

# Dnešní mikroskopie v biomedicíně

*Pohyb molekul v přímém přenosu z živé buňky a další kouzla*

V minulých stoletích se světelné mikroskopy v biologii používaly převážně pro pozorování a popis buněk či jejich výrazných struktur. Rozvoj fluorescenční mikroskopie umožnil lokalizovat v biologických systémech i jednotlivé makromolekuly. Izolace zeleně fluoreskujícího proteinu (GFP – green fluorescent protein) z medúzy, příprava jeho barevných variant (YFP – žlutá, CFP – modrozelená ad.) a objevy dalších fluoreskujících proteinů (od modrých po červené) v mořských korálech společně s rozmachem konfokální mikroskopie (Vesmír 83, 586, 2004/10) v uplynulém desetiletí posunuly hranice poznání v buněčné biologii a rozšířily možnosti světelného mikroskopu. Mikroskopy dnes neslouží jen k prostému popisu buněčných organel, ale pomáhají odhalovat pohyb i interakce jednotlivých molekul, především proteinů, přímo v buňkách, a tím přispívají k pochopení jejich biologických funkcí.

Protein, který chceme studovat, nejdříve přímo v buňce geneticky „vybavíme“ fluorescenčním přídatkem, např. již zmíněným GFP<sup>1</sup> (chceme-li sledovat více proteinů současně, použijeme pro každý typ proteinu jinou barevnou variantu přídatku). Abychom mohli úspěšně popsat jeho dynamické chování, stačí navodit stav, při němž je pouze určitá část molekul tohoto proteinu fluorescenčně aktivní. Toho se dosahuje dvěma, v principu opačnými přístupy: cíleným „vybělením“ (fotodegradací) nebo fotoaktivací fluorescence.

● **Vybělení fluorescence.**<sup>2</sup> Zvolenou oblast buňky nejprve osvítime intenzivním laserovým pulzem s vlnovou délkou odpovídající excitační vlnové délce GFP. Tím „označené“ molekuly proteinu (tj. vybavené fluorescenčním přídatkem), které se právě nacházely v dané oblasti, ztratí svou schopnost fluoreskovat. Molekuly, které se nacházely mimo tuto oblast, schopnost fluoreskovat neztratí-

ly a postupně pronikají do sledované oblasti. Intenzitu i rychlost těchto pohybů lze pozorovat dvěma rozdílnými způsoby:

– jako opětovný *nárůst fluorescence* ve „vyběleném“ objemu (obr. 1),<sup>3</sup>

– jako *úbytek fluorescence* mimo něj.<sup>4</sup>

● **Fotoaktivace fluorescence.** Příkladem je fotoaktivovatelná varianta GFP (PA-GFP). Ta je v buňkách syntetizována ve stavu, ve kterém nevykazuje žádnou fluorescenci v oblasti viditelného světla. Jestliže ji však osvítime intenzivním zářením o krátké vlnové délce (400–420 nm), struktura molekuly PA-GFP se změní, a tím se aktivuje fluorescence v oblasti zeleného světla, obdobná jako u klasického GFP. Tato metoda tak umožňuje „označit“ molekuly, které se během fotoaktivace nacházejí ve vybrané oblasti (obr. 4, s. 583), a je tak velmi vhodná pro pozorování pohybu molekul mezi buňkami v tkáních či mezi jednotlivými strukturami v rámci jedné buňky.

Oba popsané přístupy pak vypovídají nejen o tom, kde se sledované proteiny v buňce vyskytují a jak rychle se pohybují, ale přinášejí i odpovědi na otázky „Jak dlouho trvá přepis genu?“, „Jak rychle po skončení reakce je daný enzym znovu použit?“ ap.

Kromě pohybu a lokalizace jednotlivých proteinů je důležité vědět, zda spolu sledované proteiny interagují, popřípadě kde a jak intenzivně. Technika umožňující sledovat to přímo v buňce je založena na **nezářivém přenosu excitační energie** (FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer), který popsal T. Förster v polovině 20. století. V principu jde o přenos energie mezi dvěma vhodnými fluorochromy nacházejícími se v příhodné orientaci a vzdálenosti. Pokud se molekuly fluorochromů CFP a YFP k sobě dostatečně přiblíží (typická vzdálenost pro FRET je 5 nm) a vhodně se vůči sobě natočí, je pravděpodobné, že po excitaci molekuly CFP tato molekula získanou energii nezářivě předá blízké molekule YFP, takže místo modrozelené fluorescence pozorujeme fluorescenci žlutou (obr. 5, 6, s. 584). Máme-li tedy buňku, která produkuje rekombinantní formy dvou zvolených proteinů kombinovaných s CFP, resp. YFP a tyto proteiny spolu v buňce interagují, může se stát, že budou obě základní podmínky pro nezářivý přenos excitační energie během interakce splněny a k měřitelnému přenosu energie z donoru na akceptor dojde. Přenos excitační energie představuje vhodný nástroj k detekci mezimolekulárních interakcí v buňkách. Lze tak například zjistit,

**JAN BEDNÁR  
DAVID STANĚK  
JAN MALÍNSKÝ  
KAREL KOBERNA  
IVAN RAŠKA**

Jan Bednár (\*1960) získal Ph.D. u profesora J. Dubocheta v Lausanne, kde se věnoval vývoji metodiky nativních kryožezů a jejich aplikace na studium struktury chromatinu *in situ*. Později zkoumal topologické vlastnosti DNA-proteinových komplexů, zejména 30 nm chromatinového vlákna, pomocí techniky tenké vitrifikované vrstvy. Nyní se jako stálý pracovník Národního střediska pro vědecký výzkum (CNRS) na univerzitě v Grenoblu zabývá elasticitou 30nm chromatinového vlákna za použití optické pinzety.

David Staněk, Ph.D., (\*1970) vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK. V dráždanském Ústavu Maxe Plancka pro buněčnou biologii a genetiku se zabývá dynamikou proteinů a RNA v živých buňkách a studiem makromolekulárních komplexů pomocí FRET. Oba autoři plánují vrátit se do Prahy v roce 2005.

Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc., (\*1945), RNDr. Karel Koberna, CSc., (\*1965) a RNDr. Jan Malínský, Ph.D., (\*1970) se v Ústavu buněčné biologie a patologie 1. LF UK a na oddělení buněčné biologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR zabývají funkční organizací buněčného jádra.

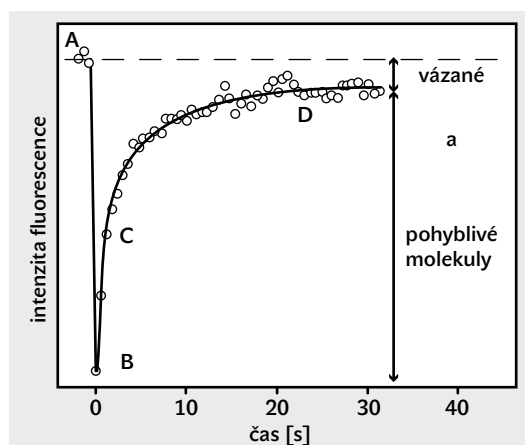
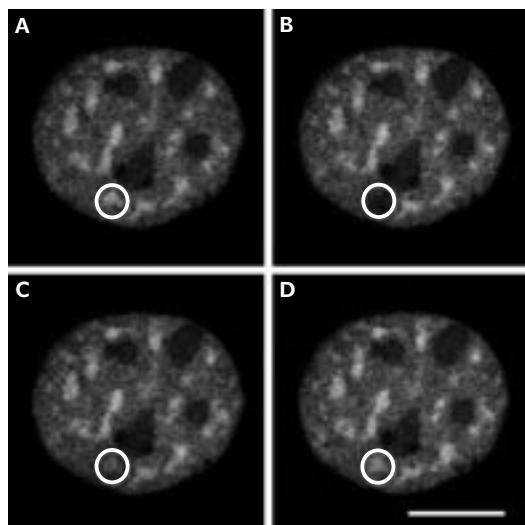
1) V případě eukaryotických buněk se do buněčného jádra vpraví DNA, která obsahuje genetický kód pro zvolený protein spolu s kódem pro GFP. Na základě této genetické informace si buňka sama syntetizuje protein kombinovaný s GFP – takzvaný rekombinantní protein. Protože při této přípravě fluorescenčně značeného proteinu zůstává produkce původního „buněčného“ proteinu nezměněna, je třeba před vlastním experimentem otestovat kromě funkčnosti rekombinantního proteinu i vliv nadprodukce studovaného proteinu na chování buňky.

2) Poznámka redakce: Ve Vesmíru jsme dosud užívali termín „vysvícení“, který asi lépe postihuje podstatu jevu: svítí-li se dlouho na vzorek, který je fluorescenčně značen, „světélkování“ zhasne a v zorném poli mikroskopu „nastane tma“. Nicméně v odborném jazyce byl zaveden termín „vybělení“, k němuž se přikláníme.

3) Odborníci znají tuto metodu pod zkratkou FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

4) V tomto případě mluvíme o metodě FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching).

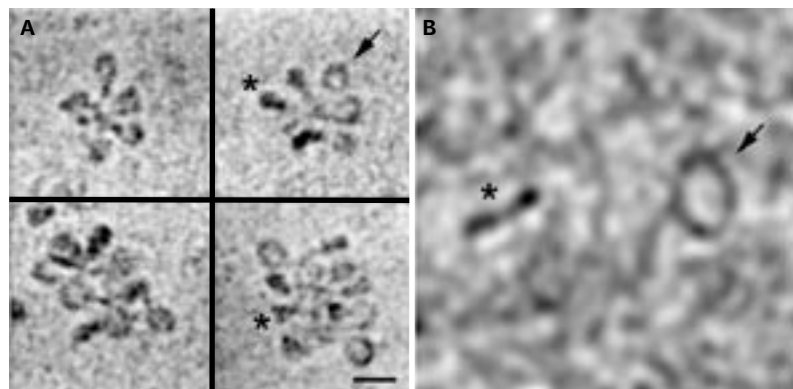
1. FRAP analýza pohybu jednoho ze sestřihových faktorů nahromaděného v jaderných skvrnách (speckles; viz např. Vesmír 79, 438, 2000/8) v živé buňce. Na obrázcích je jádro savčí buňky před (A) a ihned po (B; v čase  $t = 0$  s) vybělení fluorescence v oblasti odpovídající jedné jaderné skvrně (v bílém kroužku), následně pak v průběhu (C) a po dokončení (D) obnovy fluorescenčního signálu ve vybělené oblasti. Intenzita fluorescence v této oblasti byla měřena v časových intervalech 0,5 s. Naměřená časová závislost postupného obnovy fluorescence obsahuje důležité informace. Kromě podílu volně pohyblivých molekul sledovaného proteinu z ní lze určit i rychlost jejich difuze nukleoplazmou a dynamiku vazby proteinu na jaderné skvrny. Je zřejmé, že s výjimkou malé pevně vázané frakce se molekuly proteinu v jaderných skvrnách rychle obměňují (nepublikované výsledky J. Večeřové, pořízené v laboratoři T. Misteliho v USA). Měřítko: 5  $\mu\text{m}$ .



kde se v buňce vytvářejí makromolekulární komplexy, které právě studujeme (obr. 6).

Metody světelné mikroskopie nám poskytují prostředek ke studiu uspořádání a dynamiky buněčných struktur, nicméně jejich rozlišení je příliš omezující („jen“ v řádu desetin mikrometrů). Zvýšit jej lze jinými mikroskopickými přístupy. Z nich jsou nejrozšířenější

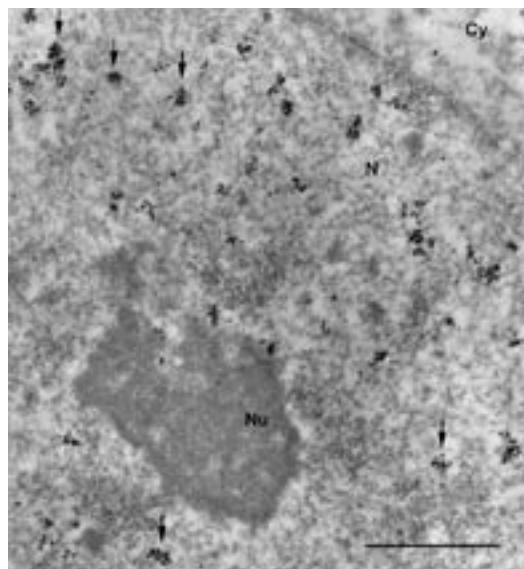
2. A – Elektronová kryomikroskopie izolovaného chromatinu. DNA se v buněčném jádře nachází v komplexu s množstvím proteinů, zejména histonů, které tvoří malé proteinové cívky – nukleozomy –, okolo nichž je DNA v pravidelných intervalech navinuta a vytváří chromatinové vlákno. Jednotlivé části snímku představují segmenty různé velikosti tohoto vlákna. Protože jsou zachovány ve své původní trojrozměrné konformaci, jsou nukleozomy zachyceny v různých projekcích (příklad pohledu zpredu je označen šipkou, příklad pohledu z boku hvězdičkou). Měřítko: 20 nm. B – Snímek minikroužku DNA pořízený elektronovým kryomikroskopem; 156 párů bází dlouhá molekula DNA uzavřená do cirkulární formy a vytvářející miniaturní obruč o průměru přibližně 16 nm. Protože ve vitrifikované vrstvě může být volně orientovaná, lze najít i projekce čisté boční, kde se kruh mění v úsečku.



metody elektronové mikroskopie („vidí“ v řádu desetin nanometrů, tedy tisíckrát více než optické). Zmíníme se o třech, které mají velké uplatnění v biomedicinském výzkumu: o počítačové tomografii, korelaci souběžné světelné a elektronové mikroskopie a nativní elektronové kryomikroskopii.

**Počítačová tomografie v elektronové mikroskopii** umožňuje ze sady snímků pořízených pod různými úhly pohledu rekonstruovat prostorový obraz vzorku (princip je popsán v Mikroskopii dnes, Vesmír 83, M9, 2004/3). Existuje množství vědeckých problémů, pro jejichž řešení je počítačová tomografie optimální nástroj. Jako příklad uvádíme studium organizace replikačních domén v jádře lidské buňky (obr. 3), jejichž velikost a uspořádání jsou vhodné pro tomografickou analýzu. V České republice zatím bohužel moderní elektronový mikroskop s automatickou tomografickou výbavou postrádáme.

Jiným nepochybně perspektivním přístupem je **srovnávací (korelativní) světelná a elektronová mikroskopie**, která studuje jediný jev pomocí současného použití světelné a elektronové mikroskopie. Zatímco světelná mikrosko-



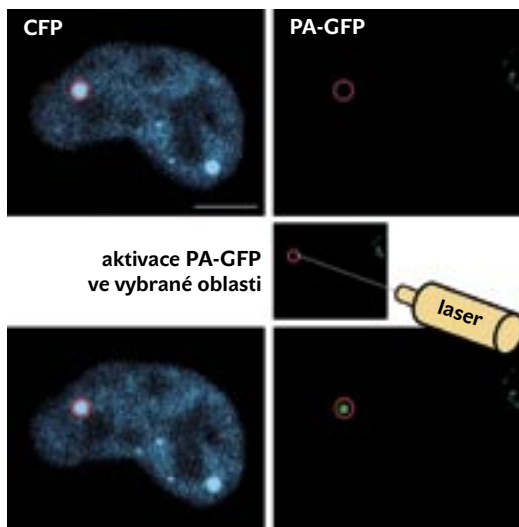
3. Elektronmikroskopický obraz řezu lidskou buňkou s místy nově se replikující DNA. Místa replikující se DNA byla imunocytochemicky označena a zviditelněna jako malé shluky stříbrných částic (příklady označeny šipkou). Struktury tohoto typu jsou vhodné pro tomografickou rekonstrukci (Anna Ligasová, nepublikované výsledky). Cy – cytoplazma, N – jádro, Nu – jadérko. Měřítko: 0,5  $\mu\text{m}$ .

pie dovoluje pozorovat živé buňky, a tedy sledovat např. časový průběh studovaného jevu, elektronová mikroskopie díky vysoké rozlišovací schopnosti odhaluje jemné detaily, které by jinak zůstaly skryty. Světelnémikroskopický obrázek se následně porovnává s elektronmikroskopickým snímkem téže oblasti buňky a studovaná struktura se detailně popisuje i z hlediska jejího uspořádání. V některých případech tento přístup nejen zpřesní světelnými

5) Významné zlepšení v tomto směru představuje metoda mrazové substituce. Změny probíhající ve vzorku během nahrazování vody při nízké teplotě a následném zalití však dovoluji hovořit o uchování nativního obrazu vzorku pouze v omezeném rozlišení.

kroskopická pozorování, ale pomůže odhalit i chybné závěry založené pouze na výsledcích světelné mikroskopie. Omezená rozlišovací schopnost fluorescenčního mikroskopu např. nedovolí jednoznačně určit, ve které části jáderka probíhá transkripce ribozomálních genů (obr. 7, s. 585). Matematické odstranění nezaostřené části fluorescenčního signálu (dekonvoluce) vede v tomto případě dokonce k chybnému umístění aktivních ribozomálních genů do fibrilárních center jáderka. Z elektronmikroskopického snímku je však zřejmé, že transkripčně aktivní geny jsou soustředěny výlučně v denzních fibrilárních komponentách. Vysoké prostorové rozlišení elektronové mikroskopie je v tomto případě nenahraditelné.

**Elektronová kryomikroskopie** je zatím jediná metoda elektronové mikroskopie, která dokáže zobrazit biologický preparát v jeho nativním (přírozeném) stavu. Při použití klasických metod (Vesmír 83, 146, 2004/3) se musí biologický vzorek nejdříve vhodně fixovat, popřípadě šetrně zbavit vody (dehydratovat). To jsou však pomalé procesy, které poskytují buněčným strukturám dostatek času, aby se reorganizovaly nebo změnila svá uspořádání.<sup>5</sup> Elektronová kryomikroskopie umožňuje vodu v biologickém preparátu zachovat. Při teplotě okolo  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  je parciální tlak nasycených vodních par tak malý, že se voda neevaporuje ani v hodnotách vakua elektronového mikroskopu (resp. vypařuje se, ale velmi málo). Současně se veškeré chemické reakce zcela zastaví. Kdyby bylo možné biologický

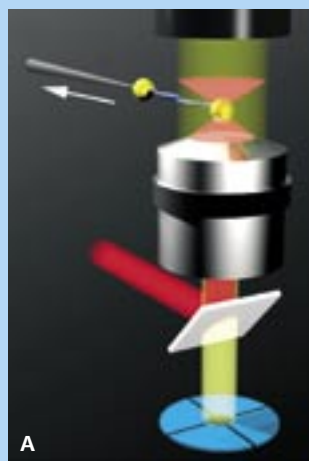


4. Fotoaktivovatelný GFP (PA-GFP). CFP a PA-GFP byly připojeny k bílkovinám, které se nacházejí ve specifických jaderných strukturách – Cajalových tělískách (Vesmír 79, 563, 2000/10). Zatímco CFP je snadno viditelný, PA-GFP je před aktivací v podstatě nedetekovatelný. Po fotoaktivaci laserem o vlnové délce 405 nm se molekuly PA-GFP v místě aktivace „rozsvítí“ a lze pozorovat jejich pohyb v buněčném jádře. Měřítka: 5  $\mu\text{m}$ .

vzorek „zmrazit“, a potom jej při dostatečně nízké teplotě pozorovat v elektronovém mikroskopu, zůstal by hydratovaný, tedy ve svém přírozeném stavu (zůstala by zachována jeho původní jemná struktura). Jakkoli to zní jednoduše, pro úspěšné uplatnění tohoto přístupu bylo třeba řešit řadu zásadních problémů. Při obyčejném zmrazení biologického materiálu vznikají krystaly ledu, což vytváří mnoho artefaktů, od přerozdělení rozpustných složek až po mechanická poškození. Dosáhne-li však rychlost ochlazení zhruba milion stupňů za sekundu, vzniká nekystalické pevné skupenství vody, amorfni led, který nemá na strukturu vzorku vliv. Tento proces se na-

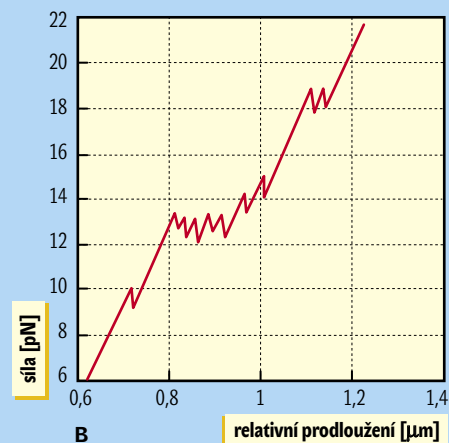
#### OPTICKÁ PINZETA

Aby naše informace o pohybu a interakcích sledovaných molekul byly úplnější, bylo by dobré změřit síly a energie nezbytné k vytvoření makromolekulárních komplexů nebo k přeskupení struktur, jejichž součástí jsou sledované bílkoviny. Jedním z moderních přístrojů, který umožňuje tyto velmi malé síly (a tedy nepřímo i energie) měřit, je optická pinzeta. Její princip objevil Arthur Ashkin koncem sedmdesátých let minulého století. V čem spočívá? Několikamikronový průhledný objekt, který se nachází v silném světelném paprsku s určitým rozdělením intenzity, bude vždy vtahován do místa s největší intenzitou. Jestliže tedy někde v prostoru vytvoříme bod, kde bude intenzita světla výrazně vyšší než v blízkém okolí, průhledný mikroobjekt bude do tohoto bodu přitážen a nebude s ním moci uniknout, dokud jej nějaká vnější síla z této „optické pasti“ nevytáhne. Vytvořit takový bod je možné pomocí zaostření intenzivního laserového svazku objektivem světelného mikroskopu s velkou numerickou aperturou (obr. A).<sup>\*</sup> Optická past funguje jako velice citlivý detektor síly, neboť síla  $F$  nutná k vychýlení objektu z klidové polohy v optické pasti je přímo úměrná velikosti vychýlení  $x$ , tedy  $F = k \cdot x$ . Konstanta  $k$  závisí na mnoha parametrech (tvaru a velikosti objektu, intenzitě laserového paprsku ad.) a lze ji určit kalibrací optické pinzety. Změříme-li pak s velkou přesností velikost vychýlení objektu z centra optické pasti (sou-



A – Schéma optické pinzety. Laserový paprsek (červeně) je odražen dichroickým zrcadlem (d) do objektivu mikroskopu a zaostřen. V ohnisku vzniká optická past, v níž je chycena malá kulička. Druhá kulička je upevněna v miniaturní pipetě a mezi nimi je upevněn vzorek (např. chromatinové vlákno). Obraz kuličky je promítán osvětlovacím systémem mikroskopu (žlutě) na detektor polohy kuličky (modře). Pohybem pipety (ve směru šipky) se natahuje vlákno a vychýlení kuličky v optické pinzetě lze zaznamenat elastickou křivkou. Dosáhneme-li při zkoumání chromatinu určité prahové síly, nukleozom se zborští (viz legendu k obr. 2) a náhle se uvolní zhruba 25 nm DNA, což se projeví „zubý“ na grafu (B).

časné metody umožňují přesnost až jednoho nanometru), budeme moci určit velikost síly, která na objekt působí. Takto je možné měřit síly řádu pikonewtonů ( $10^{-12}\text{ N}$ ) a zjistit např. elastické vlastnosti proteinových komplexů s DNA (obr. B). Podobné experimenty umožnily určit sílu, kterou je schopna vyvinout RNA-polymeráza během přepisu DNA do RNA, nebo síly spja-

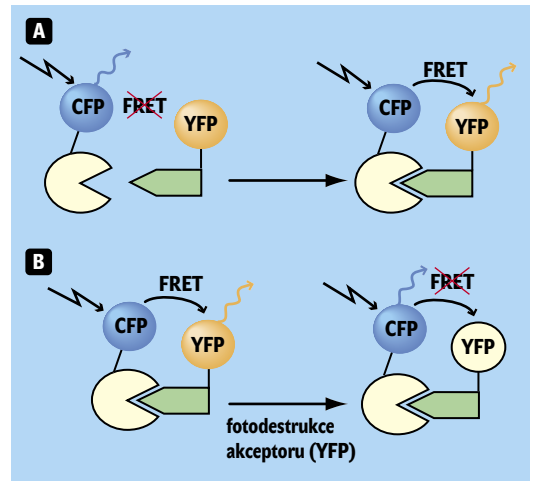


té s „kráčením“ kinezinu (typ molekulárního motoru, viz Vesmír 75, 309, 1996/06) podél mikrotubulu.

<sup>\*</sup>) Numerická apertura charakterizuje optickou soustavu v souvislosti s její rozlišovací schopností, hloubkou ostroty a množstvím světla, které jí projde za určitý čas. Čím je větší, tím více detailů soustava rozlišuje a tím více světla jí prochází.

5. Modely detekce nezářivého přenosu excitační energie (FRET) mezi molekulami CFP a YFP. A – Pokud se molekuly CFP a YFP připojí k bílkovinám, které spolu interagují, mohou se CFP a YFP přiblížit na vzdálenost okolo 5 nm. Při vhodné orientaci obou molekul může dojít k nezářivému přenosu excitační energie, při němž se excitační energie z donoru (CFP) přenesou na akceptor (YFP), který ji následně vyzáří a toto záření je detekováno. B – Alternativní postup nepřímého měření FRET; akceptor (YFP) se „zničí“ silným laserovým pulzem. FRET se po fotodestrukci akceptoru projeví zvýšením fluorescence donoru (CFP) o energii, která byla před fotodestrukci přenášena na akceptor.

Přímé měření emise akceptoru po excitaci donoru (A) je velmi vhodné pro měření v živých buňkách, nicméně náročné na pečlivé a zdlouhavé provádění celé sady kontrolních měření. Nepřímá metoda detekce FRET pomocí zvýšení fluorescence donoru po fotodestrukci akceptoru (B) poskytuje velmi dobré výsledky převážně u fixovaných preparátů (obr. 6). Další technika pro detekci FRET je založena na měření toho, jak se zkracuje dohasínání fluorescence donoru při realizaci přenosu energie z donoru na akceptor. Rychlost dohasínání fluorescence donoru je možné měřit v živých buňkách, navíc i v případě fluorochromů s velmi podobnými spektry. Tento přístup však vyžaduje technicky i finančně náročné vybavení pro detekci s nanosekundovým časovým rozlišením, a není proto běžně dostupný.



zývá **vitrifikace** a její použití na biologický materiál bylo klíčovým krokem pro zavedení metod elektronové kryomikroskopie v biologii. Při vitrifikaci se vzorek zchladí (a tedy fixuje) během několika desítek mikrosekund, což mimo jiné umožní zavést tzv. **časově rozlišenou elektronovou mikroskopii**. Můžeme si představit, že studovanou biologickou reakci spustíme a vzorky budeme připravovat vždy po uplynutí určitého časového intervalu. Časové rozlišení se bude pohybovat v řádech jednotek až desítek sekund, ale stále to je o několik řádů rychleji než při přípravě vzorku standardní metodou.

Amorfní led je bohužel nestabilní struktura, která při překročení mezní (devitrifikační) teploty přechází do formy krystalické. Proto se po vitrifikaci vzorku musí všechny operace provádět při teplotě nižší než devitrifikační

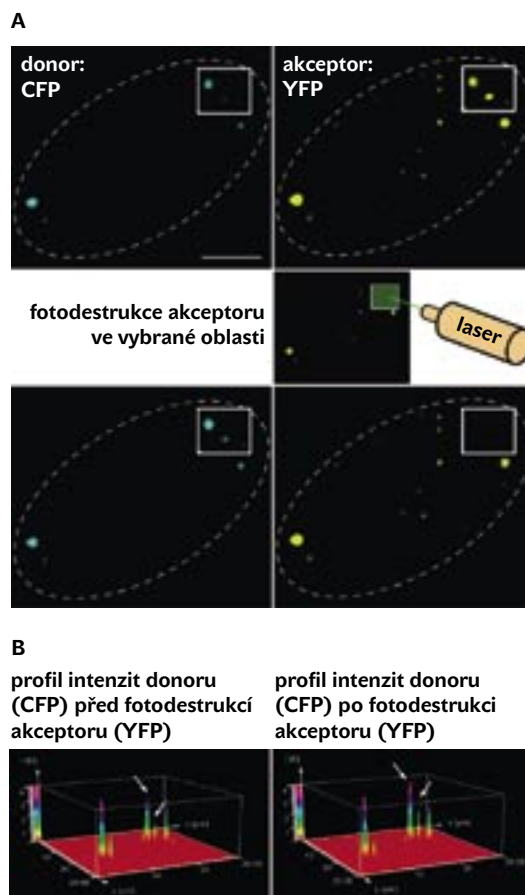
(-130 °C) a elektronový mikroskop musí být přizpůsoben pro práci za těchto teplot. Dnes jsou nezbytná kryovytavení k elektronovým mikroskopům běžně dostupná i v České republice a některá pracoviště u nás jsou jimi již vybavena.

Existují dvě základní techniky elektronové kryomikroskopie. Mikroskopie tenké vrstvy a mikroskopie nativních hydratovaných ultratenkých řezů. **Mikroskopie tenké vitrifikované vrstvy** se používá především ke studiu izolovaných proteinových a nukleoproteinových komplexů a částic až do velikosti asi 200 nm. Umožňuje dosáhnout subnanometrového rozlišení při zachování zcela nativního stavu biologického komplexu (obr. 8). Tato procedura nedovoluje dodatečné kontrastování těžkými kovy, a výsledný kontrast snímků je proto velice slabý. Naštěstí pokrok v zobrazovací kvalitě elektronových mikroskopů, zejména konstrukce vysokokontrastních objektivových čoček a vysoce koherentních zdrojů elektronů, umožňuje využít fázový kontrast. Tím lze bez dodatečného kontrastování zviditelnit i takové struktury, jako jsou DNA nebo chromatinové vlákno (obr. 2). Navíc skutečnost, že je preparát zachován ve svém původním prostorovém uspořádání, umožňuje jeho věrnou rekonstrukci. Byly to právě výsledky elektronové kryomikroskopie (obr. 2A), které vedly k zásadní změně pohledu na uspořádání 30nm chromatinového vlákna a vyústily v zavedení „cickak“ modelu.<sup>6</sup>

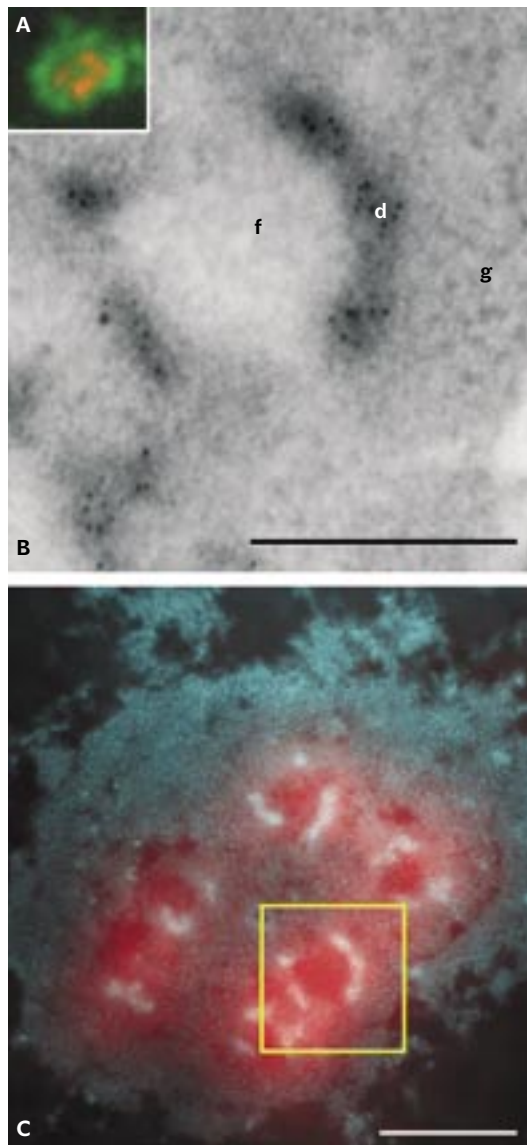
Pro pozorování nativních preparátů tkání nebo buněk se používá **elektronová kryomikroskopie nativních hydratovaných řezů**. Jak napovídá název techniky, jde o přípravu ultratenkých (-50 nm) řezů vitrifikovaného biologického materiálu. Metoda zahrnuje množství technologicky velice náročných postupů, od samotné vitrifikace „objemného“ vzorku přes ultratenké krájení a operace s řezy při velmi nízkých teplotách po vlastní pozorování v elektronovém mikroskopu. Přestože se tato velmi složitá metoda vyvíjí již více než dvacet let, zvládají ji pouze nejmodernější laboratoře.

Po přípravě ultratenkých řezů nebo tenké vitrifikované vrstvy následuje bez jakýchkoli dodatečných operací pozorování v elektronovém mikroskopu. I tady nastává řada obtíží, neboť vzorek je nesmírně citlivý na elektrono-

6. Nezářivý přenos excitační energie (FRET) v buněčném jádře. A – CFP a YFP byly připojeny k bílkovinám, které spolu v buňce interagují. Tyto bílkoviny se hromadí v Cajalových tělíčkách. FRET byl měřen nepřímou metodou (obr. 5B). Po fotodestrukci akceptoru (YFP) ve vybrané oblasti buňky o velikosti asi 4 × 5 μm (bílý obdélník) se FRET projeví jako zvýšený signál donoru (CFP) v dané oblasti. Buněčné jádro je naznačeno přerušovanou čarou. B – Pohled na stejnou buňku jako na obrázku A. Profily intenzit donoru (CFP) před fotodestrukci akceptoru (YFP) a po ní jasně ukazují zvýšení fluorescence pouze v tělíčkách, ve kterých byl akceptor zničen (bílé šipky). Měřítka: 5 μm.



vý svazek. Kromě jiného zvyšuje jeho interakce s elektrony lokální teplotu a to může vést k následné krystalizaci vody. Vyhledávání vhodné oblasti vzorku i vlastní snímkování se proto musí provádět při minimální intenzitě svazku elektronů a typická celková dávka by neměla přesáhnout 1000 elektronů na čtvereční nanometr (tj. stokrát až tisíckrát méně než u klasického preparátu). To značně zvyšuje nároky na citlivost snímání signálu. Mikroskopy jsou proto v poslední době vybavovány citlivými CCD-kamerami, jejichž zavedení dokonce umožnilo realizovat **elektronovou**



7. Simultánní světelná a elektronmikroskopická lokalizace míst transkripce ribozomálních genů na řezu jádrkem lidské buňky. Ve fluorescenčním mikroskopu (A) je jadrový transkripční signál soustředěn do malých ohnisek (červeně) rozptýlených uvnitř jáderka (zeleně). Po použití elektronové mikroskopie (detailní pohled v B, celé jádrko modrozeleně v C) je zřejmé, že zlaté kuličky (černé tečky v B), které odpovídají místům výskytu nově syntetizovaných ribozomálních RNA, se nacházejí výhradně v jisté oblasti jáderka označované jako denzní fibrilární komponenty (d). Na počítačové kombinaci obou snímků (C) je patrné, že ohniska fluorescence (červeně) naproti tomu zasahují ještě jak do fibrilárních center (f), tak do granulární části jáderka (g). Měřítka: 200 nm (B), 500 nm (C). Obrázek je publikován s laskavým svolením Journal of Cell Biology, The Rockefeller University Press.

### GFP - JEDINEČNÁ SVÍTÍCÍ BÍLKOVINA

Molekula zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), izolovaná z mořské medúzy pohárovky (*Aequorea victoria*), má podobu soudku o průměru 3 a výšce 4 nm, v němž je uzavřen unikátní obsah: skupina tří aminokyselin (SYG – Serinu, Tyrosinu a Glycinu), která při osvětlení modrým světlem zeleně fluoreskuje. Je hodně jiných bílkovin, které ve svém řetězci mají stejnou sekvenci aminokyselin, a přesto nesvítilí. V GFP „světlo noš uzraje“, až když se po dokončení proteosyntézy polypeptidový řetězec sbalí do podoby zmíněného soudku. Téměř uprostřed, dokonale ochráněna od okolních vlivů, se skupina SYG přemění do cyklické podoby, oxiduje a začne fluoreskovat.

Na rozdíl od ostatních fluoreskujících bílkovin, které jsou citlivé na světlo až po připojení nějaké exotické molekuly, je molekula GFP schopna provést tuto kosmetickou změnu sama na sobě, modifikací svých vlastních aminokyselin. Pro její využití ve vědě to má obrovský význam – protože nepotřebuje žádný specifický enzym ze „své“ medúzy, lze GFP připravit v libovolném organismu. Oba konce GFP molekuly zůstávají navíc vně soudku a jsou tedy volně přístupné. Na libovolný z nich lze proto další peptidovou vazbou připojit jiné bílkoviny, a to již na genové úrovni. Stejně jako při syntéze samotného GFP, po vytvoření fúzního proteinu z GFP a studované bílkoviny se soudek GFP sám sbalí a připraví pánům vědcům k laskavému použití. Sledování míst výskytu studované bílkoviny je pak triviální – stačí si na ni posvítit modrým světlem, které budí fluorescenci GFP.



**kryotomografii.** Vůbec nejobtížnější je pravděpodobně interpretace získaných snímků. Za dobu padesáti let si biologové zvykli na vysoce kontrastní obrázky buněk a buněčných struktur a nebylo nikdy pochyb, kde například je v buněčném jádře heterochromatin a kde euchromatin. Na nekонтastovaných řezech však tento rozdíl mizí a musí se hledat rozdíly jiné, například texturální (zrnitost, vláknité uspořádání ap.).<sup>7</sup> Naproti tomu lze na nativních hydratovaných řezech pozorovat detaily, které jsou v klasickém preparátu překryty kontrastními barvami, a hlavně jsou odstraněny všechny artefakty, které vznikají při přípravě vzorku standardními technikami. Je nesporné, že přínos této techniky odpovídá úsilí a prostředkům věnovaným na její vývoj. Některé vědecké výsledky nešlo získat jiným způsobem, např. údaje o uspořádání nukleozomů v tekutých krystalických fázích.

Využití mikroskopů a nových mikroskopických přístupů v buněčné biologii prodělalo v posledních patnácti letech bouřlivý rozvoj, který stále pokračuje. Zásadním způsobem pomáhá hlouběji porozumět buněčným funkcím, ať již v základním biologickém výzkumu či v medicíně. Česká věda jej nemůže opomíjet, chce-li hrát důstojnou roli na mezinárodní vědecké scéně. Nutnou (avšak nikoliv postačující) podmínkou pro to však je, že se odpovídající přístrojové vybavení stane inventářem našich laboratoří.

6) Existují varianty techniky tenké vrstvy, které využívají i amplitudový kontrast (např. negativní kryokонтastování), ale jejich použití je omezené.

7) Přímé „čtení“ takových snímků bývá obtížné i pro odborníka, a proto snímek nativního kryofreze nezařazujeme.

8. Příprava vzorku pro elektronovou kryomikroskopii tenké vrstvy. Mikroskopická síťka pokrytá perforovanou membránou (v detailu jedno oko sítky) se upevní do pinzety a vzorek ve formě suspenze (například virus) se nanese pomocí pipety na membránu. Po šetrném odsátí většiny tekutiny vytvoří jeho zbytek na síťce velice tenkou vrstvu (50–150 nm), která je okamžitě ponořena do zkapalněného etanu o teplotě  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  (šipka) a vzorek je během několika desítek mikrosekund vitrifikován.

