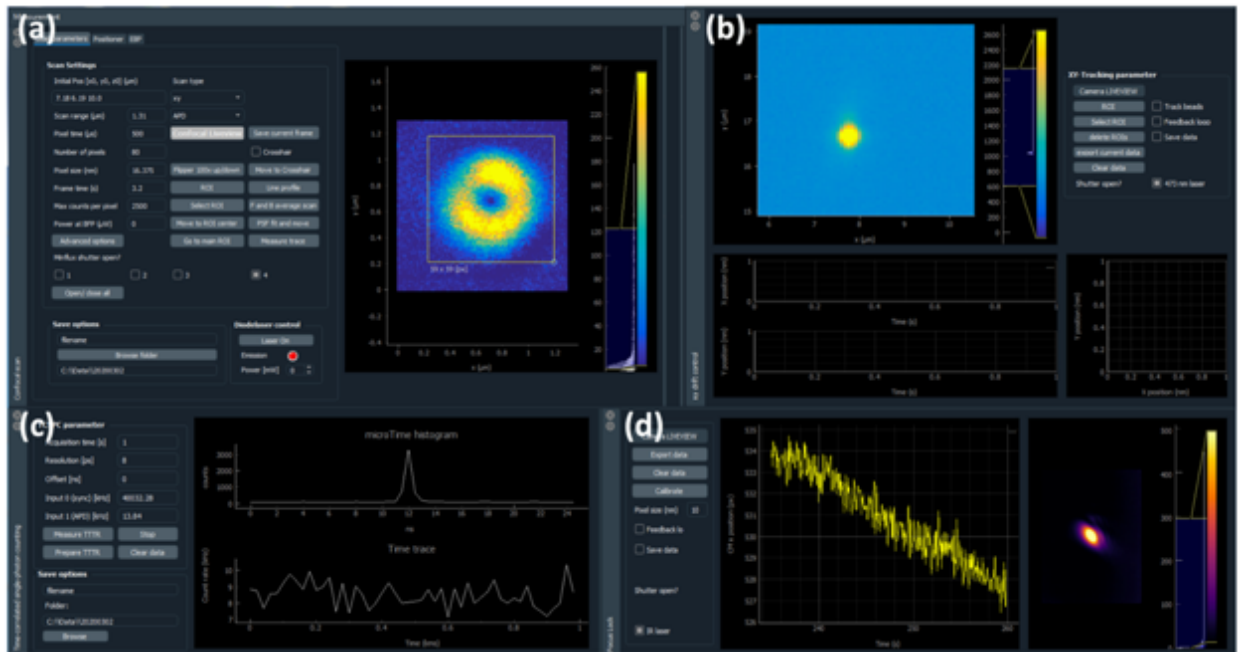


Figura 4.3 Software de control de PyFLUX. (a) Módulo de escaneo confocal. Todos los parámetros para realizar el escaneo de la etapa son accesibles al usuario y se muestra una imagen de vista previa. (b) Módulo de seguimiento fiduciario $x - y$. (c) Módulo de recuento de fotones individuales correlacionado en el tiempo (TCSPC). Todos los parámetros del TCSPC son accesibles. (d) Módulo de bloqueo de enfoque (z tracking).

El software de control de configuración constituye un proyecto de instrumentación de código abierto llamado PyFLUX, disponible gratuitamente en <https://github.com/lumasullo/pyflux> y <https://github.com/stefani-lab/pyflux>. La estructura de PyFLUX se divide en clases *backend* y *frontend*. La clase backend controla todo el hardware y envía y recibe instrucciones y datos. La clase frontend es la interfaz gráfica de usuario a través de la cual el usuario puede interactuar con el microscopio y realizar las mediciones. Ambas clases se ejecutan en hilos de Python independientes, por lo que el backend puede actuar de forma eficiente sin ninguna pérdida de velocidad debido a la representación en tiempo real de los datos en el frontend. El backend y el frontend interactúan a través de las *señales (signals)* y *ranuras (slots)* de Python.

PyFLUX está estructurado de forma modular, dividido en cuatro módulos que pueden funcionar en modo autónomo: i) el módulo de escaneo de la etapa (Figura 4.3a) que controla la placa *ADwin* para enviar las señales de escaneo al piezo y recoger las señales digitales de recuento de fotones del APD. Este módulo también controla los obturadores mecánicos de los láseres, ii) el módulo de seguimiento x-y (Figura 4.3b) controla una cámara, localiza las partículas de referencia y corrige activamente la posición del piezo a través de un lazo de retroalimentación PI, iii) el módulo TCSPC (Figura 4.3c) controla el dispositivo PicoHarp 300 a través de un *wrapper* de la biblioteca .dll y permite al usuario seleccionar todas las opciones de medición, iv) El módulo de bloqueo de enfoque (Figura 4.3d) mide la posición del haz reflejado de IR y controla la posición z del piezoeléctrico para mantener constante la distancia entre el objetivo y la muestra.

Es importante señalar que, debido a la arquitectura modular y de código abierto de PyFLUX, cualquiera o todos los módulos pueden ser reutilizados e integrados en otros proyectos de instrumentación. Más detalles sobre la instrumentación específica de Python y versiones actualizadas del código están disponibles en el repositorio de GitHub.

4.2.2 Configuración de Múnich

Excitación. Se utiliza un láser supercontinuo (SuperK Fianium FIU-15, NKT Photonics GmbH, Alemania) a una velocidad de repetición de 19,5 MHz como fuente de luz en combinación con un filtro de paso de banda sintonizable (SuperK VARIA, NKT Photonics GmbH, Alemania) para seleccionar el rango de longitud de onda deseado (527 - 537 nm) en el espectro de luz visible, seguido de un filtro de limpieza adicional (520/35 Brightline HC, Semrock Inc., EE.UU.). La luz no polarizada de la fuente láser se divide mediante un cubo divisor de haz polarizado (PBS251, Thorlabs GmbH, Alemania) en dos haces de polarizaciones ortogonales. Cada uno de los haces se divide a su vez mediante un cubo divisor de haz no polarizado 50:50 (BS013, Thorlabs GmbH, Alemania). Este sistema de división de haz genera dos pares de haces que comparten la polarización lineal ortogonal.

Los cuatro haces láser resultantes se acoplan a fibras monomodo que mantienen la polarización (PM-S405-XP, Thorlabs GmbH, Alemania) de longitudes 2.0 m, 4.6 m, 7.1 m y 9.7 m, de manera que el retardo entre los haces después de la fibra es de $\sim 12,5$ ns ($= T/4$). Los cuatro haces se coliman después de las fibras con una lente acromática (AC254-035-A, Thorlabs GmbH, Alemania) y se recombinan utilizando tres cubos divisores de haz 50:50 (BS013, Thorlabs GmbH, Alemania). La superposición de los haces puede ajustarse para obtener la disposición necesaria de los focos láser en el plano del objeto. Los ejes de polarización lineal se ajustan girando los acopladores de salida de fibra (Thorlabs GmbH, Alemania). Posteriormente, los haces láser con polarización lineal pasan por una combinación de una placa de cuarto de onda y otra de media onda (WPQ05M-532 y WPH532M-532, Thorlabs GmbH, Alemania) para que se polaricen circularmente. A continuación, se utiliza una placa de fase de vórtice (V-532-20-1, Vortex Photonics, Alemania) para introducir la modulación de fase necesaria para generar los focos en forma de donut. Los haces se guían hacia la entrada posterior del cuerpo del microscopio (IX83, Olympus Deutschland GmbH, Alemania), se reflejan en un espejo dicróico (ZT532RDC - STED, Chroma Technology Corp., EE.UU.) y se enfocan con un objetivo (UPLSAPO100XO/1.4, Olympus Deutschland GmbH, Alemania) sobre el plano de la muestra.

Detección. La luz de fluorescencia se recoge con el mismo objetivo y se transmite a través del espejo dicróico, se enfoca mediante una lente de tubo Olympus en un pinhole (120 μm , Owis, Alemania), se colima con una lente acromática (AC254-150-A, Thorlabs GmbH, Alemania) y se enfoca con una segunda lente acromática (AC127-025-A, Thorlabs GmbH, Alemania) al chip de un fotodiodo de avalancha (SPCM-AQRH-16-TR, Excelitas Technologies GmbH & Co. KG, Alemania) tras filtrar la luz dispersa restante del láser con filtros ópticos de interferencia adecuados (785 SP EdgeBasic, Semrock Inc, EE.UU., 2x 582/75 Brightline HC, Semrock Inc. EE.UU.). La señal digital del APD se envía a una unidad TCSPC (HydraHarp 400, PicoQuant GmbH, Alemania).

Corrección de la deriva. Para medir y corregir la deriva de la muestra durante las mediciones, se utiliza la salida IR del filtro de pasabanda variable. Se selecciona un haz

de longitud de onda entre 850 y 900 nm con filtros ópticos (875/50 bandpass, Edmund Optics GmbH), se acopla a una fibra monomodo (780HP, Thorlabs GmbH, Alemania), se desacopla y se colima. A continuación, este haz se divide con un cubo divisor de haz 50:50 (BS014, Thorlabs GmbH, Alemania) y se combina de nuevo tras insertar un sistema de lentes (ACN254-040-B, AC254-150-B, Thorlabs GmbH, Alemania) en una de las dos trayectorias que enfoca el haz hacia el plano focal posterior del objetivo (línea de puntos) para crear una iluminación de campo amplio en el plano de la muestra. Este haz se utiliza para la corrección de la deriva xy en la que se localiza la posición de los marcadores fiduciaros durante la medición. El haz IR colimado se enfoca sobre el plano de la muestra en un ángulo oblicuo para conseguir un punto dependiente de la posición z en el detector y utilizarlo para la corrección de la deriva z. Ambos haces IR se acoplan a la trayectoria del haz principal a través de un espejo dicroico (ZT 785 SPXXR, Chroma Technology Corp., EE.UU.) y se introducen en el microscopio para iluminar una región cercana, pero no superpuesta, al campo de visión utilizado para el MINFLUX. La luz reflejada y retrodispersada se divide con un cubo divisor de haz adicional 50:50 (BS014, Thorlabs GmbH, Alemania) del haz IR de excitación y se detecta en una cámara CMOS única (Zelux, Thorlabs GmbH, Alemania) en diferentes posiciones del chip.

Control de la configuración. La platina piezoeléctrica (P733.3CD, Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Alemania) traslada la muestra en las tres dimensiones con una resolución de 0,3 nm cuando funciona en modo de lazo cerrado. Todos los componentes de la configuración, incluida la platina piezoeléctrica, se controlan digitalmente y se integran a través de una versión modificada del proyecto PyFLUX. Para más detalles y el código fuente de esta versión del software de control, consulte <https://github.com/zaehringer-Jonas/pyflux>

4.3 Corrección de la deriva

En ambas configuraciones, tanto la posición xy mediante marcadores fiduciaros y la posición z mediante el haz IR reflejado se registran en cada experimento. La precisión de seguimiento de los marcadores fiduciaros conseguida en xy es mejor que 1 nm y la precisión en z es mejor que 10 nm lo que es suficiente para la precisión de localización p-MINFLUX que esperamos. Durante las mediciones se suele aplicar una corrección activa de la deriva mediante un lazo de retroalimentación entre la xyz señal y la etapa piezoeléctrica (Figura 4.4a). Normalmente, la corrección activa de la deriva consigue una estabilización mejor que 5 nm en xy y mejor que 10 nm en z (desviación estándar). Cualquier deriva residual xyz puede corregirse mediante el postprocesamiento utilizando la información de seguimiento. El sistema de estabilización xyz sistema de estabilización también puede utilizarse para escanear un emisor sobre el campo de visión (Figura 4.4b).

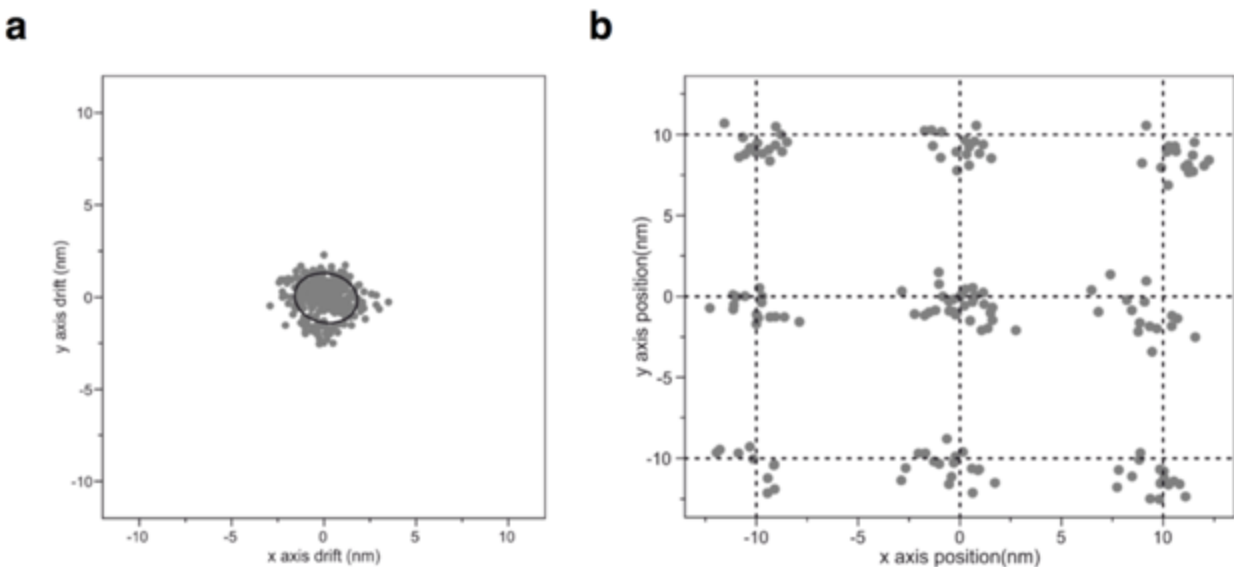


Figura 4.4 Corrección de la deriva (a) Localización basada en cámara de los marcadores fiduciaros durante una medición puntual de 30 s y la elipse de covarianza (negra) que muestra una precisión de $\sigma = 1.5$ nm. (b) Localización basada en cámara de los marcadores fiduciaros durante la medición de la Figura 2C. El posicionador piezoeléctrico se mueve en una cuadrícula con una separación de 10.0 nm de media, y una precisión media de $\sigma = 1.7$ nm.

4.4 Medición del patrón de excitación

La caracterización precisa del patrón de excitación es la clave de todo método de localización de una molécula individual que utilice iluminación estructurada secuencial. A diferencia del MINFLUX original, en el que un mismo foco se desplaza secuencialmente por las cuatro posiciones, en el p-MINFLUX cada uno de los cuatro focos procede de un haz independiente. Así, en el caso del p-MINFLUX, la caracterización del patrón de haces comprende los dos pasos siguientes: i) la caracterización de los perfiles de intensidad y las posiciones de los cuatro haces enfocados en la muestra, y ii) la caracterización de los tiempos de llegada a escala de nanosegundos de los pulsos intercalados.

El perfil de intensidad y la posición de los haces de excitación se determinaron obteniendo imágenes de sondas luminiscentes estables y brillantes de tamaño nanoscópico con cada uno de los haces por separado (Figura 4.5a). Para ello, se utilizaron nanopartículas de oro (AuNP, 60 nm de diámetro, de fabricación propia), nanopartículas de poliestireno con moléculas fluorescentes (FluoSpheres 0,04 μm Dark Red, Thermo Fisher Scientific), o se utilizaron nanopartículas fluorescentes diseñadas con ADN (GATTAbead ATTO532, GATTAquant GMBH). En la figura 4.5a se muestra una medición típica del perfil de intensidad de los cuatro haces. Los perfiles de intensidad individuales, así como sus posiciones, constituyen información esencial para localizar las moléculas, por lo que deben determinarse con gran precisión. Normalmente, se determinan a partir de imágenes de alta resolución con un tamaño de píxel entre 1 y 10 nm, y una SNR media superior a 10. En la Figura 4.5c se muestra una vista detallada del mínimo central de un foco habitual en forma de rosquilla, junto con su representación analítica mediante un polinomio de grado 4 en la Figura 4.5d. Este último se utiliza como entrada ($I(\mathbf{r}_i)$) del apartado 3.1.1, ecuación 3.5) en el análisis de estimación. La alineación de los haces en la disposición deseada (tres focos en un triángulo equilátero y el cuarto foco en su centro) se consigue operando los soportes de los espejos cinemáticos. La posición de cada haz puede desplazarse sobre la muestra de forma independiente mediante dos espejos. En los experimentos presentados aquí, esto se hizo manualmente y se controló mediante mediciones con nanopartículas de oro o GATTAbeads. De este modo, pudimos alinear

rutinariamente el patrón de excitación deseado con 5 – 10 nm con precisión, en ambos montajes ópticos. Una descripción detallada de los protocolos de alineación y las optimizaciones para obtener PSFs de alta calidad en forma de donut se puede encontrar en ¹⁴⁴.

En la figura 4.5b se muestra un ejemplo de medición de las llegadas temporales intercaladas de los cuatro pulsos. Estos datos también pueden obtenerse a partir de la medición de la intensidad y la posición utilizando nanopartículas o, alternativamente, pueden obtenerse a partir de una medición independiente utilizando una muestra reflectante (es decir, un espejo de plata). Esto último tiene la ventaja de que los pulsos no se ensanchan por el tiempo de vida de la fluorescencia de las sondas y proporcionan una estimación justa de la función de respuesta al impulso temporal (IRF) del sistema. En nuestro caso, el principal factor limitante de la IRF fue la precisión temporal (jitter) del APD, lo que dio lugar a una IRF con $FWHM \sim 300$ ps. Para nuestros fines, esta resolución es más que suficiente para medir los tiempos de vida de la fluorescencia > 1 ns o y para asignar correctamente cada fotón detectado a las ventanas temporales correspondientes para el análisis p-MINFLUX.

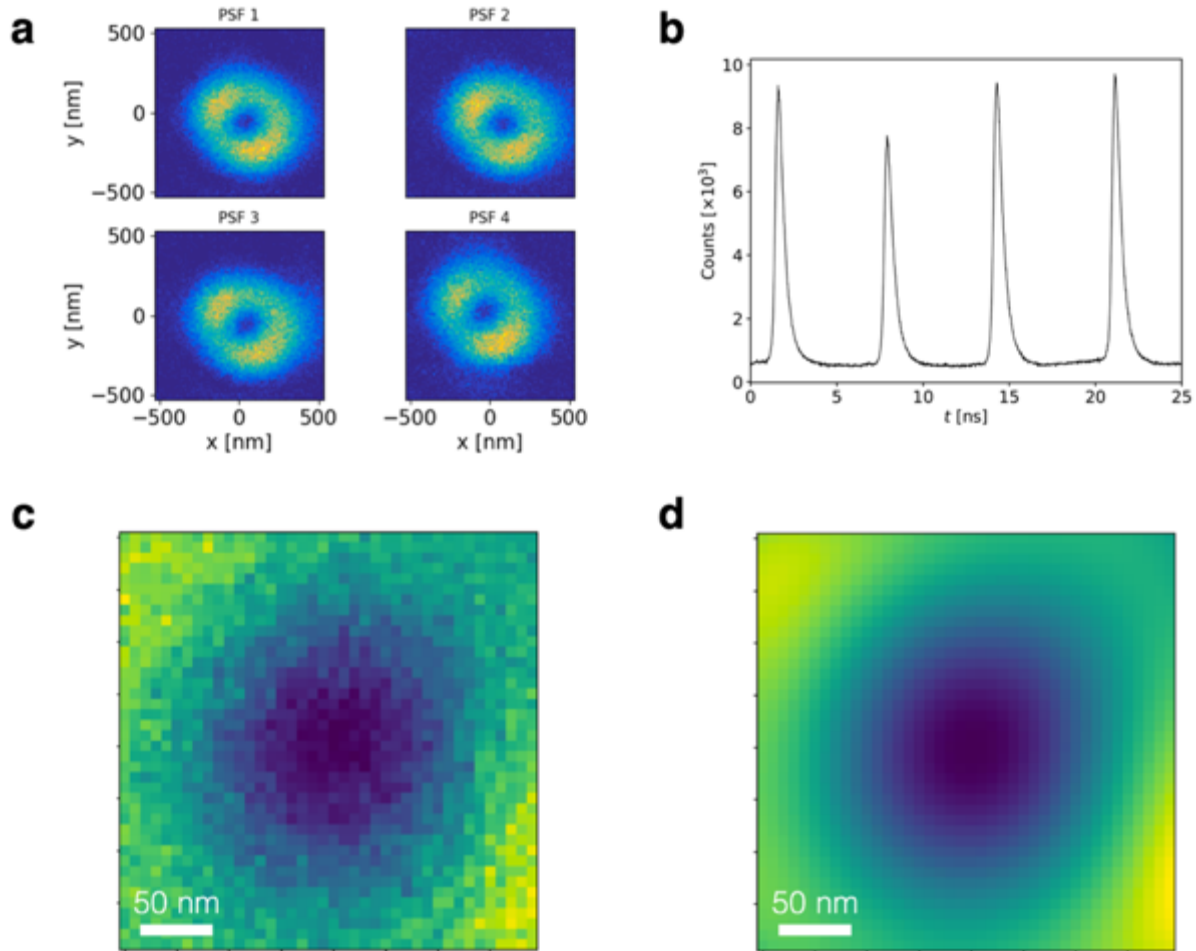


Figura 4.5 Medición del patrón del haz de excitación para p-MINFLUX. (a) Perfil de intensidad y posición de cada haz enfocado. (b) Tiempo de llegada de cada pulso dentro del periodo del láser. (c) Vista detallada del mínimo central medido de uno de los haces. (d) Ajuste polinómico a los datos de (c).

4.5 Muestras de prueba basadas en origami de ADN

Para demostrar las capacidades de p-MINFLUX preparamos varias muestras de origami de ADN. El origami de ADN¹⁴⁵ es una tecnología basada en el autoensamblaje del ADN. En pocas palabras, consiste en plegar una hebra larga (~ 8000 bases) de ADN ("andamio")

en formas prediseñadas mediante la hibridación con un gran número de hebras cortas de ADN ("grapas"). El ADN-origami permite la organización de moléculas en posiciones controladas con una precisión de sub 1-nm. Por lo tanto, se pueden preparar excelentes muestras de calibración para la microscopía de superresolución¹⁴⁶ con ADN-origami, especialmente para comprobar el rendimiento en la escala de 1-10 nm. Además, mediante la ingeniería cuidadosa de la afinidad entre las diferentes cadenas de ADN, se pueden fabricar estructuras dinámicas. A continuación describimos brevemente los protocolos de las muestras utilizadas para los experimentos presentados en las siguientes secciones. Para una revisión exhaustiva de la fabricación de origamis de ADN, véase¹⁴⁷.

4.5.1 Plegado de estructuras de ADN-origami

Las estructuras de origami de ADN se plegaron con un exceso de grapas 10 veces superior al andamio en el buffer de plegado (20 mM MgCl₂ × 6H₂O, 40 mM de base Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA-Na₂ × 2H₂O) con una rampa de plegado no lineal de 16 horas¹⁴⁸.

Se utilizó la electroforesis en gel para la purificación. El gel de 50 mL contiene 1,5% de agarosa, 2 µL de tinte de ADN peqGreen y buffer de gel (12 mM MgCl₂ × 6H₂O, 40 mM de base Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA-Na₂ × 2H₂O). Después de añadir 1 buffer de carga de gel BlueJuice a la solución de origami de ADN, el gel enfriado funcionó durante 2 h a 60 V. A continuación, se cortó el gel y se extrajo la solución de origami de ADN por estrujamiento. La concentración de ADN origami se midió con un espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c (ThermoFisher Scientific).

La secuencia completa del ADN-origami se encuentra en el Apéndice 4.1.

4.5.2 Incubación de ADN-origami

Los cubreobjetos se lavaron primero con agua ultrapura, luego se limpiaron con un limpiador de ozono (PSD-UV4, Novascan Technologies, Inc., EE.UU.) y se volvieron a lavar con agua ultrapura. Para la inmovilización de la muestra, la cámara de flujo se recubrió con albúmina de suero bovino marcada con biotina (1 mg/mL Sigma-Aldrich Chemie GmbH) y NeutrAvidina (1 mg/mL, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). En la cámara de flujo, las estructuras de origami de ADN (100 pM en buffer de gel 1x) se inmovilizaron gracias a la unión de biotina y NeutrAvidina.

Para suprimir el blinking y el fotoblanqueo, se utilizó un sistema buffer oxidante y reductor¹⁴⁹ (1x TAE, 12 mM MgCl₂, 2 mM trolox/troloxquinona, 1% (p/v) de D-(+) glucosa) en combinación con un sistema de eliminación de oxígeno con una concentración final de 100 u/ml de glucosa oxidasa y 2500 u/ml de catalasa. Para inducir la fotoconmutación para la obtención de imágenes de superresolución, se añadió 50 mM de beta-mercaptoetanol al buffer (1x TAE, 12 mM de MgCl₂, 2 mM de trolox/troloxquinona, 1% (p/v) de D-(+) glucosa). Se añadió 2 mM de ciclooctatetraeno para aumentar la estabilidad del colorante.

4.6 Estimación de la posición y límite de Cramér-Rao

Para estimar la posición de las moléculas fluorescentes a partir de los datos TCSPC adquiridos, primero se calcula el n_i número de fotones detectados para cada ventana de tiempo de detección. Luego se aplica la teoría de Máxima Verosimilitud presentada en el Capítulo 3 para MINFLUX. La ecuación (3.5) se utiliza para calcular los p_i . La ecuación (3.8) se utiliza para construir la función de máxima verosimilitud y la ecuación (3.9) se utiliza para obtener la posición estimada \mathbf{r}_E . Para todos los resultados presentados en este capítulo SBR se ha aproximado como constante, es decir $SBR(\mathbf{r}) \approx SBR(\mathbf{0})$. Para comparar con la precisión esperada teóricamente, utilizamos el límite de Cramér-Rao (CRB), descrito en detalle en el Capítulo 3.

Por analogía con la ecuación (3.15), elegimos evaluar nuestra precisión experimental con la expresión de la incertidumbre escalar dada por

$$\sigma_{exp} = \sqrt{\frac{1}{2} \text{tr}(\Sigma_{cov})}. \quad (4.1)$$

4.7 Caracterización experimental de la precisión y exactitud de la localización

La precisión de localización de p-MINFLUX en función del número de fotones detectados (N) fue probada con ambas configuraciones localizando emisores individuales. En Buenos Aires, los experimentos se realizaron midiendo la fotoluminiscencia de nanopartículas de oro individuales fijadas a un sustrato de vidrio. En Munich, las mediciones se realizaron con fluoróforos individuales (ATTO 532) fijados a una nanoestructura de origami de ADN. El parámetro L y el SBR fueron $L = 150$ nm, $SBR \sim 10$ para las mediciones en Buenos Aires, y $L = 120$ nm, $SBR \sim 15$ para las mediciones en Múnich.

La Figura 4.6a y la Figura 4.6e muestran ejemplos de histogramas bidimensionales de estimaciones de posición utilizando N que van desde 50 a 5300 (a, Buenos Aires) y N que van desde 50 a 2000 (e, Múnich). Como se esperaba, MINFLUX es extremadamente eficiente en cuanto a fotones para localizar moléculas. Por ejemplo, la desviación estándar experimental de las localizaciones utilizando $N = 50$ es $\sigma = 11.7$ nm (Buenos Aires) y $\sigma = 8.4$ nm (Munich), comparable a la mejor resolución alcanzable con PALM/STORM usando $N = 5000$ ^{36,150,151}. Las diferencias de precisión se deben a las diferentes L y SBR y son esperadas teóricamente (Sección 3.3.2). Con recuentos de fotones moderadamente altos de $N = 1000 - 2000$ la precisión de la localización alcanza $\sigma \approx 1 - 2$ nm en ambos conjuntos de experimentos. En la Figura 4.6e, la precisión experimental (covarianza) se representa en forma de elipses rojas y muestra que el rendimiento de p-MINFLUX sigue

de cerca el límite de Cramér-Rao (CRB, elipses blancas en la Figura 4.6a, elipses negras en la Figura 4.6e) predicho teóricamente.

Las figuras 4.6b y 4.6f muestran σ en función de N . Para comparar, en la Figura 4.6f mostramos las curvas de la precisión de localización experimental σ en función de N para el SMLM basado en la cámara (0,04 μm nanopartículas fluorescentes Dari Red, localizadas repetidamente en una configuración de campo amplio con una cámara Andor EM-CCD iXon 897 a $SBR \sim 20$) y un cálculo ideal, teniendo en cuenta únicamente el ruido de Poisson puro y sin ruido de lectura, bajo una relación señal/fondo infinita ($SBR = \infty$).

Para el mismo número de fotones detectados, p-MINFLUX ofrece una precisión de localización casi un orden de magnitud mejor que las técnicas SMLM basadas en cámaras. A la inversa, se necesitan casi dos órdenes de magnitud menos de fotones para lograr la misma resolución que con las técnicas SMLM basadas en cámaras. De esta manera, p-MINFLUX demuestra un rendimiento equivalente en términos de precisión de localización al microscopio MINFLUX original dadas condiciones experimentales equivalentes (L , N , SBR). Esto se espera porque ambos métodos trabajan bajo el mismo principio de localización de emisores individuales.

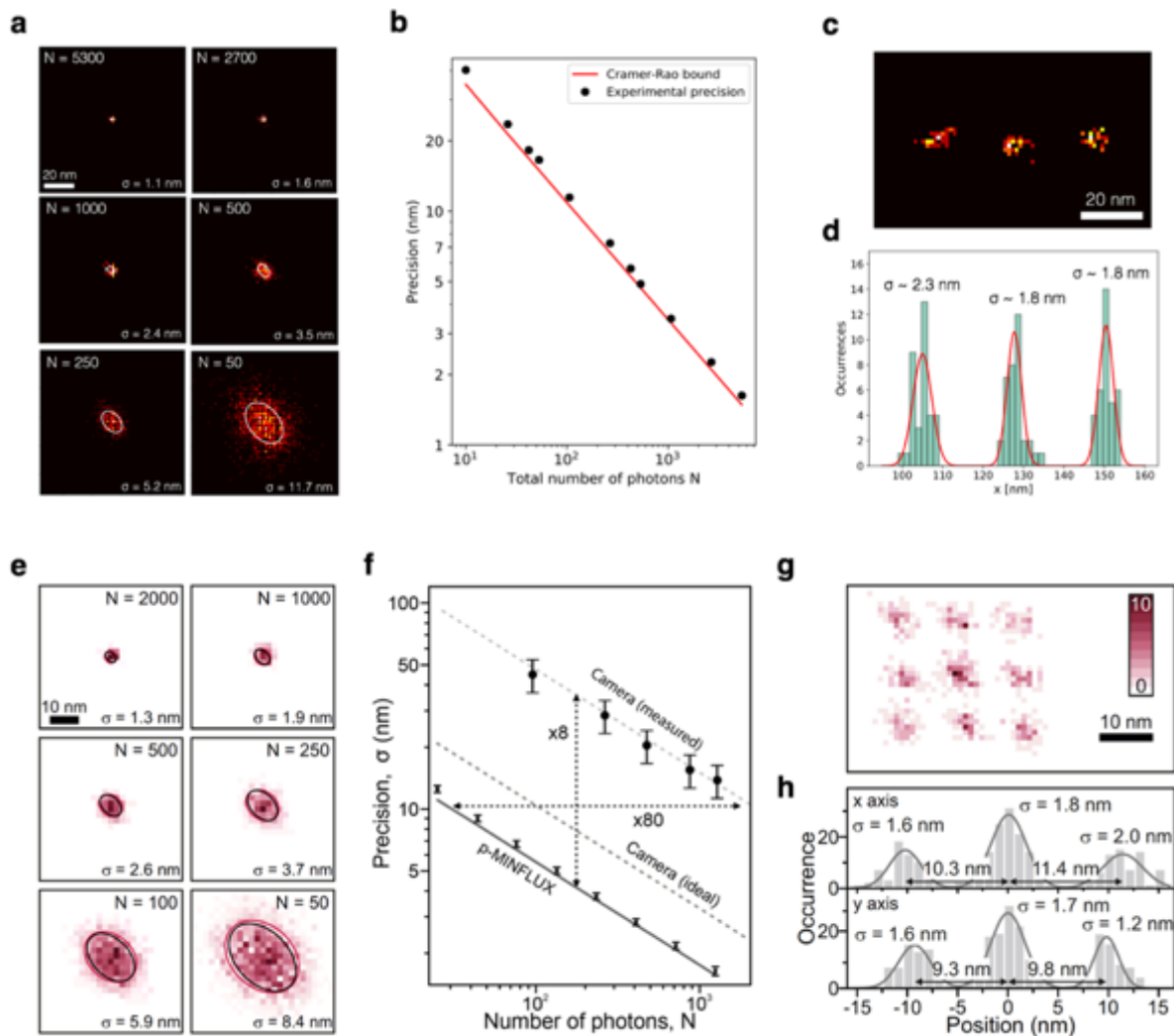


Figura 4.6 Evaluación del rendimiento de localización de p-MINFLUX para el montaje de Buenos Aires (a-d) y el montaje de Munich (e-h). (a, e) Histogramas de localización 2D de una AuNP inmovilizada (a) y de un colorante ATTO 532 fijo (e) para diferentes números de fotones, N utilizados para estimar la posición. Las elipses roja y negra muestran la covarianza de los datos experimentales y el límite de Cramér-Rao, respectivamente. (b, f) Precisión de localización en función de los fotones recogidos, N , y el límite de Cramer-Rao (CRB) como límite inferior de la incertidumbre de p-MINFLUX (negro). Precisiones de localización basadas en la cámara (datos medidos) con $SBR \sim 20$ y el cálculo para una cámara ideal CRB con $SBR = \infty$ se muestran en gris en (f). La línea gris detrás de los datos medidos es sólo una ayuda visual. (c, g) Histograma de localización de una sola AuNP (c) y de un GattaBead© (g) desplazado en pasos controlados mediante un piezo-posicionador. (c, h) Sección transversal a lo largo del eje x (c) y del eje x central (arriba) y del eje y central (abajo) de los histogramas de localización mostrados en (c) y (g) respectivamente.

La precisión de la localización de p-MINFLUX se evaluó localizando una sola AuNP (Buenos Aires) o una nanopartícula fluorescente GattaBead© (23 nm de diámetro, con ATTO 542, vida de fluorescencia: 3.2 ns, Múnich). La figura 4.5c muestra los histogramas de localización obtenidos al desplazar una nanopartícula de oro mediante un piezoposicionador en tres posiciones separadas por $d = 25$ nm. Las localizaciones se realizaron con una media de $N = 3400$. La figura 4.5d muestra los perfiles medios de los histogramas de localización. Las distancias medidas entre las posiciones fueron $d \approx 23 - 27$ nm. La figura 4.5g muestra los histogramas de localización obtenidos con las nanopartículas fluorescentes GattaBead© al desplazarlas sobre una rejilla cuadrada con un tamaño de paso de $d = 10$ nm. Estas localizaciones se realizaron con una media de $N = 2000$. La figura 4.6h muestra los perfiles medios de la fila central y la columna central de las distribuciones de localización. Las distancias medidas entre las posiciones fueron $d \approx 9 - 11$ nm. En ambos conjuntos de experimentos, los valores obtenidos para las distancias de los objetivos estaban en buena concordancia con las posiciones de los marcadores fiduciaros determinados independientemente para corregir la deriva de la muestra durante las mediciones (véase la sección 4.3). Por tanto, las variaciones observadas se atribuyeron a la precisión de los piezoposicionadores utilizados.

4.8 Simulaciones de p-MINFLUX

El principio de funcionamiento de p-MINFLUX también se evaluó mediante simulaciones numéricas que se describen en detalle en esta sección. En resumen, las simulaciones demuestran que el rendimiento de p-MINFLUX sólo se ve ligeramente influenciado por los desajustes del patrón del haz de excitación. Por ejemplo, una desalineación lateral de cualquiera de los cuatro focos de la rosquilla, o de todos ellos, en menos de 15 nm, deteriora la precisión de la localización en menos de 1 nm. También hemos evaluado el efecto en la precisión y exactitud de la localización de la posible interferencia entre las ventanas de

tiempo de detección para diferentes tiempos de vida. En general, esta interferencia puede deteriorar la precisión de la localización y/o introducir un sesgo de localización. Sin embargo, estos efectos son menores que ~ 1 nm para tiempos de vida inferiores al 25% de las ventanas de tiempo de detección (3 ns en nuestro caso), y menores que ~ 2 nm para tiempos de vida de hasta el 33% de las ventanas de tiempo de detección (4 ns en nuestro caso).

4.8.1 Descripción de las simulaciones de Monte Carlo

Hemos desarrollado un paquete de software con funciones que simulan un experimento completo de p-MINFLUX, incluyendo la excitación pulsada con diferentes patrones de haz, la emisión de fluorescencia, la detección TCSPC y la estimación de la posición del emisor a partir de los tiempos de llegada de los fotones.

Brevemente, en un primer paso se crean focos con forma de rosquilla (o focos con cualquier otra geometría). A continuación, dada una determinada posición del emisor dentro de la disposición de los focos, se extrae un conjunto de $\bar{n} = [n_0, n_1, n_2, n_3]$ fotones que se extrae de una distribución multinomial. Los tiempos de llegada de los fotones se generan a partir de unas estadísticas de emisión predefinidas; nosotros utilizamos una distribución exponencial simple de acuerdo con el comportamiento observado de los fluoróforos. Los tiempos de llegada de los fotones simulados se registran tanto en la escala de tiempo de vida de la fluorescencia (es decir, desde el pulso de excitación del láser; microtiempo) como en la escala de tiempo absoluto de la simulación (es decir, desde el inicio del experimento simulado; macrotiempo). Se añaden fotones de fondo con una distribución uniforme en el tiempo para simular diferentes situaciones de SBR.

En este punto, el análisis se realiza exactamente igual que con los datos reales, calculando el MLE de la posición del emisor como se explica en el Capítulo 3, apartado 3.1.1, ecuaciones (3.8) y (3.9). Para cada conjunto deseado de parámetros experimentales, se realiza un número (normalmente $M = 1000$) de simulaciones de p-MINFLUX para

obtener la distribución de probabilidad completa del estimador de forma Monte-Carlo. Normalmente, se utilizó el error medio de la distribución como métrica de calidad de la localización.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{2M} \sum_{i=1}^M ((x_i - x)^2 + (y_i - y)^2)} \quad (4.2)$$

donde M son el número de resultados simulados, (x, y) indican la posición real del emisor y (x_i, y_i) son el resultado de la i -ésima simulación. Cabe señalar que (4.2) es muy similar a la ecuación (4.1), pero utiliza la posición real en lugar de la posición media estimada para el cálculo de la traza de la matriz de covarianza, con lo que se tiene en cuenta el error debido a cualquier posible sesgo.

Las funciones utilizadas para simular los experimentos son de código abierto y pueden encontrarse en

https://github.com/lumasullo/p-minflux/tree/main/tools/tools_simulations.py

4.8.2 Efecto de la desalineación del patrón de excitación

Analizamos la influencia de los desajustes del patrón de excitación (PE) en la precisión de localización alcanzable mediante simulaciones de Monte Carlo. En particular, nos interesaba cuantificar el efecto de la alineación manual del PE que se limitaba a una precisión de 5 – 10 nm en la posición de cada foco. Se calcularon mapas de precisión de localización para varios desplazamientos de los centros de los focos en forma de rosquilla, como se indica a continuación. Para cada posición del emisor, realizamos 1000 realizaciones de la simulación en las que los focos fueron desplazados de sus posiciones ideales por un desplazamiento radial r . Durante una ejecución de la simulación, los cuatro focos fueron desplazados por el mismo valor r en una dirección aleatoria, que se cambió

después de 100 ejecuciones. Con este procedimiento, en cada ejecución de la simulación recuperamos la distribución de las localizaciones correspondientes a 10 desajustes aleatorios de la misma magnitud, proporcionando un resultado promediado que no sobreestima un PE particularmente bueno o malo. Las simulaciones se realizaron para $N = 1000$ fotones detectados, $SBR = 20$, y $L = 100$ nm. En la Figura 4.7a, mostramos los resultados de los mapas de precisión simulados para un PE aleatorio con desajustes de $r = 0, 10$ y 20 nm respectivamente.

Para facilitar la evaluación de los resultados de la simulación, calculamos la precisión de localización de un emisor situado en el centro del PE perfectamente alineado ($\sigma(0,0)$) y la precisión media de localización de cada mapa 2D en un área circular delimitada por el PE, para $\bar{\sigma}$ para $FOV = L$. La figura 4.7b muestra la media de todas las simulaciones de $\sigma(0,0)$ y $\bar{\sigma}$ en función de r . Los resultados muestran que la precisión de la localización de un emisor en el centro del PE disminuye significativamente para los desplazamientos radiales $r > 20$ nm. La precisión media de localización, $\bar{\sigma}$ se deteriora en menos de 0.5 nm para desplazamientos radiales inferiores a 15 nm.

Apreciando los resultados experimentales y computacionales, concluimos que la precisión de localización alcanzable en p-MINFLUX es robusta frente a desalineaciones del PE por menos de 15 nm. Hay que destacar que el presente análisis se ha realizado utilizando los perfiles de intensidad de los focos en forma de rosquilla determinados experimentalmente, como se describe en la sección 4.4. Por tanto, estas simulaciones son una representación fiel de la situación experimental.

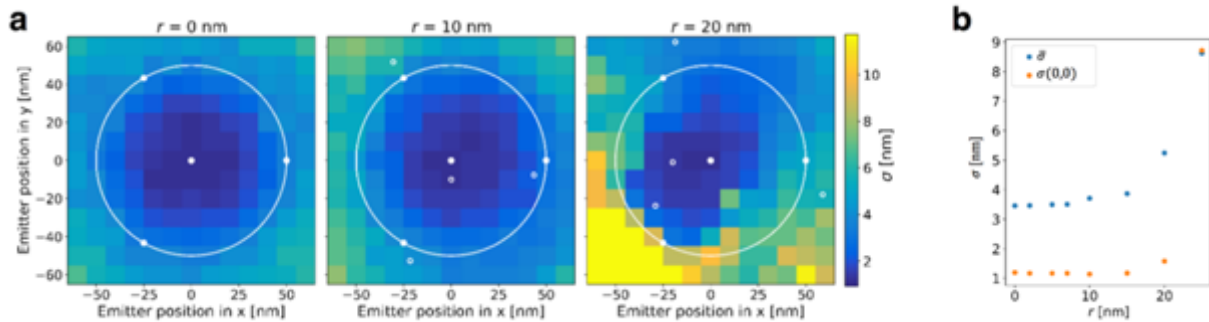


Figura 4.7 Análisis de los desajustes del patrón del haz de excitación p-MINFLUX (EP). (a) Ejemplo de mapas 2D de la precisión de localización alcanzable para diferentes posiciones del emisor y desplazamientos radiales $r = 0, 10$ y 20 nm de los cuatro focos. Los puntos sólidos indican la posición central del PE perfectamente alineado mientras que los círculos pequeños corresponden al PE desalineado. (b) La precisión de localización en el centro del FOV , $\sigma(0,0)$ y la media en un área circular de diámetro $FOV = L$, es decir $\bar{\sigma}$ para diferentes valores de desplazamiento radial. Todos los valores son la media de las 1000 simulaciones realizadas. Las simulaciones se realizaron para $N = 1000$ fotones detectados, $SBR = 20$ y 10 EP desalineados al azar para cada r .

4.8.3 Tiempos de llegada de los fotones e interferencia entre las ventanas de tiempo de detección

Como cualquier otra técnica de pulsos entrelazados, p-MINFLUX se basa en el hecho de que existe una mínima interferencia entre las ventanas de tiempo de llegada correspondientes a cada una de las excitaciones láser pulsadas. La probabilidad de que se produzcan interferencias de señal puede calcularse analíticamente teniendo en cuenta el tiempo de fluorescencia de la molécula y el tamaño de las ventanas de tiempo de detección.

Sin embargo, la influencia esperada de la interferencia de señal o *crosstalk* entre ventanas de detección de fotones en la precisión y exactitud de la localización p-MINFLUX no es sencilla. Por ello, hemos simulado experimentos p-MINFLUX con diferentes grados de crosstalk. En la Figura 4.8a, mostramos la precisión y exactitud de la localización simulada para valores típicos de $N = 1200$, $SBR = 15$, $L = 100$ nm y tiempos de vida de la fluorescencia que van desde 1.0 a 4.0 ns para ventanas de tiempo de detección de 12.5 ns. A partir de nuestras simulaciones, concluimos que los efectos sobre la precisión y la exactitud son < 1 nm para tiempos de vida de fluorescencia de hasta 3.0 ns que corresponde aproximadamente a $\frac{1}{4}$ de la ventana de tiempo de detección y $\sim 1\%$ de crosstalk. Las mediciones por encima de este límite siguen siendo aceptables hasta tiempos de vida de 4 ns (5% de crosstalk), aunque se produce un sesgo de ~ 2 nm y la precisión disminuye ~ 1 nm.

En particular, también simulamos la situación experimental de los experimentos de imágenes de superresolución presentados en la sección 4.9, que se realizaron con $\sim 5\%$ de crosstalk. La Figura 4.8b muestra los resultados de la simulación en estas condiciones. Se espera que p-MINFLUX proporcione una precisión de localización de $\lesssim 2$ nm e introduzca un sesgo global de 1 – 2 nm (Figura 4.8b).

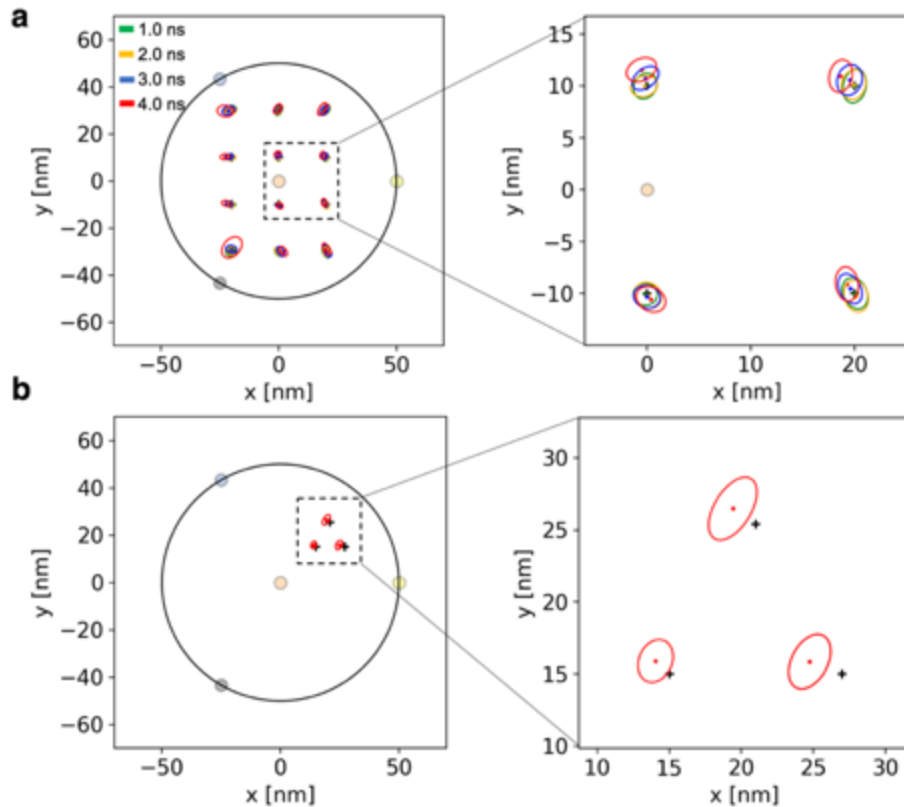


Figura 4.8 Efectos del crosstalk entre ventanas de tiempo de detección. (a) Precisión y exactitud de p-MINFLUX en diferentes posiciones dentro del campo de visión para diferentes tiempos de vida de fluorescencia. (b) Simulación de un experimento de súper resolución representativo: tres emisores fluorescentes de tiempo de vida ~ 4.0 ns dispuestos en un triángulo equilátero de 12 nm de lado. Las cruces negras indican la posición real de las moléculas simuladas.

Observamos que al utilizar la ecuación (3.3) para modelar la función de verosimilitud del experimento, despreciamos el crosstalk entre ventanas de tiempo. Sin embargo, los tiempos de llegada de los fotones podrían modelarse e incluirse en el análisis, ampliando

posiblemente el rendimiento de p-MINFLUX para un crosstalk mayor siempre que haya una buena SNR.

Por último, observamos que, dado que la probabilidad de crosstalk escala con la tasa de repetición del láser, una tasa de repetición más baja resolvería el crosstalk y ampliaría el rango de tiempos de vida de fluorescencia posibles. En particular, demostramos el p-MINFLUX con láseres de 40 MHz y 20 MHz de repetición. Una configuración con una tasa de repetición de 10 MHz implicaría cambios mínimos en cualquiera de las configuraciones y ampliaría el rango de tiempos de vida de fluorescencia adecuados hasta ~ 8 ns que cubren la mayor parte de los fluoróforos orgánicos utilizados habitualmente en microscopía y espectroscopía de fluorescencia.

4.9 Nanoscopía con información sobre el tiempo de vida de la fluorescencia

A continuación, aplicamos p-MINFLUX para obtener imágenes de una disposición triangular de moléculas individuales separadas por $d \approx 12$ nm en una nanoestructura de ADN-origami, como se muestra en la Figura 4.9a. En este caso, se utilizó el ATTO 532, ya que muestra una fotoconmutación estocástica adecuada al inducir estados iónicos radicales en un buffer reductor (véase la señal de intensidad de fluorescencia en la Figura 4.9b)^{149,152,153}. La Figura 4.9c muestra los fotones detectados ordenados según sus tiempos de llegada en relación con la señal de sincronización del láser, dando lugar a cuatro decaimientos correspondientes a las cuatro rosquillas de excitación. En la Figura 4.9d se muestra un zoom de la traza temporal de fluorescencia de la Figura 4.9b que muestra los eventos individuales de emisión de una molécula individual. Cada evento de una molécula individual presenta una combinación diferente de niveles de intensidad en los cuatro canales de detección, que codifica la posición del fluoróforo. Los números de fotones integrados en cada ventana de tiempo de detección proporcionan el conjunto de recuentos

de fotones para cada dona de excitación \bar{n} (como indican los colores en las Figuras 4.9c y d) que se utiliza para determinar la localización molecular.

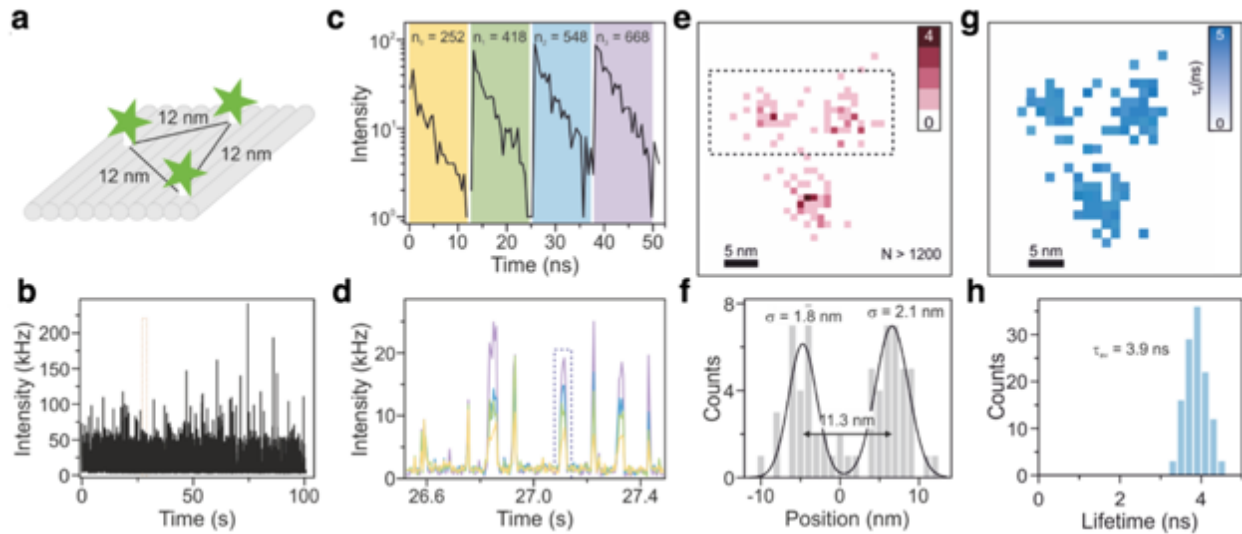


Figura 4.9 Imágenes de súper resolución con p-MINFLUX. (a) Esquema de la estructura de origami de ADN con tres fluoróforos ATTO 532 en un arreglo triangular. (b) Traza de 100 segundos de la intensidad total de fluorescencia de una sola estructura de origami de ADN. En esta medición, el SBR fue ~ 8 . (c) Decaimientos de fluorescencia y recuentos totales integrados en los cuatro canales de detección para el evento de emisión de una molécula individual marcado en (d). (d) Ampliación del trazado temporal mostrado en (b). La intensidad se divide en las cuatro ventanas de tiempo de detección correspondientes a los cuatro haces de excitación codificados por colores como en (c). (e) Imagen de localización 2D para una estructura de origami de ADN. Los eventos de emisión de una molécula individual con $N < 1200$ fueron descartados. (f) Perfil horizontal medio de las localizaciones del área marcada en (e). (g) Imagen de vida de fluorescencia p-MINFLUX. (h) Distribución de los tiempos de vida de fluorescencia para todas las localizaciones en E.

Se utilizaron umbrales de intensidad inferiores y superiores adecuados para discernir los eventos de emisión de una molécula individual del fondo y de los eventos de múltiples moléculas, respectivamente. El umbral inferior se eligió muy por encima del ruido de la señal de fondo para asegurarse de que ningún estado OFF se considerara como evento ON

(falso positivo), incluso a costa de descartar posibles estados ON de baja tasa de recuento (falsos negativos). También utilizamos un umbral superior para descartar eventos con una tasa de recuento de fotones muy alta, ya que es probable que procedan de un evento en el que dos moléculas en estado ON estén emitiendo al mismo tiempo. La traza que se muestra en la Figura 3 es representativa de las mediciones. Se ha elegido un tamaño de bin de tiempo de 0.5 ms y tiene un nivel de fondo de ~ 10.2 kHz con un ruido de ~ 2.4 kHz y una tasa media de recuento de fotones en moléculas en estado ON de ~ 80 kHz. Como parámetros de umbral se utilizaron un umbral inferior de 25 cuentas, un umbral superior de 80 cuentas y una longitud mínima de tiempo de encendido de 3 ms como parámetros de umbral.

La figura 4.9e muestra el mapa de localización obtenido a partir de la 100 s de medición de la Figura 4.9b. Se consideraron los eventos de moléculas individuales con $N > 1200$ fotones detectados. Se eligió el valor de umbral de 1200 porque ofrecía un buen compromiso de precisión de localización (~ 2 nm) y la frecuencia de eventos para este fluoróforo y las condiciones experimentales. La imagen reconstruida revela tres poblaciones distintas en un patrón triangular que concuerda bien con la estructura de origami de ADN diseñada. El corte a lo largo del eje x de la Figura 4.9e se muestra en la Figura 4.9f, ilustrando la resolución alcanzada. Se distinguen claramente dos manchas, separadas por 11.3 nm son claramente distinguibles (desviaciones estándar de $\sigma = 1.8$ nm y $\sigma = 2.1$ nm). Además, p-MINFLUX da acceso al tiempo de vida de la fluorescencia de cada molécula individual detectada, lo que permite reconstruir imágenes de tiempo de vida de fluorescencia súper resueltas, como se muestra en la Figura 4.9g. Para todas las localizaciones, los tiempos de vida de fluorescencia detectados muestran una estrecha distribución en torno a un valor medio $\tau_{fl} = 3.9 \pm 0.3$ ns (Figura 4.9h). Como también se ha demostrado mediante simulaciones en la sección 4.8.3, Figura 4.8, la nanoscopía p-MINFLUX es eficaz para estas condiciones experimentales, resolviendo claramente los distintos fluoróforos.

4.10 Seguimiento a escala nanométrica

A continuación, demostramos el rendimiento de p-MINFLUX para el seguimiento multiplexado de moléculas individuales utilizando información sobre el tiempo de vida de la fluorescencia. Para ello, utilizamos una estructura dinámica de origami de ADN en la que sobresalen tres ADNs monocatenarios de la plataforma de origami de ADN con una distancia de separación de 6 nm entre cada hebra, como se indica en los esquemas de la Figura 4.10a. La hebra central que sobresale (también llamada hebra puntero) puede hibridarse transitoriamente con las otras hebras que sobresalen. El extremo de la hebra puntero está marcado con un único fluoróforo para que su posición pueda ser rastreada mediante p-MINFLUX. Se diseñaron y fabricaron dos estructuras de origami de ADN de este tipo. Una estaba marcada con un colorante ATTO 542 y tenía ocho nucleótidos complementarios para la unión transitoria (rojo, Figura 4.10a). El otro estaba marcado con un colorante Cy3B y tenía sólo siete nucleótidos complementarios para la unión transitoria (azul, Figura 4.10a). Como en cualquier experimento de seguimiento, las resoluciones temporal y espacial están vinculadas y limitadas por la tasa de conteo de fotones detectada. Al tratarse de una técnica de conteo de fotones individuales, p-MINFLUX ofrece total flexibilidad para agrupar los fotones en el tiempo con el fin de optimizar la resolución temporal o espacial, o un compromiso adecuado de ambas. En estos experimentos, nuestro objetivo era detectar múltiples uniones transitorias de la hebra del puntero, lo que impone un requisito de tiempo de seguimiento mínimo, diferente para cada una de las dos estructuras dinámicas y limitado por la fotoestabilidad del fluoróforo. Garantizamos una precisión de localización de $\sigma = 2 - 3$ nm para discernir claramente las dos posiciones de unión transitoria ($x_0 = + 6$ nm, $x_1 = - 6$ nm). Esto se consiguió con una tasa de detección de 20 – 60 kHz y bins de tiempo de 30 – 150 ms para Atto 542, mientras que para Cy3B utilizamos una tasa de detección de 20 – 110 kHz y bins de tiempo de 10 – 90 ms.

La figura 4.10b muestra ejemplos de trazas de seguimiento p-MINFLUX para ambas estructuras dinámicas de ADN-origami. En ambos casos, las localizaciones de los

fluoróforos alternan entre dos posiciones separadas por aproximadamente 12 nm como se espera del diseño del origami de ADN. La figura 4.10c muestra los correspondientes histogramas de localización bidimensional. Para el puntero marcado con ATTO 542, las dos posiciones de unión están separadas por 11.8 nm ($\sigma = 2.2$ nm), mientras que para el puntero con Cy3B por 11.0 nm ($\sigma = 2.5$ nm).

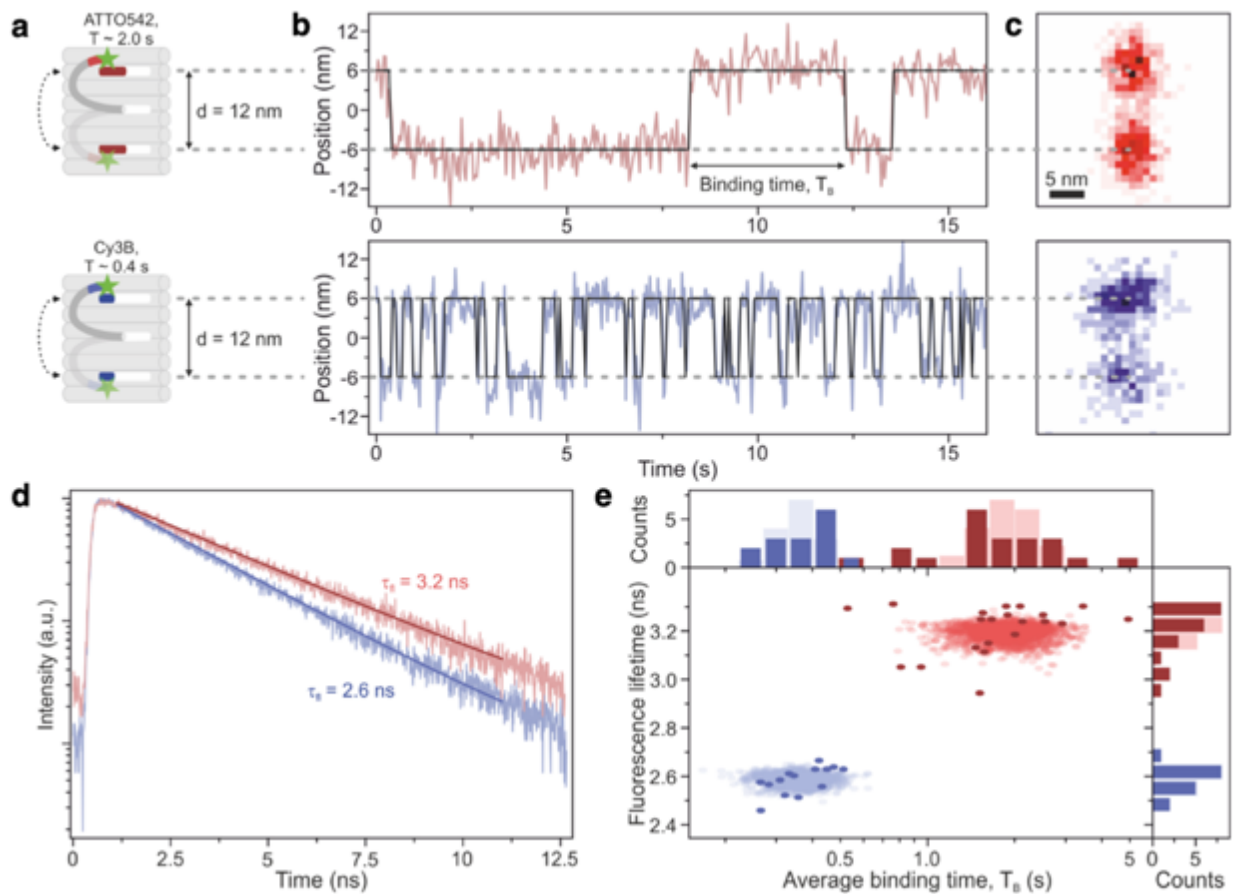


Figura 4.10 Seguimiento a escala molecular de un puntero de ADN sobre una estructura de origami de ADN. (a) Esquema, (b) rastro de localización (tiempo de Binning: **100 ms** para la parte superior y **60 ms** para la traza inferior; **SBR** \sim **8** para la traza superior y **SBR** \sim **10** para el trazo inferior), y (c) histogramas de localización 2D de un puntero de origami de ADN etiquetado con un único colorante ATTO 542 (fila superior) y Cy3B (fila inferior). (d) Ejemplos de decaimientos de fluorescencia de una molécula individual para estructuras marcadas con ATTO 542 (rojo) y Cy3B (azul). (e) Diagrama de dispersión del tiempo medio de unión T_B y el tiempo de vida de la fluorescencia τ_{fl} obtenidos a partir de las mediciones en las estructuras de origami

de ADN (rojo oscuro, azul oscuro) y de las simulaciones (rojo claro, azul claro). Los histogramas correspondientes para T_B y τ_{fl} se muestran arriba y a la derecha, respectivamente.

Por otro lado, los tiempos de unión transitoria de las dos estructuras difieren significativamente debido al diferente número de nucleótidos complementarios en el diseño. El puntero con ocho nucleótidos complementarios (Figura 4.10b superior) presenta tiempos de unión más largos que el puntero con siete nucleótidos complementarios (Figura 4.10b inferior). Además, los dos fluoróforos utilizados para marcar los punteros tienen tiempos de vida de fluorescencia distintos (Figura 4.10d).

La figura 4.10e muestra un gráfico de dispersión de los tiempos medios de unión frente a los tiempos de vida de fluorescencia de punteros de ADN individuales marcados con ATTO 542 y Cy3B. Las dos estructuras son identificables en este gráfico tanto por sus distintos tiempos medios de unión (T_B) de 1.92 s y 0.37 s y los tiempos de vida de fluorescencia medios (τ_{fl}) de 3.2 ns y 2.6 ns respectivamente. En la Figura 4.10e, también mostramos simulaciones de los experimentos en el fondo del gráfico de dispersión.

Para estimar la distribución esperada de los tiempos de unión medidos a partir de trazas de localización finitas y limitadas por fotones, simulamos el experimento de seguimiento p-MINFLUX asumiendo que el cambio entre las posiciones de los punteros de ADN es estocástico y sin memoria, y por tanto los tiempos de unión transitorios se distribuyen exponencialmente. Así, generamos trazas de localización p-MINFLUX simuladas con tiempos de unión transitorios en las dos posiciones de la estructura ADN-origami. Simulamos las localizaciones con una precisión de $\sigma = 3$ nm y la distancia entre las dos posiciones se fijó en $d = 12$ nm. Generamos trazas con parámetros (tiempo de vida fluorescente, tiempo de unión aproximado, número de transiciones entre posiciones) tomados de nuestros datos experimentales para ambos diseños de ADN-origami. A continuación se analizaron las trazas y se extrajeron los tiempos medios de unión y los tiempos de vida fluorescentes utilizando los mismos algoritmos que empleamos para analizar los datos experimentales. Las simulaciones demuestran que la variación observada experimentalmente en los tiempos de unión está dominada por el número limitado de

transiciones detectadas para cada estructura antes de que el colorante fluorescente se fotoblanquee.

4.11 Discusión y perspectivas

Hemos presentado p-MINFLUX, una nueva implementación de MINFLUX basada en la excitación intercalada por pulsos y el recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo. p-MINFLUX funciona bajo el mismo principio básico que el MINFLUX original y, por lo tanto, proporciona localizaciones de moléculas individuales igualmente eficientes en cuanto a fotones, con sus consecuencias positivas para la nanoscopía y el seguimiento. Hemos demostrado precisiones de localización de $\sigma \approx 1 - 2$ nm con alrededor de $N \approx 1000$ fotones por localización, una mejora de ~ 10 veces en comparación con una localización típica basada en una cámara. Demostramos el rendimiento de p-MINFLUX en las aplicaciones típicas de nanoscopía a escala molecular utilizando moléculas fotoconmutables, así como el seguimiento a nanoescala en estructuras de origami de ADN. Además, p-MINFLUX es único al proporcionar acceso a la información sobre el tiempo de vida del estado excitado de fluorescencia, lo que permite la identificación de moléculas individuales (multiplexación) y la nanoscopía FLIM con una resolución a escala molecular; una mejoría de $10 - 100$ veces en comparación con trabajos anteriores^{130,154}. La información sobre el tiempo de vida de la fluorescencia puede ampliar el campo de aplicación de p-MINFLUX, ya que permite la detección específica de la fluorescencia en medios con fuerte dispersión.

En la primera implementación de MINFLUX, las excitaciones secuenciales utilizadas para interrogar la posición de los fluoróforos individuales se realizaron desplazando un foco láser con un escáner. Para maximizar la velocidad de escaneo, se utilizaron deflectores electroópticos controlados por una FPGA. El ciclo MINFLUX se realiza en un barrido a ~ 100 μ s. En cambio, en el p-MINFLUX, el ciclo de excitación no está limitado por ningún escáner óptico, sino por la velocidad de repetición del láser pulsado, que corresponde a

~ 50 ns. Por lo tanto, la resolución temporal sólo está limitada por la tasa de emisión detectada y el tiempo de vida fluorescente del emisor, lo que supone un potencial para los experimentos que exploran la dinámica a escala de μs . Como ventaja adicional, el montaje puede considerarse como una modificación bastante sencilla de un microscopio confocal de barrido con excitación pulsada y detección TCSPC. Debido a estas ventajas, prevemos que p-MINFLUX se adoptará y reproducirá más fácilmente en otros laboratorios. Para facilitar aún más esto, toda la instrumentación y el código Python de análisis de datos están disponibles de forma abierta. Observamos que una disposición adaptativa en tiempo real del patrón de excitación, como demostraron Gwosch y colaboradores⁶², también puede implementarse en p-MINFLUX. Esto puede lograrse, por ejemplo, incorporando soportes de espejo motorizados. Además, la eficiencia de los fotones puede maximizarse mediante el uso de enfoques iterativos MINFLUX⁶².

En resumen, p-MINFLUX constituye una nueva herramienta analítica que combina la resolución espacial a escala molecular con las mediciones del tiempo de vida, lo que puede ser de utilidad no sólo para la localización ultraprecisa de una molécula individual y la nanoscopía, sino también para nuevas mediciones de transferencia de energía de moléculas individuales, como la transferencia de energía inducida por FRET, metales o grafeno.

Este trabajo se desarrolló en el marco de una colaboración con el grupo del Prof. Philip Tinnefeld, Departamento de Química Física, Ludwig Maximilians Universität (LMU), Munich, Alemania. Mi principal contribución al proyecto fue el desarrollo del concepto del método, el diseño de los sistemas ópticos, la construcción del montaje en Buenos Aires junto con la instrumentación y el software de control, las mediciones para evaluar la precisión y exactitud del sistema, el desarrollo de los códigos de análisis de datos y las simulaciones numéricas de los experimentos. Además, durante una estadía de investigación de cuatro meses (agosto - noviembre de 2019) en el grupo del Prof. Tinnefeld contribuí significativamente a construir el setup p-MINFLUX, el hardware y el software de control, en ese laboratorio. También contribuí significativamente al diseño de todos los experimentos, al análisis de los datos y a escribir el manuscrito⁶⁸.

Apéndice 4.1 Secuencias de ADN-origami

Incluimos aquí, las secuencias completas de ADN utilizadas para las muestras de ADN-origami utilizadas en los experimentos de nanoscopía (Sección 4.9) y de seguimiento de moléculas individuales (Sección 4.10)

Tabla 4.1: Grapas no modificadas desde el extremo 5' al 3' para la estructura de ADN-origami utilizada para los experimentos de nanoscopía combinada con imágenes de vida (Sección 4.9).

Secuencia (5' a 3')	Longitud [nt]
TAAGAGCAAATGTTTAGACTGGATAGGAAGCC	32
AATAGTAAACACTATCATAACCCTCATTGTGA	32
TCAAATATAACCTCCGGCTTAGGTAACAATTT	32
GTACCGCAATTCTAAGAACGCGAGTATTT	32
ATTATCATTCAATATAATCCTGACAATTAC	30
AAATTAAGTTGACCATTAGATACTTTTGCG	30
ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCATTAGACGG	40
AAAGTCACAAAATAAACAGCCAGCGTTTTA	30
AAAGGCCGGAGACAGCTAGCTGATAAATTATTTGT	38
ACAAACGAAAAGCCCCAAAAACACTGGAGCA	32
TCTTCGCTGCACCGCTTCTGGTGCGGCCTTCC	32
GACAAAAGGTAAAGTAATCGCCATATTTAACAAAACCTTTT	40
GATTTAGTCAATAAAGCCTCAGAGAACCCTCA	32
TATATTTTGTTCATTGCCTGAGTGGAAGATTGTATAAGC	40
GCTTTCCGATTACGCCAGCTGGCGGCTGTTTC	32
CACCAGAAAGGTTGAGGCAGGTCATGAAAG	30
CGCGCAGATTACCTTTTTTAATGGGAGAGACT	32
ACAACATGCCAACGCTCAACTCTGA	30
GTTTATCAATGCGTTATACAAACCGACCGTGGATAAA	40
AACGCAAAGATAGCCGAACAAACCCTGAAC	30
CTTTTACAAAATCGTCGCTATTAGCGATAG	30
CAACTGTTGCGCCATTGCGCATTCAAACATCA	32
CAGCGAAACTTGCTTTTCGAGGTGTTGCTAA	30
AAGGCCGCTGATACCGATAGTTGCGACGTTAG	32
AGGCTCCAGGCTTTGAGGACGGGTAA	30
TTAGGATTGGCTGAGACTCCTCAATAACCGAT	32
GATGGCTTATCAAAAAGATTAAGCGTCC	30
TAAATCGGGATTCCCAATTGCGATATAATG	32
AGGCAAAGGGAAGGGCGATCGGCAATTCCA	30
TTTCGGAAGTGCCGTCGAGGGTGAGTTTCG	32

TCACCAGTACAAACTACAACGCCTAGTACCAG	32
AACAAGGGATAAAAAATTTTGTAGCATAAAGC	32
AAATCACCTTCCAGTAAGCGTCAGTAATAA	30
CAGCAAAAGGAAACGTCACCAATGAGCCGC	30
TGTAGCCATTAATAATTCGCATTAATGCCGGA	32
TATTAAGAAGCGGGGTTGCTCGTAGCAT	30
TACGTTAAAGTAATCTTGACAAGAACCCTGAACT	32
GCAAGGCCTCACCAGTAGCACCATGGGCTTGA	32
TGCATCTTTCCAGTCACGACGGCCTGCAG	30
AATTGAGAATTCTGTCCAGACGACTAAACCAA	32
GCCATCAAGCTCATTFTTTAACCACAAATCCA	32
TAAATGAATTTTCTGTATGGGATTAATTTCTT	32
ATGCAGATACATAACGGGAATCGTCATAAATAAAGCAAAG	40
AATACGTTTGAAAGAGGACGACTGACCTT	30
TTATACCACCAAATCAACGTAACGAACGAG	30
CATGTAATAGAATATAAAGTACCAAGCCGT	30
TATAACTAACAAGAACGCGAGAACGCCAA	30
ATCGCAAGTATGTAAATGCTGATGATAGGAAC	32
CATAAATCTTTGAATACCAAGTGTTAGAAC	30
GCGAAAAATCCCTTATAAATCAAGCCGGCG	30
TAAATCATATAACCTGTTTAGCTAACCTTTAA	32
CTTAGGGCCTGCAACAGTGCCAATACGG	30
CGAAAGACTTTGATAAGGTCATTTCGCA	32
AGCAAGCGTAGGGTTGAGTGTGAGCC	32
TCAAGTTTCATTAAAGGTGAATATAAAGA	30
TCATTGAGATGCGATTTTAAGAACGCATAG	32
CTACCATAGTTTGAGTAACATTTAAAATAT	30
ATCCCAATGAGAATTAACCTGAACAGTTACCAG	32
ACCTTGCTTGGTCAGTTGGCAAAGCGGA	30
CTGTGTGATTGCGTTGCGCTCACTAGAGTTGC	32
GCCGTCAAAAAACAGGTGAGCCTATTAGT	32
GTATAGCAAACAGTTAATGCCCAATCCTCA	30
AGACGACAAAGAAGTTGCCATAATTCGAGCTTCAA	37
ACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGGCTGAG	32
ATATTTTGGCTTTCATCAACATTATCCAGCCA	32
ATATTGGAACCATCGCCCACGCAGAGAAGGA	32
TTCCAGTCGTAATCATGGTCATAAAAGGGG	30
CGGATTGCAGCTTAATTGCTGAAACGAGTA	32
AAAGCACTAAATCGGAACCCTAATCCAGTT	30
GACCTGCTTTGACCCAGCGAGGGAGTTA	32
GTTTATTTTGTACAAATCTTACCGAAGCCCTTTAATCA	40
TAATCAGCGGATTGACCGTAATCGTAACCG	30
GCGAGTAAAAATATTTAAATTGTTAAAG	30
CTTAGATTTAAGGCGTTAAATAAAGCCTGT	30
CCAGGGTTGCCAGTTTGGGGGACCCGTGGGA	32
TAGGTAAACTTTTGGAGATCAAACGTTA	32
CGATAGCATTGAGCCATTTGGGAACGTAGAAA	32
GCGCAGACAAGGCAAAAGAATCCCTCAG	30
CCTGATTGCAATATATGTGAGTGATCAATAGT	32
GCCCCAGTCCACGCTGGTTTGCAGCTAACT	32
TCATCGCCAACAAAGTACAACGGACGCCAGCA	32

CTGTAGCTTGGACTATAGTCAGTTCATTGA	32
GAATTTATTTAATGGTTTGAATATTCTTACC	32
CCTAAATCAAAATCATAGGTCTAAACAGTA	30
AGCGGATGATAAATTGTGTCGACGAGA	30
GATGTGCTTCAGGAAGATCGCACAAATGTGA	30
GCCTCCCTCAGAATGGAAAGCGCAGTAACAGT	32
TTTATCAGGACAGCATCGGAACGACCAACCTAAAACGA	40
CACAACAGGTGCCTAATGAGTGCCCAGCAG	30
CTGAGCAAAAATTAATTACTTGGGTTA	30
TGACAACCTCGCTGAGGCTTGCATTATACCA	30
GCGAACCTCCAAGAACGGGTATGACAATAA	30
TGAAAGGAGCAAATGAAAAATCTAGAGATAGA	32
GCACAGACAATTTTGAATGGTCAGTA	31
TCACCGACCACGTAATCAGTAGCAGAACCG	32
GCCCTTCAGTCCACTATTAAGGGTGCCGT	32
CCACCCTCTATTCACAAACAAATACCTGCCTA	32
ATTTTAAAATCAAAATTTGCACGGATTCTG	32
GTAATAAGTTAGGCAGGCATTTATGATATT	32
TTAACCAGCACTAACAATAATCGTTATTA	32
TTTTATTTAAGCAAATCAGATTTTTGT	30
AACACCAAATTTCAACTTTAATCGTTTACC	30
GATGGTTTGAACGAGTAGTAAATTTACCATTA	32
CTCGTATTAGAAATTGCGTAGATACAGTAC	30
ATCCCCCTATACCACATTCAACTAGAAAAATC	32
CTTATCATTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTT	32
GCGGAACATCTGAATAATGGAAGGTACAAAAT	32
GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGTAGCA	32
ACGGCTACAAAAGGAGCCTTTAATGTGAGAAT	32
TGGAACAACCGCCTGGCCCTGAGGCCCGCT	30
GCGGATAACCTATTCTGAAACAGACGATT	32
CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAAGAATA	32
TTAAAGCCAGCCGCCACCCTCGACAGAA	30
CAGAAGATTAGATAATACATTTGTGCGACAA	30
AGAAAACAAGAAGATGATGAAACGCTGG	32
CGTAAAACAGAAATAAAAAATCCTTTGCCCGAAAGATTAGA	40
ACCGATTGTCGGCATTTTCGGTCATAATCA	30
AATAGCTATCAATAGAAAATTCAACATTCA	30
AAACAGCTTTTTGCGGGATCGTCAACACTAAA	32
ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT	32
TTGACAGGCCACCACCAGAGCCGCGATTTGTA	32
TACCGAGCTCGAATTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGATT	40
GCCAGTTAGAGGGTAATTGAGCGCTTTAAGAA	32
AGCCAGCAATTGAGGAAGTTATCATCATTTT	32
CATTTGAAGGCGAATTCATTTGTTTGG	32
ACACTCATCCATGTTACTTAGCCGAAAGCTGC	32
ACTTTTTTATTTTAGTTAATTTTCATAGGGCTT	32
GCTATCAGAAATGCAATGCCTGAATTAGCA	30
AAGTAAGCAGACCACGGAATAATGACG	32
CAGGAGGGGTCAGTGCCCTGAGCTGAATTTACCG	40
TTAATGAACTAGAGGATCCGGGGTAACG	32
AAGGAAACATAAAGGTGGCAACATTATCACCG	32

CATCAAGTAAAACGAACTAACGAGTTGAGA	30
AATGGTCAACAGGCAAGGCAAAGTAATGG	32
CAACCGTTTCAAATCACCATCAATTCGAGCCA	32
GGCCTTGAAGAGCCACCACCTCAGAAACCAT	32
TAAATCAAAATAATTCGCGTCTCGGAAACC	30
GAGGGTAGGATTCAAAGGGTGAGACATCCAA	32
TTATTACGAAGAACTGGCATGATTGCGAGAGG	32
ATACCCAACAGTATGTTAGCAAATTAGAGC	30
TTAACGTCTAACATAAAAAACAGGTAACGGA	30
AGTATAAAGTTCAGCTAATGCAGATCTTTC	32
CACATTAATAATGTTATCCGCTCATGGGGCC	32
CTTTAATGCGCGAACTGATAGCCACCAG	30
GAAATTGCCTTTAGCGTCAGACCGGAACC	32
AACGCAAAATCGATGAACGGTACCGGTTGA	30
ACAACCTTCAACAGTTTCAGCGGATGTATCGG	32
GCCTTAAACCAATCAATAATCGGCACGCCT	32
TCCACAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACGA	32
GCCCGTATCCGGAATAGGTTATCAGCCCAAT	32
TCAATCGAACCTCAAATATCAATTCCGAAA	32
GTCGACTTCGGCCAACGCGCGGTTTTTC	30
GCAATTCACATCCTGATTATCAAAGTGTA	32
CTCCAACGCAGTGAGGGGCAACCAGCTGCA	32
TGTAGAAATCAAGATTAGTTGCTTACCA	30
TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGC	32
CAAATCAAGTTTTGGGGTCGAAACGGGA	31
CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAA	32
TTAGTATCACAATAGATAAGTCCACGAGCA	30
AGGAACCCATGTACCGTAACACTTGATATAA	31
GAGAGATAGCGTCTTTCCAGGTTTTGAA	32
TCGGCAAATCCTGTTTGATGGTGACCCTCAA	32
AAGCCTGGTACGAGCCGGAAGCATAGGATG	32
AGAAAGGAACAACCTAAAGGAATTCAAAAAA	31
ACGCTAACCCACAAGAATTGAAAATAGC	30
CCACCCTCATTTTCAGGGATAGCAACCGTACT	32
TTTAGGACAAATGCTTTAAACAATCAGGTC	30
AGAGAGAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC	32
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAACCAGTAA	31
CCAACAGGAGCGAACCAGCGGAGCCTTTAC	32
AACAGTTTTGTACCAAAAAACATTTTATTTT	30
TTTACCCCAACATGTTTTAAATTTCCATAT	30
TAAAAGGGACATTGGCCAACAAAGCATC	30
TTTTCACTCAAAGGGCGAAAAACCATCACC	30
TCTAAAGTTTTGTTCGTCTTTCCAGCCGACAA	31
GTTTTAACTTAGTACCGCCACCCAGAGCCA	30

Tabla 4.2. Grapas modificadas y ampliadas desde el extremo 5' al 3' para la estructura de ADN-origami utilizada para los experimentos de nanoscopía combinada con imágenes de vida (Sección 4.9).

Secuencia (5' a 3')	Longitud [nt]	Función
Biotina- GAGAAGATAACCTTGCTTGTTTCGGAGAAACAATAA	40	Biotina para la inmovilización
Biotina- ATAAGGGAACCGGATATTCATTACGTCAGACGTTGGAA	40	Biotina para la inmovilización
Biotina- AGCCACCACTGTAGCGTTTTCAAGGAGGGAAGGTAAA	40	Biotina para la inmovilización
Biotina- CGGATTCTGACGACAGTATCGGCCGCAAGGCGATTAAGTT	40	Biotina para la inmovilización
Biotina- GAAACGATAGAAGGCTTATCCGGTCTCATCGAGAACAAGC	40	Biotina para la inmovilización
Biotina- TAGAGTTATTTTCATTTGGGATAGTAGCATTAA	40	Biotina para la inmovilización
TTCCTCTACCACCTACATCACAA ATTACCTTTGAATAAGGCTTGCCCAAATCCGC	56	Sitio de etiquetado externo del Atto 532 para imágenes de súper resolución
TTCCTCTACCACCTACATCACAA TTGCTCCTTTCAAATCGCGTTTGAGGGGGT	56	Sitio de etiquetado externo del Atto 532 para imágenes de súper resolución
TTCCTCTACCACCTACATCACAA AATACTGCCCAAAGGAATTACGTGGCTCA	54	Sitio de etiquetado externo del Atto 532 para imágenes de súper resolución
TTCCTCTACCACCTACATCACAA CTTTTGCAGATAAAAACCAAAAAGACTCC	56	Sitio de etiquetado externo del Atto 532 para imágenes de súper resolución
Atto532-TTTGTGATGTAGGTGTAGAGGAA	25	Atto 532 cadena de etiquetado externo para imágenes de súper resolución
GATGGCTTATCAAAA-Atto532-GATTAAGCGTCC	30	Atto 532 interno para evaluar el rendimiento de la localización

Tabla 4.3: Grapas no modificadas desde el extremo 5' al 3' para la estructura de ADN-origami utilizada para los experimentos de seguimiento de una molécula individual (Sección 4.10).

Secuencia (5' a 3')	Longitud [nt]
CAATTCATATAGATAAAATCCTTTGCCCCG	31
ATGAGTGACCTGCAGTTTCTGCCAGCACG	31
GGAACCCAAAACACTACAAACAGTTTCAGCG	29
GTTCCCGTAGATGGCAGGAAGATCGCACT	31
TTTTTTAATGCACGTACAAGTTACCCATTTCAG	32
CCCGCCGCGCTTAATGAAAGCCGGCGAACGG	32
AAATCCCGTAAAAAACGTTTTGGACTTGT	32
AGGAAACCGAGGACGTAGAAAAAGTACCG	29
TATCATTTTGCAGAACATCCTGATATAAAGAA	32
CTTAATTGAGACCGGAAACAGGTCAGATTAGAGGGGCA	40
TTTTTTTTTTAAAACACTAG	20
GCCGATTAAGGAAGGGCGCGTAACCACCACA	31
ATGGCTACAATCAACTGAGAGCCAGCAGCAAATGAAAAACGAACCTAATGC GCTTGGCAGA	61
GTCCACTAAACGCGGGACGGGCAACAGCTG	31
TGCGGCCAGAATGCGGTTTT	20
TTTTATTGGGCTTGAGATGGCCAGAACGATT	31
ATTGCCCTTACCCGCCAGCTGCTTGCGTTG	32
TGATGTTACTTAGCCGGAAAAGACACTACGAA	35
TTTTCTTTACAAACAATTTCG	20
TATTTTGTAAATTCGGGTATATATCAAAC	32
TAATAGTATTCTCCGTGCATTAATTTTTGT	32
TGTTGCCCTGCGGCTGATCAGATGCAGTTCA	32
TTTTTTGCATCAAAGCCTGAGTAATTTT	29
TTTTGAGGGGACGAC	20
TGATTGCTTTGAATACAAACAGAATGTTTGGA	32
ACATAGCGATAGCTTATTTT	20
TTTTCCCTTACACTGGTTGC	20
CGGCCTCGTTAGAATCTTTT	20
TTACCCATAACCCTCGAAATACAATGTTTAAACAGGG	37
TTTTTTAGGAATACCACAGTAGTAATTTT	29
TGTAATCTTGACAACCGAAC	23
CTTCTGACCTAAATTTGCAGGCCAGAACGCAATTTACG	40
AGATGAAGGGTAAAGTTTTT	20
CACAGACATTTTCAGGGATCTCCAAAAAAGGTTCTTAAAGCCGCTTT	48
TCTTTAGGCTGAATAATGCTCATTAGTAACAT	32
CAAAGGGCCTGTCGTGTGGCCCTGAGAGAGTT	32
GCAGGCGAATTTTTCATTTGCTATTAA	32
TTTCGACTTGATCGAGGGTTGATATAAGTATTTT	36
TTTTTCATATAAAAGAAAGCCGAACATTTT	29
TTTTAAACATCAAGAAAAA	20
CAAAAGAATAAAATACCCAGCGATTATACCAAGCGCGAA	39
GAGCCGATATAACAACAACCATCGCCCTTTTT	34
TTTTTTCCTGATTATCACGT	20
CCGAATCTAAAGCATCTTTT	20
TTTTGCTAATCAGAGATAACCCCGACCGG	36
TGTACTGGTAATAAGTTCAGTGCC	24

TTTTCGCAAATGGTCAATAAACCATATGC	32
ATCAAAAAGTCATAAAACGGAACAACATTATCAACTTTAGTAGAT	45
GGCTTAGGTTGGGTAAAGCTAATGATTTTTCGA	32
AACGTTATTAATTTTACAACATAATCAGTTGGC	32
TGCGAATAATCGACAATGTTCCGGTTCG	29
CTGCAACTGCCACGTATCTGGTAGATTAGA	32
CCAGCCAGCTTTCCGGGTAATGGTAACAAC	32
CCGTGCATCTGCCAGTTTTT	20
TTTTCCCGACTTACAAAATAAACAGTTTT	29
GAAAGGAGCGGGCGCTAGGTTTT	23
CATTGCCTGAGTCTTTATGACCATAAATCATTTCATTT	40
TTTTGGCGCATAGGCTGGCTAACGGTGTTAAATTGT	36
CTCCAATCGTCTGAAATTTT	20
CCCCCTGCGCGCTTTAGCTGTTTCCTGT	32
GGAGCCTTCACCCTCAGCCACC	24
TTTTTTGTTCCAGTTTGGAACAAGA	25
TTAATTA AACCATACATACATAAAGGTGGCAATTTT	36
TTTTTATCATCGCCTGAACAGACCATTTT	29
TCTTACCATAAAGCCATAAATTTAGAATGGTTTAGGGTAGC	40
TTTTATTGCTGAATATAATACATTTTTTTT	29
AAATCAACGTGGCATCAGTCTCAATCC	32
AGAACGTTAACGGCGTAATGGGTAAAGGTTTCTGCGTCGGTGGTGTGTTGTT	61
GCCTAATTATCATATGATAAGATTTAGTTAATTTTCAT	39
TTTTCCATATTTATCCCAATCCAAAGTCAGAGA	36
ACCCTCATGCCCTCATTTTTCTGTATGGGATTTAGTTAAAGCAGCTTGA	48
GTCGAAATCCGCGACCTGCTCCACCAACTTTTAGCATTC	39
CCGGAACCGCAAGAAAGCAATAGCTATCTCACAATCCGATTGAG	48
AACGTCAATAGACGGGGAATACCCAAAAGAACAAGACTCCGTTTTTTAT	48
GCAGTTGGGCGGTTGTCCAGTTATGGAAGGAG	32
CCGTCCGAGTAGCATTCAAAAACAGGAAGATT	32
TTTTTTATCACCGTCACAGCGTTT	29
CCAACATGACGCTCAATGCCGGAGGAAATACC	32
TACAGGCATTA AATTAACCAATAGGAACGCCATCAAAGTCAATCAGAATTAG CCTAAATCG	61
AGTTGATTAGCTGAAAAGAGTACCTTTAATTGTTAATTCGGACCATAA	48
AGCGAACCGAAGCCTGGAGAATCACAAAGGCTATCAGGT	40
TTTTGAACAACATAAAGGAACACTGATTTT	29
CGGGAACGAAAAACCTGATGGTGGTTCCGAA	32
CGTTGAAAATAGCAAGCCCAATA	23
GACAGATGGACCTTCATCAAGCCCTGAC	30
GCGAGAAAAGGGATGACGAGCACGTATAACGTCTTTTCACGCTGAAGAAAG C	53
TCGATAGCAGCACCGTAAAATCACGTTGCT	32
TTTTCCCTCAGAGCCACCACCTCAGAAAGCGCTTA	36
ATCGGCAAAATCCCTTACGTGGACTCCAACGT	32
TTCAAATTTTTAGAAAAAACAGGAGCAAACAAGAGAATCGATGAAGGGTGA GATATTTTA	60
TTTTTAGCCCGAATAGCCTTCTTTT	29
TACCGATAGTTGCCTTTTTTCA	22
TTTTCAGGGTGGTTTCTT	20
AAAGACAAATTAGCAAGTCACCAATGAAACCA	32

CCAGAATGGAGCCGCCAATCAAGTTTGCC	29
TTTTTGGATTTACAGAA	20
ATTATAGCGTCGTAATAGTAAAATGTTTTT	31
TAGTCAGAAGCAAAGCGGATTTT	23
AGGCGAAAATCCTGTTGTCTATCACCCGAT	32
GGGGCGCCAATTCACTAAAGTACGGTGTACGAGAATAGCTTCAA	48
GCCGTCACAATATAAAAAGAAACCACCAGAAGCGGACTCGTATTACATTTGTC AAATAT	61
GAAATTGTTATCCGCTCACATTAATAATGA	32
TTTTTCCAAGAACGGGTGCGAACCTTT	29
TGCTCATCTTATGCGTTAATAAAAACGAACTATCATTGGCTTG	48
TTTTTAGACTGGCATCAGTTGAGATTTTTT	30
AAACGGGGTTGCTACATAACGCCAAAAAAGGCT	35
ACAAAGTATGAGGAAGCTTTGAGGACTAAAGATTTT	36
TCATCAACAAGGCAAATATGTACCCCGGTTG	31
ACAAGAAATAGGAATCCCAATAGCAAGCAAATAGCAGCATCCTGAA	48
AGGAGGGGGCGGATAAGTATTAAGGCTAAATCCTCTACAGGAG	45
TTCCGGAATCATAATTTTTT	20
TTTTGAATGCCAACGGCAGC	20
TCGAAGATGATGAAACTTTT	20
TGCCATTCAACAATAGAAAATTCATATGGT	30
TTTTACTGTAGCCTCAGAACC GCCATTTT	29
CTGCGCGGCTAACTCACAATTCACACAACATACGAGTACCGGCTGTGGGTT TCAG	61
AAGCGCATAAATGAAACAGATAGAAGGCTTAGCAAGCCTTATTACG	48
CACTCATGAAACCACCTTAAATCAAGATTGAGCGTCTTTGTTT	45
TATTTTTGAGATCTGCCATATTTTCTCTACTCAATTGA	40
GTA CTATGGTTGCTTTTAGACGCAAATT	32
AATGCAATAGATTAAGGGCTTAGAGCTTATTTT	33
GTATAAGCAAATTTAGATAAGTAACAACG	32
AAGGGAACCGGATATTCACTCATCTTTGACCCGTAATGCCATCGGAAC	48
TGTAGCTCAACATTTACCCTCGAAAGAC	28
TTTTGTGTAGGTAAAGATTC	20
TTTTGCCTCAGCATAAAGAAAATTAAGCAATAAATTTT	40
CATAGGTCTGAGACAAATCGTCGAATTACC	32
AGCATGTACGAGAACAATCCGGTATTCTAAGAACGATTTTCCAGA	45
GAGAAACATTTAATTTTACAGGTAGAAAG	29
TTTTAGAGCGGGAGCTAGAT	20
GTAAGAATAGTTGAAACTTTTCGCAAACCGC	32
ACCTCGTCATAAACATTTTTT	20
TTCGTAATCATGGTCATCCATCAGTTATAAGT	32
TTTTGTGTAAAGCCTGGCGG	20
CCTGCAGCCATAACGGTGTCCAGCATCAGC	32
TTTGCGTATTGGGCGCTTTT	20
TTTTCGGGCCGTTACGG	20
GCCGGGCGGGTTGCGCCGCTGACCCCTTG	32
TTATACTTAGCACTAAAAAGTTTGTCCGCCA	32
GGCACCAAACCAAAGTAAGCAACTATAGCAACGTAAATCGCC	48
CTAGCTGATAAATTAACAGTAGGG	24
ATACGCAAAGAAAATTCATTAAGGTGAATTTT	36
AGAGCAAATCCTGTCCAGATACCGACAAAAGGTAATTTT	39

GCCAGTACGTTATAAGGCGTTAAATAAGAATAAACACAAAT	41
TTTTTAAACGATGCTGATGG	20
CCTCAGCACAAAGAAAAGTAAGCAG	29
ACAGTTGAGGATCCAGATAGAAGTAAAGC	32
ATAATCAGAAAAGCCCAACATCCACTGTAATA	32
AAATTTGAAAACAGCCATTCGAAAATCGC	32
ACATTCTGAAGTCTCCGCCAGCAGCTCGAA	32
TTTCATCGAATAATATCCAGCTACAATACTCCAGCAATTTCTTTACAG	48
TGAATTACCAGTGAATGGAATTACGAGGCATATAGCGAGAATCC	48
CGTGCCTGTTCTTCGCATCCAGCGGGGTTA	32
TTAGAGCTATCCTGAGGCTGGTTTCAGGGCGC	32
TAGTAATAACATCACTTTTT	20
TAATAAGAAGAGCCACCCTTATTAGCGTT	29
ATCCAGAACAATATTAGTCCATCAGGAACGGT	32
TTTTATCGCCATTA AAAATA	20
TTTTGATTAAGACGCTGAGA	20
GGAATTAGGTAAATTCGGTCATAGCCACCGGAACCACC	45
TTTTAGAACGCGAGAAAACTTT	22
GGCCTCTTCGCTATTACGTTGTACCTCACCG	32
TTTTTGCTGAGTAGAAGAA	20
GCCAGTGCATTGACCCACCGCTTGGTGCC	32
TAAAGTTTAGAACCGCTAATTGTATCGGGTTAAGTTTGGCCTTG	48
TTTTATTAAGTTGGGTACGC	20
ATATATATAAAGCGACGACATCGGCTGTCTTTCCTTATCATTTTT	45
CAGATGAATACAGTTTTT	20
GACCGTGTGATAAATACAAATTCT	24
CATAATAATTCGCGTCTTTT	20
ACAAATTATCATCATATTTTT	20
TCACCGGAAGCATAAATTTTT	20
ATCAAACCTAAATTTCTGGAAGGGCCATATCA	32
TTCATAGGGTTGAGTGTTTT	20
GCCCCCTGGTGTATCACCGTACTC	24
TTCTGAAACATGAAAGTGCCGGCCATTTG	29
TTTTGGAACCTAAGTCTGAATTTTTTTTT	32
TTTTCTTTTTCACACGGAGATTTGTT	29
GTTGTACCACCCTCATAAAGGGGAGACAG	31
CCGAGTAAGCCAACAGGGGTACCGCATTGCAA	32
AGTGTGCTGCAAGGCGTTTT	20
CCCTGAACAAATAAGAAACGCGGTT	29
CATTATACCAGTGATTTGGCATCAGGACGTTGTAACATAAACCAGACG	48
CAACTAATGCAGACAGGGGCAATACTG	29
CGTTGGTAGTCACGACGCCAGCTGGCGAAAGGGATCGGCCTGCGCATCGGA GCTT	61
AAACGGCGCAAGCTTTGAAGGGCGATCGGTGC	32
TTTTGTTTCGTCACCAGTACTGTACCGTAAT	31
CAGTATGTTTTTGCGAAGCCCTTTTAAATTGAGTTCTGAACA	45
TCAAATCACCATCAATACGCAAGG	24
CGCTGGCACCACGGGAGACGCAGAAACAGCGG	32
GAAACAACGCGGTGCGCCGACAGGCGGCCTTTAGTGACTTTCTCCACGTACA GACGAGG	61
TGCTTTTCGAGGTGAATCTCCAAA	24

TAGTTGCCAGTTGCGGGAGGTTGAAGATCAATAA	36
AATTACATAGATTTTCAATAACGGATTCGCC	31
TTTTACCGTTCAGTAAGCGTCATACATGGCTTCAGTTAAT	41
TTTTAACAGTACTTTACA	20
CTTTTGCGTTATTTCAATGATATTCAACCGTT	32
TTTTCATCGGCATATTGACGGCACGG	29
CTCTCACGGAAAAAGAACGGATAAAAAACGACG	32
CGGAATCTCAGGTCTGTTTTAAATGCATGCGAACGAATCATTG	45
TGCGGGATAGCAGCGACGAGCGCAGAGAAACGGGCGGTAACGATC	48
ATTGCTTTAACAAACATTTCAATTACCTGAGCAAAAAGGGAGAAACAGGTTTAA GATGGG	61
TTCACCAGGTAGCAATGGCCTTGCTGGTAAT	31
GCCTGTTTGCTTCTGTTACCTTTTAAACGTTAA	32
CCATTACCAAGGGCGACATCTTTTCATAGGCAGAAAGAATGTTGAG	48
TCAGCAGCAACCGCAATTTT	20
CAAATCGTCAGCGTGGTGCCATCCCACGCAA	31
TTGAGTAAGCCACCCTCAGAACCG	24
GGAGGGAAGCCAGCAATCAGTAGCGACAGCAGAACCGCCTC	45
ATAAACAATCCCTTAGTGAATTTATCAAAAT	31
CACATCCTCAGCGGTGGTATGAGCCGGGTCAC	32
GCTGCGCAACTGTTGGCAGACCTATTAGAAGG	32
AAATCAGCTCATTTTTGTGAGCGAATAGGTCA	32
TTTTAGTAATTCAATCGCAAGACAATTTT	29
GGAAACCAGGCAAAGCGTACATAAGTAGTGA	32
CAAACCCTTTAGTCTTACCAGCAGAAGATAA	31
CAGTACCATTAGTACCCAGTGCCCCTATAAATTGATGAATTAAG	45
AACAGGTGAGCGGCAGACAATTAAGGG	32
TTTTAAGTTACCAGGGTAATTGAGCTTTT	29
ATTTAGAAGTATTAGTT	20
CTGATAGCCCTAAAACCTTTT	20
CCGGCAAATCGGCGAAGTGGTGAAGGGATAG	31
TTTTACCTTGCTGAACCAGG	20
GGGGTCATTGCAGGGGGAATTGACTAAAATA	32
CGCTCACTATCAGACGGTCCGTGAGCCTC	32
GCAGCAAGCGGTCCACAAGTGTGAGGCCA	32
CCACCCTGTTAGGAAGGATCGTCTCCAGCAGGATTATCAGCT	48
CTCAAATGTTTCAAGAAATGGAAGTTTACGGCATTACTTCAACTGGCT	48
ATAACCTTATCAACAAAAATGTATAACCTCC	32
ATCGGCCTTAAAGAATAAATCAAAAAGAATAGCCCGAGACCAGTGAGGGAGG GGTGCTA	61
CCAGCTTACGGCTGGAAACGTGCCCGTCTCGT	32
CTGAGGCCAACGGCTACAGGTTTCCATT	30
AAAACGGTAATCGTTTTTTTT	20
TGGAGCCGGCCTCCGGGTACATCGACATAAAA	32
ACGCCAGATGACGGCGCCGCTAGCCAGC	32
TTTTACGCATAATGAGAATAGAAAGTTTT	29
CATGTTTACCAGTCCTTTTT	20
TTAATTTTATGTTCTATAACTATGTAAATGCTGATGTCAATAGAATCCTTGA CAAAATT	61
TTTTACTAGAAAAAGCCTGTT	21
TTAGTTTGCCTGTTTAGGTCATTTTTGCGGATAGGAAGCCGACTATTA	48

AATAAGTTAGCAAAAACGCAATAACGAGAATTTAAAAGCCCAA	45
TTTTTGGCCTTCCTGTATAA	20
CAGGAAAAACGCTCATACCAGTAAATTTTTGA	32
ATATTCACCCGCGCAGCATTGACAGGCAAAATCA	32
AACCGTTTCACGGGAAATACCTACTTGACCTAAACTATCACTTTTAACGAG	61
TTTTGCGCTGGCAAGTGTAG	20
TTTTGGAATTTGTAGAGAT	20

Tabla 4.4. Grapas modificadas y extendidas desde el extremo 5' al 3' para la estructura de ADN-origami utilizada para los experimentos de seguimiento de una molécula individual (Figura 4.9).

Secuencia (5' a 3')	Longitud [nt]	Función
Biotina- AGAGCCGCAAACAAATGACTCCAAGA GATTAGCGGGCAGTAGCA	48	Biotina para la inmovilización
Biotina- GAGGTAGTTGCAGGTGCTAAACAACTTTCA CGCCTGGAAAGAG	45	Biotina para la inmovilización
Biotina- TACCAGTAACGCTAACAGTTGCTATTGCAC CCCATCCT	40	Biotina para la inmovilización
Biotina- ATAAAAATATCGCGTTCTCCTTGATAAG CTATAT	38	Biotina para la inmovilización
AGAAACAGCTTTAGAAGGAAGAAAAATCTAC GATTTTAAGCATATAACTTTTAAATGC	58	Sitio de captura 1 para el puntero Cy3B
GCACCCCTCCGTCAGGTACGTTAGTAAATGAA TTTAGCGTCAATCATTTTTAAATGC	58	Sitio de captura 2 para el puntero Cy3B
ACGATAAACCTAAAACAAAGAATACACTAAA ACATTACCCAAAGCTTTTTTCGGGCATTTA- CY3B	67	Puntero - Cy3B
AGAAACAGCTTTAGAAGGAAGAAAAATCTAC GATTTTAAGCATATAACTTTTAAATGCC	58	Sitio de captura 1 para el puntero Atto542
GCACCCCTCCGTCAGGTACGTTAGTAAATGAA TTTAGCGTCAATCATTTTTAAATGCC	58	Sitio de captura 2 para el puntero Atto 542
ACGATAAACCTAAAACAAAGAATACACTAAA ACATTACCCAAAGCTTTTTTCGGGCATTTA- ATTO542	67	Puntero - Atto542

Capítulo 5 - Localización de moléculas individuales mediante el escaneo de un mínimo de luz (RASTMIN)

La generalización de la localización de moléculas individuales con iluminación estructurada secuencial (SML-SSI) desarrollada en el Capítulo 3 permitió el diseño de nuevos métodos. Entre las nuevas alternativas, RASTER-scanning MINimum of light (RASTMIN) destaca por su rendimiento y simplicidad. Teóricamente, RASTMIN puede alcanzar precisiones de localización tan altas o incluso más altas que los mejores valores reportados usando MINFLUX. En este capítulo se presenta la primera realización experimental de RASTMIN con el objetivo de verificar el rendimiento predicho teóricamente.

La medición RASTMIN se realiza mediante el barrido de un haz en forma de rosquilla sobre una molécula individual fluorescente cuya posición se desconoce (Figura 5.1a). Los datos recogidos, es decir, las intensidades registradas en cada píxel ($\{n_i\}$ en el Capítulo 3, ecuaciones 3.3, 3.8 y 3.11) del barrido producen una imagen de baja resolución y baja SNR del haz en forma de rosquilla (figura 5.1b). Una medición de alta resolución y alta SNR del foco de excitación en forma de rosquilla se adquiere, normalmente antes de la medición de moléculas individuales, utilizando un emisor más brillante y estable (Figura 5.1c). Es especialmente relevante la zona de una extensión $\sim \lambda/2NA$ alrededor del mínimo de intensidad (Figura 5.1d). Esta medición estima con gran precisión el $I(\mathbf{r})$ en el Capítulo 3, ecuaciones 3.2 y 3.5. Utilizando las dos mediciones como entrada para la función de verosimilitud (Capítulo 3, ecuación 3.11) se recupera la posición del emisor.

5.1 Implementación de RASTMIN en un microscopio confocal

RASTMIN interroga la posición de una molécula individual mediante un barrido rasterizado con un mínimo de intensidad luminosa sobre un área alrededor de la molécula objetivo. Así, en principio, RASTMIN podría implementarse en cualquier microscopio óptico de barrido modificado para que el haz de excitación tenga un mínimo (idealmente un cero) de intensidad. En principio, RASTMIN puede implementarse tanto en microscopios de barrido por escaneo de platina como por escaneo óptico. Sin embargo, es muy útil utilizar el control electromecánico de la platina para corregir activamente la deriva mecánica en lugar de realizar el barrido. Por lo tanto, un escáner óptico para el haz de excitación combinado con una platina motorizada utilizada para compensar la deriva es probablemente la forma más eficiente de implementar RASTMIN.

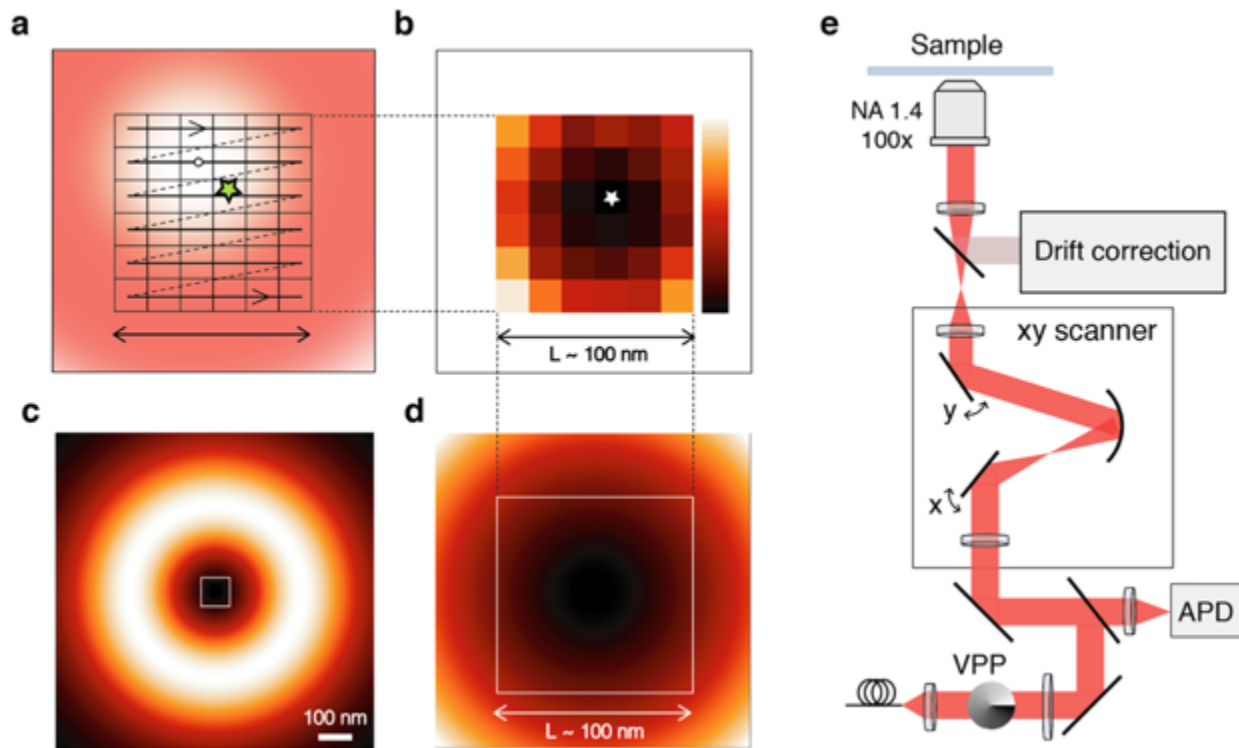


Figura 5.1 Montaje experimental y medición de RASTMIN. (a) RASTMIN se ha implementado en un sistema de escaneo láser confocal existente; las dos modificaciones principales son: la adición de una placa de vórtice-fase (VPP) en la trayectoria de excitación para generar el foco en forma de rosquilla y un sistema de corrección IR de la deriva para corregir activamente la deriva mecánica de la muestra. (b) El haz en forma de rosquilla se escanea en un barrido rasterizado sobre la molécula fluorescente individual. (c) La medición (b) produce una imagen de baja SNR del haz en forma de rosquilla. (d) Una medición como (b) se realiza también con un emisor más brillante y estable para obtener una imagen detallada del foco del haz de excitación. (e) Zoom de la región central de (d).

Hemos implementado RASTMIN en un microscopio confocal hecho a medida que cuenta con un escáner de haz basado en espejos galvanométricos y una platina piezoeléctrica para controlar el movimiento del soporte de la muestra, el mismo microscopio se utiliza en nuestro laboratorio para realizar nanoscopía STED. Una descripción detallada del montaje en su modo STED se encuentra en ²⁸. Aquí, para mayor claridad, nos centraremos en describir las partes del montaje que se utilizaron realmente para implementar RASTMIN.

La figura 5.1e muestra un esquema del microscopio; se utiliza un escáner óptico para realizar la iluminación estructurada secuencial y adquirir la señal de fluorescencia en un fotodiodo de avalancha (APD, SPCM-AQR-13 PerkinElmer Optoelectronics). En la subsección 5.1.1 se ofrece una descripción detallada del escáner de haz. En comparación con un microscopio confocal habitual, se realizaron dos modificaciones principales en el montaje: una $0 - 2\pi$ se añadió una placa de vórtice-fase (VPP) en la trayectoria de excitación para generar el enfoque en forma de rosquilla (subsección 5.1.2) y se implementó un sistema IR de corrección de la deriva para corregir activamente la deriva mecánica de la muestra (subsección 5.1.3).

5.1.1 Escáner de haz

Hay una gran variedad de posibles diseños de escáneres de haz, algunos de ellos se describen en el Capítulo 9, sección 5 de ¹. La Figura 5.2a muestra una fotografía del escáner de haz hecho a medida basado en espejos galvanométricos utilizado en el microscopio confocal hecho a medida. La figura 5.2b muestra un esquema del montaje. Consta de dos lentes, dos espejos galvanométricos ortogonales (horizontal, x y vertical, y), y un espejo cóncavo (Figura 5.2a).

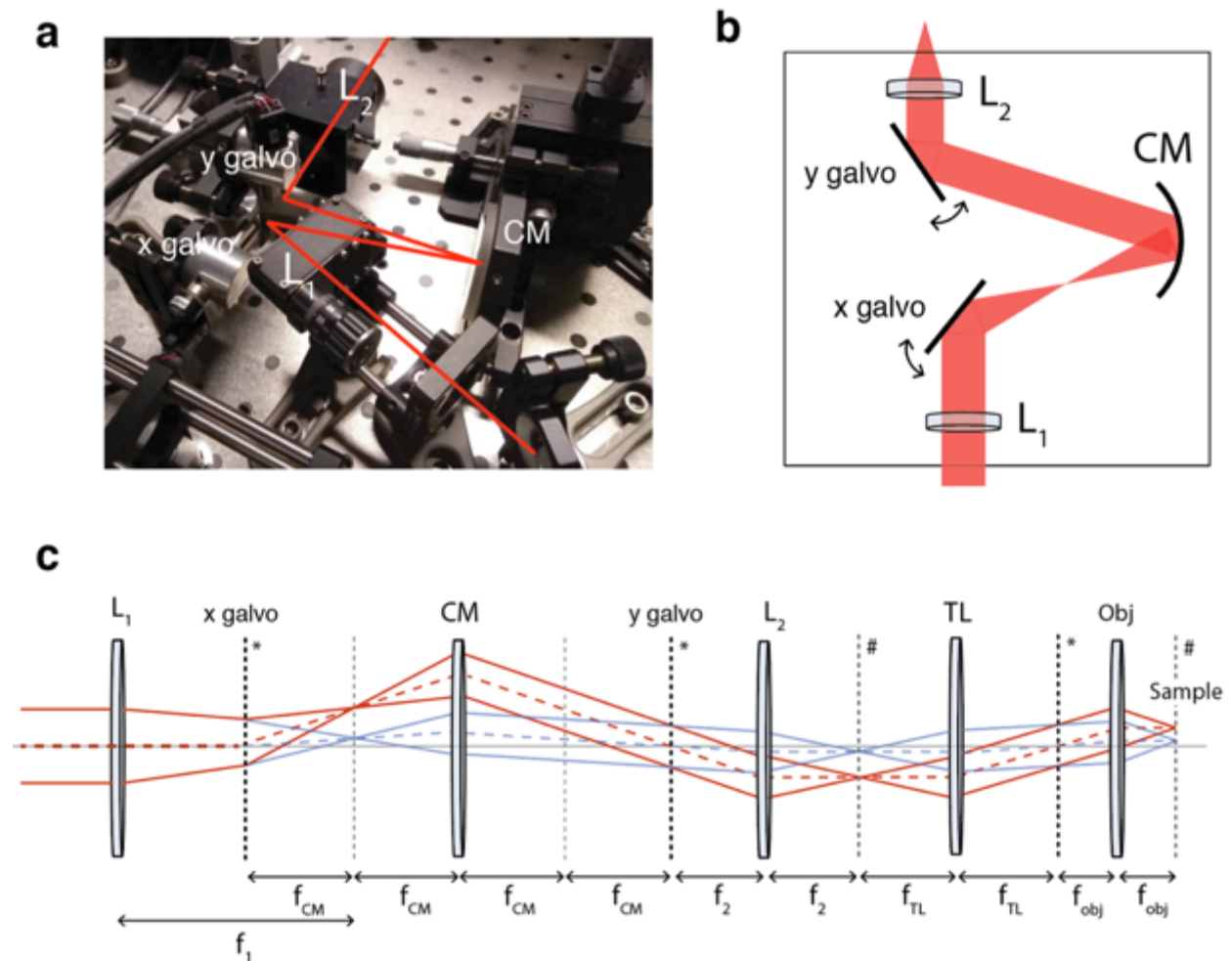


Figura 5.2 Escaneo óptico de trama. (a) Imagen de los elementos ópticos que forman el escáner óptico. (b) Representación esquemática en 2D. (c) Representación detallada en 1D del posicionamiento de cada elemento. L_1 : doblete acromático, $f = 100$ mm (Thorlabs), L_2 : lente de barrido con corrección de aberraciones (Leica), $f = 200$ mm. CM: espejo de plata cóncavo de 2''

(Thorlabs). x y y galvo: espejos galvanométricos (Cambridge Technology, Inc). Los planos conjugados están marcados con * y #.

Es más fácil explicar el diseño del sistema de exploración en un esquema 1D (Figura 5.2c) en el que el espejo cóncavo se representa como una lente, ya que tiene un papel equivalente en términos de enfoque/colimación de la luz. En primer lugar, el haz de entrada colimado (líneas rojas oscuras) es enfocado por una lente (L_1) con distancia focal f_1 en el plano focal posterior del espejo cóncavo (CM) que tiene una distancia focal f_{CM} . El primer galvo (x) se coloca exactamente a una distancia $2f_{CM}$ antes del CM y el segundo galvo (y) se coloca exactamente a una distancia $2f_{CM}$ después del CM . De este modo, siguiendo la ecuación de imagen $1/f = 1/s_o + 1/s_i$ se forma una imagen del galvo x se forma en el galvo y . Por otro lado, el rayo es colimado por el CM y es enfocado de nuevo por una segunda lente (L_2) colocada a una distancia f_2 del galvo y . De este modo, se consiguen dos factores clave: i) el haz es completamente estacionario en el galvo x , y pivotea (el ángulo del haz varía, pero está inmóvil en su posición) en el galvo y , ii) el haz enfocado se desplaza en x y y sin inclinación en el plano focal de L_2 . Por lo tanto, colocando la TL a una distancia f_{TL} del plano focal de L_2 el haz se desplaza sólo en ángulo en el plano focal posterior del objetivo, lo que permite un barrido puramente lateral sin ninguna inclinación del haz enfocado sobre la muestra. Un haz desplazado se representa en azul claro para mostrar cómo el movimiento es puramente lateral, sin inclinación del haz enfocado. En las Figuras 5.2a y 5.2b no se muestran la muestra y el objetivo.

Los voltajes necesarios para accionar los espejos galvanométricos son proporcionados por una fuente de alimentación regulada linealmente (Peaktech 6060) controlada con una tarjeta DAQ (National Instruments PCIe-6353). La tarjeta DAQ está a su vez interconectada mediante el software especializado Inspector¹⁵⁵. Destacamos que, si bien elegimos este software para controlar la tarjeta DAQ, podría utilizarse cualquier otro software para microscopios de escaneo láser, ya sea escrito a medida o disponible en el mercado.

Este escáner óptico cumple cuatro especificaciones importantes: i) es eficiente en cuanto a los fotones: se probó experimentalmente y la eficiencia del sistema óptico permite la detección de moléculas individuales con una SNR alta, ii) los planos ópticos del espejo galvanométrico son estacionarios con respecto al escaneo por diseño, iii) las aberraciones ópticas se minimizan mediante el uso de una superficie de enfoque reflectante junto con lentes especializadas de alta calidad y ángulos de desviación relativamente pequeños, iv) es compacto y robusto: su tamaño total es de aproximadamente $20 \times 20 \text{ cm}^2$ y su alineación es muy estable durante meses y hasta años. Las especificaciones i-iii) se probaron en un campo de visión de al menos $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ y velocidades de escaneo de hasta $1 \text{ nm}/\mu\text{s}$ sin ninguna distorsión evidente en la imagen.

5.1.2 Modulación de fase del haz de excitación

La fuente de luz de excitación del microscopio de fluorescencia es un diodo láser de 640 nm (PicoQuant LDH-P-C-640B). El láser está acoplado a una fibra monomodo para obtener un perfil de haz TEM₀₀. Para transformar el microscopio confocal de barrido en un sistema RASTMIN, el frente de fase del haz de excitación se moduló con una placa de fase de vórtice $0 - 2\pi$ (VPP, V-633-10, Vortex Photonics) con el fin de obtener un foco toroidal con un cero central de intensidad, aquí denominado foco en forma de rosquilla. La alineación fina en posición (coincidencia del centro del VPP con el eje óptico) y en inclinación (VPP perpendicular a la dirección de propagación del haz) es crítica para obtener un foco en forma de rosquilla rotacionalmente simétrico y con un mínimo central de intensidad cercano a cero. Además, la polarización del haz de excitación debe ser circular y en el mismo sentido que el VPP. Por lo tanto, el VPP se montó en una platina con posición lateral ajustable (x, y) e inclinación (θ, φ), ambas con precisión micrométrica. La polarización se controló con láminas $\lambda/2$ y $\lambda/4$ (WPH05M-633 y WPQ05M-633, Thorlabs Inc.) para conseguir una polarización circular. El estado de polarización se verificó en el plano focal posterior del objetivo con el siguiente procedimiento: i) se

retiraron el portamuestras y el objetivo, ii) se colocó una herramienta auxiliar consistente en un polarizador lineal montado en un motor giratorio en lugar del objetivo, iii) la luz que pasa el polarizador se detecta con un fotodiodo estándar. La señal del fotodiodo se adquiere con un programa hecho a medida o con un osciloscopio. La señal adquirida suele ser proporcional a $\sim \sin^2 \omega t$ según la ley de Malus, cuanto más pequeña sea la diferencia entre los máximos y los mínimos de esta señal, más cerca estará la polarización de ser circular.

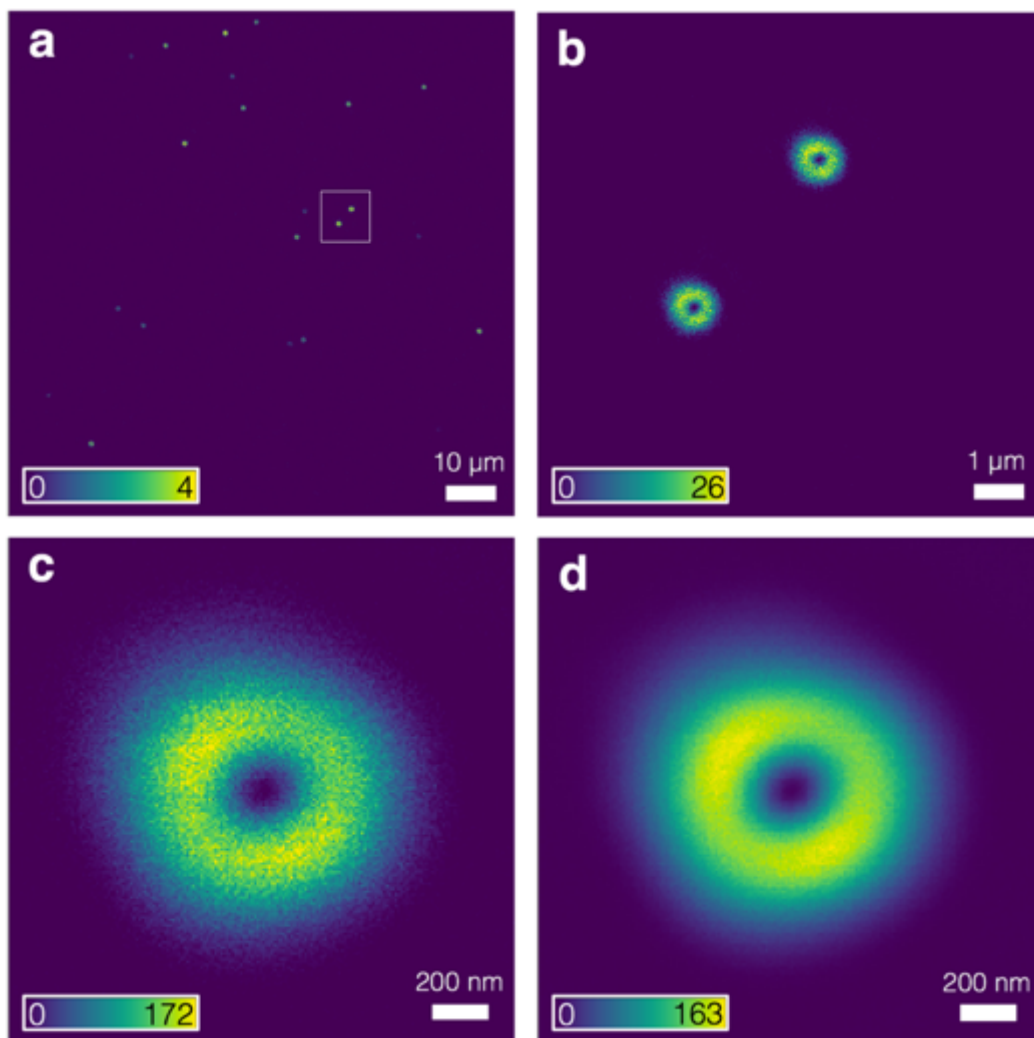


Figura 5.3 Escaneo óptico de trama. Enfoque típico en forma de rosquilla del microscopio RASTMIN. Las NPs fluorescentes con un diámetro de 40 nm se utilizan como fuentes puntuales aproximadas para medir el *PSF* del sistema. (a) Vista general de la muestra y de la densidad superficial típica utilizada. Normalmente tenemos 10-20 NP en un $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ campo de visión.

(b) Escaneo más pequeño ($100 \times 100 \mu\text{m}^2$) de la zona marcada en (a). (c) Escaneo sobre un solo NP, por lo que se considera una medida *PSF* del sistema. (d) Medición de alta SNR del *PSF*, en este caso se adquirieron y promediaron 16 imágenes como la mostrada en (c). Tamaño de los píxeles: (a) 67 nm, (b) 20 nm, (c) y (d) 10 nm.

Para evaluar el foco en forma de rosquilla generado, se adquirieron y analizaron imágenes de pequeñas NPs fluorescentes individuales. La figura 3a muestra una $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ imagen de nanopartículas fluorescentes individuales (40 nm Dark Red Microspheres, Thermofisher). En la Figura 3b se muestra un escaneo más pequeño de la región marcada en la Figura 3a (cuadrado blanco), donde se obtienen imágenes de dos NPs bien separadas. Las intensidades y las formas son similares, lo que confirma que las señales corresponden a NPs individuales (no a agregados de partículas). La figura 3c es un escaneo sobre una sola NP. En la Figura 3d se muestra una medición de alta SNR del foco en forma de rosquilla, que se obtuvo promediando la señal de 16 fotogramas como el de la Figura 3c. Dicha medición de alta SNR también puede utilizarse como entrada para la estimación de la posición del emisor.

La clave de RASTMIN es la calidad del mínimo central de intensidad, que se evaluó calculando un contraste efectivo definido como $C = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$ donde I_{min} es la intensidad en el centro del foco e I_{max} es la intensidad máxima alcanzada en la periferia. Para nuestros propósitos, encontramos que $C > 95\%$ era suficiente. En este punto, hay que tener en cuenta que debido al tamaño finito de la nanopartícula fluorescente utilizada para sondear el foco es imposible medir intensidad cero en el centro, aunque la intensidad real de la luz sea cero.

En general, la calidad del foco también estará limitada por las aberraciones de los elementos ópticos utilizados. Empíricamente, descubrimos que las aberraciones residuales en el foco en forma de rosquilla pueden evitarse disminuyendo ligeramente la NA efectiva del haz de excitación. Esto se hace experimentalmente simplemente colocando una abertura en la trayectoria de forma que se reduzca el tamaño efectivo del haz. Para nuestros experimentos RASTMIN, se utilizó una excitación efectiva con $NA = 1.2 - 1.3$.

Observamos que, como alternativa al VPP, podría utilizarse un modulador espacial de luz (SLM) para proporcionar la modulación de fase necesaria. En este caso, el SLM también podría utilizarse para corregir la aberración y alternar fácilmente entre la iluminación gaussiana y la iluminación en forma de rosquilla.

5.1.3 Influencia de la deriva mecánica en la precisión de la localización

Todos los microscopios sufren inestabilidades termomecánicas. La más crítica es el desplazamiento relativo de la muestra con respecto a la lente del objetivo. Un microscopio bien construido presenta derivas posicionales muestra-objetivo de unas decenas de nanómetros por minuto. Si bien este nivel de deriva es insignificante para la mayoría de las aplicaciones de imágenes limitadas por la difracción, se vuelve crítico para los métodos que intentan alcanzar el régimen de menos de 10 nm, como RASTMIN.

Aunque la deriva de escala a largo plazo puede corregirse en las técnicas SMLM basadas en la cámara introduciendo marcadores fiduciaros en la muestra y realizando una corrección posterior a la adquisición, este enfoque es insuficiente para alcanzar una precisión de localización inferior a 10 nm y no es compatible con los métodos SML-SSI, en los que la muestra tiene que permanecer inmóvil para mantener la estructura objetivo dentro del campo de visión delimitado por el patrón de iluminación, que está en el rango de 50 – 150 nm. Teniendo en cuenta que la precisión del método disminuye drásticamente fuera de esta región, hay que realizar una corrección activa de la deriva para conseguir una resolución nanométrica. Además, aunque las técnicas SMLM permiten una corrección posterior a la adquisición, este procedimiento puede introducir una incertidumbre adicional en la precisión de la localización. En particular, puede producirse una deriva significativa dentro de la duración de un fotograma de la cámara cuando se utilizan

fotogramas de larga duración, por ejemplo en las mediciones de DNA-PAINT, como ha estudiado el grupo de K. Gaus¹⁵⁶.

La precisión final de la localización alcanzada vendrá dictada por las contribuciones de incertidumbre independientes correspondientes a la localización sin deriva (dada por el MLE) y a la deriva. Si se desprecia la deriva de la escala de tiempo largo y se considera la inestabilidad mecánica como un ruido gaussiano puro con σ_{drift} centrado en la posición ideal de la muestra, entonces se puede hacer la siguiente aproximación:

$$\sigma_{tot} \approx \sqrt{\sigma_{loc}^2 + \sigma_{drift}^2} \quad (5.1)$$

Donde σ_{loc} es el parámetro de la distribución gaussiana esperada de las localizaciones dadas por cualquiera de los métodos de localización de una molécula individual. Utilizando la aproximación de la ecuación (5.1) puede evaluarse la influencia de σ_{drift} en el rendimiento global del sistema puede evaluarse. La figura 5.3 muestra un gráfico de $\sigma_{drift}/\sigma_{loc}$ frente a $\sigma_{tot}/\sigma_{loc}$ que nos permite estimar los límites de tres regiones: i) para $\sigma_{drift} < 0.4 \sigma_{loc}$ la contribución de la deriva a la incertidumbre es inferior a 10% de la incertidumbre total, ii) para $0.4 \sigma_{loc} < \sigma_{drift} < 2.0 \sigma_{loc}$ tanto la deriva como la precisión de la localización contribuyen de forma comparable a la incertidumbre total y deben ser analizadas cuidadosamente, iii) para $\sigma_{drift} > 2.0 \sigma_{loc}$ la deriva contribuye a más de 90% de la incertidumbre, convirtiéndose en el efecto dominante.

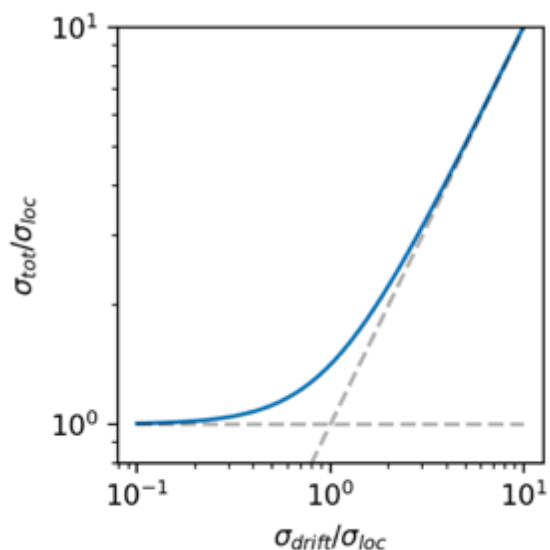


Figura 5.3 Influencia de σ_{drift} en la precisión total de la medición. El gráfico muestra $\sigma_{tot}/\sigma_{loc}$ (línea azul) trazado frente a $\sigma_{drift}/\sigma_{loc}$. Las líneas de puntos grises son los valores asintóticos de $\sigma_{drift}/\sigma_{loc} \ll 1$ y $\sigma_{drift}/\sigma_{loc} \gg 1$

5.1.4 Sistema de estabilización

Para implementar RASTMIN, complementamos el microscopio con un sistema de estabilización activo xyz que proporciona una estabilización mejor que 2 nm en xy ($\sigma_{drift x}$, $\sigma_{drift y}$) y mejor que 3 nm en z ($\sigma_{drift z}$).

La figura 5.4 muestra de forma esquemática cómo se puede añadir el sistema de estabilización en un microscopio confocal combinando la luz de excitación/fluorescencia (642 nm/670-730 nm) con la luz IR (láser de 775 nm, One Five Katana HP) a través de un espejo dicróico (DM, T750SPXRXT-UF1). El sistema de estabilización IR puede dividirse en una rama de excitación (Figura 5.4a) y una rama de detección (Figura 5.4b). Ambas ramas están divididas por un divisor de haz no polarizante 50:50 (BS_3).

Excitación

La luz IR se acopla a una fibra monomodo que proporciona un perfil de haz TEM₀₀ y se colima mediante un colimador de fibra (60FC, Schäfter & Kirchhoff GmbH). A continuación, se divide en dos caminos mediante un divisor de haz (BS_1). El camino superior se utiliza para la estabilización en la dirección axial (z). Una lente (L_1) se acopla a la lente del tubo (TL) del microscopio en un $4f$ sistema. De este modo, el haz se enfoca en la muestra mediante el objetivo. Este haz se alinea a propósito con una inclinación tal que la posición z de la muestra pueda inferirse a partir del desplazamiento de la imagen del haz reflejado en una cámara sCMOS.

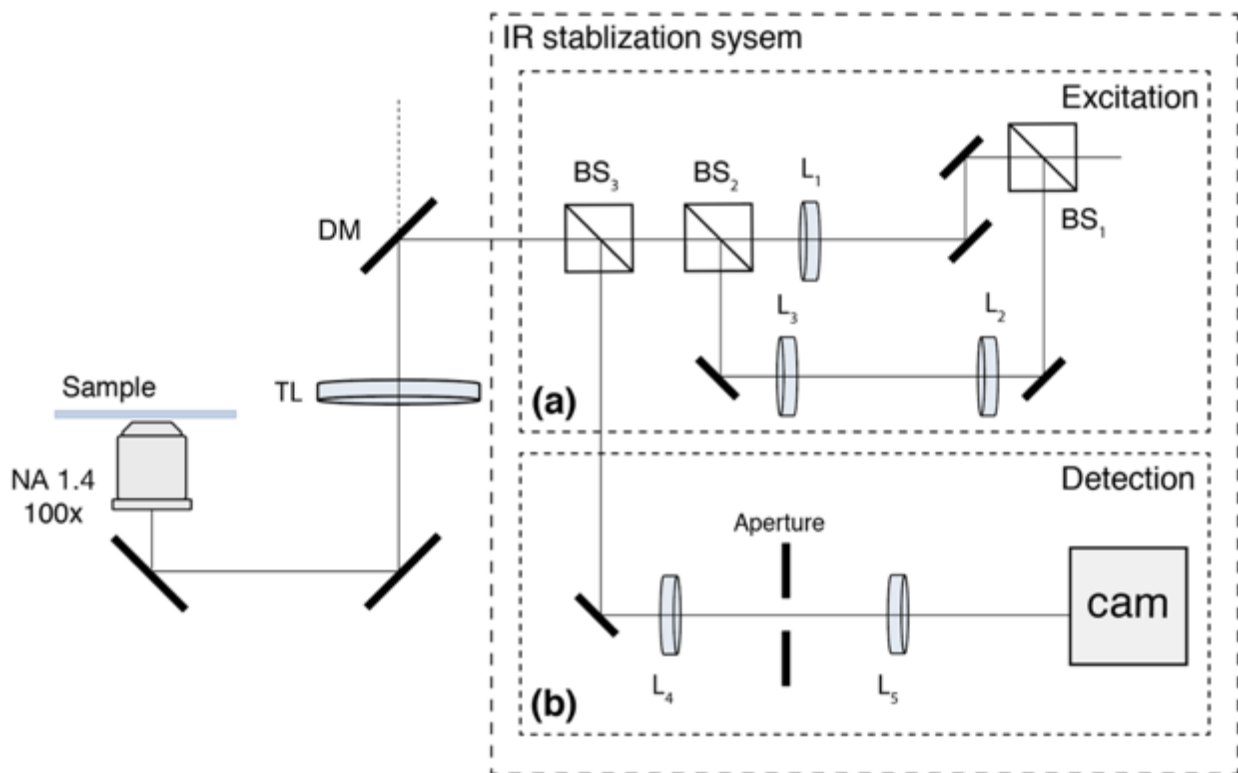


Figura 5.4. Sistema de estabilización - hardware. (a) Trayectoria de la iluminación infrarroja (775 nm). Parte superior: haz para la detección de la posición z . Parte inferior: iluminación TIR de campo amplio para la para la localización fiduciaria de las AuNP en xy . (b) Parte común con el microscopio confocal. El haz para la detección de posición z se enfoca y refleja en la muestra, el haz para la iluminación TIR se enfoca en el plano focal posterior (BFP) del objetivo. (c) Camino de detección. Se coloca una apertura en un plano conjugado del BFP. La apertura bloquea la luz

reflejada de la iluminación TIR, constituyendo un microscopio de campo oscuro efectivo. Tanto el haz de posición z como la luz dispersada por las AuNP se enfocan en la cámara.

El camino inferior de la excitación es una iluminación de campo amplio que se utiliza para estabilizar lateralmente (xy) siguiendo el desplazamiento de la imagen por dispersión de los marcadores fiduciaros (normalmente nanopartículas de oro). Un telescopio formado por L_2 y L_3 expande el haz que se enfoca en el plano focal posterior (BFP) del objetivo por la TL . Dado que la señal utilizada es de dispersión, es importante separar geoméricamente la señal de los marcadores de la iluminación. Para ello, la iluminación se alinea de forma que el haz se enfoque en la parte exterior del BFP como se hace en la microscopía TIRF. De este modo, la luz se reflejará con un ángulo γ , cuando se enfoque de nuevo, aparecerá como un punto fuera del eje óptico, donde puede bloquearse mediante una máscara o apertura adecuada.

Ambas vías de excitación se combinan mediante BS_2 . Un tercer divisor de haz (BS_3) se utiliza para separar la luz de excitación de la luz dispersada/reflejada, que es la señal que se detectará en la cámara.

Detección

El sistema formado por el objetivo y el TL forman una imagen intermedia de los marcadores de dispersión entre BS_3 y L_4 . Por otra parte, el $4f$ sistema formado por el TL y L_4 crea una imagen del BFP donde se coloca una apertura. Esta apertura puede cerrarse para bloquear la luz reflejada de iluminación de campo amplio que se enfoca fuera del eje por L_4 . La luz dispersada por los marcadores fiduciaros se colima en la apertura y tiene componentes de ángulo bajo γ , por tanto, su señal sólo se bloquea parcialmente por la apertura. A expensas de una ligera pérdida de resolución de la imagen (debido al bloqueo de los componentes angulares elevados de la luz dispersada), el SBR se incrementa drásticamente al bloquearse toda la luz reflejada.

Después de la apertura, otra lente de relevo L_5 crea una imagen de los dispersores fiduciaros en una cámara sCMOS de 8 bits (ThorCam DCC1240C, Thorlabs Inc.). Por otra parte, el haz utilizado para el seguimiento de la posición z se enfocó en la muestra y el sistema compuesto por *Objective* – TL – L_4 – L_5 forma una imagen del punto de enfoque inclinado en la cámara (Figura 5.5a rectángulo rojo, con líneas de puntos).

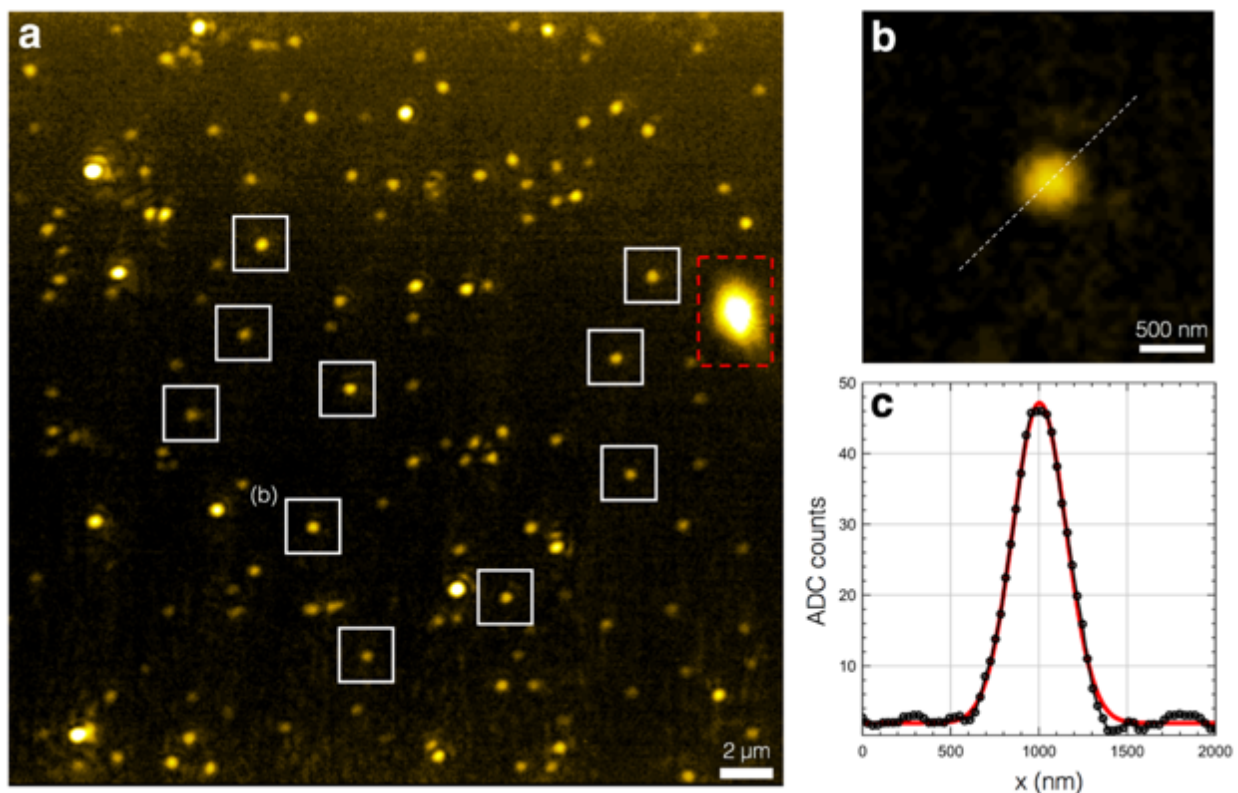


Figura 5.5 Estabilización - óptica xyz seguimiento óptico de la muestra. (a) La trayectoria IR forma efectivamente un sistema de imagen de campo oscuro. Las AuNP individuales (de 60 nm de diámetro) se visualizan con $SBR > 10$. Normalmente, se seleccionan unas 10 AuNP bien aisladas como marcadores fiduciaros (cuadrados blancos). Además, se selecciona el haz reflejado para detectar la deriva axial (rectángulo rojo). (b) Imagen de cerca de la AuNP marcada en (a). (c) Perfil de intensidad 1D (puntos negros) de (b) y ajuste con una función gaussiana (línea roja).

De este modo, la trayectoria de estabilización IR se convierte en la práctica en un sistema de imagen de campo oscuro. En la figura 5.5 se muestra un ejemplo de imagen de campo oscuro. En la Figura 5.5a se muestran tanto la imagen de las AuNPs (cuadrados blancos) como el rayo láser reflejado (rojo, rectángulo punteado). Las AuNPs presentan una imagen gaussiana simétrica con $SBR > 10$ (Figura 5.5b-c).

Así, a partir de una sola imagen adquirida, se puede obtener tanto la posición xy como la posición z de la muestra con respecto al sistema óptico. Las posiciones laterales de los dispersores fiducarios proporcionan la xy posición y la posición lateral del haz reflejado proporciona la información sobre la posición axial. A partir de esta información, la posición de la muestra se corrige activamente con una platina piezoeléctrica (NanoMax 311D/M con controlador BPC303, Thorlabs Inc.).

La comunicación con los instrumentos utilizados en el sistema de estabilización (cámara sCMOS y etapa piezoeléctrica) se realiza digitalmente a través de código Python. Todo el control está integrado en un software Python hecho a medida que proporciona una interfaz gráfica de usuario (GUI) para supervisar la estabilización e interactuar con las mediciones. La arquitectura del software se divide en clases de *backend* y *frontend* para mantener una distinción limpia entre las funciones que se comunican con el hardware (backend) y la visualización de los datos y los comandos en la GUI (frontend). El software de control es de código abierto y puede encontrarse en <https://github.com/lumasullo/pyflux>. La figura 5.6 muestra una captura de pantalla de la interfaz gráfica de usuario.

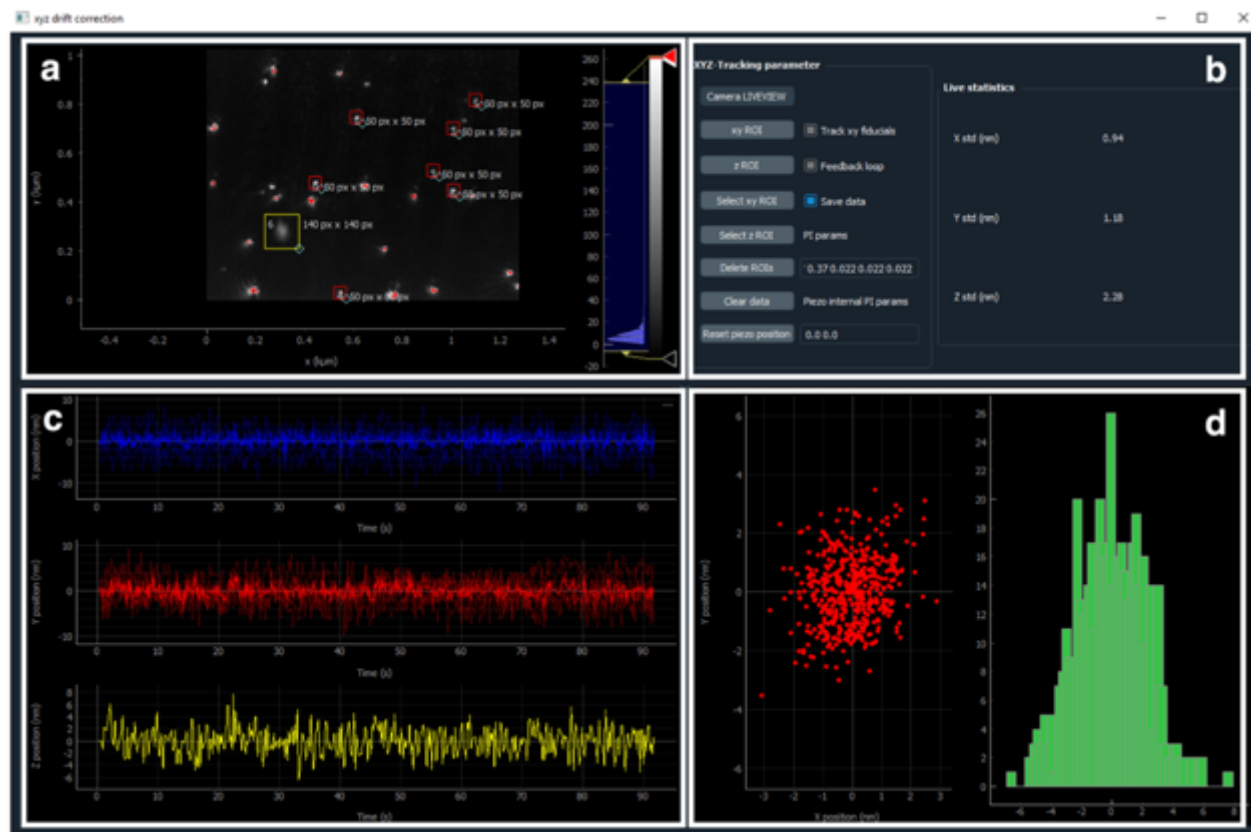


Figura 5.6 Estabilización - instrumentación y control. (a) Normalmente se seleccionan manualmente entre 5 y 10 nanopartículas de oro (AuNPs) (ROIs rojas) y se localizan y rastrean continuamente a una velocidad de ~ 20 Hz. También se selecciona el haz IR reflejado utilizado para rastrear la posición z de la muestra (ROI amarillo). Comprobando la intensidad de la señal de las AuNPs, se pueden distinguir los agregados y las partículas individuales de 60 nm. Se seleccionan las AuNPs que tienen una señal alejada de la saturación. (b) Interfaz de usuario básica que permite seleccionar las AuNPs fiduciaros, seguirlas y controlar el lazo de retroalimentación PI para estabilizar activamente la (x, y, z) posición de la etapa. Se pueden seleccionar los parámetros de PI y es necesario un ajuste fino manual para optimizar el rendimiento. Las estadísticas básicas sobre la posición de la AuNP rastreada y el rayo IR reflejado se calculan para tener una lectura en vivo del rendimiento del sistema de estabilización. (c) Señales de posición en función del tiempo para x , y y z . (d) Histograma 2D para $x - y$ y el histograma 1D para z . Todos los gráficos se actualizan continuamente.

Las imágenes se adquieren a velocidades de entre 10 y 30 Hz con una resolución digital de 8 bits. Las AuNP individuales se seleccionan manualmente (Figura 5.6a, cuadrados

rojos) y su posición se monitoriza en tiempo real (fotograma a fotograma) mediante un ajuste gaussiano a su distribución de intensidad (las Figuras 5.6 b-d muestran un ejemplo). El haz enfocado de IR también se selecciona manualmente (Figura 5.6a, cuadrado amarillo) y su centro de masa se rastrea en tiempo real. Las calibraciones para traducir los desplazamientos laterales en píxeles en (x, y) y desplazamientos en z de la muestra en nm se obtienen realizando movimientos predefinidos con la piezo-etapa y registrando los valores de desplazamiento en píxeles.

Para obtener una mejor corrección de la deriva, es conveniente utilizar muchas nanopartículas. El (x_i, y_i) de posiciones estimadas de las AuNP se promedia y la posición (\bar{x}, \bar{y}) media se utiliza como referencia de la posición de la muestra con respecto al sistema óptico. Las estadísticas en vivo de (\bar{x}, \bar{y}) se calculan y se muestran los gráficos de $(x_i(t), y_i(t))$ y $(\bar{x}(t), \bar{y}(t))$ así como un histograma 2D para (x, y) y un histograma 1D para z . Todos los datos se actualizan en tiempo real y pueden guardarse en archivos *.txt*.

Si la opción de *lazo de realimentación* está marcada por el usuario, el sistema puede entrar en un lazo de realimentación PI activo en el que la consigna es la (x, y) en el momento en que se inicia el lazo. La señal para el lazo es la (\bar{x}, \bar{y}, z) posición medida de la muestra y el actuador es la etapa piezoeléctrica. Los parámetros son accesibles a través de la GUI y tienen que ser ajustados por el usuario.

El rendimiento del sistema de estabilización se caracterizó evaluando la media y la desviación estándar de las xyz posiciones en el modo de lazo cerrado. Se registraron series temporales en muestras con AuNP inmovilizada (diámetro 60 nm). En todos los casos elegimos entre 5 y 10 AuNP para estabilizar el sistema y descartamos cuidadosamente las manchas saturadas que probablemente sean agregados de NPs. Los valores exactos de las precisiones de estabilización pueden variar ligeramente de un experimento a otro y dependen del ajuste fino de los parámetros de PI, pero podemos decir con seguridad que la (x, y) estabilización alcanzada está entre 1 nm y 2 nm (σ_{drift}) como mejor y peor escenario, respectivamente. La estabilización conseguida en z también está entre 1 nm y 2 nm (σ_{drift}). La figura 5.7 muestra las trazas temporales típicas de x, y y z . Las posiciones

se distribuyen normalmente en torno al valor objetivo y la estabilidad se mantiene durante períodos de tiempo superiores a 1 hora (datos no mostrados).

Es interesante observar que estos valores de estabilización están limitados por la resolución de la platina piezoeléctrica y no por la precisión de la localización óptica de las AuNP. De hecho, si se deja que el sistema derive libremente, el ruido de la señal posicional (\bar{x} , \bar{y}) es muy inferior a 1 nm.

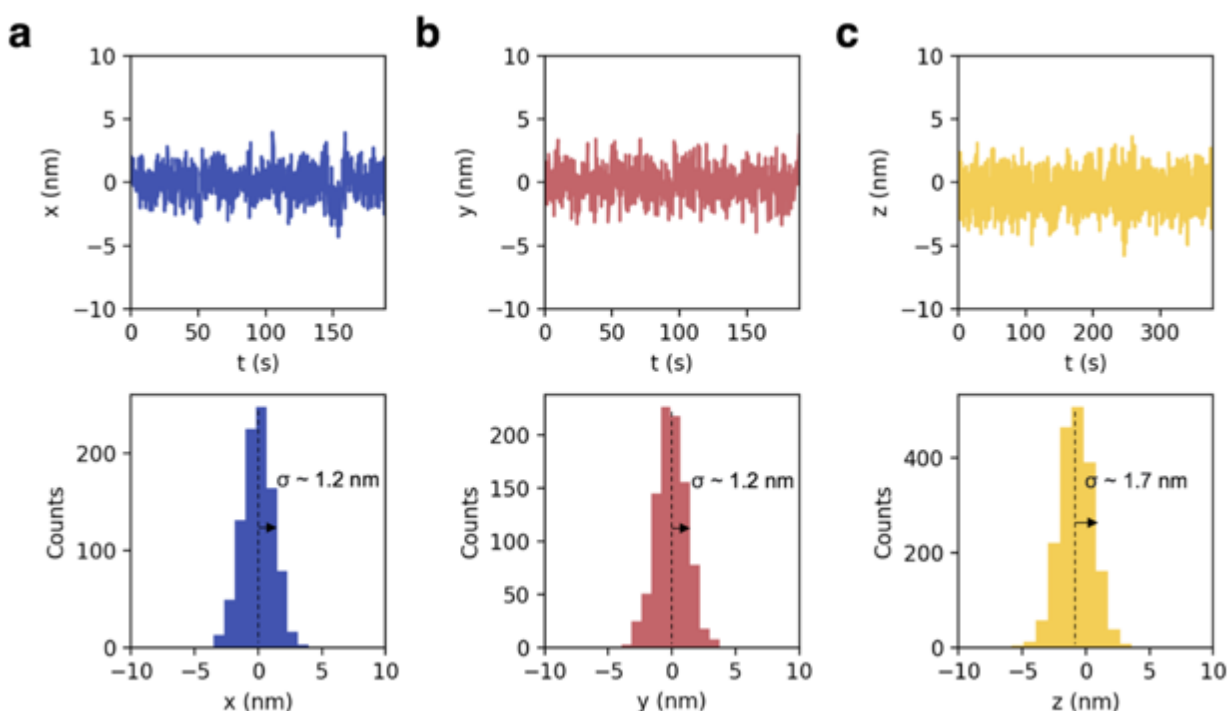


Figura 5.7 Resultados de estabilidad. (a) x Posición de la muestra en función del tiempo. (b) y posición de la muestra frente al tiempo. (c) z posición de la muestra en función del tiempo. Todas las posiciones son relativas a la posición objetivo (posición inicial medida).

5.2 Simulaciones de localización y nanoscopía RASTMIN

Para predecir la precisión y resolución esperadas de las mediciones de localización de RASTMIN, realizamos extensos cálculos y simulaciones. Como primera aproximación, complementamos los estudios σ_{CRB} presentados en el Capítulo 3 probando el método con diferentes números de exposiciones. Encontramos que no se produce una pérdida de precisión al utilizar un mayor número de exposiciones (K). Al principio, este resultado puede parecer contraintuitivo, ya que un mayor número de exposiciones dará lugar a un menor número de fotones detectados esperados (λ_i) por exposición, llegando a niveles en los que $\lambda_i \lesssim 1$ fotón detectado. Sin embargo, observamos que este régimen sólo afecta a una medición en la que está presente el ruido de lectura. Para una detección de ruido de Poisson puro, no hay ninguna desventaja real en elegir un mayor número de exposiciones K . Por lo tanto, elegimos $K = 6 \times 6$ para nuestros experimentos como un buen compromiso teniendo en cuenta el tiempo que tarda el software de control en leer cada conjunto adquirido de $\{n_i\}$ con $i \in [1, K]$.

En la figura 5.8a se muestra un mapa bidimensional $\sigma_{CRB}(x, y)$ para $L = 100$ nm, $N = 1000$ y $SBR = 5$. RASTMIN alcanza precisiones $\sigma_{CRB} \sim 1$ nm para la región de interés (línea roja punteada), definida por $FOV = 0.75 L$. A continuación, realizamos simulaciones de Monte Carlo para estudiar computacionalmente el rendimiento real del estimador MLE en estas condiciones; los resultados se muestran en la Figura 5.8b. El MLE es óptimo, alcanzando el CRB en la región de interés (línea roja punteada) y se comporta bien incluso en las partes exteriores del patrón de excitación. Fuera de la zona definida por el círculo de diámetro L el MLE no alcanza el CRB para estos parámetros, resultando $\sigma_{CRB} \approx 4$ nm y $\sigma_{MLE} \approx 5$ nm una divergencia de $\sim 25\%$.

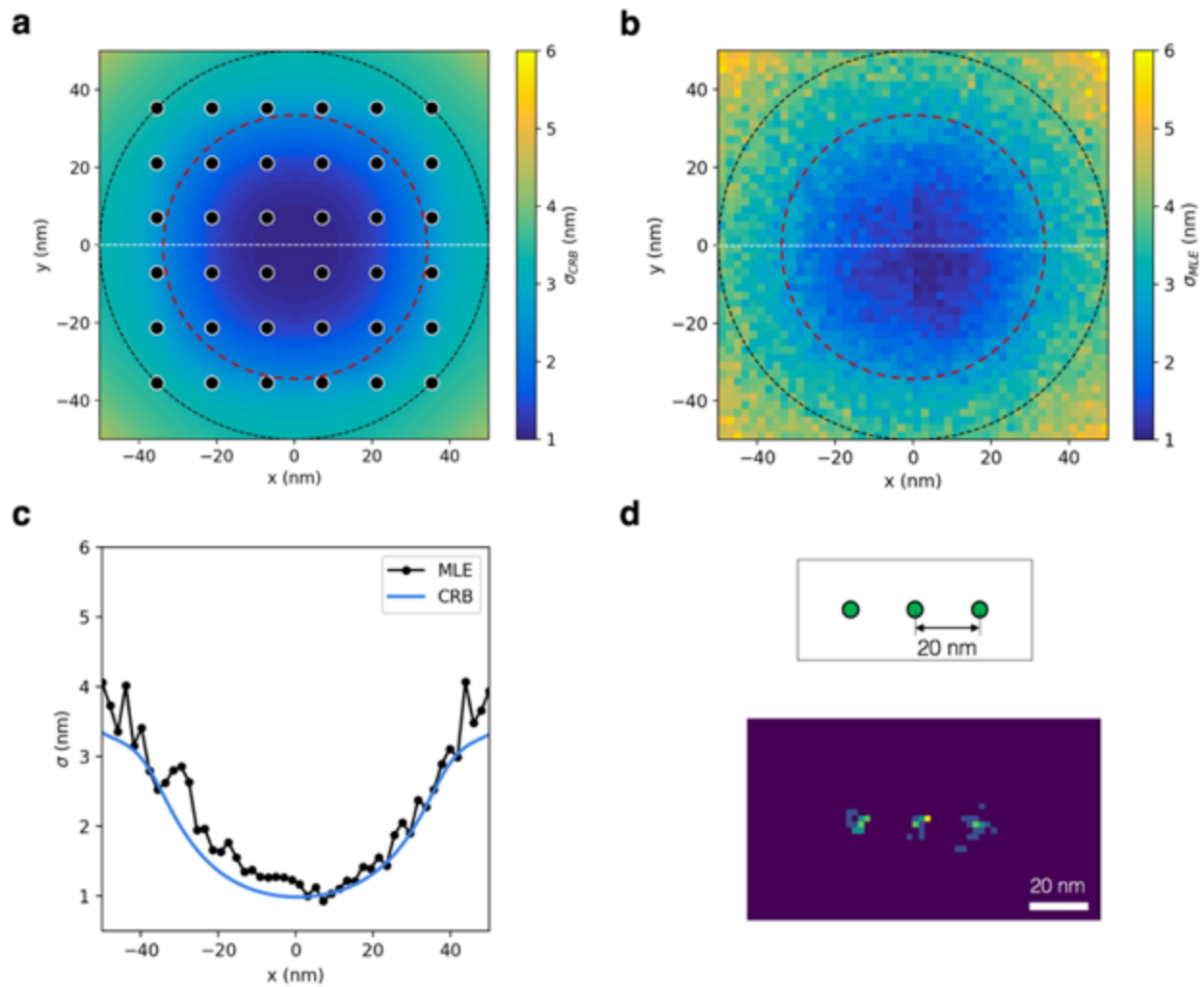


Figura 5.8 Simulaciones RASTMIN. (a) Mapa bidimensional $\sigma_{CRB}(x,y)$ bidimensional. Los puntos negros indican el centro del haz r_i en las exposiciones secuenciales. (b) Mapa bidimensional del error (σ_{MLE}) del MLE. Regiones de diámetro L y $0.75L$ se indican (líneas punteadas negras y rojas respectivamente) en (a) y (b). (c) Perfil unidimensional de la línea punteada blanca indicada en (a) y (b). (d) Simulación de un experimento completo de la cinética de parpadeo de la fluorescencia.

Por último, para evaluar el rendimiento de RASTMIN en la localización de moléculas individuales parpadeantes, modelamos un experimento realista de obtención de imágenes SMLM y lo evaluamos mediante simulaciones de Monte Carlo. La simulación incluyó: i) iluminación secuencial RASTMIN, ii) estadísticas del número total de fotones detectados N que siguen una distribución exponencial $N \sim Exp(\Lambda)$ con Λ el valor esperado. Esta

estadística ha demostrado ser una buena descripción de la fotoconmutación ON/OFF de una molécula individual^{151,157}, iii) número de eventos detectados en estado ON (M) que también sigue una distribución exponencial^{151,157}, iv) un conjunto de emisores separados a distancias predefinidas (d) como sería el caso de una estructura de ADN-origami, v) la incertidumbre introducida por la limitada precisión de la estabilización (σ_{drift}). Los resultados de un conjunto simulado de 3 moléculas separadas por $d = 20$ nm se muestran en la Figura 5.8. Los parámetros de simulación fueron $L = 100$ nm, $K = 6 \times 6$, $SBR = 5$, $\Lambda = 1000$, $M = 20$ y $\sigma_{drift} = 1.0$ nm. Las tres distribuciones de localización presentan desviaciones estándar inferiores a 2 nm, resolviendo completamente la distancia de 20 nm.

5.3 Evaluación de la precisión de RASTMIN con NPs fluorescentes

Para evaluar experimentalmente la precisión de RASTMIN realizamos la siguiente medición:

- i) Una NP fluorescente (40 nm Dark Red Microspheres, Thermofisher) fue localizada repetidamente 1000 veces. La medición completa duró ~ 200 s. El protocolo para la preparación de la muestra se encuentra en la sección 5.3.1
- ii) Se modificó la potencia del láser y se repitió el experimento descrito en i) para obtener otras 1000 localizaciones a diferentes valores de N fotones medios detectados,
- iii) El procedimiento de i-ii) se repitió para diferentes NPs fluorescentes.

Dividimos los datos en subconjuntos i de 50 localizaciones y luego utilizamos la ecuación (4.1) para estimar la precisión de la localización en cada subconjunto (σ_i). La precisión se estima entonces como la $\text{mean}(\{\sigma_i\}) \pm \text{std}(\{\sigma_i\})$ de las precisiones de los subconjuntos de localizaciones. Las precisiones medidas en función de N (media de fotones detectados) se

representan en la Figura 5.9a y los histogramas 2D representativos de las localizaciones se muestran en la Figura 5.9b. Los parámetros RASTMIN fueron $L = 100$ nm, $K = 6 \times 6$ y la relación señal/fondo en el experimento fue $SBR = 20$. Para $N = 300 - 2500$ se consiguen precisiones de localización de $\sigma = 1.2 - 2.6$ nm, similares a las reportadas en MINFLUX y p-MINFLUX.

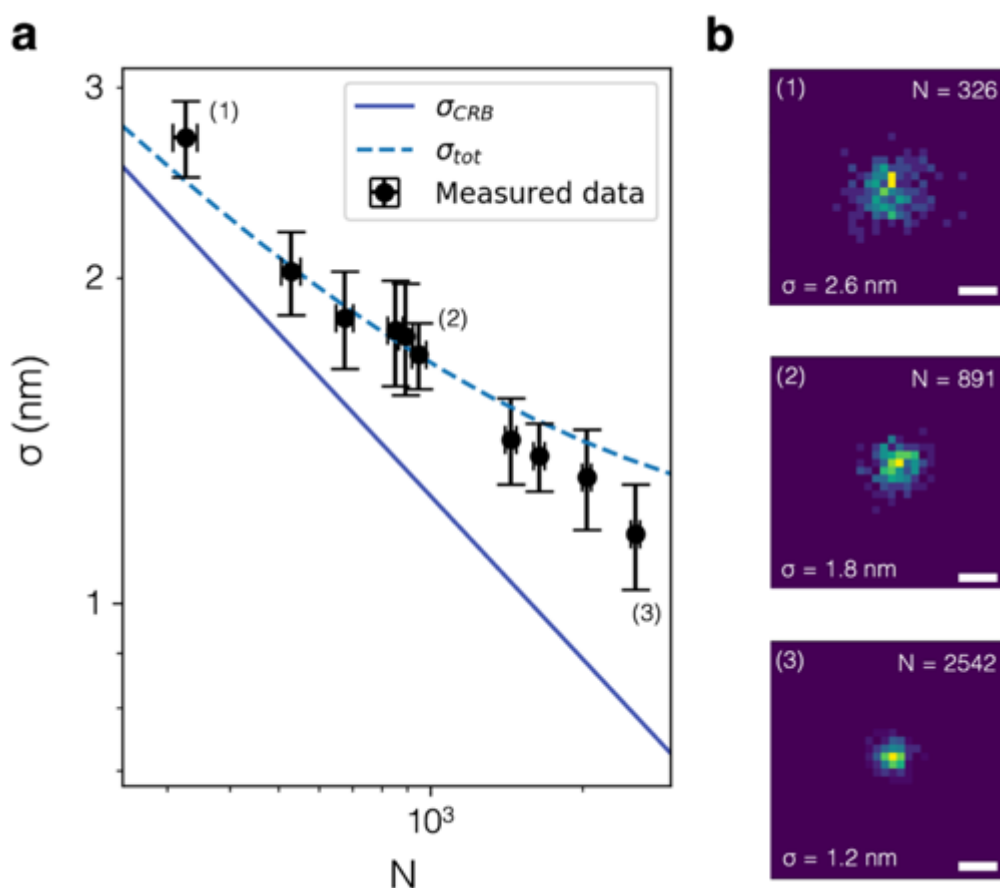


Figura 5.9 Evaluación de la precisión de RASTMIN con NPs fluorescentes. (a) Precisión medida frente a N (media de fotones detectados). Los datos experimentales (puntos negros) se comparan con la precisión máxima teórica σ_{CRB} (azul, línea sólida) y con la precisión esperada teniendo en cuenta la precisión de estabilización σ_{tot} (azul, línea de puntos). (b) Ejemplos de histogramas 2D de las localizaciones para los puntos de datos (1-3) en (a). Barra de escala: 5 nm.

Los datos se comparan con la máxima precisión teórica alcanzable σ_{CRB} (Figura 5.9a, azul, sólido) y se observa una discrepancia con la precisión medida. Esta diferencia puede explicarse si se tiene en cuenta la precisión de estabilización del sistema según la ecuación (5.1). σ_{tot} para $\sigma_{drif} = 1.1$ nm se representa en la figura 5.9a (azul, punteada). Nuestros resultados nos permiten concluir dos hechos importantes. En primer lugar, RASTMIN logra experimentalmente precisiones en el rango de 1 – 2 nm para $N = 500 - 2000$. En segundo lugar, el límite final para alcanzar la precisión de 1 nm será la estabilidad mecánica del sistema, que en nuestro caso se convierte en el cuello de botella en términos de rendimiento.

5.3.1 Preparación de la muestra de NP fluorescente

Para preparar la muestra que contiene las NPs fluorescentes inmovilizadas y las AuNPs utilizamos el siguiente protocolo:

1. Hacer una alícuota de $1:10^3$ y sonicar durante 10 min*.
2. Incubar la cámara de vidrio Labtek® 10 minutos en KOH
3. Limpiar 3 veces con PBS/MQ
4. Incubar 15 minutos con solución de PDDA (0,5M NaCl, dilución 1:200 de PDDA 409030, Sigma Aldrich)
5. Limpiar 3 veces con PBS/MQ
6. Incubar 15 minutos con la NP fluorescente deseada (diluir en MQ a una concentración de $5:10^6$ para una densidad superficial escasa)
7. Limpiar 3 veces con PBS/MQ
8. Incubar 10 minutos con una solución de AuNP 2 pM (NPs esféricas, 60 nm de diámetro)

9. Limpiar 3 veces con PBS/MQ

5.4 Nanoscopía RASTMIN en muestras de origami de ADN

Aplicamos RASTMIN para obtener imágenes de una estructura de ADN-origami que contenía fluoróforos dispuestos en un patrón rectangular, como se muestra en la Figura 5.11a. Los fluoróforos eran Alexa Fluor 647, que son colorantes rojos, adecuados para la localización de moléculas individuales debido a su comportamiento de conmutación estocástica ON/OFF en un buffer reductor^{5,43}. Los detalles de la preparación de la muestra se describen en las secciones 5.4.1 y 5.4.2.

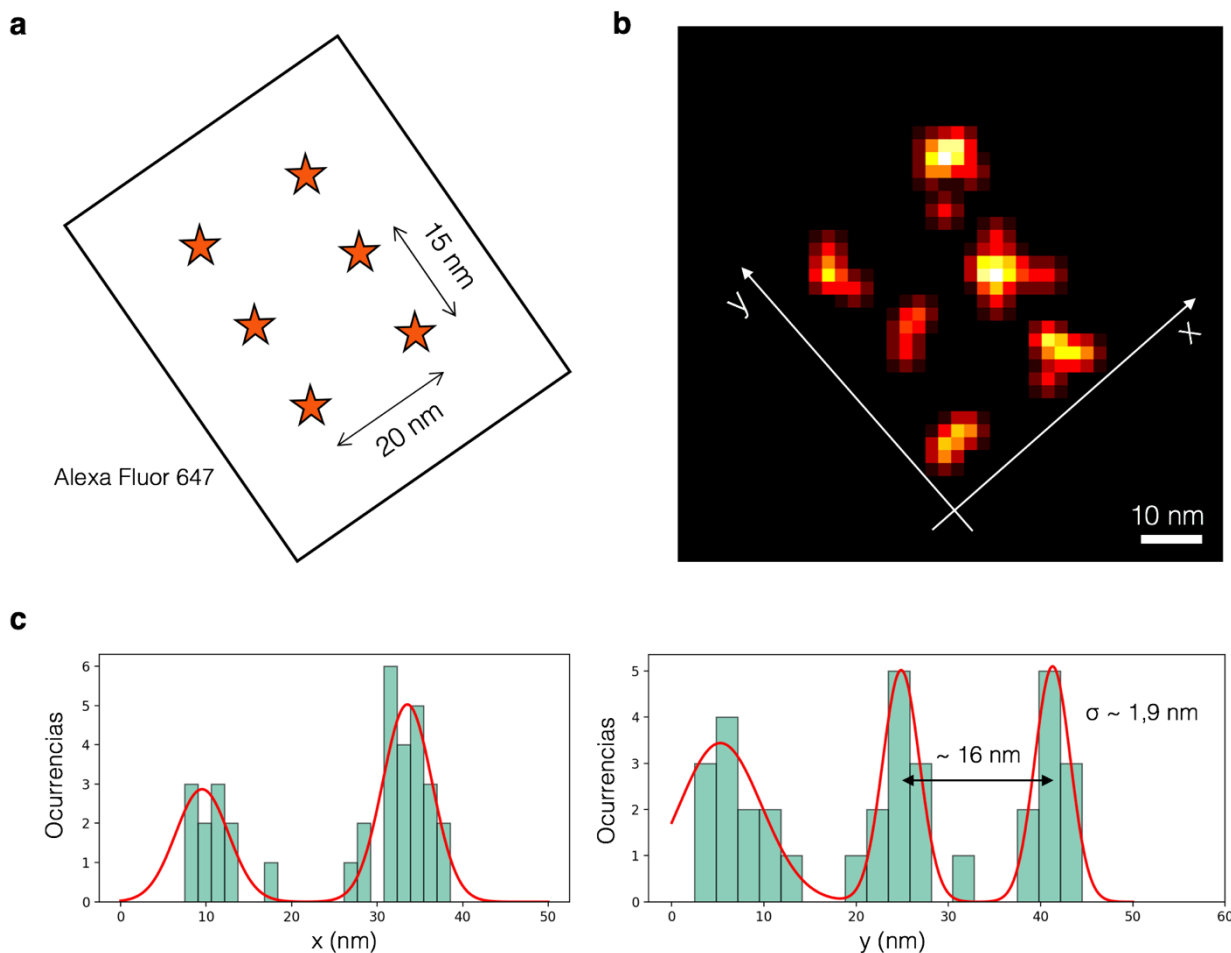


Figure 5.11 RASTMIN nanoscopy on DNA-origami structure. (a) Sketch of the DNA-origami structure used to organize Alexa Fluor 647 molecules with separation distances of 15 nm and 20 nm. (b) An example image of a DNA-origami as depicted in (a) obtained by RASTMIN. The image is reconstructed by computing an average shifted histogram of all localizations¹⁵⁸. Bin size: 2 nm, shifts: 2 (c) 1D histograms of the localizations projected on the axis x and y of (b).

La medición se realizó mediante un procedimiento muy similar al descrito en el capítulo 4, Sección 4.9. En la imagen confocal, de baja potencia (1-5 μW en el BFP) y con difracción limitada, se localiza una única estructura de ADN-origami. A continuación, se aumentó la potencia de excitación (60 μW en el BFP) para inducir la foto-conmutación ON/OFF. Se registró una secuencia de fotogramas RASTMIN, cada fotograma se registra en ~ 20 ms, el tiempo total de medición fue de ~ 6 min.

Los eventos de estado ON se discernieron con un umbral de intensidad de la traza de fluorescencia de la medición. El umbral se fijó en dos desviaciones estándar del ruido de fondo con respecto a la media del fondo, de esta forma el número de falsos positivos es casi nulo a costa de algunos falsos negativos. Los eventos de estado ON con menos de $N = 400$ fotones detectados o con menos de tres fotogramas ON consecutivos fueron descartados. El fotograma inicial y el final del evento fueron descartados ya que probablemente serán una medición RASTMIN incompleta y por lo tanto proporcionarán una falsa localización. Las señales de los eventos válidos de estado ON se analizaron con el enfoque MLE descrito en el Capítulo 3 y se guardó cada localización.

Posteriormente, se reconstruyó una imagen superresuelta calculando un histograma desplazado del promedio de las localizaciones, como se muestra en la Figura 5.11b. La figura 5.11c muestra proyecciones unidimensionales (x e y) de los datos mostrados en la figura 5.11b. La organización de los fluoróforos en el ADN-origami puede resolverse completamente. Consideramos la desviación estándar de la distribución más pequeña de las localizaciones como una medida de la resolución del método, que resulta en una precisión de 2 nm.

Estos primeros experimentos de nanoscopía demuestran que RASTMIN es adecuado para la obtención de imágenes a nanoescala cuando se combina con la cinética de parpadeo adecuada de los tintes fluorescentes, proporcionando precisiones de localización de hasta ~ 2 nm.

5.4.1 DNA-origami sample fabrication

Las secuencias de ADN no modificadas se compraron a Eurofins Genomics (Alemania). En resumen, se mezcló un andamio consistente en un vector derivado del genoma del bacteriófago M13 monocatenario (M13mp18, 7249 bases) y grapas (100 nM, ca. 32 nts) en un buffer 1xTAE (40 mM Tris, 10 mM Acetato, 1 mM EDTA, pH 8) que contenía 12 mM MgCl₂. La solución se calentó a 75 C y se redujo a 25 C a un ritmo de 1 grado cada 20 minutos. Las estructuras de origami de ADN plegadas se purificaron de las hebras de grapas sobrantes mediante electroforesis en gel utilizando un gel de agarosa al 0,8% en un tampón 1x TAE/12 mM MgCl₂ durante 2,5 horas a 4 V/cm. La banda apropiada que contenía la plantilla de ADN objetivo se recortó y se apretó utilizando cubreobjetos envueltos en parafilm.

Se formó una banda de ADN con dimensiones de 60 nm x 40 nm x 5 nm con 6 fluoróforos Alexa Fluor 647 unidos en las posiciones mostradas en la Figura 5.11a mediante la inclusión de grapas modificadas funcionalizadas con el fluoróforo.

5.4.2 DNA-origami sample preparation

To prepare the sample containing the immobilized fluorescent NPs and the AuNPs we used the following protocol:

1. Incubate Labtek® glass chamber 10 min in KOH
2. Clean 3x with PBS/MQ
3. Incubate 15 min with BSA-biotin
4. Clean 3x with PBS/MQ
5. Incubate 15 min with neutrovidin
6. Clean 3x with PBS/MQ
7. Incubate 10 min with 2 pM AuNP solution (spherical NPs, 60 nm diameter)
8. Clean 5x with TAE12
9. Incubate DNA-origami at the desired concentration (typically 10-100 pM)
10. Right before imaging, put the “STORM” buffer: pH 8, 50 mM TRIS (Sigma Aldrich), 10 mM NaCl, 10% w/v D-glucose (Biopack), 10 mM mercaptoethylamine (Sigma Aldrich), 0.5 mg/mL glucose oxidase (Sigma Aldrich), and 40 ug/mL catalase (Sigma Aldrich).

5.5 Conclusiones y perspectivas

El concepto de RASTMIN ya fue presentado y discutido teóricamente en el Capítulo 3. Aquí, hemos presentado su primera realización experimental confirmando que puede ofrecer ~ 1 nm precisión de localización con un número moderado de fotones. Esta primera implementación experimental de RASTMIN se realizó en un microscopio confocal de barrido con unas pocas modificaciones necesarias, a saber, la ingeniería de un foco toroidal (en forma de rosquilla) y la inclusión de un sistema de estabilización de alto rendimiento. Se ha demostrado que la precisión de este último se convertirá en el límite definitivo para alcanzar resoluciones en el rango 1 – 5 nm.

Se ha descrito un sistema de estabilización original, compacto y robusto y se ha caracterizado su rendimiento. Mostramos precisiones de estabilización de 1.2 nm ($\sigma_{drift\ x,y}$) para el lateral y 1.7 nm ($\sigma_{drift\ z}$) para la dirección axial. También se ha caracterizado por completo el escáner óptico y el foco en forma de rosquilla del microscopio.

Hemos realizado cálculos y simulaciones de la precisión de la localización RASTMIN y también experimentos completos que combinan las localizaciones de una molécula individual con la dinámica fotofísica simulada. Nuestros resultados sirven de guía para diseñar futuros experimentos de nanoscopía RASTMIN. Estos experimentos ya están planificados y se realizarán a corto plazo.

Además, hemos mostrado los primeros resultados experimentales en muestras de calibración. Hemos evaluado la precisión de RASTMIN en nanopartículas fluorescentes, mostrando que precisión de $\sim 1 - 2$ nm puede obtenerse efectivamente de forma experimental con $N = 500 - 2000$ fotones detectados. Finalmente, demostramos los primeros resultados de RASTMIN en nanoscopía obteniendo imágenes de origamis de ADN con moléculas fluorescentes. Demostramos una precisión de ~ 2 nm y la localización de las moléculas están en acuerdo con los parámetros de diseño de la nanoestructura. Los resultados experimentales, junto con las simulaciones, mostraron que la precisión de localización de nuestras mediciones estaba limitada por la estabilidad mecánica del sistema, lo que pone de manifiesto la importancia de un sistema de estabilización de alto rendimiento para todas las técnicas de nanoscopía que tienen como objetivo una resolución mejor a 10 nm, especialmente en el rango más exigente 1 - 3 nm rango.

RASTMIN puede alcanzar precisiones de localización tan altas o incluso más altas que MINFLUX. Experimentalmente, las implementaciones originales⁵⁹ y comerciales⁶⁷ de MINFLUX utilizan i) deflectores electro-ópticos acoplados a un escáner galvanométrico posterior y una rutina de escaneo muy especializada ii) Electrónica especializada en tiempo real basada en FPGA para controlar las mediciones iii) Software de código cerrado tanto para controlar el hardware como para analizar los datos. Además, los métodos de OT, incluido el SMCT, se han implementado en configuraciones especializadas hechas a medida

y construidas por expertos en óptica. Aunque el p-MINFLUX (Capítulo 4) simplifica considerablemente las mediciones de precisión de 1 nm, observamos que para construir una configuración de este tipo se necesita hardware especializado y experiencia, especialmente en el campo de la TCSPC confocal.

En cambio, RASTMIN sólo necesita: i) un escaneo óptico de trama estándar que puede implementarse en muchos sistemas confocales de escaneo láser ya disponibles, ii) una placa de adquisición DAC estándar y un software de código abierto (véase el Capítulo 3) para analizar los datos, iii) un sistema de estabilización que logre una precisión mejor que la precisión de localización esperada (requisito común a todas las técnicas SML-SSI). Por lo tanto, creemos que RASTMIN tiene un gran potencial para ser implementado en muchos sistemas confocales, haciendo que la resolución a escala de 1 nm esté disponible para una comunidad mucho más amplia y, finalmente, sea aplicable a una amplia gama de cuestiones biológicas.

Capítulo 6 – Conclusiones generales y perspectivas

El objetivo principal del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral fue ampliar las fronteras de la nanoscopía óptica en términos de resolución espacio-temporal. En el Capítulo 1 se revisaron los conceptos fundamentales de la microscopía de fluorescencia y la nanoscopía y se resumió el estado del arte de los métodos de superresolución. Durante el desarrollo de este trabajo, surgieron nuevos métodos que alcanzan la escala de resolución de 1 – 10 nm. Se revisaron las diferentes estrategias, prestando especial atención a las técnicas basadas en la localización de una molécula individual mediante iluminación estructurada, como MINFLUX y métodos relacionados..

En el Capítulo 2, se presentó una nueva implementación paralelizada de RESOLFT que ofrece confocalidad y, por tanto, una mayor sensibilidad. El método llamado MoNaLISA, ofrece la mejor combinación reportada de campo de visión y resolución espacio-temporal en microscopía de células vivas al momento de escribir esta tesis: 50 nm de resolución lateral y tiempos de adquisición de 1 s para la obtención de imágenes de células enteras. Tras su publicación en 2018, se han desarrollado nuevas mejoras y aplicaciones que incluyen la ampliación de la resolución 3D por debajo de los 100 nm, la combinación con rsFP rojas y los estudios biológicos de la actividad neuronal. Otra serie de mejoras como por ejemplo las adquisiciones de imágenes a varios colores, los campos de visión más amplios ($> 200 \times 200 \mu\text{m}^2$) y combinaciones con métodos de moléculas individuales se están investigando actualmente.

En el Capítulo 3, demostramos que la mayoría de las técnicas recientemente reportadas que logran 1 – 10 nm de resolución (excepto DNA-PAINT) pueden considerarse expresiones particulares de un concepto común de localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial (SML-SSI). A primera vista, debido a las diferencias en la estructura de la luz de excitación, la instrumentación, los protocolos de

medición y los métodos de análisis de datos, cada uno de estos métodos puede parecer único. Sin embargo, sus profundas similitudes se hacen evidentes con el marco conceptual y matemático presentado en el Capítulo 3, que también permite una evaluación comparativa justa entre los métodos. Además, identificamos nuevos métodos de localización de moléculas individuales que combinan los puntos fuertes de las técnicas disponibles. Creemos que este marco común ayudará a la comunidad a diseñar mejores y optimizados métodos SML-SSI. Además, dado que el enfoque está formulado en términos de la bien establecida teoría de Estimación de Máxima Verosimilitud, debería ser fácil extenderlo o adaptarlo para ser aplicado en otras cuestiones científicas que podrían parecer distantes pero que en realidad utilizan enfoques matemáticos muy similares. Por ejemplo, la deconvolución de imágenes o los enfoques basados en el aprendizaje automático podrían implementarse en SML-SSI rediseñando la función de verosimilitud del modelo.

En el Capítulo 4, se presentó una implementación novedosa y simplificada del concepto de localización MINFLUX. A diferencia de la implementación original, p-MINFLUX utiliza pulsos láser intercalados para iluminar con los focos de excitación en forma toroidal a una tasa de repetición máxima, generando así un barrido efectivo de los mínimos de luz en la escala de los nanosegundos. Demostramos su desempeño para la nanoscopía de localización y el seguimiento de moléculas individuales en nanoestructuras de origami de ADN. La precisión de la localización de 1 – 2 nm se logró con 2000 – 1000 fotones detectados en ambas aplicaciones. Además, p-MINFLUX proporciona acceso al tiempo de vida de la fluorescencia. Esta información se aplicó para adquirir señales multiplexadas discernidas por el tiempo de vida y para realizar microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) con una resolución de 3-4 nm (precisión de localización de 1-2 nm). En el momento de escribir esta Tesis, ésta es la mayor resolución alcanzada en imágenes de vida de fluorescencia (FLIM) de superresolución, mejorando la resolución en más de un orden de magnitud en comparación con trabajos anteriores. Toda la instrumentación y el análisis de datos necesarios para p-MINFLUX se escribieron en el lenguaje de programación Python y están disponibles de forma abierta. Gracias a este enfoque de código abierto, junto con la reducida complejidad de la configuración, prevemos que p-MINFLUX será más fácilmente adoptado y reproducido en otros laboratorios.

p-MINFLUX constituye una nueva herramienta analítica que combina la resolución espacial a escala molecular con las mediciones del tiempo de vida de fluorescencia, lo que puede ser útil no sólo para la localización ultraprecisa de moléculas individuales y nanoscopía, sino también para nuevas mediciones de transferencia de energía de moléculas individuales, como la transferencia de energía inducida por FRET, metal o grafeno. Además, p-MINFLUX es único entre los métodos de localización de moléculas individuales porque puede alcanzar el límite de resolución temporal absoluta que impone la tasa de emisión del emisor. Aparte de las aplicaciones en el seguimiento ultrarrápido de moléculas fluorescentes, creemos que p-MINFLUX puede convertirse en el método de elección para el seguimiento de pequeñas ($\sim 10 - 20$ nm) partículas metálicas o fluorescentes. Las NP metálicas son especialmente interesantes ya que su fotoluminiscencia presenta tasas de emisión muy altas y tiempos de vida muy cortos, lo que permite optimizar la velocidad del p-MINFLUX hasta el límite planteado por la tecnología de los detectores de conteo de fotones.

El Capítulo 5 presenta la primera implementación experimental de RASTMIN, un método SML-SSI propuesto teóricamente en el Capítulo 3. La evaluación de la precisión de la localización utilizando nanopartículas fluorescentes muestra que RASTMIN puede ofrecer $1 - 2$ nm precisión con $N = 500 - 2000$ fotones detectados. Finalmente, demostramos los primeros resultados de RASTMIN en nanoscopía obteniendo imágenes de origamis de ADN con moléculas fluorescentes. Demostramos una precisión de ~ 2 nm y la localización de las moléculas están en acuerdo con los parámetros de diseño de la nanoestructura. Se están llevando a cabo más experimentos con nanoestructuras de origami de ADN y muestras biológicas para desarrollar protocolos de aplicación de este enfoque a la obtención de imágenes biológicas.

RASTMIN se implementó en un microscopio confocal de barrido de haz con unas pocas modificaciones, a saber, la ingeniería de un foco toroidal y la inclusión de un sistema de estabilización de alto rendimiento. Debido a su relativa simplicidad, creemos que RASTMIN tiene un gran potencial para ser implementado en muchos sistemas confocales,

haciendo que la resolución a escala de 1 nm esté disponible para una comunidad mucho más amplia y sea finalmente aplicable a una amplia gama de preguntas biológicas.

Una combinación de un método SML-SSI robusto como RASTMIN junto con un enfoque RESOLFT paralelizado como MoNaLISA podría implementarse mediante el uso de una activación multifocal combinada con una excitación de barrido usando una matriz de focos toroidales. De este modo, se puede generar el parpadeo de una molécula individual y localizar el emisor en una medición RASTMIN altamente paralelizada. Este enfoque, en sinergia con la rsFP de conmutación rápida, podría ser un fuerte candidato para la nanoscopía de células vivas con resoluciones espacio-temporales de 1 – 10 nm y ~ 1 s en células enteras de tamaño *FOVs*.

Finalmente, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado herramientas tanto experimentales como teóricas para avanzar en los límites actuales de la nanoscopía de fluorescencia óptica. Se ha hecho hincapié en diseños más sencillos sin sacrificar el rendimiento y en implementaciones de código abierto, con el objetivo de facilitar una mayor difusión de la nanoscopía de fluorescencia con resolución molecular. Esperamos que los conceptos y métodos experimentales presentados en esta Tesis sean adoptados por muchos investigadores y laboratorios, y que sirvan de disparador de nuevas ideas y descubrimientos.

Agradecimientos

Primeramente, estoy muy agradecido de haber recibido una educación pública, gratuita y de excelencia. Renuevo mi compromiso de defenderla y contribuir desde todos los lugares que pueda.

Durante el Doctorado tuve la oportunidad de cursar la materia de Métodos Estadísticos, dictada por Ricardo Piegai y Darío Rodrigues Ferreira Maltez. Este curso impactó en mi manera de ver los problemas científicos y me aportó herramientas decisivas para poder llevar a cabo la investigación de esta Tesis.

Ilaria no sólo me enseñó una infinidad de conceptos de óptica, fotofísica y súper resolución, me enseñó cómo se trabaja con pasión, tenacidad y sobre todo disfrutando del increíble trabajo que es hacer ciencia. Me mostró, a través del ejemplo, cómo es un ambiente científico de excelencia con calidad humana, empatía y compañerismo. Ilaria confió en mí, me dio la libertad y el apoyo que me permitieron aprender tanto.

La ciencia se hace en equipo y así es como trabajé durante estos casi cinco años y medio. En Estocolmo, Andreas, Fra y Gio, los *Monalisers*, fueron un equipo inmejorable, no sólo tuve el privilegio de trabajar y aprender con grandes científicos y científicas sino que también terminaron siendo grandes amigos y amigas.

Durante el Doctorado tuve la oportunidad de participar de la colaboración excelente con el grupo de Philip Tinnefeld. Fue un trabajo intenso, enriquecedor y fructífero con Florian, Jonas, Philip y el resto del grupo. Les agradezco por recibirme con tanta calidez.

Quiero agradecer también a quienes desinteresadamente me ayudaron de una o más maneras. Sin ellos este recorrido no hubiera sido posible. En particular quiero agradecer a Hernán Grecco por las charlas sobre instrumentación y control y a Andrew York por las charlas sobre deconvolución de imágenes y problemas inversos.

Fernando es definitivamente un gran director de Tesis. Me enseñó a hacer ciencia con profundidad, rigurosidad y espíritu crítico. De las discusiones de ideas, el laboratorio, las presentaciones, las reuniones, los análisis, la escritura de artículos y de esta Tesis me llevo infinidad de conocimientos y una formación de la cual estoy muy agradecido. Como director siempre me dio la libertad necesaria para desarrollar mis ideas y el apoyo constante para llevarlas a cabo, especialmente en los momentos más difíciles. Estoy muy agradecido por todo.

El grupo de Nanofísica Aplicada es un grupo de trabajo hermoso. Aprendí muchísimo de todos y todas, a nivel científico y humano. Con Fede di los primeros pasos, me enseñó muchísimo con paciencia y generosidad. Más adelante, Lu y Alan fueron y son compañeros de equipo increíbles con quienes aprendo, disfruto de hacer ciencia y también me divierto todos los días. Iani sintetizó las nanopartículas de oro que se usaron en esta Tesis, me enseñó química y me ayudó innumerables veces a interpretar resultados y a pensar alternativas cuando no sabía por dónde seguir. Juli es como un hermano mayor, siempre tirando la posta, de plasmónica, de fotoluminiscencia y de la vida. Chechu fue mi compañera de Doctorado desde el primer día, nos reímos, aprendimos y nos bancamos mutuamente, en las buenas y también en las malas. Marian es capaz de dejar todo por dar una mano, con humildad y paciencia te explica todo lo que sabe, y sabe mucho. Con él aprendí sobre electrónica y conversores analógico/digitales. De enseñarle yo al principio algunas cosas, LPM se convirtió en la gurú de Python y terminé aprendiendo yo de ella. Santi es pura solidaridad, mi biólogo de referencia, se nota su espíritu docente para

explicarle las cosas más básicas a un físico. Con todos y todas compartimos mates, churros, birras, asados, discusiones de ciencia, política científica y siempre, pero siempre estuvieron ahí para dar una mano con el tema que fuera, en cualquier momento. Con la nueva generación, Gonza, Flor C, Flor E, Romi, Vale, Mariano, Ale nos conocemos más que nada virtualmente, pero también siempre están para dar una mano y estoy seguro que los que se quedan van a mantener esta manera de trabajar fundada en la generosidad. A todos y todas, gracias por tanto.

Me tocó trabajar codo a codo con estudiantes de Master/Licenciatura. Tuve la suerte de trabajar con dos personas absolutamente brillantes como son Lars y Fer. Con Lars aprendimos juntos a pensar problemas experimentales y a estudiar óptica en verdadera profundidad. Con Fer nos adaptamos a este 2020-2021 que nos tocó vivir e hicimos un camino tan alternativo como interesante y enriquecedor.

Le agradezco a toda la comunidad del CIBION, a Pedro, a los becarios y becarias y también a la gente de limpieza y seguridad, entre todos y todas se genera un ambiente de trabajo excelente donde da gusto estar y que se extraña en estos momentos de pandemia y virtualidad.

Mis amigos y amigas de la facu y de toda la vida fueron un apoyo constante. Juan, Lu, Guido, Mati, Memi, Fiore, Agus, Sol, Marto, Javi son algunos de los que escucharon, me acompañaron, me aconsejaron.

No conozco a nadie tan apasionado como Waso para charlar durante tardes y noches enteras (birras mediante) de electromagnetismo, nanociencia, microscopios, sistemas eléctricos, política científica e internacional y viajes intergalácticos. Gracias por escuchar (y entender todo increíblemente rápido), por compartir la pasión por la ciencia, por estar siempre de principio a fin de este Doctorado.

Mi familia es siempre un pilar fundamental. Mi prima Vale, con la que compartimos la pasión por las ciencias naturales y la docencia, mis primos Ale, Julio, Julia, Mariano, mis sobrinos Martín, Delfi, Nachito. Mi tía Angelita, que va a estar siempre, mi tío Cacho, mi tía Lu. Mis tías Tatá y Marcela.

Mis abuelos Cocó y Lula son para mí un ejemplo de vida. Les agradezco con el alma su amor infinito.

Les agradezco por todo a Maxi y Ana, siempre escuchando, siempre bancando, siempre y en todo. Olivia y Matteo son los sobrinos más lindos del mundo, gracias por el cariño y por ser personas tan hermosas.

De papá y mamá surge mi pasión por el conocimiento, desde que tengo memoria. Los veo siempre reflejados en mí, en mis gestos, en mi trabajo, en todo. Estoy infinitamente agradecido. Los quiero muchísimo.

Vicky es la mejor compañera que existe. Del amor y de la vida. Gracias por estos años compartidos y por todo lo que se viene.

Publicaciones derivadas de esta Tesis

- 2021** L. A. Masullo, A. M. Szalai, L. F. López, M. Pilo-Pais, S. A. Giusti, D. Refojo, G. Acuña, F. D. Stefani
8 "Localización de moléculas individuales con precisión a escala molecular mediante la exploración de un mínimo de luz"
En preparación
- F. Caprile, L. A. Masullo, F. D. Stefani
7 "pyFocus" - un paquete de Python para cálculos vectoriales de campos ópticos enfocados en condiciones realistas. Aplicación a focos toroidales. "
Enviado, en revisión
- L. A. Masullo, A. M Szalai, F. D. Stefani
6 "Microscopía de fluorescencia de superresolución a una resolución inferior a 10 nm (review)"
Enviado, en revisión
- L. A. Masullo, L. F. López, F. D. Stefani
5 "Un marco matemático común para la localización de moléculas individuales mediante iluminación estructurada secuencial"
En revisión - preprint: arXiv:2109.01234
- 2020** L. A. Masullo, F. Steiner, J. Zähringer, L. F. López, J. Bohlen, L. Richter, F. Cole, P. Tinnefeld, F. D. Stefani
4 "MINFLUX pulsado intercalado"
Nano Letters **21**, 1, 840-846 (2020)
- 2018** L. A. Masullo, A. Bodén, F. Pennacchietti, G. Coceano, M. Ratz, I. Testa
3 " Una mayor captación de fotones permite la nanoscopía de fluorescencia cuatridimensional de sistemas vivos"
Nature Communications **9**, 3281 (2018)
- N. Unsain, M. D. Bordenave, S. Jalil, G. Martínez, C. von Binderling, F. M. Barabas, L. A. Masullo, A. D. Johnstone, P. A. Barker, M. Bisbal, F. D. Stefani, A. O. Cáceres
2 "Remodelación del esqueleto periódico asociado a la membrana de actina/espectrina, colapso del cono de crecimiento y disminución de la actina filamentosa durante la degeneración axonal"
Scientific Reports **8**, 3007 (2018)

- 2017 F. M. Barabas, **L. A. Masullo**, M. D. Bordenave, S. Giusti, N. Unsain, D. Refojo, A. Cáceres, F. D. Stefani
- 1 "Cuantificación automatizada de nanoestructuras periódicas de proteínas en imágenes de nanoscopía de fluorescencia: abundancia y regularidad del esqueleto neuronal asociado a la membrana de la espectrina"
Scientific Reports **7**, 16029 (2017)

Referencias

- (1) Pawley, J. B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; 2006.
- (2) Lakowicz, J. R. *General Features of Protein Fluorescence*; 2006.
- (3) Atkins, P. *Physical Chemistry*, 11^a ed.; 2017.
- (4) Bernard, J.; Fleury, L.; Talon, H.; Orrit, M. Photon Bunching in the Fluorescence from Single Molecules: A Probe for Intersystem Crossing. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (2), 850-859. <https://doi.org/10.1063/1.464249>.
- (5) Heilemann, M.; Margeat, E.; Kasper, R.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3801-3806. <https://doi.org/10.1021/ja044686x>.
- (6) Andresen, M.; Wahl, M. C.; Stiel, A. C.; Gräter, F.; Schäfer, L. V.; Trowitzsch, S.; Weber, G.; Eggeling, C.; Grubmüller, H.; Hell, S. W.; Jakobs, S. Structure and Mechanism of the Reversible Photoswitch of a Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (37), 13070-13074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502772102>.
- (7) Minsky, M. Aparato de Microscopía. Google Patents 19 de diciembre de 1961.
- (8) De Wilde, Y.; Lemoine, P. A. Review of NSOM Microscopy for Materials. *AIP Conf. Proc.* **2007**, *931* (septiembre), 43-52. <https://doi.org/10.1063/1.2799414>.
- (9) Betzig, E.; Chichester, R. J.; Lanni, F.; Taylor, D. L. Near-field Fluorescence Imaging of Cytoskeletal Actin. *Bioimaging* **1993**, *1* (3), 129-135. [https://doi.org/10.1002/1361-6374\(199309\)1:3<129::AID-BIO1>3.3.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1361-6374(199309)1:3<129::AID-BIO1>3.3.CO;2-#).
- (10) Lewis, A.; Radko, A.; Ami, N. Ben; Palanker, D.; Lieberman, K. Near-Field Scanning Optical Microscopy in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* **1999**, *9* (2), 70-73. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01437-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01437-8).
- (11) Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science (80-)*. **1990**, *248* (4951), 73 LP - 76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>.
- (12) Tsien, R. Y. LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67* (1), 509-544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.
- (13) Harper, B. K.; Mabon, S. A.; Leffel, S. M.; Halfhill, M. D.; Richards, H. A.; Moyer, K. A.; Stewart, C. N. Green Fluorescent Protein as a Marker for Expression of a Second Gene in Transgenic Plants. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (11), 1125-1129. <https://doi.org/10.1038/15114>.
- (14) Moerner, W. E.; Kador, L. Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid. *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62* (21), 2535-2538.

- <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.2535>.
- (15) Orrit, M.; Bernard, J. Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a P-Terphenyl Crystal. *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *65* (21), 2716-2719. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.65.2716>.
 - (16) Hell, S. W. Toward Fluorescence Nanoscopy. *Nat Biotech* **2003**, *21* (11), 1347-1355.
 - (17) Sahl, S. J.; Hell, S. W.; Jakobs, S. Fluorescence Nanoscopy in Cell Biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (11), 685-701. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.71>.
 - (18) Hell, S. W.; Wichmann, J. Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* **1994**, *19* (11), 780. <https://doi.org/10.1364/ol.19.000780>.
 - (19) Klar, T.; Hell, S. W. Subdiffraction Resolution in Far-Field Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* **1999**, *24* (14), 954-956.
 - (20) Bretschneider, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy by Optical Shelving. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98* (21), 1-4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.218103>.
 - (21) Heintzmann, R.; Jovin, T. M.; Cremer, C. Saturated Patterned Excitation Microscopy—a Concept for Optical Resolution Improvement. *J. Opt. Soc. Am. A* **2002**, *19* (8), 1599. <https://doi.org/10.1364/josaa.19.001599>.
 - (22) Gustafsson, M. G. L. Nonlinear Structured-Illumination Microscopy: Wide-Field Fluorescence Imaging with Theoretically Unlimited Resolution. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (37), 13081-13086. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406877102>.
 - (23) Winter, F. R.; Loidolt, M.; Westphal, V.; Butkevich, A. N.; Gregor, C.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. Nanoscopia multicolor de células fijas y vivas con un único haz STED y detección hiperespectral. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (marzo), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep46492>.
 - (24) WILDANGER, D.; MEDDA, R.; KASTRUP, L.; HELL, S. W. A Compact STED Microscope Providing 3D Nanoscale Resolution. *J. Microsc.* **2009**, *236* (1), 35-43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03188.x>.
 - (25) Staudt, T.; Engler, A.; Rittweger, E.; Harke, B.; Engelhardt, J.; Hell, S. W. Nanoscopia óptica de campo lejano con un número reducido de ciclos de transición de estado. *Opt. Express* **2011**, *19* (6), 5644. <https://doi.org/10.1364/oe.19.005644>.
 - (26) Heine, J.; Reuss, M.; Harke, B.; D'Este, E.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. Adaptive-Illumination STED Nanoscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (37), 9797-9802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708304114>.
 - (27) Gould, T. J.; Burke, D.; Bewersdorf, J.; Booth, M. J. La óptica adaptativa permite la microscopia STED 3D en muestras aberrantes. *Opt. Express* **2012**, *20* (19), 20998. <https://doi.org/10.1364/oe.20.020998>.
 - (28) Szalai, A. M.; Siarry, B.; Lukin, J.; Giusti, S.; Unsain, N.; Cáceres, A.; Steiner, F.;

- Tinnefeld, P.; Refojo, D.; Jovin, T. M.; Stefani, F. D. Super-Resolution Imaging of Energy Transfer by Intensity-Based STED-FRET. *Nano Lett.* **2021**.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c00158>.
- (29) Jahr, W.; Velicky, P.; Danzl, J. G. Strategies to Maximize Performance in Stimulated Emission Depletion (STED) Nanoscopy of Biological Specimens. *Methods* **2020**, *174* (julio), 27-41. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.019>.
- (30) Willig, K. I.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Jahn, R.; Hell, S. W. STED Microscopy Reveals That Synaptotagmin Remains Clustered after Synaptic Vesicle Exocytosis. *Nature* **2006**, *440* (7086), 935-939.
<https://doi.org/10.1038/nature04592>.
- (31) Unsain, N.; Bordenave, M. D.; Martinez, G. F.; Jalil, S.; Von Bilderling, C.; Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Johnstone, A. D.; Barker, P. A.; Bisbal, M.; Stefani, F. D.; Cáceres, A. O. Remodelación del esqueleto periódico asociado a la membrana de actina/espectrina, colapso del cono de crecimiento y disminución de la F-actina durante la degeneración axonal. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21232-0>.
- (32) Unsain, N.; Bordenave, M. D.; Martinez, G. F.; Jalil, S.; von Bilderling, C.; Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Johnstone, A. D.; Barker, P. A.; Bisbal, M.; Stefani, F. D.; Cáceres, A. O. Remodelación del esqueleto periódico asociado a la membrana de actina/espectrina, colapso del cono de crecimiento y disminución de la F-actina durante la degeneración axonal. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 3007.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21232-0>.
- (33) Hofmann, M.; Eggeling, C.; Jakobs, S.; Hell, S. W. Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy at Low Light Intensities by Using Reversibly Photoswitchable Proteins. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (49), 17565-17569.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506010102>.
- (34) Grotjohann, T.; Testa, I.; Leutenegger, M.; Bock, H.; Urban, N. T.; Lavoie-Cardinal, F.; Willig, K. I.; Eggeling, C.; Jakobs, S.; Hell, S. W. Diffraction-Unlimited All-Optical Imaging and Writing with a Photochromic GFP. *Nature* **2011**, *478* (7368), 204-208.
- (35) Westphal, V.; Rizzoli, S. O.; Lauterbach, M. A.; Kamin, D.; Jahn, R.; Hell, S. W. Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement. *Science* (80-.). **2008**, *320* (5873), 246-249.
<https://doi.org/10.1126/science.1154228>.
- (36) Thompson, R. E.; Larson, D. R.; Webb, W. W. Análisis preciso de localización nanométrica para sondas fluorescentes individuales. *Biophys. J.* **2002**, *82* (5), 2775-2783. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75618-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75618-X).
- (37) Huang, B.; Wang, W.; Bates, M.; Zhuang, X. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science* **2008**, *319* (5864), 810-813. <https://doi.org/10.1126/science.1153529>.

- (38) Pavani, S. R. P.; Thompson, M. A.; Biteen, J. S.; Lord, S. J.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Piestun, R.; Moerner, W. E. Three-Dimensional, Single-Molecule Fluorescence Imaging beyond the Diffraction Limit by Using a Double-Helix Point Spread Function. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (9), 2995-2999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900245106>.
- (39) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science (80-.)*. **2006**, *313* (5793), 1642-1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.
- (40) Hess, S. T.; Girirajan, T. P. K.; Mason, M. D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.* **2006**, *91* (11), 4258-4272. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
- (41) Fölling, J.; Bossi, M.; Bock, H.; Medda, R.; Wurm, C. a; Hein, B.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. Fluorescence Nanoscopy by Ground-State Depletion and Single-Molecule Return. *Nat. Methods* **2008**, *5* (11), 943-945. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1257>.
- (42) Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Nat. Methods* **2006**, *3* (10). <https://doi.org/10.1038/NMETH929>.
- (43) Heilemann, M.; van de Linde, S.; Schüttpelez, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M. Imágenes de fluorescencia de subdifracción-resolución con sondas fluorescentes convencionales. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47* (33), 6172-6176. <https://doi.org/10.1002/anie.200802376>.
- (44) Sharonov, A.; Hochstrasser, R. M. Wide-Field Subdiffraction Imaging by Accumulated Binding of Diffusing Probes. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (50), 18911-18916. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104>.
- (45) Jungmann, R.; Steinhauer, C.; Scheible, M.; Kuzyk, A.; Tinnefeld, P.; Simmel, F. C. Cinética de una molécula individual y microscopía de superresolución mediante imágenes de fluorescencia de la unión transitoria en el origami de ADN. *Nano Lett.* **2010**, *10* (11), 4756-4761. <https://doi.org/10.1021/nl103427w>.
- (46) Jiménez, A.; Friedl, K.; Leterrier, C. Sobre las muestras, dando ejemplos: Microscopía optimizada de localización de una molécula individual. *Methods* **2020**, *174* (marzo), 100-114. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.008>.
- (47) Mortensen, K. I.; Churchman, L. S.; Spudich, J. a; Flyvbjerg, H. Optimized Localization Analysis for Single-Molecule Tracking and Super-Resolution Microscopy. *Nat. Methods* **2010**, *7* (5), 377-381. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1447>.
- (48) Holm, T.; Klein, T.; Löschberger, A.; Klamp, T.; Wiebusch, G.; Van De Linde, S.; Sauer, M. A Blueprint for Cost-Efficient Localization Microscopy. *ChemPhysChem* **2014**, *15* (4), 651-654. <https://doi.org/10.1002/cphc.201300739>.

- (49) Ma, H.; Fu, R.; Xu, J.; Liu, Y. A Simple and Cost-Effective Setup for Super-Resolution Localization Microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01606-6>.
- (50) Auer, A.; Schlichthaerle, T.; Woehrstein, J. B.; Schueder, F.; Strauss, M. T.; Grabmayr, H.; Jungmann, R. Nanometer-Scale Multiplexed Super-Resolution Imaging with an Economic 3D-DNA-PAINT Microscope. *ChemPhysChem* **2018**, *19* (22), 3024-3034. <https://doi.org/10.1002/cphc.201800630>.
- (51) Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Bordenave, M. D.; A. Giusti, S.; Unsain, N.; Refojo, D.; Cáceres, A.; Stefani, F. D. Cuantificación automatizada de nanoestructuras periódicas de proteínas en imágenes de nanoscopía de fluorescencia: Abundancia y Regularidad del Esqueleto Asociado a la Membrana de la Espectrina Neuronal. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 16029. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16280-x>.
- (52) Carlini, L.; Manley, S. Live Intracellular Super-Resolution Imaging Using Site-Specific Stains. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (12), 2643-2648. <https://doi.org/10.1021/cb400467x>.
- (53) Huang, F.; Hartwich, T. M. P.; Rivera-Molina, F. E.; Lin, Y.; Duim, W. C.; Long, J. J.; Uchil, P. D.; Myers, J. R.; Baird, M. a; Mothes, W.; Davidson, M. W.; Toomre, D.; Bewersdorf, J. Video-Rate Nanoscopy Using SCMOS Camera-Specific Single-Molecule Localization Algorithms. *Nat. Methods* **2013**, *10* (7), 653-658. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2488>.
- (54) Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H. A Practical Guide to Evaluating Colocalization in Biological Microscopy. *Am. J. Physiol - Cell Physiol.* **2011**, *300* (4), 723-742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>.
- (55) Schnitzbauer, J.; Strauss, M. T.; Schlichthaerle, T.; Schueder, F.; Jungmann, R. Super-Resolution Microscopy with DNA-PAINT. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (6), 1198-1228. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.024>.
- (56) Dai, M.; Jungmann, R.; Yin, P. Optical Imaging of Individual Biomolecules in Densely Packed Clusters. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11* (9), 798-807. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.95>.
- (57) Strauss, S.; Nickels, P. C.; Strauss, M. T.; Jiménez Sabinina, V.; Ellenberg, J.; Carter, J. D.; Gupta, S.; Janjic, N.; Jungmann, R. Modified Aptamers Enable Quantitative Sub-10-Nm Cellular DNA-PAINT Imaging. *Nat. Methods* **2018**, *15* (9), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0105-0>.
- (58) Strauss, S.; Jungmann, R. Up to 100-Fold Speed-up and Multiplexing in Optimized DNA-PAINT. *Nat. Methods* **2020**, *17* (8), 789-791. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0869-x>.
- (59) Balzarotti, F.; Eilers, Y.; Gwosch, K. C.; Gynnå, A. H.; Westphal, V.; Stefani, F. D.; Elf, J.; Hell, S. W.; Gynna, A. H. Nanometer Resolution Imaging and Tracking of Fluorescent Molecules with Minimal Photon Fluxes. *Science (80-.)*.

- 2017, *355* (6325), 606-612. <https://doi.org/10.1126/science.aak9913>.
- (60) Reymond, L.; Huser, T.; Ruprecht, V.; Wieser, S. Modulation-Enhanced Localization Microscopy. *J. Phys. Photonics* **2020**, *2* (4), 041001. <https://doi.org/10.1088/2515-7647/ab9eac>.
- (61) Balzarotti, F.; Eilers, Y.; Gwosch, K. C.; Gynnå, A. H.; Westphal, V.; Stefani, F. D.; Elf, J.; Hell, S. W. Nanometer Resolution Imaging and Tracking With Minimal Photon Fluxes. *Science* (80-.). **2017**, *355* (diciembre), 606-612.
- (62) Gwosch, K. C.; Pape, J. K.; Balzarotti, F.; Hoess, P.; Ellenberg, J.; Ries, J.; Hell, S. W. MINFLUX Nanoscopy Delivers 3D Multicolor Nanometer Resolution in Cells. *Nat. Methods* **2020**, *17* (2), 217-224. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0688-0>.
- (63) Eilers, Y.; Ta, H.; Gwosch, K. C.; Balzarotti, F.; Hell, S. W. MINFLUX Monitors Rapid Molecular Jumps with Superior Spatiotemporal Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, 201801672. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801672115>.
- (64) Pape, J. K.; Stephan, T.; Balzarotti, F.; Büchner, R.; Lange, F.; Riedel, D.; Jakobs, S.; Hell, S. W. Nanoscopia 3D multicolor MINFLUX de proteínas mitocondriales MICOS. *Proc. Acad. Sci.* **2020**, *117* (34), 20607-20614. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009364117>.
- (65) Stephan, T.; Brüser, C.; Deckers, M.; Steyer, A. M.; Balzarotti, F.; Barbot, M.; Behr, T. S.; Heim, G.; Hübner, W.; Ilgen, P.; Lange, F.; Pacheu-Grau, D.; Pape, J. K.; Stoldt, S.; Huser, T.; Hell, S. W.; Möbius, W.; Rehling, P.; Riedel, D.; Jakobs, S. MICOS Assembly Controls Mitochondrial Inner Membrane Remodeling and Crista Junction Redistribution to Mediate Cristae Formation. *EMBO J.* **2020**, *39* (14), 1-24. <https://doi.org/10.15252/embj.2019104105>.
- (66) Grabner, C. P.; Jansen, I.; Neef, J.; Weiss, T.; Schmidt, R.; Riedel, D.; Wurm, C. A.; Moser, T. Resolución de la arquitectura molecular de la zona activa del fotorreceptor mediante nanoscopia MINFLUX. *bioRxiv* **2021**, 2021.05.28.446138. <https://doi.org/10.1101/2021.05.28.446138>.
- (67) Schmidt, R.; Weihs, T.; Wurm, C. A.; Jansen, I.; Rehman, J.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. MINFLUX Nanometer-Scale 3D Imaging and Microsecond-Range Tracking on a Common Fluorescence Microscope. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21652-z>.
- (68) Masullo, L. A.; Steiner, F.; Zähringer, J.; Lopez, L. F.; Bohlen, J.; Richter, L.; Cole, F.; Tinnefeld, P.; Stefani, F. D. Pulsed Interleaved MINFLUX. *Nano Lett.* **2021**, *21* (1), 840-846. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04600>.
- (69) Reymond, L.; Ziegler, J.; Knapp, C.; Wang, F.-C.; Huser, T.; Ruprecht, V.; Wieser, S. SIMPLE: Estimador de localización de puntos basado en iluminación estructurada con mayor precisión. *Opt. Express* **2019**, *27* (17), 24578. <https://doi.org/10.1364/oe.27.024578>.
- (70) Gu, L.; Li, Y.; Zhang, S.; Xue, Y.; Li, W.; Li, D.; Xu, T.; Ji, W. Molecular

- Resolution Imaging by Repetitive Optical Selective Exposure. *Nat. Methods* **2019**, *16* (11), 1114-1118. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0544-2>.
- (71) Cnossen, J.; Hinsdale, T.; Thorsen, R.; Siemons, M.; Schueder, F.; Jungmann, R.; Smith, C. S.; Rieger, B.; Stallinga, S. Localization Microscopy at Doubled Precision with Patterned Illumination. *Nat. Methods* **2020**, *17* (1), 59-63. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0657-7>.
- (72) Axelrod, D. Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence. *J. Cell Biol.* **1981**, *89* (1), 141-145. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141>.
- (73) Szalai, A. M.; Siarry, B.; Lukin, J.; Williamson, D. J.; Unsain, N.; Cáceres, A.; Pilo-Pais, M.; Acuña, G.; Refojo, D.; Owen, D. M.; Simoncelli, S.; Stefani, F. D. Nanoscopia de fluorescencia de reflexión total tridimensional con resolución axial nanométrica por localización fotométrica de moléculas individuales. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20863-0>.
- (74) Jouchet, P.; Cabriel, C.; Bourg, N.; Bardou, M.; Poüs, C.; Fort, E.; Lévêque-Fort, S. Nanometric Axial Localization of Single Fluorescent Molecules with Modulated Excitation. *Nat. Photonics* **2021**, *15* (abril). <https://doi.org/10.1038/s41566-020-00749-9>.
- (75) Gu, L.; Li, Y.; Zhang, S.; Zhou, M.; Xue, Y.; Li, W.; Xu, T.; Ji, W. Molecular-Scale Axial Localization by Repetitive Optical Selective Exposure. *Nat. Methods* **2021**, *18* (4), 369-373. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01099-2>.
- (76) Weber, M.; Leutenegger, M.; Stoldt, S.; Jakobs, S.; Mihaila, T. S.; Butkevich, A. N.; Hell, S. W. MINSTED Fluorescence Localization and Nanoscopy. *Nat. Photonics* **2021**, 1-6. <https://doi.org/10.1038/s41566-021-00774-2>.
- (77) Kis-Petikova, K.; Gratton, E. Distance Measurement by Circular Scanning of the Excitation Beam in the Two-Photon Microscope. *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *63* (1), 34-49. <https://doi.org/10.1002/jemt.10417>.
- (78) Enderlein, J. Tracking of Fluorescent Molecules Diffusing within Membranes. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **2000**, *71* (5), 773-777. <https://doi.org/10.1007/s003400000409>.
- (79) Levi, V.; Ruan, Q.; Kis-Petikova, K.; Gratton, E. Scanning FCS, a Novel Method for Three-Dimensional Particle Tracking. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31* (5), 997-1000. <https://doi.org/10.1042/bst0310997>.
- (80) Lanzañò, L.; Gratton, E. Orbital Single Particle Tracking on a Commercial Confocal Microscope Using Piezoelectric Stage Feedback. *Methods Appl. Fluoresc.* **2014**, *2* (2), 1-19. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/2/2/024010>.
- (81) Wehnekamp, F.; Plucińska, G.; Thong, R.; Misgeld, T.; Lamb, D. C. C. Seguimiento orbital 3D en tiempo real de nanorresolución para estudiar el tráfico mitocondrial en axones de vertebrados in vivo. *Elife* **2019**, *8*, 1-22. <https://doi.org/10.7554/eLife.46059>.

- (82) Dupont, A.; Gorelashvili, M.; Schüller, V.; Wehnekamp, F.; Arcizet, D.; Katayama, Y.; Lamb, D. C.; Heinrich, D. Seguimiento tridimensional de partículas individuales en células vivas: Noticias de la tercera dimensión. *New J. Phys.* **2013**, *15* (7), 075008. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/7/075008>.
- (83) Marklund, E.; van Oosten, B.; Mao, G.; Amselem, E.; Kipper, K.; Sabantsev, A.; Emmerich, A.; Globisch, D.; Zheng, X.; Lehmann, L. C.; Berg, O. G.; Johansson, M.; Elf, J.; Deindl, S. DNA Surface Exploration and Operator Bypassing during Target Search. *Nature* **2020**, *583* (7818), 858-861. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2413-7>.
- (84) Davis, L. M.; Canfield, B. K.; Germann, J. A.; King, J. K.; Robinson, W. N.; Dukes III, A. D.; Rosenthal, S. J.; Samson, P. C.; Wikswo, J. P. Four-Focus Single-Particle Position Determination in a Confocal Microscope. En *Single Molecule Spectroscopy and Imaging III*; Enderlein, J., Gryczynski, Z. K., Erdmann, R., Eds.; 2010; Vol. 7571, p 757112. <https://doi.org/10.1117/12.842572>.
- (85) Germann, J. A.; Davis, L. M. Seguimiento tridimensional de una sola nanopartícula fluorescente utilizando la excitación de cuatro enfoques en un microscopio confocal. *Opt. Express* **2014**, *22* (5), 5641. <https://doi.org/10.1364/OE.22.005641>.
- (86) Levi, V.; Ruan, Q. Q.; Gratton, E. 3-D Particle Tracking in a Two-Photon Microscope: Application to the Study of Molecular Dynamics in Cells. *Biophys. J.* **2005**, *88* (4), 2919-2928. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.044230>.
- (87) Katayama, Y.; Burkacky, O.; Meyer, M.; Bräuchle, C.; Gratton, E.; Lamb, D. C. Nanomicroscopía en tiempo real mediante seguimiento tridimensional de una sola partícula. *ChemPhysChem* **2009**, *10* (14), 2458-2464. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900436>.
- (88) Hell, S. W.; Sotomayor, M.; Schulten, K.; Evans, E.; Bell, G. I.; Davis, M. M.; Ritchie, K. Far-Field Optical Nanoscopy. *Science* (80-). **2007**, *316* (5828), 1153-1158. <https://doi.org/10.1126/science.1137395>.
- (89) Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. E. On/off Blinking and Switching Behaviour of Single Molecules of Green Fluorescent Protein. *Nature* **1997**, *388* (6640), 355-358. <https://doi.org/10.1038/41048>.
- (90) Lukyanov, K. A.; Fradkov, A. F.; Gurskaya, N. G.; Matz, M. V.; Labas, Y. A.; Savitsky, A. P.; Markelov, M. L.; Zarausky, A. G.; Zhao, X.; Fang, Y.; Tan, W.; Lukyanov, S. A. La coloración natural de los animales puede determinarse mediante un homólogo de la proteína verde fluorescente no fluorescente. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (34), 25879-25882. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000338200>.
- (91) Habuchi, S.; Ando, R.; Dedecker, P.; Verheijen, W.; Mizuno, H.; Miyawaki, A.; Hofkens, J. Reversible Single-Molecule Photoswitching in the GFP-like Fluorescent Protein Dronpa. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (27), 9511-9516. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500489102>.

- (92) Grotjohann, T.; Testa, I.; Reuss, M.; Brakemann, T.; Eggeling, C.; Hell, S. W.; Jakobs, S. RsEGFP2 Enables Fast RESOLFT Nanoscopy of Living Cells. *Elife* **2012**, *2012* (1), 1-14. <https://doi.org/10.7554/eLife.00248>.
- (93) Stiel, A. C.; Trowitzsch, S.; Weber, G.; Andresen, M.; Eggeling, C.; Hell, S. W.; Jakobs, S.; Wahl, M. C. 1.8 Una estructura de estado brillante de la proteína fluorescente reversible Dronpa guía la generación de variantes de conmutación rápida. *Biochem. J.* **2007**, *402* (1), 35-42. <https://doi.org/10.1042/bj20061401>.
- (94) 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. A Reversibly Photoswitchable GFP-like Protein with Fluorescence Excitation Decoupled from Switching. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (10), 942-950. <https://doi.org/10.1038/nbt.1952>.
- (95) Hell, S. W.; Jakobs, S.; Kastrop, L. Imaging and Writing at the Nanoscale with Focused Visible Light through Saturable Optical Transitions. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2003**, *77* (7), 859-860. <https://doi.org/10.1007/s00339-003-2292-4>.
- (96) Chmyrov, A.; Keller, J.; Grotjohann, T.; Ratz, M.; D'Este, E.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. Nanoscopia con más de 100.000 "donuts". *Nat. Methods* **2013**, *10* (8), 737-740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2556>.
- (97) Chmyrov, A.; Leutenegger, M.; Grotjohann, T.; Schönle, A.; Keller-Findeisen, J.; Kastrop, L.; Jakobs, S.; Donnert, G.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. Achromatic Light Patterning and Improved Image Reconstruction for Parallelized RESOLFT Nanoscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (noviembre de 2016), 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep44619>.
- (98) Rego, E. H.; Shao, L.; Macklin, J. J.; Winoto, L.; Johansson, G. A.; Kamps-Hughes, N.; Davidson, M. W.; Gustafsson, M. G. L. La microscopia de iluminación estructurada no lineal con una proteína fotosensible revela estructuras celulares con una resolución de 50 Nm. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (3). <https://doi.org/10.1073/pnas.1107547108>.
- (99) Li, D.; Shao, L.; Chen, B.; Zhang, X. X.; Zhang, M.; Moses, B.; Milkie, D. E.; Beach, J. R.; Hammer, J. A.; Pasham, M.; Kirchhausen, T.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Xu, P.; Betzig, E. Hammer, J. A.; Pasham, M.; Kirchhausen, T.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Xu, P.; Betzig, E.; Iii, J. A. H.; Pasham, M.; Kirchhausen, T.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Xu, P.; Betzig, E. Extended-Resolution Structured Illumination Imaging of Endocytic and Cytoskeletal Dynamics. *Science (80-.)*. **2015**, *349* (6251), aab3500-aab3500. <https://doi.org/10.1126/science.aab3500>.
- (100) Zhang, X.; Zhang, M.; Li, D.; He, W.; Peng, J.; Betzig, E.; Xu, P. Proteína fluorescente altamente fotoestable y reversible con alta relación de contraste para la microscopia de superresolución de células vivas. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (37), 10364-10369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611038113>.

- (101) Sahl, S. J.; Balzarotti, F.; Keller-Findeisen, J.; Leutenegger, M.; Westphal, V.; Egner, A.; Lavoie-Cardinal, F.; Chmyrov, A.; Grotjohann, T.; Jakobs, S. Comentario sobre "extended-Resolution Structured Illumination Imaging of Endocytic and Cytoskeletal Dynamics. *Science (80-.)*. **2016**, *352* (6285). <https://doi.org/10.1126/science.aad7983>.
- (102) Masullo, L. A.; Bodén, A.; Pennacchiotti, F.; Coceano, G.; Ratz, M.; Testa, I. Enhanced Photon Collection Enables Four Dimensional Fluorescence Nanoscopy of Living Systems. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05799-w>.
- (103) Bewersdorf, J.; Egner, A.; Hell, S. W. Multifocal Multi-Photon Microscopy. *Handb. Biol. Confocal Microsc. Third Ed.* **2006**, *23* (9), 550-560. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_29.
- (104) York, A. G.; Parekh, S. H.; Nogare, D. D.; Fischer, R. S.; Temprine, K.; Mione, M.; Chitnis, A. B.; Combs, C. A.; Shroff, H. Resolution Doubling in Live, Multicellular Organisms via Multifocal Structured Illumination Microscopy. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 749-754. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2025>.
- (105) Müller, C. B.; Enderlein, J. Image Scanning Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104* (19), 1-4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.198101>.
- (106) Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Stefani, F. D. Nota: Tormenta: An Open Source Python-Powered Control Software for Camera Based Optical Microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **2016**, *87* (12). <https://doi.org/10.1063/1.4972392>.
- (107) Booth, M. J.; Neil, M. A. A.; Juškaitis, R.; Wilson, T. Adaptive Aberration Correction in a Confocal Microscope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (9), 5788-5792. <https://doi.org/10.1073/pnas.082544799>.
- (108) Testa, I.; Urban, N. T.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Willig, K. I.; Hell, S. W. Nanoscopy of Living Brain Slices with Low Light Levels. *Neuron* **2012**, *75* (6), 992-1000. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.028>.
- (109) York, A. G.; Chandris, P.; Nogare, D. D.; Head, J.; Wawrzusin, P.; Fischer, R. S.; Chitnis, A.; Shroff, H. Instantánea de imágenes de superresolución en células vivas y embriones a través del procesamiento de imágenes analógicas. *Nat. Methods* **2013**, *10* (11), 1122-1126. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2687>.
- (110) Fiolka, R.; Beck, M.; Stemmer, A. Structured Illumination in Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy Using a Spatial Light Modulator. **2008**, *33* (14), 1629-1631.
- (111) Yang, B.; Przybilla, F.; Mestre, M.; Trebbia, J.-B.; Lounis, B. Large Parallelization of STED Nanoscopy Using Optical Lattices. *Opt. Express* **2014**, *22* (5), 5581. <https://doi.org/10.1364/oe.22.005581>.
- (112) Bergermann, F.; Alber, L.; Sahl, S. J.; Engelhardt, J.; Hell, S. W. Fluorescence Nanoscopy. **2015**, *23* (1), 731-733. <https://doi.org/10.1364/OE.23.000211>.
- (113) 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. Interferometric Fluorescent Super-Resolution Microscopy Resolves 3D Cellular Ultrastructure. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (9), 3125-3130. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813131106>.
- (114) Aquino, D.; Schönle, A.; Geisler, C.; Middendorff, C. V.; Wurm, C. a.; Okamura, Y.; Lang, T.; Hell, S. W.; Egner, A. Nanoscopia bicolor de volúmenes tridimensionales mediante la detección 4Pi de fluoróforos conmutados estocásticamente. *Nat. Methods* **2011**, *8* (4), 353-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1583>.
- (115) Huang, F.; Sirinakis, G.; Allgeyer, E. S.; Toomre, D.; Booth, M. J.; Bewersdorf, J.; Huang, F.; Sirinakis, G.; Allgeyer, E. S.; Schroeder, L. K.; Duim, W. C. Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells Resource Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells. *Cell* *166* (4), 1028-1040. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.016>.
- (116) Juette, M. F.; Gould, T. J.; Lessard, M. D.; Mlodzianoski, M. J.; Nagpure, B. S.; Bennett, B. T.; Hess, S. T.; Bewersdorf, J. Microscopia de fluorescencia tridimensional de resolución sub-100 Nm de muestras gruesas. *Nat. Methods* **2008**, *5* (6), 527-529. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1211>.
- (117) Jones, S. a.; Shim, S.-H.; He, J.; Zhuang, X. Fast, Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of Live Cells. *Nat. Methods* **2011**, *8* (6), 499-508. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1605>.
- (118) 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. Fast Reversibly Photoswitching Red Fluorescent Proteins for Live-Cell RESOLFT Nanoscopy. *Nat. Methods* **2018**, *15* (8), 601-604. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0052-9>.
- (119) Bodén, A.; Pennacchietti, F.; Coceano, G.; Damenti, M.; Ratz, M.; Testa, I. Volumetric Live Cell Imaging with Three-Dimensional Parallelized RESOLFT Microscopy. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39* (5), 609-618. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00779-2>.
- (120) Damenti, M.; Coceano, G.; Pennacchietti, F.; Bodén, A.; Testa, I. Nanoscopia óptica STED y RESOLFT paralela del retículo endoplásmico tubular y sus contactos mitocondriales en células neuronales. *Neurobiol. Dis.* **2021**, *155* (enero). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105361>.
- (121) Van Oijen, A. M.; Blainey, P. C.; Crampton, D. J.; Richardson, C. C.; Ellenberger, T.; Xie, X. S. Single-Molecule Kinetics of λ Exonuclease Reveal Base Dependence and Dynamic Disorder. *Science (80-.)*. **2003**, *301* (5637), 1235-1238. <https://doi.org/10.1126/science.1084387>.
- (122) Yildiz, A.; Ha, T.; Goldman, Y. E.; Selvin, P. R.; Forkey, J. N.; McKinney, S. a.; Ha, T.; Goldmann, Y. E.; Selvin, P. R.; Goldman, Y. E.; Selvin, P. R.; Forkey, J.

- N.; McKinney, S. a; Goldmann, Y. E.; Ha, T.; Goldman, Y. E.; Selvin, P. R.; Forkey, J. N.; McKinney, S. a; Goldmann, Y. E.; Ha, T.; Goldman, Y. E.; Selvin, P. R. Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Imagen de un solo fluoróforo con localización de 1,5 Nm. *Science (80-.)*. **2003**, *300* (2003), 2061-2065. <https://doi.org/10.1126/science.1084398>.
- (123) English, B. P.; Min, W.; Van Oijen, A. M.; Kang, T. L.; Luo, G.; Sun, H.; Cherayil, B. J.; Kou, S. C.; Xie, X. S. Ever-Fluctuating Single Enzyme Molecules: Michaelis-Menten Equation Revisited. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (2), 87-94. <https://doi.org/10.1038/nchembio759>.
- (124) Cisse, I. I.; Izeddin, I.; Causse, S. Z.; Boudarene, L.; Senecal, A.; Muresan, L.; Dugast-Darzacq, C.; Hajj, B.; Dahan, M.; Darzacq, X. Real-Time Dynamics of RNA Polymerase II Clustering in Live Human Cells. *Science (80-.)*. **2013**, *341* (6146), 664-667. <https://doi.org/10.1126/science.1239053>.
- (125) Kosuri, P.; Altheimer, B. D.; Dai, M.; Yin, P.; Zhuang, X. Seguimiento de la rotación de las enzimas de procesamiento del genoma utilizando rotores de origami de ADN. *Nature* **2019**, *572* (7767), 136-140. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1397-7>.
- (126) Mortensen, K. I.; Churchman, L. S.; Spudich, J. a; Flyvbjerg, H. Optimized Localization Analysis for Single-Molecule Tracking and Super-Resolution Microscopy. *Nat. Methods* **2010**, *7* (5), 377-381. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1447>.
- (127) Lelek, M.; Gyparaki, M. T.; Beliu, G.; Schueder, F.; Griffié, J.; Manley, S.; Jungmann, R.; Sauer, M.; Lakadamyali, M.; Zimmer, C. Single-Molecule Localization Microscopy. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, *1* (1). <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00038-x>.
- (128) Hellriegel, C.; Gratton, E. Real-Time Multi-Parameter Spectroscopy and Localization in Three-Dimensional Single-Particle Tracking. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6* (marzo), S3-S14. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0313.focus>.
- (129) Klar, T. A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S. W. Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission. *Proc. Acad. Sci.* **2000**, *97* (15), 8206-8210.
- (130) Thiele, J. C.; Helmerich, D. A.; Oleksiievets, N.; Tsukanov, R.; Butkevich, E.; Sauer, M.; Nevskiy, O.; Enderlein, J. Confocal Fluorescence-Lifetime Single-Molecule Localization Microscopy. *ACS Nano* **2020**, *14* (10), 14190-14200. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c07322>.
- (131) Sengupta, S. K.; Kay, S. M. *Fundamentals of Statistical Signal Processing: Estimation Theory*; Prentice Hall, 1995. <https://doi.org/10.2307/1269750>.
- (132) Verveer, P. J.; Jovin, T. M. Efficient Superresolution Restoration Algorithms Using Maximum a Posteriori Estimations with Application to Fluorescence Microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A* **1997**, *14* (8), 1696.

<https://doi.org/10.1364/JOSAA.14.001696>.

- (133) Markham, J.; Conchello, J.-A. Fast Maximum-Likelihood Image-Restoration Algorithms for Three-Dimensional Fluorescence Microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A* **2001**, *18* (5), 1062. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.18.001062>.
- (134) Ober, R. J.; Ram, S.; Ward, E. S. Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy. *Biophys. J.* **2004**, *86* (2), 1185-1200. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74193-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74193-4).
- (135) Abraham, A. V.; Ram, S.; Chao, J.; Ward, E. S.; Ober, R. J. Estudio cuantitativo de las técnicas de estimación de localización de moléculas individuales. *Opt. Express* **2009**, *17* (26), 23352. <https://doi.org/10.1364/OE.17.023352>.
- (136) Chao, J.; Sally Ward, E.; Ober, R. J. Teoría de la información de Fisher para la estimación de parámetros en la microscopía de una molécula individual: Tutorial. *J. Opt. Soc. Am. A* **2016**, *33* (7), B36. <https://doi.org/10.1364/josaa.33.000b36>.
- (137) Kasper, R.; Harke, B.; Forthmann, C.; Tinnefeld, P.; Hell, S. W.; Sauer, M. Single-Molecule STED Microscopy with Photostable Organic Fluorophores. *Small* **2010**, *6* (13), 1379-1384. <https://doi.org/10.1002/smll.201000203>.
- (138) van de Linde, S.; Loschberger, A.; Klein, T.; Heidbreder, M.; Wolter, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy with Standard Fluorescent Probes. *Nat. Protoc.* **2011**, *6* (7), 991-1009.
- (139) Testa, I.; Urban, N. T.; Balzarotti, F.; Hell, S. W. Nanoscopía RESOLFT de doble canal mediante el uso de cinética de estado fluorescente. **2014**, 8-11.
- (140) Isbaner, S.; Karedla, N.; Kaminska, I.; Ruhlandt, D.; Raab, M.; Bohlen, J.; Chizhik, A.; Gregor, I.; Tinnefeld, P.; Enderlein, J.; Tsukanov, R. Colocalización axial de moléculas individuales con una precisión nanométrica mediante la transferencia de energía inducida por metales. *Nano Lett.* **2018**, *18* (4), 2616-2622. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00425>.
- (141) Kaminska, I.; Bohlen, J.; Rocchetti, S.; Selbach, F.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Dependencia de la distancia de la transferencia de energía de una molécula individual al grafeno medida con nanoposicionadores de origami de ADN. *Nano Lett.* **2019**, *19* (7), 4257-4262. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00172>.
- (142) Müller, B. K.; Zaychikov, E.; Bräuchle, C.; Lamb, D. C.; Mu, B. K. Pulsed Interleaved Excitation. *Biophys. J.* **2005**, *89* (noviembre), 3508-3522. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.064766>.
- (143) Caprile, F. Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires. **2021**.
- (144) Richter, L. Tesis de maestría, Universidad Humboldt.
- (145) Rothmund, P. W. K. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature* **2006**, *440* (7082), 297-302.
- (146) Scheckenbach, M.; Bauer, J.; Zähringer, J.; Selbach, F.; Tinnefeld, P. DNA Origami Nanorulers and Emerging Reference Structures. *APL Mater.* **2020**, *8* (11).

- <https://doi.org/10.1063/5.0022885>.
- (147) Dey, S.; Fan, C.; Gothelf, K. V.; Li, J.; Lin, C.; Liu, L.; Liu, N.; Nijenhuis, M. A. D.; Saccà, B.; Simmel, F. C.; Yan, H.; Zhan, P. DNA Origami. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, *1* (1), 1-24. <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00009-8>.
- (148) Nickels, P. C.; Wünsch, B.; Holzmeister, P.; Bae, W.; Kneer, L. M.; Grohmann, D.; Tinnefeld, P.; Liedl, T. Molecular Force Spectroscopy with a DNA Origami - Based Nanoscopic Force Clamp. *Science (80-)*. **2016**, *354* (6310), 305–307.
- (149) Vogelsang, J.; Kasper, R.; Steinhauer, C.; Person, B.; Heilemann, M.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes. *Angew. Chemie* **2008**, *47* (29), 5465-5469. <https://doi.org/10.1002/anie.200801518>.
- (150) Sigal, Y. M.; Zhou, R.; Zhuang, X. Visualización y descubrimiento de estructuras celulares con microscopía de superresolución. *Science*. 2018. <https://doi.org/10.1126/science.aau1044>.
- (151) Dempsey, G. T.; Vaughan, J. C.; Chen, K. H.; Bates, M.; Zhuang, X. Evaluation of Fluorophores for Optimal Performance in Localization-Based Super-Resolution Imaging. *Nat. Methods* **2011**, *8* (12), 1027-1036. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1768>.
- (152) Vogelsang, J.; Steinhauer, C.; Forthmann, C.; Stein, I. H.; Person-Skegro, B.; Cordes, T.; Tinnefeld, P. Make Them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy. *ChemPhysChem* **2010**, *11* (12), 2475-2490. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000189>.
- (153) van de Linde, S.; Krstić, I.; Prisner, T.; Doose, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. Photoinduced Formation of Reversible Dye Radicals and Their Impact on Super-Resolution Imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (4), 499-506. <https://doi.org/10.1039/C0PP00317D>.
- (154) Castello, M.; Tortarolo, G.; Buttafava, M.; Deguchi, T.; Villa, F.; Koho, S.; Pesce, L.; Oneto, M.; Pelicci, S.; Lanzanó, L.; Bianchini, P. Sheppard, C. J. R.; Diaspro, A.; Tosi, A.; Vicidomini, G. A Robust and Versatile Platform for Image Scanning Microscopy Enabling Super-Resolution FLIM. *Nat. Methods* **2019**, *16* (2), 175-178. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0291-9>.
- (155) Schönle, A. Inspector Image Acquisition & Analysis Software v0.10, <Http://Www.Inspector.De>.
- (156) Coelho, S.; Baek, J.; Graus, M. S.; Halstead, J. M.; Nicovich, P. R.; Feher, K.; Gandhi, H.; Gooding, J. J.; Gaus, K. Ultraprecise Single-Molecule Localization Microscopy Enables in Situ Distance Measurements in In Intact Cells. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (16), 1-10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay8271>.
- (157) Dempsey, G. T.; Bates, M.; Kowtoniuk, W. E.; Liu, D. R.; Tsien, R. Y.; Zhuang, X. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (51), 18192-18193. <https://doi.org/10.1021/ja904588g>.



UNIVERSITY OF BUENOS AIRES

Faculty of Exact and Natural Sciences

Physics Department

Photon-efficient fluorescence nanoscopy by scanning light intensity minima

Thesis presented to opt for the title of Doctor of the University of Buenos Aires in
Physical Sciences

LUCIANO ANDRÉS MASULLO

Thesis Supervisor: Dr. Fernando D. Stefani

Studies Counselor: Dr. Andrea V. Bragas

Workplace: Center for Bionanoscience Research, National Scientific and Technical
Research Council of Argentina

Autonomous City of Buenos Aires, 2021

A papá y mamá, por el amor, por el esfuerzo, por despertar en mí la pasión por el conocimiento, por el apoyo continuo.

Por todo.

Introduction and motivation

Super-resolution microscopy, or more accurately fluorescence nanoscopy techniques have revolutionized fluorescence-based imaging reaching resolutions in the nanometer range, well beyond the diffraction limit of light. The key enabling concept is the switching of fluorophores between a fluorescent and a non-fluorescent state. This "on-off switching" enables the sequential localization of a subset of fluorophores on the sample with a precision beyond the diffraction limit. The first generation of fluorescence nanoscopy was composed of two families of techniques: coordinate targeted and coordinate stochastic methods. In coordinate targeted methods, such as Stimulated Emission Depletion (STED) or REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions (RESOLFT), the off-switching process is light-induced and the super-resolved image is obtained by scanning a spatially modulated optical field that controls the off-switching of fluorophores on predefined positions of the sample. In contrast, coordinate stochastic methods such as Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) or Photo-activated localization microscopy (PALM), use uniform illumination. In this case, individual and well-separated fluorophores are imaged as they switch on and off stochastically over the sample. The super-resolved image is reconstructed using the positions of each measured fluorophore, which are obtained from fits of their individual images to the point spread function of the microscope. These techniques are now well established with commercial microscopes available in the market from several companies.

Although there is no fundamental limit to the spatial resolution of these methods, in practice they hardly reach 20 to 30 nm of lateral resolution due to the limited number of detectable fluorescence photons, imposed mainly by the photo-degradation of fluorophores. Naturally, it is of interest to achieve higher resolutions in order to access to the scale between 1 and 20 nm. Particularly interesting would be to reach the sub-10 nm regime because that is the typical size of structural proteins. Therefore, such methods

would enable the study of supramolecular protein structures with molecular resolution under biologically compatible conditions.

It is therefore of interest to investigate routes for more photon-efficient methods of fluorescence nanoscopy. Recently, the technique Maximally INFormative LUminescence eXcitation (MINFLUX) has launched a new generation of fluorescence nanoscopy methods that combines the advantages of coordinate-stochastic and coordinate-targeted methods, to extract maximum positional information of a single molecule using minimal photon counts. MINFLUX uses excitation fields comprising an intensity minimum to interrogate the position of single molecules and can routinely deliver a localization precision of ~ 1 nm. In this Thesis, new photon-efficient methods to localize single molecules with structured light featuring a minimum of intensity are presented.

Chapter 1 describes the fundamentals of fluorescence microscopy and fluorescence nanoscopy. The common underlying principles are presented. The different types of nanoscopy techniques, including the most recent developments, are reviewed and the state of the art of the field is summarized.

In Chapter 2 the development of a parallelized version of the coordinate-targeted RESOLFT nanoscopy is presented. This microscope uses a combination of two widefield light patterns: an array of light minima and a multi-foci pattern. This novel illumination scheme achieves higher sensitivity by enhancing photon collection and background rejection, delivering the best reported combination of field of view and spatiotemporal resolution in live-cell microscopy at the time of writing this thesis: 50 nm lateral resolution and 1 s acquisition times for whole cell imaging.

Chapter 3 describes the localization of single fluorescent molecules by using a sequence of exposures to structured light patterns. Previous work on the field is discussed and a common mathematical framework using Maximum Likelihood Estimation (MLE) theory is developed and described. This mathematical framework serves as a way to benchmark different methods and also facilitates the design of new experimental schemes. As an example, two new localization methods which combine the strengths of existing schemes are proposed.

A novel and simplified implementation of the MINFLUX localization concept is presented in Chapter 4. In contrast to the original implementation, p-MINFLUX uses interleaved laser pulses to deliver the doughnut-shaped excitation foci at a maximum repetition rate thus generating an effective nanosecond-scale scan of the light minima. Using both static and dynamic DNA origami model systems, we demonstrate its performance for single-molecule localization nanoscopy and tracking, respectively. Localization precision of 1 – 2 nm is achieved with 2000 – 1000 photon counts. In addition, p-MINFLUX provides access to the fluorescence lifetime. We have applied this information to acquire multiplexed signals discerned by lifetime and to perform fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) with 3-4 nm resolution (1-2 nm localization precision), that it is a resolution at least one order of magnitude better than previously reported in lifetime imaging.

In Chapter 5 the development of a new single-molecule localization method using light minima is described. By scanning a beam of light featuring an intensity minimum (ideally a zero) over a single fluorescent molecule, the position of the emitter can be estimated with precisions equivalent to MINFLUX or better. In contrast to MINFLUX, which requires set-ups of high technical complexity, this approach of raster scanning the excitation minimum can be directly implemented in any laser-scanning microscope simply introducing a passive optical element, such as a vortex phase plate, to obtain a doughnut-shaped focus. We characterize the performance of this new method through theoretical calculations, numerical simulations and nanoscopy experiments.

Finally, the conclusions of this Thesis and future perspectives are unfolded in Chapter 6.

Table of contents

Introduction and motivation	3
Table of contents	6
1. Fluorescence microscopy and super-resolution fluorescence microscopy (nanoscopy)	9
1.1. Optical microscopy and the diffraction limit	9
1.2. Fluorescence	11
1.3. Fluorescence microscopy	14
1.4. Super resolution microscopy: switching fluorophores on and off	16
1.5. Coordinate-targeted fluorescence nanoscopy	17
1.6. Single-molecule localization microscopy	21
1.7. Sub-10 nm super resolution microscopy	26
1.8. Single-molecule localization with sequential structured illumination	27
1.8.1. Maximally Informative Luminescence Excitation (MINFLUX)	28
1.8.2. Camera-based widefield single-molecule localization methods using structured illumination	32
1.8.3. Minimal STED (MINSTED)	36
1.9. Orbital Tracking	38
2. Parallelized RESOLFT nanoscopy in living cells with enhanced sensitivity and resolution	41
2.1. Concept and overview	43
2.2. Target fluorescent proteins and optical setup	46
2.3. Instrumentation, control and data acquisition	50
2.4. Data acquisition and image reconstruction	51
2.5. Enhanced optical sectioning	53
2.6. Optimization of inter-foci separation distance	55
2.7. Super resolution imaging in living cells	56
2.8. 3D imaging in living cells	61
2.9. Nanoscale dynamics recording in living cells	63
2.10. Discussion	65
2.11. Conclusions and outlook	67
3. Single-molecule localization by sequential structured illumination	70
3.1. A common framework for single-molecule localization using sequential structured illumination (SML-SSI)	71
3.1.1. Position estimation and precision	74
3.2. Benchmarking different methods	79
3.2.1. Orbital methods	80
3.2.2. Raster methods	84
3.2.3. Comparison between RASTMAX and camera-based localization	89
3.2.4. Top performance comparison	92
3.3. Conclusions and outlook	95

Appendix 3.1	Derivation of $p_i(r_E)$ with background	98
4.	Pulsed interleaved MINFLUX	102
4.1.	Concept and overview of the experimental implementation	102
4.2.	Optical setups	105
4.2.1.	Buenos Aires setup	107
4.2.2.	Munich setup	112
4.3.	Drift correction	114
4.4.	Measurement of the excitation pattern	115
4.5.	Test samples based on DNA-origami	118
4.5.1.	DNA-origami structure folding	118
4.5.2.	DNA-origami incubation	119
4.6.	Position estimation and Cramér-Rao Bound	119
4.7.	Experimental characterization of the localization precision and accuracy	120
4.8.	p-MINFLUX simulations	123
4.8.1.	Description of the Monte Carlo simulations	124
4.8.2.	Effect of misalignment of the excitation pattern	125
4.8.3.	Photon arrival times and crosstalk between detection time windows	127
4.9.	Nanoscopy with fluorescence lifetime information	129
4.10.	Nanoscale tracking	131
4.11.	Discussion and outlook	134
	Appendix 4.1 DNA-origami sequences	137
5.	Single-molecule localization by raster scanning a minimum of light (RASTMIN)	149
5.1.	RASTMIN implementation in a confocal microscope	150
5.1.1.	Beam scanner	151
5.1.2.	Excitation beam phase modulation	154
5.1.3.	Influence of mechanical drift on localization precision	157
5.1.4.	Stabilization system	159
5.2.	Simulations of RASTMIN localization and nanoscopy	166
5.3.	RASTMIN precision evaluation with fluorescent NPs	168
5.3.1.	Fluorescent NP sample preparation	170
5.4.	RASTMIN nanoscopy on DNA-origami samples	171
5.4.1.	DNA-origami samples nanofabrication	173
5.4.2.	DNA-origami samples preparation	173
5.5.	Conclusions and outlook	174
6.	General conclusions and perspectives	177
	Acknowledgements	182
	Publications derived from this Thesis	186
	References	188

Chapter 1 – Fluorescence microscopy and super-resolution microscopy (nanoscopy)

1.1 Optical microscopy and the diffraction limit

Optical microscopy has a preponderant role in life sciences as it provides unique advantages: it is minimally invasive, allowing microscopy of intact or even living cells and organisms, it is extremely sensitive when combined with fluorescent labelling and it allows to obtain three dimensional images inside biological samples. Nevertheless, it has a fundamental limitation in terms of the achievable spatial resolution. Until approximately 25 years ago, obtaining nanometric resolution using far-field optical systems made of conventional lenses was considered impossible.

Due to the wave nature of light, a point-like source in the sample space will produce a diffraction-limited image of finite size after going through an optical system. The produced diffraction pattern can in fact be used to characterize the optical system and is called the Point Spread Function (*PSF*). For a typical lens-based system, an Airy Disk pattern is formed in the image space, with a Full-Width at Half-Maximum (*FWHM*) given by the Abbe formula¹:

$$FWHM \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (1.1)$$

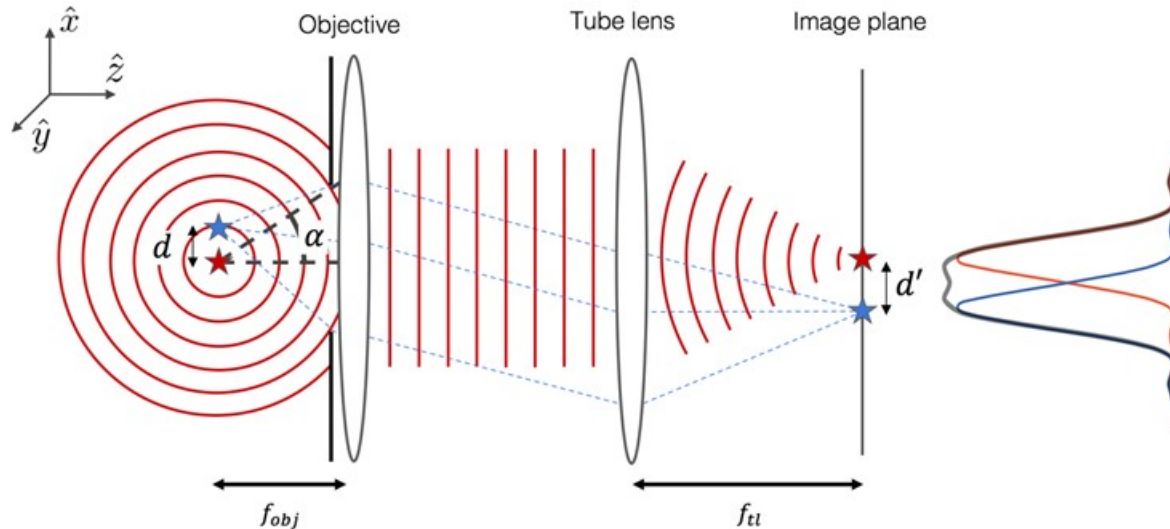


Figure 1.1 Diffraction limited optical system. Simplified model of an optical microscope. Two incoherent point-like emitters at distance d are imaged by the system formed by the objective and the tube lens. In the image plane of the microscope two diffraction patterns at distance $d' = M d$ are measured, where M is the magnification factor of the microscope.

In the context of microscopy, the lens that is limiting the resolution of the system is the first one starting from the sample, this lens (which is actually a combination of different lenses) is called *objective lens*. For visible light and state-of-the-art objective lenses, the *PSF* has a $FWHM_{xy} \approx 200 - 300 \text{ nm}$ laterally and $FWHM_z \approx 500 - 600 \text{ nm}$ axially. This diffraction patterns limit the ability of the system to discern between two point-like sources that are too close in the sample space, hence limiting the resolution of the system. Two incoherent sources of electromagnetic radiation, separated by a distance smaller than the FWHM produce two overlapping diffraction patterns (Figure 1.1).

A widely adopted standard to define the resolution of an optical microscope is Rayleigh's criterion, which establishes that the lateral resolution of a microscope is

$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (1.2)$$

and the axial resolution is

$$\Delta z \approx \frac{\lambda}{n \sin \alpha} \quad (1.3)$$

Where λ is the emission wavelength, n is the refractive index of the sample medium and α is the maximum collection angle of the first lens (microscope objective lens). It is often also expressed in terms of the parameter $NA = n \sin \alpha$, called the *numerical aperture* of a lens.

The formulas (1.2, 1.3) given by Raleigh's criterion are such that the resolution limit coincides approximately with the *FWHM* of the *PSF* of the optical system. We note, that setting resolution criterion based exclusively on the PSF of the system can only be approximate because the actual resolution achieved experimentally will also depend on other parameters such as optical aberrations, signal-to-noise ratio (SNR) and signal-to-background ratio (SBR).

1.2 Fluorescence

Fluorescent molecules or *fluorophores* are chemical compounds or moieties that can emit light after absorbing light². The simplest quantum mechanical picture to represent the process of molecular fluorescence is a three-level system as depicted in the Jablonski diagram of figure 1.2a: a ground singlet state S_0 , an excited singlet state S_1 , and a triplet state T_1 , each one split in vibrational states.

Molecules can transition from S_0 to S_1 by absorbing a photon with an energy equal to the difference between the energy of the two molecular states. This energy difference ΔE is related to the photon wavelength λ through the Planck-Einstein relation²:

$$\Delta E = \frac{h c}{\lambda} \quad (1.4)$$

where h is the Planck's constant and c is the speed of light in the medium where the transition is taking place. The absorption process occurs in the femtosecond time scale. At room temperature, the equilibrium population of higher vibrational states is negligible and the molecule decays to the lowest vibrational state within S_1 in a vibrational relaxation process that takes place in a few picoseconds. At this point several processes can occur. The excited molecule can decay directly to S_0 emitting a fluorescence photon with a transition rate k_F . Alternatively, it may decay to S_0 non-radiatively by internal conversion, with rate k_{nr} . The molecule can perform many cycles like this in the singlet subspace and emit a number of photons, i.e. the molecule is bright.

In addition, if there is a mechanism to unpair two electron spins (such as spin-orbit coupling) and S_1 and T_1 share the same common molecular geometry for some energy, the excited molecule may undergo inter-system crossing (ISC) to the lower energy T_1 . Due to spin selection rules, the singlet-triplet transitions are radiative-forbidden³. The molecule is then trapped in the triplet state until ISC occurs again. During this time in T_1 , the molecule is in a non-fluorescent state, i.e. it remains dark.

Usually, the singlet-triplet transitions rates (k_{ISC} and k_P) are much lower than singlet-singlet transition rates. Then, the bright periods where a molecule is able to absorb and emit fluorescence photons are interrupted by dark periods in the range of sub-milliseconds to seconds, which are easily discernible when the fluorescence of a single molecule is followed in time. This effect is known as triplet blinking⁴.

The absorption and emission spectra of a fluorescent molecule are schematically shown in Figure 1.2b. The vibrational energy relaxation within S_1 and S_0 accounts for the spectral shift of the emission spectra with respect to the absorption towards longer wavelengths, called *Stokes shift*². The Stokes shift is generally of ~ 20 nm and it allows, by means of

appropriate optical filters, the separation of excitation and emission light in fluorescence microscopes.

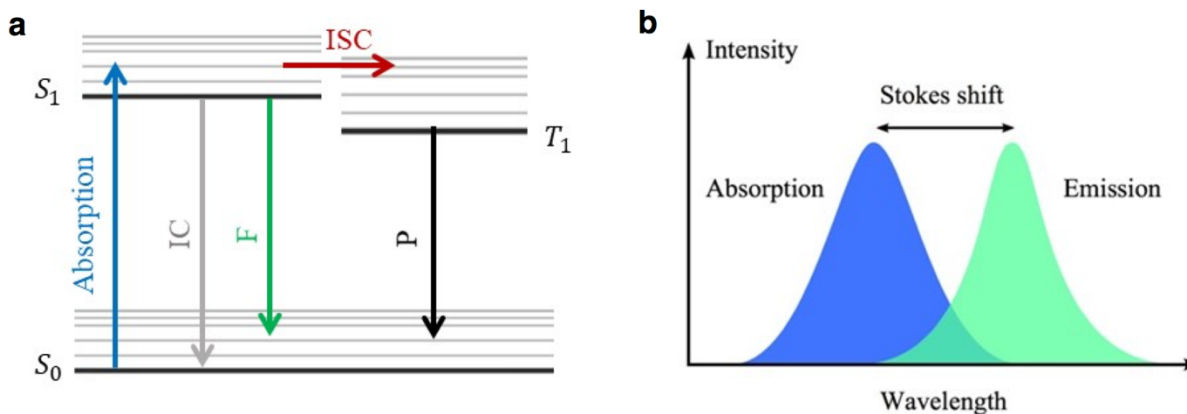


Figure 1.2 Fluorescence. (a) Simplified Jablonski diagram of fluorescence phenomena. S_0 : ground state, S_1 : excited state, ISC : intersystem crossing, IC : internal conversion. T_1 : triplet state, P : phosphorescence (b) Absorption and emission spectra of a generic fluorescence molecule. The Stokes shift is the wavelength difference between the absorption and emission peaks.

The transitions between states are independent, stochastic, and memoryless. Thus, the time elapsed in each state between transitions follows an exponential distribution. The time elapsed in S_1 after photon absorption $\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr} + k_{ISC}}$, is usually called the lifetime of the excited state or fluorescence lifetime, and typically ranges from 0.5 to 10 ns for organic fluorophores and fluorescent proteins. A fluorescence quantum efficiency is defined as $\phi = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_{ISC}}$. Because k_{ISC} is usually much lower than k_F and k_{nr} , it is often neglected in computing τ and ϕ .

Of key relevance for super-resolution microscopy is the possibility of fluorophores to transition between a fluorescent (bright, ON) and non-fluorescent state (dark, OFF). Here, we have described triplet blinking which is a mechanism of stochastic ON-OFF blinking. Stochastic ON-OFF blinking is essential for super-resolution methods based on the localization of single-molecules, so called single-molecule localization microscopy, described in Section 1.6. It is important to note that there are also other possible

mechanisms of stochastic ON-OFF blinking, like reversible redox reactions⁵ or (photo-)isomerizations that interrupt the photo-active conjugated system⁶.

In addition, there are ways to induce fluorophores to transition to a dark state that are driven by light. Such photo-induced OFF-switching is essential for coordinate-targeted super-resolution methods described in section 1.5. One universal photo-induced mechanism to produce the decay of a molecule from S_1 is stimulated emission. Although stimulated emission involves the emission of a photon, it is of the exact same energy as the light used to induce the transition. Then, this can be separated spectrally from spontaneous emission that occurs over a wider spectral range. Therefore, in practice, stimulated emission works as a photo-induced way to suppress detectable spontaneous emission. Again, there are other photo-induced mechanisms to suppress or switch OFF fluorescence, such as photo-induced isomerization or depletion of the ground state.

Finally, it is important to comment that excited molecules may also undergo irreversible chemical reactions that render them non-fluorescent. This process, usually called photobleaching, limits the total number of fluorescence photons that can be detected from a single molecule.

1.3 Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy¹ is the kind of optical microscopy that uses fluorescent compounds as the contrast mechanism to image different structures in samples. Typical fluorescence microscopy configurations are shown in Figure 1.3. Here, laser light (in blue) is used to excite fluorescence from a sample. A dichroic mirror reflects the laser beam towards the sample and transmits light of longer wavelengths, typically around the fluorescence emission maximum, thus separating the excitation light from the emission light. An additional emission filter more precisely tuned to the emission peak is usually used before light reaches the detector to further block excitation light and other unspecific fluorescence contributions.

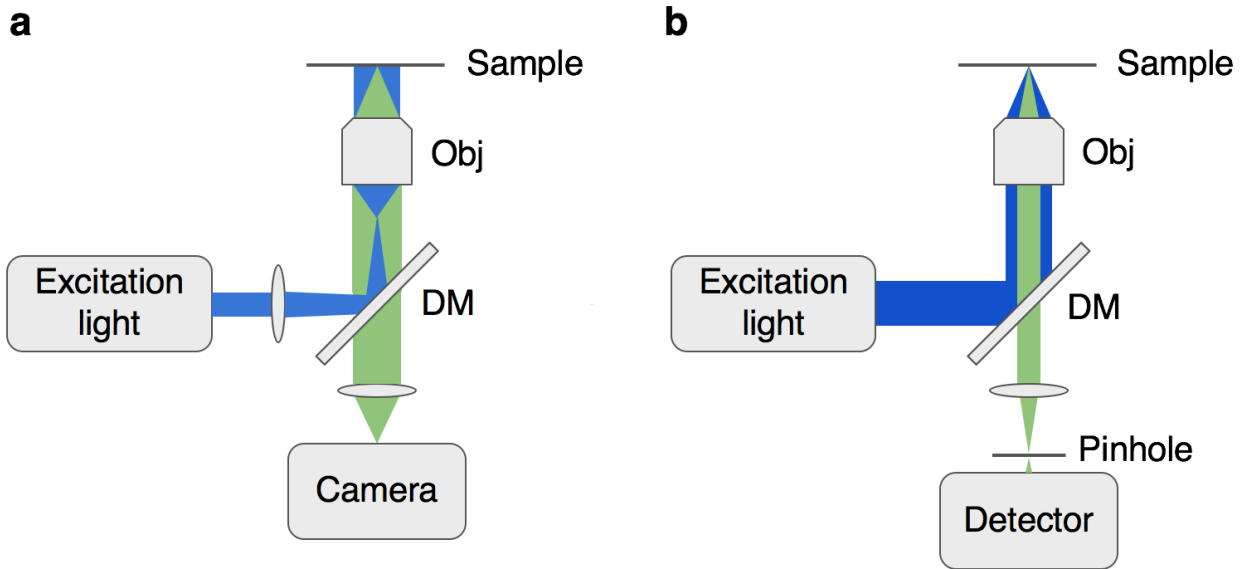


Figure 1.3 Diffraction-limited fluorescence microscopy. (a) Wide-field fluorescence microscope. (b) Scanning (confocal) fluorescence microscope.

Microscopes can be classified according to their excitation/detection scheme in wide-field and scanning (confocal) microscopes¹. In the former (Figure 1.3a), a rather large area of the sample is illuminated and a pixelated detector (camera) detects the light emitted by all illuminated markers. Scanning microscopy (Figure 1.3b) takes an alternative approach: the illumination is focused at a spot on the sample and the image is reconstructed by registering the detected signal during a raster scan of the focused beam over the sample. Additionally, in scanning *confocal* microscopy^{1,7}, a spatial filter composed of a *pinhole* in the detection focal plane is used to block out-of-focus emission. Background fluorescence is thus drastically reduced compared to wide-field microscopy and signal contrast is enhanced. The trade-off to this contrast enhancement is that in order to acquire a complete image, the illumination (and detection) spots have to be jointly scanned through the sample so that the detector can measure the response at each position.

1.4 Super-resolution microscopy: switching fluorophores on and off

Until the early 1990s it was generally accepted that the only way of dramatically improving imaging resolution employing light was using near-field optics⁸. Efforts were made in this direction, including applications in biology^{9,10}. Even though near-field imaging is a relevant technique in areas like material sciences and Integrated optics, its usefulness is limited by its restriction to surfaces. Meanwhile, important progress in far-field fluorescence microscopy was made thanks to developments like two-photon 3D imaging¹¹, the discovery of the GFP and its variants^{12,13} and the improvement in the measurements sensitivity allowing the first detection of single fluorescent molecules at room temperature^{14,15}.

Understanding and then engineering the possible transitions between fluorescent and non-fluorescent states of fluorophores was key to unlock unlimited resolution in far-field microscopy. The idea behind all nanoscopy or super-resolution microscopy techniques was to use molecular transitions to overcome the resolution limit¹⁶. There was a radical change in conceiving fluorophores as not only reporters but also as proper tools in their own right.

Several methods to overcome the diffraction limit were developed in the last few years. They all rely on switching the fluorophores between a fluorescent state (ON) and a non-fluorescent state (OFF) (Figure 1.4a). Molecules in the ON state emit detectable fluorescence while molecules in the OFF state do not emit a significant amount of detectable fluorescence. In this context, detectable fluorescence refers to each particular experimental set-up, it does not refer to the intrinsic capacity of the fluorophore to undergo the processes of absorbing or emitting photons. The nature (chemical, photophysical, conformational, etc.) of each state is different for each method. Fluorescence nanoscopy methods are commonly grouped according to their readout mode in two families. Coordinate-targeted techniques have their excitation/detection paths built in a scanning configuration so that they sequentially probe every position of the sample

with nanometric resolution. On the other hand, coordinate stochastic techniques work in a wide-field configuration, recording intermittent fluorescence emission transients from individual molecules that occur in random positions of the sample. From each detected single molecule signal, the position of the molecule is determined. A super-resolved image is then reconstructed using the determined single-molecule positions. This family of techniques is also known as single-molecule localization microscopy (SMLM). Next, the two groups of nanoscopy techniques are described, along with some of the more relevant implementations. It is beyond the scope of this Thesis to review the applications of super-resolution microscopy, for an extensive and excellent review on fluorescence nanoscopy in cell biology we refer to ¹⁷.

1.5 Coordinate-targeted fluorescence nanoscopy

In coordinate targeted techniques, a light pattern governing the ON/OFF transitions determines the coordinates where the sample can emit fluorescence. To that end, at least two superimposed patterns of light are scanned over the sample. One of the light patterns excites fluorophores for fluorescence emission. The other one, called the depletion pattern, suppresses the emission of fluorescence by transferring fluorophores to a non-fluorescent state (OFF). Typically, the depletion pattern presents a minimum (ideally a zero) of intensity where the excitation pattern presents a maximum, as schematically shown in Figure 1.4b for the two-dimensional (2D) case. The excitation pattern takes the form of a conventional (nearly gaussian) focus while the depletion pattern takes the form of a doughnut-shaped focus. Even though both foci are diffraction-limited, the region of the sample capable of emitting fluorescence photons is effectively reduced. Scanning the excitation and depletion patterns a super-resolved image is obtained. With this method, resolutions of ~ 20 nm have been reported in biological samples, which constitutes an order of magnitude improvement over diffraction-limited microscopy.

In 1994 Prof. Stefan Hell proposed stimulated emission depletion microscopy (STED)¹⁸, the first method of this kind and the first viable physical concept to fundamentally overcome the diffraction limit in lens-based microscopy overall. STED uses stimulated emission as the mechanism to transfer fluorophores from the excited (ON) state to the ground (OFF) state (Figure 1.4c), effectively inhibiting its fluorescence emission. Stimulated emission light is filtered from the fluorescence before reaching the detector so the effective *PSF* of the microscope is greatly reduced (Figure 1.4b). This concept was experimentally demonstrated for the first time in 1999 by Stefan Hell and Thomas Klar¹⁹. A number of techniques like ground-state depletion (GSD)²⁰, saturated pattern excitation microscopy (SPEM)²¹ or saturated (non-linear) structured illumination microscopy (SSIM or NL-SIM)²² were later developed following the same basic concepts of STED for achieving super-resolution but using different mechanisms for controlling the transitions between ON and OFF states.

During the last twenty years of development, several advances have been made in STED nanoscopy, these include: i) multicolor imaging²³, ii) 3D super resolution²⁴, iii) adaptive depletion patterns to minimize light intensities^{25,26}, iv) adaptive optics for applications in deep tissues²⁷, v) combination with intensity-based FRET measurements²⁸.

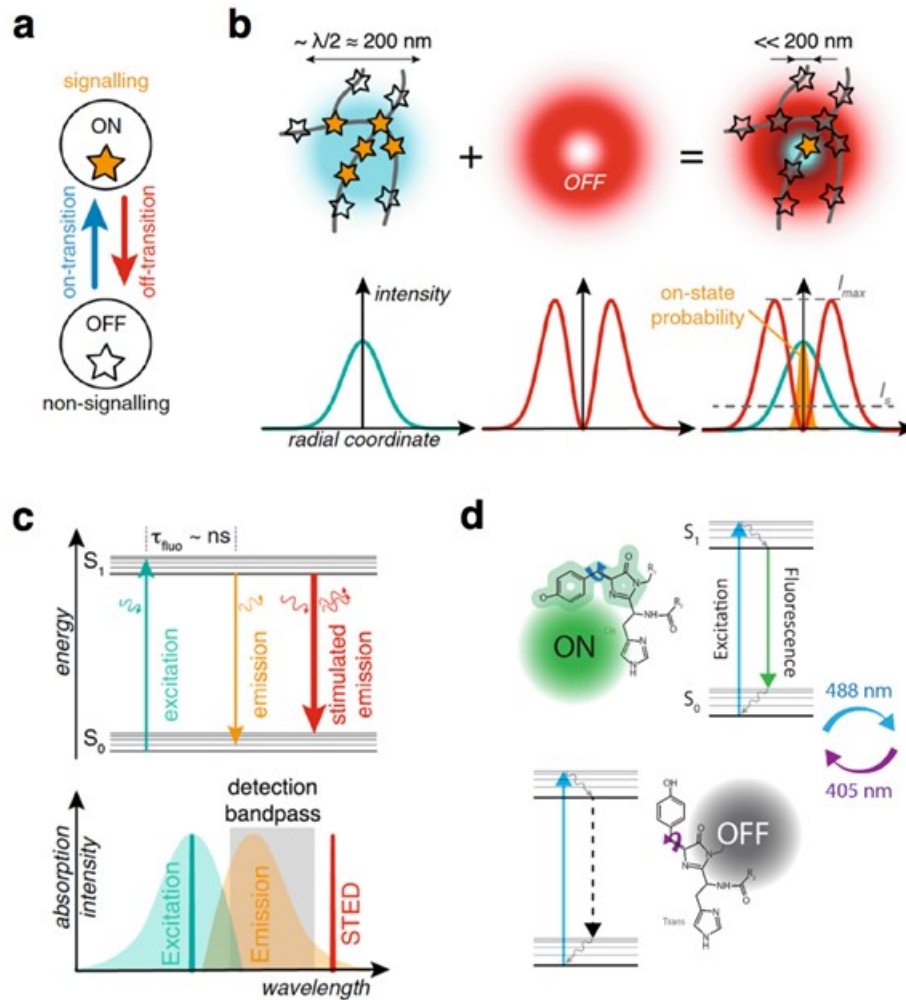


Figure 1.4 Coordinate-targeted fluorescence nanoscopy. (a) Transitions between a fluorescent (ON) state and a non-fluorescent (OFF) state is the key underlying concept in all super-resolution techniques. (b) Conceptual scheme of coordinate-targeted nanoscopy: a depletion beam featuring a minimum of intensity is superimposed with the excitation beam that features a maximum. The depletion beam suppresses the emission of fluorescence in the periphery of the maximum of the excitation beam, thereby reducing the effective area from which fluorescence is detected. (c) STED nanoscopy uses stimulated emission as the depletion mechanism. The depletion wavelength is outside the detection spectral region. (d) RESOLFT nanoscopy exploits the cis-trans photoisomerization of fluorescent proteins by using two different wavelengths, commonly 405 and 488 nm. Figures a-c adapted from ²⁹.

Since its first experimental application in a biological research question³⁰, STED nanoscopy has been increasingly applied in life sciences and currently STED nanoscopes

are commercially available. To illustrate the performance of STED, results of secondary projects on STED imaging that have been conducted in the frame of this PhD work are presented in Figure 1.5. Figure 1.5a shows the membrane-associated periodic skeleton (MPS) in dorsal-root ganglion neurons³¹. This supramolecular structure with a characteristic spacing of 190 nm between protein units is not visible with conventional microscopy. As a secondary project in collaboration with the group of Dr. Alfredo Cáceres (Instituto Ferreyra, Córdoba, Argentina) the role of the MPS during neuronal degeneration was studied. For this purpose, correlative two-color imaging of spectrin (STED, red) and tubulin (widefield, green) was performed (Figure 1.5b). The loss of the MPS was found to be a necessary precondition for axonal degradation, suggesting that it has a crucial role in mechanical stability³².

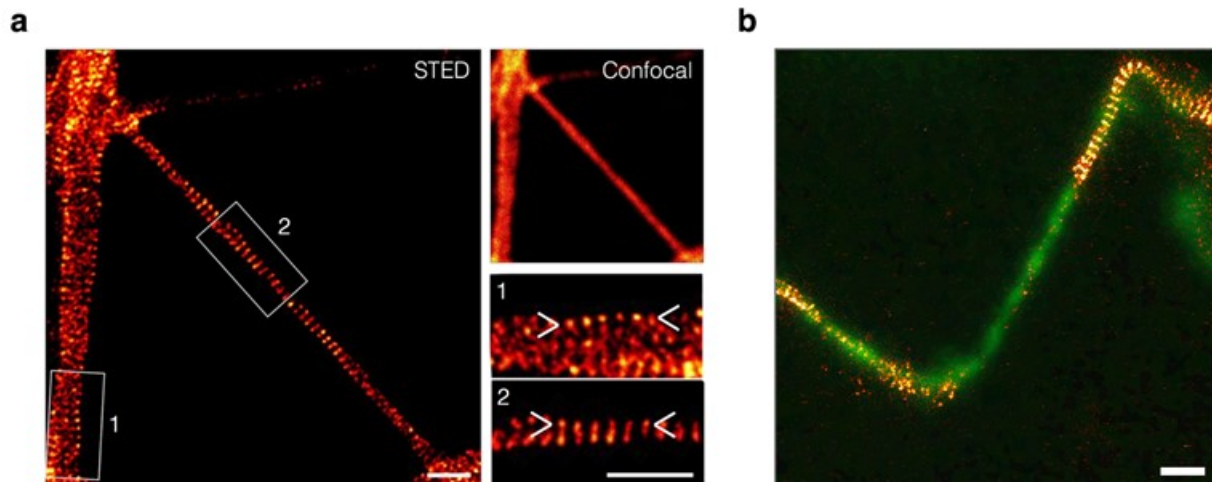


Figure 1.5 STED application examples. (a) Spectrin protein on the membrane-associated periodic skeleton (MPS) in dorsal-root ganglion (DRG) neurons. In the confocal image shown for comparison, no periodic structure is visible. Zoom into areas that present the MPS are displayed in insets 1 and 2. Adapted from ³¹. (b) Two-color imaging of spectrin (STED) and α -tubulin (widefield). Spectrin was labelled with ATTO 647N and α -tubulin with Alexa Fluor 488. Data used in ³¹, image unpublished.

Among the different coordinate-targeted techniques, the method called RESOLFT nanoscopy^{33,34} is especially relevant. Following the same STED principles, RESOLFT uses

reversible photo-induced transitions (cis-trans isomerizations) in reversibly switchable fluorescent proteins (rsFP, Figure 1.4d). RESOLFT allows to image living specimens that express rsFPs (for example mutations of the GFP) at low light levels, making it the method of choice for live-cell imaging where minimizing photodamage may become relevant.

An important aspect of STED and RESOLFT nanoscopy is the temporal resolution. Since both methods are point-scanning techniques the time needed to acquire an image scales quadratically with the FOV as in any scanning method. Moreover, they are intrinsically limited by the switching rate of the fluorescent probes. While in STED the switching mechanism, stimulated depletion of fluorescence, happens in the \sim ns scale, in RESOLFT the cis/trans isomerization takes place in the \sim ms scale, thus making it substantially slower. For example, STED images of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ can typically be acquired within a few seconds and it has even been demonstrated at video-rate speed³⁵ by using fast scanners and reducing the FOV to $2.5 \times 1.8 \mu\text{m}^2$. On the other hand, an equivalent RESOLFT image would take $\sim 5 - 60$ min depending on the fluorescent protein used. Therefore, it is of interest to improve the temporal resolution of RESOLFT, especially since it is arguably the most suitable technique to study biological dynamics through live-cell imaging due to the much lower light doses used compared to STED (5-6 orders of magnitude less) or live-cell compatible single-molecule localization techniques (1-3 orders of magnitude less). The development of a parallelized RESOLFT capable of acquiring images of $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ in about 1 s with ~ 50 nm spatial resolution in living cells was part of this PhD work and will be described in Chapter 2 of this Thesis.

1.6 Single-molecule localization microscopy

Single-molecule localization microscopy (SMLM) techniques consist of constructing a super-resolved image from the previously determined positions of each fluorophore of the sample (Figure 1.6). Although the image of a single isolated fluorophore has an intensity

pattern given by the *PSF* of the optical system, its position can be determined with an uncertainty well below the diffraction limit. This localization precision scales with the inverse squared root of the number of collected photons³⁶. Conventional fluorescence microscopy images result from the overlapping signals of all the illuminated markers (Figure 1.6b). Stochastic localization techniques gain resolution by separating markers along the temporal dimension and for that they rely on fluorophores that can be switched between a fluorescent (ON) state and a non-fluorescent (OFF) state. Molecules within a diffraction-limited region can be activated at different times, individually imaged and localized.

In a typical acquisition (Figure 1.6c), fluorescent markers are initially in the OFF state and a random set is switched on in a sufficiently low concentration to make the individual imaging possible. While they are ON, they emit photons that are detected with a high-sensitivity camera so that each single-molecule image can be localized with sub-diffraction precision. Then these fluorophores are switched OFF and the process is iterated with a new random set of markers until a sufficiently large number of the molecules of the sample has been imaged. Finally, a super-resolved image is built from the localizations gathered from the whole acquisition (Figure 1.6d). Because the localization precision is better than the diffraction limit, the reconstructed image has a better resolution than conventional fluorescence images. SMLM can be extended to 3D by introducing optical elements that produce a z -dependent *PSF*, and thus allowing to retrieve the (x, y, z) coordinates of the single emitter^{37,38}.

The different SMLM techniques differ in their switching mechanism. Photoactivatable localization microscopy (PALM)^{39,40} is based on fluorescent photoactivatable proteins that can be activated with light of a certain wavelength and then excited with a different wavelength. Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return (GSDIM)⁴¹ works with standard fluorophores and use the triplet state of the molecule as the dark state. Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)^{42,43} uses synthetic fluorescent molecules that can switch photochemically to a dark, reversible long-lived

state. Finally, point accumulation for imaging in nanoscale topography (PAINT)^{44,45} relies on the transient binding of markers to the structure of interest.

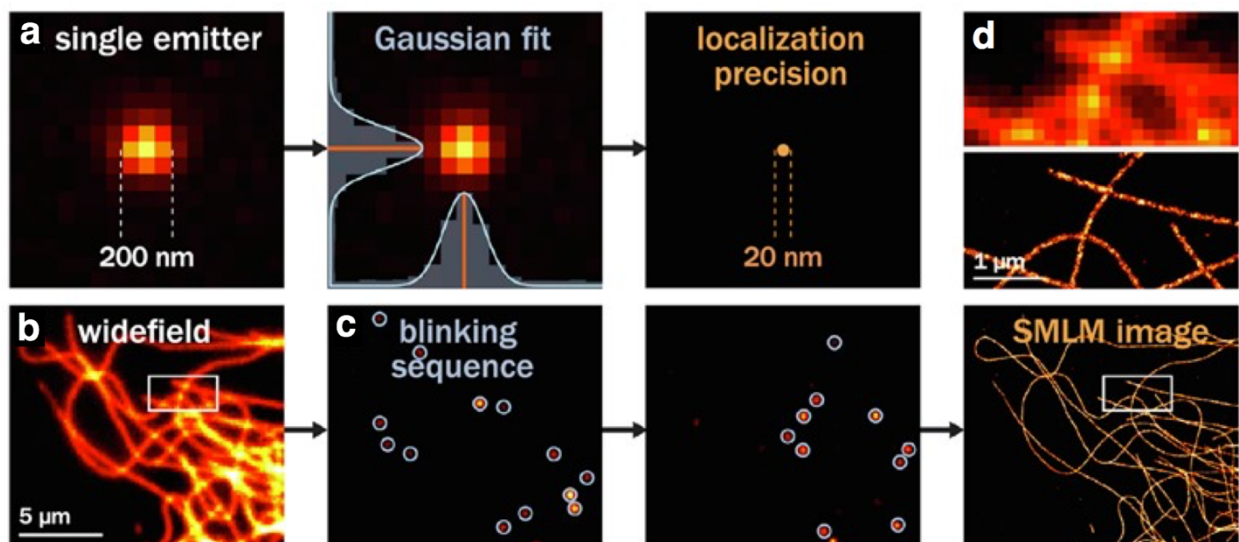


Figure 1.6 Single-molecule localization microscopy (SMLM). (a) Diffraction-limited image of a single fluorescent molecule. A fit of a Gaussian function allows to estimate the position of the single emitter with a precision better than the diffraction limit. (b) Wide-field, diffraction-limited image of a subcellular structure. All fluorescent molecules in the sample are in the ON state. (c) After transferring ideally all molecules into the dark (OFF) state, small subsets of sparse single molecules are recovered into the ON state. Single molecules are imaged individually in a time sequence and finally all the estimated positions are rendered into a super-resolution image. (d) SMLM image provides a significant resolution improvement compared to its diffraction-limited counterpart. Adapted from ⁴⁶.

Typical localization precisions achieved with conventional SMLM are in the range $\sim 10 - 30$ nm in the lateral dimensions and $\sim 20 - 60$ nm in the axial dimension. Following a criterion equivalent to Rayleigh's, resolution is thus a factor of ~ 2 worse than the achieved precision. A well-established formula⁴⁷ that estimates the localization precision, σ_{loc} , as a function of experimental parameters is:

$$\sigma_{loc}(N) \gtrsim \sqrt{\frac{2\sigma_a^2}{N} \left(\frac{16}{9} + \frac{8\pi\sigma_a^2 b^2}{Na^2} \right)} \quad (1.5)$$

With $\sigma_a^2 = \sigma_{PSF}^2 + a^2$, where $\sigma_{PSF} = \frac{FWHM}{2.35} \approx \frac{\lambda}{4.7 NA}$ for the Gaussian image of the single molecule. For visible light and objectives of $NA = 1.2 - 1.5$, typically $\sigma_{PSF} = 80 - 150$ nm; a is the size of the camera pixel divided by the magnification of the microscope, b^2 are the expected background photons per pixel and N are the total fluorescence composing the image of the molecule. We note, that although this formula provides a very useful estimation of the expected localization precision, it was derived modelling the noise of the electron multiplication process and readout typical of an EM-CCD camera. Other type of noise models should be used for detectors based on different physical principles, such as sCMOS cameras for example.

In summary, for a given wavelength and NA , the most important limiting factors in SMLM are: i) the limited number of detected photons per single emitter, typically $N \sim 10^2 - 10^3$ for a switchable fluorescent protein and $N \sim 10^3 - 10^4$ for an organic fluorophore; ii) the sensitivity/noise in the detectors used; and iii) the physical size of the labelling probe which should be much smaller than the desired achievable resolution.

SMLM has the advantage of being relatively simple in terms of hardware and instrumentation compared to STED/RESOLFT and has therefore become by far the most widely used super-resolution method. With many custom-made set-ups around the world, a variety of commercial systems and even low cost ($\sim 5K - 30K USD$) implementations⁴⁸⁻⁵⁰, SMLM is being applied to a vast variety of biological problems.

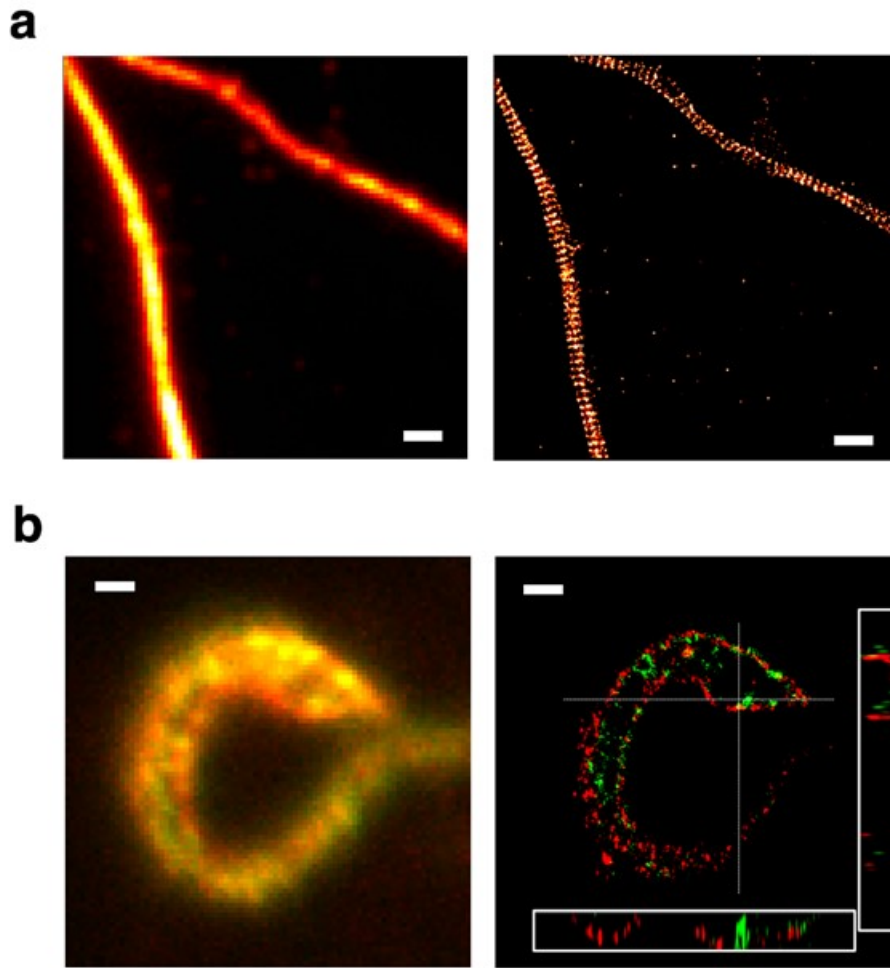


Figure 1.7 SMLM application examples. (a) One-color widefield (left) and 2D STORM (right) of the spectrin protein distributed in the membrane-associated periodic cytoskeleton. Spectrin protein is labelled with Alexa Fluor 647. Data used in ⁵¹, unpublished image. (b) Two-color widefield (left) and 3D STORM (right) of mucin (green) and trans-sialidase (red) proteins in a *Trypanosoma cruzi* parasite. Mucin is labelled with Alexa Fluor 565 and trans-sialidase is labelled with Alexa Fluor 647. XZ and YZ cuts are displayed in the insets (white boxes). Axial depth is 600 nm. Unpublished data. All scale bars: 1 μm .

It is important to note that the temporal resolution is intrinsically limited in SMLM techniques due to the sequential recording of the position of the single molecules. In fact, it could be considered that the spatial resolution improvement of SMLM comes at the expense of higher acquisition times. Typical acquisition times lie in the order of several

minutes to dozens of minutes. Live SMLM (mainly PALM) applied to imaging is still very challenging and very few successful applications have been reported (see for example^{52,53}). In practice, the vast majority of SMLM studies are done in fixed samples.

To illustrate the performance of SMLM, some results of secondary projects on STORM imaging that have been conducted in the frame of this PhD work are presented In Figure 1.7. Figure 1.7a shows one-color 2D STORM imaging of the spectrin organization in the MPS of hippocampal neurons. As part of this project, the MPS was Imaged by STED and STORM and an open-source software for the analysis of images of periodic supramolecular structures was developd⁵¹. Another example is shown in Figure 1.7b. Two-color 3D STORM imaging enabled the visualization of the nanoscale organization of mucin (green) and trans-sialidase (red) proteins in the membrane of *Trypanosoma cruzi*. While, from conventional fluorescence microscopy and standard colocalization analysis⁵⁴ it could in principle be concluded that these two proteins largely colocalize in the membrane of the parasite, super-resolution STORM microscopy allows to resolve the distinct clusters of these proteins in the membrane and study their size, distribution and relation. These results were part of a collaboration with Dr. Oscar Campetella group at IIB-UNSAM (Buenos Aires, Argentina) and are not yet published in a peer-reviewed journal.

1.7 Sub-10 nm super resolution microscopy

The resolution limit reached by the first generation of super-resolution methods, both SMLM and coordinate targeted, is determined by the total number of detectable fluorescence photons, i.e. by the photostability of the fluorophores. Then, conceptually, there are two possible ways to circumvent this limitation: obtaining more fluorescence photons from a given position in the sample or extracting more information from the limited photon budget. Recently, both strategies have been explored. One way to obtain more fluorescence photons from specific positions of a sample is through DNA-PAINT. Here, programmable transient hybridization of short, fluorescently labelled single-

stranded DNA sequences is exploited to interrogate positions of the sample with multiple fluorophores, and virtually unlimited fluorescence photons^{45,55}. DNA-PAINT, combined with localization algorithms analogous to the ones used in other stochastic nanoscopy techniques, provides a spatial resolution well below 10 nm^{56–58}.

A strategy to obtain higher localization precisions with limited photon budgets was reported during the development of this PhD Thesis. The so called MINFLUX method⁵⁹ combines concepts of coordinate targeted and coordinate stochastic nanoscopies to attain 1-nm resolution. The publication of MINFLUX inspired the development of a series of techniques using structured illumination to inject information in the localization process. While these techniques should be considered single-molecule localization techniques, they differ from the first generation of stochastic methods in that the illumination used is not homogenous but carefully structured to enhance the localization precision. Here we choose to describe them as a family of techniques under the name of single-molecule localization with sequential structured illumination (SML-SSI). SML-SSI methods hold potential to become the methods of choice to access the sub-10 nm resolution scale with limited photon budgets.

1.8 Single-molecule localization with sequential structured illumination

Within the last 5 years a new family of methods has emerged which we will call single-molecule localization by sequential structured illumination (SML-SSI). Some of these methods have recently been reviewed⁶⁰ and are the main frame in which the work of Chapters 3, 4 and 5 of this Thesis has been developed.

SML-SSI methods use the key principle of SMLM microscopy: the stochasticity of the ON/OFF transitions such that only signal from **one molecule at a time is measured** and its position estimated. But, unlike camera-based SMLM, they enhance the information rate (information *per photon*) that the measurement provides by Interrogating the

molecular position with a sequence of structured illumination patterns. Also, SML-SSI do not require camera detectors and can be performed with point-like detectors such as avalanche photodiodes.

SML-SSI methods can be regarded as consisting of **two independent measurements**: i) The measurement of the excitation light patterns which is typically done with fluorescent nanoparticles and can be repeated so that is practically unlimited in SNR and ii) The SNR-limited measurement of the photons coming from the single fluorescent emitter ($N \sim 10^2 - 10^4$). This is a key distinction with camera-based SMLM and coordinate-targeted techniques in which the precise and accurate knowledge of the excitation light is not related to the achieved resolution in such a direct way.

By using the information of the excitation pattern, the localization precision can be enhanced either in the lateral or the axial dimension by factors ranging from 2- to 10-fold with respect to standard camera-based SMLM, thus reaching the sub-10 nm scale range.

1.8.1 Maximally Informative Luminescence Excitation (MINFLUX)

Maximally Informative Luminescence Excitation (MINFLUX) was the first method to explicitly merge single-molecule localization with sequential structured illumination patterns of light that excite the emitter within one ON-state event. By using four exposures to a doughnut-shaped beam, the position of a fluorophore is inferred from the registered photon counts corresponding to each exposure (Figure 1.8a). Three of the exposures are organized in a triangular pattern, and the fourth exposure is placed in the center. MINFLUX is the most photon-efficient single molecule localization method reported so far. It can reach localization precisions equivalent to SMLM counterparts using $\sim 20 - 100$ times less photons, or, alternatively, increase the localization precision well below 10 nm by using only $N \sim 500 - 1000$ detected photons.

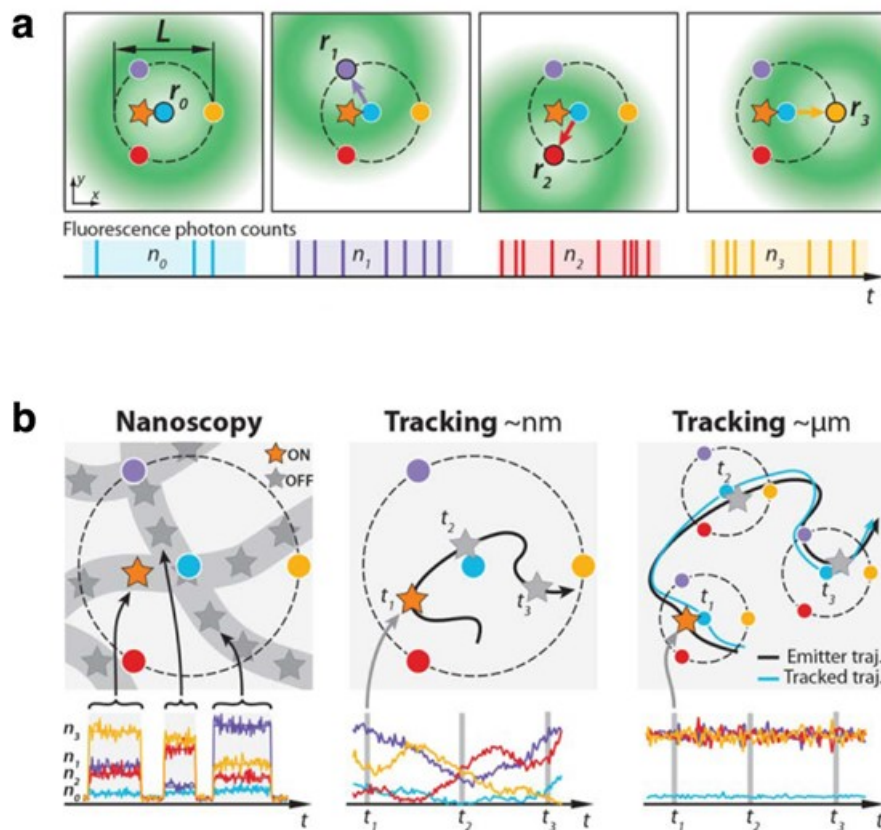


Figure 1.8 Maximally Informative Luminescence Excitation (MINFLUX). (a) The intensity of the excitation beam is modulated and deflected such that it is sequentially placed at the four focal plane positions (denoted by blue, violet, red, and yellow dots), which delimit a measurement area of diameter L . Photons emitted by the fluorescent molecule (star) are detected with a single-photon counting sensor for each doughnut position (n_0, n_1, n_2, n_3) and are then used to extract the molecular location. (b) Different MINFLUX applications: i) nanoscopy, ii) nanometer-scale tracking, iii) micrometer-scale tracking. Adapted from ⁵⁹.

As for any other method of single-molecule localization, the achievable localization precision of MINFLUX depends on experimental parameters such as SNR and SBR. Interestingly, in MINFLUX there is no fundamental limitation related to the light wavelength or the NA of the microscope. The localization precision generally follows the approximate relation $\sigma \sim \frac{L}{\sqrt{N}}$ where L is a geometric parameter defining the size of the excitation pattern (Figure 1.8a) and N is the total number of detected photons in the

four exposures. The parameter L controls the resolution. Using sub-diffraction values of L , typically in the range of 50-100 nm, localization precisions of a few nm can be reached with moderate photon counts. Ultimately, for a given number of detected fluorescence photons N , the achieved localization precision will be determined by the *SBR* because it imposes a limit to minimum usable L . Uncorrected mechanical drifts during the measurement may also place a limit to the achievable localization precision. At the moment of writing this Thesis, MINFLUX is the only fluorescence microscopy method that can routinely achieve ~ 1 nm localization precision with $N \leq 1000$ detected photons using standard fluorescent molecules and only relying on a linear fluorescence emission process, far from saturation.

As depicted in Figure 1.8b, single-molecule localization by MINFLUX can be used for at least three applications: i) in combination with stochastic ON-OFF blinking, super-resolved images can be obtained by localizing molecules one at a time.; ii) the trajectory of a single molecule can be tracked within the localization region of size L (nanometer-scale tracking); and iii) if the emitter leaves the initial L -sized area, the excitation pattern can be periodically re-centered to the last estimated position of the molecule to perform tracking on longer scales (micrometer-scale tracking).

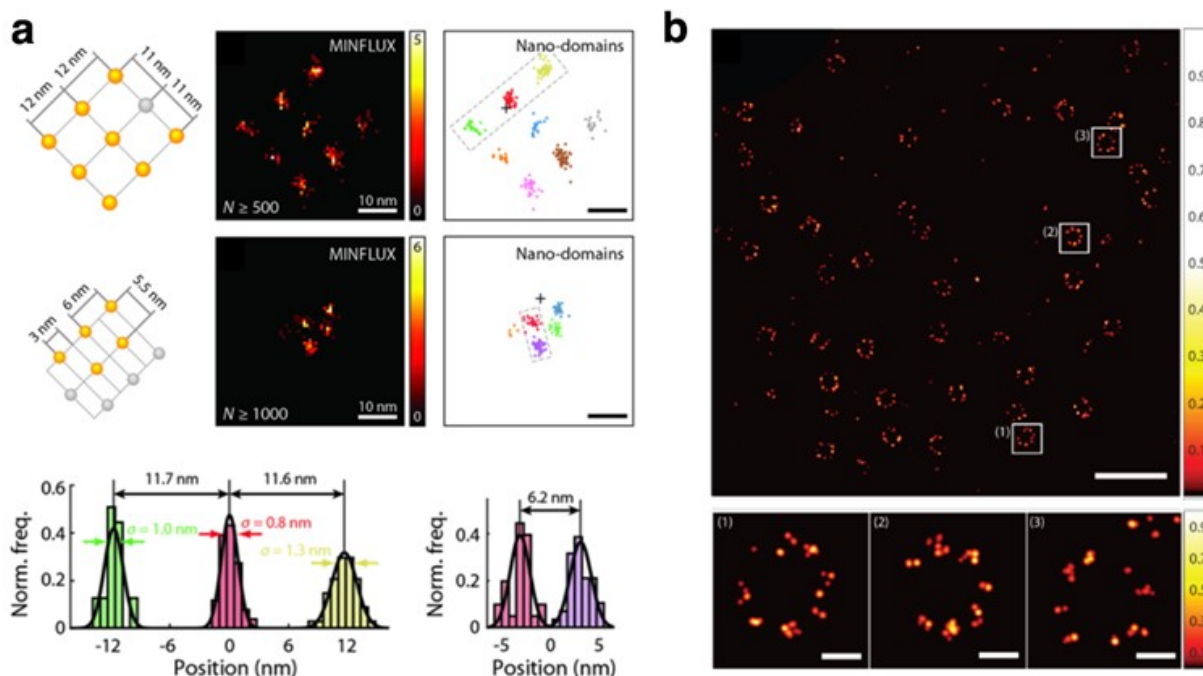


Figure 1.9 MINFLUX applications. (a) DNA-origami structures with Alexa Fluor 647 fluorophores 12 nm and 6 nm apart are fully resolved by MINFLUX. Adapted from ⁶¹. (b) Nuclear-pore complex (NPC) imaged with MINFLUX. The 8-fold structure and the sub-units separated by ~ 12 nm are clearly resolved. Resolution in this case is mostly limited by the size of the labels. Adapted from ⁶².

MINFLUX has been demonstrated in model systems (DNA-origami structures)^{61–63} as shown in Figure 1.9a, fixed and living cells^{61,62,64} as shown in Figure 1.9b, and was recently extended to three-dimensions⁶². Moreover, several applications in biological systems have been published recently^{64–66}.

In MINFLUX, signal coming from single molecules in the ON-state outside the useful *ROI* can be wrongly interpreted and lead to false localizations. This was overcome by a fast (100- μ s scale) on-line adaptive scheme in which the ON/OFF transition of the molecules is driven by an activation 405 nm laser^{62,67}. A pre-localization using gaussian beams is performed in a ~ 200 nm area and then successive zooms are performed with doughnut-shaped beams in order to efficiently localize the molecule.

Once an area has been interrogated and sufficient molecules have been recorded, the excitation pattern is moved to the next area and the sequence is repeated. By using this procedure following a grid, images with larger *FOV* can be acquired. The procedure is, however, very slow in practice, leading to acquisition times of ~ 60 min for *FOV*s of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. A parallelized version of MINFLUX should be possible but it has not been implemented yet.

MINFLUX original experimental implementation is based on complex hardware involving multiple real-time FPGA-based scanning systems and multiple illumination systems and several lasers for auxiliary purposes (for a sketch of the setup see Figure S13 from ⁵⁹). On the other hand, none of the control or analysis software is open source nor available publicly. Because of these reasons and because of the high cost of the commercial version, although representing a breakthrough in fluorescence nanoscopy, the widespread use of MINFLUX has been slowed down.

Very recently, the company exploiting the technological transfer of the original MINFLUX microscope published an article describing the technical details and capabilities of the commercially available version⁶⁷. In Chapter 4 of this Thesis, a new, open-source implementation of MINFLUX is described, which is based on a much simpler set-up that achieves the same spatial localization precision as the original implementation at the time it provides higher temporal resolution and access to fluorescence lifetime information⁶⁸.

1.8.2 Camera-based, widefield single-molecule localization methods using structured illumination

To overcome the limitations in *FOV* and acquisition speed inherent to current MINFLUX implementations, wide-field camera-based versions of SML-SSI have been developed. Three research groups developed independently SIMPLE⁶⁹, ROSE⁷⁰ and SIMFLUX⁷¹ which, despite the differences in the technical implementations, share the same concept

in common: they use interference patterns in two orthogonal directions (Figure 1.10a) and at least two exposures in each direction (Figure 1.10b) to infer the position of the molecules with an enhanced localization precision that results in a factor of ~ 2 times better than a traditional SMLM counterpart (Figure 1.10c).

In contrast to MINFLUX, the enhancement in localization precision in SIMPLE/SIMFLUX/ROSE are limited by the minimum pitch of the interference pattern, which is limited by diffraction. A higher localization precision is possible⁶⁹ by shifting the patterns by smaller distances but in this configuration only an effective sub-area of the *FOV* is useful despite all fluorophores are illuminated simultaneously. To complete the precise localizations in all the illuminated region, several acquisitions would have to be performed in series, resulting in a time- and photon-consuming measurement. Nevertheless, although it has not been realized, we note that such an approach could be implemented in combination with DNA-PAINT in which the ON-OFF events are virtually infinite. A successful implementation of SIMPLE/SIMFLUX/ROSE with a precision enhancement better than a factor of ~ 2 is yet to be implemented.

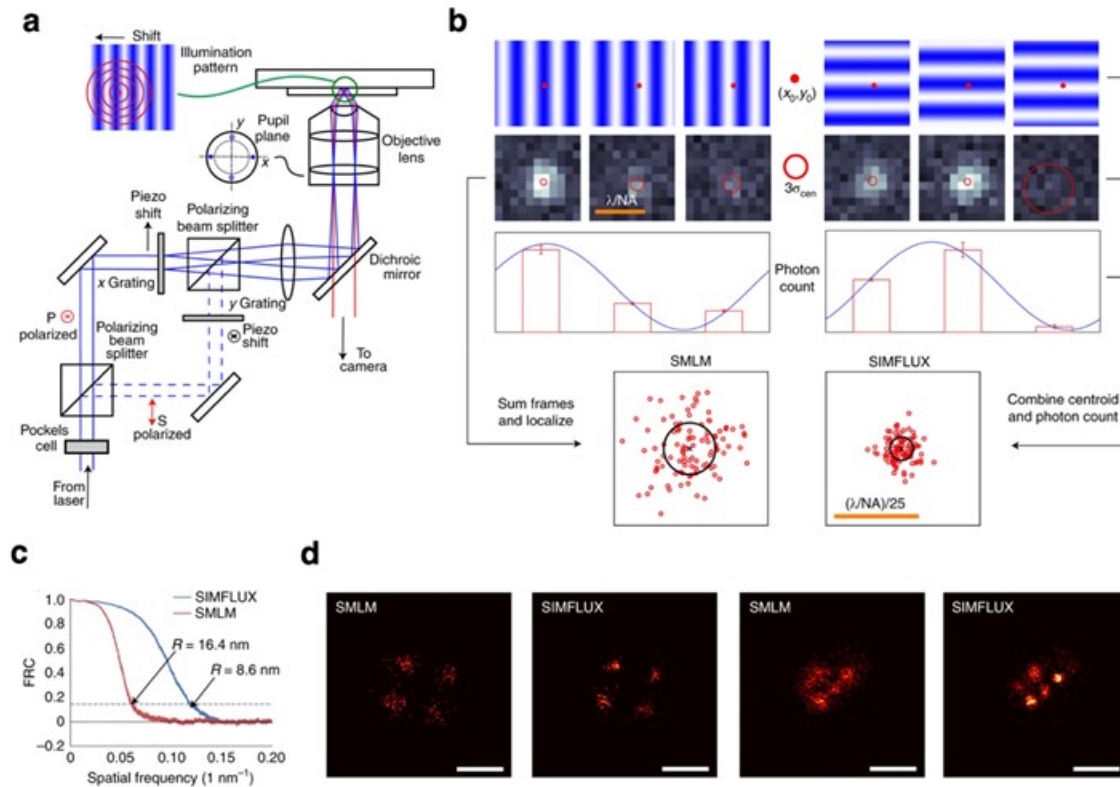


Figure 1.10 SIMFLUX. (a) A sinusoidal illumination pattern is created in a total internal reflection setup by two coherent counter propagating evanescent waves. Fast switching between two orthogonal line patterns is achieved by placing two piezo-mounted gratings in the two arms of a polarizing beam splitter, selecting the operational arm by a polarization switching Pockels cell. (b) An arbitrary set of images are recorded for each orientation of the orthogonal patterns. In ⁷¹, three images per direction, a total of six images, were used. Combining the centroid estimates of all the acquired frames with the photon count in relation to each pattern shift improves the localization precision by a factor of around two. (c) Fourier-ring correlation curves with resolution values R . (d) SMLM and SIMFLUX images of DNA-origami grids with 40 nm (left) and 20 nm (right) spacing between binding sites. Scale bars: 50 nm. Adapted from ⁷¹.

While SIMFLUX/ROSE/SIMPLE provide an enhancement in the lateral precision of the localizations, the potential axial precision remains unchanged from standard SMLM.

Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy is a well-known wide-field approach to increase the contrast in fluorescence microscopy that was first demonstrated⁷² by D. Axelrod in 1981. In TIRF, the sample is illuminated in total internal reflection,

thus effectively exciting the fluorophores with the evanescent components of the electromagnetic field. TIRF microscopy is a common tool used in SMLM to increase SBR at the expense of imaging the sample close to the coverslip. Axial localization precision can be improved by taking into account the depth-dependent illumination and collection efficiency that is produced in TIRF conditions (Figure 1.11a). This approach called SIMPLER⁷³ provides isotropic sub-10 nm localization precision when combined with DNA-PAINT and is easy to implement in any TIRF fluorescence microscope, holding potential to be quickly adopted in any microscopy lab with a TIRF-SMLM set-up. Analogously to MINIFLUX, the increase in localization precision comes at the expense of *FOV*, in this case limited by the TIRF conditions to $\sim \lambda/2$ from the interface.

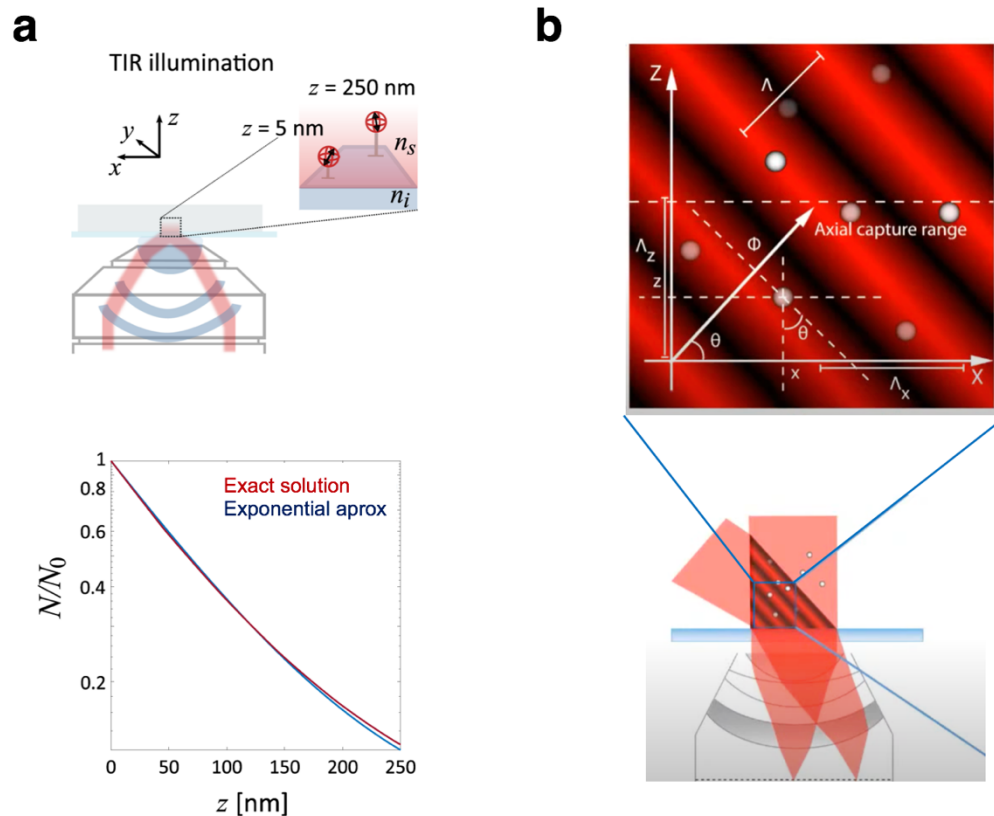


Figure 1.11 SIMPLER and ModLoc. (a) The exponential decay of the illumination intensity in TIRF microscopy, together with a model of the z -dependent emission of the fluorophores can be used to estimate the single-molecule axial position by counting the number of detected photons.

Adapted from ⁷³ (b) Three-dimensional interference patterns can be used to excite single emitters, by modulating the phase of the patterns and performing sequential illumination, the (x, y, z) coordinate of the fluorophores can be estimated. Adapted from ⁷⁴.

Two other approaches have been developed to increase the localization precision in the three spatial dimensions: ModLoc⁷⁴ and ROSE-Z⁷⁵. In both methods different interference patterns that have spatial variations in (x, y, z) are engineered (Figure 1.11b). By introducing different phases in a sequence of exposures, the position of single emitters can be inferred with enhanced precision in three dimensions. Compared to SIMPLER, ROSE-z and ModLoc have the advantage of not being limited to imaging close to the coverslip but have the disadvantage of requiring a much more complex specialized hardware and a careful and laborious characterization of the interference patterns.

1.8.3 Minimal STED (MINSTED)

Minimal STED (MINSTED)⁷⁶ is a very recently reported method that combines the concept of localizing single-molecules with sequential structured illumination with a sub-diffraction effective PSF_{eff} provided by STED nanoscopy (Figure 1.12a). The molecule is excited with the flank of the PSF_{eff} as a compromise between sensitivity and SBR ⁷⁷ (Figure 1.12b). The localization measurement consists of registering the fluorescence signal as the sub-diffraction PSF performs a circular scan around the target single fluorescent (Figure 1.12c). The MINSTED illumination is updated in real-time using feedback loops programmed in FPGA electronics in order to continuously reduce the distance between the single-emitter and the effective excitation beam. The position of the emitter is inferred through a specific and *ad hoc* estimation analysis.

Figure 1.12d shows the localization of a single immobilized ATTO647N molecule. The iterative re-positioning of the beam after each detected photon is plotted. The distribution of localizations inside the region delimited by the diameter d_{min} is used to estimate of the

localization precision. MINSTED precision has been characterized through both simulations and experiments and it is very similar to the one achieved by MINFLUX, reaching $\sim 1 - 3$ nm localization precision with $N \leq 2000$ detected photons.

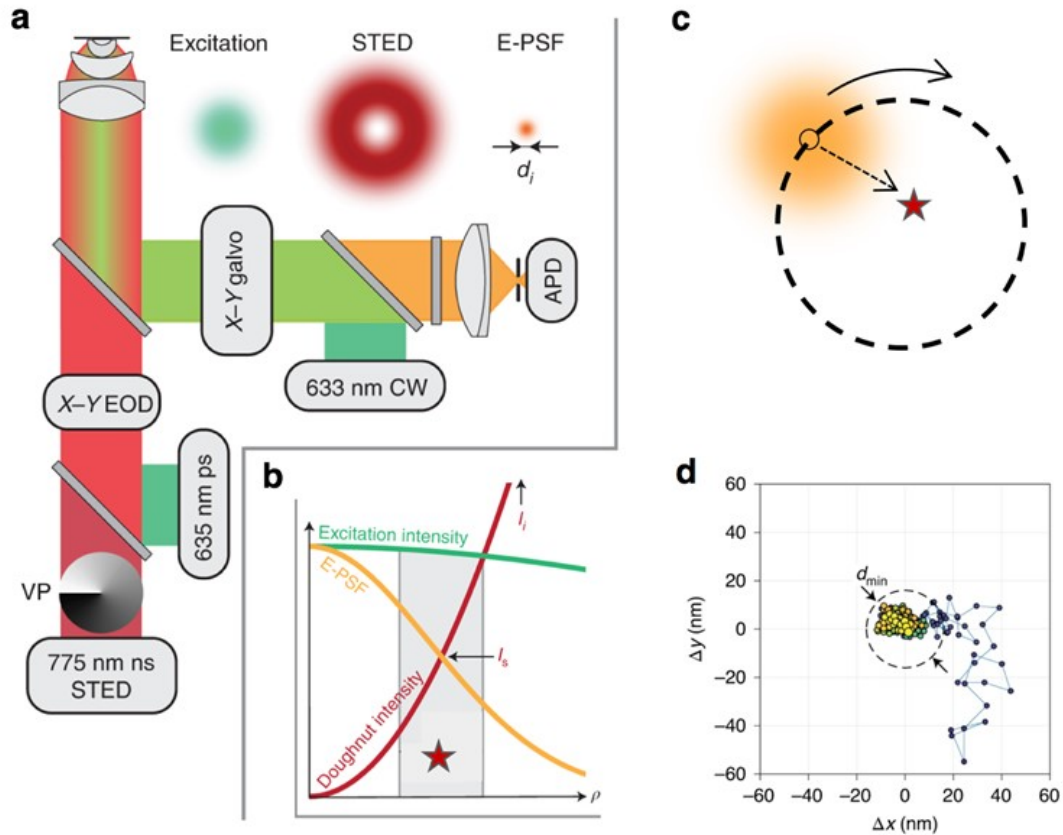


Figure 1.12 MINSTED. (a) Simplified sketch of the MINSTED setup (b) Normalized probability of excitation (green) and fluorescence detection, i.e. effective PSF (PSF_{eff} , orange) as a function of radial distance ρ from the focal point, along with a non-normalized intensity profile of the STED beam doughnut (red). (c) The PSF_{eff} (orange) orbits around the single-emitter. (d) Iterative estimations of the emitter position. Adapted from ⁷⁶.

However, MINSTED is arguably even more complex than MINFLUX because of three reasons: i) three different photophysical processes are involved (photoswitching, fluorescence and stimulated depletion), ii) two fast scanning systems have to be operated synchronically, one using electro-optical deflectors for the illumination beams and one

using galvanometric mirrors for the detection, iii) in its current implementation, operations in the FPGA are carried out every time a photon is detected, performing the real-time repositioning updates in the $\sim 10 - 100 \mu\text{s}$ range thus requiring a very fast and highly precise electro-optical response.

1.9 Orbital Tracking

In 2000, before the advent of SMLM, and by the time of the first experimental STED demonstrations, a method to track the motion of particles or single fluorescent molecules in 2D called Orbital Tracking (OT) was theoretically proposed⁷⁸ and later implemented experimentally in a multitude of situations including 3D tracking and combinations with fluorescence correlation spectroscopy^{79–83}. In OT, the fluorescence signal from a single particle or molecule is registered for a number of positions a focused laser beam along a circular trajectory of around the target molecule or particle (Figure 1.13a). Other methods of single-molecule tracking based on multiple expositions of displaced focused beams have also been reported, such as the four-focus single-particle position determination^{84,85}, a method analog to MINFLUX but using maxima of light. To the best of our knowledge, these localization techniques developed for tracking have not been combined with single-molecule blinking in order to obtain super-resolved images.

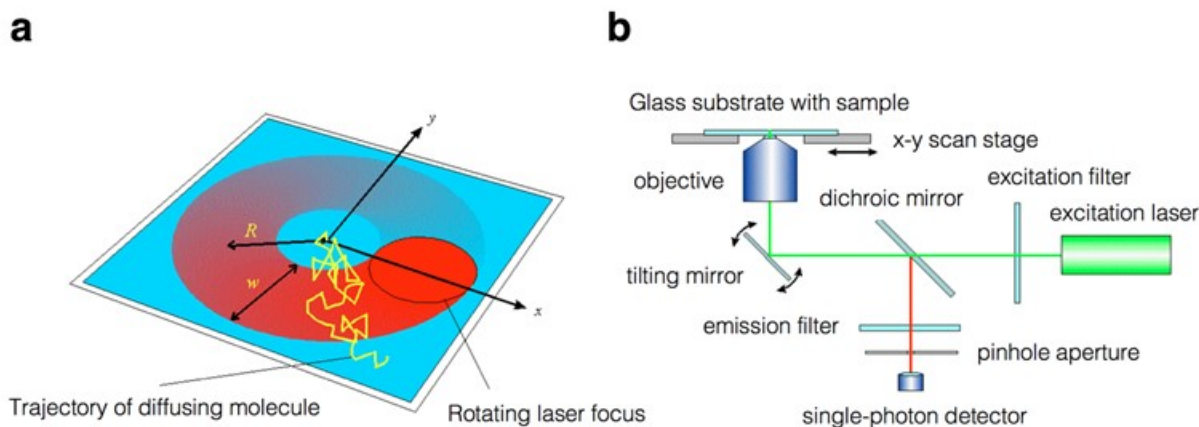


Figure 1.13 Orbital Tracking. (a) A laser focus rotates around (orbits) a single emitter, the detected light intensity is recorded, and the position of the emitter can be estimated analyzing the detected signal. (b) First proposal of an experimental implementation of OT. A tilting mirror is used to move the laser in an orbit, excitation and detection are the same as in a typical confocal microscope. Adapted from ⁷⁸.

Orbital Tracking (OT) has been implemented in different setups based on modified laser-scanning microscopes (Figure 1.13b) and its localization precision has been studied both theoretically and experimentally^{86,87}. Initial works report a lateral precision of $\sigma_{xy} \sim 15$ nm with $N \sim 1000 - 2000$ detected photon counts^{86,87}. However, we note that in more modern set-ups higher precisions have been reported, namely $\sigma_{xy} \sim 4$ nm with $N \sim 1000 - 2000$ photon counts⁸¹.

While OT is not considered a super-resolution method, we note that, if combined with an ON/OFF stochastic switching, it could be used for nanoscale imaging as it has been done with MINFLUX or MINSTED. Actually, the same way that the localization of a single molecule by fitting its image to a Gaussian model does not constitute *per se* a super-resolution method, the OT localization method does not either. However, beyond the technical differences, localization schemes using sequential structured illumination are profoundly related. We will demonstrate and develop this concept extensively in Chapter 3 of this Thesis.

Chapter 2 – Parallelized RESOLFT nanoscopy in living cells with enhanced sensitivity and resolution

Observing the interplay of organelles and macromolecular complexes inside living cells and tissues calls for the continuous development of minimally invasive optical systems performing at high spatio-temporal resolution. Nowadays, the spatial resolution of fluorescence nanoscopy approaches the nanoscale (1 – 50 nm) by optically controlling the ability of molecules to fluoresce either in a deterministic or stochastic fashion^{39,40,42,56,59,88}. However, the current approaches to fluorescence nanoscopy, even if powerful, are often limited by the requirement of high doses of light, small fields of view, or slow recording times.

The problem of high illumination doses was partially overcome by using reversibly switchable fluorescent proteins (rsFPs)^{89–94} in approaches like Reversible Saturable Optical Fluorescent Transition (RESOLFT)^{33,34,95} as it was explained in Section 1.5. The coordinate targeted fluorescence ON/OFF switching of the rsFPs requires intensities in the range of W–kW/cm² to produce images with sub–100 nm spatial resolution. However, RESOLFT implementations based on a confocal microscope need very long recording times for moderately large fields of view.

Advanced Wide-Field (WF) RESOLFT implementations^{96,97} can reach relatively fast acquisitions of large fields of view. WF-RESOLFT has been implemented with the following illumination sequence: i) fluorescent proteins are activated (switched ON) with a uniform widefield illumination, ii) they are partially transferred to a dark state (switched OFF) with the superposition of two incoherent interference patterns of period $\sim \lambda/2NA$

that produce zero-intensity points at the intersections of their zero-intensity lines, iii) the rsFPs in the bright state are excited with another uniform widefield illumination. This way, emission areas below the diffraction limit are generated. Super-resolution images are reconstructed by scanning the sample with respect to the stationary array of zeros while detecting the fluorescence with an array of sensors (sCMOS camera).

However, the full potential of a parallelized RESOLFT approach has not been exploited: WF-RESOLFT imaging has been mostly limited to bright cellular structures in 2D. This limitation stems from the fact that the uniform illumination used to switch ON the rsFPs causes unnecessary switching and generates signal from out-of-focus planes of the specimen, which hampers the image contrast in 3D samples. Furthermore, since the parallelization, is determined by the OFF-switching pattern periodicity, even the signal generated by adjacent emitting spots in the focal plane is severely affected by crosstalk, especially in a highly parallelized implementation.

Other approaches such as Non-Linear Structured Illumination Microscopy^{21,22,98} and its recent implementation featuring Patterned Activation⁹⁹ also minimizes the illumination dose if applied to rsFPs¹⁰⁰. In those methods, the super resolution information is encoded in the frequency space of the image and therefore has to be extracted through intensive image processing, which is prone to artifacts¹⁰¹. This is especially relevant in dim structures with low signal to noise ratio (SNR) such as in cells exhibiting endogenous levels of rsFP fusion expression and in 3D samples where signal-to-background (SBR) is low in a widefield detection. A nanoscope able to record robust raw data rapidly and with sub-100 nm spatial resolution across the entire 3D space of cells and tissues is still missing.

To overcome these limitations, we developed MoNaLISA (Molecular Nanoscale Live Imaging with Sectioning Ability), a parallelized RESOLFT nanoscope where the ON-switching and the excitation light are spatially modulated in a multi-foci array to enhance sensitivity and resolution allowing for the first time to capture the internal dynamics of

an entire living cell with ~ 1 s temporal resolution. The results presented in this chapter have been published in a peer-reviewed article¹⁰².

2.1 Concept and overview

MoNaLISA imaging is performed with a sequence of pulse-interleaved, spatially modulated beams (CW lasers, modulated in the \sim ms time scale). The illumination sequence is as follows: i) an ON-switching (activation) array of focused spots, which we will call “multifocal array” activates the rsFPs in confined regions, ii) an array of zeros of light intensity switches OFF the periphery of the activated rsFP, effectively confining the emitting proteins to a sub-diffraction area, iii) another multifocal array excites the fluorescence of the proteins in the bright state thus generating the readout signal. A 1D representation of the illumination patterns is represented in Figure 2.1a and a 2D representation is depicted in Figure 2.1g.

The OFF-switching pattern, responsible for the sub-diffraction resolution, is essentially the same as in WF-RESOLFT and features standing waves with intensity minima at a periodicity $P_{SW} \sim \lambda/2NA$. In principle, a P_{SW} as small as possible (highest NA) is desirable because a steeper interference pattern allows to use less total light on the sample to drive the proteins into their dark state. This way less light is delivered into the living cells, reducing possible photodamage. Both ON-switching and readout patterns are composed of a square grid of N individual foci^{103,104} separated by a distance P_{MF} , such that $P_{MF} = k P_{SW}$, where k is an integer. These alignment of the illumination sequence, generates a square array of effective sub-diffraction emitting spots with a periodicity dictated by $P_{MF} = k P_{SW}$. The emitting spots are imaged into an array of sensors (camera) and the signal is acquired by scanning the sample with respect to the stationary array of activation/readout foci, such as it is done in a parallelized confocal microscope¹⁰⁴. Due to the parallelization, the stage scanning consists only of a small area $A_{scan} = P_{MF}^2 = k^2 P_{SW}^2$.

In conventional confocal microscopy a pinhole is added in front of the detector to filter out-of-focus background. When using a camera as photodetector, a straightforward way to obtain the equivalent to a pinhole filter is to computationally select the pixels from which the signal will be extracted and discard the signal from other pixels. This operation is analogous to a detection with a physical pinhole aperture and will be referred to as “digital pinholing”¹⁰⁵. In MoNaLISA an array of digital pinholes is arranged to be confocal with the array of emitting spots, thus generating optical sectioning.

The key advantage of MoNaLISA lies in the possibility of separating the sub-diffraction emitting spots through the choice of a suitable k value. In choosing the value of k , one must take into account that the photons detected from each sub-diffraction emitting spot is diffraction-limited imaged onto the camera sensor over an area of diameter $\sim \lambda/NA$, which imposes a minimum limit for $k > 2$ to separate those signals.

Previous implementations of WF-RESOLFT function with a periodicity of emitting spots dictated only by P_{SW} , i.e. equivalent to use $k = 1$. Hence, the extraction of information requires using either a very small digital pinhole in the detection or intensive computational unmixing, which cause a loss of signal (Figure 2.1b, right plot, grey area) that eventually results in images with low SNR or possible artifacts due to the error-prone reconstruction algorithms, respectively. As an example, digital pinholing with a Gaussian $FWHM$ of 50 nm, as used in previous WF-RESOLFT implementations^{96,97}, led to more than 60% loss in SNR (Figure 2.1d, grey dotted line) compared to using a pinhole of $FWHM \sim 250$ nm, i.e. equal to the size of the emission PSF .

By contrast, using $k > 2$, MoNaLISA enables the clear separation of the signals arising from the sub-diffraction emitting spots by applying an optimal digital pinhole with $FWHM \sim \lambda/2NA$. Thus, photon collection efficiency and optical sectioning can be optimized without compromise with respect to cross-talk and image quality (Figure 2.1e, green dotted line). While using larger values of k is advantageous to order to avoid cross-talk and perform an efficient digital pinholing, it comes at the cost of expanding the

scanning area necessary to complete an image $A_{scan} \propto k^2$. The optimum value k was evaluated experimentally in Section 2.6.

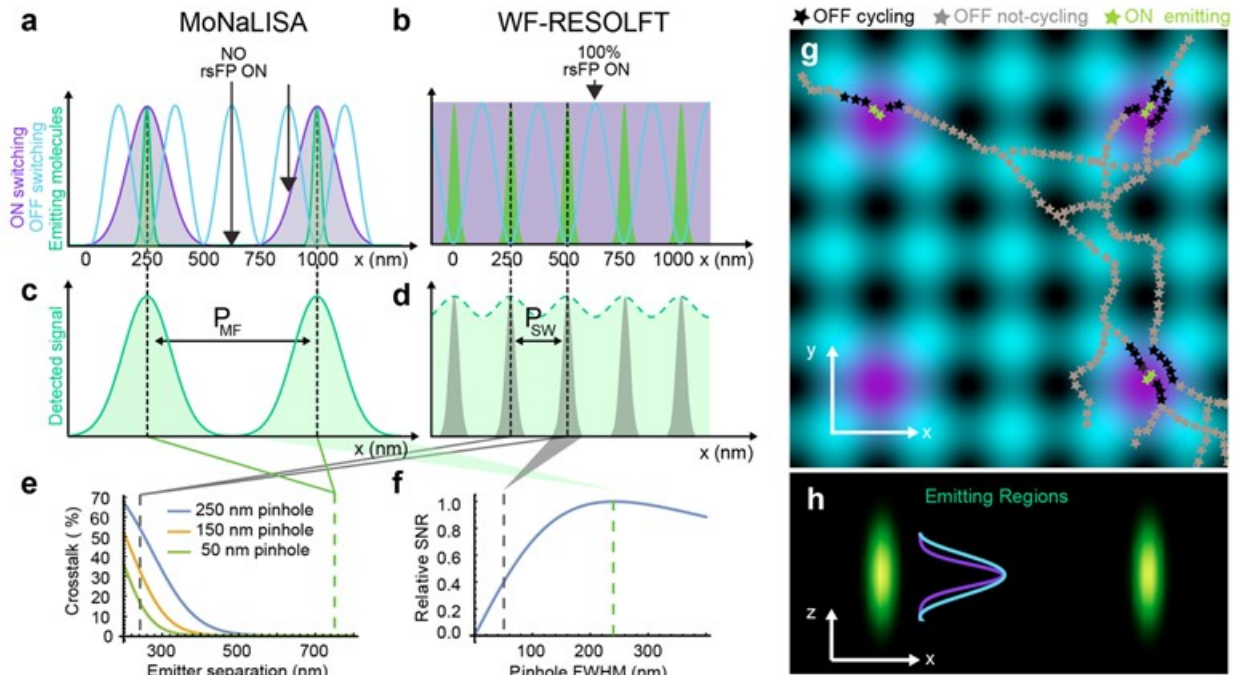


Figure 2.1 Schematic of multifocal parallelized RESOLFT (MoNaLISA). (a) MoNaLISA and (b) WF-RESOLFT illuminations and detected fluorescence distributions for MoNaLISA (c) and WF-RESOLFT (d). (e) The larger foci separation $P_{MF} > P_{SW}$ in MoNaLISA allows detection of the whole fluorescence signal without crosstalk. (f) Fluorescence collection efficiency for different sizes of digital pinholing. The 250 nm optimal size in MoNaLISA (green dashed line) increases photon collection and SNR compared to the 50 nm pinholing of WF-RESOLFT (gray dashed line). (g) 2D representation of the MoNaLISA illumination described in (a): ON-switching and excitation (violet), OFF-switching (blue). Filaments showing rsFPs in different states are illustrated. (h) The multifocal illuminations provide fluorescence confinement (emitting regions in green) in 3D as shown in the $x - z$ section. The axial resolution is further increased by a two-step process due to photoactivation (violet) followed by fluorescence excitation (blue).

The image quality of MoNaLISA is further enhanced by saving ON-OFF switching fatigue. Indeed, its multi-foci ON-switching leads to a spatially confined protein population able to interact with the OFF-switching light, in the exact positions where the signal is read out. In this way the majority of the proteins are kept in the OFF state and only a few of them are exposed to the intensity maxima of the ON and OFF-patterns in the same cycle, which is extremely important to minimize useless cycles and photobleaching. By contrast, in WF-RESOLFT the entire population of rsFPs are repeatedly exposed to peak intensities of both the ON and OFF-switching light causing unnecessary cycling, especially in 3D.

In addition to saving ON/OFF cycles and enhancing the detection efficiency, the use of multi foci patterns for both ON-switching and read-out enables, for the first time in a parallelized rsFP-based imaging approach, confocal optical sectioning and sub-100 nm lateral resolution simultaneously. Two factors contribute to the sectioning ability of the nanoscope. First, focused excitation and digital pinholing in detection rejects out of focus emission and improves optical sectioning just as in any confocal system. Second, the confinement of the signal generated by focused light is further enhanced by the progressive rsFPs absorption of the ON-switching and readout focused light, which leads to a quadratic dependence of the emission process with respect to the illumination intensities. This improves both lateral and axial resolution, analog to what happens in 2-photon microscopy. Thus, we will call the imaging modality without OFF-switching step “enhanced confocal” to account for this resolution improvement. This effect will be further described in Section 2.6.

2.2 Target fluorescent proteins and optical setup

MoNaLISA was implemented for rsEGFP2⁹² and dronpa(M159T)⁹³. These reversibly switchable fluorescent proteins are driven into a bright state (ON) by 405 nm light and can be turned back to a dark state (OFF) by 488 nm light . Their fluorescent absorption

is in the range 460 – 490 nm and the same wavelength can be used for OFF-switching and readout.

The experimental setup is described in Figure 2.2. Activation light was obtained from a laser diode with wavelength of 405 nm (Cobolt 06-01, 200 mW). OFF-switching and readout light was performed with two separate diode lasers at 488 nm (Cobolt 06-01 200 mW). The output of the three lasers is spectrally cleaned up with matched bandpass filters (ZET 405/10 and ZET 488/10, Chroma) and then expanded with a telescope (AC254-30-A-ML and AC254-300-A-ML, Thorlabs).

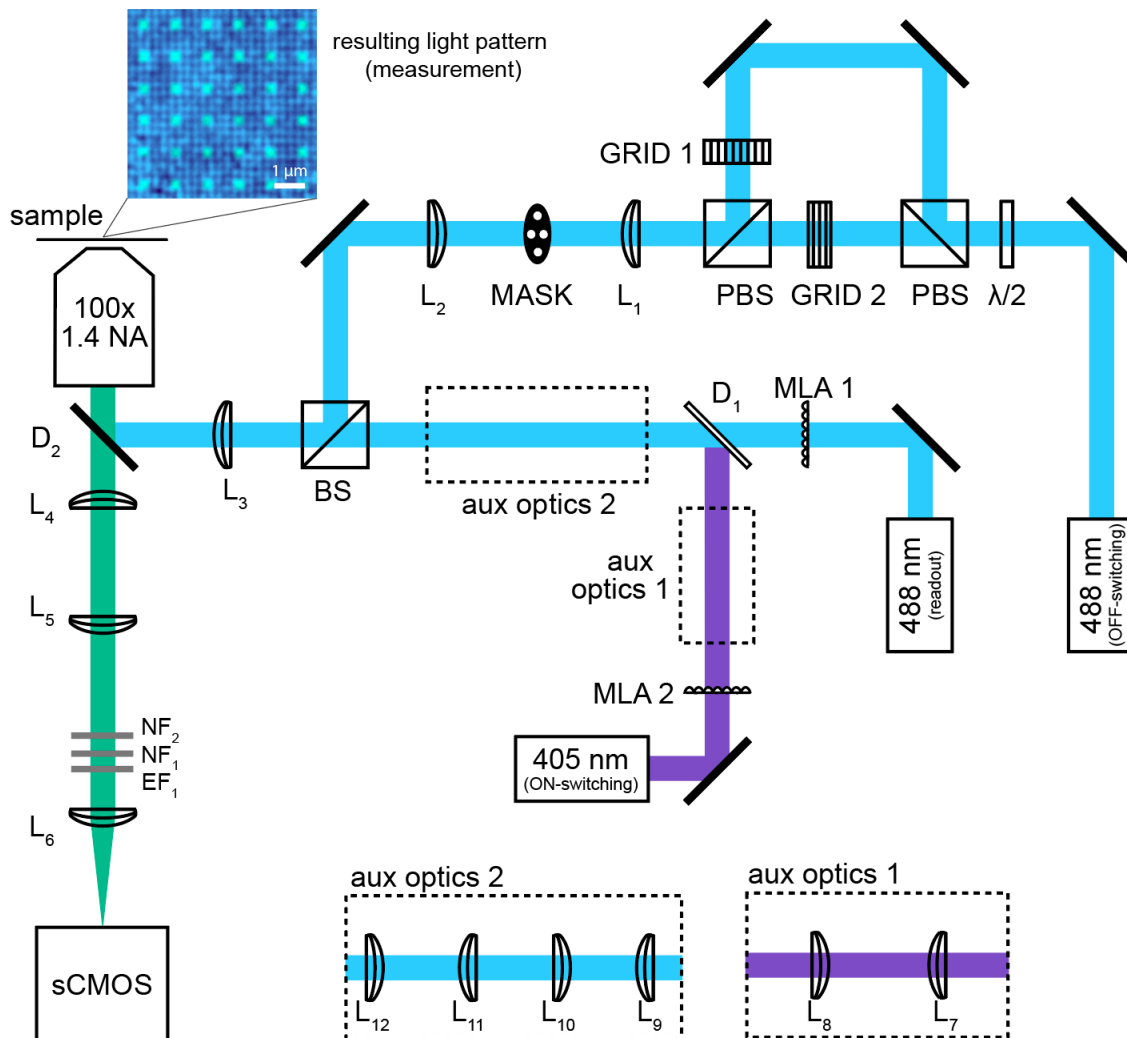


Figure 2.2 Schematic representation of the optical set-up. MLA 1, MLA 2: microlens arrays, GRID 1, GRID 2: diffraction gratings, PBS: polarizing beam splitter, BS: non-polarizing beam splitter with 90/10 or 50/50 reflection/transmission, MASK: custom-built mask to let through only the orders 1 and -1 of the two orthogonally polarized beams, NF: notch filter, EF: emission filter, and D: dichroic mirror. L1: $f=100$ mm, L2: $f=300$ mm, L3: $f=300$ mm, L4: $f=250$ mm, L5: $f=250$ mm, L6: $f=200$ mm, L7: $f=200$ mm. Aux optics 1. L9: $f=200$ mm, L10: $f=150$ mm, L11: $f=250$ mm, L12: $f=250$ mm. Aux optics 2. L7: $f=100$ mm, L8: $f=100$ mm

The beam profiles are spatially cleaned up with a pinhole (P20S, Thorlabs) in the telescope intermediate focus to deliver gaussian beams with a full width at half maximum of ~ 10 mm.

The 405 nm beam and one 488 nm beam are focused with respective microlens arrays (MLA-150-5C-M, Thorlabs) that creates the multi-foci pattern. Subsequently, for the 405 nm light path an auxiliary telescope (Aux optics 1) is used to correct for a chromatic mismatch in magnification. The corrected 405 nm and the 488 nm multi-foci patterns are then combined in the same beam path by a dichroic mirror (ZT458RDC, Chroma). A second set of telescopes (Aux optics 2) is used as relay optics but also to adjust the foci periodicity and beam size of the 488 nm beam. For example, we used lenses of focal distance $f = 300$ mm (Thorlabs AC254-300-A-ML) and $f = 400$ mm (AC254-400-A-ML) to obtain a period of $P_{MF} = 750$ nm. This intermediate plane is then imaged into the sample by the focusing lens (AC508-300-A-ML, Thorlabs) and the objective (HCX PC APO 100 \times /1.40-0.70 oil, Leica Microsystems) creating a multi-foci pattern illumination.

The OFF-switching pattern is adapted from the WF-RESOLFT implementation⁹⁶ since it provides a robust array of intensity zeros while keeping simplicity in the instrumentation. The collimated light is directed through a half-wave plate (B. Halle, Germany) and a polarizing beam splitter (Thorlabs CCM1-PBS251/M). The half-wave plate is adjusted to equally split the light according to the p and s orientation. After the polarization beam splitter (PBS), the light is sent through custom-made phase-diffraction gratings made of SiO₂ with lines of 437 nm height and a pitch of 25 μ m (Laser Laboratorium Göttingen). The gratings were oriented such that the grid lines were parallel

to the polarization of the incoming light. After the gratings, the light paths were recombined with another polarizing beam splitter (Thorlabs CCM1-PBS251/M). The gratings were placed in the back focal plane of an $f = 100$ mm lens (AC254-100-A-ML, Thorlabs), the diffracted light was then focused to a mask where all of the diffraction orders except $+1$ and -1 were blocked; these orders were relayed by a pair of lenses (AC508-300-A-ML, Thorlabs) to four spots in the back focal plane of the objective, where they recombined and created two incoherent regular sinusoidal patterns in perpendicular directions with a period $P_{SW} = 250$ nm. The period of both sinusoidal patterns can be tuned by changing the focal length of the first lens after the grids. To combine the ON-switching/excitation light path with the OFF-switching light path we use a 10/90 non-polarizing beam splitter (CCM1-BS028/M, Thorlabs). We chose this splitting ratio to compensate for the fact that the optical engineering with diffraction grids and spatial filters of the OFF-switching pattern is much less efficient than the microlenses that produce the multifocal arrays.

The ON-switching, excitation and OFF-switching beam paths are reflected with a dichroic (ZT488RDC, Chroma) into the objective. The fluorescence light coming from the sample is transmitted by the same dichroic and an auxiliary telescope (L4, L5) is used as relay optics. In one-color operation, light is then directed through 405 and 488 nm notch filters (ZET405NF and ZET488NF, Chroma), a bandpass fluorescence emission filter (ET535/70, Chroma) and finally imaged into an sCMOS camera (ORCA Flash 4.0 V2, Hamamatsu) by an $f = 200$ mm lens (AC254-200-A-ML, Thorlabs). The resulting light pattern can be imaged and characterized by using a fluorescent sample covered with a thin layer of fluorescent molecules excitable at 405 and 488 nm. A small portion of a measurement of the pattern is displayed as an example in Figure 2.2.

For sample screening we added a wide field path, which can be alternated with the main MoNaLISA imaging illumination by flipping a motorized mirror. For ON-switching and excitation we use 405 nm (BDL-405 Picosecond Diode Laser, Becker and Hickl) and 473 nm laser light (50 mW, 04-01, 473 nm, Cobolt) which are collimated and expanded by a telescope (AC508-30-A-ML and AC508-250-A-ML Thorlabs) and then focused into

the back focal plane of the objective by the same lens used in the previously described multi-foci optical path (AC508-300-A-ML, Thorlabs).

This experimental implementation of MoNaLISA featured a $P_{SW} = 250$ nm and $N = 4356$ foci. P_{MF} was experimentally tested at 500 nm ($k = 2$), 750 nm ($k = 3$), and 1250 nm ($k = 5$).

2.3 Instrumentation, control and data acquisition

The three lasers (ON-switching, OFF-switching, and readout) can be switched on and off digitally through a DAQ board (National Instruments NIDAQ PCI 6371). The same DAQ device is used to synchronize the sequence of laser pulses, the camera read-out and the scanning. The readout laser is synchronized with the sCMOS camera exposure to detect fluorescence emission. Sample scanning is performed with a piezoelectric stage (Nanomax TS, Thorlabs Inc.). The length and delay of the laser pulses, the output power of the lasers, the exposure time of the camera and all other relevant parameters can be controlled through a graphical user interface which is part of our own open-source microscope control project developed in Python, and initially based on *Tormenta*¹⁰⁶. This software project is an effort to contribute to the open-source community and provides an alternative to commercial software available for the control of scanning microscopes. It is constantly under development with the current configuration available at <https://github.com/TestaLab>. The software uses adaptations of available instrument drivers generously contributed by other members of the open-source community <https://github.com/pearu/pylibnidaqmx>, https://github.com/ZhuangLab/storm-control/tree/master/sc_hardware/hamamatsu, <https://github.com/LabPy/lantz>.

The multi-foci pattern must be identified on the image sensor in order to define the pixels for digital pinholing. This was achieved with an alignment algorithm which obtains the

alignment coordinates by performing a correlation between the reference pattern of multi-foci and an image of a sample.

2.4 Data acquisition and image reconstruction

A MoNaLISA measurement consists of acquiring a stack of camera frames, each one corresponding to one step of the stage scanning. For 2D imaging, the stage scanning is performed over an area $A_{scan} = P_{MF}^2 = k^2 P_{SW}^2$ in regular steps. Each camera frame contains the signal from a number of sub-diffraction emitting spots determined by the ON- and OFF-switching light patterns (Figure 2.3a). When imaged, the sub-diffraction emitting spots appear as diffraction-limited signals on the camera sensor. (Figure 2.3b). A number of pixels around each signal define the digital pinholes (dotted-line in Figure 2.3b). We used 9 x 9 pixels, corresponding to an area of $585 \times 585 \text{ nm}^2$ on the sample. The signal inside each digital pinhole is fitted (least square differences) to a Gaussian function with fixed $FWHM = \lambda/2NA$ plus a constant background. The net amplitude of the signal is assigned to the central position of the scanning step. Then, the process is repeated for all camera frames of the scan to complete a super-resolved image.

Modelling the data of each digital pinhole as a Gaussian with background accounts for the fact that the samples imaged are usually three dimensional. Signal contributions from out-of-focus planes are considered as considered as a constant background.

It is interesting to note that this procedure of digital pinholing with multiple pixels of an array detector is superior to a confocal detection with a physical pinhole because it contains more information about the intensity distribution of the signal. We note that it may be possible to further refine the model, for example with functions that could better represent out-of-focus signals or the noise of the sCMOS camera. Also, instead of least square differences, a Maximum Likelihood Estimator approach could be used.

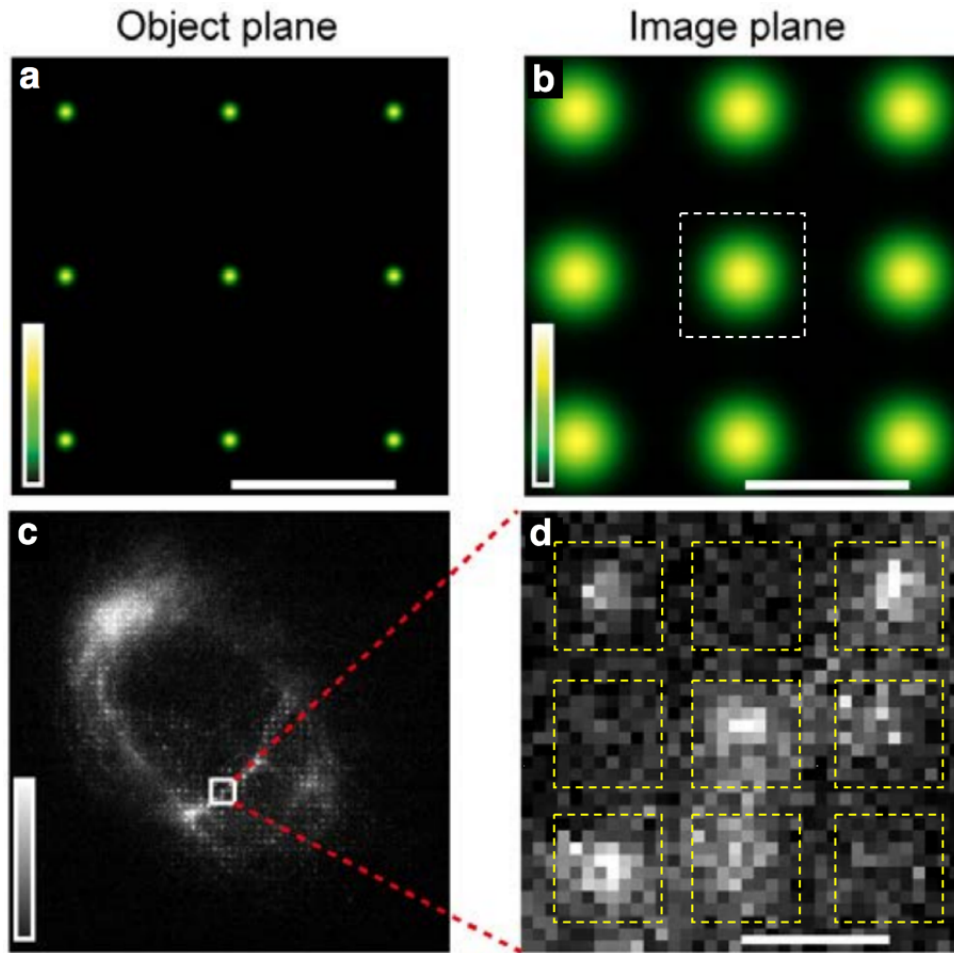


Figure 2.3 Image reconstruction. (a) Schematic of the sub-diffraction emitting spots in a region of the sample. (b) Schematic of the images on the camera sensor of the sub-diffraction emitting spots of (a). The dotted-line square indicates the digital pinhole for the central signal. (c) raw image of one frame from a recording. (d) Detail of a small region of (c) comprising the signal of $3 \times 3 = 9$ sub-diffraction emitting spots. The corresponding digital pinholes are marked by the yellow dotted-lines. Scale bars: 750 nm.

During the acquisition of each frame, the rsFPs are cycled between their ON-OFF states causing a fraction of them to undergo a transition to a permanent non-fluorescent state (photobleaching). To compensate for this, a photobleaching correction can be implemented in the reconstruction of the images. In a given frame, the correction consists in normalizing the signals in each digital pinhole by dividing by the average signal of the frame.

Owing to the negative switching of the rsFPs used in this MoNaLISA scheme, there is emission of light during the OFF-switching phase. This fluorescent light will reach the camera sensor before it is exposed and cause a specific type of noise caused by trapped charge in the pixels. The amount of trapped charge was found to be pixel dependent meaning that the different areas of the final image, detected on different pixels of the sensor, may show slight variations in intensity. We handle this issue by first identifying the average offset of each pixel during a scan caused by the inherent noise characteristics of that pixel. To do so we create an average image of all the frames collected during an acquisition and create a map of the hot pixels and their average offset. This image can then be subtracted from each raw data frame to minimize the effect of this phenomenon.

2.5 Enhanced optical sectioning

The optical sectioning capability of MoNaLISA comes from the focused ON-switching and readout illumination patterns. The OFF-switching light pattern is uniform in the axial direction and does not provide any sectioning capability. Remarkably, since the detected fluorescence depends on the concomitant absorption of ON-switching and readout light, it presents a quasi-quadratic dependency on illumination. The effective emitting volume can be estimated as the product of the ON-switching PSF and the readout PSF. For the axial dimension we have:

$$\text{Exp}\left(-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_{\text{eff}}^2}\right) \approx \text{Exp}\left(-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_{405}^2}\right) \times \text{Exp}\left(-\frac{(z-z_0)^2}{2\sigma_{488}^2}\right) \quad (2.1)$$

$$\sigma_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{\sigma_{405}^2 \times \sigma_{488}^2}{\sigma_{405}^2 + \sigma_{488}^2}} \quad (2.2)$$

Where $\sigma = \frac{\text{FWHM}_z}{2.355}$ and $\text{FWHM}_z \approx \frac{2\lambda}{\text{NA}^2}$. Thus, for an $\text{NA} = 1.4$ we will have $\sigma_{405} = 175$ nm, $\sigma_{488} = 211$ nm and $\sigma_{\text{eff}} = 136$ nm. This yields an effective axial full width at half maximum of $\text{FWHM}_{z_{\text{eff}}} = 2.355 \sigma_{z_{\text{eff}}} \approx 320$ nm, which is ~ 1.4 times better than what would be expected for a conventional confocal microscope operated at 488 nm excitation using the same optics.

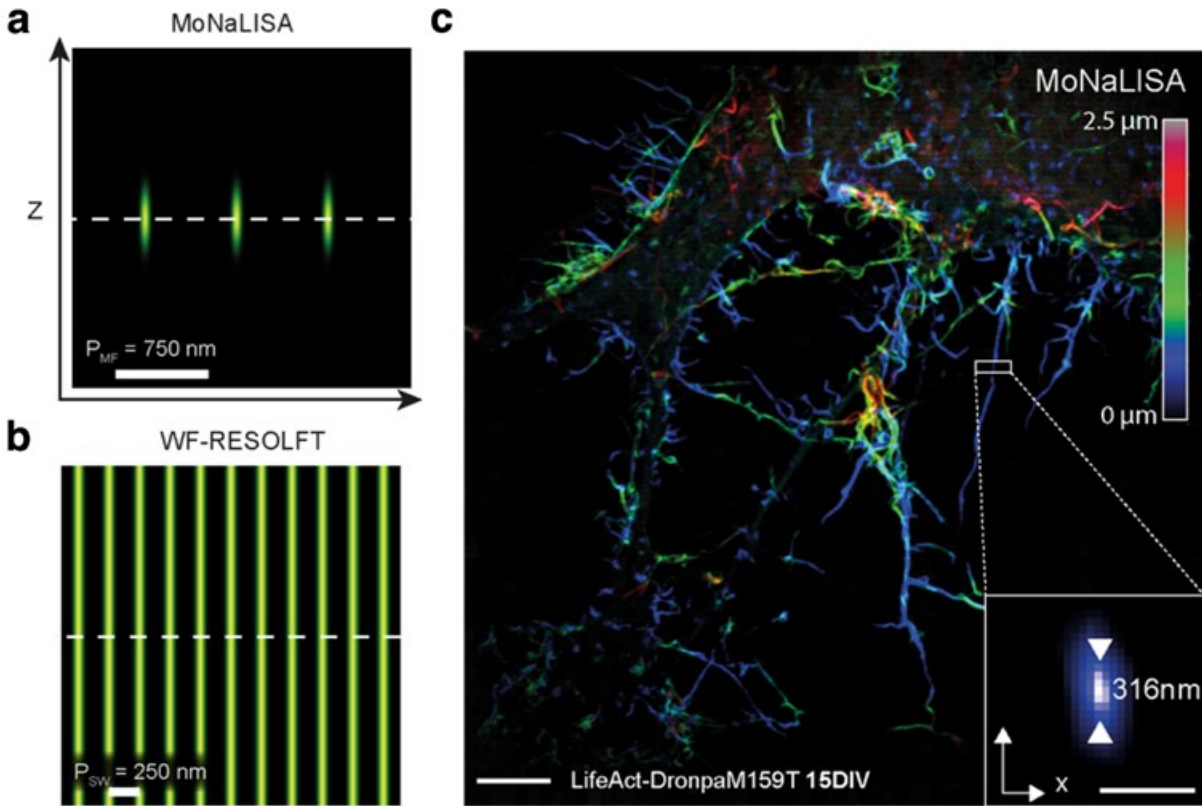


Figure 2.7. MoNaLISA spatial confinement of the fluorescence emission. Calculated spatial distribution of the emitting volumes for MoNaLISA (a) and WF-RESOLFT (b) showing a clear signal confinement along the optical axis for MoNaLISA. (c) MoNaLISA 3D image of 15 DIV hippocampal neuron expressing LifeAct-DronpaM159T. Scale bar: 5 μm . The inset is the $x - z$ maximum projection of an actin filament. A Gaussian fit of the filament axial extension results in a FWHM of 316 nm. Scale bar: 500 nm.

Figure 2.7a shows the calculated spatial distribution on the xz plane of the emitting volumes for MoNaLISA, and Figure 2.7b for conventional WF-RESOLFT. Since the optical sectioning capability of MoNaLISA does not depend on the OFF-switching light, the same set-up can be used to obtain images using only with the ON-switching and readout light patterns. We will call such images "enhanced confocal".

Figure 2.7c shows an example 3D MoNaLISA image of filamentous actin in a hippocampal neuron expressing LifeAct-DronpaM159T, where the axial sectioning was determined to be $\sigma_{z_{\text{eff}}} \approx 316$ nm.

2.6 Optimization of inter-foci separation distance

Small separations P_{MF} (small k) are desirable because they achieve a higher parallelization and hence faster imaging but they might lead to higher cross-talk and/or compromise the optical sectioning capability of the system. On the other hand, very large P_{MF} guarantee a low cross-talk and a good optical sectioning but the scanning needed to obtain a full image scales quadratically with P_{MF} , thus significantly reducing the imaging speed.

We experimentally evaluated the effect of P_{MF} by computing the amount of detected background in enhanced confocal images. Figure 2.8 shows images of U2OS cells endogenously expressing vimentin-rsEGFP2 obtained under the three modalities: conventional wide-field, enhanced confocal, and MoNaLISA. We found that at $P_{MF} = 500$ nm ($k = 2$) the out-of-focus background is still visible in the enhanced confocal image (Figure 2.8a). For $P_{MF} = 750$ nm ($k = 2$) we observed a clear optical sectioning effect (Figures 2.8b), which is not further improved by increasing P_{MF} to 1250 nm ($k = 5$). Thus, $P_{MF} = 750$ nm was used in all measurements.

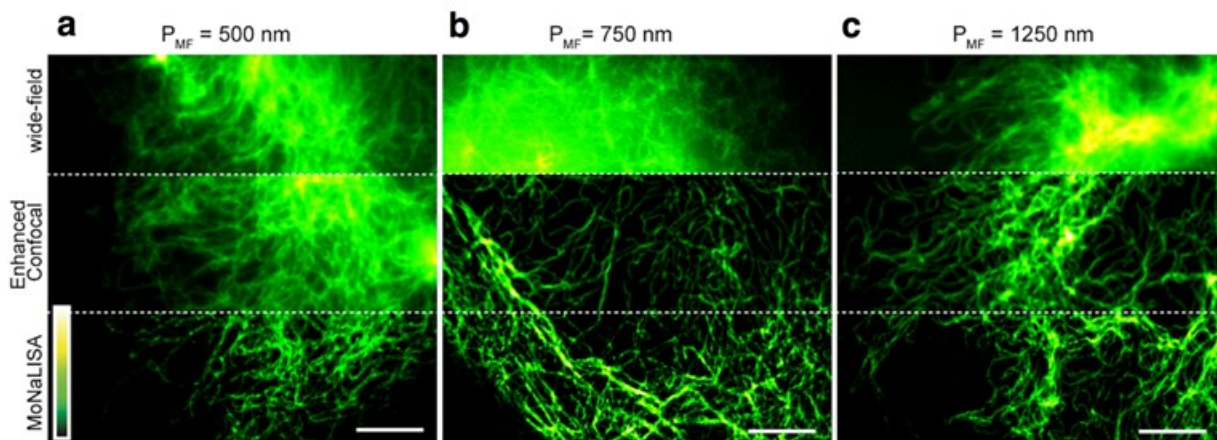


Figure 2.8. MoNaLISA imaging at different multi-foci periodicity P_{MF} . All the images show U2OS cells endogenously expressing vimentin-rsEGFP2. The three cells in (a), (b) and (c) were imaged with different P_{MF} : 500 nm (a), 750 nm (b) and 1250 nm (b) and the same OFF switching pattern with $P_{SW} = 250$ nm. Also, each cell was recorded with different imaging modalities: wide-field (up section), enhanced confocal (middle section) and MoNaLISA (bottom section). Scale bars: 5 μ m.

From this experimental characterization together with further calculations and simulations that were performed and are described in ¹⁰² we can conclude that, unlike previous parallelized RESOLFT implementations, MoNaLISA performs equivalently to a point-scanning RESOLFT in terms of sensitivity, optical sectioning and resolution but massively increases the imaging speed ($\sim 1 - 2$ s vs $\sim 10 - 60$ min) by parallelizing the acquisition by a factor > 4000 . In the following sections, results on 3D and dynamic time-lapse imaging of different biological systems will be presented.

2.7 Super-resolution imaging in live cells

The performance of MoNaLISA to deliver super-resolved images in live cells was assessed by acquiring and analyzing images of live U2OS cells expressing endogenous vimentin-rsEGFP2 (Figure 2.4a). MoNaLISA images were obtained with the following light

intensities (I) and pulse times (T) for activation, OFF-switching and readout: $I_{on} = 540 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 350 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 1.5 \text{ ms}$, $I_{readout} = 800 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 1.5 \text{ ms}$.

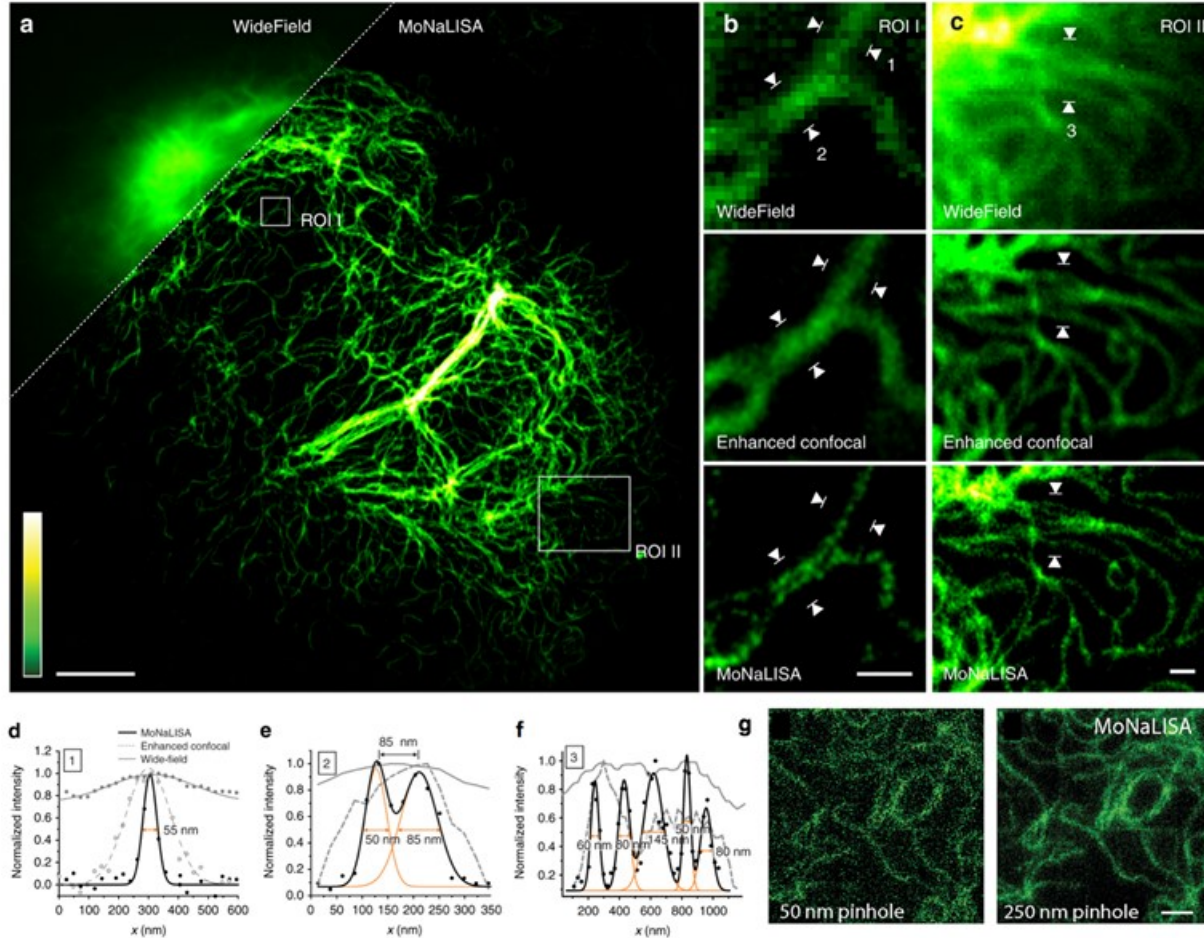


Figure 2.4. Spatial resolution and image contrast. (a) Super-resolved image of endogenous vimentin-rsEGFP2 in a live U2OS cell. Upper-left corner in diffraction-limited wide-field mode (inset). Scale bar $5 \mu\text{m}$. (b) and (c) Magnified regions showing wide-field, enhanced confocal, and MoNaLISA images. Scale bar 500 nm . (d) Representative normalized intensity profiles (four lines averaged) measured across the filaments marked with white arrowheads no. 1 in (b). Gaussian fits of the data show a FWHM of $55 \pm 5 \text{ nm}$, $180 \pm 10 \text{ nm}$, and $335 \pm 45 \text{ nm}$ for imaging in MoNaLISA, enhanced confocal, and wide-field mode, respectively ($\pm\text{s.e.m.}$). (e) Normalized intensity profiles (four lines averaged) measured across the filaments marked with white arrowheads no. 2 in (b). The Gaussian fit (black line) for the two filaments shows a FWHM of 85 nm . (f) Normalized intensity profiles (four lines averaged) measured across the filaments marked with white arrowheads no. 3 in (c). The Gaussian fits (black lines) for the three filaments show FWHMs of 60 nm , 50 nm , and 145 nm . (g) MoNaLISA images of vimentin-rsEGFP2 in a live U2OS cell using a 50 nm pinhole (left) and a 250 nm pinhole (right). Scale bar 500 nm .

50 ± 5 nm and 85 ± 10 nm, respectively, and a separation of 85 ± 5 nm (\pm s.e.m.). **(f)** Normalized intensity profile measured in **(c)** across the white arrows. The MoNaLISA data shows five distinct filaments that cannot be resolved using confocal or widefield imaging. **(g)** Image generated with a 50 nm digital pinhole, as commonly used in WF-RESOLFT to minimize crosstalk, compared to the image reconstructed with a Gaussian digital pinhole with a FWHM of 250 nm used in MoNaLISA.

Image were reconstructed from 900 raw images recorded by performing the scan of $P_{MF} \times P_{MF}$ (750×750) nm² with steps of 25 nm. Each raw image is based on a switching cycle duration within 1.6–3.5 ms, resulting in temporal resolutions of 1.4 – 3.2 s per super-resolution image. MoNaLISA imaging clearly resolved endogenous vimentin stretches with sizes down to 45 – 65 nm (Figure 2.4b–f), which would have been indistinguishable in wide-field and even in the enhanced confocal images acquired without OFF-switching. Importantly, the improved contrast enabled us to image small and dim filaments, which would have been missed with previous WF-RESOLFT implementations due to the lower SNR caused by inefficient photon collection (Figure 2.4g) and out-of-focus background.

We provide a robust and statistically significant quantification of the resolution by measuring not a single isolated filament but rather a representative set in the image (Figure 2.5a-b). The resolution estimate is therefore obtained from the histogram of the width of the vimentin filaments (Figure 2.5c), resulting in $\Delta x = 55 \pm 10$ nm.

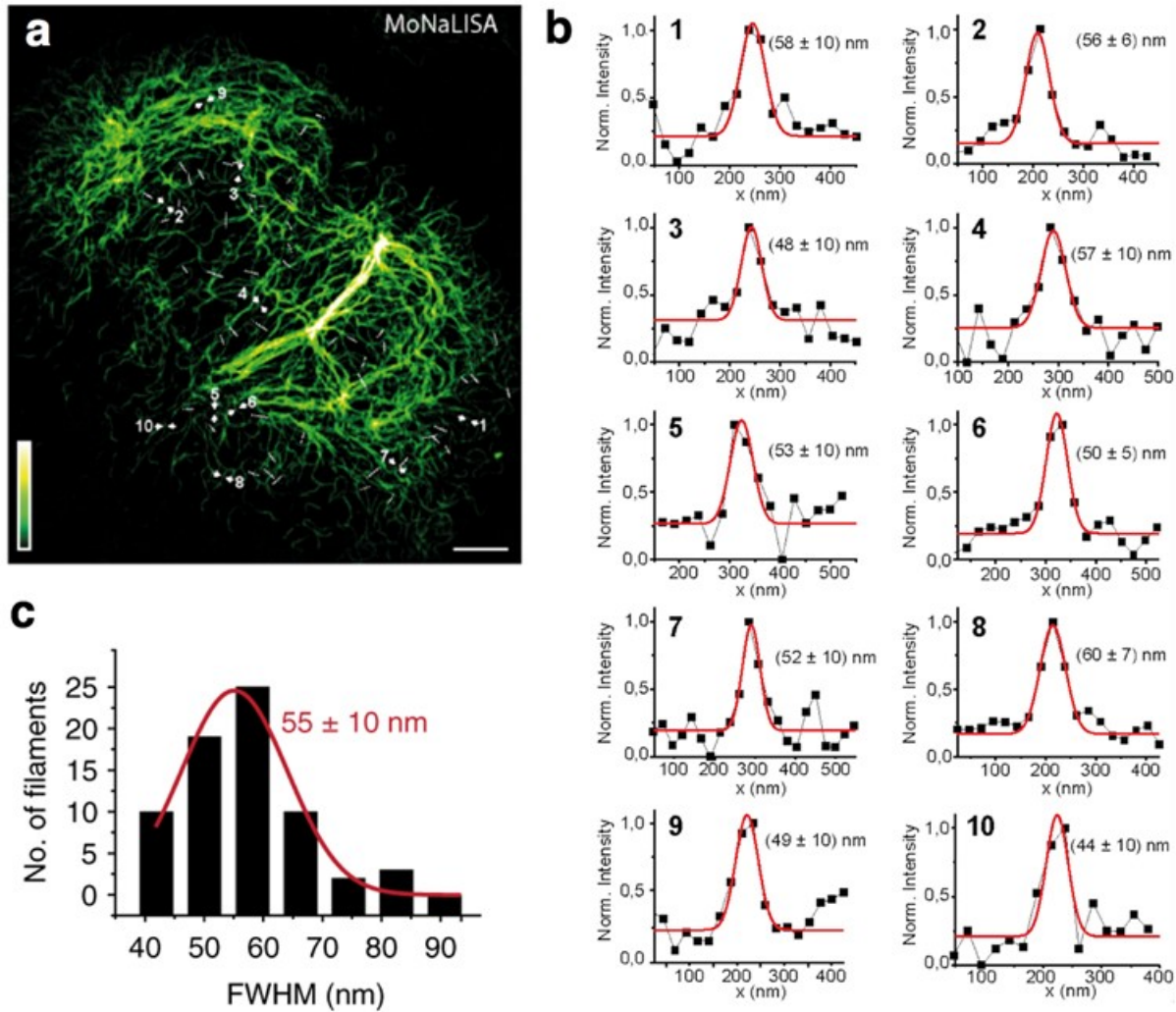


Figure 2.5 Spatial resolution quantification. (a) MoNaLISA image of living U2OS cells endogenously expressing vimentin-rsEGFP2. Scale bar: 5 μ m. In the image, representative measured line profiles are shown, each profile is the average of 4-px width lines corresponding to a filaments length of 100 nm. The resulting *FWHM* values were used to estimate the resolution of the optical system. (b) Measured intensity fitted with Gaussian curves and related *FWHM* are reported for 10 representative lines profiles of the vimentin filaments that are marked in the image in (a). (c) Histogram of 70 independent filament widths measured in the image in (a), the mean value is 55 ± 10 nm (mean \pm std).

We then systematically studied the resolution dependence on the ON-switching and OFF-switching light intensity. First, we found the lowest ON-switching light intensity at which

more than 90% of the proteins are recovered to the fluorescent state, i.e. the saturation level (Figure 2.6a). This ON-switching light intensity is optimal because higher levels of power will not result in a gain in signal and will only contribute to photodamage of the sample and fluorescence background.

Subsequently, at this optimal ON-switching power, we modulated the OFF-switching light power. Figure 2.6b shows the dependency of the resolution as a function of the OFF-switching power for $P_{MF} = 1250$ nm and $P_{SW} = 250$ nm ($k = 5$) and $P_{SW} = 312.5$ nm ($k = 4$). As expected, we found that smaller periodicities allow higher resolutions at lower powers and we found that ~ 50 nm was the highest resolution we could achieve without compromising SNR. Representative images at increasing (left to right) OFF light power are displayed in Figure 2.6c.

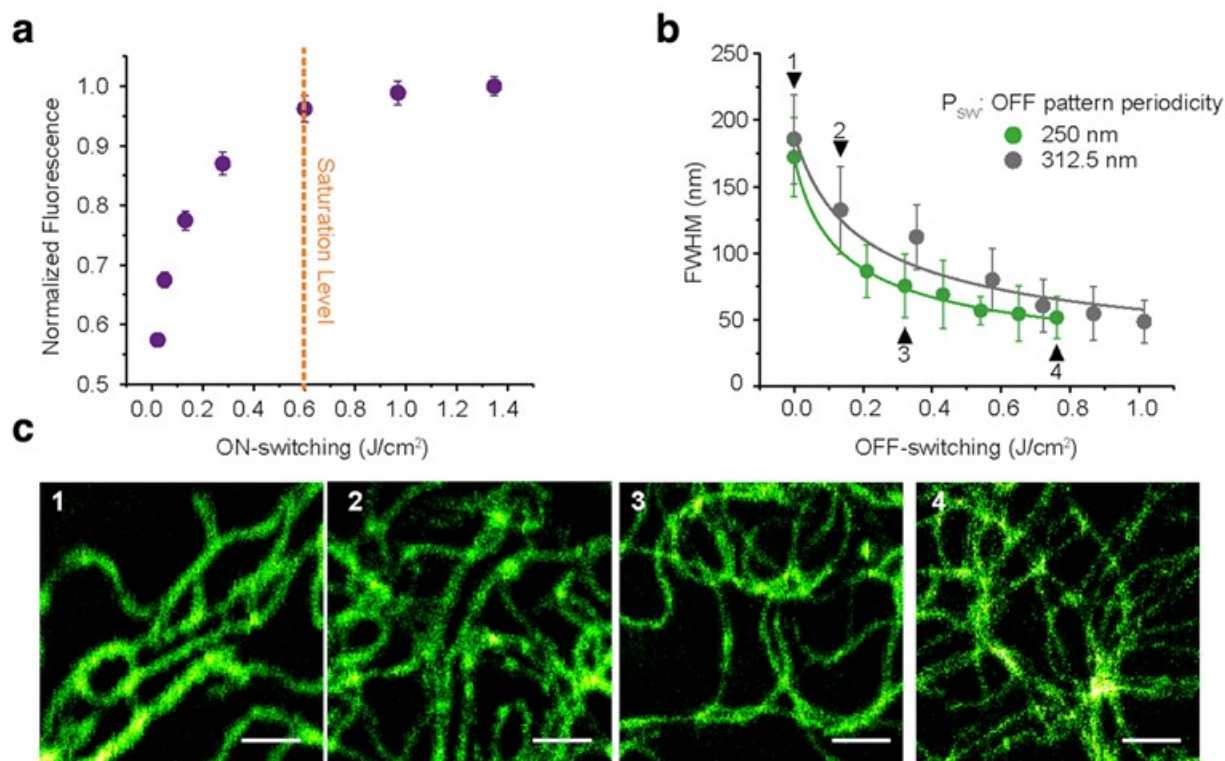


Figure 2.6. Switching kinetics and spatial resolution. (a) ON-switching kinetics as a function of the 405 nm light doses. The experiments are performed in U2OS cell endogenously

expressing vimentin-rsEGFP2. Each data point is the average of 10 cycles of the protein (\pm std). In each cycle the rsFPs is illuminated at 488 nm for 50 ms at 170 W/cm² to turn it OFF after initial ON-switching with 405 nm light for 1 ms at different powers. **(b)** Dependence of the spatial resolution on the OFF-switching light doses for two different OFF pattern periodicities (P_{SW}). The OFF-pattern with the smaller P_{SW} allows to reach comparable resolution with less doses of light. Each resolution data point results from the average of the *FWHMs* of the fit of 25 – 30 filaments. Each profile is the averaged of adjacent lines corresponding to a filaments length of 80 – 140 nm. **(C)** Four representative images recorded with different OFF illuminations. Scale bar: 1 μ m.

2.8 3D imaging in living cells

The enhanced photon collection and minimal fatigue enabled the acquisition of multiple optical sections of living cells in a large variety of biological samples. A first example is shown in Figure 2.9a, where we demonstrate the optical sectioning performance of MoNaLISA and the super-resolved lateral resolution in a stack of 28 super-resolved frames spaced 100 nm along the axial dimension in a hippocampal neuron. Crossing actin filaments in neurons that are not distinguishable in the diffraction-limited image (Figure 2.9b) are clearly resolved by MoNaLISA (Figure 2.9c) and are shown to be separated by \sim 120 nm.

The volumetric imaging was also extended over time to study the whole re-arrangement of a stem-cell colony (Figure 2.9d). Further experiments were performed on organotypic tissues and are described in ¹⁰² demonstrating the high versatility and wide-range applicability of the method. We note that, increased imaging depth can be achieved with the use of glycerol/water objective lenses with a correction collar to correct for spherical aberrations or through the use of adaptive optics ^{107,108}.

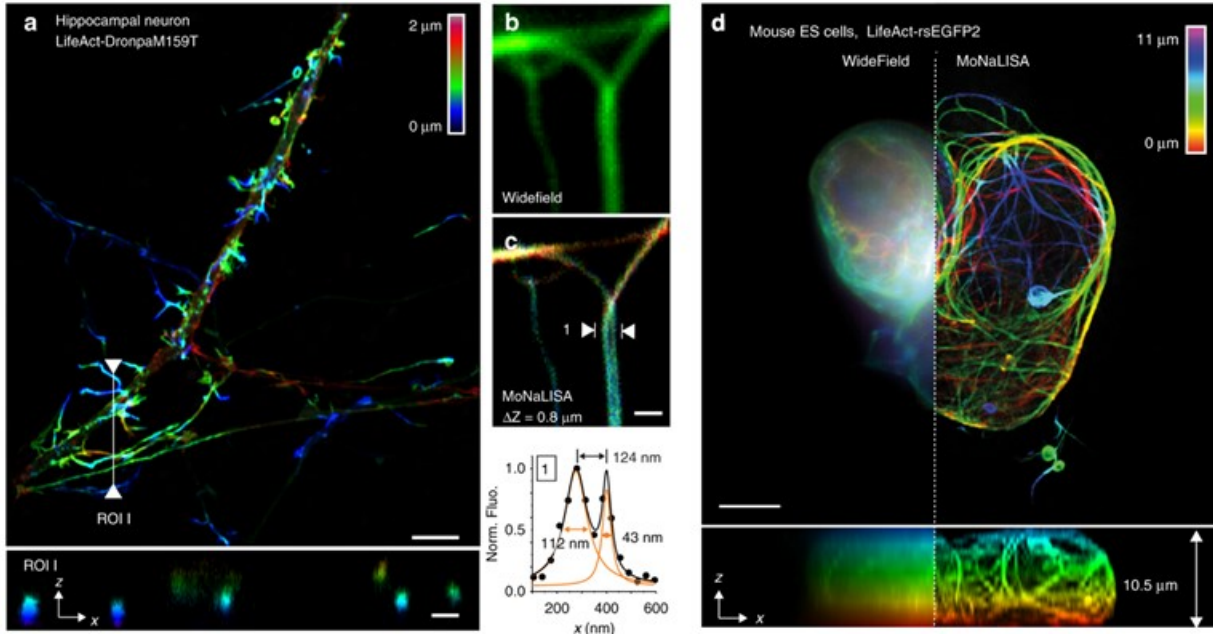


Figure 2.9. 3D imaging in living cells. (a) 3D volumes of 15 DIV neurons expressing LifeAct-DronpaM159T with MoNaLISA. The fine optical sectioning reveals the color-coded depth information in the x - y and x - z maximum projections. Scale bar: 5 μm . (b) and (c) Comparison between wide-field and MoNaLISA imaging of a neuron expressing LifeAct-rsEGFP2. The line profiles measured in the MoNaLISA image were averaged over four lines and fitted with a Gaussian. (d) Colony of mouse ES cells spanning $30 \times 30 \times 11 \mu\text{m}^3$ imaged in the volumetric imaging mode. The scan steps are 35 nm in x - y and 500 nm in z . The images report fine structures across the entire z depth (right), hidden in the wide-field comparison (left).

The light intensities and pulse times for activation, OFF-switching and readout for the measurements in Figure 2.9a-c were: $I_{on} = 540 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 720 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 1.0 \text{ ms}$, $I_{readout} = 1000 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 1.5 \text{ ms}$. For measurements in Figure 2.9e, they were $I_{on} = 400 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 360 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 1.0 \text{ ms}$, $I_{readout} = 1000 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 1.5 \text{ ms}$.

2.9 Nanoscale dynamics recorded in living cells

MoNaLISA is also a suitable tool to study the nanoscale rearrangement of the live cells over time with genetically encoded markers through transfections. A detailed description of the transfection protocols can be found in ¹⁰². We provide several examples in Figure 2.10a-d, where series of 30 – 50 super-resolved images of different cell types are shown. Structural changes in living epithelial cells (Figure 2.10a–b) and hippocampal neurons (Figure 2.10c–e) were unraveled by monitoring the actin dynamics in the time windows of seconds and minutes.

Some of the dynamic features that we could record in living cells are: i) the formation of small actin loops (Figure 2.10b), ii) the creation of a cup-shaped dendritic spines (Figure 2.10d), iii) the formation of actin branches at sub-80 nm step size (Figure 2.10e), which have been followed over time without loss in either spatial resolution or image quality. Additionally, we applied MoNaLISA imaging to examine the continuous sliding of mitochondria above and below each other (Figure 2.10f). Fine changes in their morphology during fusion and fission are caught in several sequential volumetric recordings across seconds. The hollow structure of mitochondria, not distinguishable in diffraction-limited microscopy can be seen in all MoNaLISA 3D time points.

Representations in movie format of the time-lapse imaging data described in this Chapter are available online at ¹⁰². The light intensities and pulse times for activation, OFF-switching and readout for the measurements in Figure 2.10 were varied and optimized empirically. However, they were all kept in the range $I_{on} = 260 - 830 \text{ W/cm}^2$, $T_{on} = 0.25 - 0.5 \text{ ms}$, $I_{off} = 290 - 750 \text{ W/cm}^2$, $T_{off} = 0.6 - 1.5 \text{ ms}$, $I_{readout} = 1000 - 2500 \text{ W/cm}^2$, $T_{readout} = 0.75 - 1.5 \text{ ms}$.

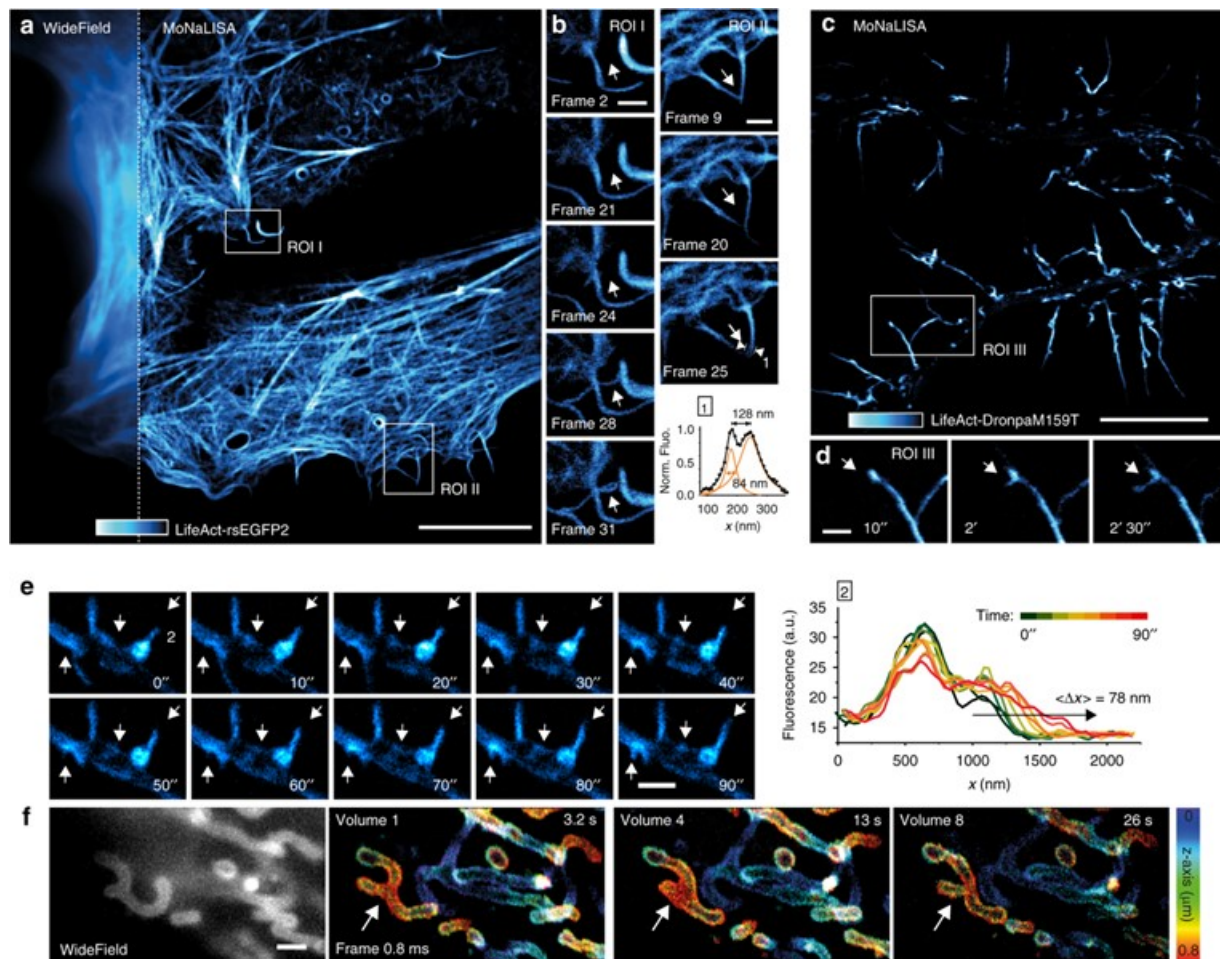


Figure 2.10. Nanoscale dynamic live-cell imaging. (a) Epithelial cells expressing LifeAct-rsEGFP2 compared to the wide-field image (inset). Scale bar: 10 μm. (b) Magnified regions I and II unravel the dynamics of growing small filopodia observed over 3 min for a total of 45 frames, each acquired in 3.9 s. Scale bar: 1 μm. (c) Living hippocampal neurons infected with LifeAct-DronpaM159T showing the actin arrangements in dendrites and dendritic spines. Scale bar: 10 μm. (d) Magnified region III highlights the recruitment of actin molecules into a spine, which slowly enlarge its head into a cup-shape across 19 frames (left arrow), each acquired in 3.4 s. Scale bar: 1 μm. (e) Dynamics of dendritic filopodia emerging from actin densities in the dendritic shaft in a neuron at 8 DIV. The arrows highlight the actin dynamics and redistribution. The graph shows the elongation over time of the filopodia 2 and reveals nanosized increments across time. Each line profile was averaged over a 100 nm width. (f) Time-lapse imaging of mitochondria outer membrane labeled with rsEGFP2-Omp25. The mitochondrial volumetric dynamics are recorded continuously over seconds. The axial information is color-coded. Single frame recording is 0.83 s, volume 3.3 s. Scale bar: 1 μm.

2.10 Discussion

The field of fluorescence microscopy has evolved rapidly, and different techniques have achieved remarkable results in terms of spatial super-resolution, speed, light-dose reduction, contrast and optical sectioning in live-cell imaging.

Recent Structured Illumination implementations such as iSIM¹⁰⁹ are considerably faster than MoNaLISA reaching acquisition times of down to ~ 10 ms per frame. However, despite their impressive time resolution, they are essentially limited by diffraction and the gain in terms of spatial resolution is a factor of $\sim \sqrt{2}$ with respect to their diffraction-limited counterpart given the same NA objective. For example, iSIM characterizations of spatial resolution report 213 ± 26 nm for raw images and 145 ± 14 nm after deconvolution for the lateral dimensions¹⁰⁹, which is 2-4 times worse than MoNaLISA imaging. Another implementation of the SIM concept in Total Internal Reflection (TIRF-SIM)¹¹⁰, when combined to ultra-high NA⁹⁹ and short wavelengths, report images acquired in seconds and with theoretically calculated spatial resolution approaching the sub-100 nm. Nevertheless, in these cases, like in any other TIRF technique, imaging is bound to the cover glass, limiting its application to membrane-related biological questions. In contrast, MoNaLISA can reach the entire cell volume, even in tissues. PA-NL-SIM⁹⁹ claims a theoretical resolution of 45 nm at a temporal resolution of 0.5 – 1 s which are values very similar to the ones reported in our work. However, there are two major aspects that need to be taken into account: firstly, PA-NL-SIM is still based on a TIRF scheme meaning that, just like TIRF-SIM, it is intrinsically limited to imaging at the cover glass surface. Secondly, little or no experimental evidence¹⁰¹ has been given of the theoretical 45 nm resolution. PA-NL-SIM in combination with the lattice light sheet illumination scheme named LLS-PA-NL-SIM⁹⁹ has been claimed to achieve a spatially anisotropic super-resolution of $118 \times 230 \times 170$ nm (x, y, z). Thus, this implementation shows true non-linear super-resolution in only one dimensional. The LLS-PA-NL-SIM acquisition time for

a 1D super-resolution improvement is about 2.5 s (a volume containing 28 slices imaged in 70.5 s), which is comparable and even longer than in MoNaLISA imaging.

STED¹⁸ is potentially the fastest diffraction-unlimited super resolution methods and it has been demonstrated to work in living samples even at video rate³⁵. However, the recording speed can only be achieved in a small field of view because of the point-scanning implementation. A recording time of a field of view of $45 \times 45 \mu\text{m}^2$ in STED would take about 20 to 40 times longer than in MoNaLISA parallelized recording. A parallelized version of STED has been reported^{111,112} but, to our knowledge, it has not been demonstrated in living samples and time-lapse recordings. Additionally, since STED is based on the stimulated emission depletion mechanism, recordings require light intensities ($\text{MW-GW}/\text{cm}^2$) which are notoriously several orders of magnitude higher than the ones used in MoNaLISA ($\text{W-kW}/\text{cm}^2$).

Single molecule switching methods such as PALM/STORM/FPALM^{39,40,42} and the 3D derived technique such as iPALM¹¹³⁻¹¹⁵, 3D STORM based on *PSF* astigmatism³⁷, multi-planes¹¹⁶ or other *PSF* engineering methods³⁸ are very effective in terms of spatial resolution but they compromise recording speed and that is why most of these experiments are carried on with fixed samples. There have been efforts to apply single molecule switching methods to live-cell imaging, for example 3D STORM was successfully applied to image clathrin-coated pits at 1 – 2 s temporal resolution^{53,117}. However, structures which need higher labelling density to be resolved will inevitably compromise the recording speed, mostly because of the intrinsic trade-off in the concept between spatial resolution, which requires a high number of localizations, and acquisition time.

Finally, WF-RESOLFT⁹⁶ can achieve temporal resolutions of ~ 1 s per frame which is comparable to MoNaLISA, however it lacks optical sectioning and it is much less efficient in photon collection, which decreases the image contrast and overall quality. In fact, an increase in the length of the switching cycle has been reported in order to improve the SNR at the cost of reducing the temporal resolution to ~ 17 s per frame⁹⁷. Moreover,

neither WF-RESOLFT nor PA-NL-SIM, which are both based on rsFP, have been demonstrated to our knowledge at endogenous levels of fluorescent proteins expression.

To sum up, while different existing techniques are as good as, or better than MoNaLISA in one or some metrics regarding live-cell, super-resolution imaging, no technique to date presents at the same time the advantages of our approach in terms of minimal light doses, optical sectioning, field of view size, spatial resolution, and flexibility to visualize structures in the entire cell.

2.11 Conclusions and outlook

We have demonstrated that our parallelized RESOLFT multifocal microscope, MoNaLISA, enables entire living cells and tissues to be studied in 3D with an unprecedented combination of spatio-temporal resolution and minimal doses of light. The efficient use of ON-OFF switching cycles in combination with intrinsic optical sectioning and optimal photon collection enabled the imaging of subcellular structures at the nanoscale at endogenous, physiologically relevant expression levels, which would have been missed in previous implementations. The time resolution did not yet reach the limit posed by the switching kinetics of the rsFP⁹². Faster camera technology, as well as condensed acquisitions in a single camera exposure as in instant SIM¹⁰⁹ have the potential to maximize the recording speed of MoNaLISA.

This work was developed in a research stay of one year (2016) at the group of Prof. Ilaria Testa at the Science for Life Lab, KTH in Stockholm, Sweden. My main contribution to the project was the development of the method concept, the design of the optical system, the construction of the experimental setup and the development of the instrumentation and control software. I also performed measurements in living cells to quantify the spatiotemporal resolution of the microscope and I was substantially involved in the development of the algorithms for the image reconstruction software. After my return to

Buenos Aires I was involved in the design of the rest of the experiments of the project, in the data analysis and in writing the manuscript.

Since its publication in 2018, the group of Prof. Ilaria Testa together with collaborators have further improved, expanded and applied the parallelized RESOLFT microscopy work presented in this Thesis. Some of the immediate subsequent successful projects have been: i) implementation of MoNaLISA with red-shifted rsFP¹¹⁸ making the method even more live-cell compatible, ii) extension of the sub-100 nm super-resolution to the three dimensions¹¹⁹, iii) neuronal studies of the tubular ER organization and the mitochondria-ER interactions in different compartments of live neuronal cells¹²⁰. Further improvements such as multicolor recordings, larger fields of view ($> 200 \times 200 \mu\text{m}^2$) and combinations with single-molecule methods are currently under investigation.

Chapter 3 – Single-molecule localization by sequential structured illumination

Since it became technically possible, localization of single fluorescent molecules has been key to obtain information on biological processes beyond ensemble averages. For instance, single-molecule tracking measurements provide unique insight into molecular trajectories that would otherwise be hidden in the average behavior of an ensemble of unsynchronized molecules^{121–125}. Another important application of single-molecule localization is single-molecule localization microscopy (SMLM) methods which were reviewed in Section 1.5.

The performance of SMLM is limited by the photostability of the fluorophores^{36,126,127}. Most commonly, single-molecule localization is performed using uniform illumination, and the position of the molecule is determined from a fit to its image recorded with a photodetector array such as an EM-CCD or a CMOS camera. With this approach, the lateral localization precision of organic fluorophores under biologically compatible conditions lies typically in the range of 10 – 50 nm. Recently, aiming to attain higher localization precisions (sub-10 nm) with the available photon budget, a series of methods, such as MINFLUX, SIMFLUX, ROSE or MINSTED, have been developed where single emitters are interrogated with a sequence of spatially modulated patterns of light. These methods have been briefly reviewed in Sections 1.8. At first sight, due to the differences in the structure of the excitation light, instrumentation, measurement protocols, and data analysis methods, each of these methods may appear unique. In this chapter, we show how these techniques can be regarded as special cases of a common concept of single-molecule localization using sequential structured illumination (SML-SSI). Furthermore, the generalization includes older methods of single-molecule localization and tracking such as orbital tracking, reviewed in section 1.9. We present a common analytical framework for SML-SSI and use it to perform a fair benchmarking between methods and to identify

new single-molecule localization methods that bring together the strengths of the available techniques.

3.1 A common framework for single-molecule localization using sequential structured illumination (SML-SSI)

Figure 1a shows schematically the essential components of SML-SSI. A spatially structured excitation field $I(\mathbf{r})$ is sequentially shifted along a sequence of K positions \mathbf{r}_i ($1 \leq i \leq K$). Here, we will deal with the two-dimensional (2D) localization problem. Naturally, the formalism can be easily reduced to 1D localization or extended to 3D localization. In 2D, the K positions \mathbf{r}_i may be arbitrary within the plane of interest but must not be in line to avoid obvious localization ambiguities. We will call the sequence of $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ the “excitation pattern”, and \mathbf{r}_E the position of the emitter whose position is to be determined. For each $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$, the emitter is exposed to a specific local intensity $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ and emits fluorescence with a certain intensity, which in turn corresponds to an expected value of detected photon counts (λ_i) during a given integration time in the experiment. The measured fluorescence photon counts are denoted by n_i , which are assumed to be Poisson distributed with average λ_i . The latter is an excellent approximation for modern avalanche photodiodes (APD) with neglectable dark counts and readout noise. The position of the emitter is determined from the sequence of intensity measurements $\bar{\mathbf{n}} = [n_1, n_2, \dots, n_K]$, and considering the known $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$. The relationship between $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ and λ_i is assumed to be linear (emission far from saturation).

Although in this Chapter we will treat $I(\mathbf{r})$ as a known function, we stress that SML-SSI methods consist of actually two measurements of equal importance: **(1)** A detailed characterization of the excitation light field $I(\mathbf{r})$ where almost unlimited photons (i.e. $N > 10^6$, high SNR) can be collected because very bright emitters are used (i.e. fluorescent

NPs), and (2) a measurement with limited photon counts (i.e. $N < 10^3$, low SNR) by sequentially exciting the single emitter (i.e. organic fluorophore or fluorescent protein), whose position is unknown, with the previously determined $I(\mathbf{r})$ placed at different positions \mathbf{r}_i .

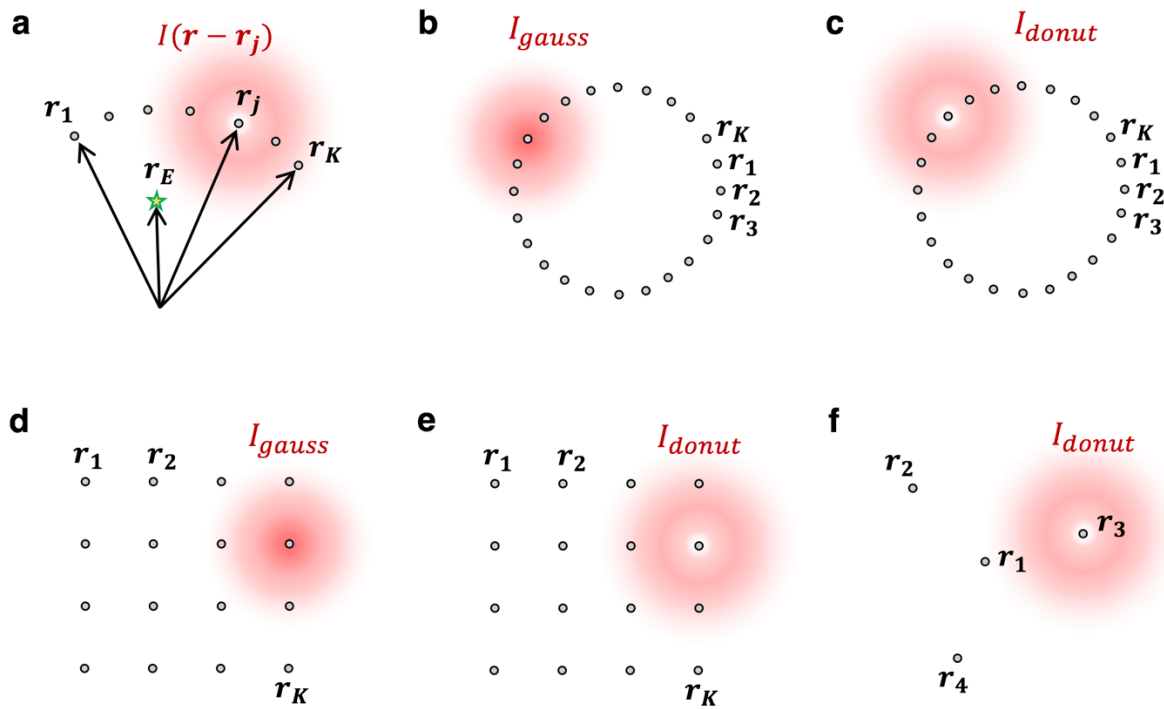


Figure 3.1 Common framework for single-molecule localization with sequential structured illumination (SML-SSI). (a) Schematic showing the essential parameters of a SML-SSI measurement in 2D. \mathbf{r} defines the position in the plane of interest. $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j)$ is the structured excitation field located at position \mathbf{r}_j . The excitation field is sequentially placed at K positions \mathbf{r}_i ($1 \leq i \leq K$). At each position of the excitation field, the intensity of an emitter placed at \mathbf{r}_E is registered. (b-f) Example configurations of SML-SSI measurements using a maximum (I_{gauss}) or a minimum (I_{donut}) of light.

Any method of SML-SSI can be fully described by $I(\mathbf{r})$ and the set of \mathbf{r}_i . We will deal with methods using focused laser beams, which can be classified into two categories depending on whether the focus has a central maximum or a central minimum (ideally a zero) of intensity. For our analysis, focused excitation fields with a central maximum will be described with a Gaussian function:

$$I_{Gauss}(\mathbf{r}) = A_0 e^{-4 \ln 2 \frac{r^2}{FWHM^2}} \quad (3.1)$$

and excitation fields with a central zero, here called donut-shaped foci, will be described as:

$$I_{donut}(\mathbf{r}) = A_0 4e \ln 2 \frac{r^2}{FWHM^2} e^{-4 \ln 2 \frac{r^2}{FWHM^2}} \quad (3.2)$$

While for the following calculations we will use the idealized $I_{Gauss}(\mathbf{r})$ and $I_{donut}(\mathbf{r})$, we note that the analysis can be performed with any other shape of $I(\mathbf{r})$, particularly with functions describing more accurately experimentally determined illumination patterns.

As for the sequence of excitation positions \mathbf{r}_i , we will consider two types too: orbital sequences enclosing an area (as it is done in orbital tracking), and raster-scanning sequences covering an area (as it is done in raster-scanning microscopy). Varying combinations of I_{Gauss} , I_{donut} and sequence of \mathbf{r}_i can be used to define any SML-SSI with focused beams, including all reported methods and any new conception.

Figures 1b to 1e show some example configurations of SML-SSI measurements. Figure 1b shows schematically the combination used for classical orbital tracking (OT)^{78,79,128}, namely, I_{Gauss} excitation sequentially shifted over K positions along a circle. In practice, optimum performance in OT is achieved with a radius of the orbit close to half the full-width at half-maximum (FWHM) of I_{Gauss} ^{77,79,128}. The number of exposures K may vary

from a few up to a quasi-continuum intensity register. The so-called Single-Molecule Confocal Laser Tracking (SMCT)⁸³ can be regarded as a special case of orbital tracking with $K = 6$. MINSTED⁷⁶ is, in essence, another expression of OT that achieves higher localization precision by using an effectively smaller excitation field, produced by the combination of a normal excitation beam and a donut-shaped depletion beam, just as in STED microscopy^{18,129}. Hence, the excitation field of MINSTED can be described by $I_{Gauss}(\mathbf{r})$ with a FWHM below the diffraction limit. Alternatively, OT could be performed with $I_{donut}(\mathbf{r})$, as schematically shown in Figure 3.1c. We will call this method OTMIN. So far, it has not been proposed or implemented.

The sequence of \mathbf{r}_i , can also be organized in a raster to cover an area, as shown in Figure 3.1d for $I_{Gauss}(\mathbf{r})$. This configuration, here denoted RASTMAX, has been recently applied in a conventional confocal microscope¹³⁰. Under this framework, a new method where $I_{donut}(\mathbf{r})$ is raster scanned over a rectangular area can be easily envisaged, as schematically shown in Figure 1e; we will call this new scheme RASTMIN. Finally, Figure 3.1f shows the scheme of 2D MINFLUX where $I_{donut}(\mathbf{r})$ is shifted over four positions: a central exposure and three more forming an equilateral triangle around the central position^{59,68}. 2D MINFLUX can be classified as a raster-scanning method because the excitation pattern used is the minimum needed to cover an area.

3.1.1 Position estimation and precision

Estimating the molecular position from the intensity measurements $\bar{n} = [n_1, n_2, \dots, n_K]$ and $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ can be done in innumerable ways, and many have been implemented in the various methods cited above. For example, in orbital tracking, the position of the emitter has been estimated by analyzing quasi-continuum intensity signals by Fourier analysis⁷⁹ or by triangulation of discrete intensity signals⁸³. In MINFLUX^{59,68}, or the four-focus single-particle localization⁸⁴, the position of the emitter is obtained using a maximum

likelihood estimator with four intensity measurements. Other methods such as MINSTED⁷⁶ use ad-hoc analysis functions and routines.

Ideally, the position estimator must be unbiased and accurate. Independently of the estimator used, using the Fisher information matrix, a theoretical maximum accuracy for an unbiased position estimator can be calculated in the form of a theoretical lower bound for the variance of the estimator, the so-called Cramér-Rao bound (CRB)¹³¹. Here, we will use the maximum likelihood estimator to determine the emitter position from \bar{n} and $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$, as it is by far the most widely used approach in statistical estimation due to its well-established performance; it is in general consistent and asymptotically attains the CRB¹³¹. Studies about deconvolution in microscopy showed that the MLE is more accurate than least squares based algorithms especially for quantum-limited data, i.e. Poisson distributed data with low signal levels^{132,133}. More recently, the performance of the MLE for single-molecule localization has been validated in camera-based approaches^{134–136} as well as in sequential structured illumination approaches such as the 3D four-focus localization⁸⁴ or MINFLUX⁶¹.

The likelihood function \mathcal{L} for the emitter position can be expressed as:

$$\mathcal{L}(\mathbf{r}_E|\bar{n}) = \frac{N!}{\prod_{i=1}^K n_i!} \prod_{i=1}^K p_i(\mathbf{r}_E)^{n_i} \quad (3.3)$$

where $N = \sum_{i=1}^K n_i$ is the total number of detected photons, and $p_i(\mathbf{r}_E)$ is the multinomial parameter for each exposure:

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} \quad (3.4)$$

defined as the ratio between the intensity of the excitation field at the fluorophore position for the current exposure and the sum of all the exposure intensities. In the presence of background, defined by the signal-to-background ratio (SBR) eq. (3.4) becomes:

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{SBR(\mathbf{r}_E)}{SBR(\mathbf{r}_E)+1} \frac{I(\mathbf{r}_E-\mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E-\mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_E)+1} \frac{1}{K} \quad (3.5)$$

where

$$SBR(\mathbf{r}_E) = \frac{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E-\mathbf{r}_j)}{\sum_{j=1}^K I_b(\mathbf{r}_E)} = \frac{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E-\mathbf{r}_j)}{K I_b} \quad (3.6)$$

Here, we have assumed that the background contribution is equal for all exposures and does not depend on the position of the emitter. A detailed derivation of eq. (3.5) is described in Appendix 3.1 at the end of this chapter. $SBR(\mathbf{r}_E)$ can be calculated from an assumption (or experimental determination) of SBR at the center of the excitation pattern $SBR(\mathbf{0})$, as

$$SBR(\mathbf{r}_E) = SBR(\mathbf{0}) \frac{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E-\mathbf{r}_j)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{0}-\mathbf{r}_j)} \quad (3.7)$$

In the following, we will use $SBR(\mathbf{0}) \equiv SBR$ as a scalar parameter for the benchmarking of the different methods.

For the MLE, it is practical to use the log-likelihood function $l(\mathbf{r}_E|\bar{n}) = \ln(\mathcal{L}(\mathbf{r}_E|\bar{n}))$:

$$l(\mathbf{r}_E) = \sum_{i=0}^K \ln(p_i(\mathbf{r}_E)) n_i \quad (3.8)$$

since we are interested in finding the value of $\mathbf{r}_{\mathbf{E}}$ that maximizes the function. In eq. (3.8), all additive constants have been omitted because they are irrelevant for the maximum likelihood estimation of the emitter position, which is computed as follows:

$$\widehat{\mathbf{r}_{\mathbf{E}}}^{MLE} = \arg \max (l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})) \quad (3.9)$$

In general, SML-SSI delivers high precision position estimations only for molecules in the vicinity of the excitation pattern. Thus, extra, prior, lower-precision information about the emitter position is necessary to place the excitation pattern in such a way that the emitter position can be estimated with high precision. The likelihood function can be modified to include this *prior* as follows:

$$\mathcal{L}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}}) = \frac{N!}{\prod_{i=1}^K n_i!} \prod_{i=1}^K p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})^{n_i} f(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) \quad (3.10)$$

Where the function $f(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$ includes the prior information about the emitter position. The log-likelihood function then becomes:

$$l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}}) = \sum_{i=1}^K n_i \ln p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}}) + \ln f(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) \quad (3.11)$$

Where, again, all the constant terms have been dropped since we are only interested in the maximum of the $l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}})$ function. We note that f may depend on an independent set of photon counts used to determine the molecule position with low precision.

For the 2D problem, $\mathbf{r}_{\mathbf{E}} = (x, y)$ and the Fisher information matrix takes the form:

$$\mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = -E \left(\begin{bmatrix} \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}})}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}})}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}})}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 l(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}|\bar{\mathbf{n}})}{\partial y^2} \end{bmatrix} \right) \quad (3.12)$$

which using eq. (3.11) can be expressed as:

$$\mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \mathcal{J}_{SML-SSI} + \mathcal{J}_{prior} = N \sum_{i=1}^K \frac{1}{p_i} \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial p_i}{\partial x}\right)^2 & \frac{\partial p_i}{\partial x} \frac{\partial p_i}{\partial y} \\ \frac{\partial p_i}{\partial y} \frac{\partial p_i}{\partial x} & \left(\frac{\partial p_i}{\partial y}\right)^2 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 \ln f}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 \ln f}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 \ln f}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 \ln f}{\partial y^2} \end{bmatrix} \quad (3.13)$$

Finally, the lower bound for the covariance matrix of the estimated emitter position as a function of the real emitter position, $\Sigma_{cov}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$, can be obtained from the Cramér-Rao inequality:

$$\Sigma_{cov}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) \geq \Sigma_{CRB}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})^{-1} \quad (3.14)$$

The eigenvalues of Σ_{cov} and Σ_{CRB} are denoted as σ_x^2 and σ_y^2 . It is common practice to represent Σ_{cov} and Σ_{CRB} as ellipses with the principal axes directions given by the eigenvectors of the matrices and the length of the axes given by $2\sigma_x$ and $2\sigma_y$ respectively. For simplicity, in this Chapter we will take the arithmetic mean of the eigenvalues of $\mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})^{-1}$ as a measure of the average maximum precision:

$$\sigma_{CRB}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \sqrt{\frac{1}{2} \text{tr} [\Sigma_{CRB}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})]} = \sqrt{\frac{1}{2 \det[\mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})]} \text{tr} [\mathcal{J}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})]} \quad (3.15)$$

In general, $f(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$ reduces the uncertainty in the position estimation. To visualize this, it can be considered that any *prior* can be expressed, at least approximately, as a Gaussian

function or similar centered at the estimated position, whose logarithm has a second derivative that is always negative.

The implementation of this mathematical framework, i.e. all functions and scripts used in this work, is written in Python and is fully open-source. It can be found at <https://github.com/lumasullo/sml-ssi> and at <https://github.com/Stefani-Lab/sml-ssi>. All calculations and simulations can be easily reproduced following the instructions in the repositories.

3.2 Benchmarking different methods

Next, we benchmark the theoretical performance of different orbital and raster scanning methods, including reported techniques and new proposals. For each method, we show an exemplary 2D map of $\sigma_{CRB}(\mathbf{r}_E)$ for a set of realistic experimental parameters ($N = 500$ detected photons, $SBR = 5$) and then compute the average σ_{CRB} ($\bar{\sigma}_{CRB}$) within a circular field-of-view (FOV) concentric with the excitation pattern.

The size of the excitation pattern is a relevant parameter for all methods. Here, we will parametrize it by L , the diameter of the orbit or the diagonal of the raster, for orbital or scanning methods, respectively. For a field of view (FOV) with a diameter of $0.75 L$, which is a suitable localization region for all methods, we evaluate $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of N and SBR . In all cases, we used a Gaussian *prior* $f(\mathbf{r}_E)$ that represents a rough previous localization of the emitter ($\sigma_{prior} = 50$ nm), which is a common step of all real-life experiments of this kind. The cost in photon budget of this prior information is not analyzed as it would be the same for all the methods; it would lay in the $N = 50 - 100$ range, depending on the procedure used.

3.2.1 Orbital methods

We first analyze orbital methods using I_{gauss} excitation. We note that, theoretically, the localization precision using Gaussian beams increases indefinitely with L . However, in practice, the drop in SBR leads to a compromise value of the orbit roughly equal to the $FWHM$ ^{77,79}. Therefore, all orbital methods using a Gaussian beam will be studied for $L = FWHM$.

Figure 3.2a shows a map of the localization precision (σ_{CRB}) for orbital tracking (OT) with $L = FWHM = 300$ nm, $K = 100$, $N = 500$, and $SBR = 5$. The performance is approximately flat in areas up to $\sim L^2$. This behavior is also evident in the curves of $\bar{\sigma}_{CRB}$ vs. size of the FOV for OT ($L = 300$ nm) and MINSTED ($L = 100$ nm and $L = 50$ nm) in Figure 3.2b. For the case of $L = 50$ nm, it can be observed that the localization uncertainty increases up to 20 – 30 nm for $FOV > 5L$. A similar behavior is observed for all orbital tracking implementations scaled by L .

Figures 3.2c and 3.2d show the $\bar{\sigma}_{CRB}$ over a FOV with a diameter of $0.75 L$ as a function of SBR and N , respectively. Both continuous (solid line) and discrete (stars) versions show almost identical behaviors and are strongly influenced by the size of $FWHM = L$, which explains the better precision achieved with MINSTED. Attaining 1-nm precision with $N = 1000 - 3000$ is only possible with $L < 100$ nm, i.e. by means of STED or any other way to achieve sub-diffraction effective excitation fields.

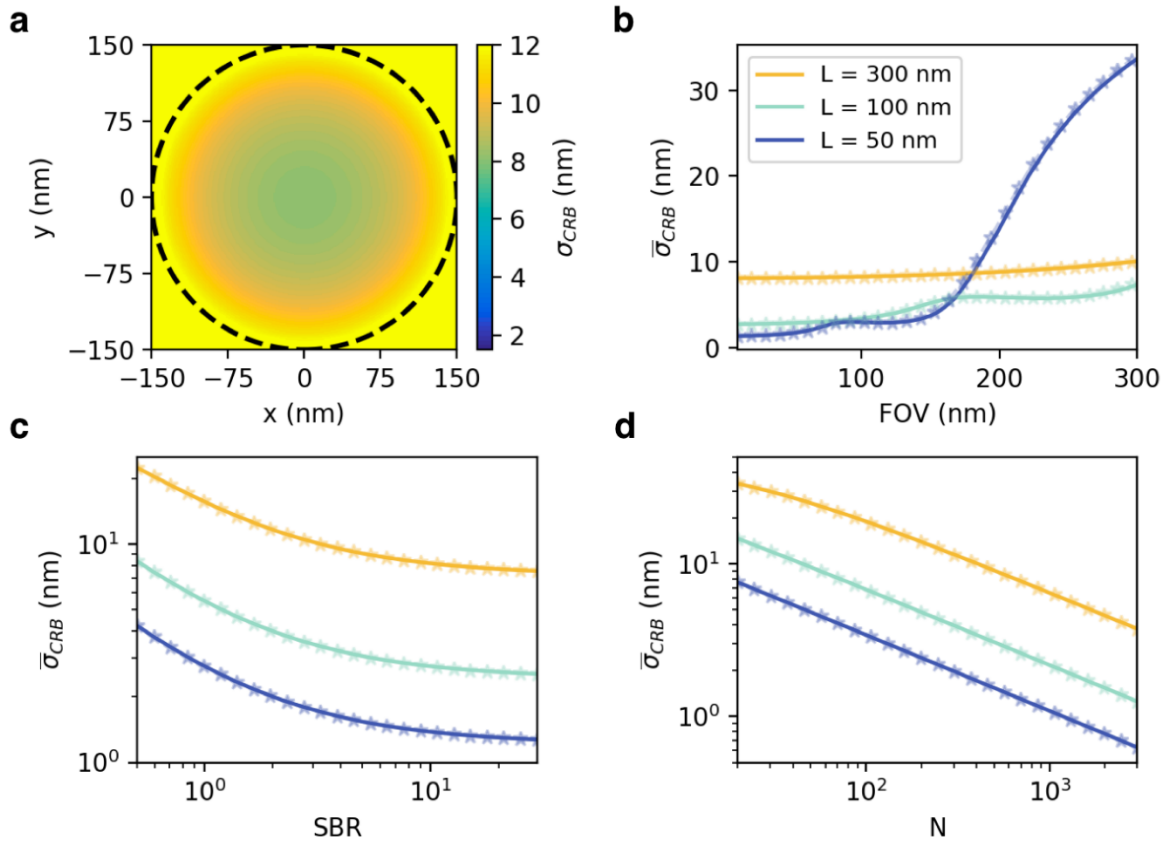


Figure 3.2 Orbital Tracking, Single-Molecule Confocal Tracking and MINSTED. (a) Precision map $\sigma_{CRB}(x, y)$ for $L = FWHM = 300$ nm, $K = 100$. The black dotted line indicates the orbit. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of the FOV for three values of $L = FWHM$. (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of SBR. (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of N . Parameters: $K = 100$ (solid) and $K = 6$ (stars), $N = 500$, $SBR = 5$, unless otherwise stated.

Also in Figures 3.2b-d, the performance of these methods is shown for $K = 6$ (dotted lines). Particularly, the diffraction-limited case ($L = 300$ nm) with $K = 6$ corresponds to the method reported as SMCT⁸³. The theoretical localization precision achieved with just 6 exposures is practically the same as with a quasi-continuous signal register ($K = 100$).

Next, we analyze the performance of a method featuring a minimum of intensity in the excitation beam (I_{donut}) and an orbital sequence of exposures. To our knowledge, such a

method has not been realized experimentally. We will refer to it as Orbital Tracking with a MINimum (OTMIN).

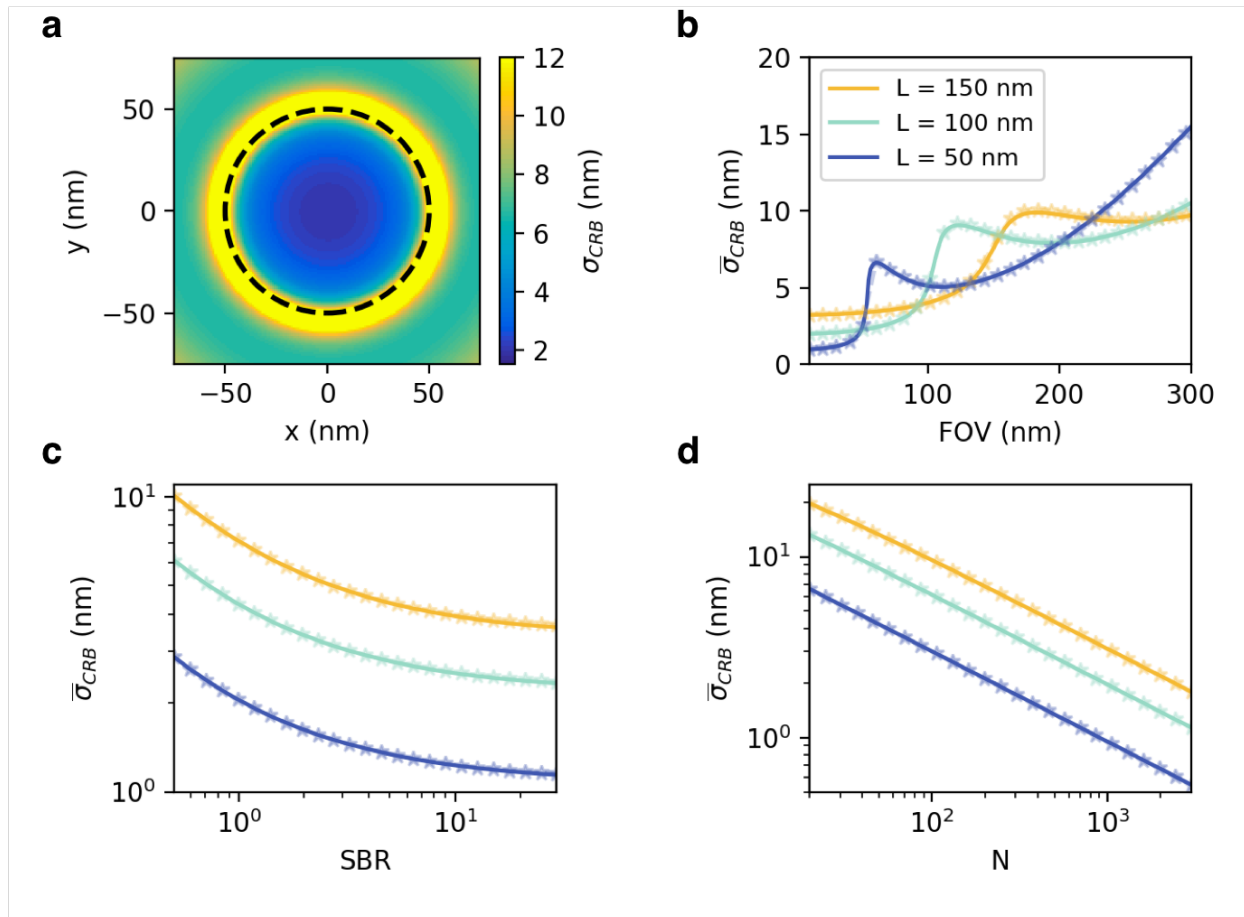


Figure 3.3 Orbital Tracking with a minimum of intensity. (a) Precision map $\sigma_{CRB}(x, y)$ for $L = 100$ nm. The black dotted line indicates the orbit. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of the FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of N . Parameters: $K = 100$ (solid) and $K = 6$ (stars), $FWHM = 300$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$, unless otherwise stated.

Figure 3.3a shows a 2D map of σ_{CRB} for OTMIN with $L = 100$ nm and $K = 100$. In contrast to OT, OTMIN can be performed with orbits of arbitrarily small size without the need of applying sub-diffraction techniques. OTMIN delivers accurate localizations in the inner part of the orbit. Remarkably, in the region close to the orbit the σ_{CRB} increases

rapidly. Monte-Carlo simulations confirm that the OTMIN estimator is accurate and reaches the CRB in the inner part of the area defined by the orbit (Figure 3.4a) but becomes imprecise and inaccurate in the vicinity of the orbit (Figure 3.4b). Nonetheless, this ill-behaved region is very narrow. Experimentally, it could be avoided by injecting information to the measurement in order to use a *FOV* limited to the well-behaved area, e.g., periodically recentering the pattern in real-time.

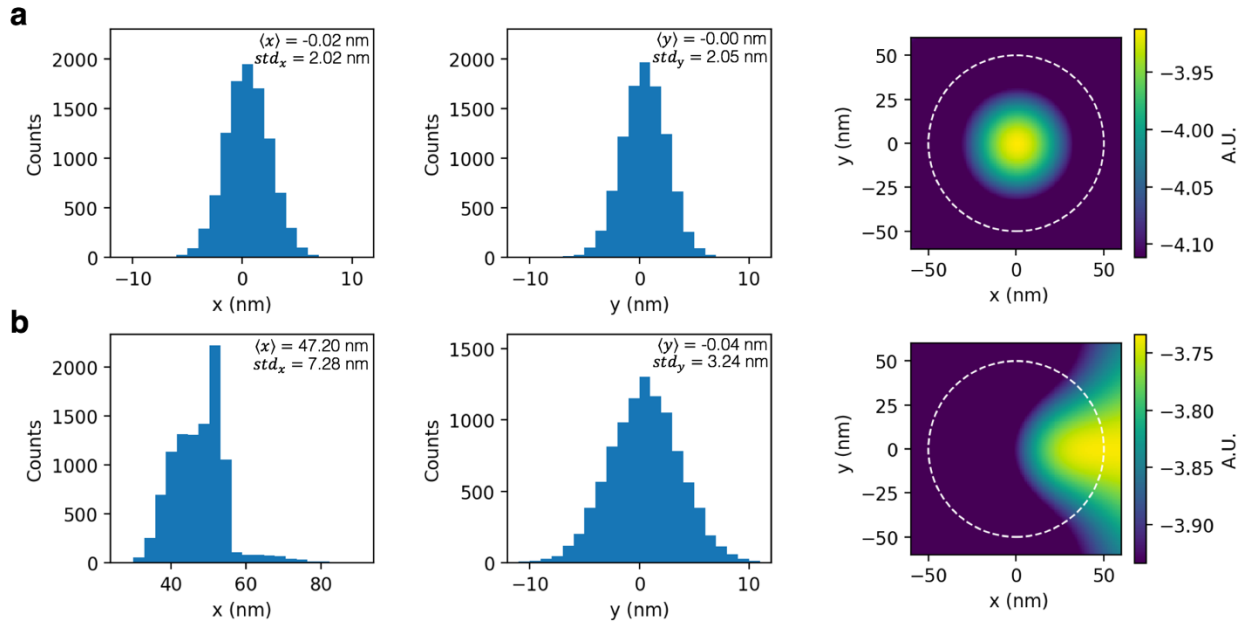


Figure 3.4 Simulated localizations for OTMIN. Estimations of x , estimation of y , and average likelihood function using OTMIN with $L = 100$ nm for **(a)** $\mathbf{r}_E = (0, 0)$ and **(b)** $\mathbf{r}_E = (50, 0)$. CRB values for **(a)** $\sigma_{CRB_x} = 2.01$ nm, $\sigma_{CRB_y} = 2.01$ nm. Parameters: $N = 500$, $SBR = 5$. Simulation size: 10000 samples for each position.

Figure 3.3b shows curves of $\bar{\sigma}_{CRB}$ vs. size of the *FOV* for OTMIN with $L = 50, 100$ and 150 nm for $K = 100$ (solid) and $K = 6$ (stars). The best achievable localization precision of OTMIN improves with decreasing values of L (for a constant $FWHM = 300$ nm of the focused beam). This increase in localization precision at the expense of limiting the *FOV* is a common feature of all methods using a minimum of intensity. Experimentally, the

ultimate limit to shrink L is the decrease in SBR . While the FOV can have a sub-diffraction size, the illumination and detection volumes are still diffraction limited. Thus, for a given illumination intensity, reducing L to subdiffraction dimensions reduces the excitation and fluorescence emission of the emitters, but the background contribution remains constant.

In all cases, for $K = 100$ (solid) or $K = 6$ (stars) and a FOV size of up to $0.75 L$, the average localization precision of OTMIN remains remarkably high. For example, for $N = 500$ and $SBR = 5$, OTMIN reaches an average precision of $\bar{\sigma}_{CRB} < 2$ nm with $L = 100$ nm, or $\bar{\sigma}_{CRB} < 1$ nm with $L = 50$ nm (Figure 3.3c-d). This level of performance is only comparable to the best-reported localization precision, attained with MINFLUX. OTMIN could be of particular interest for several labs in the world that already have OT setups. Their localization accuracy could be increased significantly simply by adding a suitable phase-mask in the excitation path to generate a focus with a central minimum.

3.2.2 Raster methods

MINFLUX, using just four exposures ($K = 4$) with the excitation pattern I_{donut} , can be regarded as the minimal expression of a raster method. Three of the exposures delimit an area that is probed with just one central exposure. MINFLUX performance has been comprehensively studied both theoretically and experimentally^{61,62}. Here, we reproduce (for completeness) and expand the reported theoretical results. We note, however, that our calculations include the spatial dependency of $SBR(x, y)$ instead of using the approximation of a constant $SBR(x, y) = SBR(0, 0)$. Figure 3.5a shows a map of σ_{CRB} for MINFLUX with $L = 100$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$, $FWHM = 300$ nm. Figure 3.5b displays curves of $\bar{\sigma}_{CRB}$ vs size of the FOV for $L = 50, 100, \text{ and } 150$ nm ($N = 500$ and $SBR = 5$), the central exposure of MINFLUX directly solves the problems of OTMIN close to the orbit border. As already reported, MINFLUX delivers the best localization precision at the center of the excitation pattern; a common feature of all these methods.

For instance, with $N = 500$, $SBR = 5$, and $L = 100$ nm, the average precision is $\bar{\sigma}_{CRB} = 2.7$ nm for a $FOV = 0.75 L$, while the precision at the center of the excitation pattern is $\sigma_{CRB}(0,0) = 2.0$ nm. The localization precision of MINFLUX is the best demonstrated to date, achieving $\bar{\sigma}_{CRB} < 1$ nm for $L = 50$ nm and $N \geq 800$, $SBR \geq 5$ (Figure 3.5d). It should be noted that as L is decreased, the precision at the center of the excitation pattern increases but $\bar{\sigma}_{CRB}(FOV)$ grows more rapidly (Figure 3.5b), specially outside the region defined by the excitation pattern. For example, $\bar{\sigma}_{CRB}(FOV = 200 \text{ nm}) \sim 6$ nm for $L = 100$ nm, while $\bar{\sigma}_{CRB}(FOV = 200 \text{ nm}) \sim 10$ nm for $L = 50$ nm.

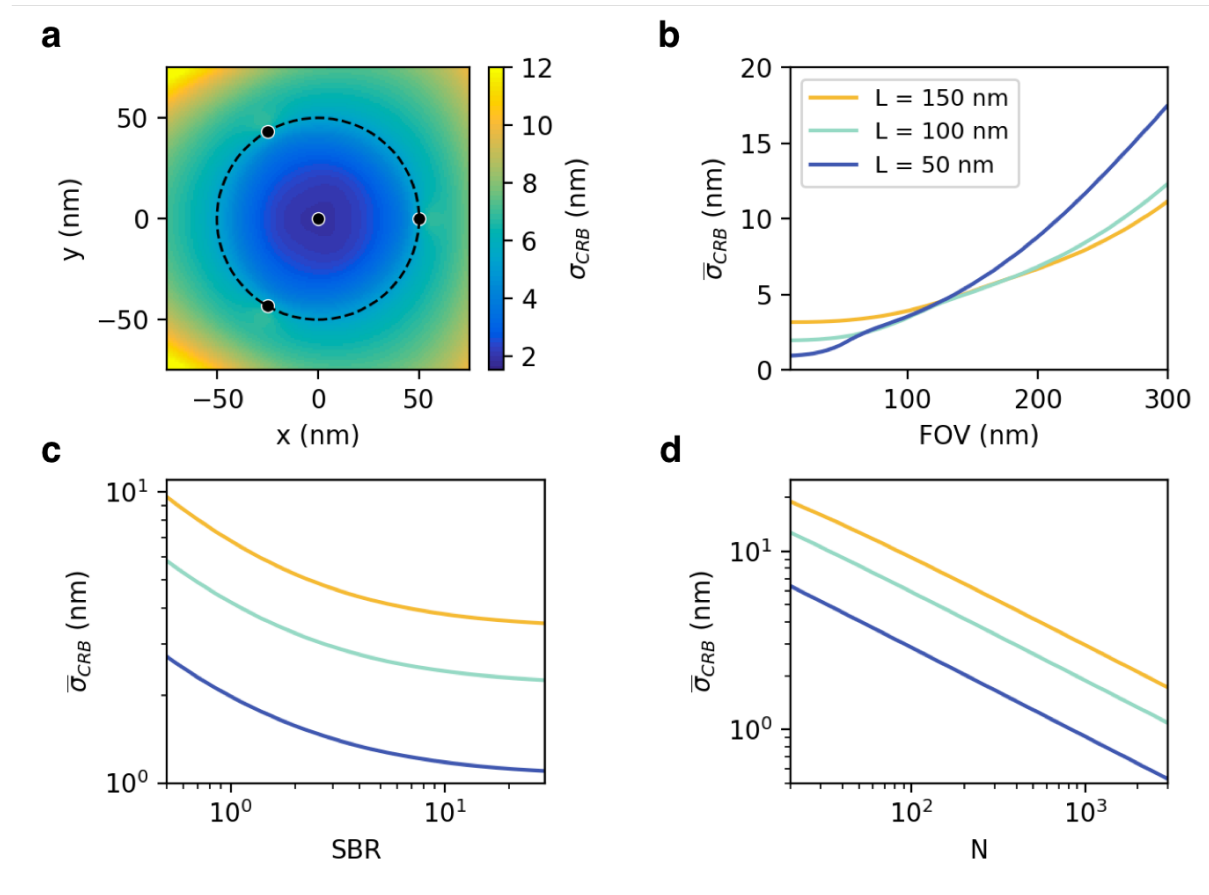


Figure 3.5 MINFLUX. (a) Precision map $\sigma_{CRB}(x, y)$ for $L = 100$ nm. Black dotted line indicates a circle of diameter L , black dots indicate the positions \mathbf{r}_i of the exposures. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of the FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of N . Parameters: $K = 100$, $FWHM = 300$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$ unless otherwise stated.

Another method of this kind consists of using exposures of a minimum of intensity organized in a rectangular raster. To our knowledge, such a method has not been reported either theoretically or experimentally. We will refer to it as RASTer scanning with a MINimum (RASTMIN). Figure 5a shows a 2D map of $\sigma_{CRB}(x, y)$ for RASTMIN with $L = 100$ nm, $N = 500$, and $SBR = 5$. As it happens with MINFLUX, the central exposures in RASTMIN solve the ill-behaved area problem that appears in OTMIN for $FOV \sim L$ (Figure 3.6b).

The performance of RASTMIN in terms of SBR (Figure 3.6c) and N (Figure 3.6d) is very similar to MINFLUX and OTMIN, achieving its best performance for $SBR > 5$ and reaching precisions of ~ 1 nm for $N = 500$ and $N = 1000$ for $L = 50$ nm and $L = 100$ nm respectively (Figure 3.6d).

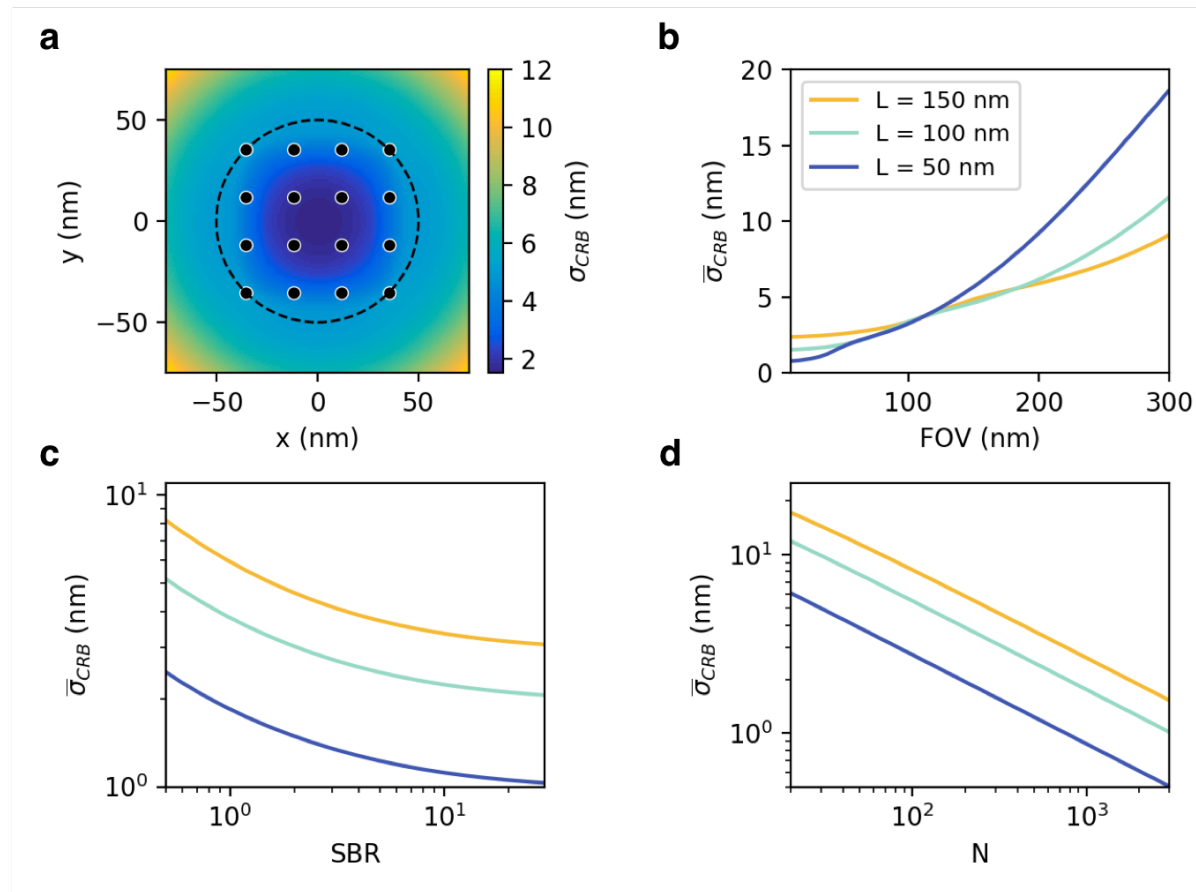


Figure 3.6 Raster scanning with a minimum. (a) Precision map $\sigma_{CRB}(x, y)$ for $L = 100$ nm. Black dotted line indicates a circle of diameter L , black dots indicate the positions \mathbf{r}_i of the exposures. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of the FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of N . Parameters: $K = 16$, $FWHM = 300$ nm, $N = 500$, $SBR = 5$ unless otherwise stated.

In principle, RASTMIN can be performed in any laser-scanning (confocal) microscope, as they are readily prepared to perform rectangular raster scans. The only hardware modification needed would be including a phase-mask into the excitation beam path to produce a focus featuring a central minimum (ideally a zero) of intensity. In this way, the power of localizing with intensity minima could be made available to significantly more optical systems available in many labs. We note, however, that achieving nanometer localization precision requires an active stabilization or drift correction systems with nanometer accuracy.

We also analyze the performance of the counterpart of RASTMIN using excitation maxima. For a sufficiently large L , this approach is equivalent to conventional laser-scanning (confocal) imaging and localization of the single emitter, which has recently been reported by the group of Jörg Enderlein and named Confocal Fluorescence Lifetime SMLM (FL-SMLM)¹³⁰. However, to avoid implying that confocality or picosecond time-resolved detection are necessary conditions for this method, we will name it RASTMAX as a more general approach that would include any technique that raster scans a (Gaussian) maximum of light over a single emitter.

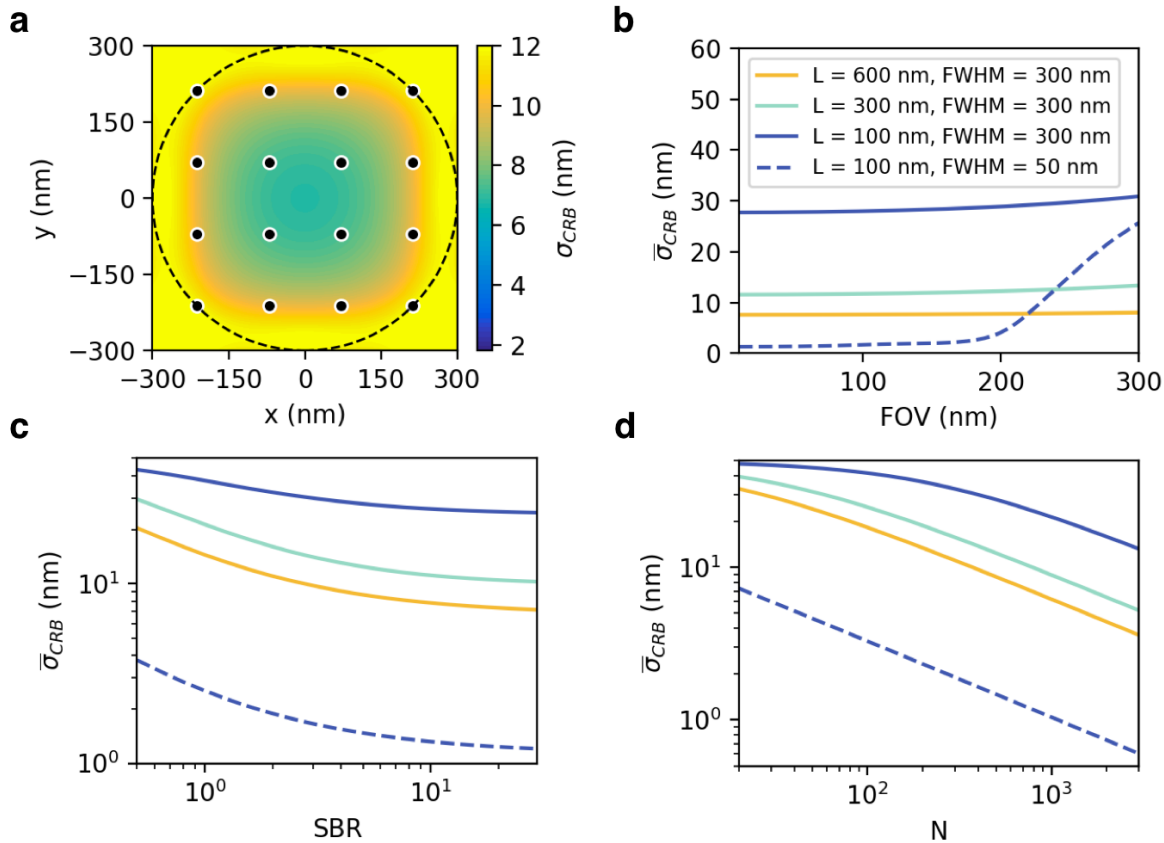


Figure 3.7 Raster scanning with a maximum. (a) Precision map $\sigma_{CRB}(x, y)$ for $L = 600$ nm. Black dotted line indicates a circle of diameter L , black dots indicate the positions \mathbf{r}_i of the exposures. (b) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of the FOV . (c) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of SBR . (d) $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of N . Parameters: $K = 16$, $N = 500$, $SBR = 5$ unless otherwise stated. $FWHM = 300$ nm (solid lines), $FWHM = 50$ nm (dotted line).

Figure 3.7a shows a map of σ_{CRB} for RASTMAX with $FWHM = 300$ nm, $L = 600$ nm, $N = 500$ and $SBR = 5$. Within the region-of-interest defined by $FOV = 0.75 L$, the average localization precision ranges from 7 to 9 nm. Contrary to what happens in RASTMIN, excitation patterns smaller than the $FWHM$ of the excitation beam decrease the precision achieved by RASTMAX (Figure 3.7b, solid lines). Given a certain $FWHM$, we find that $L < FWHM$ gives poor results in terms of precision because the part of the excitation beam with more sensitivity, the flanks of the Gaussian focus, are not used to

excite the emitter. Using $L \gg FWHM$ is not optimal either because most exposures would not excite the emitter efficiently and only contribute to add background to the measurement. Hence an optimal situation is given by $L \sim 2 FWHM$.

It is of interest to analyze RASTMAX with sub-diffraction excitation maxima, attained for example through STED. To our knowledge, such a nanoscopy scheme has not yet been realized, although experimental results of STED nanoscopy on immobilized single molecules have been reported^{28,137}. We study the potential performance of such a method by considering a RASTMAX scheme with $FWHM = 50$ nm and $L = 100$ nm. As it can be seen in Figure 3.7b (blue, dotted line) such a method has the potential to reach precisions comparable to MINSTED. The calculations indicate that ~ 1 nm precision should be reached for $N \sim 1000$ with a $SBR = 5$ (Figure 3.7d).

RASTMAX precision as a function of FOV remains fairly constant up to $FOV = 2L$ where it starts to decrease mainly due to a drop in relative SBR . This is evident in Figure 3.7b for the case of $FWHM = 50$ nm and $L = 100$ nm. The same behavior is found for the other examples, scaled by L ($FWHM$). On the other hand, the precision as a function of SBR decays in a similar fashion to the other methods (Figure 3.7c). While diffraction-limited RASTMAX does not match the precisions of MINFLUX, OTMIN and RASTMIN it should significantly outperform camera-based SMLM. The reason for this is that the measurement process in a single-photon counting detector such as an APD is well described by Poisson noise, while detecting with a camera involves other sources of noise that compromise localization precision at relatively low photon numbers¹²⁶.

3.2.3 Comparison between RASTMAX and camera-based localization

When comparing these two methods, it is important to note that they are based on two different physical phenomena. SML-SSI obtains the molecular position information from

light absorption. The differences in molecular excitation at each exposure of the sequence lead to different fluorescence emission intensities that are detected with a single photodetector. By contrast, in camera-based single-molecule localization, illumination is uniform and all the information about the molecular position is obtained from the angular photon emission registered as an image in an array of photodetectors (camera). Despite this, there are similarities in their position estimation and performance.

In camera-based single-molecule localization, emitted photons are detected in each camera pixel with a certain probability related to the image intensity at that pixel, which can be approximated by a Gaussian function, in this case corresponding to the point-spread function of the optical system. Hence, following an analog procedure to the one described in Section 3.1.1, we can write:

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{SBR(\mathbf{r}_E)}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{1}{K} \quad (3.16)$$

Where $\mathbf{r}_i = (x_i, y_i)$ defines the central position of the i -th pixel of the camera and $\mathbf{r}_E = (x_E, y_E)$ is the position of the emitter. $Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ is the integral of the Gaussian image intensity over the area of the i -th pixel:

$$Int_Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i) = \int_{y_i - \frac{a}{2}}^{y_i + \frac{a}{2}} \int_{x_i - \frac{a}{2}}^{x_i + \frac{a}{2}} Gauss(x - x_E, y - y_E) dx dy \quad (3.17)$$

With

$$Gauss(x - x_E, y - y_E) = A_{Gauss} \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(x - x_E)^2}{\sigma_{PSF}^2}\right) \exp\left(-\frac{1}{2} \frac{(y - y_E)^2}{\sigma_{PSF}^2}\right) \quad (3.18)$$

where a is the pixel width and height (assumed to be squared), σ_{PSF} defines the size of the Gaussian PSF (assumed to be symmetrical) related to the $FWHM$ by the equation $FWHM \approx 2.35 \sigma_{PSF}$, and A_{Gauss} is an amplitude that will cancel out when computing $p_i(\mathbf{r}_E)$. The expected background contribution λ_b is again assumed to be constant, equal for all pixels.

The analogy between RASTMAX and a camera-based approach becomes evident. The integral in equation (3.17) can be approximated by $a^2 Gauss(x - x_E, y - y_E)$. Then, equation (3.16) becomes:

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{SBR(\mathbf{r}_E)}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K Gauss(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{1}{K} \quad (3.19)$$

Which is formally equal to equation (3.5) with $I = I_{Gauss}$. In both cases the distribution of detected photons is Gaussian. In one case due to a Gaussian illumination and the other due to a Gaussian image.

Figure 3.8 shows example simulations of camera-based single-molecule localization using equation (3.16) and RASTMAX, both for $N = 500$ and $SBR = 5$. The difference in wavelength due to the expected Stokes shift was neglected and the same $FWHM = 300$ nm was used in both cases. As expected, the localization precision attained by both methods is practically identical.

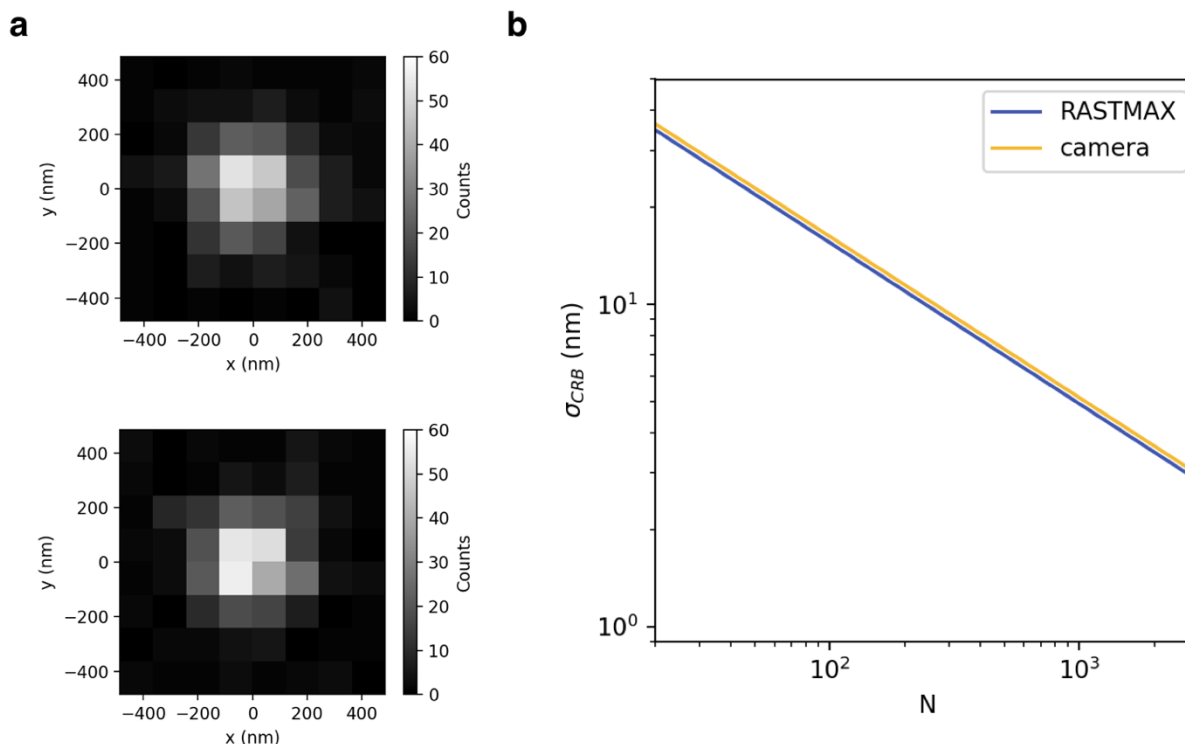


Figure 3.8 Comparison between RASTMAX and camera-based SM localization. (a) Simulation of single-molecule localization experiment in a widefield excitation, camera-based detection (top) and a raster scanning with a Gaussian beam in excitation and a single detector (bottom). Parameters: $N = 500$, $SBR = 5$. (b) $\sigma_{CRB}(0, 0)$ as a function of N , for RASTMAX and camera-based localization. $SBR = 5$. No *prior* was used in the calculated CRB for each method.

In practice, camera-based approaches cannot reach this level of precision. Reported values are typically a factor of 2 to 3 worse^{127,138}. The reason for this is that cameras present other sources of noise in addition to the fundamental Poisson shot-noise.

3.2.4 Top performance comparison

Finally, we made a comparison of reported and new methods under optimum conditions for each one. Figure 3.9 summarizes these results. The already known methods (OT,

MINSTED, MINFLUX, RASTMAX) were evaluated using the best combinations of parameters that have been experimentally realized. For the new methods (OTMIN, RASTMIN), we chose optimum parameters that are experimentally realizable. A $FWHM = 300$ nm was used for all diffraction-limited foci. When a sub-diffraction maximum of intensity was used (MINSTED) we considered a $FWHM = 50$ nm. Each method was evaluated for the best-performing and realistic value of L : $L_{OT} = 300$ nm, $L_{RASTMAX} = 600$ nm, and $L_{MINSTED} = L_{MINFLUX} = L_{RASTMIN} = L_{OTMIN} = 50$ nm. In all cases, $SBR = 5$ and a total photon-count $N = 500$ were considered.

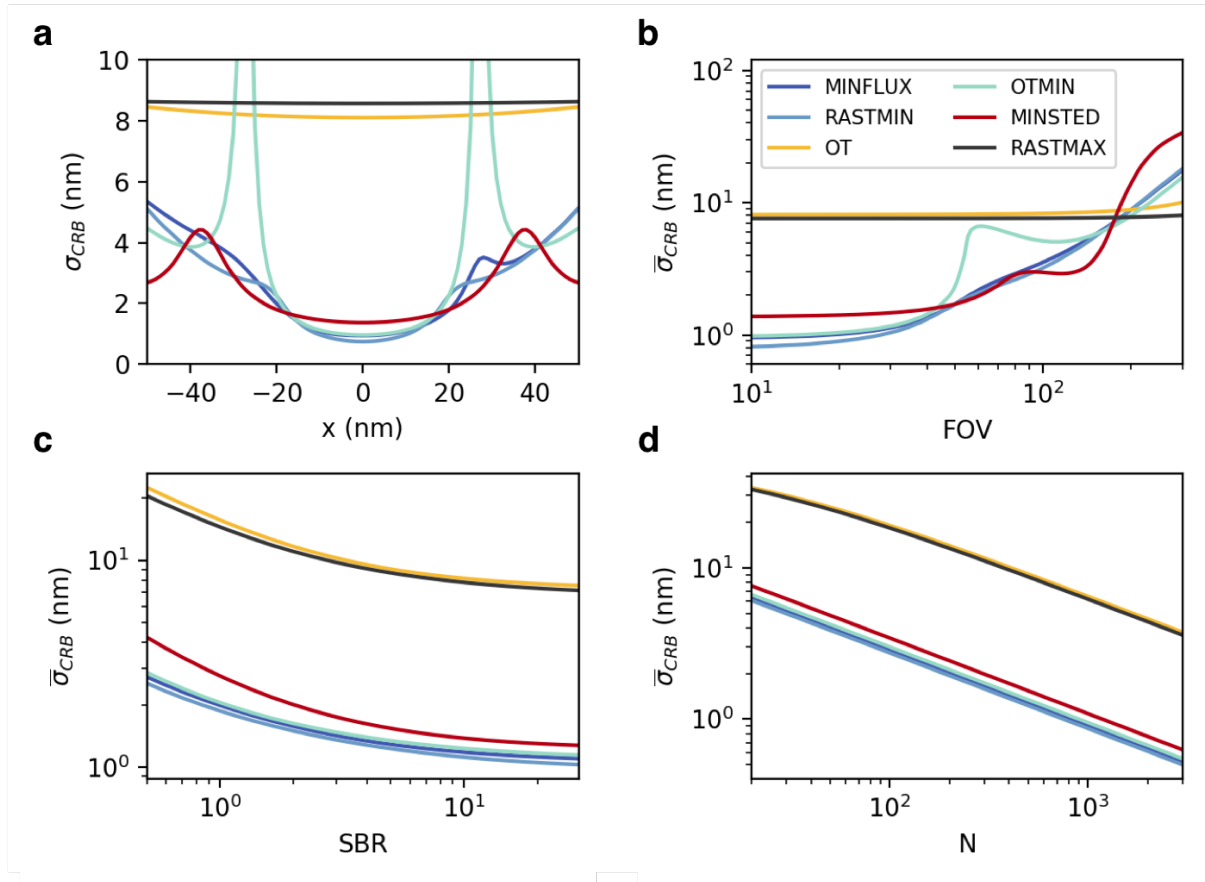


Figure 3.9 Comparison of the different methods. (a) 1D profile ($y = 0$) of the precision map $\sigma_{CRB}(x, y)$ for all the methods using their best-performing realistic parameters. A $FWHM = 300$ nm was used for all diffraction-limited foci. For MINSTED we considered a $FWHM = 50$ nm. L : $L_{OT} = 300$ nm, $L_{RASTMAX} = 600$ nm, and $L_{MINSTED} = L_{MINFLUX} = L_{RASTMIN} = L_{OTMIN} =$

50 nm. **(b)** $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of the FOV . **(c)** $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of SBR . **(d)** $\bar{\sigma}_{CRB}$ as a function of N . Other parameters: $N = 500$, $SBR = 5$ unless otherwise stated.

Among the methods that use diffraction-limited excitation, the ones using a minimum of intensity achieve a ~ 5 fold better precision than the ones using a maximum, regardless of the sequence of exposures (Figure 3.9a). Methods using sub-diffraction excitation maxima (i.e. MINSTED) can achieve a precision up to ~ 1 nm by engineering an effective PSF well below the diffraction limit of light.

In general, all techniques present the best performance in the central region of the excitation pattern, over an area about 75-80% of the range defined by the L (Figure 3.9b). In this regard, methods featuring maxima are more robust and perform well over larger regions of space.

For $SBR > 5$, the localization precision of all techniques is always better than 75% of the ideal precision for infinite SBR (Figure 3.9c). Detailed numbers on the analysis of precision with respect to SBR and FOV are given in Table 3.1. Methods using a minimum of intensity are $\sim 10 - 20$ times more photon efficient, reaching molecular-scale precision ($\sigma_{CRB} \sim 1$ nm) with $N \sim 1000$. Methods using a maximum of intensity are limited to $\sigma_{CRB} \sim 3 - 5$ nm for $N = 1000 - 3000$ and require much higher photon budgets ($N \geq 30000$) to achieve $\sigma_{CRB} \sim 1$ nm.

CONFIGURATION	$\sigma_{CRB}(\mathbf{r}_E = \mathbf{0})$	$\bar{\sigma}_{CRB}$	$SBR = 10000$	$SBR = 5$
MINFLUX L 50	0.94	1.29	1.05	1.29
MINFLUX L 100	1.96	2.65	2.16	2.65
MINFLUX L 150	3.16	4.18	3.39	4.18
OTMIN L 50	0.96	1.34	1.09	1.34
OTMIN L 100	2.00	2.77	2.22	2.77
OTMIN L 150	3.23	4.36	3.43	4.36
OTMIN L 50 K 6	0.96	1.34	1.10	1.34

OTMIN L 100 K 6	2.00	2.78	2.28	2.78
OTMIN L 150 K 6	3.23	4.38	3.51	4.38
RASTMIN L 50	0.74	1.23	0.97	1.23
RASTMIN L 100	1.52	2.47	1.93	2.47
RASTMIN L 150	2.35	3.71	2.88	3.71
RASTMAX L 100	27.73	27.87	24.26	27.86
RASTMAX L 300	11.56	12.44	9.80	12.44
RASTMAX L 600	7.59	8.69	6.72	8.69
RASTMAX L 100, FWHM 50	1.28	1.47	1.13	1.47
OT L 50 (MINSTED)	1.37	1.54	1.22	1.54
OT L 100 (MINSTED)	2.73	3.07	2.43	3.07
OT L 300	8.1	9.07	7.23	9.07
OT L 50 K 6 (SMCT)	1.37	1.54	1.22	1.54
OT L 100 K 6 (SMCT)	2.73	3.07	2.43	3.07
OT L 300 K 6 (SMCT)	8.1	9.07	7.23	9.07

Table 3.1 Performance comparison for various schemes of SML-SSI- Column 1: SML-SSI method and parameter L . Column 2: localization precision at the center of the excitation pattern $\sigma(r_E = (0,0))$. Column 3: average precision $\bar{\sigma}_{CRB}$ over a FOV corresponding to a circular area of diameter $0.75 L$ at $SBR = 5$ and $N = 500$. Column 4: average precision $\bar{\sigma}_{CRB}$ at $SBR = 10000$ (considered as infinite) and $N = 500$. Column 5: average precision $\bar{\sigma}_{CRB}$ at $SBR = 5$ and $N = 500$. All values are in nm.

3.3 Conclusions and outlook

We have presented a general framework for the description of all single-molecule localization techniques that use a sequence of structured excitations. In particular, the formalism is developed for focused beams featuring a central maximum or minimum of intensity. Under this framework, based on information theory and maximum likelihood

estimation, we made a fair comparison between methods using the Cramér-Rao bound, which is independent of the estimator used to infer the position of the emitter. Only Poisson shot-noise of the photon counts was considered. In this way, we computed the maximum possible localization precision, which is attainable with modern single-photon counting detectors such as avalanche photodiodes. Naturally, the analysis could be extended to represent other detectors by including additional sources of noise. Another advantage of the mathematical framework is the possibility to include formally the prior information needed in these methods to pre-locate the molecules. While we have focused on 2D localization, it is straightforward to generalize the analysis to three dimensions.

The common framework makes it easy to design new approaches. Here, we presented two new single-molecule localization schemes: OTMIN and RASTMIN. Both schemes achieve the highest localization precision, similar to MINFLUX, and have the potential to be implemented in existing optical systems with minor changes. OTMIN could be implemented in any OT setup by just adding a suitable phase mask to engineer a light focus with a minimum. A similar approach can be used to implement RASTMIN in any laser-scanning (confocal) microscope. We believe that these two approaches, and RASTMIN in particular, can significantly contribute to a wider application of fluorescence nanoscopy with molecular-scale resolution.

We found that all approaches featuring an intensity minimum have a similar performance in the central region of the excitation pattern. Independently of the geometry of the excitation pattern, they outperform methods featuring an intensity maximum by at least a factor of 5, reaching molecular-scale precision (~ 1 nm) with only $N \sim 1000$ detected photons at a $SBR = 5$.

In practice, RASTMAX (or confocal-SMLM) provides a significant improvement over camera-based SMLM in terms of precision. This is due to the fact that photon detection with current avalanche photodiodes include almost only Poisson noise, while EM-CCD or sCMOS cameras present substantial additional noise in their pixels.

All of these methods could benefit from iterative and adaptive approaches that update the sequence of excitations with new information about the position of the emitter, as it

was done with MINFLUX⁶². Moreover, while confocal detection is not necessary, it could be advantageous to obtain higher *SBR* conditions. We also note that active *xyz* drift compensation could be key to attain the highest localization precisions.

Methods that use sub-diffraction effective excitation patterns such as MINSTED or a combination of RASTMAX and STED can achieve localization precisions as good as methods using minima of light. However, it should be mentioned that in these experiments the total number of detected fluorescence photons N usually corresponds to a much higher number of excitation-emission cycles than in conventional measurements, with the consequent stress on the photostability of the emitter.

We stressed in Section 3.1 that any SML-SSI method consists of actually two measurements: **(1)** a high-SNR measurement of the excitation pattern $I(\mathbf{r})$, and **(2)** a low-SNR single-molecule measurement of $\{n_i\}$ photon counts. Although measurement **(1)** may be performed in various ways, the natural way to do it is to measure $I(\mathbf{r})$ over a square grid of pixels. Thus, in RASTMIN and RASTMAX, the two measurements take the form of two images of $I(\mathbf{r})$, one with high SNR and high resolution **(1)** and another one, eventually displaced, and with low SNR and low resolution **(2)**. In RASTMIN, this conceptualization makes it particularly straight-forward to understand the dependence of the localization precision σ_{CRB} with L . In the 2D case, the image of a minimum is well approximated by a paraboloid. Then, the RASTMIN single-molecule image of $I(\mathbf{r})$ is a paraboloid, and as such, it remains self-similar as L decreases. Also, for a given number of detected photons, the SNR will be constant. Hence, the uncertainty of the localization in terms of “pixels in the image” will be constant but the pixels are smaller, thus reducing the actual uncertainty measured in length units.

Finally, we note that other position estimators might be more suitable than MLE for different reasons (computational efficiency for real-time calculations, unbiased estimators at low N , etc). However, we believe that our approach explains thoroughly the fundamental similarities and differences between the different existing methods and will also be a powerful tool to design, develop, and combine new single-molecule localization methods and experiments.

Appendix 3.1 Derivation of $p_i(\mathbf{r}_E)$ with background

If we assume pure Poisson noise and we set the number of detected photons to N , the resulting measured array of photons has a multinomial distribution $n_i \sim \text{multinomial}(p_i, N)$. In the absence of background, the multinomial parameters p_i are given by

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E)}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E)} = \frac{I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} \quad (\text{A3.1})$$

That is the ratio between the excitation intensity of the i -th exposure and the sum of the rest of the exposures. Here, a linear relationship between the expected detected photon counts in each exposure λ_i and the intensity $I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$ is assumed. This is a very good approximation for fluorescence microscopy within the linear regime (far from saturation). In the case of methods using other photophysical transitions, the linear relationship will still hold with the *effective* excitation intensity $I_{eff}(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)$.

In the presence of background equation (A3.1) takes the form

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_E) + \lambda_{b_i}(\mathbf{r}_E)}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_E) + \lambda_{b_j}(\mathbf{r}_E)} \quad (\text{A3.2})$$

Following standard definitions, we can now define a signal-to-background ratio function

$$SBR(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) \equiv \frac{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})}{\sum_{j=1}^K \lambda_b(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})} = \frac{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})}{K \lambda_b} \quad (\text{A3.3})$$

where we have assumed $\lambda_{b_i}(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \lambda_b \quad \forall i$, that is that the detected background does not depend on the position of the single emitter $\mathbf{r}_{\mathbf{E}}$ and that all the background contributions of each exposure are approximately equal. This is a very good approximation of an experimental situation in which most background will come from out-of-focus autofluorescence coming from a biological context or the coverslip or other optical components. Also, the diffraction-limited size of the detection volume is considerably larger than the usually sub-diffraction excitation pattern. Thus, the background generated by the excitation field $I(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i)$ is practically independent of the position \mathbf{r}_i .

Hence, using that $SBR K \lambda_b = \sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$, we can rewrite

$$p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) + \lambda_b}{SBR K \lambda_b + K \lambda_b} = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) + \lambda_b}{K \lambda_b (SBR + 1)} \quad (\text{A3.4})$$

Multiplying and dividing by $\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})$ and using the definition (A3.3) we obtain

$$p_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}}) + \lambda_b}{K \lambda_b (SBR + 1)} \frac{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})} = \frac{\lambda_i(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})}{\sum_{j=1}^K \lambda_j(\mathbf{r}_{\mathbf{E}})} \frac{SBR}{(SBR + 1)} + \frac{1}{K(SBR + 1)} \quad (\text{A3.5})$$

And hence,

$$p_i(\mathbf{r}_E) = \frac{SBR(\mathbf{r}_E)}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_i)}{\sum_{j=1}^K I(\mathbf{r}_E - \mathbf{r}_j)} + \frac{1}{SBR(\mathbf{r}_E) + 1} \frac{1}{K} \quad (\text{A3.6})$$

where we explicitly write the dependence of SBR with the position of the emitter.

Chapter 4 – Pulsed Interleaved MINFLUX

The single-molecule localization method MINFLUX represented a breakthrough as it can routinely deliver a localization precision of about 1 nm with usual photon budgets of fluorophores under ambient conditions^{61–63}. However, its widespread application has been slowed down due to the high technical complexity of its experimental implementation. In this chapter, we describe pulsed interleaved MINFLUX (p-MINFLUX), a novel, open-source experimental realization of MINFLUX that is easier to implement in existing confocal microscopes equipped with a time-correlated single-photon counting (TCSPC) detection, only by modifying the excitation path of the microscope. No fast-scanning optics or field-programmable gate array (FPGA) electronics are required. Moreover, compared to the original MINFLUX, p-MINFLUX has the additional advantage of giving access to excited state lifetime information, which is a relevant parameter in single-molecule spectroscopy because it enables multiplexing of single-color measurements¹³⁹ and provides information about the environment of the fluorophore and its interactions with other molecules or materials^{140,141}.

The results presented in this chapter have been published in a peer-reviewed article⁶⁸.

4.1 Concept and overview of the experimental implementation

MINFLUX interrogates the position of a single fluorescent molecule with a sequence of spatially displaced minima (ideally zeroes) of intensity. Mathematically, MINFLUX can be described with the framework presented in Chapter 3 for single-molecule localization

by sequential structured illumination (SML-SSI), where the maximum localization precision theoretically attainable is also discussed in Section 3.2.2. In Figure 4.1a, the sequence and spatial distribution of the four doughnut-shaped foci used in this work for 2D localization of single molecules is schematically shown. The four doughnut foci define an effective field of view of nearly circular shape with a diameter L below the diffraction limit. Previous implementations of MINFLUX used the same excitation scheme, produced by shifting a continuous-wave beam between the four positions with an electro-optic scanner. By contrast, in p-MINFLUX, the excitation pattern is generated with interleaved laser pulses¹⁴². Figure 4.1b shows a schematic of the experimental set-up, whose core is a confocal fluorescence microscope with modifications in the excitation path. The excitation beam is divided into four using beam-splitters. Each beam is coupled into an optical fiber of different length, set to introduce time delays $\Delta t = T/4$ between the beams. The resulting arrival times of the four pulses are $\tau_i = \tau_0 + i * \Delta t$, making the interleaved pulses evenly delayed within one period of the original pulse train T . For our laser source with a repetition rate $f = 20$ MHz ($T = 50$ ns), the time delay between each one of the four excitation pulses is set to 12.5 ns. After out-coupling of the fibers, the four time-delayed beams are collimated. Each beam path has independent mirrors that allow the spatial alignment of the four doughnut-shaped foci into the MINFLUX excitation pattern. The four beams are recombined and passed through a $0 - 2\pi$ vortex phase plate (VPP) and polarization optics to create doughnut-shaped foci at the sample with a microscope objective. Further details of the set-up and the control software are provided in Section 4.2.

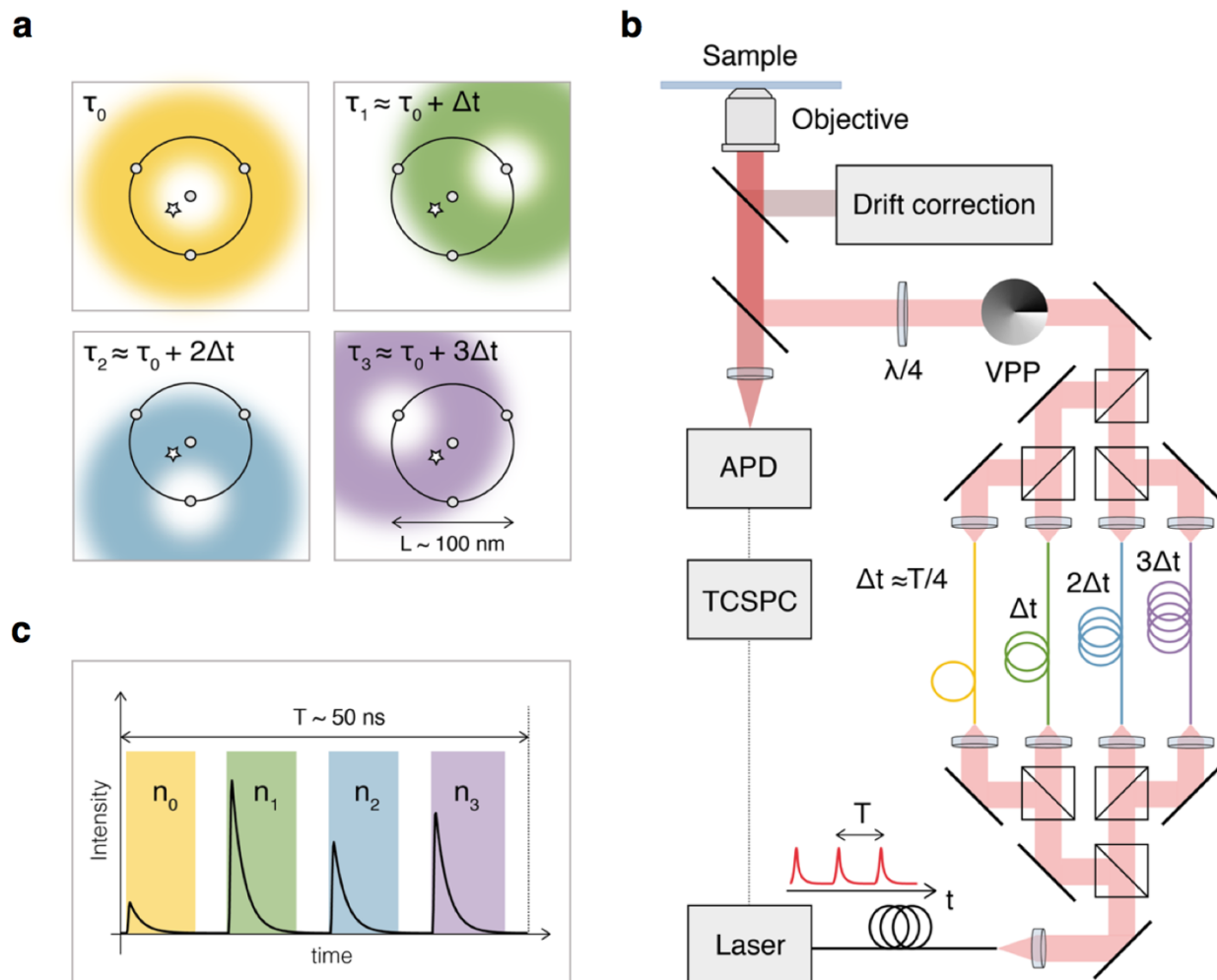


Figure 4.1 Description of the p-MINFLUX concept and the experimental system. (a) Four pulsed interleaved doughnut-shaped beams are focused on the sample arranged in a triangular pattern with the fourth beam placed at the center of the triangle. The arrival time of each pulse is denoted as τ_i . The position of a single fluorescent molecule located between the laser spot positions is indicated by a star. (b) Schematic of the p-MINFLUX set-up detailing the excitation pathway used to generate the pulsed interleaved doughnut foci delayed by Δt . (c) Schematic signal of detected photon counts within one period (T) of the original laser source.

The relative position between sample and objective is stabilized with an xyz active drift correction by imaging fiducial nanoparticles with an independent camera. The position of the fiducial nanoparticles is recorded and eventually used for post-processing drift

corrections. Correction of mechanical drifts is essential to achieve the maximum localization precision. Details are discussed in Section 4.3.

The detection path of the set-up presents no differences from a time-resolved confocal microscope. Fluorescence light from the sample is spectrally selected using conventional dichroic beam splitters and band-pass filters, and detected with an avalanche photodiode (APD). The photon counts from the APD are read out with a time-correlated single-photon counting (TCSPC) device synchronized with the laser source. In this way, detection time windows within the period T can be defined for each one of the excitation pulses (Figure 4.1c). Integrating the photon counts of the detection windows for a certain time, an array of counts $\bar{n} = (n_0, n_1, n_2, n_3)$ is obtained, which is used to retrieve the position of the molecule through a maximum likelihood estimation. Naturally, the excited-state lifetime information is also readily available in each one of the four detection time-windows (Figure 4.1c). The set-up is controlled with a dedicated open-source software written in Python, called PyFLUX (details in Section 4.2). A custom-written software was used to analyze the TCSPC data to obtain the MINFLUX position estimations of the emitter.

4.2 Optical setups

Two versions of the p-MINFLUX microscope were built and are fully functional. One in Prof. Fernando Stefani's laboratory at CIBION in Buenos Aires, Argentina, and the other in Prof. Philip Tinnefeld's laboratory at LMU in Munich, Germany.

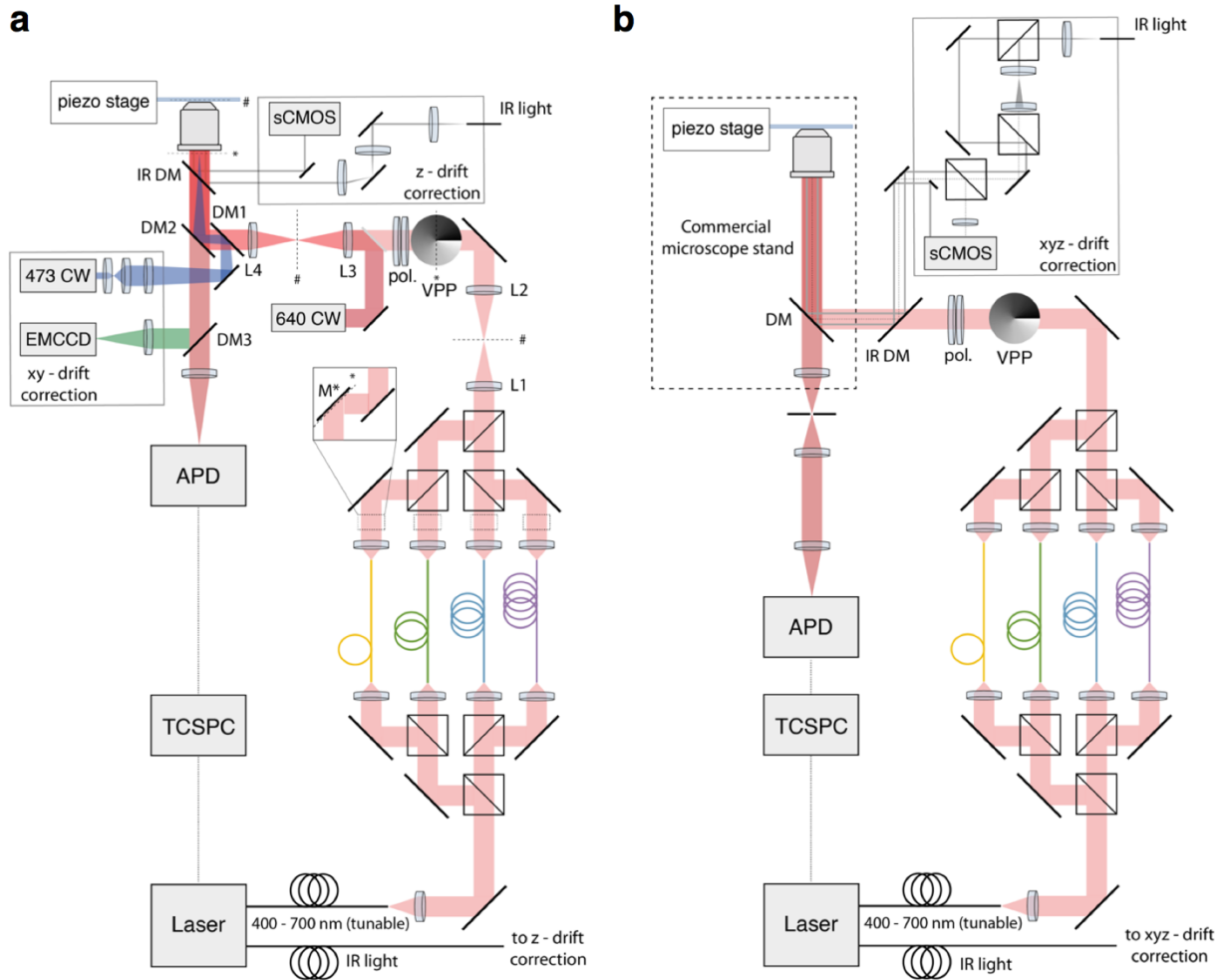


Figure 4.2 (a) p-MINFLUX setup built in Buenos Aires. Laser: Fianium SC 400-4 (NKT Photonics), 640 CW: Lambda mini Evo, RGB Photonics GmbH, 473 CW: GEM 473, Laser Quantum, piezo stage: NanoMax 300 with controller BPC303, Thorlabs Inc.), Lens 1 (L1), L2, L3, L4: AC254-300-A-ML (Thorlabs Inc.), VPP: V-633-10, Vortex Photonics, Polarizer (pol.): WPH05M-633 and WPQ05M-633, Thorlabs Inc.), Dichroic Mirror (DM1): ZT532/640RPC-UF, Chroma Technology Corporation, DM2: ZT532/640RPC, Chroma Technology Corporation, IR DM: T750SPXRXT-UF1, Chroma Technology Corporation, DM3: ZT532RDC, Chroma Technology Corporation, EMCCD: iXon DV887 (Andor), sCMOS: ThorCam DCC1240C (Thorlabs Inc.), Avalanche Photodiode (APD): SPCM-AQR-13 (PerkinElmer Optoelectronics), time-correlated single-photon-counting (TCSPC): PicoHarp 300 (PicoQuant GmbH). **(b) p-MINFLUX setup built in Munich.** Laser: SuperK Fianium FIU-15 (NKT Photonics GmbH), piezo stage: P733.3CD (Physik Instrumente (PI) GmbH), VPP: V-532-20-1 (Vortex Photonics) pol.: WPQ05M-532 and WPH532M-532, Thorlabs GmbH, IR DM: ZT 785 SPXXR (Chroma Technology Corp.), DM: ZT532RDC – STED (Chroma Technology Corp.), sCMOS: Zelux,

(Thorlabs GmbH), APD: SPCM-AQRH-16-TR (Excelitas Technologies GmbH & Co. KG), TCSPC: HydraHarp 400, PicoQuant GmbH).

4.2.1 Buenos Aires setup

Excitation. A supercontinuum laser (Fianium SC 400-4, NKT Photonics) is used for excitation with pulses of ~ 80 ps width (FWHM) and a repetition rate of $\frac{1}{T} = 40$ MHz. The emission spectrum ranges from $\lambda \sim 420$ nm to $\lambda \sim 2000$ nm and the output of the laser system is a collimated, unpolarized, beam. Infrared light with $\lambda > 1064$ nm is filtered out by a dichroic mirror (BLP01-1064R-25, Semrock Inc.). A small fraction of the IR light is sent to a custom-built, fast photodiode sensing the arrival of the laser pulses. The rest of the far-infrared light is dumped. Near-infrared light ($\sim 750 - 1024$ nm) is split from the main beam (T750SPXRXT-UF1, Chroma Technology Corporation) and coupled into a multimode fiber to be used in the z-drift correction optics. From the remaining visible light, a ~ 20 nm band around 642 nm is selected for fluorescence excitation with an interference optical filter (ZET642/20x, Chroma Technology Corporation).

The light intensity is controlled using a flipper with a mounted ND filter (MFF101/M and NDK01, Thorlabs Inc.) and a continuous, ND filter (NDC-50C-2, Thorlabs Inc.). The excitation beam is then split by a polarizing beam splitter (PBS) (CCM1-PBS251/M, Thorlabs Inc.). The two beams have orthogonal polarization states. Each of the beams is sent to a non-polarizing 50:50 beam splitter (CCM1-BS013/M, Thorlabs Inc.). This beam splitting system generates two pairs of beams with each pair sharing the orthogonal linear polarization.

The four beams are coupled into polarization-maintaining fibers (PM630-HP, Thorlabs Inc.). Each of the fibers has a different length, approx. 1.3 m, 2.6 m, 3.9 m, and 5.2 m which generate the $T/4$ time delay between pulses. The linearly polarized light coupled out of the fibers is reflected with dielectric mirrors (BB1-E02, Thorlabs Inc.) into the

beam combining system. The four beams are combined by three non-polarizing 50:50 beam splitters (CCM1-BS013/M, Thorlabs Inc.) used as beam combiners. The axes of linear polarization are matched by rotating the fiber out-couplers (60FC, Schäfter + Kirchhoff GmbH).

The recombined beams are focused by a lens L1, $f = 300$ mm (AC254-300-A-ML, Thorlabs Inc.) to a plane conjugated to the back focal plane (BFP) of the microscope objective. Lens L1 is the first out of four identical lenses forming a double 4f-system. Between L2 and L3 a VPP (V-633-10, Vortex Photonics) is placed in the conjugated plane to the back focal plane (BFP) of the objective. Conjugated planes are indicated with * and # in Figure 4.2a. The VPP creates the doughnut-shaped focus in the focal plane of the oil-immersion objective (CFI Plan Fluor 100x, NA = 1.4, Nikon Instruments Inc.). Circular polarization is needed to create the minima of intensity in the center of the doughnut-shaped foci and is achieved by the combination of $\frac{\lambda}{2}$ and $\frac{\lambda}{4}$ waveplates (WPH05M-633 and WPQ05M-633, Thorlabs Inc.) which are positioned close to L3. The handedness of circular polarization must be matched to the handedness of the VPP in order to achieve a minimum of intensity in the focused beams¹⁴³, that is the reason why the recombination of the beams could not be done with PBS, which would result in a mixture of two beams with left-hand and two beams with right-hand circular polarization. The four pulsed-interleaved beams share the doughnut excitation pattern. The mirrors M* are placed in the conjugate plane to VPP and BFP and allow to spatially shift each one of the pulsed-interleaved beams by changing their tilt angles without changing their lateral position relative to the VPP. This allows to ensure almost the same phase modulation in the Fourier plane for the four beams and to align the four beams independently to obtain the desired excitation pattern (EP) on the sample plane. Additionally, a pinhole can be placed into the conjugated plane of the sample before the VPP to clean-up the beams for possible distortions at the beam splitters used for recombination.

An auxiliary confocal system consisting of a CW diode laser (Lambda mini Evo, RGB Photonics GmbH) emitting at $\lambda = 640$ nm was added to the setup to provide an excitation

with a gaussian beam profile. Using a pellicle 92:8 beam splitter (BP108, Thorlabs Inc.), the collimated laser light is coupled into the excitation optical path.

Detection. The light emitted by the sample is collected by the objective. It passes a dichroic mirror (ZT532/640RPC, Chroma Technology Corporation) which reflects the excitation beams. Notch filters block the excitation light from the red excitation beams (ZET642NF, Chroma Technology Corporation), from the blue widefield excitation (ZET473NF, Chroma Technology Corporation), and the reflected infrared beam (NF808-34, AHF Analysentechnik AG).

The fluorescence emission is focused with a tube lens (AC254-50-A-ML, Thorlabs Inc.) onto an avalanche photodiode (APD) (SPCM-AQR-13, PerkinElmer Optoelectronics). The APD detects photons with 90% quantum efficiency at $\lambda = 650$ nm. It provides a single photon timing resolution of 350 ps (FWHM) and typically exhibits 150 dark counts per second. The digital signal from the APD is sent to a TCSPC unit (PicoHarp 300, PicoQuant). The internal timer of the TCSPC unit correlates the photon detection signal from the APD with the signal from the photodiode which senses the arrival of each excitation laser pulse. For every counted photon, it returns an absolute time from the beginning of the measurement and the time elapsed since the last laser pulse. The temporal resolution of the TCSPC unit is 8 ps and the dead time after a photon detection is reported by the manufacturer to be < 95 ns.

Drift correction. The optical system providing z-stabilization employs the near-infrared light coupled into a multimode fiber. After attenuation and clean-up (ET705/72M and T750SPXRXT-UF1, Chroma Technology Corporation), the IR light is guided to the objective. The collimated beam enters the objective at the edge of the back focal aperture. After reflection from the sample-coverslip interface, the IR light leaves the objective parallel to the incident IR beam. The reflected light passes a tube lens (AC254-150-A-ML, Thorlabs Inc.) and is focused on a CMOS camera (ThorCam DCC1240C, Thorlabs Inc.). The position on the CMOS camera of the reflected beam depends directly on the sample-objective separation distance. Through a calibration with the piezo stage, we determined that the sample-objective relative position can be tracked with a precision

better than 10 nm and a time resolution of 20 ms, limited by the frame rate of the camera. This enabled the active correction of axial drift with a feedback loop, keeping the variation of sample-objective separation distance smaller than 10 nm for hours.

Lateral stabilization of the sample is realized by tracking green fluorescent beads (FluoSpheres, 0,2 μm , Crimson, Thermo Fisher Scientific) included in the sample as fiducial markers, using an independent widefield configuration. Illumination is performed at 473 nm (GEM 473, Laser Quantum). Fluorescence emission from the fiducial beads is selectively reflected by a dichroic mirror (ZT647RDC, Chroma Technology Corporation) and focused on an EMCCD camera (iXon DV887, Andor) by a tube lens (AC254-300-A-ML, Thorlabs Inc.). A notch filter (ZET473NF, Chroma Technology Corporation) is used to block residual excitation light from reaching the camera. The processing of the data for the xy-stabilization is explained in Section 4.3.

Setup control. The core of the instrument control system is a data acquisition board (DAQ board) (ADwin Gold II, Jäger GmbH) which serves as an analog-digital and digital-analog converter. The *ADwin* allows programming its output channels for the direct control of the connected devices from a computer. The *ADwin* receives and processes the raw photon count data from the APD which are used for creating an image from the confocal scan. Additionally, it connects to the piezo controller and the electromechanical shutters (MediaLas STP 8xl, spectrabeam.de) that are used to close or open the different beam paths. The piezo stage (NanoMax 300 with controller BPC303, Thorlabs Inc.) translates the sample in all three dimensions with a resolution of 5 nm when running in closed-loop mode.

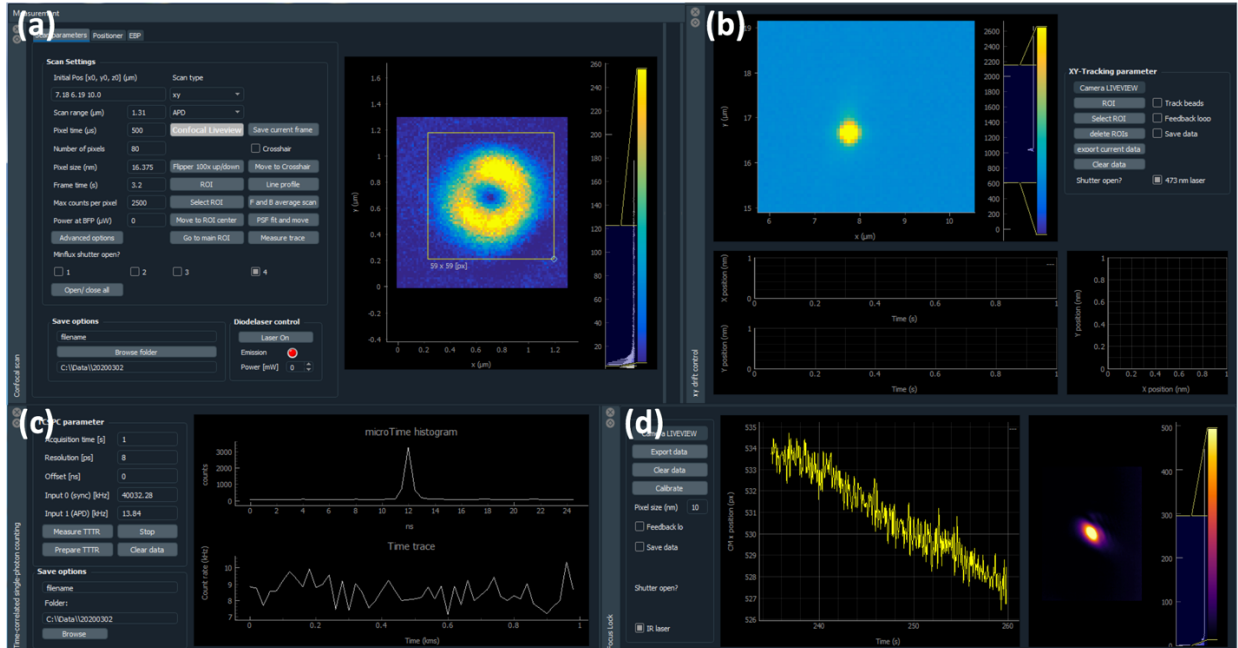


Figure 4.3 PyFLUX control software. (a) Confocal scan module. All parameters to perform the stage scanning are accessible and a preview image is displayed. (b) $x - y$ fiducial tracking module. (c) Time-correlated single-photon counting (TCSPC) module. All TCSPC parameters are accessible. (d) Focus lock (z tracking) module.

The setup control software constitutes an open-source instrumentation project called PyFLUX, freely available at <https://github.com/lumasullo/pyflux> and <https://github.com/stefani-lab/pyflux>. The PyFLUX structure is divided into *backend* and *frontend* classes. The backend class controls all the hardware and sends and receives instructions and data. The frontend class is the graphical-user-interface through which the user can interact with the microscope and perform the measurements. Both classes run in independent Python threads, thus the backend can perform efficiently without any loss in speed due to the real-time representation of the data in the frontend. Backend and frontend interact via Python's *signals* and *slots*.

PyFLUX is structured in a modular way, divided into four modules that can run in stand-alone mode: i) the stage scanning module (Figure 4.3a) which controls the *ADwin* board to send the scanning signals to the piezo and collect the photon-count digital signals from

the APD. This module also controls the mechanical shutters of the lasers, ii) the x-y tracking module (Figure 4.3b) controls a camera, localizes fiducial beads and actively corrects the piezo position through a PI feedback loop, iii) The TCSPC module (Figure 4.3c) controls the PicoHarp 300 device through a .dll library wrapper and allows the user to select all measurement options, iv) The focus lock module (Figure 4.3d) measures the position of the IR reflected beam and controls the z position of the piezo to keep the distance between objective and sample constant.

It is important to note that due to the modular and open-source architecture of PyFLUX any or all of the modules can be reused and integrated into other instrumentation projects. Further details on specific Python instrumentation and updated versions of the code are available at the GitHub repository.

4.2.2 Munich setup

Excitation. A supercontinuum laser (SuperK Fianium FIU-15, NKT Photonics GmbH, Germany) is used at 19.5 MHz repetition rate as a light source in combination with a tunable bandpass filter (SuperK VARIA, NKT Photonics GmbH, Germany) to select the desired wavelength range (527 – 537 nm) in the visible light spectrum followed by an additional clean-up filter (520/35 Brightline HC, Semrock Inc., USA). The unpolarized light from the laser source is split by a polarizing beam splitter cube (PBS251, Thorlabs GmbH, Germany) into two beams of orthogonal polarizations. Each of the beams is further split by a non-polarizing 50:50 beam splitter cube (BS013, Thorlabs GmbH, Germany). This beam splitting system generates two pairs of beams with each pair sharing the orthogonal linear polarization. The resulting four laser beams are coupled into polarization-maintaining single-mode fibers (PM-S405-XP, Thorlabs GmbH, Germany) of lengths 2.0 m, 4.6 m, 7.1 m and 9.7 m, such that the time delay between the beams after the fiber is ~ 12.5 ns ($= T/4$). The four beams are collimated after the fibers with an achromatic lens (AC254-035-A, Thorlabs GmbH, Germany) and recombined by using

three 50:50 beam splitter cubes (BS013, Thorlabs GmbH, Germany). The overlay of the beams can be adjusted to obtain the required arrangement of laser foci in the object plane. The axes of linear polarization are matched by turning the fiber out-couplers (Thorlabs GmbH, Germany). Subsequently, the linearly polarized laser beams pass a combination of a quarter- and a half-wave plate (WPQ05M-532 and WPH532M-532, Thorlabs GmbH, Germany) to make them circularly polarized. A vortex phase plate (V-532-20-1, Vortex Photonics, Germany) is then used to introduce the phase modulation necessary to generate the donut-shaped foci. The beams are guided into the back entrance of the microscope body (IX83, Olympus Deutschland GmbH, Germany), reflected on a dichroic mirror (ZT532RDC – STED, Chroma Technology Corp., USA) and focused with an objective (UPLSAPO100XO/1.4, Olympus Deutschland GmbH, Germany) onto the sample plane.

Detection. The fluorescence light is collected with the same objective and transmitted through the dichroic mirror, focused via an Olympus tube lens onto a pinhole (120 μm , Owis, Germany), collimated with an achromatic lens (AC254-150-A, Thorlabs GmbH, Germany) and focused with a second achromatic lens (AC127-025-A, Thorlabs GmbH, Germany) to the chip of an avalanche photodiode (SPCM-AQRH-16-TR, Excelitas Technologies GmbH & Co. KG, Germany) after filtering the remaining scattered light from the laser with suitable interference optical filters (785 SP EdgeBasic, Semrock Inc., USA, 2x 582/75 Brightline HC, Semrock Inc. USA). The digital signal from the APD is sent to a TCSPC unit (HydraHarp 400, PicoQuant GmbH, Germany).

Drift correction. To measure and correct for sample drift during the measurements, the IR output of the variable bandpass filter is used. A beam of wavelength between 850 and 900 nm is selected with optical filters (875/50 bandpass, Edmund Optics GmbH), coupled into a single-mode fiber (780HP, Thorlabs GmbH, Germany), outcoupled and collimated. This beam is then split with a 50:50 beam splitter cube (BS014, Thorlabs GmbH, Germany) and combined again after inserting a lens system (ACN254-040-B, AC254-150-B, Thorlabs GmbH, Germany) into one of the two paths that focuses the beam to the back focal plane of the objective (dotted line) to create a wide-field illumination at the

sample plane. This beam is used for xy drift correction where the position of fiducial markers is localized during the measurement. The collimated IR beam is focused onto the sample plane at an oblique angle to achieve a z position-dependent spot at the detector and use this for z drift correction. Both IR beams are coupled to the main beam path via a dichroic mirror (ZT 785 SPXXR, Chroma Technology Corp., USA) and fed into the microscope to illuminate a region close, but not overlapping with the field of view used for MINFLUX. The reflected and backscattered light is split with an additional 50:50 beam splitter cube (BS014, Thorlabs GmbH, Germany) from the excitation IR beam and detected on a single CMOS camera (Zelux, Thorlabs GmbH, Germany) at different positions of the chip.

Setup control. The piezo stage (P733.3CD, Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Germany) translates the sample in all three dimensions with a resolution of 0.3 nm when running in closed-loop mode. All components of the setup including the piezo stage are controlled digitally and integrated via a custom version of the PyFLUX project. Further details and source-code of this control software version are available at <https://github.com/zaehringer-Jonas/pyflux>

4.3 Drift correction

In both setups, both the xy position using fiducial markers and the z position using the reflected IR beam are recorded in every experiment. The achieved fiducial tracking precision in xy is better than 1 nm and the z precision is better than 10 nm which is sufficient for our expected p-MINFLUX localization precision. An active drift correction is typically applied during the measurements by means of a feedback loop between the xyz signal and the piezo stage (Figure 4.4a). Typically, the active drift correction achieves a stabilization better than 5 nm in xy and better than 10 nm in z (standard deviation). Any residual xyz drift can be corrected via post-processing using the tracking information.

The xyz stabilization system can also be used to scan an emitter over the field of view (Figure 4.4b).

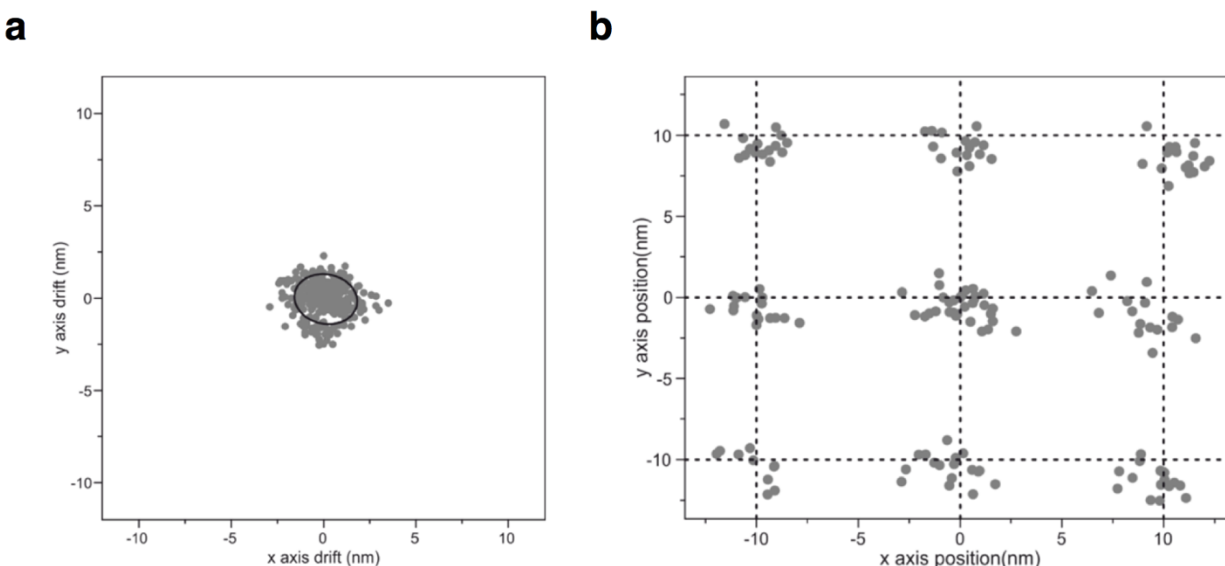


Figure 4.4 Drift correction (a) Camera-based localization of fiducial markers during a 30 s point measurement and the covariance ellipse (black) showing a precision of $\sigma = 1.5$ nm. (b) Camera-based localization of fiducial markers during the measurement from Figure 2C. The piezo positioner is moved in a grid with a spacing of 10.0 nm in average, and an average precision of $\sigma = 1.7$ nm.

4.4 Measurement of the excitation pattern

The precise characterization of the excitation pattern is key to every single-molecule localization method using sequential structured illumination. In contrast to the original MINFLUX where one and the same focus is sequentially shifted through the four positions, in p-MINFLUX each one of the four foci comes from an independent beam. Thus, in the case of p-MINFLUX, the characterization of the beam pattern comprises the following two steps: i) the characterization of the intensity profiles and positions of the four focused

beams on the sample, and ii) the characterization of the ns-scale arrival times of the interleaved pulses.

The intensity profile and position of the excitation beams were determined by imaging stable and bright luminescent probes of nanoscopic size with each one of the beams separately (Figure 4.5a). For this purpose, gold nanoparticles (AuNP, 60 nm diameter, home-made), polystyrene nanoparticles containing fluorescent molecules (FluoSpheres, 0,04 μm , Dark Red, Thermo Fisher Scientific), or DNA-origami engineered fluorescent nanoparticles were used (GATTAbead ATTO532, GATTAquand GMBH). A typical measurement of the intensity profile of the four beams is displayed in Figure 4.5a. The individual intensity profiles as well as their positions constitute the input information to localize the target molecules, therefore, they must be determined with high precision. Typically, they were determined from images of high resolution with a pixel size between 1 and 10 nm, and average SNR higher than 10. A detailed view of the central minimum of a usual doughnut-shaped focus is shown in Figures 4.5c, along with its analytical representation using a 4th degree polynomial in Figure 4.5d. The latter is used as an input ($I(\mathbf{r}_i)$ of Section 3.1.1, equation 3.5) in the estimation analysis. The alignment of the beams into the desired arrangement (three foci in an equilateral triangle and the fourth focus in its center) is achieved by operating kinematic mirrors mounts. The position of each beam can be shifted on the sample independently by two mirrors. In the experiments presented here, this was done manually and controlled through measurements with gold nanoparticles or GATTAbeads. In this way, we were able to routinely align the desired excitation pattern with 5 – 10 nm accuracy, in both optical set-ups. A detailed description of the alignment protocols and optimizations to obtain high quality doughnut-shaped PSFs can be found in ¹⁴⁴.

An example measurement of the interleaved time arrivals of the four pulses is displayed in Figure 4.5b. These data can also be obtained from the measurement of intensity and position using nanoparticles, or alternatively, it can be obtained from an independent measurement using a reflective sample (i.e. a silver mirror). The latter has the advantage that the pulses are not broadened by the fluorescence lifetime of the probes and provide

a fair estimation of the temporal impulse-response function (IRF) of the system. In our case the main limiting factor of the IRF was the timing precision (jitter) of the APD, resulting in an IRF with $FWHM \sim 300$ ps. For our purposes, this resolution is more than sufficient to measure fluorescence lifetimes > 1 ns and to correctly assign each detected photon to the corresponding time windows for the p-MINFLUX analysis.

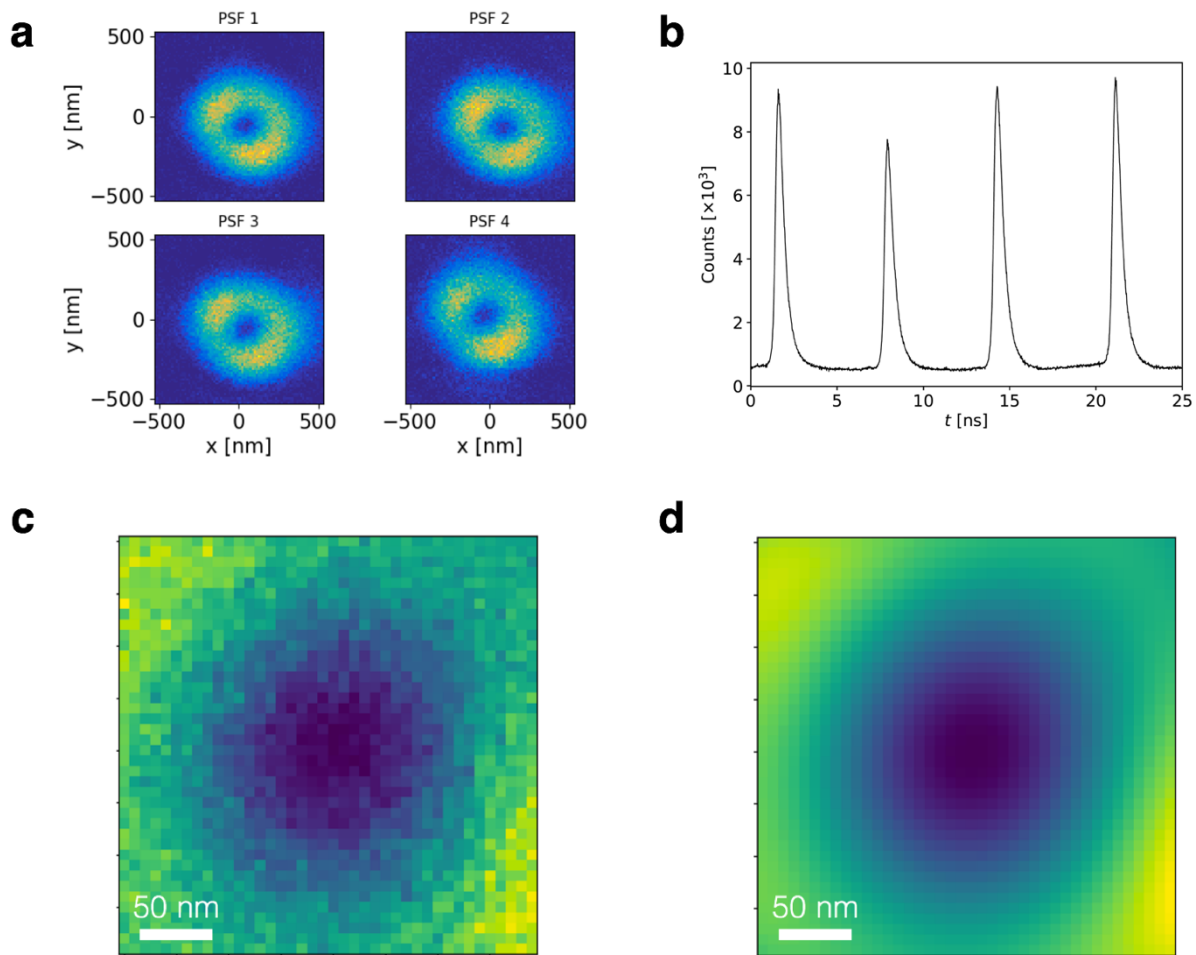


Figure 4.5 Measurement of the excitation beam pattern for p-MINFLUX. (a) Intensity profile and position of each focused beam. (b) Time arrival of each pulse within the laser period. (c) Detailed view of the measured central minimum of one of the beams. (d) Polynomial fit to the data in (c).

4.5 Test samples based on DNA-origami

To demonstrate the capabilities of p-MINFLUX we prepared several DNA-origami samples. DNA-origami¹⁴⁵ is a technology based on the self-assembly of DNA. Briefly, it consists of folding a long (~ 8000 bases) single strand of DNA (“scaffold”) into pre-designed forms by hybridization with a large number of short single strands of DNA (“staples”). DNA-origami allows the organization of molecules at controlled positions with sub-nm precision. Therefore, excellent calibration samples for super-resolution nanoscopy¹⁴⁶ can be prepared with DNA-origami, especially for testing performance at the 1-10 nm scale. Moreover, by carefully engineering the affinity between different DNA strands, dynamic structures can be fabricated. We briefly describe here the protocols for the samples used for the experiments presented in the following sections. For a comprehensive review on DNA-origami fabrication see¹⁴⁷.

4.5.1 DNA-origami structure folding

The DNA origami structures were folded with a 10-fold excess of staples to the scaffold in folding buffer (20 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, 1 mM $\text{EDTA-Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) with a 16 h nonlinear folding ramp¹⁴⁸.

Gel electrophoresis was used for purification. The 50 mL gel contains 1.5% agarose, 2 μL peqGreen DNA stain and gel buffer (12 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, 1 mM $\text{EDTA-Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$). After adding 1 x BlueJuice gel loading buffer to the DNA origami solution, the cooled gel runs for 2 h at 60 V. Afterwards, the gel was cut, and the DNA origami solution was extracted via squeezing. The DNA origami concentration was measured with a NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

Complete DNA-origami sequence can be found in the Appendix 4.1.

4.5.2 DNA-origami incubation

The coverslips were first washed using ultrapure water, then cleaned using an ozone cleaner (PSD-UV4, Novascan Technologies, Inc., USA) and washed again using ultrapure water. For sample immobilization, the flow chamber was coated using biotin-labeled bovine serum albumin (1 mg/mL Sigma-Aldrich Chemie GmbH) and NeutrAvidin (1 mg/mL, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). In the flow chamber, the DNA origami structures (100 pM in 1x gel buffer) were immobilized due to the biotin-NeutrAvidin binding.

To suppress blinking and photobleaching, an oxidizing and reducing buffer system¹⁴⁹ (1x TAE, 12 mM MgCl₂, 2 mM trolox/troloxquinone, 1% (w/v) D-(+) glucose) was used in combination with an oxygen scavenging system with a final concentration of 100 u/ml glucose oxidase and 2500 u/ml catalase. To induce blinking for super-resolution imaging, 50 mM beta-mercaptoethanol was added to the buffer (1x TAE, 12 mM MgCl₂, 2 mM trolox/troloxquinone, 1% (w/v) D-(+) glucose). 2 mM cyclooctatetraene was added to increase the stability of the dye.

4.6 Position estimation and Cramér-Rao Bound

To estimate the position of the fluorescent molecules from the acquired TCSPC data, first the n_i number of photons detected for each time window of detection are computed. Then the Maximum Likelihood theory presented in Chapter 3 for MINFLUX is applied. Equation (3.5) is used to compute the p_i arrays, equation (3.8) is used to build the log-likelihood function and equation (3.9) is used to obtain the estimated position \mathbf{r}_E . For all the results presented in this chapter SBR was approximated as being constant, that is

$SBR(\mathbf{r}) \approx SBR(\mathbf{0})$. To compare with the theoretically expected precision, we used the Cramér-Rao Bound (CRB), described in detail in Chapter 3.

In an analogy to equation (3.15), we chose to evaluate our experimental precision with the expression for the scalar uncertainty given by

$$\sigma_{exp} = \sqrt{\frac{1}{2} \text{tr}(\Sigma_{cov})}. \quad (4.1)$$

4.7 Experimental characterization of the localization precision and accuracy

The localization precision of p-MINFLUX as a function of the number of detected photons (N) was tested with both setups by localizing single emitters. In Buenos Aires, experiments were carried out measuring photoluminescence from single gold nanoparticles fixed to a glass substrate. In Munich, measurements were done with single fluorophores (ATTO 532) fixed to a DNA origami nanostructure. The L parameter and the SBR were $L = 150$ nm, $SBR \sim 10$ for measurements in Buenos Aires, and $L = 120$ nm, $SBR \sim 15$ for measurements in Munich.

Figure 4.6a and Figure 4.6e show example two-dimensional histograms of position estimations using N ranging from 50 to 5300 (a, Buenos Aires) and N ranging from 50 to 2000 (e, Munich). As expected, MINFLUX is extremely photon efficient for localizing molecules. For example, the experimental standard deviation of localizations using $N = 50$ is $\sigma = 11.7$ nm (Buenos Aires) and $\sigma = 8.4$ nm (Munich), comparable to the best achievable resolution with PALM/STORM using $N = 5000$ ^{36,150,151}. The differences in precision are due to the different L and SBR and are expected theoretically (Section 3.3.2). With moderately high photon counts of $N = 1000 - 2000$, the localization precision reaches $\sigma \approx 1 - 2$ nm in both sets of experiments. In Figure 4.6e, the experimental

precision (covariance) is plotted as red ellipses and shows that the performance of p-MINFLUX follows closely the theoretically predicted Cramér-Rao bound (CRB, white ellipses in Figure 4.6a, black ellipses in Figure 4.6e).

Figure 4.6b and Figure 4.6f show σ as a function of N . For comparison, in Figure 4.6f we show curves of the experimental localization precision σ vs. N for camera-based SMLM (0,04 μm Dark Red fluorescent beads repeatedly imaged in a widefield setup with an Andor EM-CCD iXon 897 camera at $SBR \sim 20$) and an ideal calculation, taking into account only pure Poisson noise and no readout noise, under infinite signal-to-background ratio ($SBR = \infty$).

For the same number of detected photons, p-MINFLUX delivers almost one order of magnitude better localization precisions than camera-based SMLM techniques. Conversely, almost two orders of magnitude fewer photons are needed in order to achieve the same resolution as with camera-based SMLM techniques. p-MINFLUX demonstrates an equivalent performance in terms of localization precision to the original MINFLUX microscope given equivalent experimental conditions (L , N , SBR). This is expected because both methods work under the same principle of localization of single emitters.

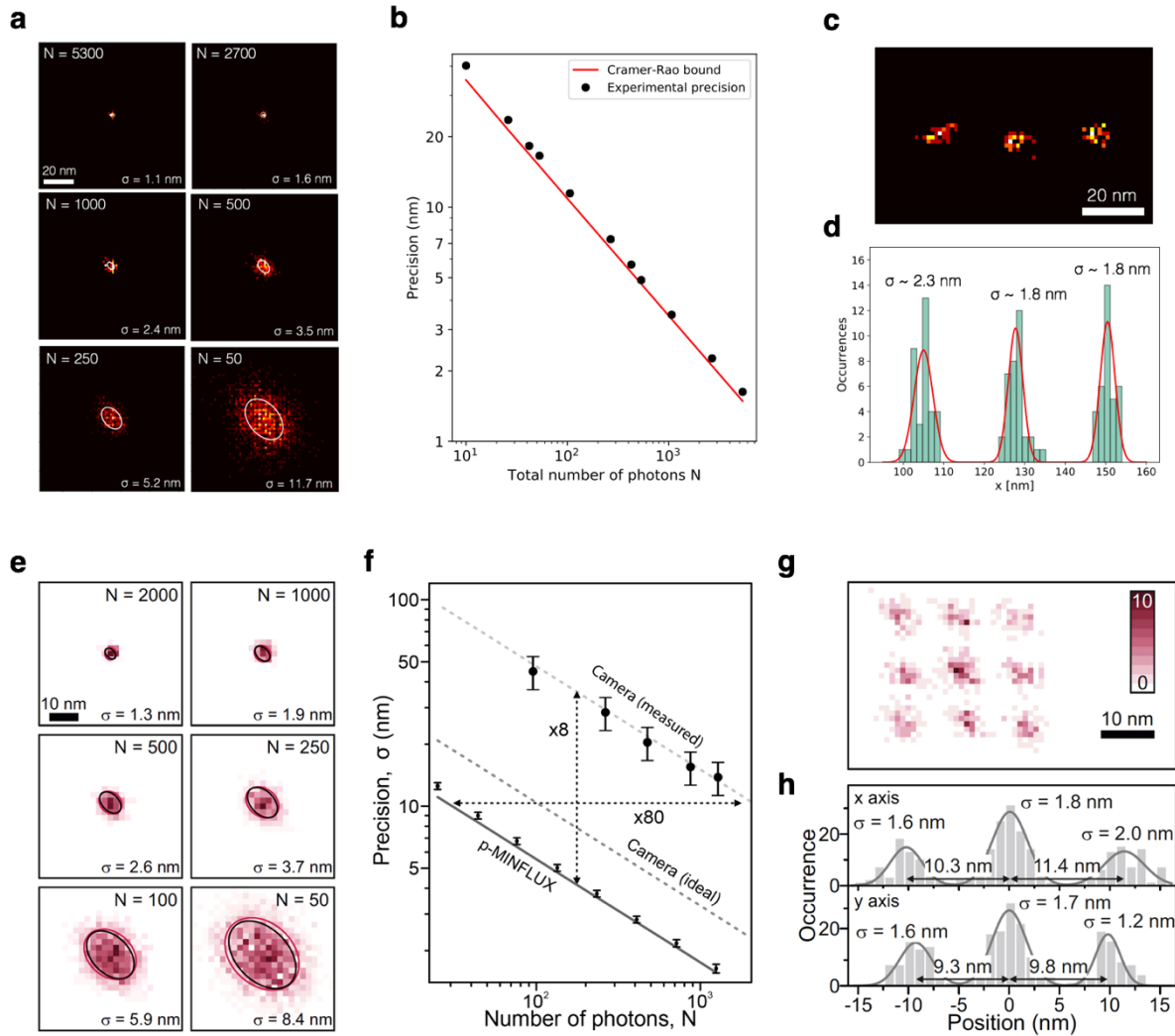


Figure 4.6 Evaluation of the localization performance of p-MINFLUX for Buenos Aires setup (a-d) and Munich setup (e-h). (a, e) 2D localization histograms of an immobilized AuNP (a) and a fixed single ATTO 532 dye (e) for different number of photons, N , used to estimate the position. The red and black ellipses display the covariance of the experimental data and the Cramér-Rao bound, respectively. (b, f) Localization precision as a function of collected photons, N , and the Cramér-Rao-Bound (CRB) as a lower limit for the uncertainty of p-MINFLUX (black). Camera-based localization precisions (measured data) with $SBR \sim 20$ and calculation for an ideal camera CRB with $SBR = \infty$ are shown in grey in (f). The grey line behind the measured data is just a visual aid. (c, g) Localization histogram of a single AuNP (c) and a GattaBead[®] (g) displaced in controlled steps by using a piezo-positioner. (c, h) Cross-section along the x-axis (c) and central x-axis (top) and central y-axis (bottom) from the localizations histograms shown in (c) and (g) respectively.

The localization accuracy of p-MINFLUX was evaluated by localizing either a single AuNP (Buenos Aires) or a GattaBead[©] fluorescent nanoparticle (23 nm diameter, containing ATTO 542, fluorescence lifetime: 3.2 ns, Munich). Figure 4.5c shows the localization histograms obtained as a gold nanoparticle was displaced using a piezo-positioner over three positions separated by $d = 25$ nm. Localizations were performed with an average of $N = 3400$. Figure 4.5d shows the average profiles of the localization histograms. The measured distances between the positions were $d \approx 23 - 27$ nm. Figure 4.5g shows the localization histograms obtained with the fluorescent GattaBead[©] nanoparticles as they were displaced over a square grid with a step size of $d = 10$ nm. These localizations were made with an average $N = 2000$. Figure 4.6h shows the average profiles of the central row and the central column of the localization distributions. The measured distances between positions were $d \approx 9 - 11$ nm. In both sets of experiments, the obtained values for the target distances were in good agreement with the positions of the fiducial markers determined independently to correct for sample drift during the measurements (see Section 4.3). The variations observed were thus ascribed to the precision of the piezo-positioners used.

4.8 p-MINFLUX simulations

The working principle of p-MINFLUX was also evaluated through numerical simulations described in detail in this section. In brief, the simulations show that the performance of p-MINFLUX is only weakly influenced by misalignments of the excitation beam pattern. For example, a lateral misalignment of any, or all the four doughnut foci by less than 15 nm, deteriorates the localization precision in less than 1 nm. We have also evaluated the effect on localization precision and accuracy of possible cross-talk between the detection time-windows for different lifetimes. In general, this cross-talk may deteriorate the localization precision and/or introduce a localization bias. However, these effects are smaller than ~ 1 nm for lifetimes smaller of 25% of the detection time windows (3 ns in

our case), and smaller than ~ 2 nm for lifetimes up to 33% of the detection time windows (4 ns in our case).

4.8.1 Description of the Monte Carlo simulations

We developed a software package with functions that simulate a complete p-MINFLUX experiment, including pulsed excitation with different beam patterns, fluorescence emission, TCSPC detection, and the position estimation of the emitter from the photon arrival times.

Briefly, in a first step doughnut-shaped foci (or foci with any other geometry) are created. Next, given a certain position of the emitter within the foci arrangement, an array of $\bar{n} = [n_0, n_1, n_2, n_3]$ photons is extracted from a multinomial distribution. Photon arrival times are generated based on predefined emission statistics; we used a single exponential distribution in agreement with the observed behavior of the fluorophores. The simulated photon arrival times are registered in both the fluorescence lifetime scale (i.e. from the laser excitation pulse; micro time) and in the absolute time scale of the simulation (i.e. from the beginning of the simulated experiment; macro time). Background photons with a uniform distribution in time are added in order to simulate different SBR situations.

At this point, the analysis is performed exactly in the same way as with the real data by calculating the MLE of the position of the emitter as explained in Chapter 3, Section 3.1.1, equations (3.8) and (3.9). For each desired set of experimental parameters, a number (typically $M = 1000$) simulations of p-MINFLUX were performed obtaining the full probability distribution of the estimator in a Monte-Carlo fashion. Typically, the mean error of the distribution was used as the localization quality metric.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{2M} \sum_{i=1}^M ((x_i - x)^2 + (y_i - y)^2)} \quad (4.2)$$

where M are the number of simulated results, (x, y) indicate the ground truth position of the emitter and (x_i, y_i) are the result of the i -th simulation. It should be noted that (4.2) is very similar to equation (4.1) but uses the ground truth position instead of the mean estimated position for the calculation of the trace of the covariance matrix thus accounting for the error due to any possible bias.

Functions used to simulate the experiments are open-source and can be found at

https://github.com/lumasullo/p-minflux/tree/main/tools/tools_simulations.py

4.8.2 Effect of misalignment of the excitation pattern

We analyze the influence of misalignments of the EP on the attainable localization precision by means of Monte Carlo simulations. In particular, we were interested in quantifying the effect of the manual alignment of the EP that was limited to a precision of 5 – 10 nm in the position of each focus. Maps of localization precision were calculated for various displacements of the centers of the doughnut-shaped foci, as follows. For each emitter position, we performed 1000 simulation runs where the foci were displaced from their ideal positions by a radial offset r . During one simulation run, all four foci were offset by the same value r in a random direction, which was changed after 100 runs. With this procedure, in each simulation run we retrieved the distribution of localizations corresponding to 10 random misalignments of the same magnitude, providing an averaged result which does not overestimate a particularly good or bad EP. The simulations were carried out for $N = 1000$ detected photons, $SBR = 20$, and $L = 100$ nm. In Figure 4.7a, we show exemplary simulated precision maps results for one random EP with offsets of $r = 0, 10$ and 20 nm, respectively.

To facilitate the evaluation of the simulation results, we computed the localization precision of an emitter placed at the center of the perfectly aligned EP ($\sigma(0,0)$) and the

mean localization precision of each 2D map over a circular area enclosed by the EP, for $\bar{\sigma}$ for $FOV = L$. Figure 4.7b shows the average of all simulations of $\sigma(0,0)$ and $\bar{\sigma}$ as a function of r . The results show that the localization precision for an emitter at the EP center decreases significantly for radial offsets $r > 20$ nm. The mean localization precision, $\bar{\sigma}$, deteriorates by less than 0.5 nm for radial offsets smaller than 15 nm.

Appreciating the experimental and computational findings, we conclude that the attainable localization precision in p-MINFLUX is robust against misalignments of the EP by less than 15 nm. It must be emphasized that the present analysis was performed using the experimentally determined intensity profiles of the doughnut-shaped foci, as described in Section 4.4. Thus, these simulations are a faithful representation of the experimental situation.

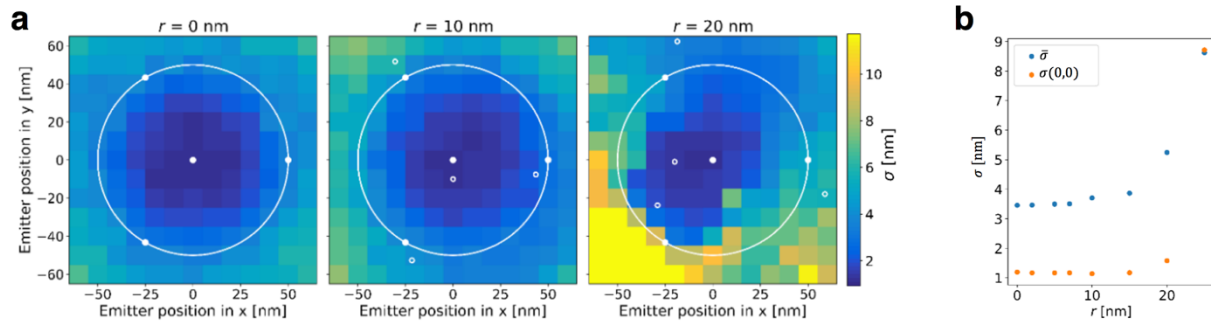


Figure 4.7 Analysis of misalignments of the p-MINFLUX excitation beam pattern (EP). (a) Example 2D maps of the attainable localization precision for different emitter positions and radial offsets $r = 0, 10$ and 20 nm of the four foci. The solid dots indicate the center position of the perfectly aligned EP whereas the small circles correspond to the misaligned EP. (b) The localization precision at the center of the FOV , $\sigma(0,0)$, and the mean over a circular area of diameter $FOV = L$, i.e. $\bar{\sigma}$, are plotted for different radial offset values. All values are the average of the 1000 simulations runs. The simulations were performed for $N = 1000$ detected photons, $SBR = 20$ and 10 randomly misaligned EP for each r .

4.8.3 Photon arrival times and crosstalk between detection time windows

As any other pulsed-interleaved technique, p-MINFLUX relies on the fact that minimal cross-talk exists between the arrival time-windows corresponding to each of the pulsed laser excitations. The probability of cross-talk can be calculated analytically taking into account the fluorescence lifetime of the molecule and the size of the detection time-windows.

The expected influence of the photon crosstalk on the p-MINFLUX localization precision and accuracy is however not straightforward. Thus, we simulated p-MINFLUX experiments at different degrees of crosstalk. In Figure 4.8a, we show simulated localization precision and accuracy for typical values of $N = 1200$, $SBR = 15$, $L = 100$ nm and fluorescence lifetimes ranging from 1.0 to 4.0 ns for detection time windows of 12.5 ns. From our simulations, we conclude that effects on precision and accuracy are < 1 nm for fluorescence lifetimes up to 3.0 ns, which corresponds to roughly $\frac{1}{4}$ of the detection time window and $\sim 1\%$ crosstalk. Measurements above this limit are still acceptable up to lifetimes of 4 ns (5% crosstalk) although a ~ 2 nm bias is present and precision decreases ~ 1 nm.

In particular, we also simulated the experimental situation of the super-resolution imaging experiments presented in Section 4.9 which were performed with $\sim 5\%$ crosstalk. Figure 4.8b shows simulation results under these conditions. p-MINFLUX is expected to deliver a localization precision of $\lesssim 2$ nm and introduce a global bias of $1 - 2$ nm (Figure 4.8b).

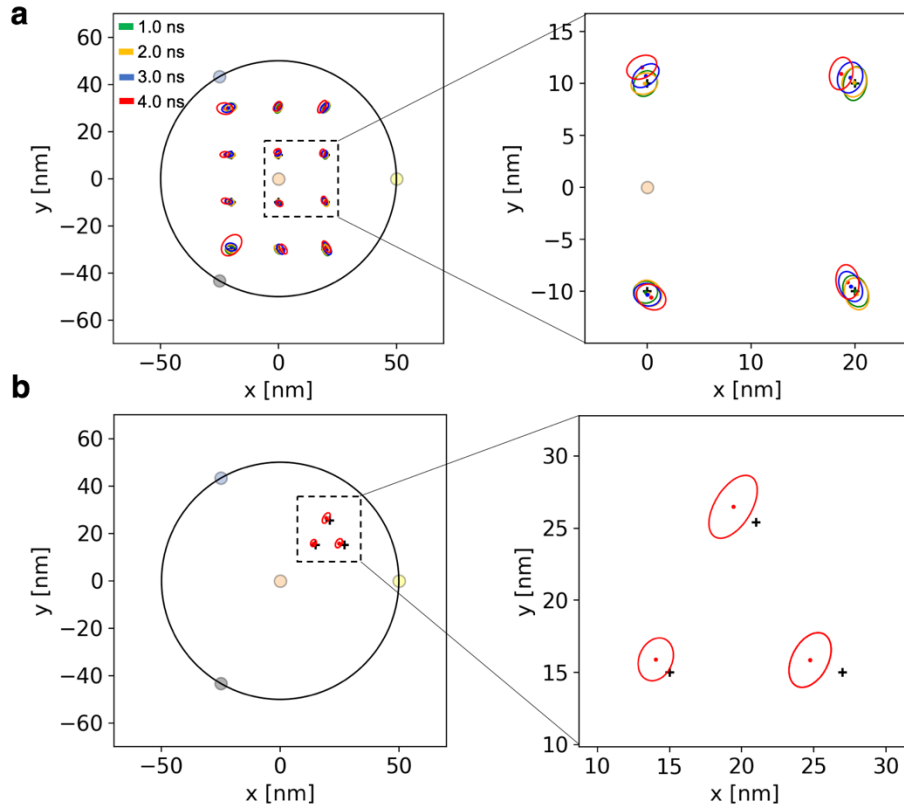


Figure 4.8 Effects of crosstalk between detection time windows. (a) Precision and accuracy of p-MINFLUX at different positions within the field of view for different fluorescence lifetimes. (b) Simulation of a representative imaging experiment: three fluorescent emitters of lifetime ~ 4.0 ns arranged in an equilateral triangle of 12-nm sides. Black crosses indicate the ground truth of the simulations.

We note that by using equation (3.3) to model the likelihood function of the experiment, we neglect crosstalk between time windows. However, the arrival times of the photons could be modeled and included in the analysis, possibly extending the performance of p-MINFLUX for larger crosstalk provided good SNR.

Finally, we note that since the crosstalk probability scales with the repetition rate of the laser, a lower repetition rate would solve the crosstalk and extend the range of possible fluorescence lifetimes. In particular, we demonstrated p-MINFLUX with lasers of 40 MHz and 20 MHz repetition rates. A setup with a repetition rate of 10 MHz would imply minimal changes to any of the setups and extend the range of suitable fluorescence

lifetimes up to ~ 8 ns which cover most of the organic fluorophores typically used in fluorescence microscopy and spectroscopy.

4.9 Nanoscopy with fluorescence lifetime information

Next, we applied p-MINFLUX to image a triangular arrangement of single-molecules separated by $d \approx 12$ nm in a DNA-origami nanostructure as depicted in Figure 4.9a. In this case, ATTO 532 was used as it shows appropriate blinking when inducing radical ion-states in a reducing buffer for super-resolution blink microscopy (see long blinking trace in Figure 4.9b)^{149,152,153}. Figure 4.9c shows the detected photons sorted according to their arrival times relative to the laser sync signal, yielding four decays corresponding to the four excitation doughnuts. A zoom into the fluorescence time trace in Figure 4.9b showing individual single-molecule emission events is depicted in Figure 4.9d. Each single-molecule event presents a different combination of intensity levels in the four detection channels, which encodes the fluorophore position. The integrated photon numbers in each detection time window deliver the array of photon counts for each excitation doughnut \bar{n} , (as indicated by the colors in Figures 4.9c and d) which is then used to determine the molecular location.

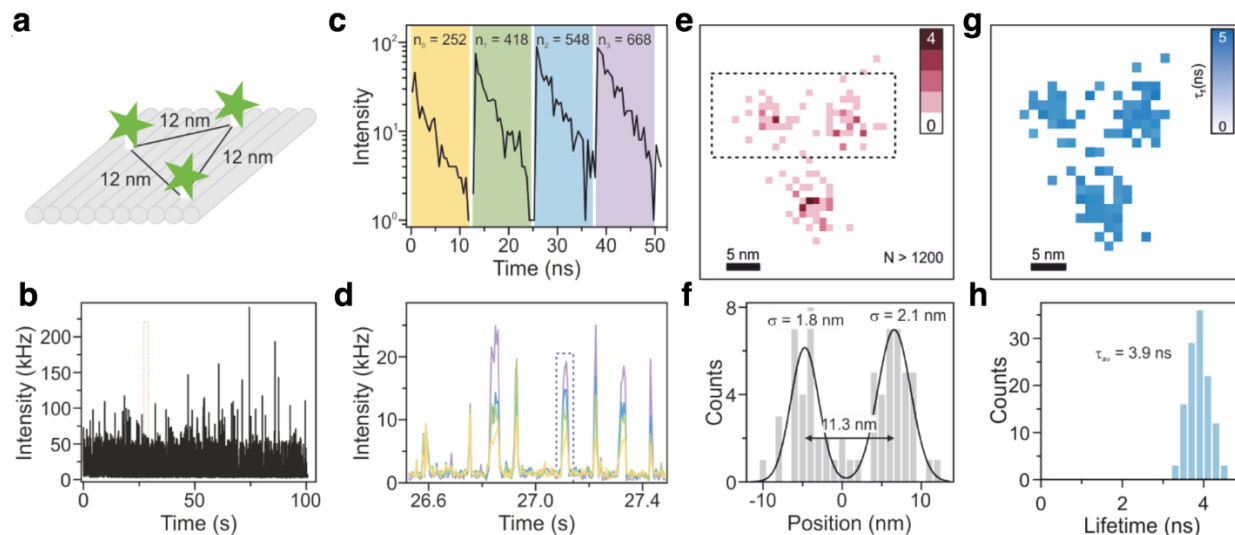


Figure 4.9 Super resolution imaging with p-MINFLUX. (a) Schematic of the DNA origami structure with three ATTO 532 dyes in a triangular array. (b) 100-second trace of the total fluorescence intensity of a single DNA origami structure. In this measurement, the SBR was ~ 8 . (c) Fluorescence decays and total integrated counts on the four detection channels for the single-molecule emission event marked in (d). (d) Zoom-in to the time trace shown in (b). The intensity is split into the four detection time windows corresponding to the four excitation beams color-coded as in (c). (e) 2D localization image for one DNA origami structure. Single-molecule emission events with $N < 1200$ were discarded. (f) Average horizontal profile of localizations from the area marked in (e). (g) p-MINFLUX fluorescence lifetime image. (h) Distribution of fluorescence lifetimes for all localizations in E.

Suitable lower- and upper-intensity thresholds were used to discern single-molecule emission events from the background and multiple-molecule events, respectively. The lower threshold was chosen well above the noise of the background signal to make sure no OFF states were considered as ON events (false positive) even at the expense of discarding possible low-count rate ON states (false negatives). We also used an upper threshold to discard events with a very high photon count rate since they are likely to come from an event in which two molecules in the ON state are emitting at the same time. The trace displayed in Figure 3 is representative of the measurements. It was time-binned at 0.5 ms, it had a background level of ~ 10.2 kHz with a noise of ~ 2.4 kHz, and an average single-molecule ON state count rate of ~ 80 kHz. A lower threshold of 25

counts, an upper threshold of 80 counts, and a minimal ON-time length of 3 ms were used as threshold parameters.

Figure 4.9e shows the localization map obtained from the 100 s of measurement in Figure 4.9b. Single-molecule events with $N > 1200$ detected photons were considered. The threshold value of 1200 was chosen as it delivered a good compromise of localization precision (~ 2 nm) and frequency of events for this fluorophore and experimental conditions. The reconstructed image reveals three distinct populations in a triangular pattern that is in good agreement with the designed DNA origami structure. The slice along the x-axis in Figure 4.9e is shown in Figure 4.9f, illustrating the achieved resolution. Two spots, separated by 11.3 nm are clearly distinguishable (standard deviations of $\sigma = 1.8$ nm and $\sigma = 2.1$ nm). Additionally, p-MINFLUX gives access to the fluorescence lifetime of each single-molecule detected, enabling the reconstruction of super-resolved fluorescence lifetime images, as shown in Figure 4.9g. For all localizations, the detected fluorescence lifetimes show a narrow distribution around an average value $\tau_{fl} = 3.9 \pm 0.3$ ns (Figure 4.9h). As also demonstrated through simulations in Section 4.8.3, Figure 4.8, p-MINFLUX nanoscopy is effective for these imaging conditions, clearly resolving the distinct fluorophores.

4.10 Nanoscale tracking

Next, we tested the performance of p-MINFLUX for single-molecule tracking and multiplexing using fluorescence lifetime information. For this purpose, we used a dynamic DNA origami structure where three single-stranded DNAs protrude from the DNA origami platform with a separation distance of 6 nm between each strand, as indicated in the schemes of Figure 4.10a. The central protruding strand (also called pointer strand) can transiently hybridize to the other protruding strands. The end of the pointer strand is labeled with a single fluorophore so that its position can be tracked via p-MINFLUX. Two DNA origami structures of this type were designed and fabricated. One was labeled

with an ATTO 542 dye and had eight complementary nucleotides for transient binding (red, Figure 4.10a). The other was labeled with a Cy3B dye and had only seven complementary nucleotides for transient binding (blue, Figure 4.10a). As in any tracking experiment, temporal and spatial resolutions are linked and limited by the detected photon count rate. Being a single-photon counting technique, p-MINFLUX offers full flexibility to bin photons in time in order to optimize for time or spatial resolution, or a suitable compromise of both. In these experiments, we aimed to detect multiple transient bindings of the pointer strand, which imposes a requirement of minimum tracking time, different for each one of the two dynamic structures and limited by the fluorophore photostability. We ensured a localization precision of $\sigma = 2 - 3$ nm to clearly discern the two transient binding positions ($x_0 = +6$ nm, $x_1 = -6$ nm). This was achieved with a count rate of 20 – 60 kHz and time bins of 30 – 150 ms for Atto 542, while for Cy3B we used a count rate of 20 – 110 kHz and time bins of 10 – 90 ms.

Figure 4.10b shows exemplary p-MINFLUX tracking traces for both dynamic DNA-origami structures. In both cases, the localizations of the fluorophores alternate between two positions separated by approximately 12 nm, as expected from the DNA origami design. Figure 4.10c shows the corresponding two-dimensional localization histograms. For the pointer labeled with ATTO 542, the two binding positions are found to be separated by 11.8 nm ($\sigma = 2.2$ nm), while for the pointer with Cy3B by 11.0 nm ($\sigma = 2.5$ nm).

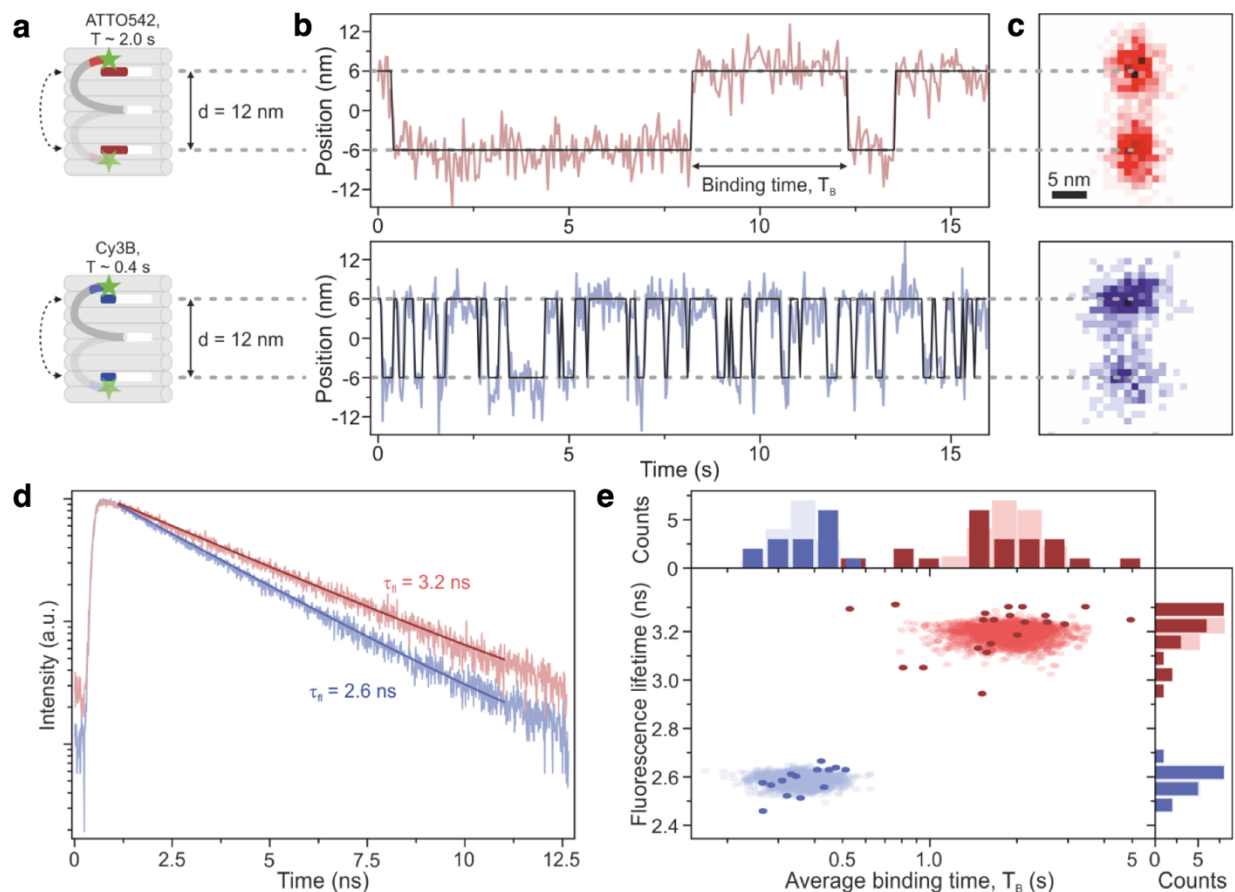


Figure 4.10 Molecular scale tracking of a DNA pointer on top of a DNA origami structure. (a) Schematics, (b) localization trace (Binning time: 100 ms for the upper and 60 ms for the lower trace; $\text{SBR} \sim 8$ for the upper trace and $\text{SBR} \sim 10$ for the lower trace), and (c) 2D localization histograms of a DNA origami pointer labeled with a single ATTO 542 (upper row) and Cy3B (lower row) dye. (d) Exemplary single-molecule fluorescence decays for ATTO 542 (red) and Cy3B (blue) labeled structures. (e) Scatter plot of the average binding time T_B and fluorescence lifetime τ_{fl} obtained from the measurements on the DNA origami structures (dark red, dark blue) and from simulations (light red, light blue). The corresponding histograms for T_B and τ_{fl} are shown on top and on the right, respectively.

By contrast, the transient binding times of the two structures differ significantly because of the different number of complementary nucleotides in the design. The pointer with eight complementary nucleotides (Figure 4.10b top) presents binding times longer than

the pointer with seven complementary nucleotides (Figure 4.10b bottom). Also, the two fluorophores used to label the pointers have distinct fluorescence lifetimes (Figure 4.10d). Figure 4.10e shows a scatter plot of the average binding times versus fluorescence lifetimes of single DNA pointers labeled with ATTO 542 and Cy3B. The two structures are identifiable in this plot both by their distinct average binding times (T_B) of 1.92 s and 0.37 s, and mean fluorescence lifetimes (τ_{fl}) of 3.2 ns and 2.6 ns, respectively. In Figure 4.10e, we also show simulations of the experiments in the background of the scatter plot. To estimate the expected distribution of binding times measured from finite, photon-limited localization traces we simulated the p-MINFLUX tracking experiment assuming the switching between positions of the DNA pointers is stochastic and memory-less, and hence the transient binding times are distributed exponentially. We thus generated simulated p-MINFLUX localization traces with transient binding times at the two positions in the DNA-origami structure. We simulated the localizations to have a precision of $\sigma = 3$ nm and the distance between the two positions was set to $d = 12$ nm. We generated traces with parameters (fluorescent lifetime, approximate binding time, number of transitions between positions) taken from our experimental data for both DNA-origami designs. Traces were then analyzed, and average binding times and fluorescent lifetimes were extracted using the same algorithms that we used to analyze the experimental data. The simulations demonstrate that the experimentally observed variance in the binding times is dominated by the limited number of transitions detected for each structure before the fluorescent dye bleaches.

4.11 Discussion and outlook

We have presented p-MINFLUX, a new implementation of MINFLUX based on pulsed interleaved excitation and time-correlated single-photon counting. p-MINFLUX works under the same basic principle as the original MINFLUX and thus delivers equally photon-efficient single-molecule localizations, with its positive consequences for nanoscopy and

tracking. We demonstrated localization precisions of $\sigma \approx 1 - 2$ nm with around $N \approx 1000$ photons per localization, an improvement of ~ 10 -fold compared to a typical camera-based localization. We demonstrated the performance of p-MINFLUX in the typical applications of molecular scale nanoscopy using blinking molecules as well as nanoscale tracking on DNA origami structures. In addition, p-MINFLUX is unique in providing access to excited state lifetime information, enabling single-molecule identification (multiplexing) and FLIM nanoscopy with molecular-scale resolution; a $10 - 100$ times improvement compared to previous works^{130,154}. Fluorescence lifetime information may expand the field of application of p-MINFLUX as it enables the specific detection of fluorescence in strongly scattering media.

In the first MINFLUX implementation, the sequential excitations used to interrogate the position of single fluorophores were performed by shifting a laser focus with a scanner. To maximize scanning speed, electro-optic deflectors controlled by an FPGA were used. The MINFLUX cycle is performed in a scan at ~ 100 μ s. By contrast, in p-MINFLUX, the excitation cycle is not limited by any optical scanner but rather by the repetition rate of the pulsed laser, which corresponds to ~ 50 ns. Therefore, the time-resolution is only limited by the detected emission rate and the fluorescent lifetime of the emitter, holding potential for experiments exploring μ s-scale dynamics. As an additional advantage, the set-up can be regarded as a rather simple modification to a stage-scanning confocal microscope with pulsed excitation and TCSPC detection. Due to these advantages, we envision that p-MINFLUX will be more easily adopted and reproduced in other laboratories. To further facilitate this, all the instrumentation and data analysis Python code is available in an open-source fashion. We note that a real-time adaptive arrangement of the excitation pattern, as demonstrated by Gwosch and coworkers⁶², can also be implemented in p-MINFLUX. This can be achieved, for example, by incorporating motorized mirror mounts. Also, photon efficiency can be maximized by the use of MINFLUX iterative approaches⁶².

In summary, p-MINFLUX constitutes a new analytical tool that combines molecular-scale spatial resolution with time-resolved lifetime measurements, which may be of use not only

for ultra-precise single-molecule localization and nanoscopy, but also for new single-molecule energy transfer measurements such as FRET, metal or graphene induced energy transfer.

This work was developed in the frame of a collaboration with the group of Prof. Philip Tinnefeld, Department of Physical Chemistry, Ludwig Maximilians Universität (LMU), Munich, Germany. My main contribution to the project was the development of the method concept, the design of the optical systems, the construction of the setup in Buenos Aires together with the instrumentation and control software, the measurements to evaluate precision and accuracy of the system, the development of the data analysis codes and the numerical simulations of the experiments. Moreover, during a research stay of four months (August – November 2019) at Prof. Tinnefeld’s group I contributed significantly to build the p-MINFLUX setup, hardware and control software, in that lab. I also contributed significantly to the design of all experiments and to write the manuscript ⁶⁸.

Appendix 4.1 DNA-origami sequences

We include here, the complete DNA sequences used for the DNA-origami samples used in the nanoscopy (Section 4.9) and single-molecule tracking (Section 4.10) experiments

Table 4.1: Unmodified staples from the 5' to the 3' end for the DNA-origami structure used for the nanoscopy combined with lifetime imaging experiments (Section 4.9).

Sequence (5' to 3')	Length [nt]
TAAGAGCAAATGTTTAGACTGGATAGGAAGCC	32
AATAGTAAACACTATCATAACCCTCATTGTGA	32
TCAAATATAACCTCCGGCTTAGGTAACAATTT	32
GTACCGCAATTCTAAGAACGCGAGTATTATTT	32
ATTATCATTCAATATAATCCTGACAATTAC	30
AAATTAAGTTGACCATTAGATACTTTTGCG	30
ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCATTAGACGG	40
AAAGTCACAAAATAAACAGCCAGCGTTTTA	30
AAAGGCCGGAGACAGCTAGCTGATAAATTAATTTTTGT	38
ACAAACGGAAAAGCCCCAAAACACTGGAGCA	32
TCTTCGCTGCACCGCTTCTGGTGCGGCCTTCC	32
GACAAAAGGTAAAGTAATCGCCATATTTAACAAAACCTTTT	40
GATTTAGTCAATAAAGCCTCAGAGAACCCTCA	32
TATATTTTTGTCATTGCCTGAGAGTGGAAGATTGTATAAGC	40
GCTTTCCGATTACGCCAGCTGGCGGCTGTTTC	32
CACCAGAAAGGTTGAGGCAGGTCATGAAAG	30
CGCGCAGATTACCTTTTTTAATGGGAGAGACT	32
ACAACATGCCAACGCTCAACAGTCTTCTGA	30
GTTTATCAATATGCGTTATACAAACCGACCGTGTGATAAA	40
AACGCAAAGATAGCCGAACAAACCCTGAAC	30
CTTTTACAAAATCGTCGCTATTAGCGATAG	30
CAACTGTTGCGCCATTGCGCATTCAAACATCA	32
CAGCGAAACTTGCTTTCGAGGTGTTGCTAA	30
AAGGCCGCTGATACCGATAGTTGCGACGTTAG	32
AGGCTCCAGAGGCTTTGAGGACACGGGTAA	30
TTAGGATTGGCTGAGACTCCTCAATAACCGAT	32
GATGGCTTATCAAAAAGATTAAGAGCGTCC	30
TAAATCGGGATTCCCAATTCTGCGATATAATG	32
AGGCAAAGGGAAGGGCGATCGGCAATTCCA	30
TTTCGGAAGTGCCGTCGAGAGGGTGAGTTTCG	32
TCACCAGTACAAACTACAACGCCTAGTACCAG	32
AACAAGAGGGATAAAAATTTTTAGCATAAAGC	32

AAATCACCTTCCAGTAAGCGTCAGTAATAA	30
CAGCAAAAGGAAACGTCACCAATGAGCCGC	30
TGTAGCCATTA AAAATTCGCATTA AATGCCGGA	32
TATTAAGAAGCGGGGTTTTGCTCGTAGCAT	30
TACGTTAAAGTAATCTTGACAAGAACC GAACT	32
GCAAGGCCTCACCAGTAGCACCATGGGCTTGA	32
TGCATCTTTCCAGTCACGACGGCCTGCAG	30
AATTGAGAATTCTGTCCAGACGACTAAACCAA	32
GCCATCAAGCTCATTTTTTAACCACAAATCCA	32
TAAATGAATTTTCTGTATGGGATTAATTTCTT	32
ATGCAGATACATAACGGGAATCGTCATAAATAAAGCAAAG	40
AATACGTTTGAAAGAGGACGACTGACCTT	30
TTATACCACCAAATCAACGTAACGAACGAG	30
CATGTAATAGAATATAAAGTACCAAGCCGT	30
TATAACTAACAAAGAACGCGAGAACGCCAA	30
ATCGCAAGTATGTAAATGCTGATGATAGGAAC	32
CATAAATCTTTGAATACCAAGTGTTAGAAC	30
GCGAAAAATCCCTTATAAATCAAGCCGGCG	30
TAAATCATATAACCTGTTTAGCTAACCTTTAA	32
CTTTAGGGCCTGCAACAGTGCCAATACGTG	30
CGAAAGACTTTGATAAGAGGTCATATTT CGCA	32
AGCAAGCGTAGGGTTGAGTGTTGTAGGGAGCC	32
TCAAGTTTCATTAAGGTGAATATAAAAAGA	30
TCATTCAGATGCGATTTTAAGAACAGGCATAG	32
CTACCATAGTTTGAGTAACATTTAAAATAT	30
ATCCCAATGAGAATTA ACTGAACAGTTACCAG	32
ACCTTGCTTGGTCAGTTGGCAAAGAGCGGA	30
CTGTGTGATTGCGTTGCGCTCACTAGAGTTGC	32
GCCGTCAAAAACAGAGGTGAGGCCATTAGT	32
GTATAGCAAACAGTTAATGCCCAATCCTCA	30
AGACGACAAAGAAGTTTTGCCATAATTCGAGCTTCAA	37
ACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGACGCTGAG	32
ATATTTTGGCTTTCATCAACATTATCCAGCCA	32
ATATTCGGAACCATCGCCCACGCAGAGAAGGA	32
TTCCAGTCGTAATCATGGTCATAAAAAGGGG	30
CGGATTGCAGAGCTTAATTGCTGAAACGAGTA	32
AAAGCACTAAATCGGAACCCTAATCCAGTT	30
GACCTGCTCTTTGACCCCCAGCGAGGGAGTTA	32
GTTTATTTTGT CACAATCTTACCGAAGCCCTTTAATATCA	40
TAATCAGCGGATTGACCGTAATCGTAACCG	30
GCGAGTAAAAATATTTAAATTGTTACAAAG	30
CTTAGATTTAAGGCGTTAAATAAAGCCTGT	30
CCAGGGTTGCCAGTTTGAGGGGACCCGTGGGA	32
TAGGTAAACTATTTTTGAGAGATCAAACGTTA	32
CGATAGCATTGAGCCATTTGGGAACGTAGAAA	32
GCGCAGACAAGAGGCAAAAAG AATCCCTCAG	30
CCTGATTGCAATATATGTGAGTGATCAATAGT	32
GCCCCAGAGTCCACGCTGGTTTGCAGCTAACT	32
TCATCGCCAACAAAGTACAACGGACGCCAGCA	32
CTGTAGCTTGACTATTATAGTCAGTTCATTGA	32
GAATTTATTTAATGGTTTGAAATATTCTTACC	32

CCTAAATCAAAATCATAGGTCTAAACAGTA	30
AGCGCGATGATAAAATTGTGTCGTGACGAGA	30
GATGTGCTTCAGGAAGATCGCACAAATGTGA	30
GCCTCCCTCAGAATGGAAAGCGCAGTAACAGT	32
TTTATCAGGACAGCATCGGAACGACACCAACCTAAAACGA	40
CACAACAGGTGCCTAATGAGTGCCCAGCAG	30
CTGAGCAAAAATTAATTACATTTTGGGTTA	30
TGACAACTCGCTGAGGCTTGCATTATACCA	30
GCGAACCTCCAAGAACGGGTATGACAATAA	30
TGAAAGGAGCAAATGAAAAATCTAGAGATAGA	32
GCACAGACAATATTTTGAATGGGGTCAGTA	31
TCACCGACGCACCGTAATCAGTAGCAGAACCG	32
GCCCTTCAGAGTCCACTATTAAGGGTGCCGT	32
CCACCCTCTATTCACAAACAAATACCTGCCTA	32
ATTTTAAAATCAAAATTAATTTGCACGGATTCCG	32
GTAATAAGTTAGGCAGAGGCATTTATGATATT	32
TTAACACCAGCACTAACAACCTAATCGTTATTA	32
TTTTATTTAAGCAAATCAGATATTTTTTGT	30
AACACCAAATTTCAACTTTAATCGTTTACC	30
GATGGTTTGAACGAGTAGTAAATTTACCATTA	32
CTCGTATTAGAAATTGCGTAGATACAGTAC	30
ATCCCCCTATACCACATTCAACTAGAAAAATC	32
CTTATCATTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTT	32
GCGGAACATCTGAATAATGGAAGGTACAAAAT	32
GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGGGTAGCA	32
ACGGCTACAAAAGGAGCCTTTAATGTGAGAAT	32
TGGAACAACCGCCTGGCCCTGAGGCCCGCT	30
GCGGATAACCTATTATTCTGAAACAGACGATT	32
CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAAAGAATA	32
TTAAAGCCAGAGCCGCCACCCTCGACAGAA	30
CAGAAGATTAGATAATACATTTGTGACAAA	30
AGAAAACAAGAAGATGATGAAACAGGCTGCG	32
CGTAAAACAGAAATAAAAATCCTTTGCCCGAAAGATTAGA	40
ACCGATTGTGCGGCATTTTCGGTCATAATCA	30
AATAGCTATCAATAGAAAATTCAACATFCA	30
AAACAGCTTTTTGCGGGATCGTCAACACTAAA	32
ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT	32
TTGACAGGCCACCACCAGAGCCGCGATTTGTA	32
TACCGAGCTCGAATTCGGGAAACCTGTGCTGCAGCTGATT	40
GCCAGTTAGAGGGTAATTGAGCGCTTTAAGAA	32
AGCCAGCAATTGAGGAAGGTTATCATCATTTT	32
CATTTGAAGGCGAATTATTCATTTTTGTTTGG	32
ACACTCATCCATGTTACTTAGCCGAAAGCTGC	32
ACTTTTTTATTTTAGTTAATTTTCATAGGGCTT	32
GCTATCAGAAATGCAATGCCTGAATTAGCA	30
AAGTAAGCAGACACCACGGAATAATATTGACG	32
CAGGAGGTGGGGTCAGTGCCTTGAGTCTCTGAATTTACCG	40
TTAATGAACTAGAGGATCCCCGGGGGTAACG	32
AAGGAAACATAAAGGTGGCAACATTATCACCG	32
CATCAAGTAAAACGAACTAACGAGTTGAGA	30
AATGGTCAACAGGCAAGGCAAAGAGTAATGTG	32

CAACCGTTTCAAATCACCATCAATTCGAGCCA	32
GGCCTTGAAGAGCCACCACCCTCAGAAACCAT	32
TAAATCAAAATAATTTCGCGTCTCGGAAACC	30
GAGGGTAGGATTCAAAAGGGTGAGACATCCAA	32
TTATTACGAAGAACTGGCATGATTGCGAGAGG	32
ATACCCAACAGTATGTTAGCAAATTAGAGC	30
TTAACGTCTAACATAAAAAACAGGTAACGGA	30
AGTATAAAGTTCAGCTAATGCAGATGTCTTTC	32
CACATTAATAATTGTTATCCGCTCATGCGGGCC	32
CTTTAATGCGCGAACTGATAGCCCCACCAG	30
GAAATTATTGCCTTTAGCGTCAGACCCGGAACC	32
AACGCAAAATCGATGAACGGTACCGGTTGA	30
ACAACCTTCAACAGTTTCAGCGGATGTATCGG	32
GCCTTAAACCAATCAATAATCGGCACGCGCCT	32
TCCACAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACGA	32
GCCCGTATCCGGAATAGGTGTATCAGCCCAAT	32
TCAATATCGAACCTCAAATATCAATTCCGAAA	32
GTCGACTTCGGCCAACGCGCGGGGTTTTTC	30
GCAATTCACATATTCCTGATTATCAAAGTGTA	32
CTCCAACGCAGTGAGACGGGCAACCAGCTGCA	32
TGTAGAAATCAAGATTAGTTGCTCTTACCA	30
TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACCGCGC	32
CAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAAACGTGGA	31
CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAA	32
TTAGTATCACAATAGATAAGTCCACGAGCA	30
AGGAACCCATGTACCGTAACACTTGATATAA	31
GAGAGATAGAGCGTCTTTCCAGAGGTTTTGAA	32
TCGGCAAATCCTGTTTGATGGTGACCCCTCAA	32
AAGCCTGGTACGAGCCGGAAGCATAGATGATG	32
AGAAAGGAACAACATAAAGGAATTCAAAAAAA	31
ACGCTAACACCCACAAGAATTGAAAATAGC	30
CCACCCTCATTTTCAGGGATAGCAACCGTACT	32
TTTAGGACAAATGCTTTAAACAATCAGGTC	30
AGAGAGAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC	32
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAACCAGTAA	31
CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTAC	32
AACAGTTTTGTACCAAAAACATTTTATTTT	30
TTTACCCCAACATGTTTTAAATTTCCATAT	30
TAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAAGCATC	30
TTTTCACTCAAAGGGCGAAAAACCATCACC	30
TCTAAAGTTTTGTGCTCTTTCCAGCCGACAA	31
GTTTTAACTTAGTACCGCCACCCAGAGCCA	30

Table 4.2. Modified and extended staples from the 5' to the 3' end for the DNA-origami structure used for the nanoscopy combined with lifetime imaging experiments (Section 4.9).

Sequence (5' to 3')	Length [nt]	Function
Biotin- GAGAAGAGATAACCTTGCTTCTGTTCTGGGAGAAACAATAA	40	Biotin for immobilization
Biotin- ATAAGGGAACCGGATATTCATTACGTCAGGACGTTGGGAA	40	Biotin for immobilization
Biotin- AGCCACCACTGTAGCGCGTTTTCAAGGGAGGGAAGGTAAA	40	Biotin for immobilization
Biotin- CGGATTCTGACGACAGTATCGGCCGCAAGGCGATTAAGTT	40	Biotin for immobilization
Biotin- GAAACGATAGAAGGCTTATCCGGTCTCATCGAGAACAAGC	40	Biotin for immobilization
Biotin- TAGAGAGTTATTTTCATTTGGGGATAGTAGTATCATTAA	40	Biotin for immobilization
TTCCTCTACCACCTACATCACAA ATTACCTTTGAATAAGGCTTGCCCAAATCCGC	56	External labeling site of Atto 532 for super resolution imaging
TTCCTCTACCACCTACATCACAA TTGCTCCTTTCAAATATCGCGTTTGAGGGGGT	56	External labeling site of Atto 532 for super resolution imaging
TTCCTCTACCACCTACATCACAA AATACTGCCCAAAGGAATTACGTGGCTCA	54	External labeling site of Atto 532 for super resolution imaging
TTCCTCTACCACCTACATCACAA CTTTTGCAGATAAAAACCAAATAAAGACTCC	56	External labeling site of Atto 532 for super resolution imaging
Atto532-TTTGTGATGTAGGTGGTAGAGGAA	25	Atto 532 external labeling strand for super resolution imaging
GATGGCTTATCAAAA- Atto532 -GATTAAGAGCGTCC	30	Internal Atto 532 for evaluation of the localization performance

Table 4.3: Unmodified staples from the 5' to the 3' end for the DNA-origami structure used for the single-molecule tracking experiments (Section 4.10).

Sequence (5' to 3')	Length [nt]
CAATTCATATAGATAATAAAATCCTTTGCCCG	31
ATGAGTGACCTGTGCAGTTTCTGCCAGCACC	31
GGAACCCAAAACACTACAAACAGTTTCAGCG	29
GTTTTCCCGTAGATGGCAGGAAGATCGCACT	31
TTTTTTAATGCACGTACAAGTTACCCATTAG	32
CCCGCCGCGCTTAATGAAAGCCGCGAACGTG	32
AAATCCCGTAAAAAACGTTTTTTGGACTTGT	32
AGGAAACCGAGGACGTAGAAAAAGTACCG	29
TATCATTTTGCAGAACATCCTGATATAAAGAA	32
CTTAATTGAGACCGGAAACAGGTCAGGATTAGAGGTGGCA	40
TTTTTTTTTTTTTAAAACACTAG	20
GCCGATTAAGGAAGGGCGCGTAACCACCACA	31
ATGGCTACAATCAACTGAGAGCCAGCAGCAAATGAAAAACGAACCTAATGC	61
GCTTGGCAGA	
GTCCACTAAACGCGCGGACGGGCAACAGCTG	31
TGCGGCCAGAATGCGGTTTT	20
TTTTATTGGGCTTGAGATGGCCAGAACGATT	31
ATTGCCCTTACCCGCCCCAGCTGCTTGCGTTG	32
TGATGTTACTTAGCCGGAAAAGACAGCACTACGAA	35
TTTTCTTTACAAACAATTCG	20
TATTTTGTAAAAATTCGGGTATATATCAAAAC	32
TAATAGTATTCTCCGTGCATTAATTTTTGTT	32
TGTTGCCCTGCGGCTGATCAGATGCAGTGTCA	32
TTTTTTGCATCAAAAGCCTGAGTAATTTT	29
TTTTTTGAGGGGACGACGAC	20
TGATTGCTTTGAATACAAACAGAATGTTTGGA	32
ACATAGCGATAGCTTATTTT	20
TTTTCCCTTACACTGGTTGC	20
CGGCCTCGTTAGAATCTTTT	20
TTACCATAACCCTCGAAATACAATGTTTAAACAGGG	37
TTTTTTAGGAATACCACAGTAGTAATTTT	29
TGTAATCTTGACAAGAACCGAAC	23
CTTCTGACCTAAATTTGCAGAGGCCAGAACGCAATTTACG	40
AGATGAAGGGTAAAGTTTTT	20
CACAGACATTTAGGGATCTCAAAAAAAAGGTTCTTAAAGCCGCTTT	48
TCTTTAGGCTGAATAATGCTCATTAGTAACAT	32
CAAAGGGCCTGTCGTGTGGCCCTGAGAGAGTT	32
GCAGAGGCGAATTATTTTTTCATTTGCTATTAA	32
TTTCGACTTGATCGAGAGGGTTGATATAAGTATTTT	36
TTTTCATATAAAAAGAAAGCCGAACATTTT	29
TTTTAAACATCAAGAAAAAA	20
CAAAAGAATAAAATACCCAGCGATTATACCAAGCGCGAA	39
GAGCCGATATAACAACAACCATCGCCCTTTTTTT	34
TTTTTTCCTGATTATCACGT	20
CCGAATCTAAAGCATCTTTT	20
TTTTGCTAATATCAGAGAGATAACCCCGCCACCGCG	36
TGTAAGGTAATAAGTTTCAGTGCC	24
TTTTCGCAAATGGTCAATAAACCATTAGATGC	32
ATCAAAAAGTCATAAAACGGAACAACATTATCAACTTTAGTAGAT	45
GGCTTAGGTTGGGTAAAGCTAATGATTTTTCGA	32

AACGTTATTAATTTTACAACATAATCAGTTGGC	32
TGCGAATAATAATCGACAATGTTCCGGTCCG	29
CTGCAACAGTGCCACGTATCTGGTAGATTAGA	32
CCAGCCAGCTTTCGGGTAATGGGGTAACAAC	32
CCGTGCATCTGCCAGTTTTT	20
TTTTCCCGACTTACAAAATAAACAGTTTT	29
GAAAGGAGCGGGCGCTAGGTTTT	23
CATTGCCTGAGAGTCTTTATGACCATAAATCATTTCATTT	40
TTTTGGCGCATAGGCTGGCTAACGGTGTTAAATTGT	36
CTCCAATCGTCTGAAATTTTT	20
CCCCCTGCGCCCGCTTTAGCTGTTTCCTGTGT	32
GGAGCCTTCACCCTCAGAGCCACC	24
TTTTTTGTTCCAGTTTGGAACAAGA	25
TTAATTAACCATACATACATAAAGGTGGCAATTTTT	36
TTTTTATCATCGCCTGAACAGACCATTTTT	29
TCTTACCATAAAGCCATAAATTTAGAAATGGTTTAGGGTAGC	40
TTTTATTGCTGAATATAATACATTTTTTTTT	29
AAATCAACACGTGGCATCAGTATTCTCAATCC	32
AGAACGTTAACGGCGTAATGGGTAAAGGTTTCTTTGCGTCGGTGGTGCTGG TCTTGCCGTT	61
GCCTAATTATCATATGATAAGAGATTTAGTTAATTTTCAT	39
TTTTCCATATTATTTATCCCAATCCAAAGTCAGAGA	36
ACCCTCATGCCCTCATTTTTCTGTATGGGATTTAGTTAAAGCAGCTTGA	48
GTCGAAATCCGCGACCTGCTCCACCAACTTTTAGCATTC	39
CCGGAACCGCAAGAAAGCAATAGCTATCTTACTCACAAATCCGATTGAG	48
AACGTCAATAGACGGGGAATACCCAAAAGAACAAGACTCCGTTTTTTAT	48
GCAGTTGGGCGGTTGTCCAGTTATGGAAGGAG	32
CCGTCCGAGTAGCATTCAAAAACAGGAAGATT	32
TTTTTTATCACCGTCACAGCGTCAGTTTT	29
CCAACATGACGCTCAATGCCGGAGGAAATACC	32
TACAGGCATTAATTAACCAATAGGAACGCCATCAAAGTCAATCAGAATTAG CCTAAATCG	61
AGTTGATTAGCTGAAAAGAGTACCTTTAATTGTTAATTCGGACCATAA	48
AGCGAACCAGAAGCCTGGAGAATCACAAAGGCTATCAGGT	40
TTTTGAACAACATAAAGGAACACTGATTTTT	29
CGGGAACGAAAAACCTGATGGTGGTTCCGAA	32
CGTTGAAAATAGCAAGCCCAATA	23
GACAGATGGACCTTCATCAAGAGCCCTGAC	30
GCGAGAAAAGGGATGACGAGCACGTATAACGTGCTTTTTCACGCTGAAGAAA GC	53
TCGATAGCAGCACCGTAAAATCACGTTTTTGCT	32
TTTTCCCTCAGAGCCACCACCCTCAGAAAGCGCTTA	36
ATCGGCAAAATCCCTTACGTGGACTCCAACGT	32
TTCAAATTTTTAGAAAAACAGGAGCAAACAAGAGAATCGATGAAGGGTGA GATATTTTA	60
TTTTTAGCCCGGAATAGCCTATTTCTTTTT	29
TACCGATAGTTGCGCTTTTTTCA	22
TTTTCAGGGTGGTTTTTCTT	20
AAAGACAAATTAGCAAGTCACCAATGAAACCA	32
CCAGAATGGAGCCGCAATCAAGTTTGCC	29
TTTTTGATTATTTACAGAA	20

ATTATAGCGTCGTAATAGTAAAATGTTTTTT	31
TAGTCAGAAGCAAAGCGGATTTT	23
AGGCGAAAATCCTGTTGTCTATCACCCCGAT	32
GGGGCGCGCCCAATCACTAAAGTACGGTGTCACGAGAATAGCTTCAA	48
GCCGTCACAATATAAAAAGAAACCACCAGAAGGAGCGGACTCGTATTACATTT GTCAAATAT	61
GAAATTGTTATCCGCTCACATTAATTAATGA	32
TTTTTCCAAGAACGGGTGCGAACCTTTTT	29
TGCTCATTCTTATGCGTTAATAAAAACGAACATATTCATTGGCTTTTG	48
TTTTTAGACTGGCATCAGTTGAGATTTTTT	30
AAACGGGGTTTTGCTACATAACGCCAAAAAAGGCT	35
ACAAAGTATGAGGAAGCTTTGAGGACTAAAGATTTT	36
TCATCAACAAGGCAAATATGTACCCCGGTTG	31
ACAAGAAATAGGAATCCAATAGCAAGCAAATATAGCAGCATCCTGAA	48
AGGAGGTGGCGGATAAGTATTAAGAGGCTAAATCCTCTACAGGAG	45
TTCCGGAATCATAATTTTTT	20
TTTTGAATGCCAACGGCAGC	20
TCGAAGATGATGAAACTTTT	20
TGCCATTCAACAATAGAAAATTCATATGGT	30
TTTTACTGTAGCCTCAGAACC GCCATTTT	29
CTGCGCGGCTAACTCACAATCCACACAACATACGAGTACCGGGGCTCTGTG GGTGTTCAG	61
AAGCGCATAAATGAAACAGATATAGAAGGCTTAGCAAGCCTTATTACG	48
CACTCATGAAACCACCTTAAATCAAGATTGAGCGTCTTTTTGTTT	45
TATTTTTGAGAGATCTGCCATATTTCTCTACTCAATTGA	40
GTA CTATGGTTGCTTTTTTTAGACACGCAAATT	32
AATGCAATAGATTAAGGGCTTAGAGCTTATTTT	33
GTATAAGCAAATATTTTAGATAAGTAACAACG	32
AAGGGAACCGGATATTCATCTATCTTTGACCCGTAATGCCATCGGAAC	48
TGTAGCTCAACATTTACCCTCGAAAGAC	28
TTTTGTGTAGGTAAAGATTC	20
TTTTGCCTCAGAGCATAAAGAAAATTAAGCAATAAATTTT	40
CATAGGTCTGAGAGACAAATCGTCGAATTACC	32
AGCATGTACGAGAACAATCCGGTATTCTAAGAACGATTTTCCAGA	45
GAGAAACATTTAATTTTACAGGTAGAAAG	29
TTTTAGAGCGGGAGCTAGAT	20
GTAAGAATAGTTGAAACTTTTCGCAAACACCGC	32
ACCTCGTCATAAACATTTTT	20
TTCGTAATCATGGTCATCCATCAGTTATAAGT	32
TTTTGTGTAAAGCCTGGCGG	20
CCTGCAGCCATAACGGGGTGTCCAGCATCAGC	32
TTTGCCTATTGGGCGCTTTT	20
TTTTCGGGCCGTTTTTACCGG	20
GCCGGGCGCGGTTGCGCCGCTGACCCCTTGTG	32
TTATACTTAGCACTAAAAAGTTTGTGCCGCCA	32
GGCACCAAAACCAAAGTAAGAGCAACACTATAGCAACGTAAATCGCC	48
CTAGCTGATAAATTAACAGTAGGG	24
ATACGCAAAGAAAATTAATTCATTAAGGTGAATTTT	36
AGAGCAAATCCTGTCCAGATACCGACAAAAGGTAATTTT	39
GCCAGTACGTTATAAGGCGTTAAATAAGAATAAACACAAAT	41
TTTTTAAACGATGCTGATGG	20

CCTCAGAGCACAAAGAAGAAAAGTAAGCAG	29
ACAGTTGAGGATCCCCAGATAGAAGTAAAGC	32
ATAATCAGAAAAGCCCAACATCCACTGTAATA	32
AAATTATTTGGAAACAGCCATTCGAAAATCGC	32
ACATTCTGAAGAGTCTCCGCCAGCAGCTCGAA	32
TTTCATCGAATAATATCCAGCTACAATACTCCAGCAATTTCTTTACAG	48
TGAATTACCAGTGAATGGAATTACGAGGCATATAGCGAGAGAATCCCC	48
CGTGCCTGTTCTTCGCATCCAGCGCCGGGTTA	32
TTAGAGCTATCCTGAGGCTGGTTTCAGGGCGC	32
TAGTAATAACATCACTTTTT	20
TAATAAGAAGAGCCACCCTTATTAGCGTT	29
ATCCAGAACAATATTAGTCCATCAGGAACGGT	32
TTTTATCGCCATTAAAAATA	20
TTTTGATTAAGACGCTGAGA	20
GGAATTAGGTAAATTTTCGGTTCATAGCCCCACCGGAACCACCACC	45
TTTTAGAACGCGAGAAAACCTT	22
GGCCTCTTCGCTATTACGTTGTACCTCACCG	32
TTTTTGCTGAGTAGAAGAA	20
GCCAGTGCATTGACCCACCGCTTCTGGTGCC	32
TAAAGTTTAGAACCGCTAATTGTATCGCGGGGTTTAAGTTTGGCCTTG	48
TTTTATTAAGTTGGGTACGC	20
ATATATATAAAGCGACGACATCGGCTGTCTTTCCTTATCATTTTT	45
CAGATGAATATACAGTTTTT	20
GACCGTGTGATAAATAACAAATTCT	24
CATAATAATTCGCGTCTTTT	20
ACAAATTATCATCATTTTT	20
TCACCGGAAGCATAAATTTTT	20
ATCAAACCTTAAATTTCTGGAAGGGCCATATCA	32
TTCATAGGGTTGAGTGTTTT	20
GCCCCCTGGTGTATCACCGTACTC	24
TTCTGAAACATGAAAGTGCCGGCCATTTG	29
TTTTGGAACCTAAGTCTCTGAATTTTTTTTTT	32
TTTTCTTTTTCACACGGAGATTTGTTTT	29
GTTGTACCACCCTCATAAAGGCCGGAGACAG	31
CCGAGTAAGCCAACAGGGGTACCGCATTGCAA	32
AGTGTGCTGCAAGGCGTTTT	20
CCCTGAACAAATAAGAAACGCGAGGCGTT	29
CATTATACCAGTGATTTGGCATCAGGACGTTGTAACATAAACCAGACG	48
CAACTAATGCAGACAGAGGGGCAATACTG	29
CGTTGGTAGTCACGACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATATCGGCCTGCGCAT CGGCCAGCTT	61
AAACGGCGCAAGCTTTGAAGGGCGATCGGTGC	32
TTTTGTTTCGTCACCAGTACTGTACCGTAAT	31
CAGTATGTTTATTTTGCGAAGCCCTTTTTAATTGAGTTCTGAACA	45
TCAAATCACCATCAATACGCAAGG	24
CGCTGGCACCACGGGAGACGCAGAAACAGCGG	32
GAAACAACGCGGTGCGCCGACAGGCGGCCTTTAGTGACTTTCTCCACGTACA GACGCCAGG	61
TGCTTTTCGAGGTGAATCTCCAAA	24
TAGTTGCCAGTTGCGGGAGGTTTTGAAGATCAATA	36
AATTACATAGATTTTCAATAACGGATTCGCC	31

TTTTACCGTTCCAGTAAGCGTCATACATGGCTTCAGTTAAT	41
TTTTAACAGTACCTTTTACA	20
CTTTTGGGTTATTTCAATGATATTCAACCGTT	32
TTTTCATCGGCATATTGACGGCACCCAGG	29
CTCTCACGGAAAAAGAACGGATAAAAAACGACG	32
CGGAATCTCAGGTCTGTTTTAAATATGCATGCGAACGAATCATTG	45
TGCGGGATAGCAGCGACGAGGCGCAGAGAAACGGCCGCGGTAACGATC	48
ATTGCGTTTTAACAAACATTTCAATTACCTGAGCAAAAGGGAGAAACAGGTTTA AGATGATGG	61
TTCACCAGGTAGCAATGGCCTTGCTGGTAAT	31
GCCTGTTTGCTTCTGTTACCTTTTAAACGTAA	32
CCATTACCAAGGGCGACATCTTTTCATAGGCAGAAAGAATAGGTTGAG	48
TCAGCAGCAACCGCAATTTT	20
CAAATCGTCAGCGTGGTGCCATCCCACGCAA	31
TTGAGTAAGCCACCCTCAGAACCG	24
GGAGGGAAGAGCCAGCAATCAGTAGCGACAGACCAGAACCGCCTC	45
ATAAACAAATCCCTTAGTGAATTTATCAAAAT	31
CACATCCTCAGCGGTGGTATGAGCCGGGTAC	32
GCTGCGCAACTGTTGGCAGACCTATTAGAAGG	32
AAATCAGCTCATTTTTTGTGAGCGAATAGGTCA	32
TTTTAGTAATTCAATCGCAAGACAATTTT	29
GGAAACCAGGCAAAGCGTACATAAGTGAGTGA	32
CAAACCCTTTAGTCTTACCAGCAGAAGATAA	31
CAGTACCATTAGTACCCAGTGCCCGTATAAATTGATGAATTAAG	45
AACAGAGGTGAGGCGGCAGACAATTAAGGG	32
TTTTAAGTTACCAGGGTAATTGAGCTTTT	29
ATTTAGAAGTATTAGATTTT	20
CTGATAGCCCTAAAACTTTT	20
CCGGCAAATCGGCGAAGTGGTGAAGGGATAG	31
TTTTACCTTGCTGAACCAGG	20
GGGGTCATTGCAGGCGGGAATTGACTAAAATA	32
CGCTCACTATCAGACGGTCCGTGAGCCTCCTC	32
GCAGCAAGCGGTCCACAAGTGTTTTGAGGCCA	32
CCACCCTCTGTTAGGAAGGATCGTCTTTCCAGCAGACGATTATCAGCT	48
CTCAAATGTTTCAAGAAATGGAAGTTTACGCGCATTACTTCAACTGGCT	48
ATAACCTTATCAACAAAAATGTATAACCTCC	32
ATCGGCCTTAAAGAATAAATCAAAAGAATAGCCCGAGACCAGTGAGGGAGA GGGGTGCCTA	61
CCAGCTTACGGCTGGAAACGTGCCCGTCTCGT	32
CTGAGGCCAACGGCTACAGAGGTTTCCATT	30
AAAACGGTAATCGTTTTTTTT	20
TGGAGCCGGCCTCCGGGTACATCGACATAAAA	32
ACGCCAGATGACGGGGCGCCGCTAGCCCCAGC	32
TTTTACGCATAATGAGAATAGAAAGTTTT	29
CATGTTTACCAGTCCCTTTT	20
TTAATTTTATGTTCTATAACTATATGTAAATGCTGATGTCAATAGAATCCTT GACAAAATT	61
TTTTACTAGAAAAAGCCTGTT	21
TTAGTTTGCCTGTTTAGGTCATTTTTGCGGATAGGAAGCCGACTATTA	48
AATAAGTTAGCAAAAACGCAATAATAACGAGAATTAAGCCCAA	45
TTTTTGGCCTTCCTGTATAA	20

CAGGAAAAACGCTCATACCAGTAAATTTTTGA	32
ATATTCACCGCCAGCATTGACAGGCAAAATCA	32
AACCGTTTCACACGGGAAATACCTACATTTTGACGCTAAACTATCACTTCTT TAACAGGAG	61
TTTTGCGCTGGCAAGTGTAG	20
TTTTGGAATTTGTGAGAGAT	20

Table 4.4. Modified and extended staples from the 5' to the 3' end for the DNA-origami structure used for the single-molecule tracking experiments (Figure 4.9).

Sequence (5' to 3')	Length [nt]	Function
Biotin- AGAGCCGCAAACAAATGAGACTCCTCAAGA GATTAGCGGGCAGTAGCA	48	Biotin for immobilization
Biotin- GAGGGTAGTTGCAGGGTGCTAAACAACTTT CA CGCCTGGAAAGAG	45	Biotin for immobilization
Biotin- TACCAGTAACGCTAACAGTTGCTATTTTGCA C CCCATCCT	40	Biotin for immobilization
Biotin- ATAAAAATATCGCGTTCTCCTTTTGATAAGA G CTATAT	38	Biotin for immobilization
AGAAACAGCTTTAGAAAGGAAGAAAAATCTAC GATTTTAAGCATATAACTTTTAAATGC	58	Catching site 1 for Cy3B Pointer
GCACCCCTCCGTCAGGTACGTTAGTAAATGAA TAGTTAGCGTCAATCATTTTAAATGC	58	Catching site 2 for Cy3B Pointer
ACGATAAACCTAAAACAAAGAATACACTAAA ACATTACCCAACAAAGCTTTTTTTTTTCGGGC ATTTA-CY3B	67	Pointer – Cy3B
AGAAACAGCTTTAGAAAGGAAGAAAAATCTAC GATTTTAAGCATATAACTTTTAAATGCC	58	Catching site 1 for Atto542 Pointer
GCACCCCTCCGTCAGGTACGTTAGTAAATGAA TAGTTAGCGTCAATCATTTTAAATGCC	58	Catching site 2 for Atto 542 Pointer
ACGATAAACCTAAAACAAAGAATACACTAAA ACATTACCCAACAAAGCTTTTTTTTTTCGGGC ATTTA-ATTO542	67	Pointer – Atto542

Chapter 5 – Single-molecule localization by raster scanning a minimum of light (RASTMIN)

The generalization of single-molecule localization with sequential structured illumination (SML-SSI) developed in Chapter 3 enabled the design of new methods. Among the new alternatives, RASTER-scanning s MINimum of light (RASTMIN) outstands for its performance and simplicity. Theoretically, RASTMIN can achieve localization precisions as high or even higher than the best reported values using MINFLUX. This chapter presents the first experimental realization of RASTMIN aiming to verify the theoretically predicted performance.

The RASTMIN measurement is accomplished by raster scanning a doughnut-shaped beam over a single fluorescent molecule whose position is unknown (Figure 5.1a). The collected data, i.e. the intensities registered in each pixel ($\{n_i\}$ in Chapter 3, equations 3.3, 3.8 and 3.11) of the raster produces a low-resolution and low-SNR image of the doughnut-shaped beam (Figure 5.1b). A high-resolution and high-SNR measurement of the excitation doughnut-shaped focus is acquired, usually previously to the single-molecule measurement, using a brighter and more stable emitter (Figure 5.1c). Especially relevant is the area of an extent $\sim \lambda/2NA$ around the minimum of intensity (Figure 5.1d). This measurement estimates with high precision the $I(\mathbf{r})$ in Chapter 3, equations 3.2 and 3.5. Using the two measurements as an input for the likelihood function (Chapter 3, equation 3.11) the position of the emitter is retrieved.

5.1 RASTMIN implementation in a confocal microscope

RASTMIN interrogates the position of a single molecule by raster scanning a minimum of light intensity over an area around the target molecule. Thus, in principle, RASTMIN could be implemented on any scanning microscope modified to have the excitation beam with a minimum (ideally a zero) of intensity. In principle, RASTMIN can be implemented on both stage-scanning and beam-scanning microscopes. However, it is very useful to use the electromechanical control of the stage to actively correct for mechanical drift instead of performing the raster scan. Therefore, a beam-scanner for the excitation beam combined with a motorized sample holder used to compensate drift is arguably the most efficient way of implementing RASTMIN.

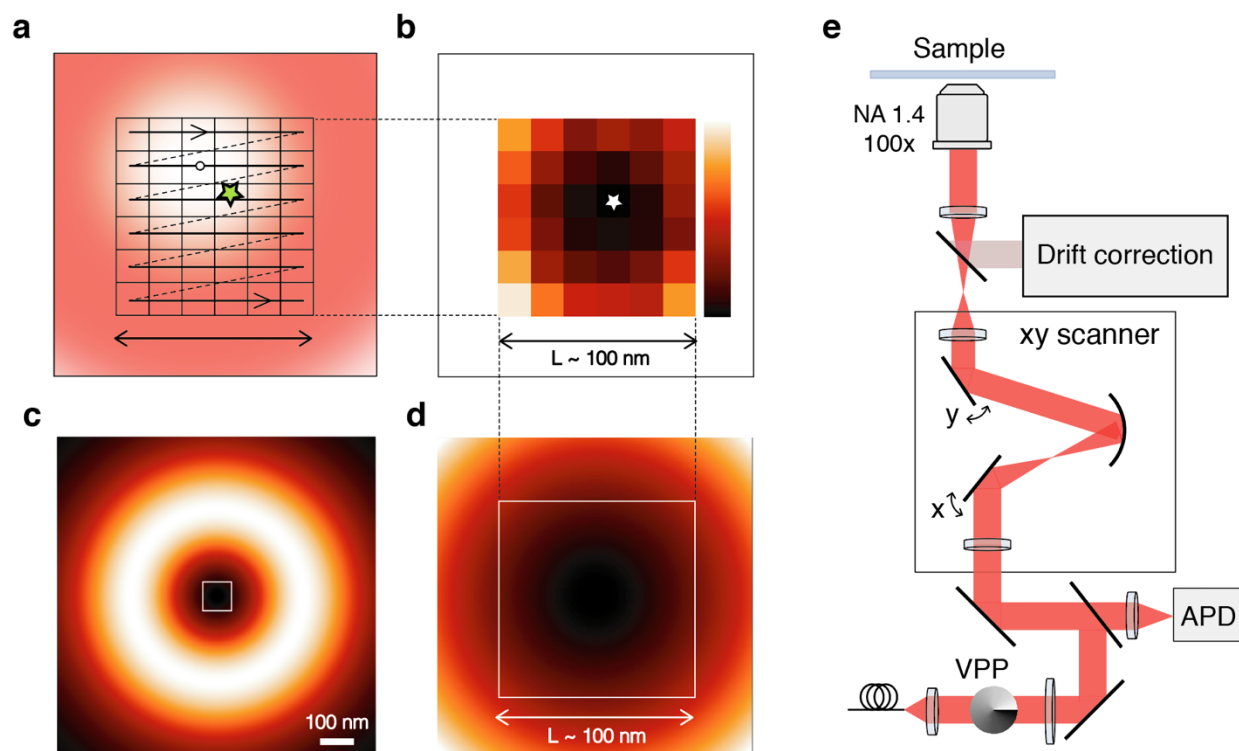


Figure 5.1 Experimental set-up and RASTMIN measurement. (a) RASTMIN has been implemented in an existing confocal laser scanning system, the two main modifications are: adding a vortex-phase plate (VPP) in the excitation path to generate the doughnut-shaped focus and an

IR drift correction system to actively correct for mechanical drift of the sample. **(b)** The doughnut-shaped beam is raster scanned over the single fluorescent molecule. **(c)** The measurement **(b)** produces a low-SNR image of the doughnut-shaped beam. **(d)** A measurement like **(b)** is also performed with a brighter and more stable emitter in order to obtain a detailed image of the excitation beam focus. **(e)** Zoom of the central region of **(d)**.

We implemented RASTMIN in a custom-made confocal microscope counting with a beam-scanner based on galvanometric mirrors and a piezoelectric stage to control the motion of the sample holder, the same microscope is used in our laboratory to perform STED nanoscopy. A detailed description of the setup working in its STED mode is provided in ²⁸. Here, for clarity, we will focus on describing the parts of the setup that were actually used to implement RASTMIN.

Figure 5.1e shows a schematic of the microscope, an optical beam-scanner is used to perform the sequential structured illumination and to acquire the fluorescence signal in an avalanche photodiode (APD, SPCM-AQR-13 PerkinElmer Optoelectronics). A detailed description of the beam-scanner is given in Subsection 5.1.1. In comparison to a usual confocal microscope, two main modifications were made to the setup: a $0 - 2\pi$ vortex-phase plate (VPP) was added in the excitation path to generate the doughnut-shaped focus (Subsection 5.1.2) and an IR drift correction system was implemented to actively correct for mechanical drift of the sample (Subsection 5.1.3).

5.1.1 Beam scanner

There is a wide variety of possible beam scanner designs, some of them are described in Chapter 9, Section 5 of ¹. Figure 5.2a shows a photograph of the custom-made beam-scanner based on galvanometric mirrors used in the custom-made confocal microscope. Figure 5.2b shows a schematic of the setup. It consists of two lenses, two orthogonal galvanometric mirrors (horizontal, x , and vertical, y), and one concave mirror (Figure 5.2a).

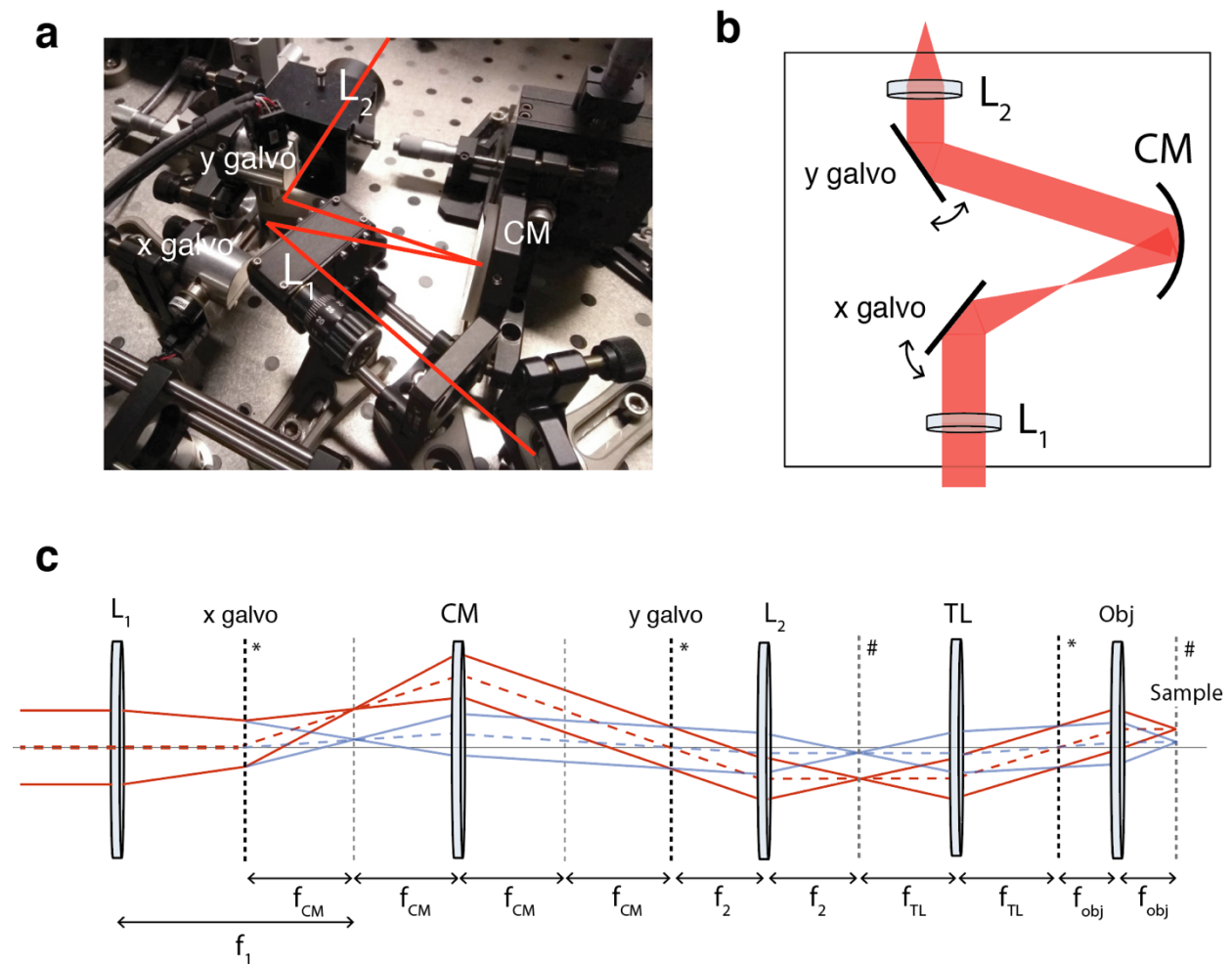


Figure 5.2 Optical raster scanning. (a) Picture of the optical elements forming the optical scanner. (b) 2D schematic representation. (c) 1D detailed representation of the positioning of each element. L_1 : achromatic doublet, $f = 100$ mm (Thorlabs), L_2 : aberration corrected scanning lens (Leica), $f = 200$ mm. CM: 2'' concave silver mirror (Thorlabs). x and y galvo: galvanometric mirrors (Cambridge Technology, Inc). Conjugated planes are marked with * and #.

It is easier to explain the design of the scanning system in a 1D scheme (Figure 5.2c) where the concave mirror is represented as a lens since it has an equivalent role in terms of focusing/collimating light. First, the collimated input beam (dark red lines) is focused by a lens (L_1) with focal length f_1 at the back focal plane of the concave mirror (CM) that has a focal length f_{CM} . The first galvo (x) is placed exactly at a distance $2f_{CM}$ before

the CM and the second galvo (y) is placed exactly at a distance $2f_{CM}$ after the CM . This way by following the imaging equation $1/f = 1/s_o + 1/s_i$, an image of the x galvo is formed onto the y galvo. On the other hand, the beam is collimated by the CM and is focused again by a second lens (L_2) placed at a distance f_2 from the y galvo. This way, two key factors are accomplished: i) the beam is completely stationary on the x galvo, and pivots (the angle of the beam varies but is stationary in position) on the y galvo ii) the focused beam is shifted in x and y without tilt at the focal plane of L_2 . Therefore, by placing the TL at a distance f_{TL} from the focal plane of L_2 the beam is moved only in angle at the back focal plane of the objective, allowing a pure lateral scanning without any tilt of the focused beam on the sample. A displaced beam is depicted in light blue to show how the movement is purely lateral, without tilt of the focused beam. TL and objective are not shown in Figures 5.2a and 5.2b.

The voltages required to drive the galvanometric mirrors are provided by a linear-regulated power supply (Peaktech 6060) controlled with a DAQ board (National Instruments PCIe-6353). The DAQ board is in turn interfaced via the specialized software Inspector¹⁵⁵. We emphasize that while we chose this software to control the DAQ board, any other custom-written or commercially available software for laser scanning microscopes could be used.

This optical scanner fulfills four important specifications: i) it is photon efficient: it was tested experimentally and the efficiency of the optical system allows the detection of single molecules at high SNR, ii) the optical planes of the galvanometric mirror are stationary with respect to the scanning by design, iii) optical aberrations are minimized by the use of a reflective focusing surface together with specialized high quality lenses and relatively small deflection angles, iv) it is compact and robust: its overall size is approximately $20 \times 20 \text{ cm}^2$ and its alignment is very stable for months and up to years. Specifications i-iii) were tested in a field of view of at least $100 \times 100 \text{ }\mu\text{m}^2$ and scanning speeds up to $1 \text{ nm}/\mu\text{s}$ without any evident distortion in the image.

5.1.2 Excitation beam phase modulation

The excitation light source of the fluorescence microscope is a 640 nm laser diode (PicoQuant LDH-P-C-640B). The laser is fiber-coupled to a monomode fiber to obtain a TEM₀₀ beam profile. In order to transform the confocal scanning microscope into a RASTMIN system, the phase front of the excitation beam was modulated with a $0 - 2\pi$ vortex phase plate (VPP, V-633-10, Vortex Photonics) in order to obtain a toroidal focus with a central zero of intensity, here called a doughnut-shaped focus. Fine alignment in position (matching of the VPP center to the optical axis) and tilt (VPP perpendicular to the beam propagation direction) are critical to obtain a doughnut-shaped focus rotationally symmetric and with a central minimum of near zero intensity. Also, the polarization of the excitation beam must be circular and of the same hand as the VPP. Therefore, The VPP was mounted on a stage with adjustable lateral position (x, y) and tilt (θ, φ) with micrometric precision. Polarization was controlled with $\lambda/2$ and $\lambda/4$ plates (WPH05M-633 and WPQ05M-633, Thorlabs Inc.) in order to achieve circular polarization. The polarization state was verified at the back focal plane of the objective with the following procedure: i) the sample holder and the objective were removed, ii) an auxiliary tool consisting of a linear polarizer mounted in a rotating motor was placed instead of the objective, iii) the light passing the polarizer is detected with a standard photodiode. The signal of the photodiode is acquired with either a custom-made program or an oscilloscope. The acquired signal is typically proportional to $\sim \sin^2 \omega t$ according to Malus law, the smallest the difference between the maxima and the minima of this signal the closer the polarization is to being circular.

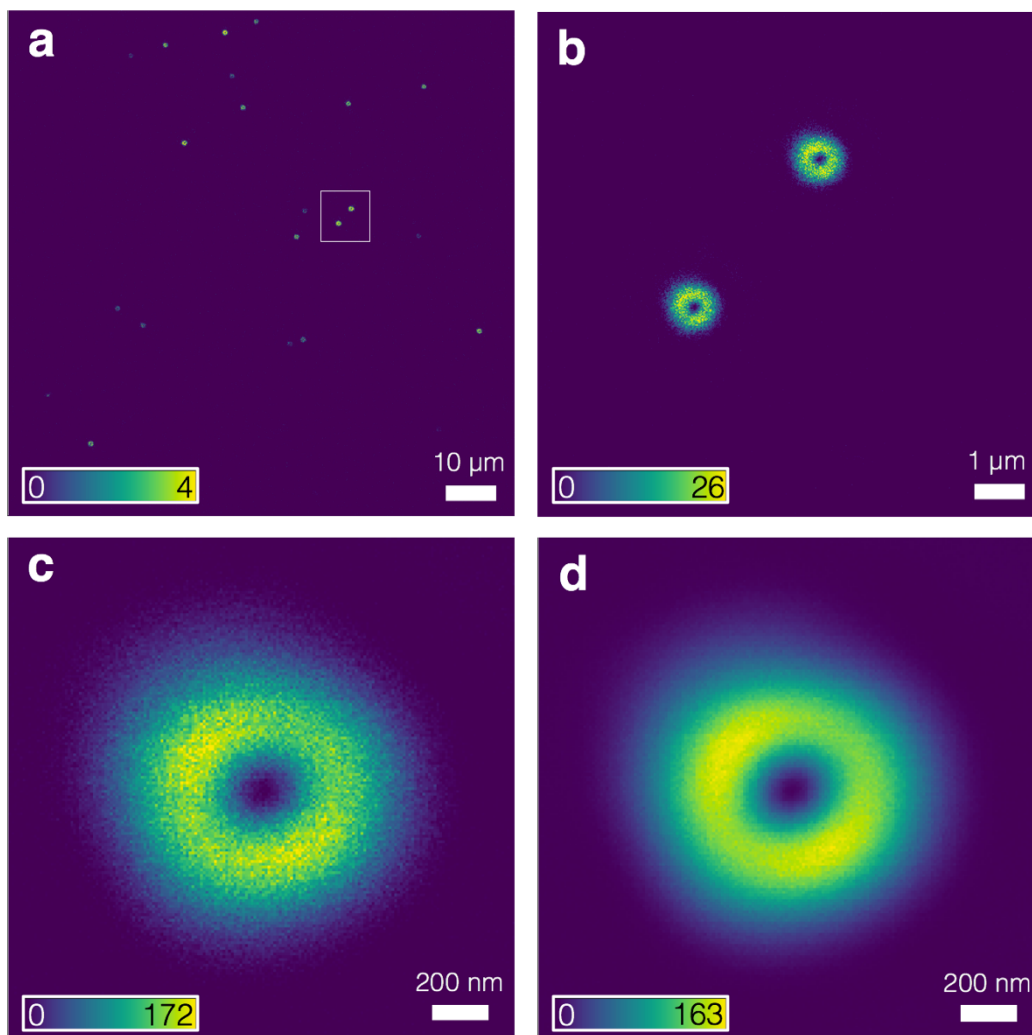


Figure 5.3 Optical raster scanning. Typical doughnut-shaped focus of the RASTMIN microscope. Fluorescent NPs with a diameter of 40 nm are used as approximate point sources to measure the *PSF* of the system. **(a)** Overview of the sample and the typical surface density used. We typically have 10-20 NP in a $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ field of view. **(b)** Smaller scan ($100 \times 100 \mu\text{m}^2$) of the area marked in **(a)**. **(c)** Scan over only one NP, thus considered a measurement of the *PSF* of the system. **(d)** High SNR measurement of the *PSF*, in this case 16 images as the one shown in **(c)** where acquired and averaged. Pixel size: **(a)** 67 nm, **(b)** 20 nm, **(c)** and **(d)** 10 nm.

To evaluate the generated doughnut-shaped focus, images of individual small fluorescent beads were acquired and analyzed. Figure 3a shows a $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ image of single fluorescent nanoparticles (40 nm Dark Red Microspheres, Thermofisher). A smaller scan

of the region marked in Figure 3a (white square) is shown in Figure 3b, where two, well-separated NPs are imaged. The intensities and shapes are similar, confirming that the signals correspond to single NPs (not aggregates of particles). Figure 3c is a scan over only one NP. In Figure 3d a high-SNR measurement of the doughnut-shaped focus is displayed, which was obtained by averaging the signal of 16 frames such as the one in Figure 3c. Such a high-SNR measurement can also be used as an input for the estimation of the position of the emitter.

Key for RASTMIN is the quality of the central minimum of intensity, which was evaluated by computing an effective contrast defined as $C = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min})$, where I_{min} is the intensity at the center of the focus and I_{max} is the maximum intensity reached at the periphery. For our purposes, we found that $C > 95\%$ was sufficient. At this point, it should be taken into account that due to the finite size of the fluorescent nanoparticle used to probe the focus it is impossible to measure zero intensity in the center, even if the actual light intensity is zero.

In general, the quality of the focus will also be limited by the aberrations of the optical elements used. Empirically, we found that residual aberrations in the doughnut-shaped focus can be avoided by slightly decreasing the effective NA of the excitation beam. This is done experimentally by simply placing an aperture in the path such that it reduces the effective beam size. For our RASTMIN experiments, an effective excitation with $NA = 1.2 - 1.3$ was used.

We note that, alternatively to the VPP, a spatial light modulator (SLM) could be used to provide the necessary phase modulation. In this case, the SLM could also be used to correct aberration and easily switch between Gaussian and doughnut-shaped illumination.

5.1.3 Influence of mechanical drift on localization precision

All microscopes suffer from thermo-mechanical instabilities. The most critical one is the relative displacement of the sample with respect to the objective lens. A well-built microscope presents sample-objective positional drifts of a few tens of nanometers per minute. While this level of drift is insignificant for most diffraction-limited imaging applications, it becomes critical for methods attempting to reach the sub-10 nm regime, such as RASTMIN.

While long-time scale drift can be corrected in camera-based SMLM techniques by introducing fiducial markers into the sample and performing a post-acquisition correction, this approach is insufficient to reach sub-10 nm localization precision and is not compatible with SML-SSI methods, where the sample has to stay still in order to keep the target structure within the field of view delimited by the illumination pattern, which is in the range of 50 – 150 nm. Considering that the precision of the method decreases drastically outside of this region, an active drift-correction has to be performed in order to achieve nanometer resolution. Moreover, even though a post-acquisition correction is possible in SMLM techniques, this procedure can introduce an additional uncertainty to the localization precision. In particular, significant drift can take place within the duration of a camera frame when using long frame durations, for example in DNA-PAINT measurements, as studied by K. Gaus group¹⁵⁶.

The final localization precision achieved will be dictated by the independent uncertainty contributions corresponding to the localization without drift (given by the MLE) and the drift. If long-time scale drift is neglected and mechanical instability is considered as pure Gaussian noise with σ_{drift} centered around the ideal position of the sample, then the following approximation can be made:

$$\sigma_{tot} \approx \sqrt{\sigma_{loc}^2 + \sigma_{drift}^2} \quad (5.1)$$

Where σ_{loc} is the parameter of the expected Gaussian distribution of localizations given by any of the single-molecule localization methods. Using the approximation in eq. (5.1) the influence of σ_{drift} on the overall performance of the system can be evaluated. Figure 5.3 shows a graph of $\sigma_{drift}/\sigma_{loc}$ vs $\sigma_{tot}/\sigma_{loc}$ which lets us estimate the boundaries of three regions: i) for $\sigma_{drift} < 0.4 \sigma_{loc}$ the drift contribution to the uncertainty becomes less than 10% of the total uncertainty, ii) for $0.4 \sigma_{loc} < \sigma_{drift} < 2.0 \sigma_{loc}$ both drift and localization precision contribute comparably to the total uncertainty and should be carefully analyzed, iii) for $\sigma_{drift} > 2.0 \sigma_{loc}$ drift contributes to more than 90% of the uncertainty, becoming the dominant effect.

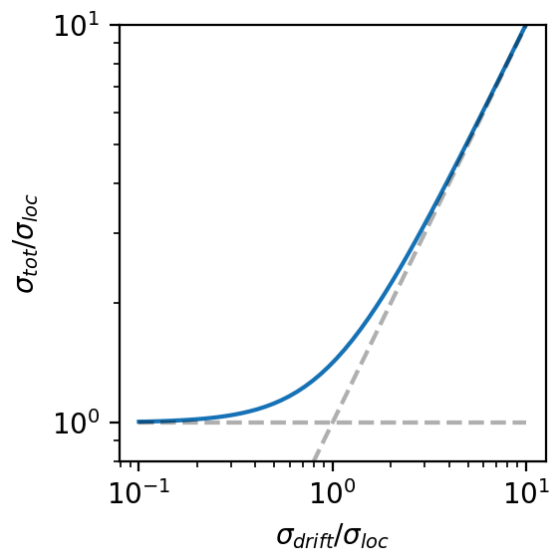


Figure 5.3 Influence of σ_{drift} on the total precision of the measurement. The graph shows $\sigma_{tot}/\sigma_{loc}$ (blue line) plotted vs $\sigma_{drift}/\sigma_{loc}$. Grey dotted lines are the asymptotic values for $\sigma_{drift}/\sigma_{loc} \ll 1$ and $\sigma_{drift}/\sigma_{loc} \gg 1$

5.1.4 Stabilization system

In order to implement RASTMIN, we complemented the microscope with an active xyz stabilization system that provides a stabilization better than 2 nm in xy ($\sigma_{drift\ x}$, $\sigma_{drift\ y}$) and better than 3 nm in z ($\sigma_{drift\ z}$).

Figure 5.4 shows schematically how the stabilization system can be added into a confocal microscope by combining the excitation/fluorescence light (642 nm/670-730 nm) with IR (775 nm laser, One Five Katana HP) light through a dichroic mirror (DM, T750SPXRXT-UF1). The IR stabilization system can be divided into an excitation branch (Figure 5.4a) and a detection branch (Figure 5.4b). Both branches are divided by a 50:50 non polarizing beam-splitter (BS_3).

Excitation

The IR light is coupled into a monomode fiber that provides a TEM00 beam profile and is collimated by a fiber collimator (60FC, Schäfter & Kirchhoff GmbH). It is then split into two paths by a beam splitter (BS_1). The upper path is used for stabilization in the axial direction (z). A lens (L_1) is matched with the tube lens (TL) of the microscope in a $4f$ system. This way the beam is focused on the sample by the objective. This beam is on purpose aligned with a tilt such that the z position of the sample can be inferred from the displacement of the image of the reflected beam on a sCMOS camera.

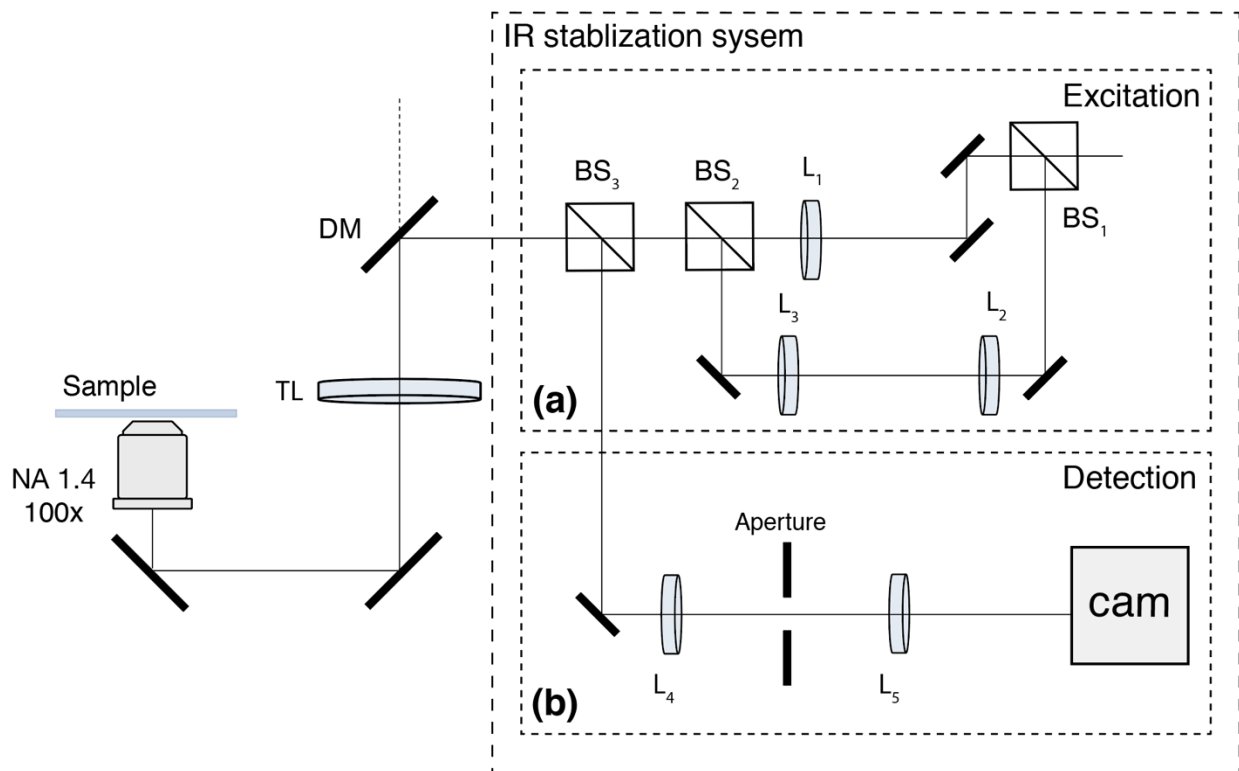


Figure 5.4. Stabilization system – hardware. (a) Infrared (775 nm) illumination path. Upper part: beam for z position sensing. Lower part: wide-field, TIR illumination for xy fiducial localization of AuNPs. (b) Common part with the confocal microscope. The beam for z position sensing is focused and reflected on the sample, the beam for TIR illumination is focused on the back focal plane (BFP) of the objective. (c) Detection path. An aperture is placed at a conjugated plane of the BFP. The aperture blocks the reflected light from the TIR illumination, constituting an effective dark field microscope. Both the z position beam and the light scattered by the AuNPs are focused on the camera.

The lower path of the excitation is a wide-field illumination used to stabilize laterally (xy) by following the displacement of the image of scattering fiducial markers (usually gold nanoparticles). A telescope formed by L_2 and L_3 expands the beam which is focused on the back focal plane (BFP) of the objective by the TL. Since the signal used is scattering, it is important to separate geometrically the signal from the markers from the illumination. For this purpose, the illumination is aligned such that the beam is focused at the outer part of the BFP, as it is done in TIRF microscopy. This way the light will

be reflected with an angle and, when focused again will appear as a spot out of the optical axis where it can be blocked by suitable mask or aperture.

Both excitation paths are combined by BS_2 . A third beam splitter (BS_3) is used to separate excitation light from scattered/reflected light, which is the signal that will be detected on the camera.

Detection

The system formed by the objective and the TL form an intermediate image of the scattering markers between BS_3 and L_4 . On the other hand, the $4f$ system formed by the TL and L_4 creates an image of the BFP where an aperture is placed. This aperture can be closed to block the reflected wide field illumination light that is focused off-axis by L_4 . The light scattered by the fiducial markers is collimated at the aperture and has low angle components and hence its signal only partially blocked by the aperture. At the expense of a slight loss in image resolution (because of blocking high angular components of the scattered light) the SBR is increased dramatically as all reflected light is blocked.

After the aperture another relay lens, L_5 , creates an image of the fiducial scatterers on an 8-bit sCMOS camera (ThorCam DCC1240C, Thorlabs Inc.). On the other hand, the beam used to track the z position was focused on the sample and the system comprised by $Objective - TL - L_4 - L_5$ forms an image of the tilted focus spot on the camera (Figure 5.5a red, dotted-line rectangle).

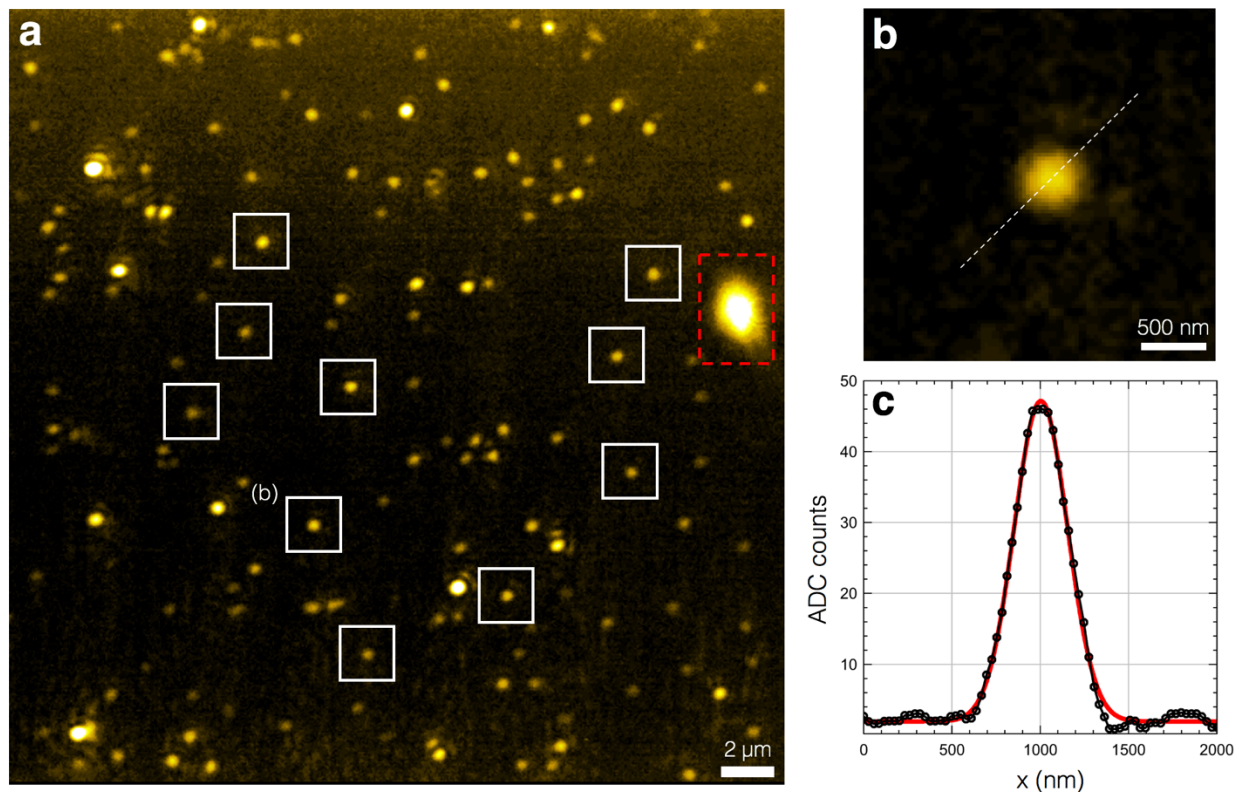


Figure 5.5 Stabilization – optical xyz fiducial tracking of the sample. (a) The IR path effectively forms a dark-field imaging system. Single AuNP (diameter 60 nm) are imaged with $SBR > 10$. Typically, around 10 well isolated AuNPs are selected as fiducial markers (white squares). Additionally, the reflected beam to sense the axial drift is selected (red rectangle). (b) Close-up image of the AuNP marked in (a). (c) 1D intensity profile (black dots) of (b) and fit with a Gaussian function (red line).

This way, the IR stabilization path becomes in practice a *dark-field* imaging system. An example of a dark-field image is shown on Figure 5.5. In Figure 5.5a both the image of the AuNPs (white squares) and the reflected laser beam (red, dotted rectangle) are shown. AuNPs present a symmetric Gaussian image with $SBR > 10$ (Figure 5.5b-c).

Thus, from a single acquired image both xy and z position of the sample relative to the optical system can be retrieved. The lateral positions of the fiducial scatterers deliver the xy position and the lateral position of the reflected beam provides the information about the axial position. Based on this information, the position of the sample is corrected

actively with a piezoelectric stage (NanoMax 311D/M with controller BPC303, Thorlabs Inc.).

Communication with the instruments used in the stabilization system (sCMOS camera and piezoelectric stage) is done digitally through Python drivers. All control is integrated in a custom-made Python software that provides a graphical user-interface (GUI) to monitor the stabilization and to interact with the measurements. The architecture of the software is divided into *backend* and *frontend* classes in order to keep a clean distinction between functions that communicate with hardware (backend) and the display of the data and the commands at the GUI (frontend). The control software is open-source and can be found at <https://github.com/lumasullo/pyflux>. Figure 5.6 shows a screen shot of the graphical user interface.

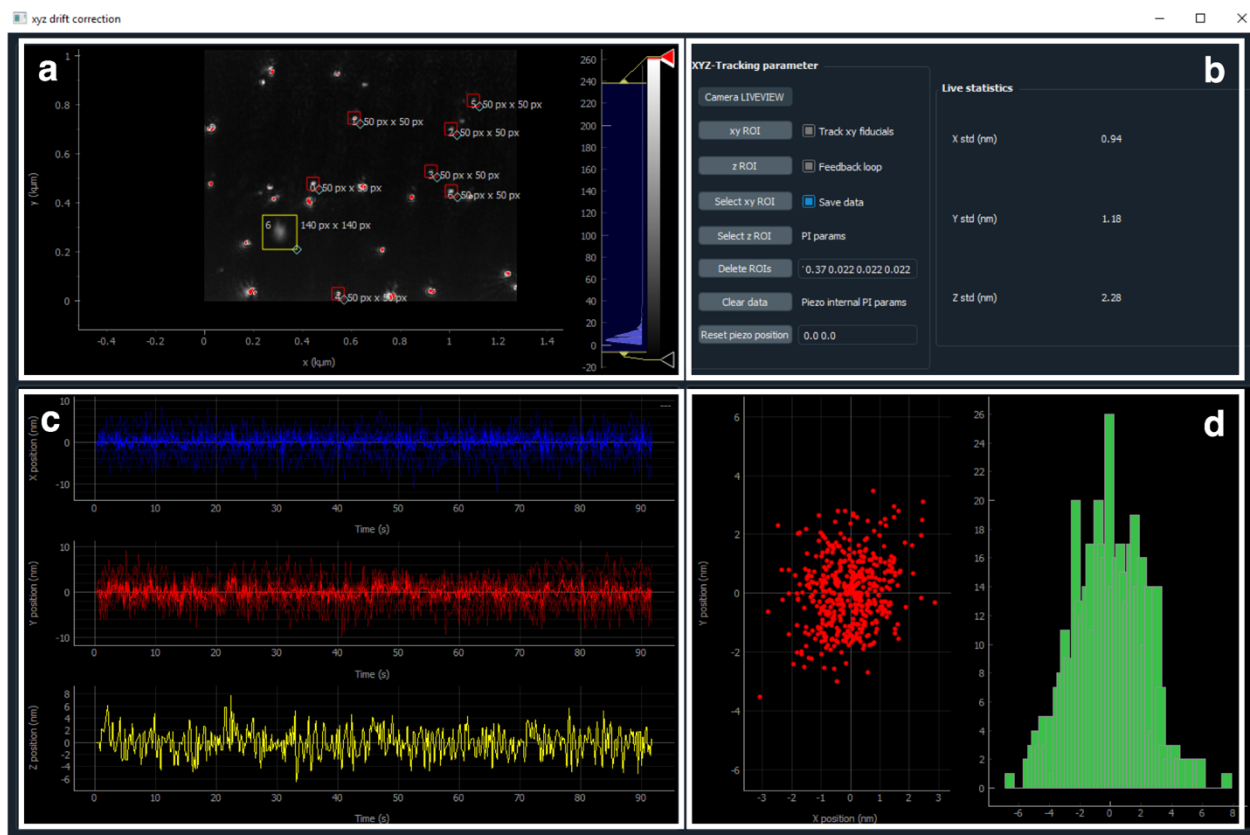


Figure 5.6 Stabilization – instrumentation and control. (a) Typically between 5 and 10 gold nanoparticles (AuNPs) are manually selected (red ROIs) and they are localized and tracked

continuously at a frame rate of ~ 20 Hz. The reflected IR beam used to track the z position of the sample is also selected (yellow ROI). By checking the signal intensity of the AuNPs, aggregates and individual 60-nm particles can be distinguished. AuNPs that have a signal far from saturation are selected. **(b)** Basic user-interface that allows to select the fiducial AuNPs, track them and control the PI feedback loop to actively stabilize the (x, y, z) position of the stage. PI parameters can be selected and manual fine tune is needed to optimize performance. Basic statistics on the position of the tracked AuNP and the reflected IR beam are computed to have a live readout of the performance of the stabilization system. **(c)** Position signals as a function of time for x , y and z . **(d)** 2D histogram for $x - y$ and 1D histogram for z . All graphs are updated continuously.

Images are acquired at frame rates between 10 and 30 Hz with 8-bit digital resolution. Single AuNP are manually selected (Figure 5.6a, red squares) and their position is monitored in real-time (frame by frame) by a Gaussian fit to their intensity distribution (Figures 5.6 b-d show an example). The IR focused beam is also selected manually identified (Figure 5.6a, yellow square) and its center of mass is tracked in real-time. Calibrations to translate lateral displacements in pixels into (x, y) and z displacements of the sample in nm are obtained by performing predefined movements with the piezo-stage and registering the displacement values in pixels.

To obtain a better drift correction, it is convenient to use many nanoparticles. The (x_i, y_i) array of estimated positions of the AuNP is then averaged and the (\bar{x}, \bar{y}) average position is used as a reference of the position of the sample with respect to the optical system. Live statistics on (\bar{x}, \bar{y}) are calculated and plots of $(x_i(t), y_i(t))$ and $(\bar{x}(t), \bar{y}(t))$ are displayed, as well as a 2D histogram for (x, y) and a 1D histogram for z . All the data is updated in real-time and can optionally be saved into *.txt* files.

If the *Feedback loop* option is checked by the user the system can enter in an active PI feedback loop where the setpoint is the (x, y) at the moment when the loop starts. The signal for the loop is the (\bar{x}, \bar{y}, z) measured position of the sample and the actuator is the piezoelectric stage. The parameters are accessible through the GUI and have to be fine-tuned by the user.

The performance of the stabilization system was characterized by evaluating the mean and standard deviation of the xyz positions in the closed-loop mode. We recorded time series on samples with immobilized AuNP (diameter 60 nm). In all cases we chose between 5 to 10 AuNPs to stabilize the system and carefully discarded saturated spots which are probably aggregates of NPs. The exact values of the stabilization precisions may vary slightly from one experiment to another and depend on fine-tuning of the PI parameters, but we can confidently say that the (x, y) stabilization achieved is between 1 nm and 2 nm (σ_{drift}) as best- and worst-case scenario, respectively. The stabilization achieved in z is also between 1 nm and 2 nm (σ_{drift}). Figure 5.7 shows typical time traces of x , y and z . The positions are normally distributed around the setpoint value and the stability is maintained over periods of time longer than 1 hour (data not shown).

It is interesting to note that these stabilization values are limited by the resolution of the piezoelectric stage rather than by the optical localization precision of the AuNPs. In fact, if the system is allowed to drift freely, the noise of the positional signal (\bar{x}, \bar{y}) is well below 1 nm.

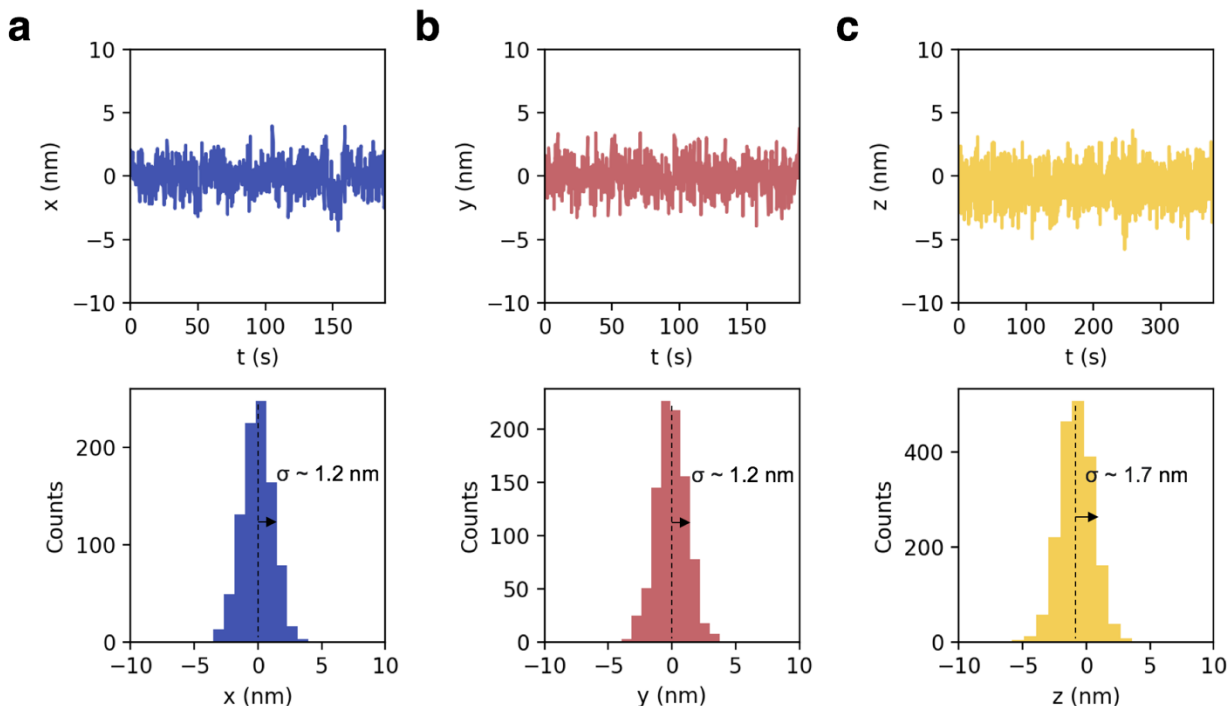


Figure 5.7 Stability results. (a) x position of the sample vs time. (b) y position of the sample vs time. (c) z position of the sample vs time. All positions are relative to the setpoint (initial measured position).

5.2 Simulations of RASTMIN localization and nanoscopy

In order to predict the expected precision and resolution of RASTMIN localization measurements, we performed extensive calculations and simulations. As a first approach, we complemented the studies of the σ_{CRB} presented in Chapter 3 by testing the method with different numbers of exposures. We found that no loss in precision is produced by using larger number of exposures (K). At first this result can appear counter intuitive since an increased number of exposures will results in a lower expected detected photons (λ_i) per exposure, reaching levels in which $\lambda_i \lesssim 1$ detected photon. However, we note that this regime only affects a measurement in which readout-noise is present. For a pure Poisson noise detection, there is no real disadvantage in choosing a larger number of exposures K . We then chose $K = 6 \times 6$ for our experiments as a good compromise taking into account the time it takes for the control software to read-out each acquired set of $\{n_i\}$ with $i \in [1, K]$.

A two-dimensional $\sigma_{CRB}(x, y)$ map is shown in Figure 5.8a for $L = 100$ nm, $N = 1000$ and $SBR = 5$. RASTMIN reaches precisions $\sigma_{CRB} \sim 1$ nm for the region of interest (red dotted line), namely defined by $FOV = 0.75 L$. We then performed Monte Carlo simulations to study computationally the actual performance of the MLE estimator under these conditions, the results are displayed in Figure 5.8b. The MLE is optimal, reaching the CRB in the region of interests (red dotted line) and is well-behaved even in the outer parts of the excitation pattern. Outside the area defined by the circle of diameter L the MLE does not reach the CRB for these parameters, resulting in $\sigma_{CRB} \approx 4$ nm and $\sigma_{MLE} \approx 5$ nm, a divergence of $\sim 25\%$.

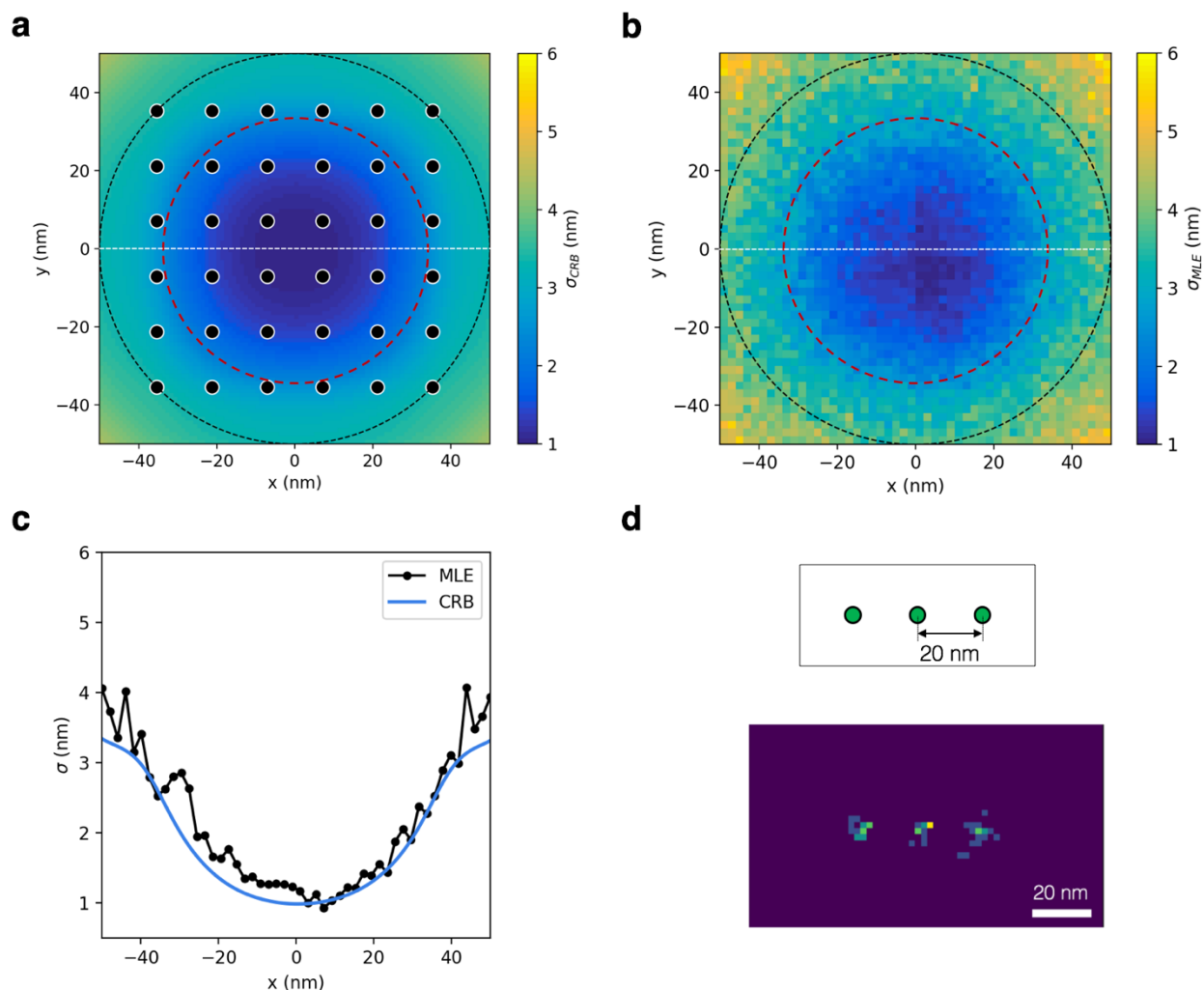


Figure 5.8 RASTMIN simulations. (a) Two-dimensional $\sigma_{CRB}(x, y)$ map. Black dots indicate the center of the beam r_i in the sequential exposures. (b) Two-dimensional map of the error (σ_{MLE}) of the MLE. Regions of diameter L and $0.75L$ are indicated (black and red dotted lines respectively) in (a) and (b). (c) One-dimensional profile of the white dotted line indicated in (a) and (b). (d) Simulation of a complete experiment involving fluorescence blinking kinetics.

Finally, to evaluate the performance of RASTMIN to localize blinking single-molecules, we modeled a realistic SMLM imaging experiment and evaluated it through Monte Carlo simulations. The simulation included: i) RASTMIN sequential illumination, ii) total detected photon number N statistics following an exponential distribution $N \sim \text{Exp}(\Lambda)$ with Λ the expected value. This statistic is shown to be a good description of single-

molecule ON/OFF blinking^{151,157}, iii) number of ON-state detected events (M) also following an exponential distribution^{151,157}, iv) a set of emitters separated at predefined distances (d) such as it would be the case in a DNA-origami structure, v) uncertainty introduced by limited stabilization precision (σ_{drift}). Results for a simulated array of 3 molecules spaced by $d = 20$ nm are displayed in Figure 5.8. Simulation parameters were $L = 100$ nm, $K = 6 \times 6$, $SBR = 5$, $\Lambda = 1000$, $M = 20$ and $\sigma_{drift} = 1.0$ nm. The three localization distributions present standard deviations smaller than 2 nm, fully resolving the distance of 20 nm.

5.3 RASTMIN precision evaluation with fluorescent NPs

To evaluate experimentally the precision of RASTMIN we performed the following measurement:

- i) A fluorescent NP (40 nm Dark Red Microspheres, Thermofisher) was localized repeatedly 1000 times. The complete measurement took ~ 200 s. The protocol for the preparation of the sample can be found in Section 5.3.1
- ii) The laser power was changed and the experiment described in i) was repeated to obtain another 1000 localizations at different values of N mean detected photons,
- iii) The procedure of i-ii) was repeated for different fluorescent NPs.

We divided the data into subsets i of 50 localizations and then used equation (4.1) to estimate the localization precision in each subset (σ_i). The precision is then estimated as the mean($\{\sigma_i\}$) \pm std($\{\sigma_i\}$) of the precisions of the subsets of localizations. The measured precisions as a function of N (mean photons detected) are plotted in Figure 5.9a and representative 2D histograms of the localizations are shown in Figure 5.9b. The RASTMIN parameters were $L = 100$ nm, $K = 6 \times 6$ exposures and the signal-to-background ratio in the experiment was $SBR = 20$. For $N = 300 - 2500$ achieves

localization precisions of $\sigma = 1.2 - 2.6$ nm, similar to the ones reported in MINFLUX and p-MINFLUX.

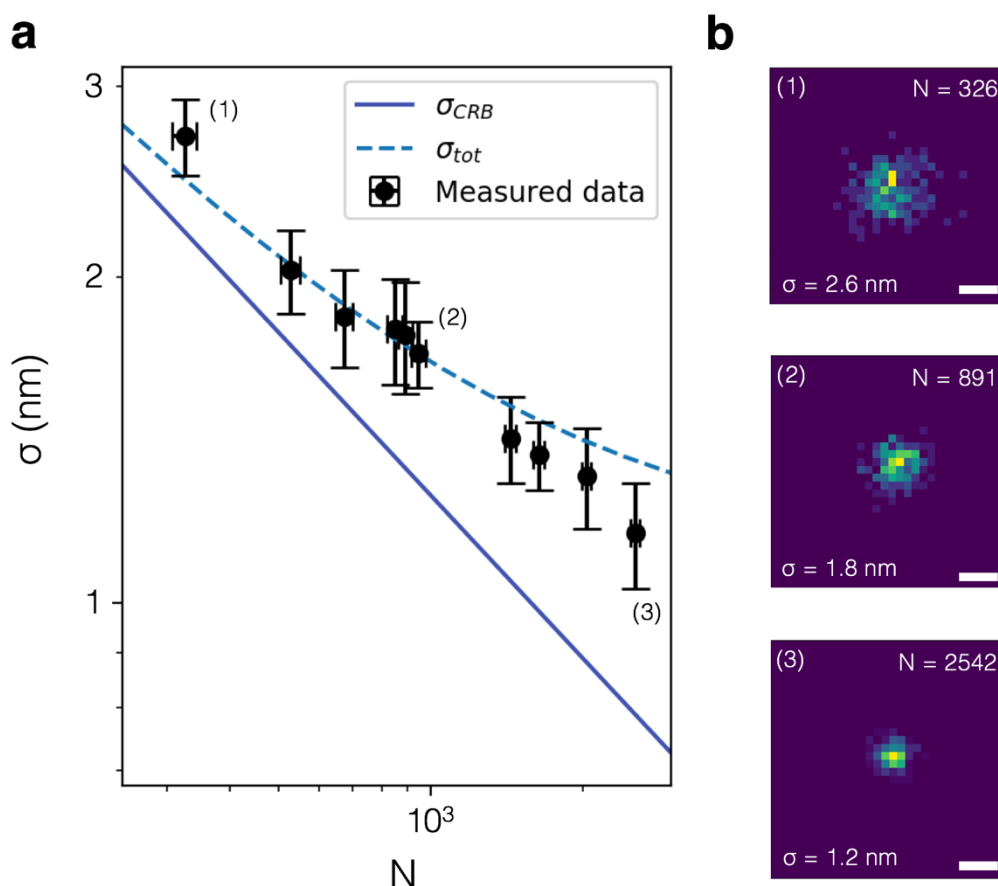


Figure 5.9 RASTMIN precision evaluation with fluorescent NPs. (a) Measured precision vs N (mean detected photons). Experimental data (black dots) is compared to the theoretical maximum precision, σ_{CRB} (blue, solid line) and to the expected precision taking into account the stabilization precision σ_{tot} (blue, dotted line). (b) Examples of 2D histograms of the localizations for data points (1-3) in (a). Scale bar: 5 nm.

The data is compared to the theoretical maximum precision achievable σ_{CRB} (Figure 5.9a, blue, solid) and a discrepancy with the measured precision is observed. This difference can be explained if the stabilization precision of the system is taken into account according to equation (5.1). σ_{tot} for $\sigma_{drif} = 1.1$ nm is plotted in Figure 5.9a (blue, dotted). Our

results let us conclude two important facts. First, RASTMIN experimentally achieves precisions in the range of 1 – 2 nm for $N = 500 - 2000$. Second, the ultimate limit to reach 1-nm precision will be the mechanical stability of the system which in our case becomes the bottleneck in terms of performance.

5.3.1 Fluorescent NP sample preparation

To prepare the sample containing the immobilized fluorescent NPs and the AuNPs we used the following protocol:

1. Make $1:10^3$ aliquote and sonicate for 10 min
2. Incubate Labtek® glass chamber 10 min in KOH
3. Clean 3x with PBS/MQ
4. Incubate 15 min with PDDA solution (0.5M NaCl, 1:200 dilution of PDDA 409030, Sigma Aldrich)
5. Clean 3x with PBS/MQ
6. Incubate 15 min with desired fluorescent NP (dilute in MQ at $5:10^6$ concentration for sparse surface density)
7. Clean 3x with PBS/MQ
8. Incubate 10 min with 2 pM AuNP solution (spherical NPs, 60 nm diameter)
9. Clean 3x with PBS/MQ

5.4 RASTMIN nanoscopy on DNA-origami samples

We applied RASTMIN to image a DNA-origami structure containing fluorophores arranged in a rectangular pattern as displayed in Figure 5.11a. The fluorophores were Alexa Fluor 647 which are red emitting dyes, suitable for single-molecule localization due to their ON/OFF stochastic switching behavior in a reducing buffer^{5,43}. Details on sample preparation are described in Sections 5.4.1 and 5.4.2.

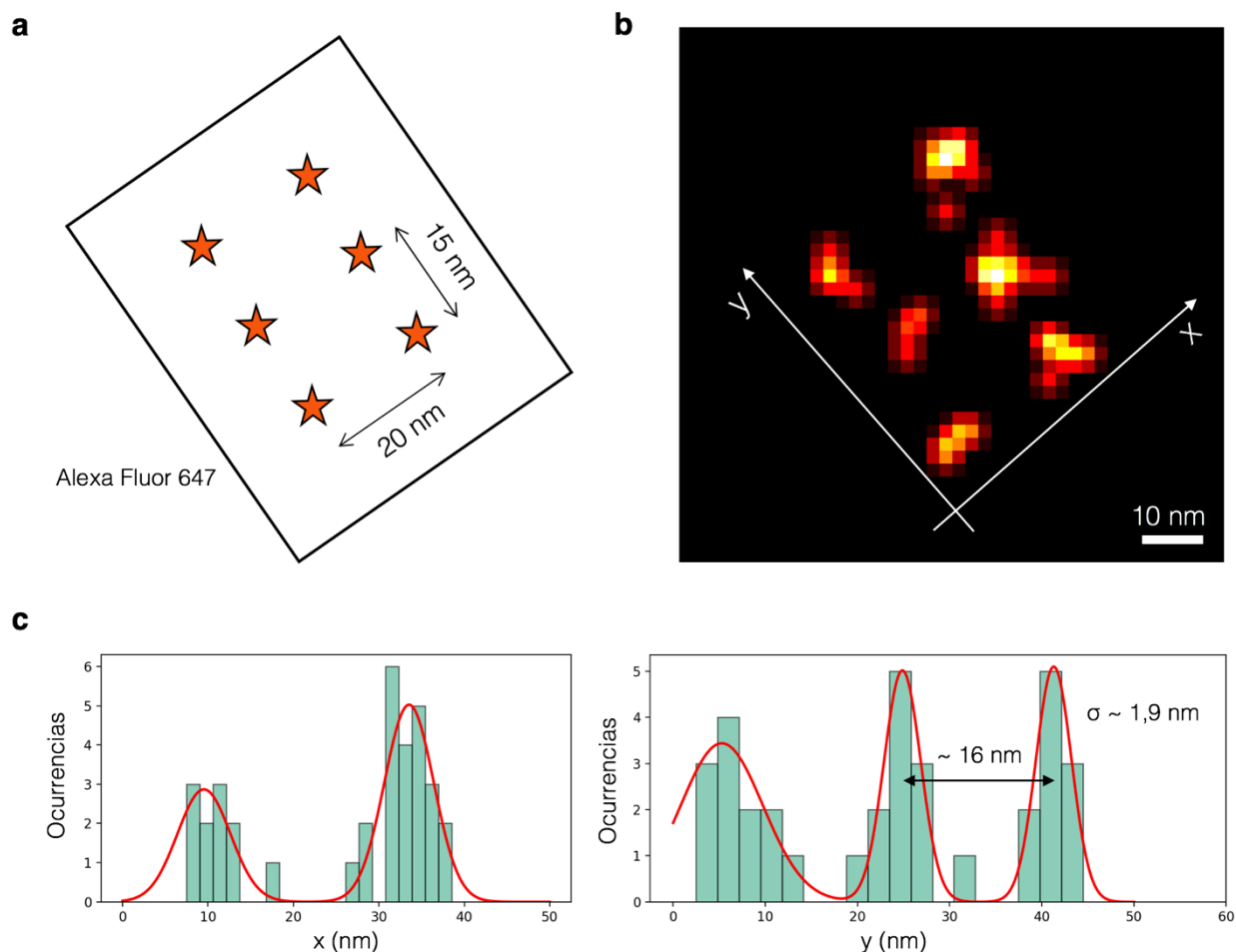


Figure 5.11 RASTMIN nanoscopy on DNA-origami structure. (a) Sketch of the DNA-origami structure used to organize Alexa Fluor 647 molecules with separation distances of 15 nm and 20 nm. (b) An example image of a DNA-origami as depicted in (a) obtained by RASTMIN.

The image is reconstructed by computing an average shifted histogram of all localizations¹⁵⁸. Bin size: 2 nm, shifts: 2 (c) 1D histograms of the localizations projected on the axis x and y of (b).

The measurement was performed in a very similar procedure as described in Chapter 4, Section 4.9. A single DNA-origami structure is located in the confocal, low-power (1-5 μW at the BFP), diffraction limited image. Then the excitation power was raised (60 μW at the BFP) to induce the ON/OFF photoswitching. A sequence of RASTMIN frames were recorded, each frame is recorded in ~ 20 ms, the total measurement time was ~ 6 min.

The ON-state events were discerned with an intensity threshold from the fluorescence trace of the measurement. The threshold is set at two standard deviations of the background's noise from the background mean, this way the number of false positives is almost zero at the cost of some false negatives. ON-state events with less than $N = 400$ photons detected or with less than three consecutive ON frames were discarded. The initial and the final frame of the event were discarded as they will likely be an incomplete RASTMIN measurement and thus provide a false localization. The signals from the valid ON-state events were analyzed with the MLE approach described in Chapter 3 and each localization was saved.

Subsequently, a super-resolved image was reconstructed by computing an average-shifted histogram of the localizations as displayed in Figure 5.11b. Figure 5.11c shows one-dimensional projections (x and y) of the data displayed in Figure 5.11b. The organization of the fluorophores in the DNA-origami can be fully resolved. We consider the standard deviation of the smallest distribution of localizations as a measure of the resolution of the method, that results in a precision of 2 nm.

These first nanoscopy experiments prove that RASTMIN is suitable for nanoscale imaging when combined with the appropriate blinking kinetics of the fluorescent dyes, providing localization precisions down to ~ 2 nm.

5.4.1 DNA-origami sample fabrication

Unmodified DNA sequences were purchased from Eurofins Genomics (Germany). In short, a scaffold consisting of a vector derived from the single-stranded M13-bacteriophage genome (M13mp18, 7249 bases) and staples (100 nM, ca. 32 nts) were mixed in a 1xTAE buffer (40 mM Tris, 10 mM Acetate, 1 mM EDTA, pH 8) containing 12 mM MgCl₂. The solution was heated to 75 C and ramped down to 25 C at a rate of 1 degree every 20 mins. The folded DNA origami structures were purified from excess staples strands by gel electrophoresis using a 0.8% agarose gel in a 1x TAE buffer/12 mM MgCl₂ buffer for 2.5 hours at 4 V/cm. The appropriate band containing the targeted DNA template was cut out and squeezed using cover slips wrapped in parafilm.

DNA-origamis with dimensions of 60 nm x 40 nm x 5 nm is formed with 6 Alexa Fluor 647 fluorophores attached in the positions shown in Figure 5.11a through the inclusion of modified staples functionalized with the fluorophore.

5.4.2 DNA-origami sample preparation

To prepare the sample containing the immobilized fluorescent NPs and the AuNPs we used the following protocol:

1. Incubate Labtek® glass chamber 10 min in KOH
2. Clean 3x with PBS/MQ
3. Incubate 15 min with BSA-biotin
4. Clean 3x with PBS/MQ
5. Incubate 15 min with neutrovidin

6. Clean 3x with PBS/MQ
7. Incubate 10 min with 2 pM AuNP solution (spherical NPs, 60 nm diameter)
8. Clean 5x with TAE12
9. Incubate DNA-origami at the desired concentration (typically 10-100 pM)
10. Right before imaging, put the “STORM” buffer: pH 8, 50 mM TRIS (Sigma Aldrich), 10 mM NaCl, 10% w/v D-glucose (Biopack), 10 mM mercaptoethylamine (Sigma Aldrich), 0.5 mg/mL glucose oxidase (Sigma Aldrich), and 40 ug/mL catalase (Sigma Aldrich).

5.5 Conclusions and outlook

The concept of RASTMIN was already presented and discussed theoretically in Chapter 3. Here, we have presented its first experimental realization confirming that it can deliver ~ 1 nm localization precision at moderate photon counts. This first experimental implementation of RASTMIN was done in a beam-scanning confocal microscope with a few necessary modifications, namely engineering a toroidal (doughnut-shaped) focus and including a high-performance stabilization system. It has been shown that the precision of the latter will become the ultimate limit to achieve resolutions in the 1 – 5 nm range.

An original, compact and cost-effective stabilization system has been described and its performance characterized. We show stabilization precisions of 1.2 nm ($\sigma_{drift\ x,y}$) for the lateral and 1.7 nm ($\sigma_{drift\ z}$) for the axial direction. The optical scanner and the doughnut-shaped focus of the microscope has also been fully characterized.

We have performed calculations and simulations of the RASTMIN localization precision and also full experiments which combine the single-molecule localizations with simulated photophysical dynamics. Our results serve as a guide to design future RASTMIN nanoscopy experiments.

We have shown the first experimental results on calibration samples. We evaluated the precision of RASTMIN on fluorescent nanoparticles, showing that $\sim 1 - 2$ nm precision can effectively be obtained experimentally at $N = 500 - 2000$ detected photon counts. The experimental results together with the simulations showed that the localization precision of our measurements was limited by the mechanical stability of the system, highlighting the importance of a high-performance stabilization system for all nanoscopy techniques that aim at sub-10 nm resolution, especially at the most demanding $1 - 3$ nm range.

Finally, we have shown the first results of RASTMIN nanoscale imaging on a DNA-origami nanostructures with fixed fluorescent molecules. We have demonstrated a precision of ~ 2 nm and the localization of the molecules are in good agreement with the design parameters of the DNA nanostructure. Further experiments on DNA-origami nanostructures and biological samples are being conducted to develop protocols of application of this approach to biological imaging.

RASTMIN can achieve localization precisions as high or even higher than MINFLUX. Experimentally, MINFLUX original⁵⁹ and commercial⁶⁷ implementations use i) electro-optical deflectors coupled to a subsequent galvanometric scanner and a very specialized scanning routine ii) FPGA-based real-time specialized electronics to control the measurements iii) closed-source software to both control the hardware and to analyze the data. Also, OT methods, including SMCT, have been implemented in specialized custom-made setups built by optics experts. While p-MINFLUX (Chapter 4) considerably simplifies the 1-nm precision measurements, we note that in order to build such a setup specialized hardware and expertise is needed, especially in the field of confocal TCSPC.

In contrast, RASTMIN needs only: i) a standard optical raster scan that can be implemented in many already available laser-scanning confocal systems, ii) a standard DAC acquisition board and open-source software (see Chapter 3) to analyze the data, iii) a stabilization system that achieves a precision better than the expected localization precision (requirement common to all SML-SSI techniques). Therefore, we believe that RASTMIN has a strong potential to be implemented in many confocal systems, making

1-nm scale resolution available to a much broader community and finally applicable to a wide range of biological questions.

Chapter 6 – General conclusions and perspectives

The main goal of the work developed in this Doctoral Thesis was to expand the frontiers of optical nanoscopy in terms of spatiotemporal resolution. In Chapter 1 the fundamental concepts of fluorescence microscopy and nanoscopy were reviewed and the state-of-the-art of super resolution methods was summarized. During the development of this work, new methods emerged that reach the 1 – 10 nm resolution scale. The different strategies were reviewed with particular attention paid to techniques based on single-molecule localization using structured illumination, such as MINFLUX and related methods..

In Chapter 2, a new parallelized RESOLFT implementation featuring confocality and thus enhanced sensitivity was presented. The so called MoNaLISA method, delivers the best reported combination of field of view and spatiotemporal resolution in live-cell microscopy at the time of writing this thesis: 50 nm lateral resolution and 1 s acquisition times for whole cell imaging. Following its publication in 2018, further improvements and applications have been developed including 3D sub-100 nm resolution extension, combination with red rsFP and biological studies in neuronal activity. Further improvements such as multicolor recordings, larger fields of view ($> 200 \times 200 \mu\text{m}^2$) and combinations with single-molecule methods are currently under investigation.

In Chapter 3, we demonstrate that most of the recently reported techniques achieving 1 – 10 nm resolution (except for DNA-PAINT) can be considered particular expressions of a common concept of single-molecule localization using sequential structured illumination (SML-SSI). At first sight, due to the differences in the structure of the excitation light, instrumentation, measurement protocols, and data analysis methods, each of these methods may appear unique. However, their profound similarities become clear with the conceptual and mathematical framework presented in Chapter 3, which

also enables a fair benchmarking between methods. Furthermore, we identified new single-molecule localization methods that bring together the strengths of the available techniques. We believe that such a common framework will help the community to design better, optimized SML-SSI methods. Moreover, since the approach is formulated in terms of the well-established Maximum Likelihood Estimation theory, it should be easy to extend it or adapt it to be applied in other scientific questions that might look distant but actually use very similar mathematical approaches. For example, image deconvolution or machine-learning based approaches could be implemented on SML-SSI by re-engineering the likelihood function of the model.

In Chapter 4, a novel and simplified implementation of the MINFLUX localization concept was presented. Unlike the original implementation, p-MINFLUX uses interleaved laser pulses to deliver the doughnut-shaped excitation foci at a maximum repetition rate thus generating an effective nanosecond-scale scan of the light minima. We demonstrated its performance for single-molecule localization nanoscopy and tracking on DNA-origami nanostructures. Localization precision of 1 – 2 nm was achieved with 2000 – 1000 photon counts in both applications. In addition, p-MINFLUX provides access to the fluorescence lifetime. This information was applied to acquire multiplexed signals discerned by lifetime and to perform fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) a resolution of 3-4 nm (1-2 nm localization precision). At the time of writing this Thesis, this is the highest resolution achieved in super-resolution fluorescence lifetime imaging (FLIM), improving the resolution by more than one order of magnitude compared to previous works. All the instrumentation and data analysis needed for p-MINFLUX was coded in Python and is available in an open-source fashion. Because of this open-source approach, together with the reduced complexity of the setup, we envision that p-MINFLUX will be more easily adopted and reproduced in other laboratories.

p-MINFLUX constitutes a new analytical tool that combines molecular-scale spatial resolution with time-resolved lifetime measurements, which may be of use not only for ultra-precise single-molecule localization and nanoscopy, but also for new single-molecule energy transfer measurements such as FRET, metal or graphene induced energy transfer.

Moreover p-MINFLUX is unique among single-molecule localization methods because it can reach the absolute time resolution limit posed by the emission rate of the emitter. Apart from applications in ultrafast tracking of fluorescent molecules, we believe that p-MINFLUX can become the method of choice to track small ($\sim 10 - 20$ nm) metallic or fluorescent nanoparticles. Metallic NP are particularly interesting since their photoluminescence presents very high emission rates and very short lifetimes, thus allowing to optimize the speed of p-MINFLUX up to the limit posed by the technology of the single-photon detectors.

Chapter 5 presents the first experimental implementation of RASTMIN, a SML-SSI method theoretically proposed in Chapter 3. The localization precision evaluation using fluorescent nanoparticles show that RASTMIN can deliver $1 - 2$ nm precision with $N = 500 - 2000$ detected photon counts. Finally, we have shown the first results of RASTMIN nanoscale imaging on a DNA-origami nanostructures with fixed fluorescent molecules. We have demonstrated a precision of ~ 2 nm and the localization of the molecules are in good agreement with the design parameters of the DNA nanostructure. Further experiments on DNA-origami nanostructures and biological samples are being conducted to develop protocols of application of this approach to biological imaging.

RASTMIN was implemented in a beam-scanning confocal microscope with a few modifications, namely engineering a toroidal (doughnut-shaped) focus and include a high-performance stabilization system. Due to its relative simplicity, we believe that RASTMIN has a strong potential to be implemented in many confocal systems, making 1-nm scale resolution available to a much broader community and finally applicable to a wide range of biological questions.

A combination of a robust SML-SSI method such as RASTMIN together with a parallelized RESOLFT approach such as MoNaLISA could be implemented by using a multifocal activation combined with a multi-doughnut raster-scanned excitation. This way, single-molecule blinking can be generated and the emitter localized in a highly parallelized RASTMIN measurement. Such an approach, in a synergy with fast-switching

rsFP, could be a strong candidate for live-cell nanoscopy at spatiotemporal resolutions of 1 – 10 nm and ~ 1 s in whole-cell sized *FOVs*.

Finally, in this Doctoral Thesis both experimental and theoretical tools to advance the current limits of optical fluorescence nanoscopy have been developed. The focus was set on simpler designs without sacrificing performance and open-source implementations, with the aim of facilitating a wider dissemination of fluorescence nanoscopy with molecular resolution. We hope that the concepts and experimental methods presented in this Thesis will be adopted by many researchers and laboratories, and will serve as a trigger for new ideas and discoveries.

Acknowledgements

Primeramente, estoy muy agradecido de haber recibido una educación pública, gratuita y de excelencia. Renuevo mi compromiso de defenderla y contribuir desde todos los lugares que pueda.

Durante el Doctorado tuve la oportunidad de cursar la materia de Métodos Estadísticos, dictada por Ricardo Piegai y Darío Rodrigues Ferreira Maltez. Este curso impactó en mi manera de ver los problemas científicos y me aportó herramientas decisivas para poder llevar a cabo la investigación de esta Tesis.

Ilaria no sólo me enseñó una infinidad de conceptos de óptica, fotofísica y súper resolución, me enseñó cómo se trabaja con pasión, tenacidad y sobre todo disfrutando del increíble trabajo que es hacer ciencia. Me mostró, a través del ejemplo, cómo es un ambiente científico de excelencia con calidad humana, empatía y compañerismo. Ilaria confió en mí, me dio la libertad y el apoyo que me permitieron aprender tanto.

La ciencia se hace en equipo y así es como trabajé durante estos casi cinco años y medio.

En Estocolmo, Andreas, Fra y Gio, los *Monalisers*, fueron un equipo inmejorable, no sólo tuve el privilegio de trabajar y aprender con grandes científicos y científicas sino que también terminaron siendo grandes amigos y amigas.

Durante el Doctorado tuve la oportunidad de participar de la colaboración excelente con el grupo de Philip Tinnefeld. Fue un trabajo intenso, enriquecedor y fructífero con Florian, Jonas, Philip y el resto del grupo. Les agradezco por recibirme con tanta calidez.

Quiero agradecer también a quienes desinteresadamente me ayudaron de una o más maneras. Sin ellos este recorrido no hubiera sido posible. En particular quiero agradecer a Hernán Grecco por las charlas sobre instrumentación y control y a Andrew York por las charlas sobre deconvolución de imágenes y problemas inversos.

Fernando es definitivamente un gran director de Tesis. Me enseñó a hacer ciencia con profundidad, rigurosidad y espíritu crítico. De las discusiones de ideas, el laboratorio, las presentaciones, las reuniones, los análisis, la escritura de artículos y de esta Tesis me llevo infinidad de conocimientos y una formación de la cual estoy muy agradecido. Como director siempre me dio la libertad necesaria para desarrollar mis ideas y el apoyo constante para llevarlas a cabo, especialmente en los momentos más difíciles. Estoy muy agradecido por todo.

El grupo de Nanofísica Aplicada es un grupo de trabajo hermoso. Aprendí muchísimo de todos y todas, a nivel científico y humano. Con Fede di los primeros pasos, me enseñó muchísimo con paciencia y generosidad. Más adelante, Lu y Alan fueron y son compañeros de equipo increíbles con quienes aprendo, disfruto de hacer ciencia y también me divierto todos los días. Iani sintetizó las nanopartículas de oro que se usaron en esta Tesis, me enseñó química y me ayudó innumerables veces a interpretar resultados y a pensar alternativas cuando no sabía por dónde seguir. Juli es como un hermano mayor, siempre tirando la posta, de plasmónica, de fotoluminiscencia y de la vida. Chechu fue mi compañera de Doctorado desde el primer día, nos reímos, aprendimos y nos bancamos mutuamente, en las buenas y también en las malas. Marian es capaz de dejar todo por

dar una mano, con humildad y paciencia te explica todo lo que sabe, y sabe mucho. Con él aprendí sobre electrónica y conversores analógico/digitales. De enseñarle yo al principio algunas cosas, LPM se convirtió en la gurú de Python y terminé aprendiendo yo de ella. Santi es pura solidaridad, mi biólogo de referencia, se nota su espíritu docente para explicarle las cosas más básicas a un físico. Con todos y todas compartimos mates, churros, birras, asados, discusiones de ciencia, política científica y siempre, pero siempre estuvieron ahí para dar una mano con el tema que fuera, en cualquier momento. Con la nueva generación, Gonza, Flor C, Flor E, Romi, Vale, nos conocimos más que nada virtualmente, pero también siempre están para dar una mano y estoy seguro que los que se quedan van a mantener esta manera de trabajar fundada en la generosidad. A todos y todas, gracias por tanto.

Me tocó trabajar codo a codo con estudiantes de Master/Licenciatura. Tuve la suerte de trabajar con dos personas absolutamente brillantes como son Lars y Fer. Con Lars aprendimos juntos a pensar problemas experimentales y a estudiar óptica en verdadera profundidad. Con Fer nos adaptamos a este 2020-2021 que nos tocó vivir e hicimos un camino tan alternativo como interesante y enriquecedor.

Le agradezco a toda la comunidad del CIBION, a Pedro, a los becarios y becarias y también a la gente de limpieza y seguridad, entre todos y todas se genera un ambiente de trabajo excelente donde da gusto estar y que se extraña en estos momentos de pandemia y virtualidad.

Mis amigos y amigas de la Facu y de toda la vida fueron un apoyo constante. Fiore, Agus, Sol, Marto, Javi, Juan, Lu, Guido, Mati, Memi, Chacho, Stepó, son algunos de los que escucharon, me acompañaron, me aconsejaron.

No conozco alguien tan apasionado como Waso para charlar durante tardes y

noches enteras (birras mediante) de electromagnetismo, nanociencia, microscopios, sistemas eléctricos, política científica e internacional y viajes intergalácticos. Gracias por escuchar (y entender todo increíblemente rápido), por compartir la pasión por la ciencia, por estar siempre de principio a fin de este Doctorado.

Mi familia es siempre un pilar fundamental. Mi prima Vale, con la que compartimos la pasión por las ciencias naturales y la docencia, mis primos Ale, Julio, Julia, Mariano, mis sobrinos Martín, Delfi, Nachito. Mi tía Angelita, que va a estar siempre, mi tío Cacho, mi tía Lu. Mis tías Tatá y Marcela.

Mis abuelos Cocó y Lula son para mí un ejemplo de vida. Les agradezco con el alma su amor infinito.

Les agradezco por todo a Maxi y Ana, siempre escuchando, siempre bancando, siempre y en todo. Olivia y Matteo son los sobrinos más lindos del mundo, gracias por el cariño y por ser personas tan hermosas.

De papá y mamá surge mi pasión por el conocimiento, desde que tengo memoria. Los veo siempre reflejados en mí, en mis gestos, en mi trabajo, en todo. Estoy infinitamente agradecido. Los quiero muchísimo.

Vicky es la mejor compañera que existe. Del amor y de la vida. Gracias por estos años compartidos y por todo lo que se viene.

Publications derived from this Thesis

- 2021 **L. A. Masullo**, A. M. Szalai, L. F. López, M. Pilo-Pais, G. Acuña, F. D. Stefani
8 “Localization of single molecules with molecular-scale precision by raster scanning
a light minimum”
In preparation
- F. Caprile, **L. A. Masullo**, F. D. Stefani
7 “pyFocus - a Python package for vectorial calculations of focused optical fields
under realistic conditions. Application to toroidal foci.”
Submitted, under review
- L. A. Masullo**, A. M Szalai, L. F. López, F. D. Stefani
6 “Super-resolution fluorescence microscopy at sub-10 nm resolution (review)”
Submitted, under review
- L. A. Masullo**, L. F. López, F. D. Stefani
5 “A common mathematical framework for single-molecule localization using
sequential structured illumination”
Submitted, under review – preprint: arXiv:2109.01234
- 2020 **L. A. Masullo**, F. Steiner, J. Zähringer, L. F. Lopez, J. Bohlen, L. Richter, F.
Cole, P. Tinnefeld, F. D. Stefani
4 “Pulsed Interleaved MINFLUX”
Nano Letters **21**, 1, 840-846 (2020)
- 2018 **L. A. Masullo**, A. Bodén, F. Pennacchietti, G. Coceano, M. Ratz, I. Testa
3 “Enhanced photon collection enables four dimensional fluorescence nanoscopy of
living systems”
Nature Communications **9**, 3281 (2018)
- N. Unsain, M. D. Bordenave, S. Jalil, G. Martínez, C. von Binderling, F. M.
Barabas, **L. A. Masullo**, A. D. Johnstone, P. A. Barker, M. Bisbal, F. D. Stefani,
A. O. Cáceres
2 “Remodeling of the Actin/Spectrin Membrane-associated Periodic Skeleton,
Growth Cone Collapse and Decreased Filamentous Actin during Axonal
Degeneration”
Scientific Reports **8**, 3007 (2018)
- 2017 F. M. Barabas, **L. A. Masullo**, M. D. Bordenave, S. Giusti, N. Unsain, D. Refojo,
A. Cáceres, F. D. Stefani

- 1 "Automated quantification of protein periodic nanostructures in fluorescence nanoscopy images: abundance and regularity of neuronal spectrin membrane-associated skeleton"
Scientific Reports **7**, 16029 (2017)

References

- (1) Pawley, J. B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2006.
- (2) Lakowicz, J. R. *General Features of Protein Fluorescence*, 2006.
- (3) Atkins, P. *Physical Chemistry*, 11th ed.; 2017.
- (4) Bernard, J.; Fleury, L.; Talon, H.; Orrit, M. Photon Bunching in the Fluorescence from Single Molecules: A Probe for Intersystem Crossing. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (2), 850–859. <https://doi.org/10.1063/1.464249>.
- (5) Heilemann, M.; Margeat, E.; Kasper, R.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3801–3806. <https://doi.org/10.1021/ja044686x>.
- (6) Andresen, M.; Wahl, M. C.; Stiel, A. C.; Gräter, F.; Schäfer, L. V.; Trowitzsch, S.; Weber, G.; Eggeling, C.; Grubmüller, H.; Hell, S. W.; Jakobs, S. Structure and Mechanism of the Reversible Photoswitch of a Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (37), 13070–13074. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502772102>.
- (7) Minsky, M. Microscopy Apparatus. Google Patents December 19, 1961.
- (8) De Wilde, Y.; Lemoine, P. A. Review of NSOM Microscopy for Materials. *AIP Conf. Proc.* **2007**, *931* (September), 43–52. <https://doi.org/10.1063/1.2799414>.
- (9) Betzig, E.; Chichester, R. J.; Lanni, F.; Taylor, D. L. Near-field Fluorescence Imaging of Cytoskeletal Actin. *Bioimaging* **1993**, *1* (3), 129–135. [https://doi.org/10.1002/1361-6374\(199309\)1:3<129::AID-BIO1>3.3.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1361-6374(199309)1:3<129::AID-BIO1>3.3.CO;2-#).
- (10) Lewis, A.; Radko, A.; Ami, N. Ben; Palanker, D.; Lieberman, K. Near-Field Scanning Optical Microscopy in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* **1999**, *9* (2), 70–73. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01437-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01437-8).
- (11) Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science (80-)*. **1990**, *248* (4951), 73 LP – 76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>.
- (12) Tsien, R. Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67* (1), 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.
- (13) Harper, B. K.; Mabon, S. A.; Leffel, S. M.; Halfhill, M. D.; Richards, H. A.; Moyer, K. A.; Stewart, C. N. Green Fluorescent Protein as a Marker for Expression of a Second Gene in Transgenic Plants. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (11), 1125–1129. <https://doi.org/10.1038/15114>.
- (14) Moerner, W. E.; Kador, L. Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid. *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62* (21), 2535–2538.

- <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.2535>.
- (15) Orrit, M.; Bernard, J. Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a P-Terphenyl Crystal. *Phys. Rev. Lett.* **1990**, *65* (21), 2716–2719. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.65.2716>.
 - (16) Hell, S. W. Toward Fluorescence Nanoscopy. *Nat Biotech* **2003**, *21* (11), 1347–1355.
 - (17) Sahl, S. J.; Hell, S. W.; Jakobs, S. Fluorescence Nanoscopy in Cell Biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (11), 685–701. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.71>.
 - (18) Hell, S. W.; Wichmann, J. Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* **1994**, *19* (11), 780. <https://doi.org/10.1364/ol.19.000780>.
 - (19) Klar, T.; Hell, S. W. Subdiffraction Resolution in Far-Field Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* **1999**, *24* (14), 954–956.
 - (20) Bretschneider, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy by Optical Shelving. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98* (21), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.218103>.
 - (21) Heintzmann, R.; Jovin, T. M.; Cremer, C. Saturated Patterned Excitation Microscopy—a Concept for Optical Resolution Improvement. *J. Opt. Soc. Am. A* **2002**, *19* (8), 1599. <https://doi.org/10.1364/josaa.19.001599>.
 - (22) Gustafsson, M. G. L. Nonlinear Structured-Illumination Microscopy: Wide-Field Fluorescence Imaging with Theoretically Unlimited Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (37), 13081–13086. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406877102>.
 - (23) Winter, F. R.; Loidolt, M.; Westphal, V.; Butkevich, A. N.; Gregor, C.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. Multicolour Nanoscopy of Fixed and Living Cells with a Single STED Beam and Hyperspectral Detection. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (March), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep46492>.
 - (24) WILDANGER, D.; MEDDA, R.; KASTRUP, L.; HELL, S. W. A Compact STED Microscope Providing 3D Nanoscale Resolution. *J. Microsc.* **2009**, *236* (1), 35–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03188.x>.
 - (25) Staudt, T.; Engler, A.; Rittweger, E.; Harke, B.; Engelhardt, J.; Hell, S. W. Far-Field Optical Nanoscopy with Reduced Number of State Transition Cycles. *Opt. Express* **2011**, *19* (6), 5644. <https://doi.org/10.1364/oe.19.005644>.
 - (26) Heine, J.; Reuss, M.; Harke, B.; D’Este, E.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. Adaptive-Illumination STED Nanoscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (37), 9797–9802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708304114>.
 - (27) Gould, T. J.; Burke, D.; Bewersdorf, J.; Booth, M. J. Adaptive Optics Enables 3D STED Microscopy in Aberrating Specimens. *Opt. Express* **2012**, *20* (19), 20998. <https://doi.org/10.1364/oe.20.020998>.

- (28) Szalai, A. M.; Siarry, B.; Lukin, J.; Giusti, S.; Unsain, N.; Cáceres, A.; Steiner, F.; Tinnefeld, P.; Refojo, D.; Jovin, T. M.; Stefani, F. D. Super-Resolution Imaging of Energy Transfer by Intensity-Based STED-FRET. *Nano Lett.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c00158>.
- (29) Jahr, W.; Velicky, P.; Danzl, J. G. Strategies to Maximize Performance in Stimulated Emission Depletion (STED) Nanoscopy of Biological Specimens. *Methods* **2020**, *174* (July), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.019>.
- (30) Willig, K. I.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Jahn, R.; Hell, S. W. STED Microscopy Reveals That Synaptotagmin Remains Clustered after Synaptic Vesicle Exocytosis. *Nature* **2006**, *440* (7086), 935–939. <https://doi.org/10.1038/nature04592>.
- (31) Unsain, N.; Bordenave, M. D.; Martinez, G. F.; Jalil, S.; Von Bilderling, C.; Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Johnstone, A. D.; Barker, P. A.; Bisbal, M.; Stefani, F. D.; Cáceres, A. O. Remodeling of the Actin/Spectrin Membrane-Associated Periodic Skeleton, Growth Cone Collapse and F-Actin Decrease during Axonal Degeneration. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21232-0>.
- (32) Unsain, N.; Bordenave, M. D.; Martinez, G. F.; Jalil, S.; von Bilderling, C.; Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Johnstone, A. D.; Barker, P. A.; Bisbal, M.; Stefani, F. D.; Cáceres, A. O. Remodeling of the Actin/Spectrin Membrane-Associated Periodic Skeleton, Growth Cone Collapse and F-Actin Decrease during Axonal Degeneration. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 3007. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21232-0>.
- (33) Hofmann, M.; Eggeling, C.; Jakobs, S.; Hell, S. W. Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy at Low Light Intensities by Using Reversibly Photoswitchable Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (49), 17565–17569. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506010102>.
- (34) Grotjohann, T.; Testa, I.; Leutenegger, M.; Bock, H.; Urban, N. T.; Lavoie-Cardinal, F.; Willig, K. I.; Eggeling, C.; Jakobs, S.; Hell, S. W. Diffraction-Unlimited All-Optical Imaging and Writing with a Photochromic GFP. *Nature* **2011**, *478* (7368), 204–208.
- (35) Westphal, V.; Rizzoli, S. O.; Lauterbach, M. A.; Kamin, D.; Jahn, R.; Hell, S. W. Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement. *Science* (80-.). **2008**, *320* (5873), 246–249. <https://doi.org/10.1126/science.1154228>.
- (36) Thompson, R. E.; Larson, D. R.; Webb, W. W. Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophys. J.* **2002**, *82* (5), 2775–2783. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75618-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75618-X).
- (37) Huang, B.; Wang, W.; Bates, M.; Zhuang, X. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science* **2008**, *319* (5864), 810–813. <https://doi.org/10.1126/science.1153529>.

- (38) Pavani, S. R. P.; Thompson, M. A.; Biteen, J. S.; Lord, S. J.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Piestun, R.; Moerner, W. E. Three-Dimensional, Single-Molecule Fluorescence Imaging beyond the Diffraction Limit by Using a Double-Helix Point Spread Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (9), 2995–2999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900245106>.
- (39) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science (80-.)*. **2006**, *313* (5793), 1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.
- (40) Hess, S. T.; Girirajan, T. P. K.; Mason, M. D. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.* **2006**, *91* (11), 4258–4272. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
- (41) Fölling, J.; Bossi, M.; Bock, H.; Medda, R.; Wurm, C. a; Hein, B.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. Fluorescence Nanoscopy by Ground-State Depletion and Single-Molecule Return. *Nat. Methods* **2008**, *5* (11), 943–945. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1257>.
- (42) Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Nat. Methods* **2006**, *3* (10). <https://doi.org/10.1038/NMETH929>.
- (43) Heilemann, M.; van de Linde, S.; Schüttpelez, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47* (33), 6172–6176. <https://doi.org/10.1002/anie.200802376>.
- (44) Sharonov, A.; Hochstrasser, R. M. Wide-Field Subdiffraction Imaging by Accumulated Binding of Diffusing Probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (50), 18911–18916. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104>.
- (45) Jungmann, R.; Steinhauer, C.; Scheible, M.; Kuzyk, A.; Tinnefeld, P.; Simmel, F. C. Single-Molecule Kinetics and Super-Resolution Microscopy by Fluorescence Imaging of Transient Binding on DNA Origami. *Nano Lett.* **2010**, *10* (11), 4756–4761. <https://doi.org/10.1021/nl103427w>.
- (46) Jimenez, A.; Friedl, K.; Leterrier, C. About Samples, Giving Examples: Optimized Single Molecule Localization Microscopy. *Methods* **2020**, *174* (March), 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.008>.
- (47) Mortensen, K. I.; Churchman, L. S.; Spudich, J. a; Flyvbjerg, H. Optimized Localization Analysis for Single-Molecule Tracking and Super-Resolution Microscopy. *Nat. Methods* **2010**, *7* (5), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1447>.
- (48) Holm, T.; Klein, T.; Löschberger, A.; Klamp, T.; Wiebusch, G.; Van De Linde, S.; Sauer, M. A Blueprint for Cost-Efficient Localization Microscopy. *ChemPhysChem* **2014**, *15* (4), 651–654. <https://doi.org/10.1002/cphc.201300739>.

- (49) Ma, H.; Fu, R.; Xu, J.; Liu, Y. A Simple and Cost-Effective Setup for Super-Resolution Localization Microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01606-6>.
- (50) Auer, A.; Schlichthaerle, T.; Woehrstein, J. B.; Schueder, F.; Strauss, M. T.; Grabmayr, H.; Jungmann, R. Nanometer-Scale Multiplexed Super-Resolution Imaging with an Economic 3D-DNA-PAINT Microscope. *ChemPhysChem* **2018**, *19* (22), 3024–3034. <https://doi.org/10.1002/cphc.201800630>.
- (51) Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Bordenave, M. D.; A. Giusti, S.; Unsain, N.; Refojo, D.; Cáceres, A.; Stefani, F. D. Automated Quantification of Protein Periodic Nanostructures in Fluorescence Nanoscopy Images: Abundance and Regularity of Neuronal Spectrin Membrane-Associated Skeleton. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 16029. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16280-x>.
- (52) Carlini, L.; Manley, S. Live Intracellular Super-Resolution Imaging Using Site-Specific Stains. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (12), 2643–2648. <https://doi.org/10.1021/cb400467x>.
- (53) Huang, F.; Hartwich, T. M. P.; Rivera-Molina, F. E.; Lin, Y.; Duim, W. C.; Long, J. J.; Uchil, P. D.; Myers, J. R.; Baird, M. a; Mothes, W.; Davidson, M. W.; Toomre, D.; Bewersdorf, J. Video-Rate Nanoscopy Using SCMOS Camera-Specific Single-Molecule Localization Algorithms. *Nat. Methods* **2013**, *10* (7), 653–658. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2488>.
- (54) Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H. A Practical Guide to Evaluating Colocalization in Biological Microscopy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2011**, *300* (4), 723–742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>.
- (55) Schnitzbauer, J.; Strauss, M. T.; Schlichthaerle, T.; Schueder, F.; Jungmann, R. Super-Resolution Microscopy with DNA-PAINT. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (6), 1198–1228. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.024>.
- (56) Dai, M.; Jungmann, R.; Yin, P. Optical Imaging of Individual Biomolecules in Densely Packed Clusters. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11* (9), 798–807. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.95>.
- (57) Strauss, S.; Nickels, P. C.; Strauss, M. T.; Jimenez Sabinina, V.; Ellenberg, J.; Carter, J. D.; Gupta, S.; Janjic, N.; Jungmann, R. Modified Aptamers Enable Quantitative Sub-10-Nm Cellular DNA-PAINT Imaging. *Nat. Methods* **2018**, *15* (9), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0105-0>.
- (58) Strauss, S.; Jungmann, R. Up to 100-Fold Speed-up and Multiplexing in Optimized DNA-PAINT. *Nat. Methods* **2020**, *17* (8), 789–791. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0869-x>.
- (59) Balzarotti, F.; Eilers, Y.; Gwosch, K. C.; Gynnå, A. H.; Westphal, V.; Stefani, F. D.; Elf, J.; Hell, S. W.; Gynna, A. H. Nanometer Resolution Imaging and Tracking of Fluorescent Molecules with Minimal Photon Fluxes. *Science (80-.)*. **2017**, *355* (6325), 606–612. <https://doi.org/10.1126/science.aak9913>.

- (60) Reymond, L.; Huser, T.; Ruprecht, V.; Wieser, S. Modulation-Enhanced Localization Microscopy. *J. Phys. Photonics* **2020**, *2* (4), 041001. <https://doi.org/10.1088/2515-7647/ab9eac>.
- (61) Balzarotti, F.; Eilers, Y.; Gwosch, K. C.; Gynnå, A. H.; Westphal, V.; Stefani, F. D.; Elf, J.; Hell, S. W. Nanometer Resolution Imaging and Tracking With Minimal Photon Fluxes. *Science (80-.)*. **2017**, *355* (December), 606–612.
- (62) Gwosch, K. C.; Pape, J. K.; Balzarotti, F.; Hoess, P.; Ellenberg, J.; Ries, J.; Hell, S. W. MINFLUX Nanoscopy Delivers 3D Multicolor Nanometer Resolution in Cells. *Nat. Methods* **2020**, *17* (2), 217–224. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0688-0>.
- (63) Eilers, Y.; Ta, H.; Gwosch, K. C.; Balzarotti, F.; Hell, S. W. MINFLUX Monitors Rapid Molecular Jumps with Superior Spatiotemporal Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, 201801672. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801672115>.
- (64) Pape, J. K.; Stephan, T.; Balzarotti, F.; Büchner, R.; Lange, F.; Riedel, D.; Jakobs, S.; Hell, S. W. Multicolor 3D MINFLUX Nanoscopy of Mitochondrial MICOS Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117* (34), 20607–20614. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009364117>.
- (65) Stephan, T.; Brüser, C.; Deckers, M.; Steyer, A. M.; Balzarotti, F.; Barbot, M.; Behr, T. S.; Heim, G.; Hübner, W.; Ilgen, P.; Lange, F.; Pacheu-Grau, D.; Pape, J. K.; Stoldt, S.; Huser, T.; Hell, S. W.; Möbius, W.; Rehling, P.; Riedel, D.; Jakobs, S. MICOS Assembly Controls Mitochondrial Inner Membrane Remodeling and Crista Junction Redistribution to Mediate Cristae Formation. *EMBO J.* **2020**, *39* (14), 1–24. <https://doi.org/10.15252/emboj.2019104105>.
- (66) Grabner, C. P.; Jansen, I.; Neef, J.; Weiss, T.; Schmidt, R.; Riedel, D.; Wurm, C. A.; Moser, T. Resolving the Molecular Architecture of the Photoreceptor Active Zone by MINFLUX Nanoscopy. *bioRxiv* **2021**, 2021.05.28.446138. <https://doi.org/10.1101/2021.05.28.446138>.
- (67) Schmidt, R.; Weihs, T.; Wurm, C. A.; Jansen, I.; Rehman, J.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. MINFLUX Nanometer-Scale 3D Imaging and Microsecond-Range Tracking on a Common Fluorescence Microscope. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21652-z>.
- (68) Masullo, L. A.; Steiner, F.; Zähringer, J.; Lopez, L. F.; Bohlen, J.; Richter, L.; Cole, F.; Tinnefeld, P.; Stefani, F. D. Pulsed Interleaved MINFLUX. *Nano Lett.* **2021**, *21* (1), 840–846. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04600>.
- (69) Reymond, L.; Ziegler, J.; Knapp, C.; Wang, F.-C.; Huser, T.; Ruprecht, V.; Wieser, S. SIMPLE: Structured Illumination Based Point Localization Estimator with Enhanced Precision. *Opt. Express* **2019**, *27* (17), 24578. <https://doi.org/10.1364/oe.27.024578>.
- (70) Gu, L.; Li, Y.; Zhang, S.; Xue, Y.; Li, W.; Li, D.; Xu, T.; Ji, W. Molecular Resolution Imaging by Repetitive Optical Selective Exposure. *Nat. Methods* **2019**,

- 16 (11), 1114–1118. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0544-2>.
- (71) Cnossen, J.; Hinsdale, T.; Thorsen, R.; Siemons, M.; Schueder, F.; Jungmann, R.; Smith, C. S.; Rieger, B.; Stallinga, S. Localization Microscopy at Doubled Precision with Patterned Illumination. *Nat. Methods* **2020**, *17* (1), 59–63. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0657-7>.
- (72) Axelrod, D. Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence. *J. Cell Biol.* **1981**, *89* (1), 141–145. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141>.
- (73) Szalai, A. M.; Siarry, B.; Lukin, J.; Williamson, D. J.; Unsain, N.; Cáceres, A.; Pilo-Pais, M.; Acuna, G.; Refojo, D.; Owen, D. M.; Simoncelli, S.; Stefani, F. D. Three-Dimensional Total-Internal Reflection Fluorescence Nanoscopy with Nanometric Axial Resolution by Photometric Localization of Single Molecules. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20863-0>.
- (74) Jouchet, P.; Cabriel, C.; Bourg, N.; Bardou, M.; Poüs, C.; Fort, E.; Lévêque-Fort, S. Nanometric Axial Localization of Single Fluorescent Molecules with Modulated Excitation. *Nat. Photonics* **2021**, *15* (April). <https://doi.org/10.1038/s41566-020-00749-9>.
- (75) Gu, L.; Li, Y.; Zhang, S.; Zhou, M.; Xue, Y.; Li, W.; Xu, T.; Ji, W. Molecular-Scale Axial Localization by Repetitive Optical Selective Exposure. *Nat. Methods* **2021**, *18* (4), 369–373. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01099-2>.
- (76) Weber, M.; Leutenegger, M.; Stoldt, S.; Jakobs, S.; Mihaila, T. S.; Butkevich, A. N.; Hell, S. W. MINSTED Fluorescence Localization and Nanoscopy. *Nat. Photonics* **2021**, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41566-021-00774-2>.
- (77) Kis-Petikova, K.; Gratton, E. Distance Measurement by Circular Scanning of the Excitation Beam in the Two-Photon Microscope. *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *63* (1), 34–49. <https://doi.org/10.1002/jemt.10417>.
- (78) Enderlein, J. Tracking of Fluorescent Molecules Diffusing within Membranes. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **2000**, *71* (5), 773–777. <https://doi.org/10.1007/s003400000409>.
- (79) Levi, V.; Ruan, Q.; Kis-Petikova, K.; Gratton, E. Scanning FCS, a Novel Method for Three-Dimensional Particle Tracking. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31* (5), 997–1000. <https://doi.org/10.1042/bst0310997>.
- (80) Lanzanò, L.; Gratton, E. Orbital Single Particle Tracking on a Commercial Confocal Microscope Using Piezoelectric Stage Feedback. *Methods Appl. Fluoresc.* **2014**, *2* (2), 1–19. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/2/2/024010>.
- (81) Wehnekamp, F.; Plucińska, G.; Thong, R.; Misgeld, T.; Lamb, D. C. C. Nanoresolution Real-Time 3D Orbital Tracking for Studying Mitochondrial Trafficking in Vertebrate Axons in Vivo. *Elife* **2019**, *8*, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.46059>.
- (82) Dupont, A.; Gorelashvili, M.; Schüller, V.; Wehnekamp, F.; Arcizet, D.;

- Katayama, Y.; Lamb, D. C.; Heinrich, D. Three-Dimensional Single-Particle Tracking in Live Cells: News from the Third Dimension. *New J. Phys.* **2013**, *15* (7), 075008. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/7/075008>.
- (83) Marklund, E.; van Oosten, B.; Mao, G.; Amselem, E.; Kipper, K.; Sabantsev, A.; Emmerich, A.; Globisch, D.; Zheng, X.; Lehmann, L. C.; Berg, O. G.; Johansson, M.; Elf, J.; Deindl, S. DNA Surface Exploration and Operator Bypassing during Target Search. *Nature* **2020**, *583* (7818), 858–861. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2413-7>.
- (84) Davis, L. M.; Canfield, B. K.; Germann, J. A.; King, J. K.; Robinson, W. N.; Dukes III, A. D.; Rosenthal, S. J.; Samson, P. C.; Wikswo, J. P. Four-Focus Single-Particle Position Determination in a Confocal Microscope. In *Single Molecule Spectroscopy and Imaging III*; Enderlein, J., Gryczynski, Z. K., Erdmann, R., Eds.; 2010; Vol. 7571, p 757112. <https://doi.org/10.1117/12.842572>.
- (85) Germann, J. A.; Davis, L. M. Three-Dimensional Tracking of a Single Fluorescent Nanoparticle Using Four-Focus Excitation in a Confocal Microscope. *Opt. Express* **2014**, *22* (5), 5641. <https://doi.org/10.1364/OE.22.005641>.
- (86) Levi, V.; Ruan, Q. Q.; Gratton, E. 3-D Particle Tracking in a Two-Photon Microscope: Application to the Study of Molecular Dynamics in Cells. *Biophys. J.* **2005**, *88* (4), 2919–2928. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.044230>.
- (87) Katayama, Y.; Burkacky, O.; Meyer, M.; Bräuchle, C.; Gratton, E.; Lamb, D. C. Real-Time Nanomicroscopy via Three-Dimensional Singleparticle Tracking. *ChemPhysChem* **2009**, *10* (14), 2458–2464. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900436>.
- (88) Hell, S. W.; Sotomayor, M.; Schulten, K.; Evans, E.; Bell, G. I.; Davis, M. M.; Ritchie, K. Far-Field Optical Nanoscopy. *Science (80-.)*. **2007**, *316* (5828), 1153–1158. <https://doi.org/10.1126/science.1137395>.
- (89) Dickson, R. M.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y.; Moerner, W. E. On/off Blinking and Switching Behaviour of Single Molecules of Green Fluorescent Protein. *Nature* **1997**, *388* (6640), 355–358. <https://doi.org/10.1038/41048>.
- (90) Lukyanov, K. A.; Fradkov, A. F.; Gurskaya, N. G.; Matz, M. V.; Labas, Y. A.; Savitsky, A. P.; Markelov, M. L.; Zarausky, A. G.; Zhao, X.; Fang, Y.; Tan, W.; Lukyanov, S. A. Natural Animal Coloration Can Be Determined by a Nonfluorescent Green Fluorescent Protein Homolog. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (34), 25879–25882. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000338200>.
- (91) Habuchi, S.; Ando, R.; Dedecker, P.; Verheijen, W.; Mizuno, H.; Miyawaki, A.; Hofkens, J. Reversible Single-Molecule Photoswitching in the GFP-like Fluorescent Protein Dronpa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (27), 9511–9516. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500489102>.
- (92) Grotjohann, T.; Testa, I.; Reuss, M.; Brakemann, T.; Eggeling, C.; Hell, S. W.; Jakobs, S. RsEGFP2 Enables Fast RESOLFT Nanoscopy of Living Cells. *Elife*

- 2012, *2012* (1), 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.00248>.
- (93) Stiel, A. C.; Trowitzsch, S.; Weber, G.; Andresen, M.; Eggeling, C.; Hell, S. W.; Jakobs, S.; Wahl, M. C. 1.8 A Bright-State Structure of the Reversibly Switchable Fluorescent Protein Dronpa Guides the Generation of Fast Switching Variants. *Biochem. J.* **2007**, *402* (1), 35–42. <https://doi.org/10.1042/bj20061401>.
- (94) 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. A Reversibly Photoswitchable GFP-like Protein with Fluorescence Excitation Decoupled from Switching. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (10), 942–950. <https://doi.org/10.1038/nbt.1952>.
- (95) Hell, S. W.; Jakobs, S.; Kastrop, L. Imaging and Writing at the Nanoscale with Focused Visible Light through Saturable Optical Transitions. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2003**, *77* (7), 859–860. <https://doi.org/10.1007/s00339-003-2292-4>.
- (96) Chmyrov, A.; Keller, J.; Grotjohann, T.; Ratz, M.; D’Este, E.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. Nanoscopy with More than 100,000 “Doughnuts.” *Nat. Methods* **2013**, *10* (8), 737–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2556>.
- (97) Chmyrov, A.; Leutenegger, M.; Grotjohann, T.; Schönle, A.; Keller-Findeisen, J.; Kastrop, L.; Jakobs, S.; Donnert, G.; Sahl, S. J.; Hell, S. W. Achromatic Light Patterning and Improved Image Reconstruction for Parallelized RESOLFT Nanoscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (November 2016), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep44619>.
- (98) Rego, E. H.; Shao, L.; Macklin, J. J.; Winoto, L.; Johansson, G. A.; Kamps-Hughes, N.; Davidson, M. W.; Gustafsson, M. G. L. Nonlinear Structured-Illumination Microscopy with a Photoswitchable Protein Reveals Cellular Structures at 50-Nm Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (3). <https://doi.org/10.1073/pnas.1107547108>.
- (99) Li, D.; Shao, L.; Chen, B.; Zhang, X. X.; Zhang, M.; Moses, B.; Milkie, D. E.; Beach, J. R.; Hammer, J. A.; Pasham, M.; Kirchhausen, T.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Xu, P.; Betzig, E.; Iii, J. A. H.; Pasham, M.; Kirchhausen, T.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Xu, P.; Betzig, E.; Hammer, J. A.; Pasham, M.; Kirchhausen, T.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Xu, P.; Betzig, E.; Iii, J. A. H.; Pasham, M.; Kirchhausen, T.; Baird, M. A.; Davidson, M. W.; Xu, P.; Betzig, E. Extended-Resolution Structured Illumination Imaging of Endocytic and Cytoskeletal Dynamics. *Science (80-.)*. **2015**, *349* (6251), aab3500–aab3500. <https://doi.org/10.1126/science.aab3500>.
- (100) Zhang, X.; Zhang, M.; Li, D.; He, W.; Peng, J.; Betzig, E.; Xu, P. Highly Photostable, Reversibly Photoswitchable Fluorescent Protein with High Contrast Ratio for Live-Cell Superresolution Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (37), 10364–10369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611038113>.
- (101) Sahl, S. J.; Balzarotti, F.; Keller-Findeisen, J.; Leutenegger, M.; Westphal, V.;

- Egner, A.; Lavoie-Cardinal, F.; Chmyrov, A.; Grotjohann, T.; Jakobs, S. Comment on "extended-Resolution Structured Illumination Imaging of Endocytic and Cytoskeletal Dynamics. *Science* (80-.). **2016**, *352* (6285). <https://doi.org/10.1126/science.aad7983>.
- (102) Masullo, L. A.; Bodén, A.; Pennacchietti, F.; Coceano, G.; Ratz, M.; Testa, I. Enhanced Photon Collection Enables Four Dimensional Fluorescence Nanoscopy of Living Systems. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05799-w>.
- (103) Bewersdorf, J.; Egner, A.; Hell, S. W. Multifocal Multi-Photon Microscopy. *Handb. Biol. Confocal Microsc. Third Ed.* **2006**, *23* (9), 550–560. https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2_29.
- (104) York, A. G.; Parekh, S. H.; Nogare, D. D.; Fischer, R. S.; Temprine, K.; Mione, M.; Chitnis, A. B.; Combs, C. A.; Shroff, H. Resolution Doubling in Live, Multicellular Organisms via Multifocal Structured Illumination Microscopy. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 749–754. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2025>.
- (105) Müller, C. B.; Enderlein, J. Image Scanning Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *104* (19), 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.198101>.
- (106) Barabas, F. M.; Masullo, L. A.; Stefani, F. D. Note: Tormenta: An Open Source Python-Powered Control Software for Camera Based Optical Microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **2016**, *87* (12). <https://doi.org/10.1063/1.4972392>.
- (107) Booth, M. J.; Neil, M. A. A.; Juškaitis, R.; Wilson, T. Adaptive Aberration Correction in a Confocal Microscope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (9), 5788–5792. <https://doi.org/10.1073/pnas.082544799>.
- (108) Testa, I.; Urban, N. T.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Willig, K. I.; Hell, S. W. Nanoscopy of Living Brain Slices with Low Light Levels. *Neuron* **2012**, *75* (6), 992–1000. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.028>.
- (109) York, A. G.; Chandris, P.; Nogare, D. D.; Head, J.; Wawrzusin, P.; Fischer, R. S.; Chitnis, A.; Shroff, H. Instant Super-Resolution Imaging in Live Cells and Embryos via Analog Image Processing. *Nat. Methods* **2013**, *10* (11), 1122–1126. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2687>.
- (110) Fiolka, R.; Beck, M.; Stemmer, A. Structured Illumination in Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy Using a Spatial Light Modulator. **2008**, *33* (14), 1629–1631.
- (111) Yang, B.; Przybilla, F.; Mestre, M.; Trebbia, J.-B.; Lounis, B. Large Parallelization of STED Nanoscopy Using Optical Lattices. *Opt. Express* **2014**, *22* (5), 5581. <https://doi.org/10.1364/oe.22.005581>.
- (112) Bergermann, F.; Alber, L.; Sahl, S. J.; Engelhardt, J.; Hell, S. W. Fluorescence Nanoscopy. **2015**, *23* (1), 731–733. <https://doi.org/10.1364/OE.23.000211>.
- (113) 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. Interferometric Fluorescent Super-Resolution Microscopy Resolves 3D Cellular Ultrastructure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (9), 3125–3130. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813131106>.
- (114) Aquino, D.; Schönle, A.; Geisler, C.; Middendorff, C. V.; Wurm, C. a.; Okamura, Y.; Lang, T.; Hell, S. W.; Egner, A. Two-Color Nanoscopy of Three-Dimensional Volumes by 4Pi Detection of Stochastically Switched Fluorophores. *Nat. Methods* **2011**, *8* (4), 353–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1583>.
- (115) Huang, F.; Sirinakis, G.; Allgeyer, E. S.; Toomre, D.; Booth, M. J.; Bewersdorf, J.; Huang, F.; Sirinakis, G.; Allgeyer, E. S.; Schroeder, L. K.; Duim, W. C. Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells Resource Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells. *Cell* **166** (4), 1028–1040. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.016>.
- (116) Juette, M. F.; Gould, T. J.; Lessard, M. D.; Mlodzianoski, M. J.; Nagpure, B. S.; Bennett, B. T.; Hess, S. T.; Bewersdorf, J. Three-Dimensional Sub-100 Nm Resolution Fluorescence Microscopy of Thick Samples. *Nat. Methods* **2008**, *5* (6), 527–529. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1211>.
- (117) Jones, S. a.; Shim, S.-H.; He, J.; Zhuang, X. Fast, Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of Live Cells. *Nat. Methods* **2011**, *8* (6), 499–508. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1605>.
- (118) 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. Fast Reversibly Photoswitching Red Fluorescent Proteins for Live-Cell RESOLFT Nanoscopy. *Nat. Methods* **2018**, *15* (8), 601–604. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0052-9>.
- (119) Bodén, A.; Pennacchietti, F.; Coceano, G.; Damenti, M.; Ratz, M.; Testa, I. Volumetric Live Cell Imaging with Three-Dimensional Parallelized RESOLFT Microscopy. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39* (5), 609–618. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00779-2>.
- (120) Damenti, M.; Coceano, G.; Pennacchietti, F.; Bodén, A.; Testa, I. STED and Parallelized RESOLFT Optical Nanoscopy of the Tubular Endoplasmic Reticulum and Its Mitochondrial Contacts in Neuronal Cells. *Neurobiol. Dis.* **2021**, *155* (January). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105361>.
- (121) Van Oijen, A. M.; Blainey, P. C.; Crampton, D. J.; Richardson, C. C.; Ellenberger, T.; Xie, X. S. Single-Molecule Kinetics of λ Exonuclease Reveal Base Dependence and Dynamic Disorder. *Science* (80-.). **2003**, *301* (5637), 1235–1238. <https://doi.org/10.1126/science.1084387>.
- (122) Yildiz, A.; Ha, T.; Goldman, Y. E.; Selvin, P. R.; Forkey, J. N.; McKinney, S. a.; Ha, T.; Goldmann, Y. E.; Selvin, P. R.; Goldman, Y. E.; Selvin, P. R.; Forkey, J. N.; McKinney, S. a.; Goldmann, Y. E.; Ha, T.; Goldman, Y. E.; Selvin, P. R.; Forkey, J. N.; McKinney, S. a.; Goldmann, Y. E.; Ha, T.; Goldman, Y. E.; Selvin,

- P. R. Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-Nm Localization. *Science (80-.)*. **2003**, *300* (2003), 2061–2065.
<https://doi.org/10.1126/science.1084398>.
- (123) English, B. P.; Min, W.; Van Oijen, A. M.; Kang, T. L.; Luo, G.; Sun, H.; Cherayil, B. J.; Kou, S. C.; Xie, X. S. Ever-Fluctuating Single Enzyme Molecules: Michaelis-Menten Equation Revisited. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2* (2), 87–94.
<https://doi.org/10.1038/nchembio759>.
- (124) Cisse, I. I.; Izeddin, I.; Causse, S. Z.; Boudarene, L.; Senecal, A.; Muresan, L.; Dugast-Darzacq, C.; Hajj, B.; Dahan, M.; Darzacq, X. Real-Time Dynamics of RNA Polymerase II Clustering in Live Human Cells. *Science (80-.)*. **2013**, *341* (6146), 664–667. <https://doi.org/10.1126/science.1239053>.
- (125) Kosuri, P.; Altheimer, B. D.; Dai, M.; Yin, P.; Zhuang, X. Rotation Tracking of Genome-Processing Enzymes Using DNA Origami Rotors. *Nature* **2019**, *572* (7767), 136–140. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1397-7>.
- (126) Mortensen, K. I.; Churchman, L. S.; Spudich, J. a; Flyvbjerg, H. Optimized Localization Analysis for Single-Molecule Tracking and Super-Resolution Microscopy. *Nat. Methods* **2010**, *7* (5), 377–381.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1447>.
- (127) Lelek, M.; Gyparaki, M. T.; Beliu, G.; Schueder, F.; Griffié, J.; Manley, S.; Jungmann, R.; Sauer, M.; Lakadamyali, M.; Zimmer, C. Single-Molecule Localization Microscopy. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, *1* (1).
<https://doi.org/10.1038/s43586-021-00038-x>.
- (128) Hellriegel, C.; Gratton, E. Real-Time Multi-Parameter Spectroscopy and Localization in Three-Dimensional Single-Particle Tracking. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6* (March), S3–S14. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0313.focus>.
- (129) Klar, T. A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S. W. Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (15), 8206–8210.
- (130) Thiele, J. C.; Helmerich, D. A.; Oleksiievets, N.; Tsukanov, R.; Butkevich, E.; Sauer, M.; Nevskiy, O.; Enderlein, J. Confocal Fluorescence-Lifetime Single-Molecule Localization Microscopy. *ACS Nano* **2020**, *14* (10), 14190–14200.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c07322>.
- (131) Sengupta, S. K.; Kay, S. M. *Fundamentals of Statistical Signal Processing: Estimation Theory*; Prentice Hall, 1995. <https://doi.org/10.2307/1269750>.
- (132) Verveer, P. J.; Jovin, T. M. Efficient Superresolution Restoration Algorithms Using Maximum a Posteriori Estimations with Application to Fluorescence Microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A* **1997**, *14* (8), 1696.
<https://doi.org/10.1364/JOSAA.14.001696>.
- (133) Markham, J.; Conchello, J.-A. Fast Maximum-Likelihood Image-Restoration Algorithms for Three-Dimensional Fluorescence Microscopy. *J. Opt. Soc. Am. A*

- 2001, *18* (5), 1062. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.18.001062>.
- (134) Ober, R. J.; Ram, S.; Ward, E. S. Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy. *Biophys. J.* **2004**, *86* (2), 1185–1200. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74193-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74193-4).
- (135) Abraham, A. V.; Ram, S.; Chao, J.; Ward, E. S.; Ober, R. J. Quantitative Study of Single Molecule Location Estimation Techniques. *Opt. Express* **2009**, *17* (26), 23352. <https://doi.org/10.1364/OE.17.023352>.
- (136) Chao, J.; Sally Ward, E.; Ober, R. J. Fisher Information Theory for Parameter Estimation in Single Molecule Microscopy: Tutorial. *J. Opt. Soc. Am. A* **2016**, *33* (7), B36. <https://doi.org/10.1364/josaa.33.000b36>.
- (137) Kasper, R.; Harke, B.; Forthmann, C.; Tinnefeld, P.; Hell, S. W.; Sauer, M. Single-Molecule STED Microscopy with Photostable Organic Fluorophores. *Small* **2010**, *6* (13), 1379–1384. <https://doi.org/10.1002/sml.201000203>.
- (138) van de Linde, S.; Loschberger, A.; Klein, T.; Heidbreder, M.; Wolter, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy with Standard Fluorescent Probes. *Nat. Protoc.* **2011**, *6* (7), 991–1009.
- (139) Testa, I.; Urban, N. T.; Balzarotti, F.; Hell, S. W. Dual Channel RESOLFT Nanoscopy by Using Fluorescent State Kinetics. **2014**, 8–11.
- (140) Isbaner, S.; Karedla, N.; Kaminska, I.; Ruhlandt, D.; Raab, M.; Bohlen, J.; Chizhik, A.; Gregor, I.; Tinnefeld, P.; Enderlein, J.; Tsukanov, R. Axial Colocalization of Single Molecules with Nanometer Accuracy Using Metal-Induced Energy Transfer. *Nano Lett.* **2018**, *18* (4), 2616–2622. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00425>.
- (141) Kaminska, I.; Bohlen, J.; Rocchetti, S.; Selbach, F.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Distance Dependence of Single-Molecule Energy Transfer to Graphene Measured with DNA Origami Nanopositioners. *Nano Lett.* **2019**, *19* (7), 4257–4262. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00172>.
- (142) Müller, B. K.; Zaychikov, E.; Bräuchle, C.; Lamb, D. C.; Mu, B. K. Pulsed Interleaved Excitation. *Biophys. J.* **2005**, *89* (November), 3508–3522. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.064766>.
- (143) Caprile, F. Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires. **2021**.
- (144) Richter, L. Master Thesis, Humboldt University.
- (145) Rothmund, P. W. K. Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature* **2006**, *440* (7082), 297–302.
- (146) Scheckenbach, M.; Bauer, J.; Zähringer, J.; Selbach, F.; Tinnefeld, P. DNA Origami Nanorulers and Emerging Reference Structures. *APL Mater.* **2020**, *8* (11). <https://doi.org/10.1063/5.0022885>.
- (147) Dey, S.; Fan, C.; Gothelf, K. V.; Li, J.; Lin, C.; Liu, L.; Liu, N.; Nijenhuis, M. A. D.; Saccà, B.; Simmel, F. C.; Yan, H.; Zhan, P. DNA Origami. *Nat. Rev. Methods*

- Prim.* **2021**, *1* (1), 1–24. <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00009-8>.
- (148) Nickels, P. C.; Wünsch, B.; Holzmeister, P.; Bae, W.; Kneer, L. M.; Grohmann, D.; Tinnefeld, P.; Liedl, T. Molecular Force Spectroscopy with a DNA Origami – Based Nanoscopic Force Clamp. *Science (80-.)*. **2016**, *354* (6310), 305–307.
- (149) Vogelsang, J.; Kasper, R.; Steinhauer, C.; Person, B.; Heilemann, M.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes. *Angew. Chemie* **2008**, *47* (29), 5465–5469. <https://doi.org/10.1002/anie.200801518>.
- (150) Sigal, Y. M.; Zhou, R.; Zhuang, X. Visualizing and Discovering Cellular Structures with Super-Resolution Microscopy. *Science*. 2018. <https://doi.org/10.1126/science.aau1044>.
- (151) Dempsey, G. T.; Vaughan, J. C.; Chen, K. H.; Bates, M.; Zhuang, X. Evaluation of Fluorophores for Optimal Performance in Localization-Based Super-Resolution Imaging. *Nat. Methods* **2011**, *8* (12), 1027–1036. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1768>.
- (152) Vogelsang, J.; Steinhauer, C.; Forthmann, C.; Stein, I. H.; Person-Skegro, B.; Cordes, T.; Tinnefeld, P. Make Them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy. *ChemPhysChem* **2010**, *11* (12), 2475–2490. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000189>.
- (153) van de Linde, S.; Krstić, I.; Prisner, T.; Doose, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. Photoinduced Formation of Reversible Dye Radicals and Their Impact on Super-Resolution Imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (4), 499–506. <https://doi.org/10.1039/C0PP00317D>.
- (154) Castello, M.; Tortarolo, G.; Buttafava, M.; Deguchi, T.; Villa, F.; Koho, S.; Pesce, L.; Oneto, M.; Pelicci, S.; Lanzanó, L.; Bianchini, P.; Sheppard, C. J. R.; Diaspro, A.; Tosi, A.; Vicidomini, G. A Robust and Versatile Platform for Image Scanning Microscopy Enabling Super-Resolution FLIM. *Nat. Methods* **2019**, *16* (2), 175–178. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0291-9>.
- (155) Schönle, A. Inspector Image Acquisition & Analysis Software v0.10, <Http://Www.Inspector.De>.
- (156) Coelho, S.; Baek, J.; Graus, M. S.; Halstead, J. M.; Nicovich, P. R.; Feher, K.; Gandhi, H.; Gooding, J. J.; Gaus, K. Ultraprecise Single-Molecule Localization Microscopy Enables in Situ Distance Measurements in Intact Cells. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (16), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay8271>.
- (157) Dempsey, G. T.; Bates, M.; Kowtoniuk, W. E.; Liu, D. R.; Tsien, R. Y.; Zhuang, X. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (51), 18192–18193. <https://doi.org/10.1021/ja904588g>.
- (158) Ovesný, M.; Křížek, P.; Borkovec, J.; Švindrych, Z.; Hagen, G. M. ThunderSTORM: A Comprehensive ImageJ Plug-in for PALM and STORM Data Analysis and Super-Resolution Imaging. *Bioinformatics* **2014**, *30* (16), 2389–2390.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu202>.