

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

2014

Aneta Sedlmajerová

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE ŽIVÝCH BUNĚK**

**Bakalářská práce**

**AUTOR:** Aneta Sedlmajerová

**VEDOUCÍ PRÁCE:** RNDr. Karel Královec, Ph.D.

**2014**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES**

**FLUORESCENCE MICROSCOPY OF LIVING CELLS**

**Bachelor thesis**

**AUTHOR:** Aneta Sedlmajerová

**SUPERVISOR:** RNDr. Karel Královec, Ph.D.

**2014**

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

Akademický rok: 2012/2013

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Aneta Sedlmajerová**  
Osobní číslo: **C10449**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Fluorescenční mikroskopie živých buněk**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Vypracujte literární řešení obsahující:

1. Principy klasické fluorescenční mikroskopie, laserové konfokální mikroskopie a vícefotonové konfokální mikroskopie, případně dalších pokročilých mikroskopických technik umožňujících pozorování dějů v živých buňkách, jako je RET, BRET, FRAP, FLIM, konfokální mikroskopie s rotujícím diskem a mikroskopie se superrozlišením.
2. Přehled fluorescenčních značek (mitotrackerů, lysotrackerů atd.) a fluorescenčních proteinů (GFP, YFP, CFP, BFP, RFP atd.) používaných v mikroskopii živých buněk včetně jejich základních aplikací.
3. Vyvození závěrů o významu fluorescenční mikroskopie živých buněk pro současný biomedicínský výzkum a praxi.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Karel Královec, Ph. D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **13. prosince 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. Července 2013**

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L. S.

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph. D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Aneta Sedlmajerová

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu RNDr. Karlu Královcí, Ph.D. za odborné konzultace, poskytnuté materiály, trpělivost a pomoc při vedení mé bakalářské práce. Také děkuji rodině a blízkým přátelům za podporu během doby mého studia.

Aneta Sedlmajerová

## **Souhrn**

Tato bakalářská práce je zaměřena na fluorescenční mikroskopii živých buněk. V práci jsou popsány principy fluorescenční mikroskopie, laserové konfokální mikroskopie a vícefotonové konfokální mikroskopie. Práce dále obsahuje další pokročilé mikroskopické techniky, které nám umožňují pozorování dějů v živých buňkách jako je FRET, FLAP, FRAP, FLIM aj. Je zde uveden přehled fluorescenčních značek a proteinů, které jsou nezbytné pro sledování buněčných struktur ve fluorescenční mikroskopii.

## **Klíčová slova**

Fluorescenční mikroskop, FRAP, FRET, FLIM, TIFR, multidimenzionální konfokální mikroskopie, FCS, LSC, PRIM, fluorescenční barviva, super-rezoluční mikroskopie



## **Summary**

The thesis is focused on fluorescence microscopy of living cells. It describes principles of fluorescence microscopy, laser confocal microscopy and multiphoton confocal microscopy. The thesis also includes other advanced microscopic techniques that allows us to observe processes in living cells, such as FRET, FLAP, FRAP, FLIM etc. It also contains an over view of the fluorescent labels and the proteins, which are necessary for the monitoring of cell structures in fluorescence microscopy.

## **Keywords**

Fluorescence microscope, FRAP, FRET, FLIM, TIFR, multi-dimensional confocal microscopy, FCS, LSC, PRIM, fluorescent dyes, super-resolution microscopy

# Obsah

1.	ÚVOD.....	14
2.	FYZIKÁLNÍ PODSTATA.....	15
	2.1.Luminiscence.....	15
	2.2.Fluorescence.....	15
	2.3.Fosforescence.....	16
	2.4.Reakce světla s tkání.....	16
3.	TYPY MIKROSKOPŮ.....	17
	3.1. Fluorescenční mikroskop.....	18
	3.2. Konfokální mikroskop.....	21
	3.3. Multifotonová mikroskopie.....	23
4.	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	25
	4.1. Vzorky pro fluorescenční techniky.....	25
	4.2. Barvení.....	25
	4.3. Imunofluorescence a imunoznačení.....	26
	4.4. Obrazová data.....	27
	4.4.1.Získání obrazových dat.....	27
	4.4.2.Snímání obrazu.....	28
	4.4.3.Předzpracování obrazu.....	29
5.	FLUORESCENČNÍ PROTEINY.....	30
	5.1. Historie.....	30
	5.2. Charakteristika fluorescenčních proteinů.....	31
	5.2.1. GFP.....	33
	5.2.2. BFP.....	33
	5.2.3. YFP.....	33
	5.2.4.DsRED.....	34
6.	MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY.....	34
	6.1. FRAP.....	35
	6.2. FRET.....	36
	6.3. BRET.....	37
	6.4. FLIM.....	37
	6.5. FLAP.....	38
	6.6. FLIP.....	40

6.7.	TIRF.....	40
6.8.	Multidimenzionální laserová konfokální mikroskopie .....	41
6.9.	FCS.....	42
6.10.	LSC.....	43
6.11.	PRIM.....	46
7.	BUNĚČNÉ KOMPONENTY A JEJICH BARVENÍ.....	47
8.	SUPER-REZOLUČNÍ MIKROSKOPIE .....	52
8.1.	SIM... ..	52
8.2.	STED.....	54
8.3.	STORM.....	56
8.4.	NSOM.....	57
8.5.	4Pi mikroskopie .....	60
8.6.	PALM .....	61
9.	ZÁVĚR.....	63
10.	CITOVANÁ LITERATURA .....	64

## Seznam použitých zkratek

mm	milimetr
nm	nanometr
LSCM	laser scanning confocal microscopy
CLSM	confocal laser scanning microscopy
μm	mikrometr
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FLAP	fluorescence localization after photobleaching
FLIP	fluorescence loss in photobleaching
FRET	fluorescence resonance energy transfer
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
GFP	green fluorescent protein
YFP	yellow fluorescent protein
BFP	blue fluorescent protein
CFP	cyan fluorescent protein
Ser65	serotonin
Tyr66	tyrosin
STED	stimulated emission depletion
GSD	grand state depletion
SIM	structured illumination microscopy
PALM	photoactivated localization microscopy
STORM	stochastic optical reconstruction microscopy
NSOM	near-field scanning optical microscopy
PSTM	photon scanning tunneling microscopy
TIRF	total internal reflection fluorescence

FCS	fluorescence correlation spectroscopy
LSC	laser scanning cytometry
AFM	atomic force microscopy
PRIM	proximity imaging
PSF	point spread function

# 1. ÚVOD

Fluorescenční mikroskopie živých buněk je velice aktuální téma. Fluorescenční mikroskopie umožňuje zobrazení látek obsažených v buňkách často v minimálních množstvích. Fluorescenční mikroskopie je založena na faktu, že určité chemické látky (fluorochromy) po ozáření světlem o kratší vlnové délce září světlem o delší vlnové délce. Fluorochromy se váží na konkrétní buněčnou složku, která pak při určité excitaci vlnové délce září světlem jiné vlnové délky. Modifikací této metody je využití protilátky s navázaným fluorochromem, nebo fluorescenčních proteinů. Fluorescenční mikroskopie í nachází využití v řadě oborů. V mikrobiologii slouží k mikroskopickému průkazu mikroorganismů v biologických vzorcích. Uplatnění nachází také v imunodiagnostice, kde se používá k detekci buněčných antigenů sdružených s určitými chorobami.

Cílem této práce je tedy podat přehled jednotlivých technik využívaných ve fluorescenční mikroskopii živých buněk, včetně jejich aplikací. Pozornost je věnována také fluorescenčním značkám a proteinům používaných v mikroskopii živých buněk.

## 2. FYZIKÁLNÍ PODSTATA

### 2.1. Luminiscence

Luminiscencí se označuje děj, při kterém látka emituje (vyzařuje) energii ve formě viditelného, infračerveného nebo ultrafialového záření. Aby došlo k vyzáření fotonů, musí látka nejprve energii přijmout. Tato energie může pocházet z různých zdrojů. Nejčastější dochází k absorpci energie ve formě fotonů elektromagnetického záření. Jedná se o tzv. fotoluminiscenci. Dalším poměrně častým případem je absorpce energie pocházející z chemické (chemiluminiscence) nebo biologické (bioluminiscence) reakce, kde energie vedoucí k excitaci látky vzniká biochemickou reakcí. Známa je také elektroluminiscence, termoluminiscence a radioluminiscence. Při elektroluminiscenci pochází absorbovaná energie z elektrického proudu. Tepelná energie je zdrojem pro termoluminiscenci. Radioluminiscence je luminiscence buzená ionizujícím zářením (tj. alfa částicemi, protony, neutrony, zářením beta nebo rentgenovým zářením). Podle povahy emitovaného záření, můžeme luminiscenci dělit na fluorescenci, zpožděnou fluorescenci a fosforescenci (1).

### 2.2. Fluorescence

Při absorpci ultrafialového záření dochází k excitaci elektronů. Elektron není schopen v excitovaném stavu setrvat, proto přechází na hladinu s nižší energií. Při přechodu na nižší hladinu se přebytečná energie přemění na záření. Jedná se tedy o sekundární záření, které látka vydává po absorpci elektromagnetického záření (1).

Hlavními charakteristikami fluorescence jsou intenzita, spektrální složení, polarizace, doba dohasínání a koherenční vlastnosti. Intenzita je počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času. Polarizace vypovídá o směru kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny. Spektrální složení je vlastně spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí. Doba dohasínání je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi. Úzce souvisí s pochopy vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu. Vztahy mezi fázemi světelných vln určují koherenční vlastnosti (1).

Většina složitých organických molekul nefluoreskuje. Intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny, zejména polyaromatické uhlovodíky či heterocykly,

označované jako fluorofory nebo fluorescenční barviva. Typickými příklady fluoroforů jsou chinin, akridinová oranž, fluorescein, rhodamin B, antracén, perylén či umbeliferon (1).

### 2.3. Fosforescence

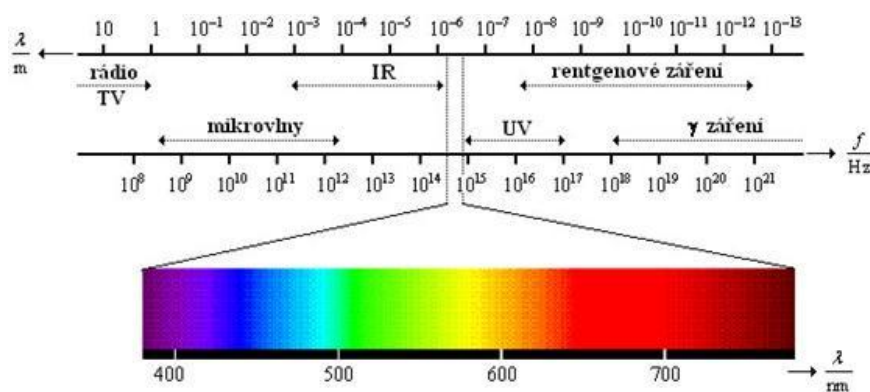
Při fosforescenci dochází k obrácení spinu excitovaného elektronu a molekula se dostává do tripletového excitovaného stavu. Přechod nastává, když se energeticky překrývají nejnižší singletové vibrační hladiny společně s vyššími vibračními hladinami tripletového stavu. Elektron ztrácí energii emisí po návratu molekuly do základního vibračního stavu (1).

Nezářivé přenosy energie jsou usnadněny vyšší teplotou, která vede k většímu počtu srážek molekul. Proto fosforescenci pozorujeme při nízkých teplotách ve vysokých viskózních médiích (1).

Zatímco u fluorescence trvá vyzařování emisního světla krátkou dobu a emise zhasíná téměř okamžitě po zhasnutí excitačního záření ( $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  sekund), u fosforescence může k emisi docházet i dlouhou dobu po zhasnutí excitačního záření ( $10^{-2}$  sekund až několik dní) (1).

### 2.4. Reakce světla s tkání

Světlo je elektromagnetické záření skládající se ze širokého spektra vlnových délek. Mezi elektromagnetické záření patří radiové vlny, mikrovlnné záření, infračervené záření, viditelné světlo, ultrafialové záření, rentgenové záření a gama záření (2).



Obrázek 1. Elektromagnetické spektrum (3).



Při interakci záření s tkání dochází k reflexi, transmisi, disperzi nebo absorpci. Při reflexi dochází k totálnímu odrazu záření na rozhraní. Pokud nedojde k odrazu, záření pronikne do tkáně. V tkáni poté může dojít k absorpci záření, tedy k jeho pohlcení. Záření, které není absorbováno, je označováno jako transmisní či disperzní. V obou případech se záření dále šíří prostředím. Při disperzi navíc dochází k rozkladu elektromagnetického záření na jednotlivé složky (4).

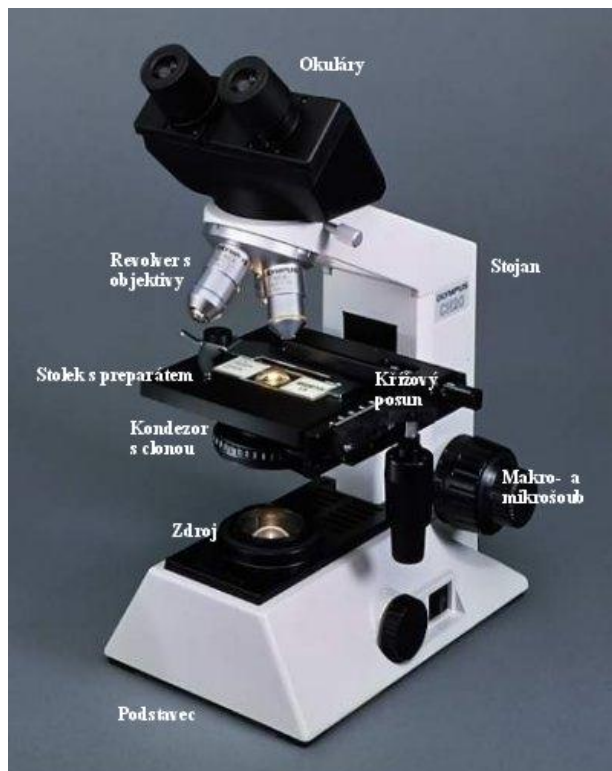
### 3. TYPY MIKROSKOPŮ

Rozeznáváme několik typů mikroskopů, které může dělit podle několika kritérií. První rozdělení je podle fyzikálního principu, na kterém mikroskop funguje. Druhé kritérium dělení je podle možnosti využití (5, 6).

První mikroskop byl vynalezen v 17. století. Vynález mikroskopu byl podmíněn zdokonalením čoček. Jedním z prvních používaných mikroskopů byl jednočočkový mikroskop, který ke svému výzkumu používal Antony van Leeuwenhoek. Antony van Leeuwenhoek zdokonalil mikroskop kolem roku 1650. Před ním na sestavení mikroskopu pracovali Hans a Zachary Jansenové. Na práci Antony van Leeuwenhoeka navázal Robert Hooke, který roku 1665 vydal knihu *Micrographia*. V této publikaci popisuje poprvé buňky (5, 6).

Světelný mikroskop se začal široce využívat k pozorování živých buněk až v 19. století. Přispěli k tomu zejména Carl Zeiss, Ernst Abbe a Otto Schott. Světelný mikroskop dosahuje rozlišení 0,2  $\mu\text{m}$ . Toto rozlišení je maximem, kterého lze pomocí světelné mikroskopie dosáhnout. Zároveň je však pro studium struktury mikroorganismů nedostačující (6).

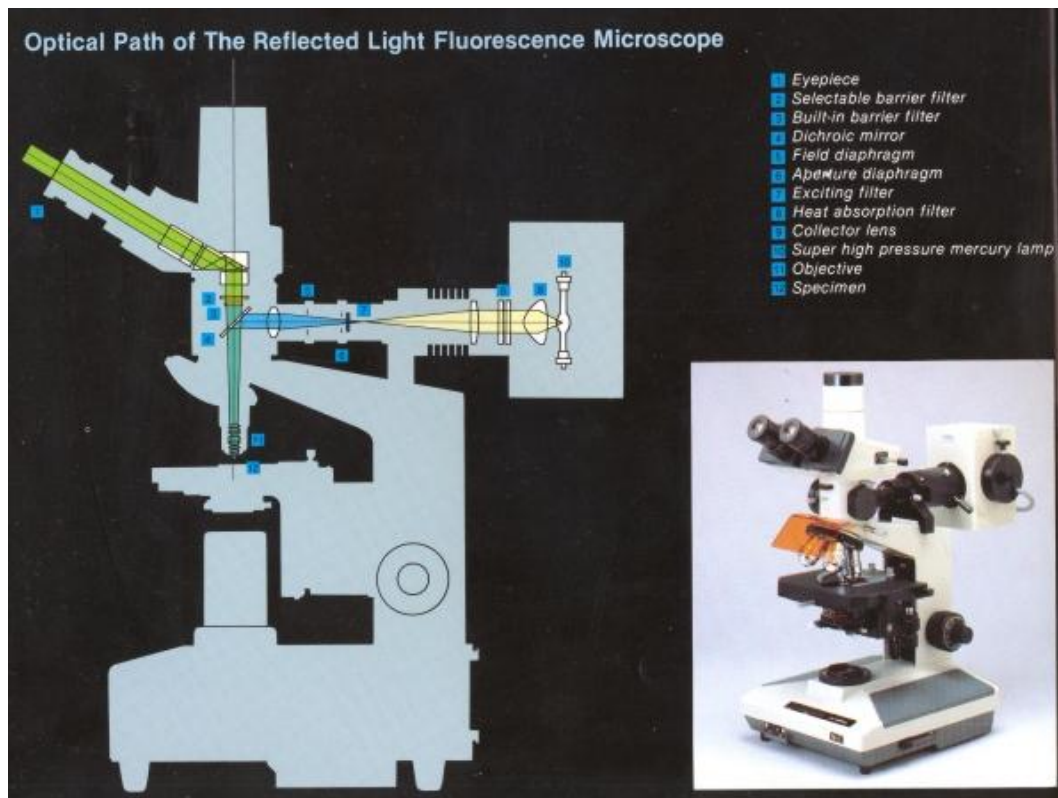
Existují různé typy optických mikroskopů: procházejícím světlem, využívající fázového kontrastu, v temném poli a také fluorescenční. Mikroskopie v procházejícím světle zobrazuje objekt na základě rozdílné hustoty. Vzorek je umístěn mezi světelný zdroj a objektiv. Při mikroskopii za využití fázového kontrastu obraz objektu v obrazovém ohnisku vzniká interferencí dvou vlnění. Podstatou mikroskopie v temném poli, označované také jako v zástině, je, že do roviny objektu vstupují z kondenzoru pouze okrajové, velmi šikmé světelné paprsky, zatímco středové paprsky jsou pohlceny a při zobrazení se neuplatní. Objekt je tedy osvětlen jen ze stran, paprsky se od něj odrážejí a lámou. Do objektivu vstupují jen paprsky odražené od povrchu objektu a ten proto září v temném poli (5).



Obrázek 2. Stavba optického mikroskopu (7).

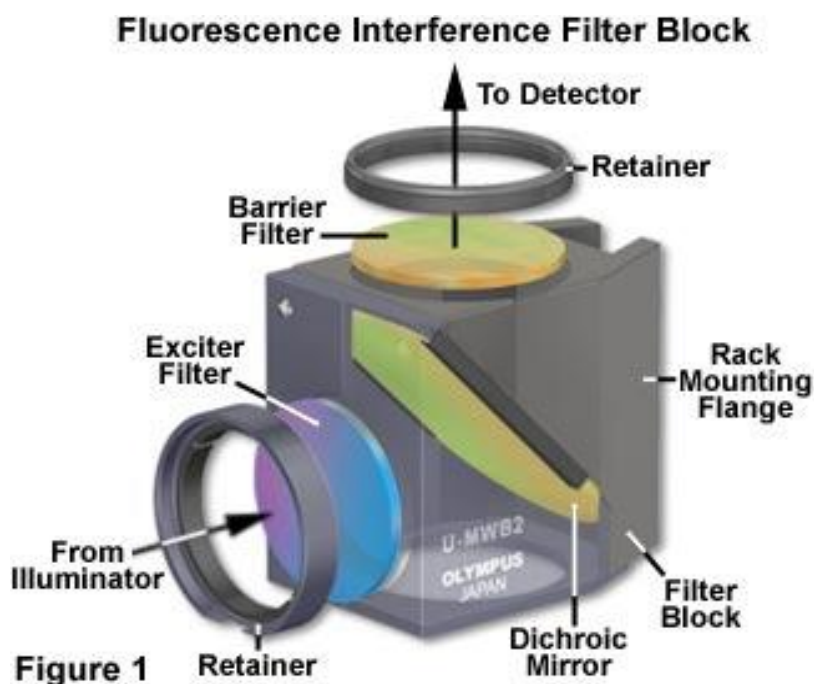
### 3.1. Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je speciálním typem optického mikroskopu, který využívá schopnosti fluorescence látek. Mikroskop je vybaven druhým zdrojem světla, kterým je rtuťová či xenonová výbojka. Další důležitou součástí fluorescenčního mikroskopu je fluorescenční filtr, který je v podobě kostky. Filtr tvoří excitační filtr a dichroické zrcadlo. Filtry se liší citlivostí pro určitou vlnovou délku, která je specifická pro dané barvivo a vymezují určité pásmo propustnosti. Principem excitačního filtru je, že propustí pouze světlo, které je potřebné pro fluorescenci vzorku. Filtr bariérový pak pohlcuje všechno excitační světlo, které nebylo použité k excitaci. Dichroické zrcadlo umožňuje odražení dlouhovlnného záření do okuláru a krátkovlnné záření odráží na preparát. Tato soustava filtrů je v mikroskopu umístěna jako jednotná kostka. Vzniklý obraz pak pozorujeme pomocí okuláru a je zaznamenáván pomocí speciálních CCD kamer. Místo CCD kamer je možno využít také digitálního fotoaparátu (8, 9).



**Obrázek 3.** Epifluorescenční mikroskop (10).

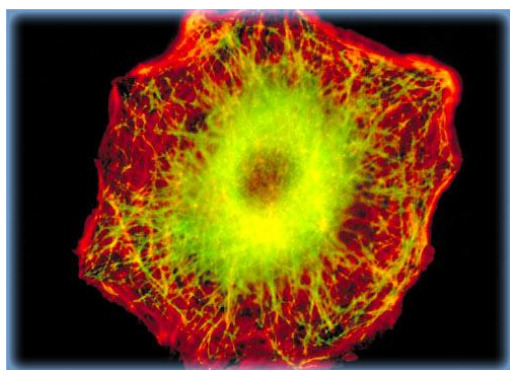
Jako zdroj světla se u fluorescenčního mikroskopu využívá rtuťové výbojky. U epifluorescenčního mikroskopu prochází excitační světlo objektivem a dopadá na preparát svrchu. Emisní světlo se vrací zpět do objektivu. U tohoto typu mikroskopu je zapotřebí použít zvláštní typ zrcadla, které odrazí excitační světlo do objektivu a emisní světlo propustí do okuláru. Využívá se dichromatického zrcadla, které propustí a odrazí světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Volíme takový typ zrcadla, které maximum excitačního světla odráží a maximum emisního světla propouští. Vhodná kombinace dichroického zrcadla, excitačního a emisního filtru pro použitý druh fluorochromu se do epifluorescenčního mikroskopu se vkládá pohromadě jako tzv. kostka, která má dvě stěny tvořeny filtry a úhlopříčku dichroickým zrcadlem. Kostky, díky svému umístění na výměníku, je možné podle potřeby měnit (10, 11).



**Obrázek 4.** Fluorescenční kostka (11).

Fluorescenční mikroskopie umožňuje pozorování přítomnosti studovaných proteinů v buněčných organelách nebo přítomnost specifické sekvence nukleové kyseliny v buňkách. Využívá se obarvení dvou různých proteinů fluorochromy různé barvy, při které lze studovat jejich vzájemnou interakci. Příkladem může být interakce studovaného proteinu s transportním proteinem buněčných systémů (12).

Principem fluorescenční mikroskopie je zobrazení molekuly v minimálním množství díky fluorescenci molekuly po dopadu ultrafialového světla. Využívá se vazby fluorochromu na molekulu proteinu či specifickou sekvenci nukleových kyselin (12, 13).



**Obrázek 5.** Zobrazení cytoskeletu pomocí fluorescenční mikroskopie (14).

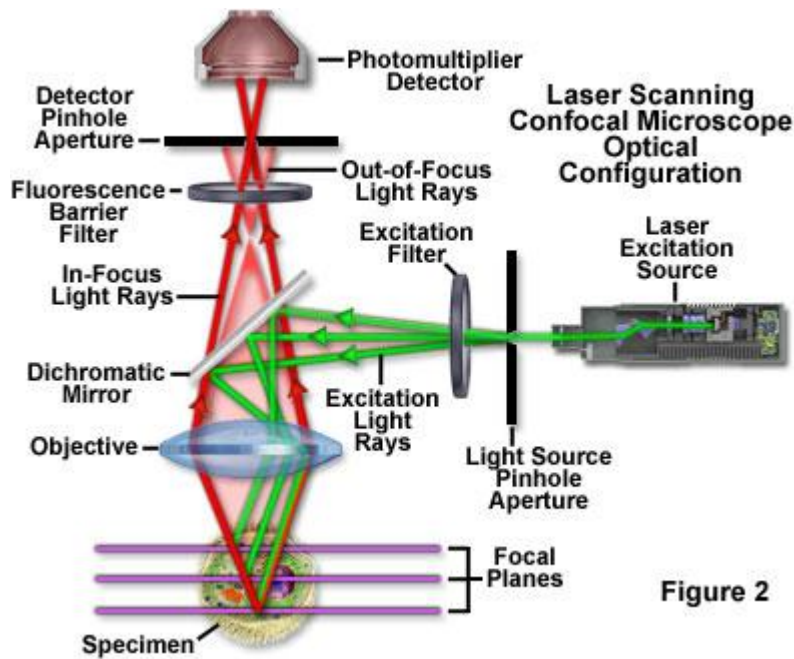
Fluorochrom v excitačním světle září. Interferenci excitačního světla při pozorování lze odstranit filtrem, který do okuláru nebo kamery propustí jen světlo excitované, které je charakteristické pro fluorochrom navázaný na pozorované molekule. Výsledkem jsou pak barevně zářící struktury v temném poli (12, 13).

## 3.2. Konfokální mikroskop

Princip konfokálního mikroskopu byl patentován roku 1957 Marvinem Minskym. O další rozvoj konfokální mikroskopie se zasloužili Mojmir Petráň a Milan Hadravský z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni. Jejich konfokální mikroskop pracoval na principu Nipkowova kotouče. V roce 1966 patentovali konfokální mikroskop s dvojitým řádkováním, pomocí kterého získali první kvalitní snímky silných řezů mozkové tkáně. Mojmir Petráň spolupracoval s americkými kolegy Davidem Eggerem a Robertem Galambosem. Nipkowovův kotouč byl nahrazen pohybujícím se zdrojem světla a roku 1973 David Egger uveřejnil první snímky buněk pořízených tímto přístrojem. Pozdější využití laseru jako zdroje osvětlení umožnilo rychlejší skenování vzorku, vyšší rozlišení a pozorování fluorescence. První aplikace laserové řádkovací konfokální mikroskopie (laser scanning confocal microscopy = LSCM) v buněčné biologii byly publikovány v roce 1987 (15).

Konfokální mikroskopie dosahuje vyššího rozlišení a kontrastu než je tomu u ostatních metod světelné mikroskopie. Výhodou je především potlačení signálu z rovin nad a pod rovinou zaostření a možnost snímání sérií optických řezů. Zdrojem světla je laser, který přes bodovou (konfokální) clonu a objektiv osvětluje preparát. Stejným objektivem poté prochází odražené světlo. Paprsky prochází dichroickým zrcadlem a pokračují k bodové cloně, kde dochází k odfiltrování světla z jiných rovin. Nakonec paprsky vstupují do fotonásobiče, kde jsou zesíleny a detekovány (15).

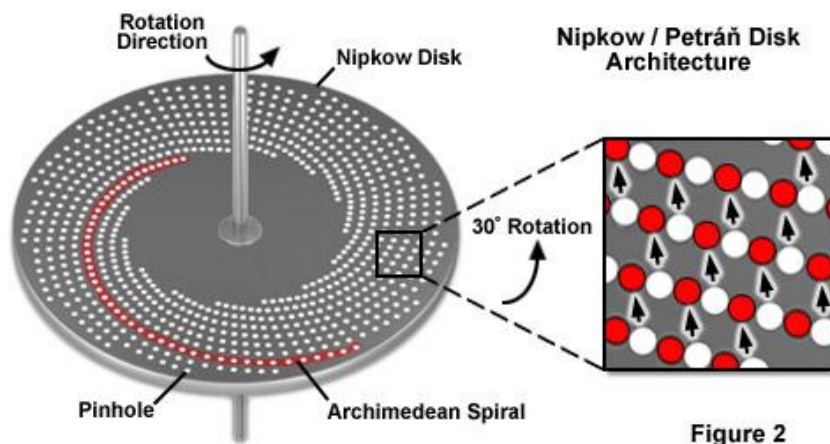
Rozeznáváme dva typy konfokálních mikroskopů: laserový rastrovací konfokální mikroskop (LSCM – Laser scanning confocal microscope) a mikroskop s rotujícím diskem (TSCM – Tandem scanning confocal microscope). Laserový rastrovací mikroskop využívá laserový paprsek jako zdroj světla. Tento paprsek je rozmítán po vzorku pomocí clony, která je umístěna mezi dichroickým zrcadlem a objektivem. Preparát je skenován bod po bodu. Skenování může probíhat dvěma způsoby. Buď je zdroj světla statický a preparát se pohybuje („stage scanning“), nebo se naopak pohybuje zdroj světla a statický je preparát („beam scanning“). Laserový rastrovací mikroskop je vhodný především pro zobrazování fixovaných preparátů (16, 17).



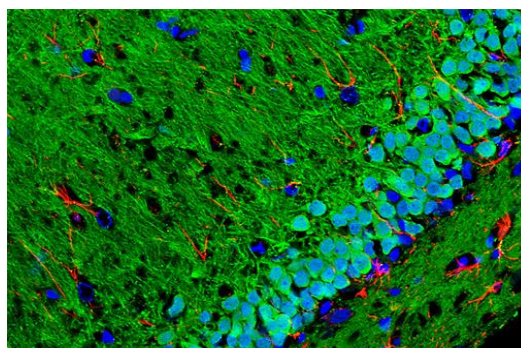
**Obrázek 6.** Konfokální mikroskop (16).

Princip tvorby obrazu u rastrovacího konfokálního mikroskopu spočívá v tom, že laserový paprsek, který představuje intenzivní bodový zdroj světla je fokusován na clonku. Cesta paprsku dále vede do objektivu až na vzorek, kde je obraz clonky fokusován do bodu, jehož průměr odpovídá difrakční mezi, označované také jako rozlišovací mez. Světlo na vzorku ať už odražené, rozptýlené či fluorescence jde zpětně přes stejný objektiv. Sekundární světlo putuje poté zpět přes clonku a pomocí děliče paprsků je bodový obraz následně lokalizován přes fotonásobič, kde je umístěna druhá konfokální bodová clonka, která filtruje světlo pocházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu. Obraz celé zaostřené roviny se pak získává rastrováním bod po bodu a to buď rozmítáním laserového paprsku, posuvem objektivu nad vzorkem či příčným posuvem vzorku před objektivem. Vzniklý obraz je mimořádně ostrý, kontrastní a poskytuje vysoké rozlišení. Jako zdroj světla se využívá laserového paprsku, který je zaostřen do zvolené roviny, která obarvenou buňkou prochází jako imaginární řez. V této zvolené rovině pak dochází k osvětlení preparátu laserovým paprskem a fluorochrom emituje viditelné záření. Získaný obraz se zaznamenává pomocí počítače. Pro získání obrazu z více rovin (od vršku až ke spodu buňky) využijeme postupnou změnu zaostření. Zde je pak nejlépe patrný rozdíl oproti klasické fluorescenční mikroskopii, kde fluorochrom září ve všech optických rovinách najednou a nelze tedy určit umístění komponent (dole, uprostřed, nahoře) (16, 17).

Druhým typem je konfokální mikroskop na bázi rotujícího Nipkowova kotouče, předchůdce rozmítaného laserového paprsku, který dosahuje rychlosti až 60 snímků za sekundu. Mikroskop obsahuje rotující zařízení, na kterém je mnoho navzájem oddělených clonek. Umožňuje zobrazovat několik bodů preparátu najednou. Snímání je tedy rychlé a na pozorovaný objekt působí světlo s nižší intenzitou. Konfokální mikroskop na bázi rotujícího disku je vhodný především pro pozorování dějů v buňkách (16, 17).



Obrázek 7. Nipkowův kotouč (17).



Obrázek 8. Obrázek získaný pomocí konfokální mikroskopie – amygdala mozku krysy (18).

Výhodou konfokální mikroskopie je potlačení mlhavého pozadí obrazu a optická tomografie. Nevýhodou představuje zatíženost statistickým šumem.

### 3.3. Multifotonová mikroskopie

Principem multifotonové mikroskopie je snímání světlem, jehož energie je příliš nízká, aby došlo k excitaci fluorochromu. Multifotonová mikroskopie využívá více nízkoenergetických světelných paprsků, které se fokusují v určitém místě. K excitaci dochází vlivem akumulace energie. Pro osvětlení vzorku se využívá světlo s vlnovou délkou, která je

násobkem absorpčního maxima použitého fluorochromu. Příkladem je dvoufotonová excitace fluoresceinu, který má absorpční maximum 500 nm. Absorpci dvou fotonů v místě zaostření způsobí osvětlení laserem o vlnové délce 1000 nm (2, 15).

#### Fluorophore Excitation in Multiphoton Microscopy

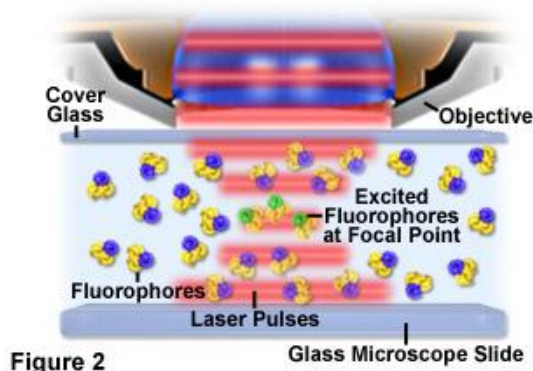


Figure 2

Glass Microscope Slide

**Obrázek 9.** Princip multifotonové mikroskopie – excitace ve fokusované oblasti (20).

Výhoda metody spočívá v menším rozptylu světla při vyšších vlnových délkách, nevysvěcování fluorochromu z neozářených částí vzorku, vysoké rozlišovací schopnosti a vysoké citlivosti. V současnosti se běžně využívá dvou- či třífotonové excitace s výhodou pro tlusté vzorky (více než 100  $\mu\text{m}$ ) (15, 19).

NIR (Near-infrared) multifotonová mikroskopie je dalším optickým nástrojem pro fluorescenční zobrazování s vysokým prostorovým a časovým rozlišením, diagnostiku, fotochemii v živých buňkách a tkáních. Mezi hlavní aplikace NIR mikroskopie patří optické zachytávání s laserovými pinzetami a multifotonová mikroskopie (21).

V oblasti biologických věd existují dvě hlavní aplikace NIR mikroskopie. Na jedné straně jsou to laserové pinzety pro optické mikromanipulace, buněčné třídění, pikonewtonové měření síly a diagnostiku pohyblivých buněk. Laserové pinzety jsou založeny na použití NIR laserového záření s nemodulovanou spojitou vlnou (CW) s typickými průměrnými působnostmi v rozsahu  $10 \pm 100$  mW. Další důležitou aplikací NIR mikroskopie jsou dvoufotonové a třífotonové excitace umožňující 3D fluorescenční zobrazování a fotoindukovaný "uncaging" sloučenin (21).

Femtosekundové NIR laserové mikroskopy mohou být také použity jako nové ultraprecizní (extrémně přesné) nanochirurgické nástroje s délkou řezu mezi 100 nm a 300 nm. Při použití univerzálního nanoskalpelu můžeme provést intracelulární preparace chromozomů v živých buňkách, aniž bychom narušili vnější buněčnou membránu. Umožňuje tedy neinvazivní NIR laserový zákrok uvnitř živé buňky nebo v rámci organely (21).



## 4. PŘÍPRAVA VZORKŮ

### 4.1. Vzorky pro fluorescenční techniky

Při přípravě vzorku, u kterého chceme pozorovat fluorescenci, je zapotřebí zvážit použitý typ fluorescenčního barviva a jeho chování v živém systému. Pojmem cytotrackery jsou označovány speciální fluorescenční barviva, která rychle difundují přes plasmatickou membránu do různých kompartmentů živých buněk a to bez omezení životaschopnosti daných buněk a bez ovlivnění jejich fyziologie. Snadno pronikající barviva nevyžadují složitější přípravu vzorku a proto jsou oblíbenou volbou při barvení živých objektů. Jejich oblíbenost spočívá také v jednoduchosti a rychlosti přípravy. Využíváme je hlavně pro studium reálných dějů v živých buňkách. Pokud fluorescenční barviva do živé tkáně nepronikají, následuje řada dalších postupů jako je např. fixace vzorku s následnou permeabilizací přítomných membrán, které umožní průnik barviva do buňky a jeho specifickou detekci (22).

Aby bylo dosaženo objektivních výsledků při studiu živých buněk, zvláště jedná-li se o delší časový interval, musíme poskytnout buňkám podmínky, které se co nejvíce podobají jejich přirozenému prostředí. Důležitým parametrem pro životaschopnost buněk je teplota. Ta je určena tělesnou teplotou organismu, z kterého dané buňky pocházejí. Pro vytvoření stabilní optimální teploty používáme vyhřívaný adaptér do mikroskopového stolku. Pro udržení stability teploty je dobré, aby byl systém izolován od okolí inkubátoru. Další důležitou roli pro přípravu živých vzorků hraje pH. Stabilního pH v kultuře dosahujeme určitou koncentrací  $\text{NaHCO}_3$  v médiu a také odpovídající koncentrací  $\text{CO}_2$  ve vzduchu. Chtěné koncentrace je dosaženo vháněním  $\text{CO}_2$  do inkubační komůrky mikroskopu (22).

### 4.2. Barvení

Pro zviditelní určité látky či struktury v buňce využíváme fluorescenční metody. Některé fluorochromy jako je DAPI, ethidium bromid, Hoechst, propidium jodid se dokáží samy o sobě vázat na určité molekuly, například na DNA. Využíváme je tedy na zviditelnění těchto molekul a mluvíme pak o přímém barvení, respektive o přímé fluorescenci (23).

Další možností je barvení pomocí konjugovaných fluorescenčních barviv. Princip kombinovaného přístupu spočívá ve schopnosti nefluorescenční molekuly se specificky

navázat na určitou buněčnou strukturu. Daný fluorochrom je pak kovalentně připojen k této nefluorescenční molekule (23).

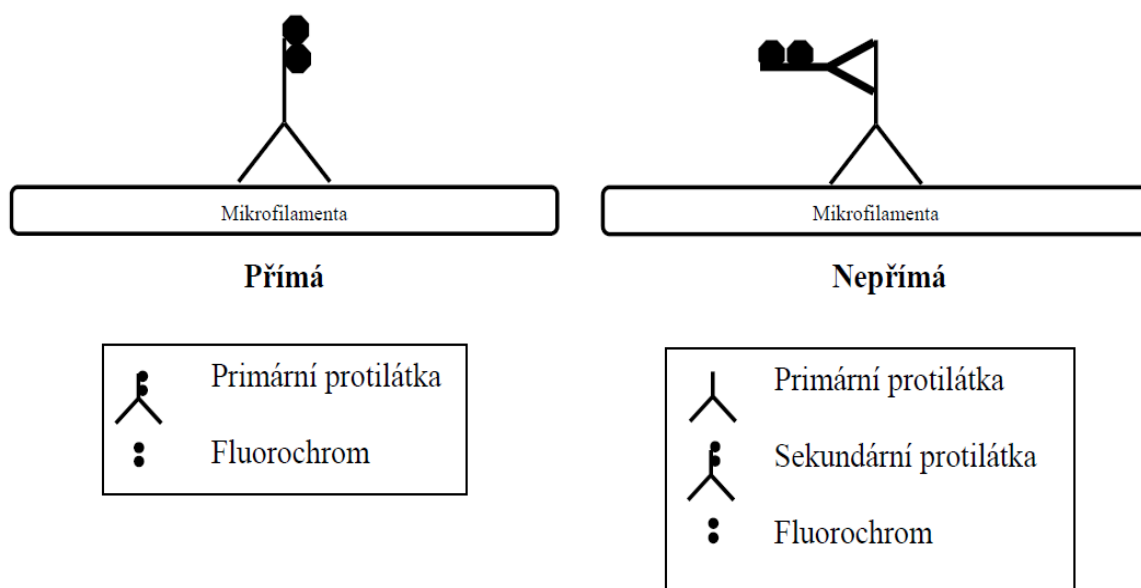
### **4.3. Imunofluorescence a imunoznačení**

Imunofluorescencí je označována laboratorní technika, umožňující vizualizaci specifické protilátky či proteinu v buňkách nebo tkáních, navázáním specifické protilátky označené fluorescenční značkou (fluorochromem). Principem metody je reakce antigen-protilátka za vzniku imunokomplexů. Imunokomplexy se dále váží na buněčné složky, přičemž nenavázané protilátky odstraníme promytím. Výsledný preparát můžeme vyhodnotit buď za použití fluorescenčního mikroskopu, nebo použitím mikroskopu konfokálního. Imunofluorescenci můžeme rozdělit do dvou skupin a to na imunofluorescenci přímou a nepřímou. V přímé je protilátka označena fluorescenčním barvivem. V imunofluorescenci nepřímé se pro zjištění primární protilátky využívá protilátka sekundární, která je označena fluorochromem (24, 25).

Podstata přímé imunofluorescence spočívá ve vazbě protilátek značených fluorochromy (označovaných jako konjugáty) na antigenní struktury ve tkáních. Zdrojem protilátek může být buď imunizované zvíře, nebo se jedná o protilátku průmyslově vyrobenou. Pro přesné výsledky je zapotřebí dodržení zásad transportu biologického materiálu. Vzorek přichází do laboratoře zmražený, čehož docílíme pomocí tekutého dusíku. Kromě tekutého dusíku lze využít i vhodného transportního media, jako je například maleinimid. Po převzetí vzorku laboratoří se z biologického materiálu začnou připravovat kryostatové řezy, které se uchytí na podložní sklo a nechají se krátce přischnout. Poté přichází na řadu „barvení“ příslušnými konjugáty a následné promývání. Tato metoda se využívá zejména v diagnostice autoimunitních onemocnění a ve výsledném preparátu pozorujeme změny, posuzujeme účast jednotlivých imunoglobulinů, fibrinu či složek komplementu (24, 25).

Nepřímou imunofluorescencí usilujeme o detekci autoprotilátek, které se nechávají reagovat se substrátem. Jako substrát se nejčastěji využívá tkáň ze zvířete, ale můžeme použít i tkáň lidskou nebo buňky standardních buněčných kultur. Princip průkazu navázaných protilátek spočívá v detekci jiných, značených protilátek, které jsou specifické vůči jednotlivým třídám protilátek. Jako zdroj antigenů se nejčastěji využívá živočišná tkáň.

Nevýhoda spočívá v tom, že některé autoprotilátky reagují pouze s antigeny lidských tkání. S porovnáním s přímou imunofluorescencí je metoda nepřímá daleko citlivější (24, 25).



**Obrázek 10:** Přímá a nepřímá imunofluorescence (24).

## 4.4. Obrazová data

### 4.4.1. Získání obrazových dat

Pro vlastní snímání, archivování a zpracování získaných dat se využívá speciálního softwaru. Laboratorní mikroskopy jsou vybaveny kamerou a výkonným počítačem se softwarem. Optimalizaci snímaného objektu umožňuje software a nasnímané obrazy lze dále zpracovávat. Existuje několik systémů pro zpracování analýzy obrazu. Jedná se například o systém LUCIA a AAC, které se využívají pro rutinní zpracování vzorků (prioritou rychlé vyhodnocení preparátů). Při digitální mikroskopii využíváme digitálních CCD-kamer a digitálních fotoaparátů. Výhodou digitálního fotoaparátu je jednoduchost práce a možnost okamžité kontroly nasnímaných obrázků (26).

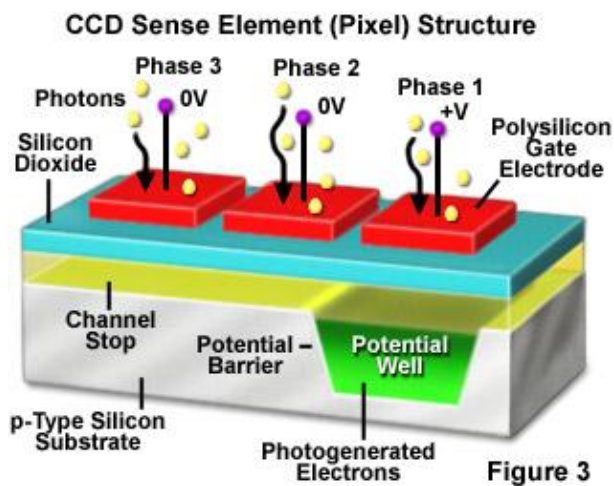
### Fluorescence Microscope with Digital Camera



Obrázek 11: Fluorescenční mikroskop s digitální kamerou pro snímání obrazu (27).

## 4.4.2. Snímání obrazu

Ke snímání obrazu se nejčastěji využívá CCD čipů (Charge Coupled Device).



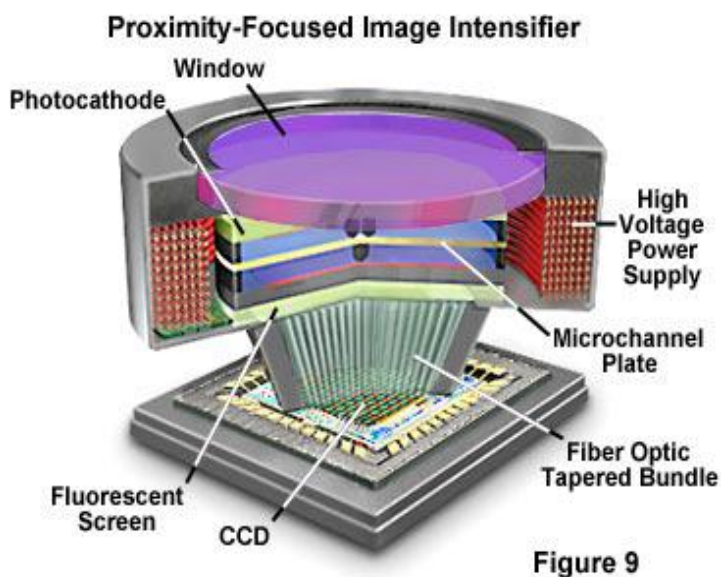
Obrázek 12. CCD senzor (28).

CCD senzor přeměňuje dopadající světelné záření na elektrickou energii. CCD senzory využívají fotoefektu. Fotony dopadají na křemíkovou destičku, ze které vlivem fotoefektu vyráží elektrony. Na každý jednotlivý pixel je přivedena kladně nabitá elektroda. Elektrony zůstávají pod elektrodou díky izolační vrstvě  $\text{SiO}_2$ . Přiváděním kladného napětí na další

elektrody se nahromaděný náboj posouvá

(princip potenciálové jámy). Struktura pro jeden pixel je zobrazena na obrázku (Obrázek 12). Obraz se vytváří vyčítáním náboje po jednotlivých řádcích a sloupcích. Architektura CCD senzorů se liší právě způsobem načítání. Rozeznáváme například architekturu Frame Transfer

CCS, při které se naráz vyčítá celý obraz, nebo Interline Transfer CCS, při které se nejdříve vyčítají jednotlivé řádky obrazu a následně se přenáší sloupce. (26)



U fluorescenční mikroskopie se využívá Low-Light-Level kamer, které obsahují další zesilovače obrazu. Tyto zobrazovací kamery obsahují vstupní fotokatodu selektronovými násobiči a výstupní fosforescenční obrazovkou (27).

Figure 9

Obrázek 13. Nová generace zesilovače jasu (Gen III, Gen IV) (29).

### 4.4.3. Předzpracování obrazu

Pro popis a kvalitu použitého zařízení pro snímání a záznam obrazu existuje celá řada charakteristik. První z nich je funkce PSF (Point Spread Function), která popisuje odezvu systému na jednotkový impuls. Při zobrazování (digitalizaci obrazu) se jeden bod nezobrazí jako bod, ale dopadající záření bude detekováno se snižující se intenzitou i v okolí tohoto bodu. Obvykle má převodní charakteristika systému Gaussovský průběh. Z obrázku (Obrázek) je patrné, že výsledný obraz vznikne konvolucí skutečného signálu a převodní charakteristiky zobrazovacího systému (30, 31).

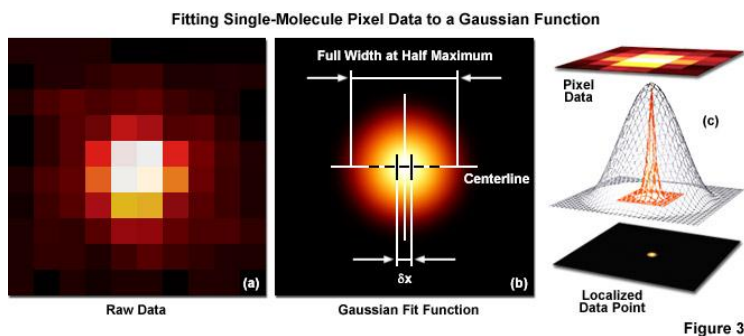
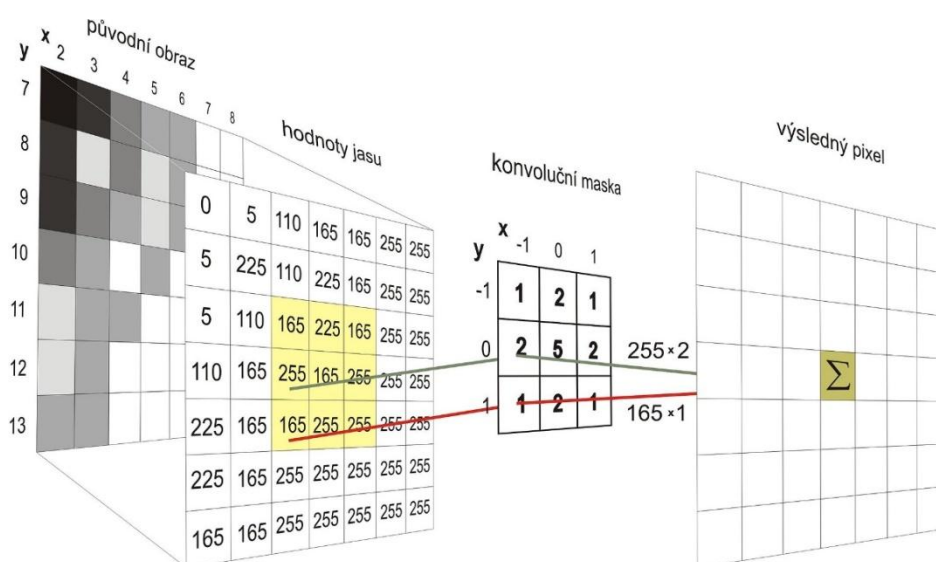


Figure 3

Obrázek 14. Zobrazení bodu a PSF (vlevo – reakce na jednotkový impuls) (31).

Konvoluce signálu je matematická operace, která přetváří původní signál předem definovaným signálem (konvoluční maska). Konvoluce se dá ve zkratce popsat jako suma všech součinů. Postupně se kombinují hodnoty původního signálu a konvoluční masky. Odpovídající prvky obou signálů se mezi sebou vynásobí, sečtou se a výsledná hodnota tvoří výstupní signál. Pro korekci se může používat dekonvoluce, což je proces opačný ke konvoluci. Konvoluce se může využívat i při zpracování obrazu. Dle charakteristiky konvoluční masky můžeme obraz zpracovat tak, že dostaneme pouze hrany všech objektů zájmu (hranový detektor) (30).



Obrázek 15. Princip konvoluce (32).

## 5. FLUORESCENČNÍ PROTEINY

### 5.1. Historie

První zmínka o fluorescenční emisi u bioluminiscenčních medúz *Aequorea victoria* byla poprvé zaznamenána až v roce 1955 Davenportem a Nicholem. Nezávisle na sobě dva týmy vědců izolovali tento zelený fluorescenční protein. O extrakci proteinu se zasloužili v 60. a 70. letech Shimomura s kolektivem a Morin s Hastingsem. Krátce nato se prokázalo, že zelený fluorescenční protein této medúzy (GFP) by se mohl používat jako užitečný značkovací pro genovou expresi v buňkách evolučně vzdálených od buněk medúzy. Na tomto

objevu měl zásluhu zejména Chalfie a kolektiv roku 1994. Během několika dalších let bylo vyvinuto, pomocí specifických mutací původní GFP nukleotidové sekvence, velké množství odvozených genetických variant, které mají emisní fluorescenční spektrální profily v modré, azurové, zelené a žluté oblasti viditelného spektra (33).

Při spojení nejnovějších výsledků technického pokroku ve fluorescenční a konfokální mikroskopii, včetně ultrarychlých digitálních detailních CCD kamer, rotujícího disku, SFC přístrojů a mimo jiné i multitracking laserových řídicích systémů s akusticko-optickými laditelnými filtry (AOTF) došlo k tomu, že zelený fluorescenční protein a jeho barevně posunuté genetické deriváty prokázaly neocenitelnou službu v tisících demonstračních experimentů sledování živých buněk. Ve srovnání s mnoha tradičními syntetickými fluorofory, které jsou často toxické nebo fotoreaktivní, je použití fluorescenčních proteinů minimálně invazivní metodou pro živé buňky, což umožňuje vizualizaci a záznam časosběrných obrázkových sekvencí po delší dobu. Neustálý pokrok v oblasti doladování vlastností jednotlivých variant fluorescenčních proteinů vedl ke zvýšení úrovně jasu, lepší fotostabilitě a výrazně lepší expresi v buňkách savců (33).

## 5.2. Charakteristika fluorescenčních proteinů

Za nejpozoruhodnější vlastnost původního zeleného fluorescenčního proteinu pocházejícího z medúzy *Aequorea victoria*, považujeme to, že stabilní a správně definovaná cylindrická polypeptidová struktura je nezbytná pro další vývoj a údržbu fluorescence v této velmi pozoruhodné rodině proteinů. Základem fluoroforů GFP, často označovaného jako chromofor, je tripeptid ze zbytků serinu, tyrosinu a glycinu v sekvenci na polohách 65 až 67. Tento jednoduchý aminokyselinový motiv se běžně vyskytuje v přírodě, avšak nemá za následek fluorescenci. Chromofor se utváří spontánně po překladi bez potřeby kofaktorů nebo komponent vnějších enzymů (jiných než molekulárního kyslíku) a to prostřednictvím vlastního katalyzovaného intramolekulárního přesmyku tripeptidové sekvence za účelem vytvoření fluorescenčních druhů (33).

Prvním krokem u dozrávání je, že řada peptidů a vazba postranních řetězců přemístí karboxylový uhlík aminokyseliny v poloze 65 (Ser65) do těsné blízkosti atomu aminodusíku Gly67. Nukleofilní atak tohoto atomu uhlíku na amidový dusík glycinu následovaný dehydratací má za následek vytvoření imidazolin-5-on heterocyklického kruhového systému. Oxidace tyrosinové (Tyr66)  $\alpha$ - $\beta$  uhlíkové vazby za pomoci molekulárního kyslíku rozšíří

elektronovou konjugaci kruhového systému imidazolinu tak, že zahrnuje tyrosin fenylový kruh a jeho para-substituent kyslíku. Následkem je fluorescence. Vznikne vysoce konjugovaný  $\pi$ -elektronový rezonanční systém, který do značné míry odpovídá spektroskopickým vlastnostem proteinu (33).

Základní chemické a fyzikální vlastnosti fluorescenčního proteinu chromoforu jsou velmi důležité pro uplatňování tohoto proteinu jako intracelulárních sond. Pozoruhodným aspektem fluorescenčního proteinu je to, že i když jeho přítomnost byla k dnešnímu dni zjištěna pouze u mořských živočichů, je schopen tvořit funkční celky v širokém spektru organismů od bakterií až po rostliny a savce. Přirozený GFP z *Aequorea victoria* se skládá z jednodoménového proteinu a 238 aminokyselin s molekulovou hmotností přibližně 27 kDa. I když fotofyzika GFP je poměrně složitá, molekulová struktura proteinu je poměrně stabilní a je vhodná pro vysoký stupeň modifikace, bez omezení schopnosti emitovat fluorescenci. Široká škála aminokyselinových substitucí do původní konfigurace byla úspěšná v jemném doladování fluorescence přirozeného GFP za účelem poskytnutí širokého spektra derivátů fluorescenčních proteinů, které vyzařují barvy přecházející z modré do žluté oblasti viditelného spektra světla. Výzkumy místně cílené a náhodné mutageneze ukázaly, že fluorescence je silně závislá na trojrozměrné struktuře aminokyselinových zbytků v okolí chromoforu. Denaturace proteinu, jak by se dalo i očekávat, ničí fluorescenci a mutace ve zbytcích bezprostředně sousedících s chromoforem může výrazně ovlivnit fluorescenční vlastnosti. Substituce aminokyselin v regionech polypeptidu daleko od chromoforu může také překvapivě ovlivnit spektrální charakteristiky proteinu (33).

Fluorescenční proteiny emitující v modré oblasti spektra viditelného světla byly nejprve získány prostřednictvím místně cíleného mutagenního úsilí zaměřeného na zbytek aminokyseliny tyrosin v GFP chromoforu na pozici 66. Konverze tohoto zbytku na histidin (Y66H) produkuje modrý fluorescenční protein BFP (blue fluorescent protein), který vykazuje široký absorpční pás v ultrafialové oblasti centrované v blízkém okolí. Protein ve srovnání s mateřským GFP vykazoval hodnoty jasu asi jen 15-20%. Proto byla provedena další sekundární mutace. Následné výzkumy a několik dalších mutací vedlo k rozšířené verzi BFP, která má však stále pouze 25% jasu. Ve srovnání s mnoha jinými fluorescenčními proteiny má omezenou fotostabilitu. Nevýhoda modrých fluorescenčních proteinů spočívá také v tom, že musí být excitovány ultrafialovým světlem, které je však fototoxické pro savčí buňky a to i v omezených dávkách. Práci v této spektrální oblasti často omezuje



autofluorescence. Mikroskopy pracující v ultrafialové oblasti vyžadují specializované světelné zdroje, optiky a kombinace filtrů, které dále komplikují zobrazování (33).

### **5.2.1. GFP**

Původní zelený fluorescenční protein izolovaný z *Aequorea victoria* byl hlavním předmětem četných výzkumů. Krátce poté, co se ukázalo, že GFP je vhodný pro genovou expresi, bodová mutace měnící zbytek serinu v pozici 65 v chromoforu na threonin (S65T) vytvořila novou verzi proteinu. Tato mutace umožnila objev varianty zeleného fluorescenčního proteinu, nazývaného jako lepší zelený fluorescenční protein (EGFP). Jediné nevýhody spojené s použitím EGFP spočívají v mírné citlivosti na pH a slabé tendenci dimenzovat. Široká škála dalších fluorescenčních proteinů emitujících v zelené oblasti spektra, byla izolována z jiných zdrojů. Patří sem i různé druhy *Aequorea*. Jedním z nejstabilnějších je protein známý jako aceGFP, odvozený náhodnou mutagenezí bezbarvého proteinu izolovaného z *Aequorea coerulescens* (33).

### **5.2.2. BFP**

První fluorescenční protein emitující v modro-zelené azurové spektrální oblasti byl objeven současně s BFP během studie mutageneze, která přeměnila zbytky tyrosinu v GFP na tryptofan (Y66W). Tento protein je označován jako CFP (cyan fluorescent protein). Následné vylepšení vyústilo v produkci ECFP s větším jasnem a fotostabilitou. Řada experimentů přinesla další užitečné fluorescenční proteiny z azurové spektrální třídy. Mezi vylepšené azurové fluorescenční proteiny, které byly nedávno zavedeny, patří CyPet a lepší tyrkysová varianta nazývaná Cerulean (33).

### **5.2.3. YFP**

Žluté fluorescenční proteiny patří mezi nejvšestrannější geneticky kódované sondy, které byly zatím vyvinuty. První příslušník skupiny byl připraven poté, co se ukázalo, že zbytek threoninu 203 (Thr203) je umístěn v blízkosti chromoforu a že je potenciálně schopen měnit spektrální charakteristiky při substituci. Mutace této alifatické aminokyseliny na několik aromatických funkčních skupin byly zavedeny za účelem vyvolání  $\pi$ -orbitalového stohování a za účelem pokusu o stabilizaci excitovaného stavu dipólového momentu

chromoforu. Několik YFP (yellow fluorescent protein) variant bylo původně vyvinuto ve snaze maximalizovat jas a stejně tak ke zvýšení rychlosti zrání. EYFP byl vytvořen z původní žluté varianty zavedením lysinu na pozici 69 místo glutaminu (Q69K). Kombinace vysoké úrovně jasu a vlnového profilu emisního fluorescenčního spektra EYFP předurčuje tuto sondu jako vynikajícího kandidáta pro vícebarevné zobrazovací experimenty v rámci fluorescenční mikroskopie, a to i přesto, že zrání je pomalejší. Nicméně původní varianty žlutého fluorescenčního proteinu přinášejí některé problémy. Jsou velmi citlivé na kyselé pH ztrácejí přibližně 50 % jejich fluorescence při pH 6,5. U většiny z proteinů v této třídě (odvozené od *Aequorea*) bylo také prokázáno, že jsou znatelně citlivé na chloridové ionty. Pokračování genetického vývoje YFP rodiny vedlo k objevu, že existuje jen jedno místo mutace v blízkosti chromoforu a to substituce methioninu za glutamin v pozici 69 (Q69M), která výrazně zvyšuje kyselou stabilitu proteinu a snižuje citlivost na chlorid. Varianta Citrín pojmenovaná podle žluté barvy a odolnosti vůči kyselinám také exprimuje na mnohem vyšší úrovni kultur savčích buněk a ukazuje téměř dvojitou fotostabilitu mnoha původních žlutých fluorescenčních proteinů (33).

#### **5.2.4. DsRED**

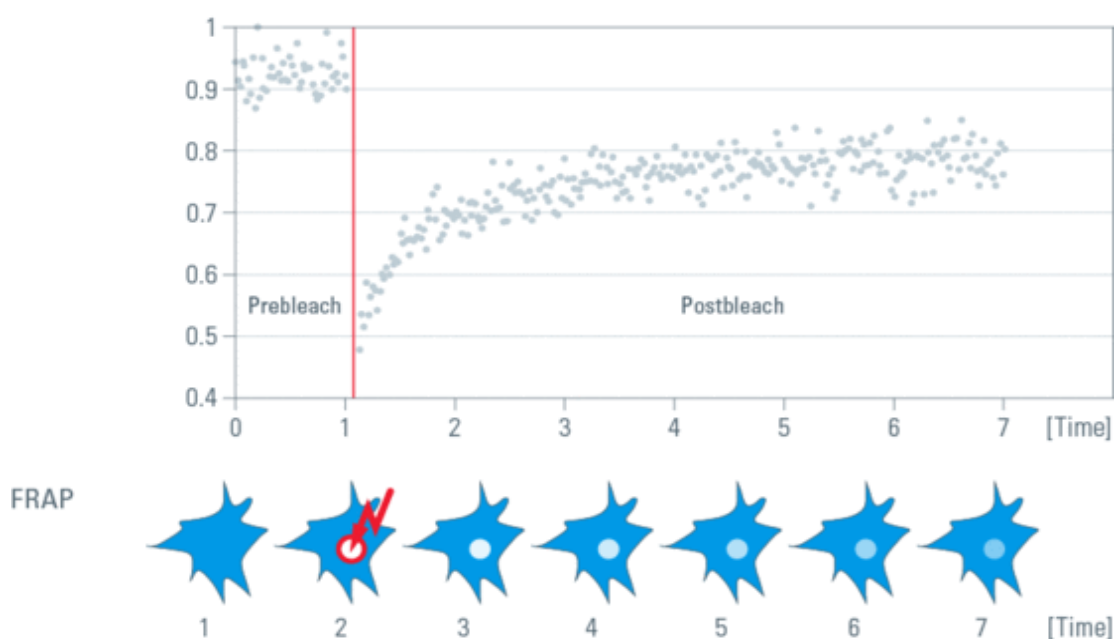
Červený fluorescenční protein, označovaný také jako red fluorescent protein, je protein zodpovědný za červené zbarvení korálu rodu *Discosoma*. Užívanější varianta je DsRED monomer, který vykazuje vynikající odolnost vůči extrémním hodnotám pH. Je extrémně stabilní, což umožňuje sledování fluorescence po delší dobu. Je ideální volbou při průtokové cytometrii a fluorescenční mikroskopii. Výhodou DsRED-monomeru spočívá také v tom, že jsou dobře snášeny v savčích buňkách (34).

## **6. MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY**

Mezi mikroskopické metody používané pro studium dějů v živých buňkách řadíme například FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FLAP (fluorescence localization after photobleaching), FLIP (fluorescence loss in photobleaching), FRET (fluorescence resonance energy transfer), BRET (bioluminescence resonance energy transfer), FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy), FCS (fluorescence correlation spectroscopy), PRIM (proximity imaging) a další.

## 6.1. FRAP

Fluorescenční zobrazovací technika FRAP byla vyvinuta v 70. letech 20. století, pro studium mobility proteinů v živých buňkách. Ta se zjišťovala pomocí měření rychlosti obnovy fluorescence ve „vybělených“ oblastech. FRAP technika nachází značné využití v buněčné i molekulární biologii. Princip metody spočívá v označení zkoumané bílkoviny pomocí fluorescenčních proteinů (např. GFP). Poté se malá část buňky osvítil silným laserovým paprskem, což vede k fotobleachingu (fotovybělení) (35).



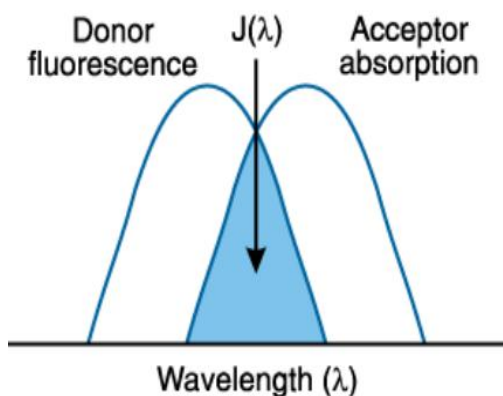
**Obrázek 16.** FRAP mikroskopie - Intenzita fluorescence v čase, červená příčka znázorňuje bělení (36).

Díky laterálnímu transportu sledujeme návrat značené částice do vybělené oblasti. Technika FRAP se využívá pro zobrazení a měření míry intracelulární molekulární dynamiky. Jedná se například o zobrazování dynamiky mikrotubul a cytoskeletu nebo mobility membránových proteinů (37).

Technika FRAP může být využita také pro monitorování proteinů mimo membránu. Poté, co je sledovaný protein pomocí exprese změněn na fluorescenční, je konfokální mikroskop použit k „vybělení“ a k následnému monitorování oblasti cytoplasmy, vřeténka, jádra nebo jiné buněčné struktury (38, 39).

## 6.2. FRET

Technika FRET (fluorescence resonance energy transfer) umožňuje studium molekulárních interakcí uvnitř živých buněk s vylepšeným prostorovým a časovým rozlišením, citlivostí a širším spektrem biologických aplikací. Metodou FRET označujeme fyzikální proces, který je závislý na vzdálenosti a energie je zde nezářivě přenesena z excitovaného molekulárního fluoroforu, označovaného také jako donoru, jinému fluoroforu, tzv. akceptoru. Většinou jde o vzdálenost 10-100 Å. Přenos probíhá pomocí mezimolekulární dipól-dipól vazby s dlouhým dosahem. Rozsah použitelnosti daného D-A (donor-akceptor) páru je dán kritickou (Försterovou) vzdáleností  $R_0$ . Tu můžeme vypočítat pomocí absorpčních a fluorescenčních charakteristik molekul. Zjednodušeně lze říci, že emisní spektrum jednoho fluorochromu se musí překrývat s excitačním spektrem druhého fluorochromu. Pokud jsou splněny tyto podmínky, pak excitovaný fluorochrom interaguje s druhým fluorochromem. Jelikož se jejich spektra překrývají, dochází k vyzáření energie v podobě fluorescence (40, 41).



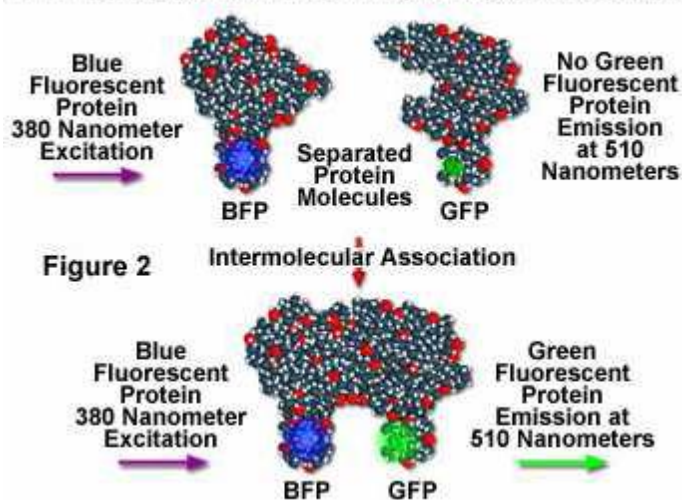
**Obrázek 17.** Diagram závislosti fluorescence donoru a absorpce akceptoru (41).

Měli by zahrnovat dostatečný odstup v excitačním spektru pro selektivní stimulaci GFP donoru, překrytí (30%) mezi emisním spektrem donoru a excitačním spektrem akceptoru k získání efektivní přenosu energie a přiměřené separaci v emisních spektrech mezi donorovým a akceptorovým GFP umožňující nezávislé měření fluorescence pro každý fluorofor. FRET zobrazovací metody založené na GFP jsou vhodné pro rozčlenění a určení funkční organizace živých buněk a pro sledování pohybu proteinů uvnitř buněk (42).

Existuje několik mikroskopických technik FRET, z nichž každá má své výhody a nevýhody. Používají se pro různé biologické aplikace včetně studií struktury organel,

konjugovaných protilátek, cytochemických identifikací a oxidačního metabolismu. Nejpoužívanější a nejjednodušší technikou je wide-field mikroskopie. Využívá se pro kvantitativní srovnání buněčných kompartmentů a časosběrné studie buněčné motility, intracelulární mechaniky a molekulárního pohybu (40).

#### FRET Detection of *in vivo* Protein-Protein Interactions



Obrázek 18. Detekce pomocí FRET (43).

### 6.3. BRET

Na stejném principu jako FRET technika pracuje i technika BRET. Rozdíl mezi těmito metodami je v použitých fluorochromech. Technika BRET využívá fluochromy vyskytující se volně v přírodě (44).

BRET technika využívá jako zdroj energie donoru bioluminiscenci. Jako donor BRET je většinou používán enzym luciferasa, který indikuje fluorescenci luciferinu v přítomnosti ATP. Jako akceptorů se využívá GFP nebo YFP. Technika BRET se nejčastěji využívá pro sledování interakcí proteinů v živých buňkách (45, 46).

### 6.4. FLIM

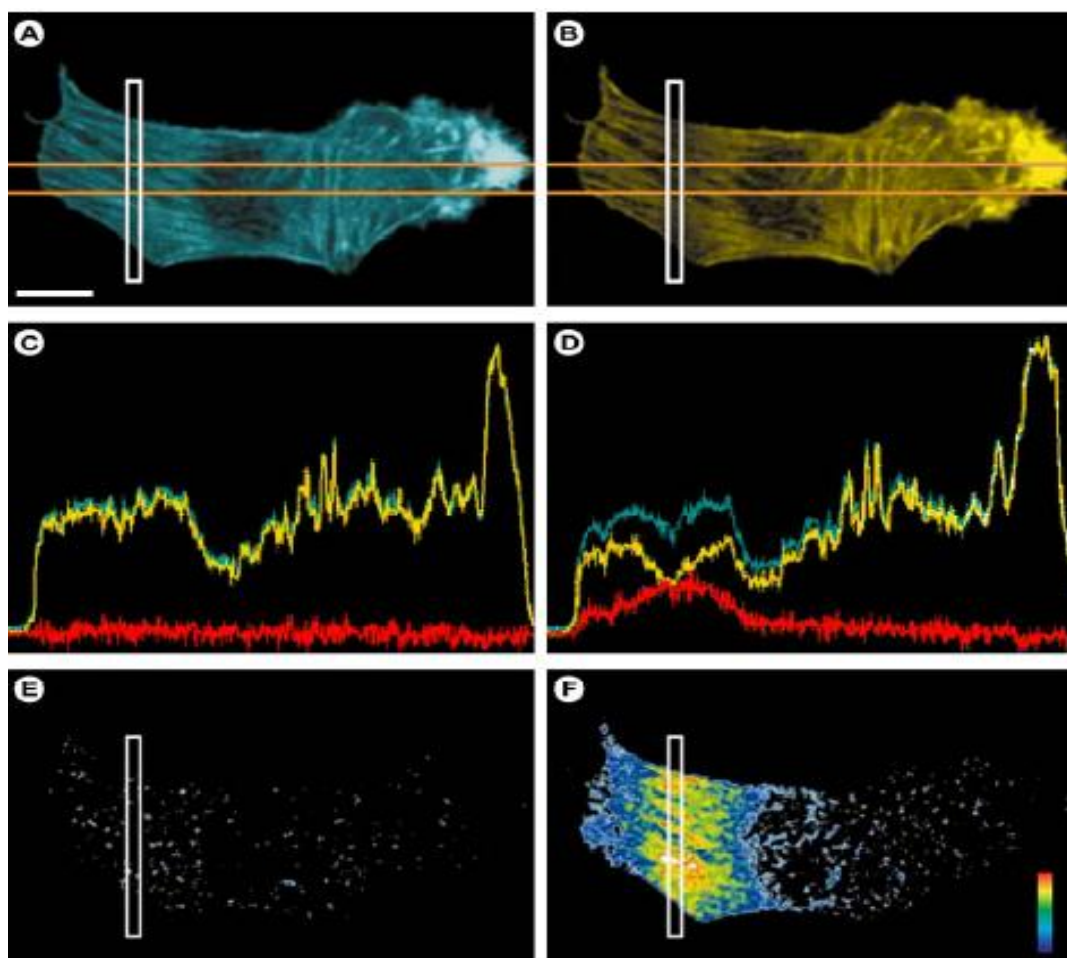
Technika FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) se zaměřuje na pozorování doby životnosti fluorescence. Tato metoda je nezávislá na koncentraci fluorochromu a na intenzitě excitace. Místo toho sleduje lokalizované změny v životnosti fluorescenční

sondy a poskytuje obrovskou výhodu pro zobrazování dynamických akcí uvnitř živých buněk. V kombinaci s metodou FRET tento přístup poskytuje přímé důkazy pro fyzikální interakce mezi dvěma nebo více proteiny s velmi vysokým prostorovým a časovým rozlišením (47, 48).

Technika FLIM se dále dělí do dvou módů. Jeden sleduje frekvenční závislost a druhý časovou závislost doby excitace. V každém případě FLIM měření závisí na registraci signálu bodu, ve kterém je vzorek ozařován. Tento bod se označuje také jako "Start". Druhým snímaným bodem je "Stop", což je bod, ve kterém je fluorescence dokončena. Měření se zaznamenává pomocí počítače. Podstatou metody FLIM ve spojení s multifotonovou mikroskopií je, že pulzní laser ozaří vzorek a zároveň odešle zprávu do počítače. To je signálem pro bod "Start". Fotonásobič pak zaznamenává fluorescenci ze vzorku a to až do dalšího laserového pulsu, který signalizuje, že byl proces zastaven. Měření probíhá v intervalu mezi signálem "Start" a "Stop" a software umožní výpočet hodnoty fluorescence značených složek (47, 48).

## **6.5. FLAP**

FLAP je metoda, která se využívá pro označování a následné sledování specifických molekul v živých buňkách. Molekula, která má být identifikována, při použití metody FLAP nese dva fluorofory. První z fluoroforů slouží k vybělení vzorku, druhý fluofor je referenční. Ačkoliv metoda byla vyvíjena pro sledování fluorescenčních proteinů přímou fotoaktivací, objevuje se zde řada nedostatků. Za účelem prokázání FLAP techniky byla využita jaderná mikroinjekce cDNA fúzních konstruktů b-aktinu pomocí žlutých (YFP) a azurových (CFP) fluorescenčních proteinů s cílem sledovat současně rychlou relokační dynamiku monomerního G-aktinu i mnohem pomalejší dynamiku vláknitého F-aktinu v živých buňkách. Vzniklé obrazy se zaznamenávají použitím laserové konfokální mikroskopie. Argonový laser je využíván pro excitaci CFP a YFP a dichromatické zrcadlo rozděljuje dva emisní kanály. Metoda FLAP pracuje na principu snímání dvou obrazů a jejich následné diferencí. Každá obrazová linie je snímána na dvakrát na nejvyšší míru skenování ( $\mu\text{s}/\text{pixel}$ ), nejprve na 514 nm laserového paprsku s detektorem YFP a poté na 458 nm laserového paprsku s detektorem CFP (49).



**Obrázek 19.** Transformovaný kryší fibroblast ukazuje současně získané snímky CFP (A) a YFP (B) hned po fotobělení lamely v úzkém pruhu (bílý obdélník). Profily intenzit integrované mezi oranžovými liniemi před fotobělením (C) a po (D) fotobělení ukazují CFP (azurová), YFP (žlutá) a FLAP (červená) signály. Snímky FLAP odpovídající profilům (C) a (D) jsou znázorněny v kódované pseudobarvě na (E) a (F). Bělicí čas 3,8 s. Měřítka: 10 um (50).

Hlavní výhodou FLAP techniky je, že umožní detekci a sledování dílčích populací, které se rychle pohybují a mají krátkou dobu pobytu. Takové studie by nebyly možné s použitím FRAP nebo FLIP. Kromě toho techniku „photodecagingu“ fluorescenčních sond nelze použít pro fluorescenční proteiny, které jsou exprimovány přímo v živých buňkách. Tím FLAP získalo významné výhody oproti obvyklejším metodám (50).

FLAP technika je ilustrována na obr. 37. Ukazuje kryší fibroblast, ve kterém byly fúzní konstrukty beta-aktinu mikroinjektovány žlutými (YFP) a azurovými (CFP) fluorescenčními proteiny do jádra pro studium aktinu. Z této studie se došlo k závěru, že globulární G-aktin zobrazuje relokační dynamiku mnohem rychleji než filamentární F-aktin (50).

## 6.6. FLIP

Metoda FLIP je široce používaná zobrazovací technika, která je obdobou metody FRAP. Zaměřuje se na zkoumání molekulární mobility a dynamiky v živých buňkách. Definovaný prostor se v průběhu času opakovaně bělí pomocí laserového paprsku a jeho okolí je sledováno pro snížení hladiny fluorescence. I přes značnou popularitu této metody, zde chybí nástroje pro kvantitativní analýzu. Typicky uživatel definuje oblasti zájmu (ROI) pro další analýzu, která je subjektivní a neumožňuje srovnávání různých buněk a experimentální nastavení. Využívá se dvou vzájemně se doplňujících metod pro detekci a kvantifikaci proteinů (36, 51, 52).

V prvním přístupu se používá protáhlá exponenciální funkce (StrExp), která je přizpůsobena fluorescenci ztráty (FL) uvnitř běleného regionu i mimo něj. Díky tomu tato funkce pomáhá popsat kinetiku FL. Prostorová změna parametrů vypočtených z funkce StrExp pak umožňuje detekci difuzních bariér pro EGFP v jádru a cytoplazmě živých buněk. Druhá metoda kombinuje SPT (Single particle tracking) s multi-kompartmentovým modelováním FL kinetiky. Jelikož uvažuje FL ve vybělených regionech i mimo něj, je tato metoda samokalibrační (53).

## 6.7. TIRF

Základem TIRF (total internal reflection fluorescence) mikroskopie je pozorování velmi tenké oblasti vzorku v těsné blízkosti krycího skla, toho se využívá zejména pro vynikající poměr signál-šum. Princip totálního odrazu popisuje Snellův zákon, který vysvětluje šíření záření mezi dvěma různými prostředími (54).

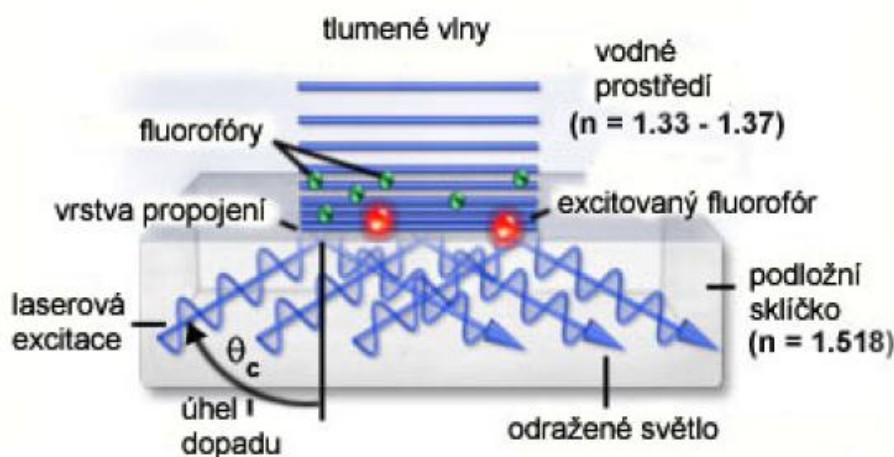
$$\frac{\sin(\theta_1)}{\sin(\theta_2)} = \frac{n_2}{n_1}$$

kde  $\theta_1$  představuje úhel dopadu paprsku na rozhraní,  $\theta_2$  je úhel lomu,  $n_1$  a  $n_2$  jsou indexy lomu daných prostředí. Existuje tzv. mezní úhel  $\theta_1$ , pro který se světelný paprsek láme rovnoběžně



s rozhraním ( $\theta_2 = \pi/2$ ). Teprve po překročení tohoto mezního úhlu dochází k totálnímu odrazu (54).

V důsledku totálního odrazu na rozhraní vzniká slabé elektromagnetické pole. Se vzdáleností od rozhraní intenzita tohoto pole exponenciálně klesá. Z tohoto důvodu elektromagnetické pole exponenciálně klesá a to až do stovek nanometrů. Ve zkoumaném vzorku dochází v této vzdálenosti k excitaci fluoroforů a jejich následné detekci. Díky tomuto zobrazení, dojde k odklonu ohniskové roviny, to vede k potlačení fluorescence pozadí a dojde ke zvýšení poměru signál-šum (54).



Obrázek 20. Princip TIRF mikroskopie (54).

## 6.8. Multidimenzionální laserová konfokální mikroskopie

Jedná se o trend ve vědeckém výzkumu, který nám umožňuje analýzu více složek v jednom okamžiku. Technologie multidimenzionální identifikace proteinů byla vyvinuta pro stanovení obsahu proteinů ve vzorku. V závislosti na vytváření kontrastu se získané informace o buněčné struktuře budou u různých mikroskopických technik lišit. Multidimenzionální mikroskopie umožňuje v jednom okamžiku generovat více snímků s odlišnými vlastnostmi vzorku. Příkladem může být využití při studiu složení a dynamiky fokálních adhezních struktur. K charakterizaci složek fokálních adhezí a jejich distribuce v jejich vzájemném vztahu a ve vztahu k aktinu v buňce bylo použito několik různých fluorescenčních kanálů (55).

Pokroky ve výběru dostupných fluoroforů a ukázkových postupů přípravy způsobují to, že může být používáno více kanálů fluorescence a to jak na žijící, tak na fixované buňky. To nám umožní generaci informací o lokalizaci různých složek v buňce. Tento postup můžeme dále rozšířit o spojení AFM (atomic force microscopy) s fluorescenční mikroskopií a mikroskopií s fázovým kontrastem. Tím docílíme, že můžeme zkoumat nejen umístění jednotlivých proteinů, ale také dynamiky povrchových struktur současně. Kombinací zobrazování povrchu pomocí AFM a fluorescenčního zobrazování kontaktních adhezí, umožňuje porovnání dynamiky kontaktních adhezních struktur na bázi buňky z aktinových struktur na povrchu buňky. V další fázi dá kontrastní obraz celkový dojem o buněčné morfologii (55).

## 6.9. FCS

FCS (fluorescence correlation spectroscopy) je metoda, při které měříme časové změny intenzity fluorescence způsobené difúzním pohybem samotných molekul. Tato technika využívá konfokálního mikroskopu a slouží ke zkoumání jakýchkoliv fluorescenčně značených molekul v roztoku, na membránách, ale i v živých buňkách. Pokud zkoumaná částice nevykazuje sama o sobě fluorescenci, využijeme k zviditelnění označovací techniku. Využívá se pro měření dynamických vlastností částic. Koeficient  $D$  je jeden z nejdůležitějších parametrů neboť obsahuje informace o velikosti a hmotnosti pohybující se částice. Difúzní koeficient  $D$ , který má jednotky  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , popisuje náhodný pohyb v roztoku. Čím větší je koeficient difúze, tím rychleji se pak částice pohybuje. Protein, pohybující se ve vodě se sráží s molekulami vody, což způsobí řadu malých pohybů v náhodných směrech. To vede k náhodné trajektorii  $\vec{r}(t)$  individuální molekuly. Trajektorii můžeme charakterizovat tzv. střední druhou mocninou posunu  $\langle r^2 \rangle$  popisující oblast, která se vztahuje na částice v určitém čase. Jedná se o lineární závislost (56).

$$\langle r^2 \rangle = 6 \cdot D \cdot t \quad (1)$$

Matematické výrazy koncentrace korelační funkce jsou získány z řešení Fickova druhého zákona ve válcových souřadnicích s osou  $z$  jako směrem laserového paprsku. Fickův zákon, označovaný také jako makroskopický difúzní zákon, který byl známý až od počátku 20. století, popisuje účinky difúze. Může být odvozen i z mikroskopických pozorování (Brownův

pohyb). Albert Einstein odvodil vztah pro difúzní koeficient, který jej spojuje s vlastnostmi částic a roztokem, ve kterém se pohybují. To popisuje Stokes-Einsteinova rovnice (56, 57).

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (2)$$

Kde  $k_B$  představuje Boltzmanovu konstantu, která odpovídá  $1,3806504 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $T$  odpovídá absolutní termodynamické teplotě,  $\eta$  určuje viskozitu roztoku,  $R_h$  popisuje poloměr dynamických částic (56).

FLCS (FLCS – Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy) je metoda, která nám umožňuje rozlišit ve směsi fluorofory s různou dobou života. Získáváme autokorelační funkci jednotlivých fluoroforů i jejich kroskorelaci. Provedení spočívá v excitaci vzorku krátkými laserovými pulsy v řádech desítek MHz. Pomocí detektoru jsou pak zaznamenávány dva časy pro každý přicházející foton. Jedná se o „makročas“, který je měřen s přesností na sto nanosekund a „mikročas“, s přesností v řádu pikosekund. Mikročas určuje dobu, která uplynula mezi posledním laserovým pulsem a zaregistrováním dalšího fotonu. Jeho hodnota nám poskytne informace o průběhu dohasínání fluoroforu, ze kterého byl daný foton emitován. Makročas zaznamenává polohu na kontinuální časové ose od začátku experimentu. V tomto čase se projeví například přechody do tripletního stavu nebo difúze molekul (58).

Technika FLCS využívá statických filtrů, které umožňují vznik dvou oddělených signálů ze signálu celého vzorku. Intenzity signálů fluktuují v čase a lze z nich vypočítat nejen autokorelaci jednotlivých komponent, ale i kroskorelaci mezi nimi. Statické filtry nacházejí hlavní využití u vzorků se dvěma a více fluorofory, ale slouží i k odlišení prostředí, ve kterém se nachází fluorofor pouze jeden. Příkladem může být kondenzace DNA, u které má fluorofor jinou dobu života v nezkondenzované DNA oproti z kondenzované DNA. Můžeme tak sledovat oddělené signály a získat bližší informace o mechanismu změny konformace řetězce DNA (59).

## 6.10. LSC

LSC je cytofluorometr na mikroskopické bázi, který nabízí nepřeborné množství analytických schopností. Multilaserem buzená fluorescence emitovaná z jednotlivých buněk

se měří při různých vlnových délkách a to velmi rychle (až 5000 buněk / min) s vysokou citlivostí a přesností (60, 61, 62).

Metoda LSC slouží k identifikaci buněk, které se liší ve stupni kondenzace chromatinu (např. mitotické nebo apoptotické buňky nebo lymfocyty vs granulocyty). Lze díky ní určit detekci translokace mezi cytoplazmou a jádrem. Technika LCS nachází uplatnění také při fluorescenční analýze in situ hybridizace, buněčné imunofenotypizaci, analýze fenotypu potomstva jednotlivých buněk v testu klonogenicity. Slouží také jako vizuální kontrola, zobrazování, nebo sekvenční analýza buněk naměřených brzy po jejich přemístění (za použití různých sond) (60, 61, 62).

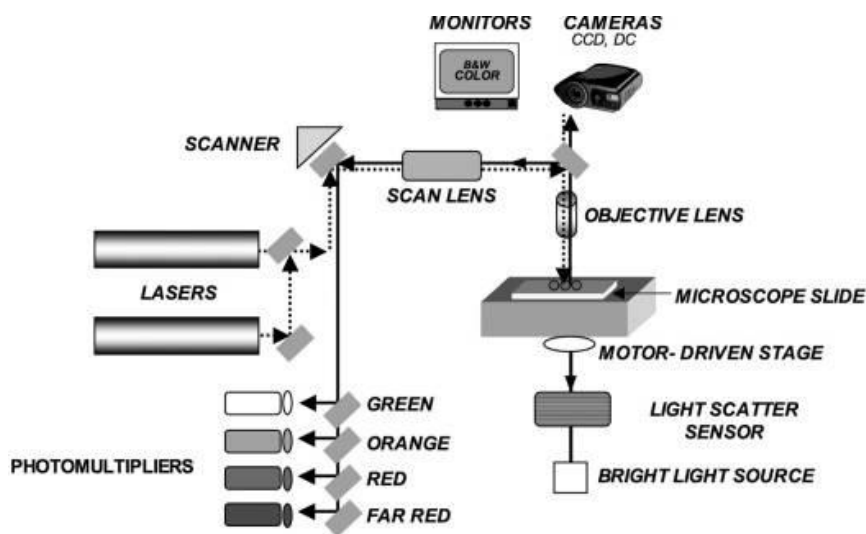
LSC sdílí s průtokovou cytometrií mnoho užitečných vlastností včetně automatizace, přesnosti kvantifikace, rychlosti a poskytuje spolehlivé informace o buněčné profileraci. Navíc má některé výhody, mezi které patří například minimální požadavky na tkáň, protože nevyžaduje žádnou speciální preparaci vzorku. Dále má potenciál pro vizuální selekci měřených buněk. Z těchto důvodů je LSC vhodná pro použití v klinických laboratořích. FCM i LSC umožňují přesné a rychlé měření apoptózy v různých kulturách a klinických vzorcích (např. solidní nádory, aspiráty kostní dřeně, periferní krev, atd.). Dále FCM a LSC umožňují korelaci apoptózy s polohou umírající buňky v buněčném cyklu (61, 63).

Během posledních tří desetiletí se průtoková cytometrie (FC) stala samozřejmostí v různých oborech biologie, medicíny a biotechnologií. Protože jsou však buňky měřeny jako suspendované v proudu tekutiny, jsou často nevhodné pro měření. Analytické schopnosti FC jsou díky těmto nevýhodám omezeny vůči mnoha aplikacím (64).

Jednou z běžných aplikací používaných v LCS technice je fluorescenční in situ hybridizace (FISH), díky které jsme schopni prostorově rozlišit rozdělení fluorescenčních oblastí v buňce. Slouží k analýze jadérka a proteinových translokací mezi jadérkem a nukleoplasmou. Umožňuje nám odhadnout velikost jednotlivých jadérek, počet jadérek na jádra apod. Používá se také obslužný FISH software. LCS ve spojení s FISH se používá pro měření různých vlastností potomstva jednotlivých buněk (fenotypu jednotlivých kolonií buňky) jako je například velikost kolonií (plocha, obvod, počet buněk na kolonii), exprese p53 nebo estrogenu (na kolonii, na buňku, na jednotku DNA nebo proteinu), heterogenity kolonií a rozdělení buněčného cyklu jednotlivých buněk v koloniích (64).

Základní strukturní a optické komponenty nám poskytne mikroskop, jehož paprsky ze dvou nebo tří laserů jsou prostorově sloučeny dichromatickým zrcadlem. Jako laserů se

využívá argon-iontových nebo helium neonových. Zrcadlo odráží paprsky skrz epi-iluminační port mikroskopu a zobrazuje skrz čočky objektivu na sklíčko. Oscilace zrcadla způsobí průnik laserových paprsků na oblast sklíčka pod objektivem. Sklíčko, u kterého je pomocí sensorů monitorována jeho pozice XY, je umístěno na počítačem kontrolované motorizované části mikroskopu, která se pohybuje po 0,5 $\mu$ m krocích během každého skenu laseru, kolmo ke skenu. Pomocí čočky kondenzátoru je laserové světlo rozptýlené buňkou zobrazeno a jeho intenzitu zaznamenávají senzory. Vzorkem emitovaná fluorescence je shromažďována objektivem a dále přeměrována na skenovací zrcadlo. Po odrazu prochází řadou dichroických zrcadel a optických emisních filtrů a dosáhne jednoho ze čtyř fotonásobičů. Každý z fotonásobičů pak zaznamenává fluorescenci konkrétního rozsahu vlnové délky. Ta je definována pomocí kombinace filtrů a dichromatických zrcadel. Zdroj světla, který je dodatečný k laserům, poskytuje procházející světlo pro vizualizaci objektů přes okulár nebo zařízení. Jako zařízení se využívá Charge-coupled zařízení, což je zařízení s vázanými náboji (CCD) kamery (60).



**Obrázek 21.** Schéma Laser scanning cytometr. (60).

Původně bylo LSC navrženo jako zobrazovací doplněk k tradiční průtokové cytometrii. Umožňuje zpracování adherentních buněk a dále zahrnuje také analýzu tkání, tkáňových řezů a dalších vzorků, které nejsou vhodné pro analýzu průtokovou cytometrií. LSC využívá pro analýzu počítače a optoelektronická zařízení založená na principu laseru pro rychlé a automatické měření biochemických složek vzorků doplněné o zobrazování s variabilním rozlišením. Výhodou je získání většího množství snímků ve vysokém rozlišení fluorescenčně a chromaticky označených vzorků současně s kvantitativními údaji. Metoda se využívá pro

automatická měření stechiometrických kvantitativních vlastností na jednotlivých buňkách, s určitou mírou přesnosti, reprodukovatelnosti a dynamickým rozsahem nesrovnatelným s alternativními technologiemi. Pomocí této metody můžeme analyzovat buněčné vzorky, tkáňové řezy nebo i cytologické stěry. Přispívá k zobrazení velkého množství multi-dimenzionálních informací pomocí sofistikovaného analytického softwaru, který produkuje výsledky podobné průtokové cytometrii. Tyto informace jsou pak snadno přístupné i pro uživatele neznalé nástrojů LSC (65).

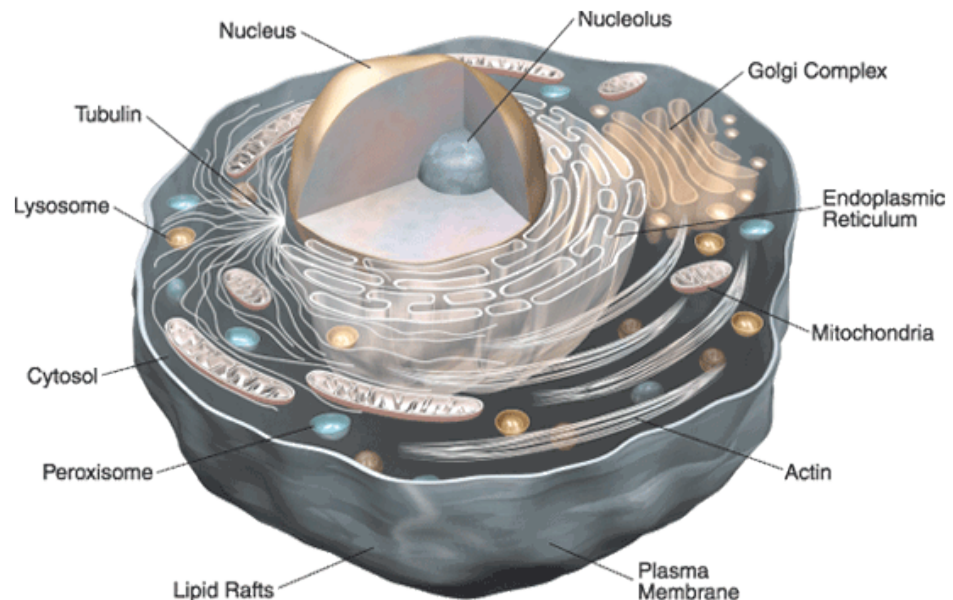
## 6.11. PRIM

PRIM technika je založena na tom, že pro termotolerantní verzi GFP existují dvě excitační maxima (395 nm 475 nm). Excitace při kratších vlnových délkách vyzařuje (emitované) světlo, které je přibližně pětikrát tak intenzivní, jako u excitace při delších vlnových délkách. Tento poměr se může změnit, pokud jsou dvě molekuly GFP ve fyzickém kontaktu, což poskytuje příležitost přímo měřit dynamickou homooligomeraci. Hlavní výhodou tohoto provedení je, že musí být vytvořen pouze jeden fluorescenčně značený expresní konstrukt, který je poté transfekován do buněk. To vede k jednoduchému a rychlému získání dat. I když může být použit standardní fluorescenční mikroskop a pořízení software péče, je třeba postarat se o správnou kalibraci. (63)

PRIM metoda může být použita například pro detekci dimerizace GFP fúzovaného na protein a seskupování glykosylfosfatidylinositolem upevněného GFP na buněčném povrchu. Zjištění, že fluorescence je spontánně generována při expresi cDNA kódovaného GFP do široké škály typů organismů a buněk, vytvořilo řadu nových možností pro biologický výzkum. Nyní mohou být vzory genové exprese přímo vizualizovány. Můžeme také zkoumat osudy proteinů v živých buňkách, monitorovat heterologní protein či analyzovat kolísání koncentrace fyziologicky relevantních iontů, jako je  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{H}^+$ . Obrazy proteinů, které jsou pořízeny metodou PRIM za pomoci značení GFP, nám umožňují odhalit polohu, dynamiku a rozsah homotypických interakcí mezi proteiny. Technika PRIM nám poskytuje přímé informace o dynamice proteinových sestav in vitro a in vivo (66).

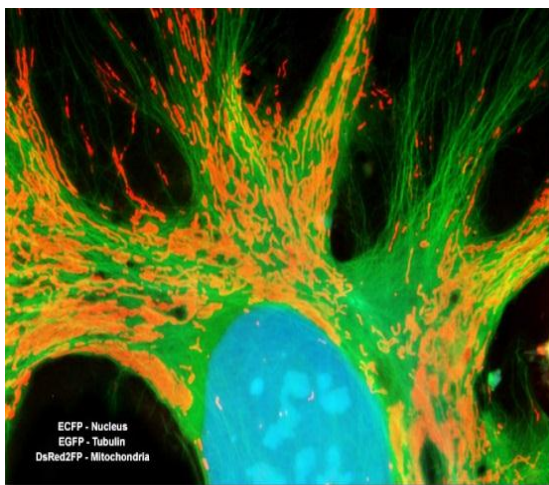
## 7. Buněčné komponenty a jejich barvení

Buňka je základní stavební a funkční jednotka organismů. Vyplňuje ji koncentrovaný vodný roztok různých látek (cytoplazma) a obklopuje je plazmatická membrána. Obvykle obsahují genetický materiál a mají schopnost se dělit. Buňky dále obsahují řadu organel, které zajišťují specifické funkce pro život buňky (5).



Obrázek 22. Struktura buňky (67).

Cytoplazmatická membrána se skládá z dvojvrstvy fosfolipidů, do které jsou vnořené bílkoviny. Hlavním úkolem membrány je funkce ochranná a transportní. Pro její barvení se využívá zejména fluorescein isothiokyanatan (FITC) (5, 24, 68).



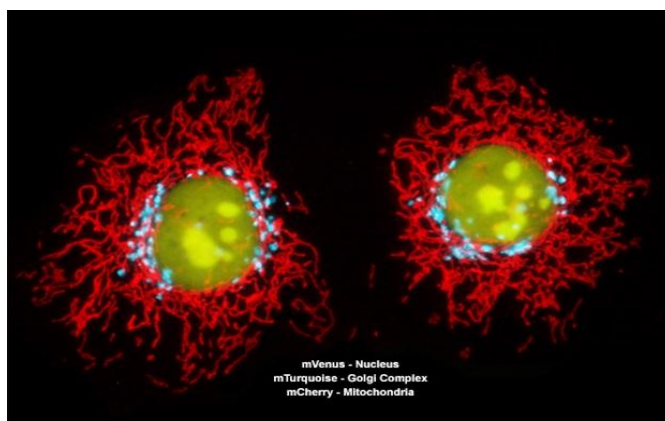
Obrázek 23. Zobrazení jádra buňky obarveného eCFP, bílkoviny tubulin, která je součástí cytoskeletu pomocí eGFP, a mitochondrie obarvené DsRed2FP (70).

Buněčné jádro je základním stavebním prvkem buňky a je zároveň nepostradatelnou součástí každé plnohodnotné buňky. Hlavní funkce jádra je řídicí a kontrolní. V jádře jsou uchovány chromozomy. Existuje řada barvicích technik pro zvýraznění jádra. Mezi nejpoužívanější patří DAPI (5, 24, 69).

Základní strukturou mikrofilament je dvoušroubovice polymerizovaného aktinu. Mikrofilamenta se podílejí na dynamických změnách tvaru buňky, na dělení a reparaci buněk, na změně tvaru cytoplazmatické membrány, na pohybu, na transportu organel a rovněž zastávají významné funkce v buněčném jádře. Probarvení využíváme Rhodamin, Faloidin (5, 24).

Mikrotubuly mají tvar dutých válců a jsou vlákna cytoskeletu, která slouží především k transportu různých struktur a látek uvnitř buňky. Jsou složeny z tubulinových monomerů (5,24).

Mitochondrie jsou semiautonomní organely eukaryotických buněk. Obsahují vlastní genetickou informaci a slouží jako energetické centrum buňky. Pro barvení mitochondrií se využívá Rhodamin 123 nebo Mitotracker (5,24,71).



**Obrázek 24.** Zobrazení Golgiho aparátu obarveného pomocí mTurquoise, mitochondrií barvením mCherry a jádra obarveného mVenus (73).

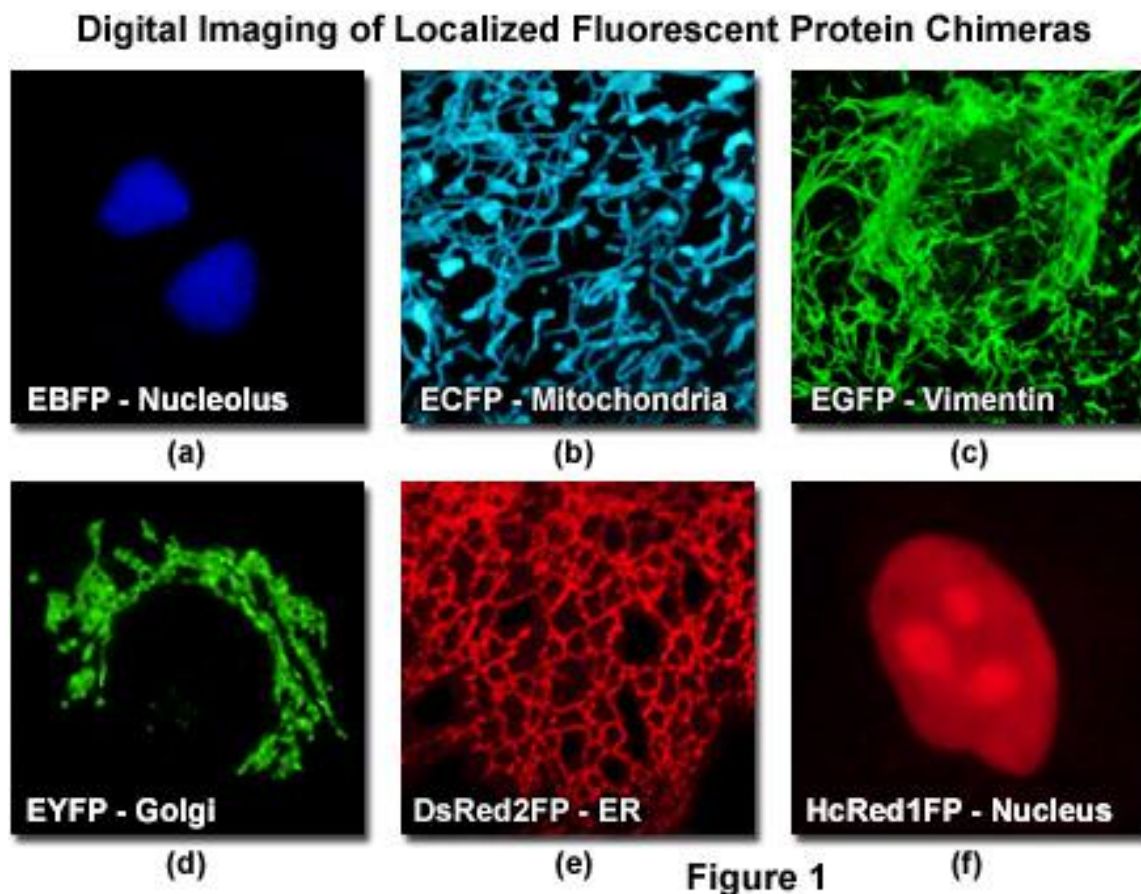
Golgiho aparát se funkčně váže na endoplazmatické retikulum a tvoří ho lamely a cisterny. Hlavní funkce Golgiho aparátu představuje syntéza polysacharidů a glykoproteinů. K barvení využíváme například Bodipy-FL-ceramid (5,24,72).

Lyzozom je kulovitý membránový útvar, který slouží k hydrolytické degradaci látek pocházejících z buňky i z jejího okolí. Uvnitř lyzozomů se nachází vhodné prostředí pro degradaci mnoha různých typů organických látek, jako jsou cukry, tuky, bílkoviny i nukleové kyseliny. Lyso-tracker se využívá pro jejich barvení (5,24,74).

Endoplazmatické retikulum představuje soustavu vzájemně propojených miniaturních membránových cisteren a kanálků, která se nachází v cytoplasmě. Rozlišujeme dva typy endoplazmatického retikula a to endoplazmatické retikulum drsné, na jehož vnějším povrchu jsou přisedlé ribozomy a endoplazmatické retikulum hladké, které je bez ribozomů.



Drsná část endoplazmatického retikula se specializuje na syntézu některých bílkovin. Hladké endoplazmatické retikulum slouží k odstraňování toxických látek. Je také místem syntézy lipidů a metabolismu hemu. Pro barvení se využívá například DiOC6 nebo Concanavalin A, Alexa Fluor 594 conjugate (5,24,75).



**Obrázek 25.** 17(a) Zobrazení jadérka obarveného EBFP, 17 (b) Zobrazení mitochondrií obarvených ECFP, 17(c) Zobrazení vimentinu obarveného EGFP, 17(d) Zobrazení Golgiho komplexu obarveného EYFP, 17(e) Zobrazení endoplazmatického retikula obarveného DsRed2FP, 17(f) Zobrazení jádra obarveného HcRed1FP (76).

Cytoplazma představuje veškerou tekutou část buňky, která je obklopená cytoplazmatickou membránou. Jedná se tekuté prostředí buňky zahrnující buněčné organely a další buněčné struktury. Tvoří prostředí pro některé důležité chemické reakce v buňce. K barvení můžeme použít Calcein AM nebo Cell Tracker Blue CMA (5,24,77).

**Tabulka 1.** Subcelulární struktury a jejich barvení fluorochromy (24,78).

STRUKTURA	FLUOROCHROM	TYP BARVENÍ	POZNÁMKA
<b>Plasmatická membrány a její komponenty</b>	FITC WGA	Přímé	Živé buňky
	TMA-DPH	Přímé	Živé buňky
<b>Jádro</b>	DAPI	Přímé	Velmi fotostabilní
	Hoechst	Přímé	Barví i živé buňky
	Akridinová oranž	Přímé	Při určitém pH barví i lysosomy
	7-AAD	Přímé	Využití i při průtokové cytometrii
	Ethidiumhomodimer 1	Přímé	váže se na dsDNA, ssDNA, RNA
<b>Mikrofilamenta (F-aktin)</b>	Rhodamin, Faloidin	Nepřímé	Odolná vůči photobleachingu
<b>Mikrotubuly</b>	Texaská červen antimyší protilátka	nepřímá imunofluorescence	Specifická
<b>Mitochondrie</b>	Rhodamin 123	přímé	Barví živé buňky
	Mitotracker	přímé	Barví živé i fixované buňky
	JC-9	přímé	Použitelná i v průtokové cytometrii
	JC-1	přímé	Selektivní pro mitochondrie
	MitoTracker® Green FM	nepřímé	-
<b>Golgiho aparát</b>	Bodipy-FL-ceramid	nepřímé	Fotostabilní
	Anti-human golgin-97 antibody (detection with an Alexa Fluor® dye-labeled secondary antibody)	nepřímé	Selektivní pro GA – detekce golgin-97
	BODIPY® FL C5-ceramide complexed to BSA	přímé	Metabolismus lipidů
	BODIPY® TR ceramide complexed to BSA	přímé	Metabolismus lipidů
	Alexa Fluor® 488 conjugate	přímé	$\alpha$ -N-acetylgalactosamin
	Alexa Fluor® 647 conjugate	přímé	$\alpha$ -N-acetylgalactosamin
	NBD C6-ceramide	přímé	Selektivně vázaný na GA

<b>Golgiho aparát</b>	CellLight™ Golgi-GFP	nepřímé	-
	CellLight™ Golgi-RFP	nepřímé	-
	Lyso-tracker	přímé	Fotostabilní
	LysoTracker® Blue DND-22	přímé	Selektivní pro kyselé organely, minimální značení mitochondrií
<b>Lysosomy</b>	LysoTracker® Green DND-26	přímé	Působí rychle
	LysoTracker® Red DND-99	přímé	Selektivní pro kyselé organely, minimální značení mitochondrií
	DiOC6	přímé	Barví i mitochondrie
	Concanavalin A, Alexa Fluor 594 conjugate	přímé	Váže se na concanavalin A
<b>Endoplasmatické reticulum</b>	ER-Tracker™ Green	přímé	Vysoce selektivní pro ER
	ER-Tracker™ Red	přímé	Vysoce selektivní pro ER
	CellLight™ ER-GFP	nepřímé	-
	CellLight™ ER-RFP	nepřímé	-
	Rhodamin $\alpha$ a $\beta$ Bungarotoxin	přímé	Specifické pro acetylcholinové receptory, živé buňky
	Fura-2	přímé	Ca <sup>2+</sup> ionty v živých buňkách
<b>Receptory</b>	Zinquin	přímé	Zn <sup>2+</sup> ionty v živých buňkách
<b>Ionty</b>	Calcein AM	přímé	Stanovení životaschopnosti většiny eukaryotních buněk
	CellTracecalceinred-orange AM	přímé	Stanovení životaschopnosti většiny eukaryotních buněk
<b>Cytoplasma</b>	CellTrace Far Red DDAO-SE	přímé	Dlouhodobé značení buněk
	CellTracker Blue CMAC	přímé	Dlouhodobé značení buněk
	CellTracker Green CMFDA	přímé	Dlouhodobé značení buněk
	CellTracker Orange CMTMR	přímé	Dlouhodobé značení buněk
	CellTrackerRed CMTPX	přímé	Dlouhodobé značení buněk

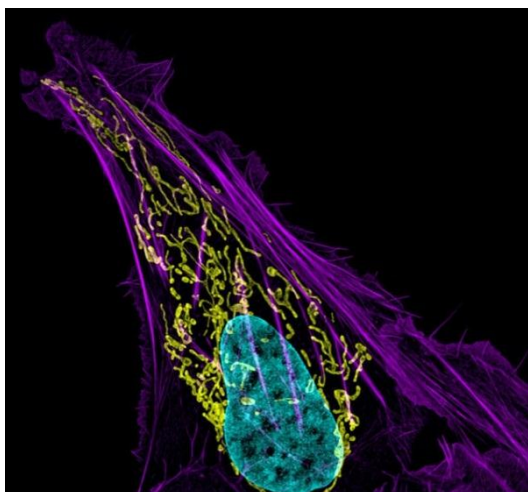
## 8. SUPER-REZOLUČNÍ MIKROSKOPIE

Široké spektrum nových nedávno zavedených metodik souhrnně označujeme jako super-rezoluční mikroskopie. Společným znakem všech těchto nových technik je, že překračují difrakční limit. Mezi tyto techniky řadíme například STED (stimulated emission depletion) a SIM (structured illumination microscopy), které jsou založeny na nelineárních světelných paprscích dosahujících vysokých intenzit. Mezi techniky, které spoléhají na vlastnosti konvertovatelných fluoroforů a schopnosti detekce jednotlivých molekul řadíme PALM (photoactivated localization microscopy) a STORM (stochastic optical reconstruction microscopy). Tyto techniky mají schopnost dosáhnout lepšího bočního rozlišení a to až k desítkám nanometrů. Obě metody mají však vlastní sadu omezení (79,80).

### 8.1. SIM

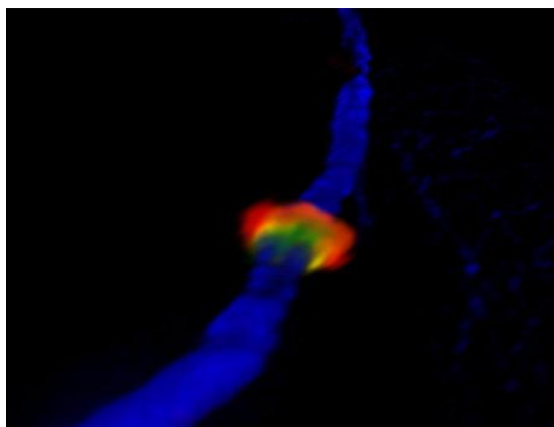
SIM (structured illumination microscopy) je technika, ve které je během pořizování obrázku generován mřížkový vzor s detaily vzorku prostřednictvím interference difrakcí na pohyblivé difrakční mřížce. Mřížka se posunuje nebo otáčí mezi každým pořízením obrázku a dochází k změnám signálu fluorescence molekul, které jsou zaznamenány pomocí citlivého detektoru a ke zviditelnění jemných detailů obrazu každého fluoroforu. Po zpracování těchto informací speciálním algoritmem, mohou být získány vysokofrekvenční informace z primárních dat pro tvorbu rekonstruovaného obrazu. Poté, co jsou získány obrázky podsetů, může být kolekce analyzována k tvorbě výsledného obrázku o vysokém rozlišení překračující difrakční limit klasické fluorescenční mikroskopie. Obecně platí, že laterální rozlišení o trochu nižší než 130 nm a axiální rozlišení nižší než 350 nm může být získáno na základě rekonstrukce pouze 10 až 15 snímků. Vztah mezi počtem rotací mřížky a očekávaným rozlišením obrázku je složitý a ve velké míře závisí na frekvenci mřížky a počtu úhlů otočení. Závislost nacházíme i v geometrickém vztahu mezi čarami mřížky a významnými vlastnostmi vzorku. Vylepšení rozlišení tedy nezávisí na vlastnostech fluoroforů. Díky tomu lze používat běžné fluorofoxy z klasické fluorescenční mikroskopie. Výsledné rozlišení může být zvětšeno zvýšením počtu rotací mřížky, avšak jen na úkor rychlosti vzorkování a zvýšení bělení. Mezi výhody SIM patří vysoká dostupnost barev a fluorescenčních proteinů pro označení vzorků, snadné provedení vícebarevného zobrazování a oproti STED je levnější. Je to uživatelská jednoduchá a podporuje i kvalitní 3D zobrazení. Hlavním nedostatkem je doba zpracování potřebná k vzniku obrázku s vysokým rozlišením (81,82).

Mikroskopie s vysokým rozlišením, trojrozměrná mikroskopie se strukturovaným osvětlením (3dSIM), slouží ke zkoumání konstrukce chromozomů. Zobrazování za hranicí difrakčního limitu je vhodné pro studie strukturální organizace meiotických chromozomů pomocí chromatinu obarveného pomocí DAPI. 3dSIM umožňuje provést kvantitativní strukturní analýzu částí, které nemohou být pomocí konvenční mikroskopie ani zjištěny (83).



**Obrázek 26.** Zobrazení pomocí SIM (84).

Dr. Lin Shao nasnímal video, v němž ukazuje vnitřní detaily mitochondrií v živých buňkách ve 3D zobrazení (HeLa buňka obarvená pomocí Mitro Tracker Green). Shao používá SIM aplikovanou na wide-field mikroskop a zdvojnásobuje normální rozlišení konvenčního mikroskopu. S touto technikou, Dr. Shao zachytil více než 50 časových bodů, které pak byly rekonstruovány ve třech rozměrech (85).

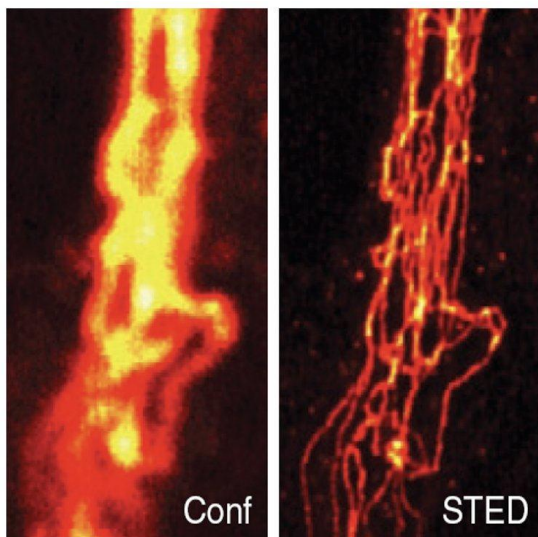


**Obrázek 27.** Aplikace SIM - intercelulární most spojující dvě nově vytvořené dceřiné buňky na konci cytokinézy (86).

SIM se používá pro sledování živých buněk s použitím GFP nebo tagRFP. Specifické orgány jako jsou mitochondrie, membrány, cytoskeleton a jádro mohou být zobrazeny pomocí CellLight® činidla v živých buňkách nebo po fixaci (87).

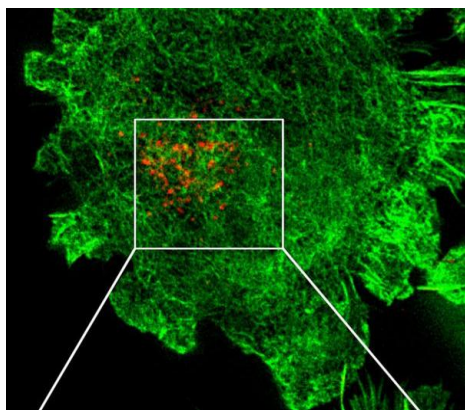
## 8.2. STED

Výzkumníci z oddělení nanobiofotoniky Institutu Maxe Plancka vyvinuli techniku, která jako první dokázala překročit Abbého limit. Jedná se o mikroskopii STED (stimulated emission depletion), která využívá fyzikálních a chemických vlastností fluoroforů. Principem metody je využití dvou překrývajících se laserových paprsků. Pro značení proteinu využíváme látku, která po nabuzení světelným paprskem světélkuje. První menší pulsní paprsek slouží k excitaci fluoroforu. Druhý silný paprsek o vysoké  $\lambda$  uvede fluorofory do stavu nasycení a následně k jejich emisi. Aby molekuly fluoroforu v době excitace byly zhaseny do základního stavu, je STED paprsek příslušně nastaven. Slabou měřitelnou emisi produkuje pouze střed fluoroforu a zbytek signálu je vyčerpán. Velikost oblasti, která je schopna emise, odpovídá intenzitě světla, která je zapotřebí k vypnutí fluorescence. Dále je nepřímo úměrná  $NA$  objektivu a přímo úměrná  $\lambda$  paprsku. Pomocí detektoru je zaznamenávána poloha a intenzita každého vyčerpaného bodu. Omezením techniky STED mikroskopie může být výběr fluoroforů, u kterých záleží na jejich charakteristice. Zejména se zaměřujeme na jejich výkon a stabilitu. Technikou STED můžeme dosáhnout rozlišení až 15 nm (88,89,90).



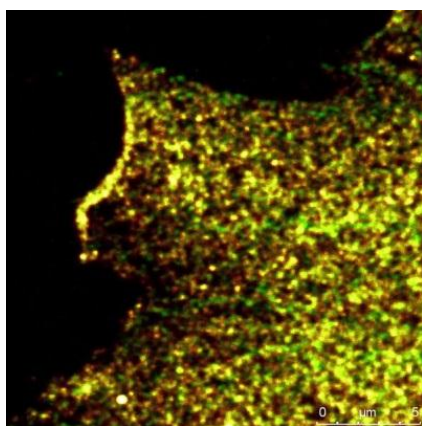
**Obrázek 28.** Porovnání zobrazení pomocí konfokální mikroskopie a STED (92).

Příkladem používání super-rezoluční mikroskopie je zkoumání struktury aktinu a jeho interakce s lytickými granulemi v imunologické synapsi NK buněk. NK buňky jsou vrozené imunitní efekторы, které rozpoznávají a zabíjejí buňky infikované virem a tumorigenní buňky. Jejich hlavní funkcí je vytvoření imunologické synapse s cílovou buňkou a následná řízená sekrece cytolytických granulí (91).



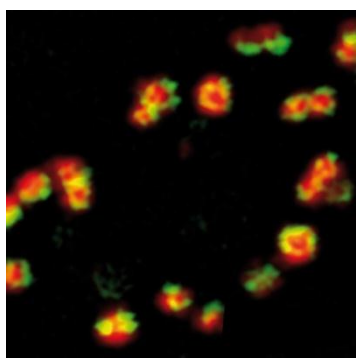
**Obrázek 29.** Vizualizace lytických granulí zobrazenými pomocí CW-STED.(93)

STED (konkrétně např. Leica TCS SP5) se dá použít pro detekci tubulinu a aktivovaného AKT za použití PAbanti-tubulinu a dále pro pozorování časové migrace AKT



**Obrázek 30.** Vyhodnocení aktivace AKT a jeho migrace pomocí STED (95).

k okrajům buňky po EFG stimulaci. Tubulin je pozorován proximálně k AKT a může usnadnit jeho migraci po aktivaci. Westernblot AKT společně s buněčnou lokalizací pomocí imunofluorescenční mikroskopie slouží k ověření cíle protilátky, ověření přítomnosti nebo nepřítomnosti AKT ve stimulovaných nebo nestimulovaných lyzátech a k ověření specifčnosti protilátky pro aktivovaný AKT (94).

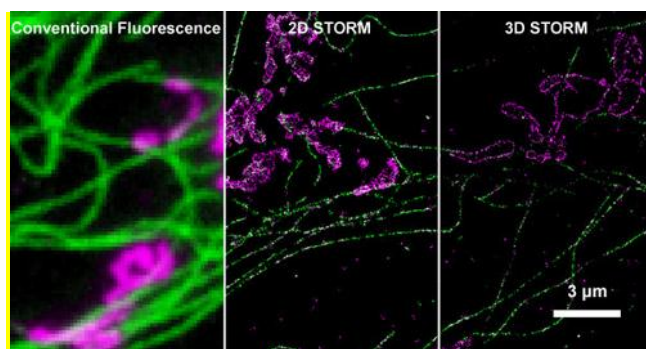


**Obrázek 31.** Presynaptická struktura T-Bar (97).

STED jde použít ke zkoumání biologické nanostruktury. Pochopení malých strukturálních změn, lokalizace bílkovin nebo redistribuce v živých buňkách, zejména v průběhu neuronální aktivity má zásadní význam pro charakterizaci synapsí. Příkladem může být zkoumání synapse *Drosophila* NMJ (500 nm diametr) a zobrazení nesynaptické struktury T-bar, kde je zapotřebí vysokého rozlišení (96).

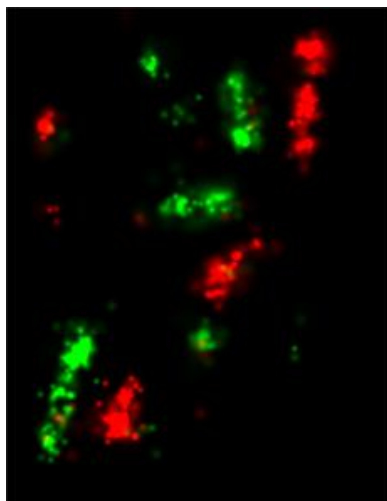
### 8.3. STORM

STORM (stochastic reconstruction microscopy) je druhem super-rezoluční mikroskopie, která nám poskytne vysoké rozlišení pod difrakčním limitem. STORM metoda obdobně jako PALM závisí na vlastnosti fluoroforů. Při této metodě mají fluorofory dva stavy. Jeden stav je schopný fluorescence a druhý nikoliv. Tyto stavy se dají přepínat světlem různých vlnových délek nebo se dají přepínat stochasticky. Fluorofory schopné fluorescence se vyskytují pouze v malém množství a jejich fluorescence se snímá do doby, než dojde k jejich vybělení. Poté se další malá část fluoroforů převede do stavu schopného fluorescence a opět se snímají do jejich vybělení. Molekuly musí poskytovat vysoké emise při nízkém osvitu, nesmí být aktivované všechny najednou. Molekuly by měly také po zhašení zůstat vypnuté. Tento postup se neustále opakuje. Během opakované náhodné aktivace se zaznamená poloha jednotlivých fluoroforů. Snímaná oblast se pulsně osvětluje laserem, různých vlnových délek a detektor pak lokalizuje zlomek aktivovaných fluoroforů. Cílem je dosáhnout nasnímání dostatečného množství fluoroforů (dostatečné množství informace). Nasnímané fotony z jednoho fluoroforu jsou detekovány na širším prostoru podle rozptylové funkce, označované jako PSF (point spread function). Střed PSF se dále matematicky určí a danému fluoroforu se tato spočítaná souřadnice přiřadí. Technikou STORM lze dosáhnout rozlišení, které se pohybuje až v jednotkách nm. K aktivaci fluorescence využívá osvětlení laserem s nízkou intenzitou. STORM využívá reverzibilně konvertovatelné fluorofory. Příkladem mohou být Cy7, Cy3, Alexa 647. Při STORM metodě dochází k nasnímání velkého množství dílčích obrazů, což má za následek delší dobu snímání celkového obrazu. Metodu lze využít pro zobrazení struktur in vivo a dosahujeme zde celkového laterálního rozlišení 30 až 60 nm (98,99,100,101).



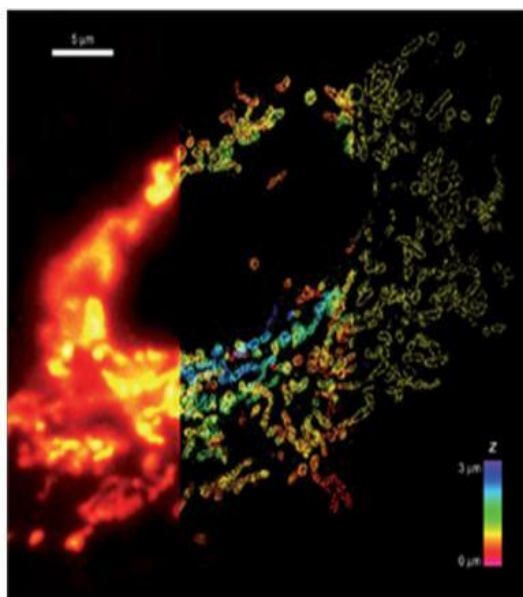
Obrázek 32. Zobrazení metodou STORM (102).





**Obrázek 33.** Superrezoluční obraz synapsí v mozku myši (104).

Použití STORM v kombinaci se SIM těží z vyššího rozlišení STORM a u SIM jde zas o to, že klade menší omezení na vzorek. Díky tomu lze studovat architekturu subcelulárních struktur jako je například centrozom a také molekulární mechanismy ovládající vývoj neuronů v centrálním nervovém systému. STORM technika je ideální pro studium molekul na synapsích v mozku a tudíž ji lze použít pro fyziologické experimenty v neurologii (103).



**Obrázek 34.** Srovnání konvenční mikroskopie a STORM na zobrazení mitochondrií v savčích buňkách (105).

## 8.4. NSOM

NSOM (Near-field scanning optical microscopy) je optická technika, která umožňuje zobrazení objektů s menším rozlišením než difrakčním limitem konvenční mikroskopie, tj. přibližně menším než poloviční vlnová délka použitého světla. NSOM technika hraje

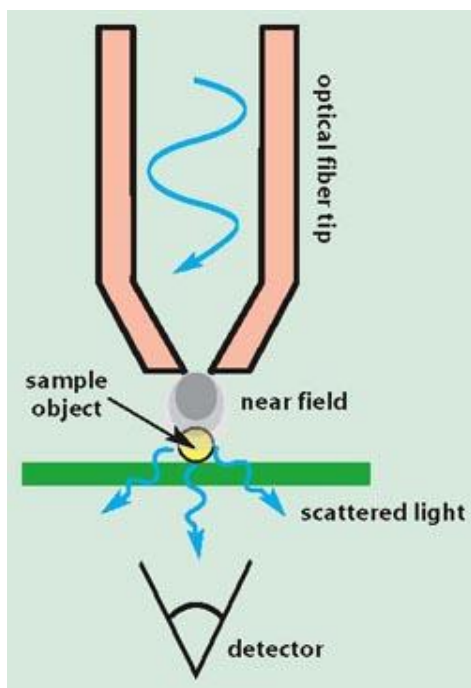
důležitou roli v oblastech výzkumu a aplikací polovodičů, organických vrstev a membrán, biologických materiálů a optiky (106).

Technika NSOM se dá popsat také jako vlna, která se neurčitě šíří pokud nedojde k absorpci nebo není lámána či rozptylována prostředím, kterým cestuje. Na druhou stranu, šíření světla v blízkém poli je omezeno na velmi krátké vzdálenosti od jeho zdroje. Díky charakteru tohoto světla je často označována jako nestála vlna a hraje hlavní roli v optice v blízkém poli. Dosah šíření fotonu z blízkého pole je úměrný fyzickým rozměrům jeho zdroje. Studované objekty musí být tedy pozorovatelné v rozmezí blízkého pole. Vlnový charakter světla způsobuje jeho difrakci, což omezuje prostorové rozlišení mikroskopu v konvenční mikroskopii (vzdáleného pole). Minimální detekovatelné rozlišení dvou bodů pro daný optický systém se nazývá Rayleighovo kritérium. Rozlišení  $R$  může být vyjádřeno jako:

$$R = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha} \quad (3)$$

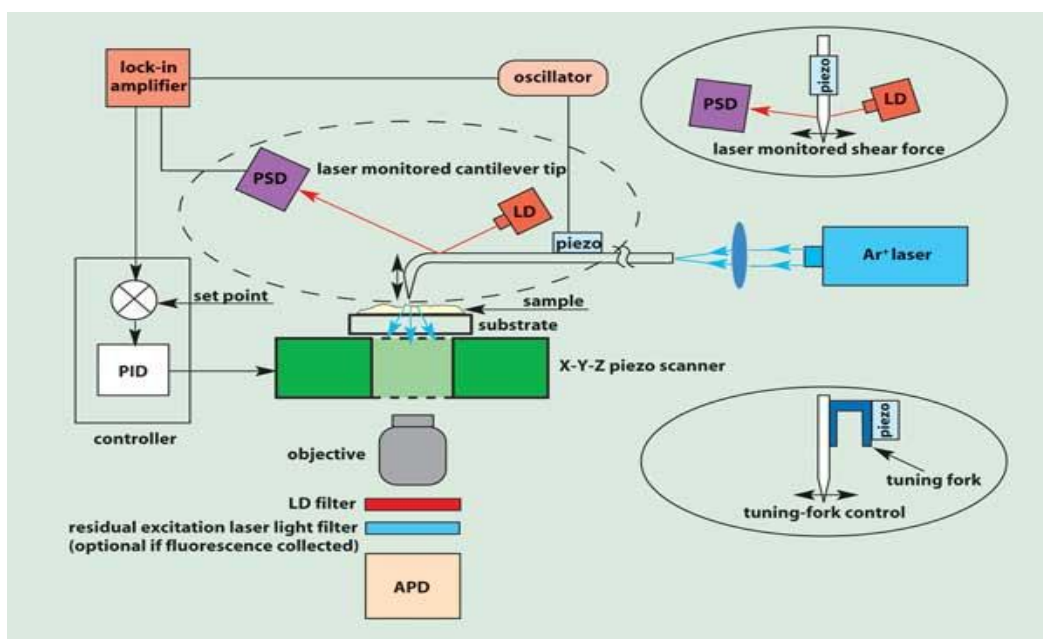
kde  $\lambda$  představuje vlnovou délku,  $n$  symbolizuje index lomu zobrazovacího média v prostoru objektu a  $\alpha$  vyjadřuje polovinu úhlu, pod kterým objektiv vidí objekt. Typicky se nejlepší dosažitelné rozlišení optické mikroskopie pohybuje kolem 200 až 300 nm. Technika NSOM dokáže jít i za hranice tohoto difrakčního limitu z důvodu velmi prostorově omezené povahy světla v blízkém poli. Pomocí NSOM dosahujeme rozlišení až 10 nm (106).

V NSOM je zužující se optické vlákno ukončené aperturovou clonou s malým otvorem o rozměrech pod hranicí difrakčního limitu světla snímáno relativně vzhledem k vzorku, zatímco špička vlákna je umístěna v těsné blízkosti povrchu vzorku. Pro pozorovatelné efekty v blízkém poli platí orientační pravidlo, které říká že, vzdálenost mezi špičkou vlákna a povrchem vzorku musí být kratší, než je rozměr otvoru špičky optického vlákna. Fotony jsou rozptýlené v důsledku vzájemného působení vzorku se světlem v blízkém poli. Díky rozptylu se fotony šíří a zaznamenává je detektor ve vzdáleném poli (106).



**Obrázek 35.** NSOM V je zužující se optické vlákno umístěno v těsné blízkosti povrchu vzorku (106).

Díky tomu, že se signál blízkého pole se nepodílí přímo na zpětné smyčce potřebné pro instrumentální řízení, NSOM přístroje nemají žádné další požadavky na řízení. Z tohoto pohledu je NSOM kombinací skenující sondy s optikou pro měření efektů v blízkém poli pomocí špičky optického vlákna a fotonového detektoru (106).



**Obrázek 36.** Režim osvětlení NSOM obecně patří do rodiny mikroskopii skenovacích sond (106).

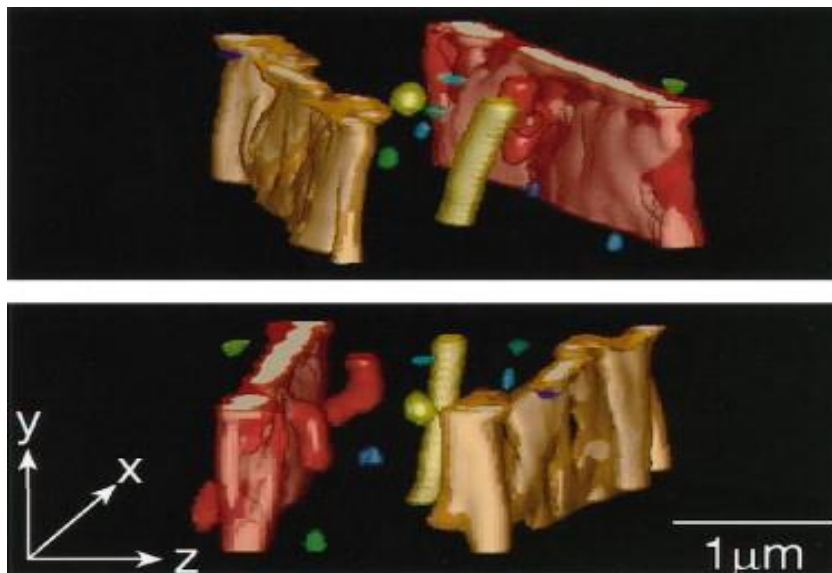
V zobrazování a spektroskopii s NSOM je intenzita světla detekována v důsledku silných elektromagnetických interakcí mezi sondou a strukturou vzorku v blízkém poli pomocí pomíjivých fotonů. Vzhledem k tomu, že NSOM využívá elektromagnetické záření, lze specifické informace o měřeném systému získat pomocí rozdílných fotonových energií, polarizace nebo detekce fluorescence tam, kde je to vhodné. Kromě toho mohou být zobrazování ovlivněna vzájemnými interakcemi sond a vzorku (106).

## 8.5. 4Pi mikroskopie

Metoda 4Pi mikroskopie umožnila zdvojnásobení hodnoty NA. Bylo toho dosaženo použitím dvou identických objektivů, které byly posazeny do opozice. Na vzorek pak světelné zdroje dopadají proti sobě a jejich paprsky spolu interferují. Pro každý bod je pak výsledkem zmenšení pozorovaného světelného objemu. U klasické CLSM je světelný objem v axiální části delší než v ose laterální. I proto je rozlišení dvou bodů v axiální ose nižší. 4Pi CLSM nám pak umožní pomocí protilehlého osvětlení zmenšení po ose ze světelného objemu a jeho následné zakulacení. Techniku 4pi mikroskopie můžeme využít pro fixované vzorky o vyšším indexu lomu, než má vzduch. Můžeme zvolit imerzní prostředí, glycerol. Dosáhneme tak axiálního rozlišení 100 nm. Tuto metodu lze také využít pro pozorování živých organismů ve vodním prostředí a to za pomoci multifotonové excitace CLSM a dekonvoluce a to za dosaženého axiálního rozlišení 190 nm. V porovnání s klasickou CLSM, která umožňuje rozlišení dvou bodů ve vzdálenosti okolo 600 nm na axiální ose, je výhodou 4pi mikroskopie především pořízení trojrozměrného obrazu. Při použití *in vivo* a díky zpracování obrazu počítačem, můžeme získat obrazy s rozlišením 100 nm (107,108).

4Pi mikroskopie může být využita pro zobrazování Golgiho komplexu. Zobrazení endogenního proteinu GM 130 jako markeru pro *cis*-Golgiho kompartment s použitím imunolabelingu s organickým fluoroforem Cy3 excitovaným při  $\lambda_{exc} = 568$  nm. Dále lze pořídit i 3D reprezentace šíření Golgiho proteinu barveného Rhodaminem 6G ve Vero buňce. Zobrazování distribuce dvou odlišných a odlišně označených proteinů má obrovský význam v buněčné biologii. To vyplývá ze skutečnosti, že ve většině případů, nejde tak úplně o distribuci určitého proteinu, který je předmětem zájmu, ale o jeho prostorový vztah k jinému proteinu v buňce. Pro takový výzkum je možné použít 4PI mikroskopie a dvou fluorescenčních barviv ve stejnou dobu nebo postupně (109,110).

Díky kombinaci vlnoploch produkovaných dvěma objektivy s velkou aperturou umožňuje dvoufotonová 4Pi-konfokální mikroskopie trojrozměrné zobrazování transparentních biologických vzorků s axiálním rozlišením v rozsahu 100 až 140 nm (111).



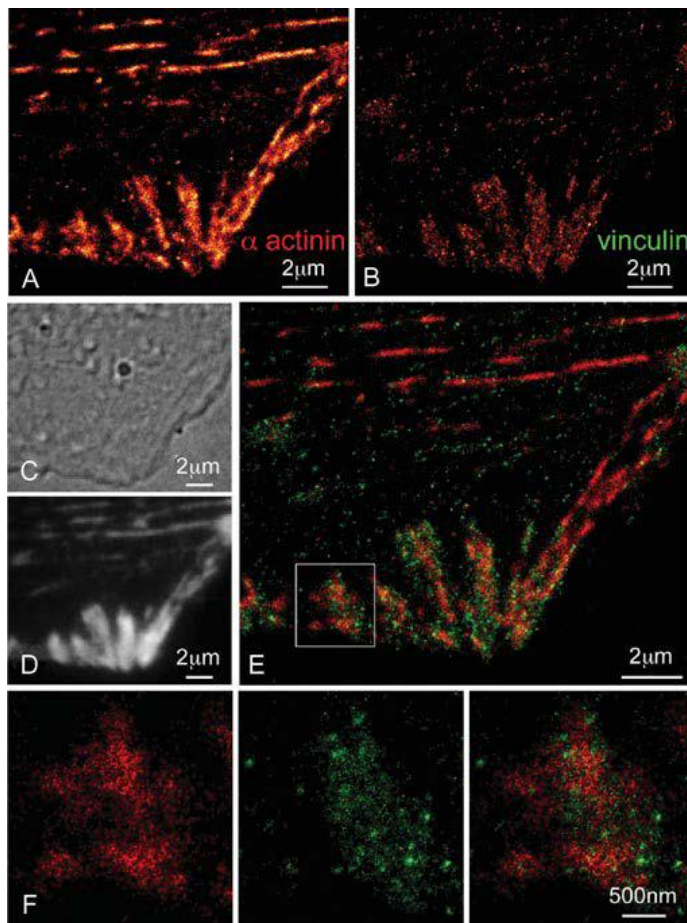
**Obrázek 37.** Různé pohledy na 3D data zaznamenaná s dvoufotonovým 4pi-konfokálním mikroskopem. Zásobník ukazuje oblast 3,5 x 3,5 x 1  $\mu\text{m}$  uvnitř fibroblastů buňky obsahující značené aktinové filameny. Údaje byly obnoveny pomocí experimentální 4Pi-PSF. Barvy nepředstavují různé intenzity, ale izolované struktury izointenzivního objektu (112).

## 8.6. PALM

PALM, neboli photoactivated localization microscopy, představuje fluorescenční mikroskopii, která nám umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení na úrovni molekul. Činí tak pomocí vlastností specifických fluoroforů. Je zapotřebí dvou fluoroforů, které jsou schopné fotoaktivace. Tyto fluorofory v závislosti na  $\lambda$  excitačního záření emitují mnoho fotonů. Se změnou  $\lambda$  mění pak stav své emise. To se projevuje změnou barvy nebo vypínáním. Světlem o konkrétní vlnové délce je možné konvertované flouorofory přepínat mezi aktivním a neaktivním. NSOM a 4Pi mikroskopie má konkrétní  $\lambda$  a jeho intenzita je nízká. Toto záření je určeno k osvětlení plochy vzorku. Toto záření následně vyvolá emisi pouze u části přítomných fluoroforů. Pomocí detektoru je poté zaznamenáván signál aktivovaných nepřekrývajících se center. Aby záznam dosáhl dostatečné hustoty je zapotřebí, aby se celý cyklus opakoval, přičemž přibývá určité procento nově lokalizovaných bodů.

Zobrazení celého obrazu nám pak umožní citlivá kamera s pomocí počítačového softwaru. PALM mikroskopie má schopnost rozlišení pod 20 nm. Nevýhody metody spočívají ve vlastnostech použitých fluroforů a také především v rychlosti snímání, která se pohybuje kolem hodnoty 1 obraz za 1 minutu. Abychom použité fluorofory mohli detekovat jako jednotlivé body, musí poskytovat vysokou emisi. Fluorofory by neměly podléhat ani spontánní aktivaci a měli by být selektivně citlivé ke konkrétní  $\lambda$  zdroje záření. PALM technika může také využívat kombinace více fluoroforů (88,99,100).

PALM mikroskopie může být využita pro výzkum dynamického pohybu fluorescenčně značených proteinových komplexů v pevných či živých buňkách, jako je *Bacillus subtilis* a *Drosophila melanogaster* (113).



**Obrázek 38.** (A) PALM snímek  $\alpha$ -aktininu označeného pomocí Dronpa; (B) Palm obraz vinkulino označeného pomocí tdEos; (C) DIC obrázek odhalující morfologii; (D) TIRF obraz kombinované tdEos a Dronp a emise (všimněte si odlišné morfologie  $\alpha$ -aktininu a vinkulinu); (E) dvoubarevné PALM překrytí  $\alpha$ -aktininu (červená) a vinkulinu (zelená); (F),  $\alpha$ -aktinin, vinkulin a překryté PALM snímky v rámci jedné adheze (114).

## **9. Závěr**

Práce podává přehled fluorescenčně mikroskopických technik využívaných v mikroskopii živých buněk. Detailně je popsána zejména mikroskopie konfokální a její pokročilé techniky jako je FRAP, FLAP, FLIP, FRET, BRET či FLIM. Práce se zabývá také přípravou vzorku, která je nutná pro zobrazení jednotlivých komponent v buňce. Práce obsahuje také e přehled fluorescenčních proteinů a barviv, které se využívají pro zobrazení jednotlivých buněčných struktur. Závěr práce je věnován super-rezoluční mikroskopii a to zejména technikám STED, SIM a STORM.

## 10. Citovaná literatura

1. OPEKAR, F. Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s.
2. <http://fyzika.jreichl.com/main.article/print/719-zareni-absolutne-cerneho-telesa>, [10. 10. 2013].
3. [http://fyzika.jreichl.com/data/Mikro\\_2kvantovka\\_soubory/image004.jpg](http://fyzika.jreichl.com/data/Mikro_2kvantovka_soubory/image004.jpg), [10. 10. 2013].
4. <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/435-sireni-svetla>, [10. 10. 2013].
5. ALBERTS, B., a kol. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002, 1463 s.
6. <http://www.history-of-the-microscope.org/history-of-the-microscope-who-invented-the-microscope.php>, [10. 10. 2013].
7. [http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/big\\_ObrCH20\(1\)b.jpg](http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/big_ObrCH20(1)b.jpg), [10. 10. 2013].
8. HRAZDIRA, I., MORNSTEIN V. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, 381 s.
9. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>, [22. 6. 2014].
10. <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/>, [5. 11. 2013].
11. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy.html>. [5. 11. 2013].
12. SPRING, K. R. Fluorescence Microscopy. Encyclopedia of Optical Engineering. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 2003, 548-555 s.
13. <http://www.vscht.cz/homepage/partneri/pristroje/mikroskop>, [22. 10. 2013].
14. <http://www.olympusmicro.com/galleries/fluorescence/pages/microtubulefilamentlarge.html>, [5. 11. 2013].
15. <http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/history.php>, [20. 11. 2013].
16. <http://www.olympusfluoview.com/theory/confocalintro.html>, [20. 11. 2013.]
17. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>, [20. 11. 2013].
18. <http://www.olympusconfocal.com/gallery/ratbrain/amygdalalarge.html>, [20. 11. 2013].
19. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/multiphotonintro.html>, [16. 12. 2013].



20. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/images/multiphotonintrofigure2.jpg>, [20. 11. 2013].
21. KONIG, K. Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy*. 2000.
22. ZEISS, C. Light Microscopy. The right mate for live cell imaging. Carl Zeiss AG, Deutschland. 2002.
23. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/fluorophoresintro.html>. [22. 3. 2014].
24. RUDOLF, E. Fluorescence a fluorescenční techniky. Manuál pro studenty všeobecného a zubního lékařství. Lékařská fakulta UK v Hradci Králové. 2003. 1-14 s.
25. FRITSCHY, Jean-Marc a HÄRTIG, Wolfgang. Immunofluorescence. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley. 1-7 s.
26. <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/digitalimagingdetectors.html>, [22. 6. 2014].
27. <http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/digitalimagingdetectors.html>, [29. 6. 2014].
28. <http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/images/ccdintro/ccdintrofigure3.jpg>, [24. 5. 2014]
29. <http://www.microscopyu.com/articles/digitalimaging/images/digitalintroduction/gen2.jpg>, [24. 5. 2014]
30. SCHERMELLEH, L., R. HEINTZMANN, LEONHARDT, H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 2010, s. 165-175.
31. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/practicalaspects.html>, [22. 6. 2014].
32. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Konvoluce#mediaviewer/Soubor:Konvoluce\\_2rozm\\_diskretni.jpg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Konvoluce#mediaviewer/Soubor:Konvoluce_2rozm_diskretni.jpg), [22. 6. 2014].
33. OLENYCH, S. G., CLAXTON, N. S., OTTENBERG, G. K. a DAVIDSON, M. W. The Fluorescent Protein Color Palette. *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001. 1-27 s.
34. BD Biosciences. BD Living Color DsRed-Monomer Fluorescent Protein. USA, 2005, 3 s.
35. SPRAGUE, B. L., McNALLY, J.G. FRAP analysis of ginding: proper and fitting. *Trends in Cell Biology*. 2005, 84-91 s.
36. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescence-recovery-after-photobleaching-frap-and-its-offspring/>. [10. 5. 2014].

37. [http://www.nikoninstruments.com/en\\_CZ/Information-Center/FRAP](http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/Information-Center/FRAP), [28. 6. 2014.]
38. KOU, Q., CHUMIN, D., GUANGYU, W., LAMBERT, N. A. Inactive-state preassembly of Gq-coupled receptors and Gq heterotrimers. *Nature Chemical Biology* 7 740–747 s.
39. TRPATHI, K., PARNAIK, V. K. Differential dynamics of splicing factor SC35 during the cell cycle. *Journal of biosciences*, 2008, 345–354 s. .
40. SEKAR, R. B. a PERIASAMY, A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of Cell Biology*. 2010, 629-633 s.
41. <http://www.nlv.ch/Molbiology/sites/Fluorescence4.htm>, [12. 12. 2013].
42. SEKAR, R. B., BAHLMANN, K., GIESE, G., HELL, S. W. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of Cell Biology*. 1998, 629-633 s.
43. <http://www.olympusfluoview.com/applications/images/fretintrofigure2.jpg>, [15. 1. 2014].
44. <http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/techniques.php>, [15. 12. 2013].
45. <http://bart.chemi.muni.cz/courses/6.pdf>, [27. 6. 2014].
46. WILDOVÁ, M. a RUMLOVÁ, M. Metody studia vzájemných interakcí proteinů. *Chemické listy*. 2008, 102, 28-34 s.
47. SWIFT, S. R., TRINKLE-MULCAHY, L. Basic principles of FRAP, FLIM, and FRET. *Proceedings of the Royal Microscopical Society*. 2004. 3-10 s.
48. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/applications/flimintro.html>, [20. 1. 2014].
49. DUNN, G. A., a další. Fluorescence localization after photobleaching (FLAP): a new method for studying protein dynamics in living cells. *Journal of Microscopy*. 2001, 109-112 s.
50. ISHIKAWA-ANKERHOLD, H. C., ANKERHOLD, R. DRUMMEN, G. P. C.. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques – FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. 2012, 4047-4132 s.
51. LIPENCOTT-SCWARTZ, J., ALTAN-BONNET, N., PATTERSON, G. H. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biology*. 7-14 s.
52. WÜNSTER, D., a další. Quantitative fluorescence loss in photobleaching for analysis of protein transport and aggregation. *BMC Bioinformatics*. 2012, 296 s.
53. WÜSTNER, D., SOLANKO, L. M., LUND, F. W., SAGE, D., SCHROLL, H. J., LOMHOLT, M. A. Quantitative fluorescence loss in photobleaching for analysis of protein transport and aggregation. *BMC Bioinformatics*. 2012, 296 s.

54. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/tirf/tirfintro.html>, [10. 5. 2014].
55. <http://www.jpk.com/index.230.en.html>, [20. 4. 2014].
56. KRIEGER, J., TÓTH, K., LANGOWSKI, J. Practical Course Biophysics: Fluorescence Correlation Spectroscopy. 2009, 3-5 s
57. JUNG, G., Fluorescence Correlation Spectroscopy: an Experimentalist's View of the Basics, Modern Research and Educational Topics in Microscopy (2007), 855-862 s.
58. GREGOR, I., ENDERLEIN, J., LOPEZ-DELGADO, R.. Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. Photochemical. 2007, 615-620 s.
59. HUMPOLÍČKOVÁ, J., BENDA, A., SÝKORA, J., MACHÁŇ, R., KRÁL, T., GASINSKA, B., ENDERLEIN, J., HOF, M. Equilibrium Dynamics of Spermine-Induced Plasmid DNA Condensation Revealed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. Biophysical Journal. 2008. 17-1.
60. POZAROWSKI, P., HOLDEN, E., DARZYNKIEWICZ, Z. Laser Scanning Cytometry. Methods Molecular Biology. 2006, 165 s.
61. <http://europepmc.org/abstract/MED/7942599>, [28. 6. 2014].
62. GORCZYCA, W. Cytometric analyses to distinguish death processes. Endocrine-Related Cancer (1999) 6, 17-19 s.
63. MATTHEWS, J. M. Protein dimerization and oligomerization in biology. Austin, Texas: Landes Bioscience, 2012, 170 s.
64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3892962/>, [28. 6. 2014].
65. <http://www.coulterflow.com/bciflow/compucyte2/index2.php?file=2&sort=>, [29. 6. 2014].
66. DE ANGELIS, D. A., a další. PRIM: Proximity imaging of green fluorescent protein-tagged polypeptides. Cell Biology. 1998, 12312–12316 s.
67. 44) <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure.html>, 20. 3. 2014.
68. <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/plasma-membrane.html>, [20.3.2014].
69. <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/nucleus-and-nucleoli.html>, [20.3. 2014].
70. <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/images/fpintrofigure1aexlarge.jpg>, [20. 3. 2014].

71. <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/mito>, [20. 3. 2014].
72. <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/golgi.html>, [20. 3. 2014].
73. <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/images/fpintrofigure1bexlarge.jpg>, [20. 3. 2014].
74. <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/autophagy/autophagy-lysosome-markers.html>, [20. 3. 2014].
75. <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/endoplasmic-reticulum.html>, [20. 3. 2014].
76. <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpimaging.html>, [20. 3. 2014].
77. <https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-tracing-tracking-and-morphology/cell-tracking.html>, [20. 3. 2014].
78. <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/fluorescence-microscopy-and-immunofluorescence-if/organelle-stains-for-fluorescence-imaging-selection-guide.html>, [26. 4. 2014].
79. <http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/index.html>, [12. 5. 2014].
80. <http://zeiss.magnet.fsu.edu/print/superresolution/introduction-print.html>. [12. 5. 2014].
81. GUSTAFSSON, Mats G. L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. PNAS. 2005, 13081–13086 s.
82. <http://zeiss.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/supersim.html>, [26. 4. 2014].
83. CARLTON, P. M. Three-dimensional structured illumination microscopy and its application to chromosome structure. Chromosome Research. 2008, 351-365 s.
84. <http://www.nikonsmallworld.com/techniques/image/structured-illumination-microscopy/2>, [26. 4. 2014].
85. <http://www.nikonsmallworld.com/techniques/image/structured-illumination-microscopy/1>, [30. 6. 2014].
86. <http://www.nikonsmallworld.com/techniques/image/structured-illumination-microscopy/3>, [30. 6. 2014].
87. <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/super-resolution-microscopy/structured-illumination-microscopy-sim.html>, [30. 6. 2014].

88. HUANG, B., BABCOCK, H., ZHUANG, X. W. Breaking the Diffraction Barrier: Super-Resolution Imaging of Cells. *Cell*, 2010. 1047-1058 s.
89. [http://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv/dalsi-nastroj-k-nahlednuti-donanosveta\\_11813.html](http://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv/dalsi-nastroj-k-nahlednuti-donanosveta_11813.html), [26. 4. 2014].
90. <http://www.microscopyu.com/references/superresolution/sted.html>, [26. 4. 2014].
91. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/visualization-of-the-natural-killer-cell-immune-synapse-by-super-resolution-nanoscopy/>, [30. 6. 2014].
92. <http://opfocus.org/index.php?topic=picture&v=4&s=1&p=2>, [26. 4. 2014].
93. [http://www.leica-microsystems.com/typo3temp/pics/Super-Resolution\\_STED-nanoscop\\_4dc73cb4fc.jpg](http://www.leica-microsystems.com/typo3temp/pics/Super-Resolution_STED-nanoscop_4dc73cb4fc.jpg), [30. 6. 2014].
94. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/subcellular-localization-of-akt-and-tubulin-using-super-resolution-microscopy/>, [30. 6. 2014].
95. [http://www.leica-microsystems.com/typo3temp/pics/Super-Resolution-STED-Subcellu\\_2c33fc870b.jpg](http://www.leica-microsystems.com/typo3temp/pics/Super-Resolution-STED-Subcellu_2c33fc870b.jpg), [30. 6. 2014].
96. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-missing-link-to-the-nanocosm-of-life/>, [30. 6. 2014].
97. <http://www.leica-microsystems.com/uploads/pics/Super-Resolution-STED-Neurobiology.jpg>, [1. 7. 2014].
98. BETZIG, E., PATTERSON, G. H., SOUGRAT, R., LINDWASSER, O. W., OLENYCH, S., BONAFICIONO, J. S., DAVIDSON, M. W., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., HESS, H. F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 2006, 1642-645 s.
99. HESS, S. T., GIRIRAJAN, T. P. K., MASON, M. D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, 2006. 4258-4272 s.
100. LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., PATTERSON, G. H. Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends in Cell Biology*, 2009, 555-565 s.
101. RUST, M. J., BATES, M., ZHUANG X. W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 2006, 793-795 s.
102. <http://huanglab.ucsf.edu/STORM.html>, [28. 4. 2014].
103. <http://www.nikon.com/products/instruments/testimonials/bo/>, [1. 7. 2014].
104. [http://www.nikon.com/products/instruments/testimonials/bo/img/pic\\_02.jpg](http://www.nikon.com/products/instruments/testimonials/bo/img/pic_02.jpg), [1. 7. 2014].

105. [http://www.nikoninstruments.com/var/ezwebin\\_site/storage/images/media/gallery-items/photomicrographs/n-storm/mitochondria-in-a-mammalian-cell/125640-1-eng-GB/Mitochondria-in-a-Mammalian-Cell\\_gallerylarge.jpg](http://www.nikoninstruments.com/var/ezwebin_site/storage/images/media/gallery-items/photomicrographs/n-storm/mitochondria-in-a-mammalian-cell/125640-1-eng-GB/Mitochondria-in-a-Mammalian-Cell_gallerylarge.jpg), [1. 7. 2014].
106. <http://www.photonics.com/EDU/Handbook.aspx?AID=25127>, [28. 4. 2014].
107. BAHLMANN, K., JAKOBS, S., HELL, S. W. 4Pi-confocal microscopy of live cells. *Ultramicroscopy*, 2001, 155-164 s.
108. DLASKOVÁ, A., ŠPAČEK, T., SANTOROVÁ, J., PLECITA-HLAVATÁ, L., BERKOVÁ, Z., SAUDEK, F., LESSARD M., BEWERSDORF, J., JETEK, P. 4Pi microscopy reveals an impaired three-dimensional mitochondrial network of pancreatic islet  $\beta$ -cells, an experimental model of type-2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2010, 1327-1341 s.
109. LANG, M., MÜLLER, T., ENGELHARDT, J., HELL, S. W. 4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging. *Optics Express*. 2007, 2459-2467 s.
110. BEWERSDORF, J., EGNER, HELL, S. W. 4Pi microscopy. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer, New York 2006, 561–570 s.
111. SCHRADER, M., BAHLMANN, K., GIESE, G., HELL, S. W. 4Pi-Confocal Imaging in Fixed Biological Specimens. *Biophysical Journal*. 1998, 1659-1668 s.
112. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0006349598776088-gr11.jpg>, [1. 7. 2014].
113. [http://www.cbs.cnrs.fr/rubrique.php3?id\\_rubrique=583](http://www.cbs.cnrs.fr/rubrique.php3?id_rubrique=583), [1. 7. 2014].
114. [http://janelia.org/sites/default/files/imagecache/child\\_inline\\_media\\_no\\_caption/image/field\\_image/Janelia%20Pub%20Shroff%20PNAS%202007.png](http://janelia.org/sites/default/files/imagecache/child_inline_media_no_caption/image/field_image/Janelia%20Pub%20Shroff%20PNAS%202007.png), [20. 6. 2014].