

Dnešní mikroskopie v biomedicině: Tak trochu jinak

Today's microscopy in biomedicine: somewhat different view

Raška I.

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav buněčné biologie a patologie a Oddělení buněčné biologie, Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.

SOUHRN

Přehledové sdělení popisuje pokrok v biomedicínsky zaměřené světelné mikroskopii a prozařovací elektronové mikroskopii. Důležitou součástí sdělení je rozbor okolností vedoucích na daném pracovišti k výběru určitého typu mikroskopu z hlediska účelnosti a využitelnosti.

SUMMARY

This review describes the progress of light as well as transmission electron microscopy in biomedicine. The essential part of this contribution deals with an analysis of circumstances within a given laboratory that, from the point of view of suitability and exploitation, leads to an acquisition of the precise type of microscope.

Raška I. (Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Cellular Biology and Pathology, and Department of Cell Biology, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i.): **Today's microscopy in biomedicine: somewhat different view, Čs. fyziologie 58 (1): 4–14, 2009.**

ÚVOD

V tomto příspěvku chci doplnit náš předchozí článek „Dnešní mikroskopie v biomedicině“ publikovaný ve Vesmíru (Bednár et al., 2004; v textu se na tento článek budu odvolávat jako na „předchozí příspěvek“), v němž byl zdůrazněn význam mikroskopie pro molekulární buněčnou biologii. Důvodů pro to mám několik. Je to nevídaný rozmach vývoje nových mikroskopů a mikroskopických přístupů docílený v posledních 5 letech, jakož i nevyváženost informací předložených zasvěceným i nezasevěným čtenářům otisknutých v našem písemnictví a věnovaných mikroskopii, včetně našeho předchozího příspěvku ve Vesmíru. V těchto článcích se totiž do značné míry vytratil souhrnný pohled na účelnost pořízení toho či onoho mikroskopu v kombinaci s tím či oním mikroskopickým přístupem, respektive na jeho využitelnost v rámci zaměření vědeckých projektů toho či onoho vědeckého pracoviště. V tomto příspěvku se omezím

jen na fluorescenční mikroskopii vzdáleného pole (far field microscopy)¹ a na prozařovací (transmisní) elektronovou mikroskopii.

KVALITNÍ PŘÍSTROJOVÉ ZÁZEMÍ JE NUTNOU PODMÍNKOU PRO DOSAŽENÍ KOMPETITIVNOSTI VĚDECKÝCH VÝSTUPŮ

V závěru našeho předchozího příspěvku jsme konstatovali, že nutnou, nikoli však dostačující podmínkou pro zvýšení vědecké úrovně výstupů v molekulární buněčné biologii u nás je získání odpovídajícího přístrojového, konkrétně mikroskopického vybavení. Na našem pracovišti byl díky státní podpoře v roce 2007 plně zprovozněn laserový rastrovací konfokální mikroskop (CLSM) SP5. Pro elektronovou mikroskopii byl v r. 2006 zprovozněn tomografický elektronový mikroskop Tecnai Sphera s urychlovacím napětím

¹Na rozdíl od „near-field“ mikroskopie jsou v mikroskopii vzdáleného pole světelný zdroj a součásti mikroskopu „zpracovávající“ světelné paprsky vzdáleny od biologického vzorku na mnoho vlnových délek použitého světla; lze ji v prvním přiblížení identifikovat s mikroskopii používající běžně rozšířené mikroskopy se skleněnými čočkami (viz však v závěru zmíněné „superčočky“); mimochodem jen krycí sklo má mnohonásobně větší tloušťku ve srovnání s vlnovou délkou červeného světla.

200 kV, ve kterém je možné pozorovat i nativní hydrátované kryopreparáty, a v r. 2007 dva přístroje umožňující provádět rychlé zmrazení biologického vzorku za vysokého tlaku a mrazovou substitucí zmrazeného vzorku. Popsaným rozšířením metodického zázemí se prohloubila možnost zodpovídat na vědecké otázky předtím pro nás nedotknutelné. V návaznosti na náš předchozí příspěvek uvádím příklady dosažených výsledků.

Využití moderního bodově rastrujícího konfokálního mikroskopu SP5 uvádím dvěma příklady, na nichž dokumentuji jak rozvoj mikroskopů, tak mikroskopických přístupů. Prvním z nich je záznam chování nukleolárních organizátorů (Nucleolar Organizer Region, NOR) během mitózy lidských HeLa buněk, které syntetizují rekombinantní protein UBF-GFP zachycený rychlým rezonančním skenerem (Kalmárová et al., 2008). Snímky nukleolárních organizátorů zachycují asymetrickou mitózu, neboť jeden ze dvojice dceřiných chromozomů ztrácí fluorescenční NOR signál (obr. 1). Druhý příklad se týká hledání odpovědi na otázku, zda rozmístění chromozomů v jádře je po mitóze uchováno v jádrech buněk dceřiných (Cvačková et al., 2009). Použili jsme k tomu transfekované HepG2 buňky lidského původu, ve kterých po cílené transfekci docházelo k syntéze rekombinantního proteinu – fotokonvertibilního proteinu histon H4-Dendra2. Obr. 2 ukazuje, že rozmístění chromozomů se v jádrech buněk dceřiných významně liší od situace v buňce mateřské (přičemž rozmístění chromozomů si po mitóze uchovává nenáhodný charakter).

Využití elektronového mikroskopu Tecnai Sphera ilustruji rovněž dvěma příklady. V prvním z nich je metodou vitrifikované tenké vrstvy prokázán zásadní vliv histonu H1 na organizaci nukleohistonového vlákna (obr. 3). Druhý představuje výsledek tomografické rekonstrukce synaptických váček a současně vymezení destruktivního vlivu elektronového svazku na preparát (obr. 4). V rámci přímého srovnání s podnětem popsáním v našem předchozím příspěvku (obr. 3 v Bednár et al., 2004) můžeme konstatovat, že se tomografie již osvědčila při prostorové rekonstrukci imunocytochemicky značených zreplicovaných segmentů DNA a přispěla k získání nových poznatků o organizaci replizomů (Ligasová et al., 2009).

Pokrok v uchování ultrastruktury buněk a tkání metodou rychlého zmrazení za vysokého tlaku a kryosubstitucí ilustruje obr. 5. Na první pohled je i pro nezavěšeného čtenáře zřejmé, že výsledné uchování buněčné ultrastruktury kvasinky (obr. 5B) je podstatně lepší ve srovnání s konvenčním postupem (obr. 5A). V obr. 6 je uveden výsledek srovnávací světelné a elektronové mikroskopie (Correlative Light Electron Microscopy, CLEM; viz rovněž náš předchozí příspěvek). V ní snímáme fluorescenční signál v živých buňkách v čase, na konci pozorování je vzorek v optimálním případě s prodlevou 5 až 10 sekund rychle zmrazen² a je provedena kryosubstituce. Na tenkém řezu kryosubstituovaného vzorku lze navíc provést ultrastrukturální imunolokalizaci

nějaké vybrané sledované makromolekuly (obr. 6). Zatímco pozorováním buněk *in vivo* ve fluorescenčním mikroskopu získáme informaci o dynamickém chování sledovaných fluoreskujících makromolekul (zejména proteinů), v elektronovém mikroskopu je poté ze stejného místa buňky pořízen snímek o vysokém rozlišení poskytující komplementární, ultrastrukturální informaci ke snímkům pořízených v mikroskopu světelném.

V našem předchozím příspěvku jsme se zmínili o pozorování nativních ultratenkých hydratovaných řezů (metoda CEMOVIS, tj. Cryo-Electron Microscopy Of Vitrified Sections). Pro dosud přetrvávající vysokou náročnost přípravy a analýzy nativních kryorezů se tomuto přístupu zatím vyhýbáme. Ve snímku nativního tenkého kryorezu je obtížné identifikovat byť jen jednotlivé buněčné kompartmenty, ovšem tomografické zpracování řezu vede k dostatečnému zesílení kontrastu (viz kapitola Volba mikroskopu). Teprve obraz trojrozměrné tomografické rekonstrukce řezu buňkou se stává srozumitelným. Tento přístup zde dokumentuji v převzatém obr. 7 (Al-Amoudi et al., 2008), v němž je uveden 2,4 nm tlustý *in silico* „řez“ tomografickou rekonstrukcí nativního vitrifikovaného řezu buňkou s minimálním kontrastem spolu s provedenou segmentací jednotlivých buněčných struktur vyznačených různými barvami z jiného 2,4 nm silného *in silico* „řezu“ buňkou.

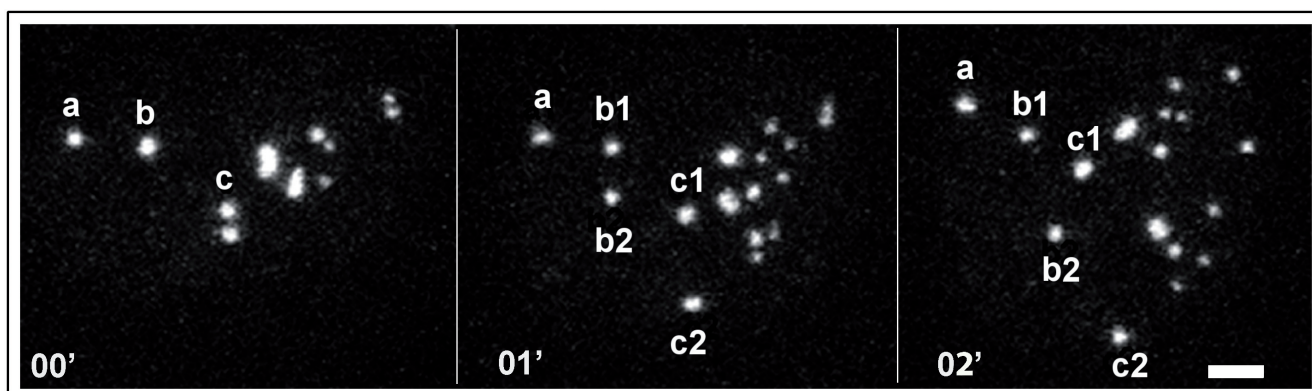
Zatímco při použití metody CEMOVIS zjevně můžeme mluvit o uchování nativní struktury buňky, v metodě rychlého zmrazení a kryosubstituce se jedná o jistý kompromis, jak se nativní struktura přiblížit. Při teplotách kolem -130 °C dochází nutně k rekrystalizaci (devitrifikaci) amorfního ledu, přičemž mrazová substituce se začíná provádět při teplotách vyšších (zpravidla -90 °C). Nicméně strukturní změny vyvolané devitrifikací jsou patrné při těchto nízkých teplotách jen velmi omezeného charakteru, k čemuž přispívá skutečnost, že mrazová substituce vody (ledu) rozpouštědlem a poté monomery pryskyřice je velice pozvolný proces trvající několik dnů.

ROZMACH FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE VČETNĚ PROLOMENÍ ABBEHO KRITÉRIA ROZLIŠENÍ (A BABYLONSKÁ ZMĚŤ AKRONYMŮ)

Ve zdařilém příspěvku Stanislava Vaňka z loňského květnového čísla Vesmíru (Vaněk, 2008) byly dokumentovány některé zásadní pokroky ve fluorescenční mikroskopii. Jsou to již komerčně dostupný laser umožňující používat k excitaci fluorescence v podstatě jakoukoliv vlnovou délku světla, komerčně dostupné akustooptické laditelné filtry umožňující spolu s dalšími (i laditelnými) složkami mikroskopu zbavit se např. stávajících karuselů se zabudovanými fixními filtry a komerčně dostupný STED (STimulated Emission Depletion) mikroskop umožňující zvýšit rozlišovací schopnost

²I sekundové prodlevy mohou být pro pozorování buněčných procesů spojených s rychlým pohybem (makro)molekul, včetně změny pH, kritické.

³Abbeho omezení je definováno vzorcem, v němž dosažitelné rozlišení je přímo úměrné vlnové délce použitého světla a nepřímo úměrné numerické apertuře objektivu.



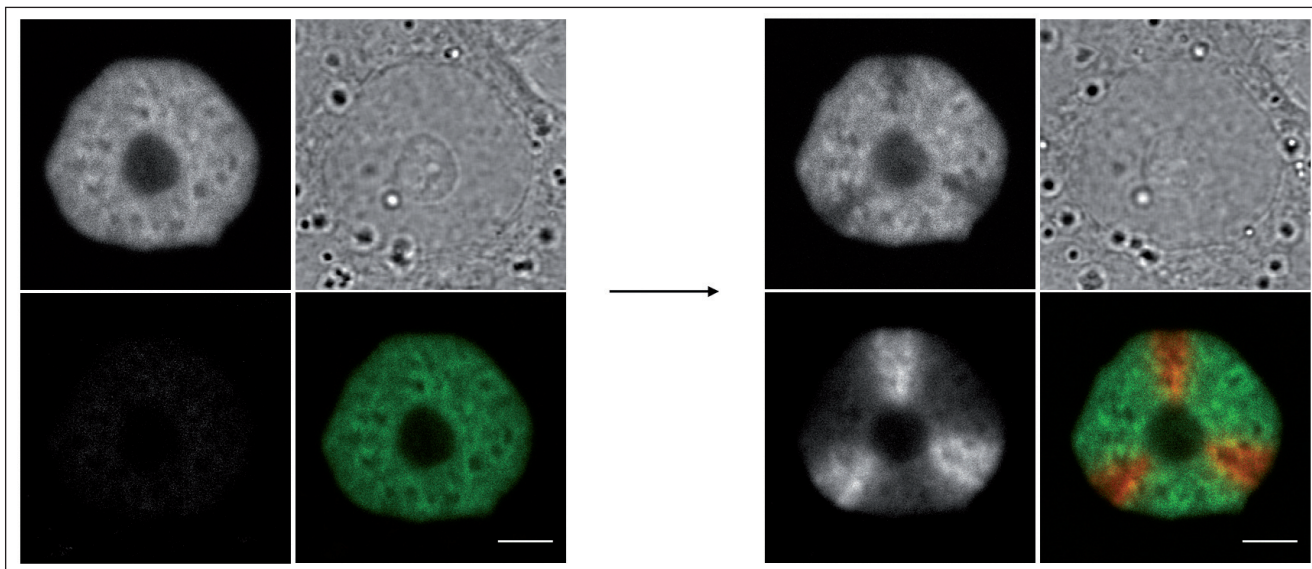
Obr. 1: Asymetrická mitóza kompetentních NORů v HeLa buňkách.

Dnes se hodně mluví o asymetrické mitóze např. v souvislosti s kmenovými buňkami. V našem projektu jsme se zaměřili na „epigenetiku“ ribozomálních genů v buněčné biologii běžně užívaných lidských HeLa buňkách.

Ribozomální geny jsou uspořádány tandemově (za sebou) v oblasti chromozomů nazývaných nukleolární organizátory (NORy), v lidských buňkách se NORy nacházejí v akrocentrických chromozomech 13,14,15,21 a 22. Pokud jsou v interfázi ribozomální geny transkripčně aktivní, je s příslušným (aktivním) NORem asociováno velké množství proteinů odpovídajících několika typům transkripčních faktorů včetně transkripčního faktoru UBF (Upstream Binding Factor). Některé NORy nejsou v interfázi transkripčně aktivní a nedochází v nich k akumulaci transkripčních faktorů. Na začátku mitózy dochází k útlumu syntézy ribozomální RNA, přičemž vybrané transkripční faktory, včetně UBF, setrvávají asociovány s NORy i v metafázních chromozomech. Takové NORy se nazývají, na rozdíl od neaktivních NORů, kompetentní NORy. Mimochodem právě přítomnost proteinových faktorů v NORech dává vznik tzv. sekundárním konstrikcím na příslušných metafázních chromozomech nesoucích NORy. Doposud se všeobecně přijímalo, že kompetentní NORy v mitotických chromozómech si uchovávají „kompetentnost“ i do další interfáze v dceřiných chromozomech. Uvedený obrázek ukazuje, že toto pravidlo neplatí.

V experimentu byly použity HeLa buňky exprimující rekombinantní protein UBF-GFP. Na obrázku je ve třech snímcích pořízených v jednominutových intervalech (interval 00, 01 a 02 min.) zachyceno chování tří typů kompetentních NORů v mitóze během 2 minut:

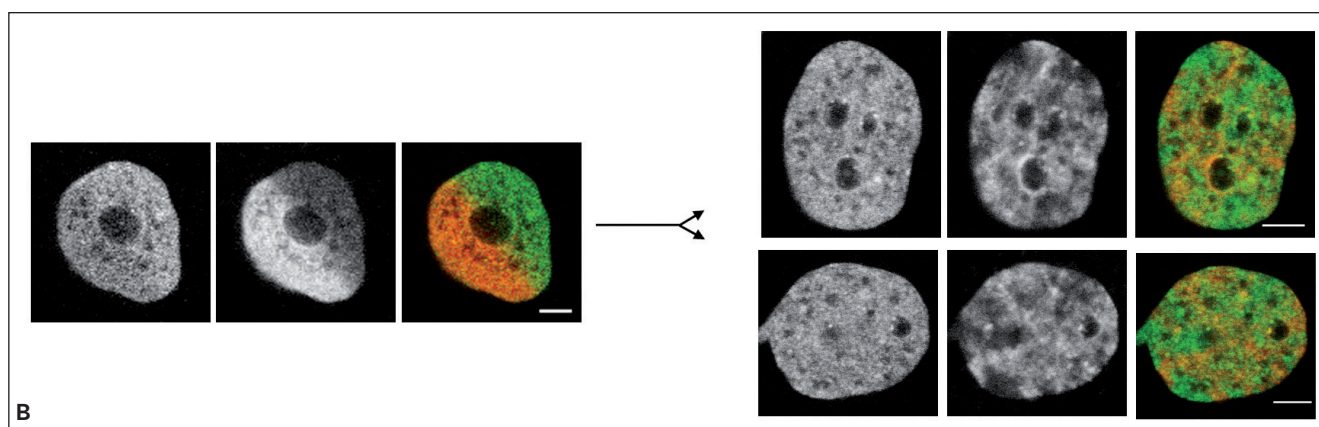
a – představuje jeden „asymetrický“ NOR; **b** – jednotlivý, ale „symetrický“ NOR; **c** – zdvojený NOR, což je obvykle pozorovaný typ NORu. V čase 00 min. je uvedena metafáze, v níž **a** a **b** jsou vidět ve formě jednoho fluorescenčního terčíku, **c** ve formě dvou terčíků. Na počátku anafáze čase 01 min. jsou NORy **b** a **c** ve formě dvou terčíků **b1,2** a **c1,2**, ovšem pro NOR **a** přetrvává jen jeden terčík označený **a**. Na konci anafáze v době 02 min. se NORy **c1** a **c2**, jakož i **b1** a **b2** pohybují na opačné póly mitózy, přičemž NOR **a** přetrvává stále jako jediný terčík. V konečném důsledku získává v obrázku budoucí horní dceřiná buňka 9 kompetentních NORů, dolní buňka jen 8. Měřítko: 5 μ m. Převzato z J Struct Biol, 2008, 163, s. 40-44, s laskavým svolením Elsevier.



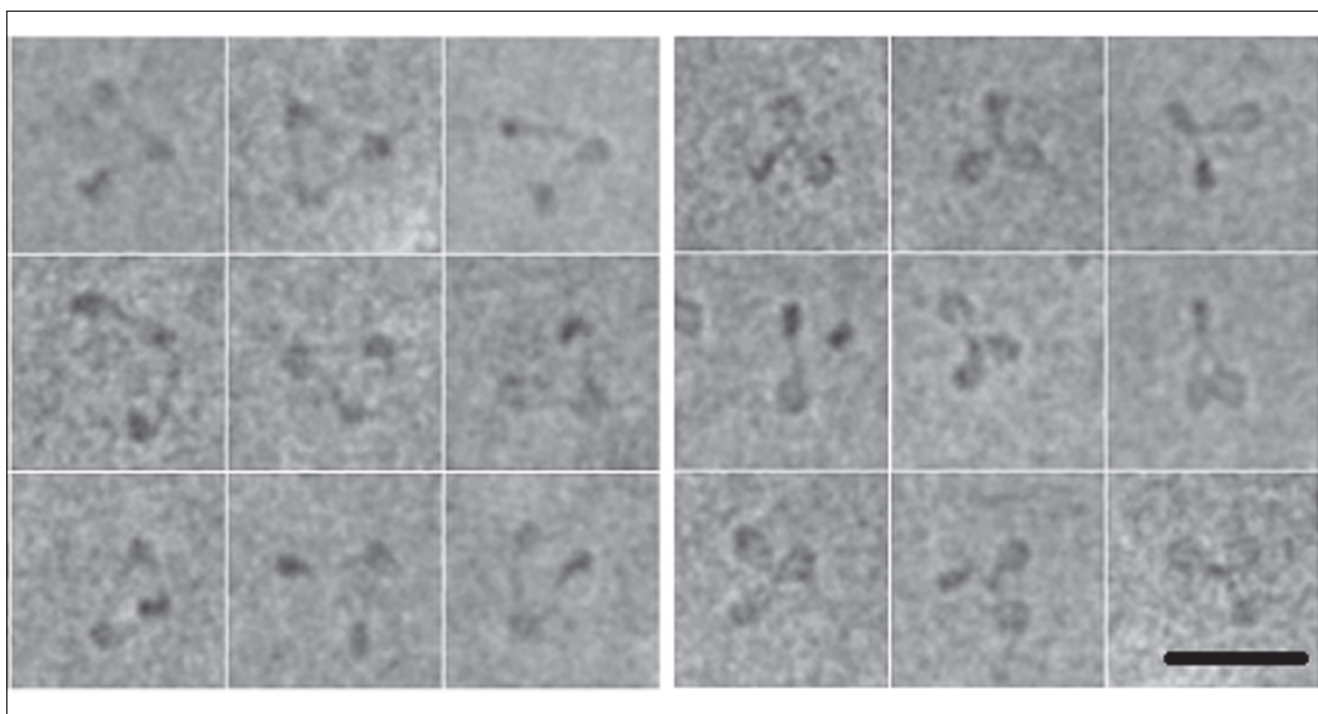
Obr. 2: Vzájemné uspořádání chromozomů v jádře lidských HepG2 buněk vykazuje významné změny v buňkách dceřiných.

Špičkové buněčné biologické laboratoře publikovaly nálezy, že vzájemné uspořádání chromozomů (chromatinu) se v jádře dceřiných buněk „dědí“. Všichni víme, že se dědí chromozomy. „Dědičnost“ uspořádání chromozomů (chromatinu) je samozřejmě velmi silným tvrzením. Náš přístup k tomuto problému byl vhodnější než přístupy dříve použité.

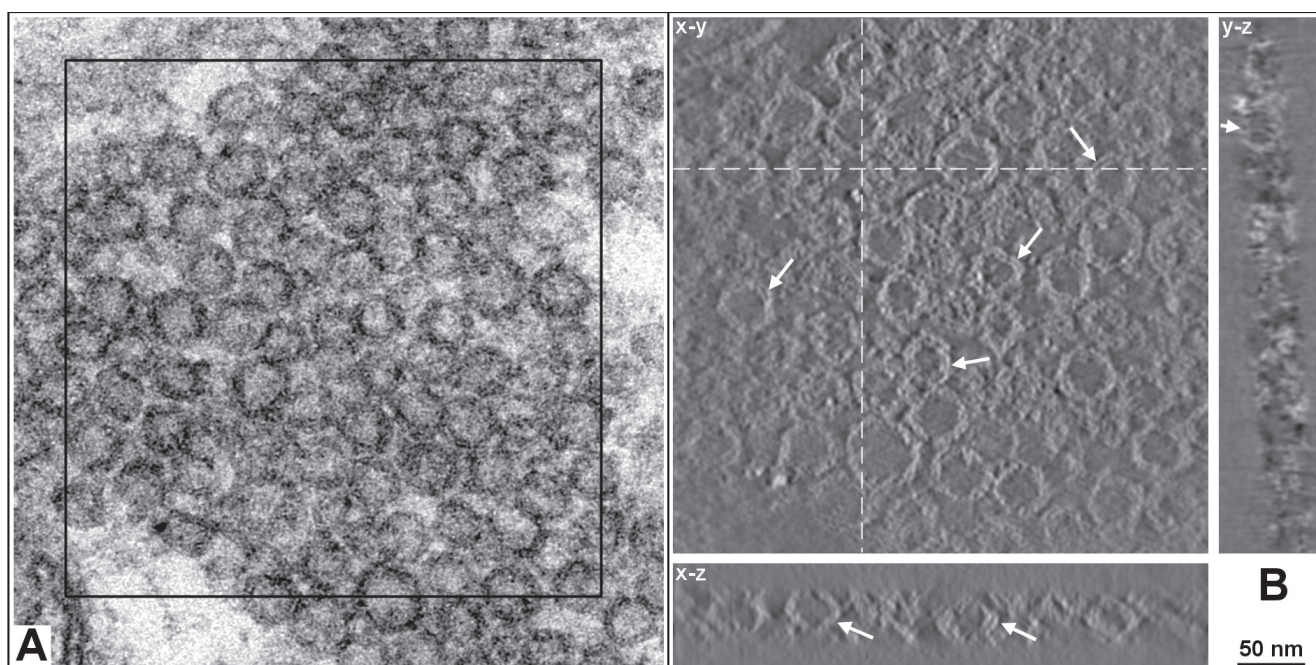
A – Poloha označené chromatinové oblasti byla sledována v buňkách HepG2 exprimujících rekombinantní protein histon H4-Dendra2. Protein Dendra2 fluoreskuje v zelené barvě (levá část obrázku), po ozáření intenzivním svazkem laserového světla vlnové délky 405 nm dojde k tzv. fotokonverzi a Dendra2 začne v ozářené oblasti fluoreskovat ve světle červeném (pravá část obrázku). Histon H4 byl vybrán proto, že setrvává velmi dlouho na daném segmentu DNA, a tudíž lze polohu červeně označeného chromatinu sledovat dlouhodobě. Jsou zde uvedeny obrázky snímáné v zeleném kanálu, červeném kanálu, fázovém kontrastu a v barevném obrázku. Měřítko: 5 μ m. Musím zde konkrétně upozornit na potencionální využití dvoufotonového mikroskopu, který poskytuje některé výhody (např. fotokonverze v podstatě omezena na rovinu zaostření, snížená fototoxicita) a ve kterém se fotokonverze provádí ne osvětlením jedním světelným paprskem vlnové délky 405 nm, ale dvěma světelnými paprsky se dvěma podstatně delšími vlnovými délkami. Fotokonverzi proteinu Dendra2 se však v dvoufotonovém mikroskopu nepodařilo vyvolat. Musím zde rovněž uvést i určité varování, neboť v této in vivo studii, jakož i v mnoha studiích z jiných laboratoří, byly použity nádorové buňky, ve kterých jsou zásadně narušeny kontrolní mechanismy. To je nutné mít vždy na paměti. Naproti tomu lze z nádorových buněk snadno vytvořit stabilně transfekovanou linii syntetizující rekombinantní fluoreskující protein, a protože jsou nádorové buňky méně citlivé na fotopokožení než primární buněčné linie, jsou vhodnější i pro (krátkodobá a zejména) dlouhodobá in vivo pozorování.



Obr. 2: Vzájemné uspořádání chromozomů v jádře lidských HepG2 buněk vykazuje významné změny v buňkách dceřiných.
 B – Snímek mateřské buňky a buněk dceřiných. V mateřské buňce byla několik hodin před mitózou fotokonvertována zhruba polovina jádra. Ze snímků buněk dceřiných, které byly zhotoveny několik hodin po mitóze, je patrné, že v mateřské buňce původně kompaktní červená doména již není kompaktní a červený signál je rozptýlen po jádře buněk dceřiných. Poloha označeného chromatinu v buňkách dceřiných tak vykazuje významné změny oproti buňce mateřské. Jsou zde uvedeny obrázky snímáné v zeleném kanálu, červeném kanálu a v barevném snímku zeleném i červeném kanálu. Měřítko: 5 μm . (Obr. 2B přetištěn z J Struct Biol, 2009, 165, s. 107–117 s laskavým svolením Elsevier.)



Obr. 3: Změna konformace trinukleozomu po navázání spojovacího histonu H1 pozorovaná kryo-elektronovou mikroskopií nativního hydratovaného vzorku.
 Hlubší poznání strukturně-funkční organizace chromatinu je tvrdým oříškem pro badatele v molekulární buněčné biologii. Jan Bednár se problematice struktury chromatinu věnuje bezmála 20 let.
 Trinukleozom (tři po sobě jdoucí nukleozomy) představuje minimální úsek chromatinového vlákna, na kterém již lze studovat jednotlivé mechanismy podílející se na uspořádání vlákna a jeho schopnostech přecházet z kompaktního do rozvolněného stavu v závislosti na okolních podmínkách (např. koncentraci iontů). Spojovací histon hraje důležitou roli jak při organizaci struktury vlákna, tak i v jeho dynamice. Bez přítomnosti histonu H1 (levý panel) zaujímají trinukleozomy rozvolněnou konfiguraci, ramena DNA jsou relativně rozevřená, a vstupují/vystupují z centrálního nukleozomu na různých místech. Po navázání spojovacího histonu dochází k uzavření struktury nukleozomu a vytvoření struktury „stopky“, která do značné míry určuje uspořádání a elastické vlastnosti chromatinového vlákna. Měřítko: 50 nm.



Obr. 4: Tomografická rekonstrukce synaptických váčků a vymezení rozsahu destrukce preparátu elektronovým svazkem.

Provedením tomografické rekonstrukce synaptických váčků byl rovněž cíleně testován destrukční vliv elektronového svazku na preparát. Působením elektronového svazku na preparát se tloušťka pryskyřičného řezu po interakci elektronů se vzorkem zmenšila z 80 nm na zhruba 40 nm, což představuje ztrátu asi 50 % hmoty. V tomto kontextu je nutné zmínit, že vhodnější je nejprve vzorek „stabilizovat“ jeho vystavením působení elektronového svazku, což má za následek zásadní omezení ztráty hmoty během následného tomografického snímání. Optimálně je však tomografie prováděna za nízkých teplot (tekutého dusíku) se vzorkem umístěným ve speciálním kryodržáku (jeho použití je samozřejmě nutnou podmínkou pro pozorování nativních kryopreparátů) a za podmínek minimálního osvětlení (low dose). Místo 50% ztráty (obr. 4B) je poté v závislosti na preparátu pozorována ztráta hmoty jen v rozmezí 5 až 20 %.

A – Elektronmikroskopický snímek seskupení synaptických váčků v 80 nm silném eponovém řezu mozkové tkáně potkana. Mozková tkáň byla zpracována standardním způsobem při teplotách nad 0 °C, tj. postupně se jednalo o aldehydickou fixaci, osmifikaci, dehydrataci, infiltraci monomery pryskyřice, polymerizaci, krájení tenkých řezů a jejich kontrastování solemi těžkého kovu. Pozorování tenkých řezů (za laskavé poskytnutí ultratenkých řezů děkují doc. MUDr. Haně Brichové) a tomografie byla provedeny v transmisním elektronovém mikroskopu Tecnai Sphera 20 při urychlovacím napětí 200 kV.

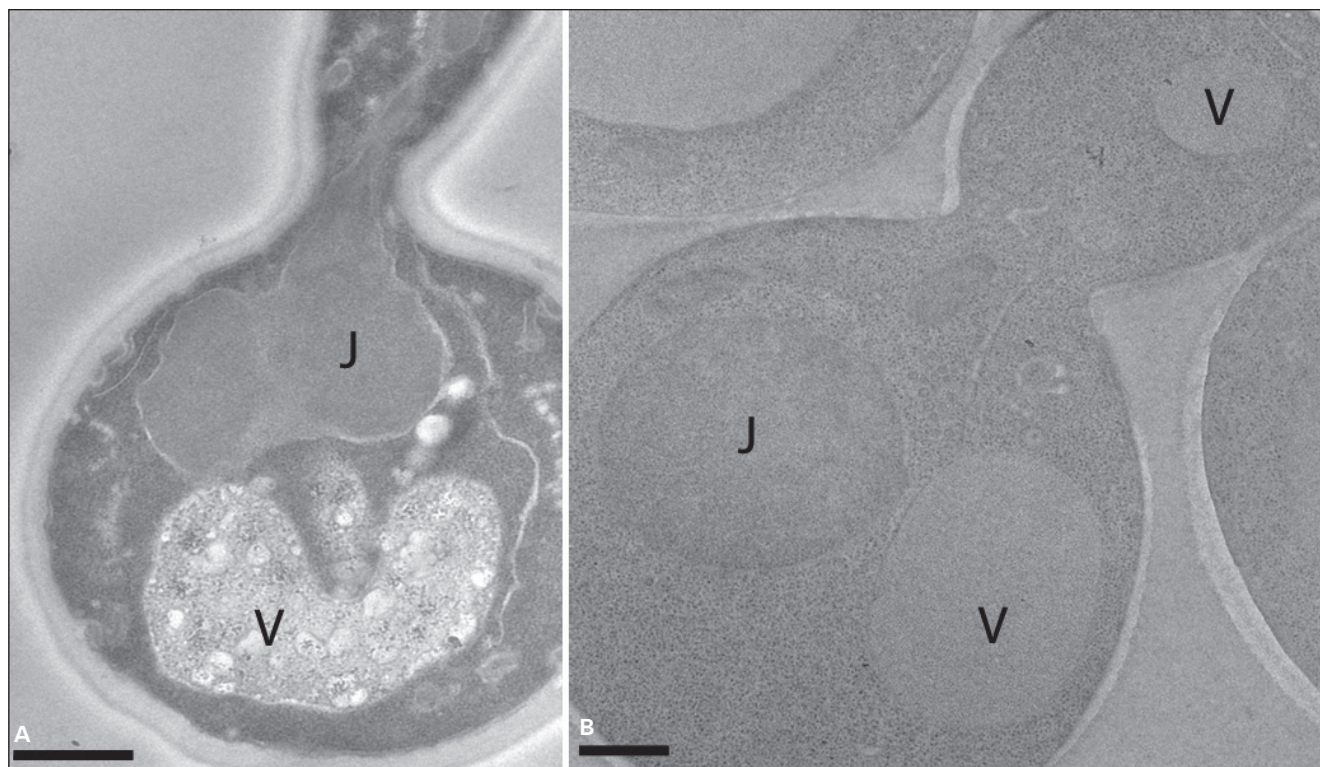
B – Trojrozměrná tomografická rekonstrukce seskupení synaptických váčků v řezech **x-y**, **x-z** a **y-z**. Oblast vybraná pro trojrozměrnou rekonstrukci je v (A) vyznačena čtvercem. Pro snadnější interpretaci výsledků rekonstrukce byl v rekonstruovaném objemu převrácen kontrast, tj. místům s nejvyšší koncentrací kontrastovacího činidla odpovídají nejsvětlejší místa. Ve všech řezech již lze pozorovat dvojitou lipidickou membránu, již jsou váčky vymezeny (šipky). Přerušované bílé čáry definují roviny, pro které jsou v dolní a pravé části obr. B uvedeny příslušné řezy **x-z** a **y-z**. Měřítka: 50 nm.

mikroskopu pod hodnotu danou difrakčním Abbeho omezením³ a docílit „superrozlišení“ pohybující se v řádech desítek nanometrů. STED má potencionálně velikou budoucnost při sledování *in vivo* intracelulárních fyziologických procesů, a to v superrozlišení. Např. Westphal et al. (2008) dosáhli při *in vivo* sledování buněk rychlosti 28 snímků za sekundu, ovšem jen při pozorování malého okrsku buňky. Pro standardní snímání živých buněk je STED ještě příliš pomalý. Co však nejde dnes, může jít zítra.

K příspěvku Stanislava Vaňka (Vaňek, 2008) mám čtyři poznámky. Ta první je přece jen trochu kritická. Není vhodné, i když pouze nepřímo řečeno, házet komponenty mikroskopů, jako jsou fixní filtry, mřížky apod. do starého železa. Tuto záležitost diskutuji v následující kapitole sdělení.

V souvislosti se STEDem je nutné dodat, že superrozlišení bylo docíleno již asi 20 různými, i když v některých případech na sebe navazujícími způsoby, přičemž každý způsob má svůj název a také zkratku. Jen v příspěvku dr. Vaňka zmíněná zkratka PALM (fotoaktivací lokalizační mikroskopie neboli PhotoActivated Localization Microscopy) má několik variant, jako jsou FPALM,

BFPALM, PALMIRA, TFPALM, RPM, SPDM, STORM či SALM. Existují mnohé zkratky pro další přístupy používané ve fluorescenční mikroskopii, přičemž jedna z nich – vedoucí ke snížení vybělení fluorochromů a snížené fototoxicitě – má již výše zmíněnou zkratku CLEM, která však zde znamená Controlled Light Exposure Microscopy. Mnoho desítek zkratk metod používaných v mikroskopii pomalu začíná připomínat stovky zkratk používaných pro různé geny a příslušné produkty genů, přičemž různé zkratky jsou často používány i pro stejné, resp. homologní geny a proteiny. To už je skutečně Babylon. Badatelé, kteří se sami zabývají vývojem nových typů mikroskopů a mikroskopických přístupů, se dokonale vyznají v používaných mikroskopických zkratkách. Běžní uživatel mikroskopů se již musí cítit zaskočení, nemusí se však obávat. V praxi se totiž mohou setkat jen s velmi omezeným počtem komerčních mikroskopů vybavených příslušnými nadstandards. A mimochodem – při pořizování určitého mikroskopu a příslušného nadstandardu je samozřejmě velmi dobrým vodítkem typ přístroje a nadstandardu používaného ve špičkových světových laboratořích v dané oblasti výzkumu.



Obr. 5: Rozdíl v uchování ultrastruktury kvasinek *S. cerevisiae* zpracovaných standardní metodou a metodou rychlého zmrazení s kryosubstitucí.

V metodě rychlého zmrazení s kryosubstitucí je biologický vzorek značně omezeného objemu nejprve rychle zmrazen za vysokého tlaku, což má za následek přeměnu vody do nekystalického, amorfního ledu. Poté je provedena mrazová náhrada vody (ledu) za nemrznoucí rozpouštědlo. Používá se např. aceton s příměsí velmi nízké koncentrace uranyl acetátu, popř. i kysličníku osmia; tyto molekuly obsahující prvky s vysokým atomovým číslem slouží automaticky ke zvýšení kontrastu preparátu a potencionálně v konečném výsledku i k určitému znehybnění (fixaci) makromolekul. Za vyšších teplot, a samozřejmě při teplotách nad bodem mrazu vody, nelze vzhledem k jeho reaktivnosti osmia použít; analogicky lze nahlížet i na „neagresivní“ chování acetonu (či monomerů pryskyřic) za nízkých teplot. Rozpouštědlo je poté stále za dostatečně nízkých teplot nahrazeno monomery vhodné (např. metakrylátové) pryskyřice. Po provedené polymerizaci při teplotách několik desítek stupňů Celsia pod nulou je biologický vzorek zalitý do bločku pryskyřice nakrájen na ultratenké (pro tomografii i na silnější) řezy. Ty jsou popř. kontrastovány solemi těžkých kovů a pozorovány v elektronovém mikroskopu.

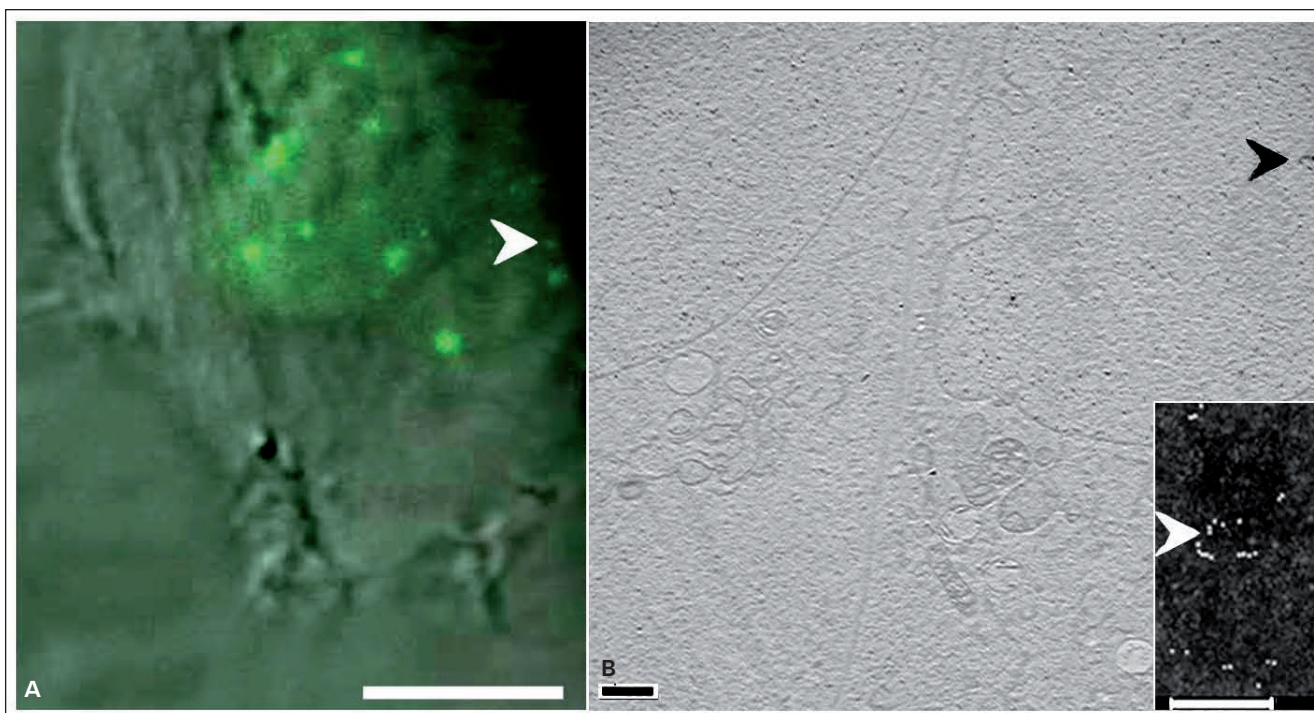
A – Ultratenký řez kvasinkami zpracovanými standardní metodou (podobnou jako v legendě k obr. 4, nicméně preparát nebyl osmifikován). Měřítka: 1 μm . B – Ultratenký řez kvasinkami zpracovanými metodou rychlého mrazení s kryosubstitucí. V tomto případě byla sůl těžkého kovu (uranyl acetát) použita během dehydratace a řez nebyl dodatečně kontrastován (viz rovněž obr. 6). Na první pohled je vidět rozdíl v uchování ultrastruktury ve srovnání s A. Za povšimnutí stojí strukturní kolaps materiálu, resp. vysrážený materiál ve vakuole (V) kvasinky a pokroucené jádro (J) v obr. 5A. Zde ovšem musím čtenáře upozornit, že klasicky zpracovaný materiál pro elektronovou mikroskopii je razantně fixován (např. obr. 5A). Preparáty, pokud jsou fixovány standardním (a podstatně „měkčím“) způsobem užívaným ve světelné (fluorescenční) mikroskopii, vykazují v elektronovém mikroskopu zásadní zhoršení uchování buněčné ultrastruktury, dovoluji si i tvrdit „katastrofické“ zhoršení. Vzhledem k omezenému rozlišení dosahovanému ve světelných mikroskopech to ve světelné (fluorescenční) mikroskopii zpravidla nevede, je však důležité si tuto skutečnost uvědomit a současně ocenit důležitost pozorování živých, tedy nefixovaných buněk. Měřítka: 500 nm.

Ve třetí, důležité poznámce chci kategorizovat způsoby, jakými se vědcům podařilo docílit superrozlišení. Jeden způsob, do kterého spadá také STED či PALM, má primárně málo společného s optikou vlastního mikroskopu. Zde je využito kvantového charakteru fluorochromů, se kterým si vědci hráli a vyhráli. Tento způsob lze přiřadit do fotofyzikální oblasti. Druhý způsob, do kterého spadá v příspěvku Stanislava Vaňka (Vaněk, 2008) zmíněná mikroskopie SIM (Structured Illumination Microscopy), ale také tzv. 4Pi mikroskop⁴, se naopak přímo týká vlastní optiky mikroskopu, přičemž mikroskopy SIM a 4Pi jsou komerčně dostupné. Oblasti fotofyziky a optiky se však překrývají např. v mikroskopech kombinujících 4Pi-STED či při saturem, nelineárním SIMu.

A ještě poslední poznámka, která zpravidla uniká zájmu světelných mikroskopiků. Při výše uvedeném překonávání

Abbeho bariéry se vždy jednalo o zpřesnění místa lokalizace fluoreskující (makro)molekuly, a to ať již v rovině zaostření mikroskopu (rovina xy , tj. souřadnice x a y tohoto místa), nebo ve směru kolmém (souřadnice z), popř. ve všech směrech, tj. v souřadnicích x , y a z . A protože zde byla zmínka o ultratenkých řezech, pak jejich využití ve fluorescenční mikroskopii samo o sobě představuje prolomení Abbeho omezení v souřadnici z . Při fluorescenční (immuno)detekci provedené přímo na pryskyřičném ultratenkém řezu nebo na rozmrzlém ultratenkém kryorezu je dosažitelná rozlišovací schopnost v ose z výrazně lepší než 100 nm, neboť tloušťka ultratenkého řezu se zpravidla pohybuje mezi 50 a 70 nm. V tomto případě je zpřesnění z souřadnice fluoreskující (makro)molekuly v podstatě vymezeno tloušťkou řezu.

⁴4Pi mikroskop, ve kterém je použito dvou proti sobě uložených objektivů zvyšujících prostorový úhel světelného svazku, vyžaduje doslova „profesionální“ seřízení a obsluhu, takže pořízení tohoto vynikajícího mikroskopu nemusí být tou nejlepší volbou pro běžné uživatele. Podobně lze nahlížet na některé jiné typy mikroskopů docilujících superrozlišení.



Obr. 6: Korelativní světelná a elektronová mikroskopie (CLEM) buněk U2OS exprimujících rekombinantní protein BMI1-GFP.

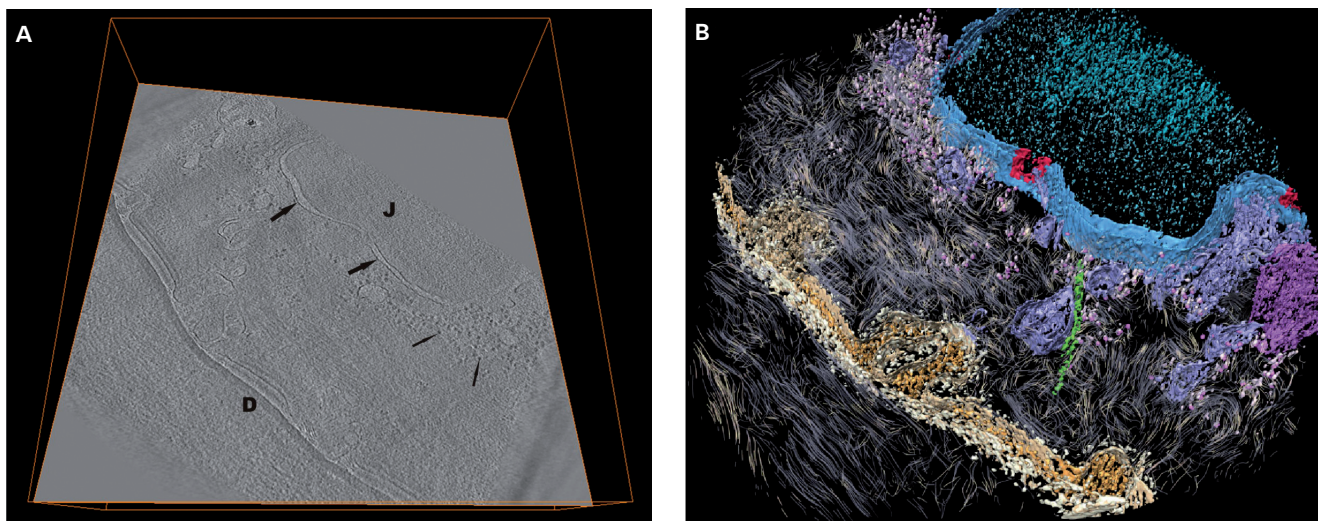
Protein BMI1 patří do skupiny Polycomb proteinů, které se účastní umlčování genů. V obrázku je uveden poslední ze série fluorescenčních snímků živých buněk, v nichž jsou pozorovány fluoreskující tělíska bohatá na protein BMI1-GFP a potažmo na protein BMI1. Buňky byly poté zpracovány rychlým mrazením s kryosubstitucí pro mikroskopii elektronovou.

A – Buňky vykazují ve fluorescenčním obraze tělíska obohacená BMI1-GFP proteinem. Šipka ukazuje na jedno drobné tělíčko, přičemž řez tímto tělískem je vyznačen šipkami v obr. B. Měřítko: 10 μ m.

B – 50 nm ultratenký řez buňkami z obr. A, na kterém byla provedena imunolokalizace proteinu BMI1 pomocí anti-BMI1 protilátky a zlatých partikul. Ultratenký řez nebyl kontrastován, a i když byl uranyl acetát použit během kryosubstituce, snímek vykazuje minimální kontrast.

V insertu je v převráceném kontrastu uveden detail řezu tělískem (šipka) označeným šipkou rovněž v obr. B. Tělíska vykazují v řezu lem zlatých partikul.

Měřítko: 1 μ m (insert – 500 nm).



Obr. 7: Tomografie nativního vitrifikovaného řezu lidským kožním fibroblastem. Cílem práce bylo získání hlubší strukturní informace o desmozomech. K jeho splnění vedla úspěšná a velmi náročná tomografická rekonstrukce nativního hydratovaného řezu fibroblasty.

V práci byly drobné biotické fragmenty z kůže zdravého jedince rychle zmrazeny za vysokého tlaku a nativní hydratované řezy byly připraveny na ultramikrotomu při teplotě -140 $^{\circ}$ C, tj. pod devitrifikační teplotou, při které dochází k devitrifikaci ledu a jeho přeměně v led krystalický.

Nutně podotknouté a vysoce „podexponované“ jednotlivé tomografické snímky (celkový náklon preparátu mezi -65 $^{\circ}$ a +65 $^{\circ}$) nativního kryorezu umístěného v kryodržáku byly při teplotách tekutého dusíku a v režimu minimálního osvětlení elektrony pořízeny v kryoelektronovém mikroskopu Tecnai Polara s urychlovacím napětím 300 kV.

A – 2,4 nm tlustý in silico „řez“ tomografickou rekonstrukcí kryorezu (objem celého kryorezu je vymezen hnědými čarami) dokumentuje náročnost práce s nativními kryorezy vykazujícími velmi nízký kontrast. Nicméně v „řezu“ již lze rozpoznat např. desmozomy (D), ribozomy (menší šipky) a jaderný obal (větší šipky) vymezující jádro (J).

B – Čitelnější pro čtenáře je barevná, poloautomatická segmentace buněčných struktur v jiném 2,4 nm tlustém in silico „řezu“ tomografickou rekonstrukcí kryorezu. Barvy odpovídají: desmozomální oblast – písková hnědá, vlastní desmozom (plaques) – béžová, filamenta – světlá ocelová modř, endoplazmatické retikulum – ocelová modř, (převážně) ribozomy – světlé šedá s nachovou, jaderný obal – modrá, jaderné póry – červená, (pravděpodobně) mikrotubulus – zelená, mitochondrie – nachová, nukleoplazma – tmavě modrá. Obrázek 2B přetištěn z Nature, 2007, 450, s. 832-837, s laskavým svolením Nature Publishing Group.

VOLBA MIKROSKOPU: KUDY, KAM A PROČ?

Při výběru fluorescenčního mikroskopu jsou uživatelé vystaveni zaklínacím slovům, jako je rozlišení, citlivost, vybělování signálu⁵, omezení (odstranění) šumu, fototoxická, rychlost, bezporuchovost (např. ovládací software může „padat“) či jednoduchost obsluhy (user friendly). A samozřejmě také cena, neboť např. pořizovací cena STED mikroskopu vybaveného velmi rychlým laserem, nicméně dnes omezeného na použití jen určitých fluorochromů, jakož i cena dále v textu zmíněného mikroskopu OMX, významně převyšuje částku milion dolarů. Za hlavní při volbě mikroskopu považují jeho využitelnost na daném pracovišti v horizontu několika příštích let. Jestliže budou uživatelé mikroskopu na daném pracovišti využívat mikroskop v podstatě jen pro kolokalizační studie různých makromolekul ve fixovaných buněčných kulturách či fixovaném řezovém materiálu, zcela určitě jim postačí standardní „wide-field“ mikroskop⁶ vybavený vhodnou sadou objektivů, filtrů a současně, i když ne nutně špičkovou, CCD (Coupled Charged Device) kamerou. Musím však zmínit, že i samotné řešení otázky kolokalizace nemusí být triviálním problémem, nicméně dnes již zavedenými („cross-correlation“) přístupy je to dobře ošetřitelný problém (např. Fidlerová et al., 2005).

Mám dojem, že pro některé zahraniční i naše vědecké skupiny, které používají fluorescenční mikroskopy, se získání zautomatizovaného CLSM stalo vytouženým cílem *a priori*. Mohu jen potvrdit, že CLSM SP5 je úžasným přístrojem, ale musím současně zdůraznit, že tento mikroskop není všelékem. A mluvím-li o molekulární buněčné biologii v plné šíři, pro řešení některých vědeckých projektů jsou zjevně vhodnější standardní wide-field fluorescenční mikroskopy nebo konfokální mikroskopy s rotujícím diskem, tj. „spinning disc microscopes“ (např. Murray et al., 2007). Skutečnost je taková, že mnoho zahraničních, ale i našich špičkových badatelů by wide-field mikroskop, popř. mikroskop s rotujícím diskem, nezaměnilo za CLSM mikroskop.

V případě dostatečně silných fluorescenčních signálů vykoná CLSM úžasnou službu na mnoha frontách, včetně experimentů se živými buňkami. Podle mého názoru však není nejvhodnější obecně pro *in vivo* pozorování (a přede-

vším v experimentech vyžadujících časté/dlouhodobé 3D snímkování) a pro detekci velmi slabých signálů. CLSM není totiž principiálně nejvhodnější, a to jak z hlediska osvětlení preparátu, tak z hlediska pořízení jeho obrazu. V CLSM mikroskopu rastruje laserový paprsek o značné intenzitě preparát bod po bodu (point scanning). To již brnkáme na strunu zaklínadel, jako jsou vybělování signálu, fototoxická a rychlost. Rychlost lze vylepšit rychlým skenerem (obr. 1), ovšem zpravidla za cenu zhoršení jiných parametrů. Konfokalita CLSM je vynikající a do značné míry je tak odstraněn šum spojený s příspěvkem neostrých obrazů mimoohniskových partií vzorků⁷. Pořízený obraz je navíc ještě možné vylepšit počítačovou dekonvolucí⁸. Jiná alternativa je osvětlovat konfokálně vzorek ne bodově, ale v celé řádce. Tím se u příslušného komerčního mikroskopu zvýší rychlost skenování, přičemž konfokalita není zásadně narušena.

V případě vzorků emitujících fluorescenci o nízké intenzitě fluorescenčního záření naráží zobrazování pomocí CLSM na základní omezení dané kvantovou povahou světla a s ní spojeným obrazovým šumem. Jedná se o to, že při libovolném způsobu měření intenzity světelného záření vždy zaznamenáme určité fluktuace její velikosti, a to i v případě, že průměrná hodnota intenzity záření se v čase nemění a detektory mikroskopů (fotonásobiče v případě CLSM, CCD kamery v případě standardních wide-field mikroskopů a konfokálních mikroskopů s rotujícím diskem) fungují ideálně bez jakéhokoliv vlastního šumu. Platí, že relativní velikost těchto fluktuací, tzv. fotonový šum, se mění s průměrným počtem detekovaných fotonů N úměrně hodnotě $\sqrt{N}/N$. Při nízkém počtu fotonů zaznamenaných během krátké doby měření v jednom obrazovém bodu bude nežádoucí vliv fotonového šumu značný. I rovnoměrně zářící plocha se nám pak bude jevit jako plocha výrazně zrnitá. Jemné strukturní detaily objektů bude za těchto podmínek obtížné, až zcela nemožné v mikroskopickém obraze rozpoznat. K získání kvalitních mikroskopických obrazů je třeba zajistit co největší počet detekovaných fotonů připadající na jeden pixel (Plášek et al., 2004). Toho lze dosáhnout zvýšením intenzity budícího záření nebo prodloužením doby měření emise v jednotlivých obrazových bodech. První způsob je zpravidla nežádoucí kvůli možné fototoxické intenzivní excitaci, druhý pak může vést k neúnosnému prodloužení

⁵Vybělení fluorochromů závisí především na intenzitě dopadajícího světla, méně na době osvětlení. Ke snížení vybělování (a samozřejmě fototoxicity) je nutné snižovat intenzitu světla UV výbojek i laserů především v *in vivo* experimentech. V některých buněčně biologických aplikacích se dnes mimo jiné uplatňují polovodičové fluoreskující kvantové částice (quantum dots), jejichž použití obchází problém vybělení. Ovšem při pozorování živých buněk považují osobně za zásadní problém fototoxicitu. Pokud kupříkladu použitý laser s výkonem 0,1 mW (při výstupu z objektivu) osvětluje v CLSM vzorek živých buněk se stopou laserového paprsku v rovině zaostření o průměru zhruba 250 nm, je to – samozřejmě v prvním přiblížení – jakoby na takovou oblast stopy dopadalo denní světlo z více než 10000 sluncí (Guy Hagen, osobní sdělení). Problém fototoxicity je o to složitější, že na různých buněčných substrukturách charakterizovaných různými indexy lomu dochází k lomu a rozptylu dopadajícího světla (např. Dobrucki et al., 2007).

⁶V příspěvku budu používat „wide-field“ mikroskop pro označení fluorescenčních mikroskopů, v nichž na rozdíl od konfokálních mikroskopů dochází k okamžitému osvětlení zorného pole jako celku. Mezi wide-field mikroskopy samozřejmě patří u nás běžně užívané fluorescenční mikroskopy.

⁷Užívané objektivy s vysokou numerickou aperturou poskytují velmi malou hloubku ostrosti a konfokalitou se odstraní naprostá většina „nezaostřeného“ signálu. Důležité je v tomto ohledu srovnání s elektronovou mikroskopií, v níž je hloubka ostrosti obrovská, neboť elektronový svazek je soustředěn do velmi malého prostorového úhlu. Proto také nevádí, ostříme-li v preparátu na horní či dolní okraj ultratenkého řezu, vždyť i kazety s filmem či CCD kamery jsou ve sloupci mikroskopu umístěny mnoho centimetrů pod nebo i nad fluoreskujícím stínítkem. To také umožňuje používat automatický modul s nízkým osvětlením (low dose), pomocí kterého ostříme na úplně jiné místo preparátu a omezujeme tak ničení preparátu elektronovým svazkem ve vlastní oblasti zájmu preparátu (Bednár et al., 2004).

⁸I počítačová dekonvoluce má svá úskalí (např. Malinský et al., 2002).

doby potřebné k nasnímání celého obrazu metodou „bod po bodu“. Použití standardní wide-field fluorescenční mikroskopie využívající CCD kamery, které měří intenzitu ve všech pixelech současně, však potřebné prodloužení doby měření umožňuje lépe (za tento důležitý odstavec vděčím doc. RNDr. Jaromíru Pláškoví). Podobně lze nahlížet i na využití konfokálních mikroskopů s rotujícím diskem, které jsou vybaveny CCD kamerami. Musím ještě dodat, že současné EM (electron multiplier)-CCD kamery jsou citlivější (kvantová účinnost DQE 97 % při vlnové délce 550 nm) než detektory s fotonásobiči (kvantová účinnost DQE 30 % při vlnové délce 550 nm, která dále výrazně klesá v červené části spektra) používané v CLSM (Pawley, 2006) a že v otázce šumu dojde k možnému průlomu implementací časoprostorových „denoising“ algoritmů (Kervrann a Boulanger, 2006; Pécot et al., 2008; Boulanger et al., 2009). Shrnu-li tento odstavec, CLSM představuje úžasný mikroskop využitelný v mnoha aplikacích, samozřejmě včetně *in vivo* pozorování, nicméně využití wide-field fluorescenční mikroskopie (popř. konfokální mikroskopie s rotujícím diskem), při které se mikroskopické obrazy snímají CCD kamerou, a je současně využito počítačové dekonvoluce, může být někdy vhodnějším řešením (především vhodnější projev zaklínadel typu citlivost, fototoxicita, vybělování, popř. rychlost). CLSM začíná rovněž ztrácet jednu výsadu z hlediska uživatele – zautomatizovaný provoz, neboť v tomto ohledu jej moderní wide-field mikroskopy a mikroskopy s rotujícím diskem začínají „dohánět“.

Na řadě buněčně biologických pracovišť jsou vyšetřovány tenké objekty, jako jsou buňky narostlé nebo přichycené na krycí sklíčko. I v tomto kontextu osobně považuji výkonné wide-field fluorescenční mikroskopy vybavené mimo jiné přesným a rychlým posunem mikroskopického stolku a (EM)-CCD kamerami za vhodné pro řešení řady projektů, především při 3D pozorování živých buněk a při snímání slabých signálů. Mimo to mohou být špičkové wide-field mikroskopy s velmi přesným posunem stolku vybaveny lasery, ovšem osvit preparátu v oblasti zájmu se v *in vivo* experimentech (např. v aplikacích FRAP či FRET – viz Bednár et al., 2004) činí skrze řízený rychlý posun stolku. Chybí samozřejmě konfokalita, takže odstraňování šumu se po získání snímků optickým prořezáním preparátu automaticky (!) a velmi rychle (v rozmezí vteřin až minut) provádí počítačovou dekonvolucí. Významným pokrokem ve vývoji wide-field mikroskopů je zjevně mikroskop OMX se zabudovaným strukturovaným osvitem SIM, který byl nedávno uveden na trh.

Volba konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem, při jehož vývoji je nemožné nezmínit zcela zásadní přínos českých vědců Mojžíra Petráně a Milana Hadravského, představuje jakousi střední cestu mezi wide-field mikroskopem a bodově rastrujícím CLSM. Původní rotující Nipkovovy disky s mnoha kulatými dírkami (clonkami) jsou dnes v komerčních mikroskopech významně vylepšeny přidáním mikrooček umístěných nad clonkami. Mikroočky soustřeďují světlo do clonky a zvyšují o více než jeden řád intenzitu paprsků dopadající na preparát. V kombinaci s lasery různých vlnových délek a dnes s využitím EM-

CCD kamer jsou kvalitní snímky pořizovány velmi rychle. Mikroskop může být doplněn FRAP modulem s možností vyznačit oblasti zájmu. Samozřejmě se to vše odráží ve vyšší ceně přístroje. Podle mého názoru mají tyto mikroskopy vůči CLSM (pro řadu vědeckých projektů samozřejmě také vůči wide-field mikroskopům) některé přednosti, které jsou využitelné při pozorování buněk *in vivo* a v případě slabých signálů. Konfokalita je ve srovnání s CSLM horší, lze ji však dohánět *a posteriori* přístupy. Jako alternativa se jeví další komerční mikroskop, kde nejsou využity clonky, ale zaměnitelné šterbiny různých rozměrů. To sice přináší horší konfokalitu, nicméně intenzita osvitu preparátu se ve srovnání s Nipkovovými disky výrazně zvyšuje.

Podobně jako u světelných mikroskopů, výběr prozařovacího elektronového mikroskopu se musí především řídit vědeckými projekty příslušného pracoviště. Pokud je pracoviště zaměřeno výlučně na zjišťování změn ultrastruktury buněk a tkání v biopsiích pacientů či přítomnosti rotavirů ve stolici pacientů, včetně provedení ultrastrukturálního imunocytochemického značení, na všechny tyto aplikace stačí pořízení v Brně vyráběného typu Morgagni nebo výkonnostně podobných mikroskopů jiných firem.

Zdůrazňuji, že zcela zavádějící je snaha dosáhnout maximálního rozlišení mikroskopu. To se u špičkových mikroskopů pohybuje v řádu 0,1 nm a je docíleno na nebiologických preparátech, jako jsou např. krystalická uspořádání atomů těžkých prvků. Pro biologické aplikace např. s ultratenkými řezy se i ve špičkových mikroskopech dosahuje reálného, biologicky významného rozlišení, které je spíše ne o jeden, ale o dva řády horší. Mluvím-li o buněčných strukturách, velmi si považuji tomografické rekonstrukce jedné z nejsložitějších buněčných struktur, jaderného póru, a to v prostorovém rozlišení (tedy ve všech souřadnicích *x*, *y* a *z*) 9 nm (Beck et al., 2004). Tohoto výsledku však bylo dosaženo nikoli na celých buňkách, ale na izolovaných, nicméně stále transportně aktivních jádrech Dictiostelium, přičemž jádra Dictiostelium byla vybrána pro jejich malý rozměr. Izolovaná jádra byla rychlým zmrazením vitrifikována a v elektronovém mikroskopu s kryonástavcem byla tomografie provedena pouze na okraji jádra, tj. v oblasti jádra o dostatečně malé tloušťce. Výsledky tomografické rekonstrukce získané na více jaderných pórech byly nakonec počítačově zprůměrovány. Dobrá zpráva je, že letos se zjevně dozvíme více i o nativní struktuře jaderného póru lidských buněk (Ohad Medalia a Ueli Aebi, osobní sdělení).

Na rozdíl od ultratenkých řezů či izolovaných buněčných organel (např. buněčného jádra) lze na izolovaných drobných strukturách, jako jsou ikosahedrické viry pozorované v tenké vitrifikované vrstvě dosáhnout biologicky významného rozlišení i pod 1 nm (např. Conway et al., 2003). Zde konkrétně k dosažení tak vysokého rozlišení napomáhá využití mnohonásobná symetrie virové částice (Raška, 1977).

Nezasvěcenému čtenáři není známo, že při tomografickém snímání jsou jednotlivé tomografické snímky pořízené kamerou vysoce „podexponovány“, takže i zkušenému pozorovateli nic neříkají. To je však nutný postup, neboť biologický preparát, a především nativní kryopreparát, je na osvit elektrony vysoce citlivý (i při tomografii pryskyřičných

řezů je vhodné omezit intenzitu osvitu – viz obr. 4). Avšak počítačem vytvořená tomografická rekonstrukce z několika desítek vysoce podexponovaných snímků je již dobře čitelná (obr. 7). Pro výběr výkonnějšího elektronového mikroskopu pro biologické aplikace uvádím myšlenkovou anabázi, kterou jsem musel projít při návrhu sestavy tomografického mikroskopu Tecnai Sphera s urychlovacím napětím 200 kV, kryonástavcem, dostatečně kvalitní (2x2k) CCD kamerou a modulem pro snímání při nízké dávce (low dose) elektronů pro naše pracoviště. K návrhu mne vedlo několik projektů, v nichž se využilo vitrifikované kryovrstvy při vysokorezolučním sledování nativní struktury komplexů biomakromolekul (obr. 3), jakož i při různých aplikacích v oblasti nanotechnologií (Kepczynski et al., 2009). Další projekty se např. týkají již zmíněné analýzy imunocytochemicky značených zreplikovaných segmentů DNA (Ligasová et al., 2009) nebo analýzy složitějších biostruktur v tenké vitrifikované vrstvě, u nichž je, na rozdíl od strukturně jednodušších trinukleozomů uvedených v obr. 3, již nutné provést tomografickou rekonstrukci. Musím zmínit, že rekonstrukci složitějších biologických objektů (např. proteinových či nukleoproteinových komplexů) lze rovněž provádět použitím velkého počtu jejich snímků, přičemž objekty jsou v tenké vitrifikované vrstvě náhodně orientovány; to však za předpokladu, že jsme schopni určit prostorovou orientaci objektů v tenké vitrifikované vrstvě.

Zásadním dilematem bylo, zda k mikroskopu požadovat energetický filtr. Filtr představuje velmi drahou nadstavbu, navíc bez pořízení další drahé investice, speciálního zdroje elektronů FEGu (Field Emission Gun), který poskytuje vysoce monochromatické elektrony, ztrácí pořízení energetického filtru do značné míry smysl. Ve srovnání se standardní, elektrony emitující katodou vyžaduje provoz FEGu podstatně vyšší vakuum (více než o jeden řád) a tento požadavek dále významně navyšuje cenu přístroje.

Energetický filtr umožňuje při tvorbě obrazu „vybrat“ elektrony jen o určité vlnové délce. Pro pochopení významu energetického filtru musím ve velmi zjednodušené formě zmínit způsob interakce elektronů s preparátem a tvorbu obrazu. Vysoce urychlené elektrony reagují v mikroskopu s preparátem dvojím způsobem. Při tvorbě věrného obrazu se uplatňují elastické elektrony, které jsou vychýleny jádrem atomů v preparátu, aniž by změnilly energii, tj. svoji vlnovou délku. Elektrony dopadající na preparát však rovněž reagují s elektronovým obalem atomů, jsou rovněž vychýleny ze své dráhy, avšak ztrácejí energii. A navíc také dochází i k vícečetným interakcím elektronu v preparátu. Takto „nevhodně“ reagující elektrony zásadně přispívají ke zničení struktury preparátu a ke zkreslení správného kontrastu biologických struktur v obraze preparátu. Vytvořený obraz preparátu tak přestává být věrným obrazem preparátu. A čím je preparát silnější, tím více se vytvoří oněch nevhodných elektronů. Zde se přímo uplatní energetický filtr, který pro vytvoření obrazu propustí jen elasticky vychýlené elektrony⁹. Situace

není alarmující v případě tenké vitrifikované vrstvy, tenkých pryskyřičných řezů nebo rozmrzlých tenkých kryorezů (fixovaného materiálu) o tloušťce do 100 nm. V případě tomografického zpracování silnějších objektů, jako jsou pryskyřičné kontrastované řezy o tloušťce kolem 200 nm, které jsou již vhodným objektem pro tomografické zpracování, se situace stává složitější, nicméně snímky lze stále bez velkých problémů vyhodnotit. Pozitivně se při tom uplatňuje i vyšší urychlovací napětí 200 kV¹⁰. Vyšší energie elektronů v 200 kV mikroskopu umožní nejen jejich průnik silnějším preparátem, ale navíc se ve srovnání s urychlovacím napětím 100 kV standardních elektronových mikroskopů zvýší relativní podíl elastických a nevhodných elektronů. Především podíl elektronů reagujících vícenásobně s preparátem významně klesá. V případě vysoce citlivých nativních vitrifikovaných kryorezů je situace již zcela kritická. Při tomografickém náklonu tenkého řezu o 60 i více stupňů se reálná tloušťka řezu pro dopadající elektrony významně zvýší, zvyšuje se tím počet nevhodných elektronů přispívajících ke tvorbě obrazu a vzhledem k zanedbatelnému inherentnímu kontrastu vitrifikovaného a nektrastovaného kryorezu nelze výsledný obraz správně vyhodnotit. Je nutné použít energetický filtr. Podobná je situace s velkými vitrifikovanými objekty, jako je izolované rozměrné, i když malé jádro *Dictiostelium*.

Vzhledem k těmto všem skutečnostem jsem upustil od energetického filtru a FEGu s plánem využívat metody tenké vitrifikované vrstvy a tomografie složitějších biostruktur v tenké vitrifikované vrstvě, jakož i tomografie (kontrastovaných) pryskyřičných řezů nebo rozmrzlých kryorezů o tloušťce kolem 200 nm. Řezy o této tloušťce jsou již vhodné pro nesčíslné tomografických aplikací na buněčné úrovni (Ligasová et al., 2009). Mikroskop je samozřejmě využitelný pro ultrastrukturální imunocytochemii na pryskyřičných řezech či rozmrzlých ultrakryorezech a pro CLEM, včetně tomografického CLEMu. Musím zdůraznit, že bezpodmínečnou podmínkou pro využitelnost mikroskopu pak byla přítomnost doc. Jana Bednára na našem pracovišti; ten je mezinárodně uznávaným odborníkem na nativní kryoelektronovou mikroskopii. Bez něho bych si nemohl dovolit jít do soutěže o tak výkonný a drahý mikroskop.

ZÁVĚR

Po přečtení článku čtenáře napadne, že i tento příspěvek je nevyvážený. Vzhledem k jeho rozsahu nebylo možné se věnovat např. FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), FLIM (Fluorescence Lifetime IMaging) a dokonce ani multifotonovému mikroskopu (viz však legenda k obr. 2). A také nově komerčně dostupným mikroskopům, elektronovému mikroskopu KRIOS s urychlovacím napětím 300 kV optimalizovanému

⁹V určitých situacích je k získání cenných informací o preparátu výhodné, aby energetický filtr „propustil“ při tvorbě obrazu výlučně „nevhodné“ elektrony.

¹⁰Ještě výhodnější je samozřejmě urychlovací napětí 300 kV, které zjevně představuje pro tomografické biologické aplikace optimum. Ovšem 300kV mikroskop je několikanásobně dražší než 200 kV mikroskop.

pro pozorování biologických vzorků či luminescenčnímu mikroskopu vhodnému pro dlouhodobá *in vivo* pozorování. Vezmu-li však v potaz otázku: „Kudy, kam a proč?“, z tohoto pohledu považuji sdělení za přiměřeně vyvážené. Konec konců to byla i určitá osobní povinnost nasměrovat článek tímto směrem.

Výhledem do budoucna chci příspěvek uzavřít. Tomografie a pozorování nativních kryopreparátů znovu oživily zájem o biomedicínsky zaměřenou elektronovou mikroskopii. Nativní kryoelektronová mikroskopie se stále více ukazuje jako nepostradatelný partner krystalografických a jiných strukturních přístupů. V buněčné biologii bude elektronová mikroskopie i v budoucnu poskytovat nesrovnatelně vyšší rozlišení než mikroskopie světelná¹¹, navíc ji lze v CLEMu kombinovat se světelnou mikroskopií živých buněk.

Rozvoj světelné mikroskopie je tak obrovský, že lze jen těžko předvídat, jaká další krásná překvapení nás čekají za 5 let. Chci v tomto ohledu uzavřít sdělení odkazem na „metamateriálové“ superčočky (superlens) s negativním (!) indexem lomu a na další alternativy, které jsou ve velmi srozumitelné formě shrnuty v krátkém přehledovém sdělení z minulého roku (Zheludev, 2008).

Poděkování:

Jsem vděčný Janu Bednárovi, Janu Černému, Guy Hagenovi, Lubomíru Kováčikovi, Jaromíru Pláškov, Jakubu Sikorovi a Miroslavu Vařechovi za cenné rady. Janu Bednárovi děkuji za pečlivé pročtení rukopisu. Velký dík patří Jaromíru Pláškov za diskusi a zevrubnou revizi závěrečného rukopisu. Za laskavé poskytnutí snímků děkuji Evženu Smirnovovi (obr. 1), Zuzaně Cvačkové (obr. 2), Janu Bednárovi (obr. 3), Lubomíru Kováčikovi (obr. 4), Veronice Moravčikové (obr. 5), Janě Šmigové (obr. 6), Michailu Eltsovovi a Ashrafu Al-Amoudimu (obr. 7). Vznik článku byl podpořen granty MŠMT MSM0021620806 a LC535, AVČRAV0Z5011050, Welcome Trustu 075834/04/Z, GAČR304/05/2168, GAČR304/06/1662, GAČR304/06/1691, GAČR304/09/1047 a GAUK 13308.

Věnování

Článek je věnován památce doc. RNDr. Josefa Reischiga, CSc.

Ivan Raška

Ústav buněčné biologie a patologie

1. LF UK v Praze

Albertov 4, 128 01 Praha

E-mail: iraska@lf1.cuni.cz

LITERATURA

1. Al-Amoudi A, Diez DC, Betts MJ, Frangakis AS. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature*, 2007, 450, s. 832–837.
2. Beck M, Förster F, Ecke M, Plitzko JM, Melchior F, Gerisch G, Baumeister W, Medalia O. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 2004, 306, s. 1387–1390.
3. Bednár J, Staněk D, Malinský J, Koberna K, Raška I. Dnešní mikroskopie v biomedicině. *Vesmír*, 2004, 83, s. 581–585.
4. Boulanger J, Kervrann C, Bouthemy P. A simulation and estimation framework for intracellular dynamics and trafficking in video-microscopy and fluorescence imagery. *Med Image Anal*, 2009, 13, s. 132–142.
5. Coates CG, Denvir DJ, McHale NG, Thornbury KD, Hollywood MA. Optimizing low-light microscopy with back-illuminated electron multiplying charge-coupled device: enhanced sensitivity, speed, and resolution. *J Biomed Opt*, 2004, s. 1244–1249.
6. Conway JF, Watts NR, Belnap DM, Cheng N, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC. Characterization of a conformational epitope on hepatitis B virus core antigen and quasiequivalent variations in antibody binding. *J Virol*, 2003, 77, s. 6466–6473.
7. Cvačková Z, Mašata M, Staněk D, Fidlerová H, Raška I. Chromatin position in human HepG2 cells: Although being non-random, significantly changed in daughter cells. *J Struct Biol*, 2009, 165, s. 107–117.
8. Dobrucki JW, Feret D, Noatynska A. Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: Phototoxic effects and relevance for FRAP studies. *Biophys J*, 2007, 93, s. 1778–1786.
9. Fidlerová H, Mašata M, Malinský J, Fialová M, Cvačková Z, Loužecká A, Koberna K, Berezney R, Raška I. Replication-coupled modulation of early replicating chromatin domains detected by anti-actin antibody. *J Cell Biochem*, 2005, 94, s. 899–916.
10. Kalmárova M, Kováčik L, Popov A, Testillano SP, Smirnov E. Asymmetrical distribution of the transcriptionally competent NORs in mitosis. *J Struct Biol*, 2008, 163, s. 40–44.
11. Kepczynski M, Bednár J, Lewandowska J, Staszewska M, Nowakowska M. Hybrid silica-silicone nanocapsules obtained in catanionic vesicles. Cryo-TEM studies. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9, s. 3138–3143.
12. Kervrann C, Boulanger J. Optimal spatial adaptation for patch-based image denoising. *IEEE Trans Image Process*, 2006, 15, s. 2866–2878.
13. Ligasová A, Raška I, Koberna K. Organization of human replicon: singles or zipping couples? *J Struct Biol*, 2009, 165, s. 2004–2013.
14. Malinský J, Koberna K, Bednár J, Štulík J, Raška I. Searching for active ribosomal genes in situ: light microscopy in light of the electron beam. *J Struct Biol*, 2002, 140, s. 227–231.
15. Murray JM, Appleton PL, Swedlow JR, Waters JC. Evaluating performance in three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc*, 2007, 228, s. 390–405.
16. Pawley J. Fundamental limits in confocal microscopy. In: Pawley J, ed. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York: Springer, 2006; 20–41.
17. Pécot T, Kervrann C, Bardin S, Goud B, Salamero J. Patch-based Markov models for event detection in fluorescence bioimaging. *Med Image Comput Assist Interv Int Conf Med Image Comput Assist Interv*, 2008, 11, s. 95–103.
18. Plášek J. Proměny světelné mikroskopie ve 20. století. *Vesmír*, 2004, 83, s. 146–153.
19. Raška I. Možnosti elektronové mikroskopie v biologických oborech. Některé aspekty analýzy obrazu a trojrozměrné rekonstrukce. *Čs. Fyziologie*, 1977, 26, s. 61–76.
20. Vaněk S. Za limity optické mikroskopie. *Vesmír*, 2008, 87, s. 309–310.
21. Westphal V, Rizzoli SO, Lauterbach MA, Kamin D, Jahn R, Hell SW. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 2008, 320, s. 246–249.
22. Zheludev NI. What diffraction limit? *Nature Mat*, 2008, 7, s. 420–422.

¹¹I když se skupině C. Cremera z Heidelbergu metodou SALM (Spectrally Assigned Localization Microscopy) podařilo docílit rozlišení pod 20 nm a skupině S. Hella z Göttingenu v přístupu využívajícím STED dokonce rozlišení pod 10 nm, jednalo se vždy o rozlišení představující vzdálenost mezi 2 fluorochromy. Ovšem na rozdíl od elektronmikroskopických snímků chybí ve fluorescenčním obraze celkový kontext buňky.