

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

# Diplomová práce



Bc. Marek Dostál

## **Zobrazování fluorescenčně značených mitochondrií metodou Biplane FPALM**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí: prof. RNDr. Jaromír Plášek CSc.

Konzultanti: RNDr. Petr Ježek DrSc., Mgr. Hana Engstová, Ph.D.

Program: Biofyzika a chemická fyzika

Obor: Biofyzika

Praha 2013

V první řadě bych rád poděkoval panu profesorovi Pláškoví a panu doktorovi Ježkovi, kteří mi umožnili podílet se na zprovoznění unikátního 3D mikroskopu, za jejich rady a trpělivý přístup. Také velice děkuji paní magistře Engstové za její rady a pomoc v laboratoři. Nesmím opomenout poděkovat společně Aleně Starobové za její pomoc v gramatických nesnázích.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 11. 4. 2013

Marek Dostál

Název práce: Zobrazování fluorescenčně značených mitochondrií  
metodou Biplane FPALM

Autor: Bc. Marek Dostál

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.

Konzultanti: RNDr. Petr Ježek, DrSc.

Mgr. Hana Engstová, Ph.D.

Abstrakt: V této práci jsme hledali a našli vhodné PCFP markery pro vizualizaci vnitřní a vnější membrány mitochondrií na unikátním prototypu biplane FPALM mikroskopu. Podíleli jsme se na odlaďování měřicího softwaru za účelem 3D vizualizace mitochondriálních sítí a určení jejich parametrů. K tomuto účelu jsme vyvinuli dvě metody. Jedna je použitelná při určování parametrů vnějších membrán a druhá při určování parametrů vnitřních membrán. Na menším statistickém souboru dat se nám podařilo potvrdit závislost kvality mitochondriální sítě na podmínkách kultivace buněk. Ve stresových podmínkách, jakými je např. hypoxie, se kvalita mitochondriální sítě mění oproti kultivaci za normálních podmínek.

Klíčová slova: mitochondrie, Biplane FPALM, GFP, 3D vizualizace.

Title: Imaging of fluorescently labelled mitochondria using Biplane FPALM microscopy

Author: Bc. Marek Dostál

Department: Fyzikální ústav UK

Supervisor: prof. RNDr. Jaromír Plášek, CSc.

Consultants: RNDr. Petr Ježek, DrSc.

Mgr. Hana Engstová, Ph.D.

Abstract: In this thesis the results are presented of a search for suitable PCFP markers for a visualization inner and outer mitochondrial membranes by unique biplane FPALM microscope. We participated in debugging the measuring software for the purpose of 3D visualization mitochondrial nets and determine their parameters. For this purpose were developed two methods. The first one can be applied to determine the parameters of outer membranes and the second one is applicable to determine parameters of inner membranes. On smaller statistical file we managed to confirm dependence quality of mitochondrial net on the cell culture conditions. Under stress conditions e.g. hypoxia the quality of mitochondrial net is changed.

Keywords: mitochondria, Biplane FPALM, GFP, 3D visualization.

## Obsah

1	Úvod .....	2
2	Biologická část.....	3
2.1	Eukaryotická buňka .....	3
2.1.1	Plazmatická membrána.....	4
2.1.2	Jádro .....	5
2.1.3	Endoplazmatické retikulum .....	7
2.1.4	Lysozomy a peroxizomy .....	8
2.1.5	Mitochondrie.....	9
2.2	Hepatocyt .....	12
2.3	Fotoaktivovatelné fluorescenční proteiny.....	13
2.3.1	Objev a využití .....	13
2.3.2	Úprava a transfekce .....	14
3	Fyzikální část.....	17
3.1	Základy optické mikroskopie.....	17
3.2	Fotoluminiscence.....	20
3.3	Fluorescenční mikroskopie .....	22
3.4	FPALM.....	26
3.4.1	Základní principy .....	26
3.4.2	Kinetika aktivace .....	28
3.4.3	Konstrukce FPALM .....	29
3.4.4	Rozlišovací schopnost FPALM.....	30
4	Praktická část.....	32
4.1	Vutara .....	32
4.1.1	Vutara SR-200.....	32
4.1.2	Software a jeho odladění .....	34
4.2	Materiál a kultivace .....	38
4.2.1	Chemikálie.....	38
4.2.2	Příprava buněk .....	38
4.3	Metody zpracování dat .....	42
4.3.1	Analýza rastrových obrázků .....	42
4.3.2	Analýza csv souborů .....	47

5	Výsledky .....	52
5.1	Vnitřní membrána .....	52
5.2	Vnější membrána.....	56
5.3	Zobrazování endoplazmatického retikula.....	57
5.4	Hypoxické vs. normoxické buňky .....	57
5.5	Dvojbarevné zobrazování.....	63
6	Diskuze .....	65
7	Závěr .....	67
8	Literatura .....	69

# 1 Úvod

Do konce 20. století převládal všeobecně názor, že pomocí optického mikroskopu nelze dosáhnout větší rozlišovací schopnosti, než jakou povoluje Rayleighova, resp. Abbeho teorie. To nyní ovšem neplatí, protože za pomoci fotoaktivovatelných fluorescenčních proteinů a speciálního uspořádání mikroskopu je možné lepšího rozlišení dosáhnout.

V průběhu řešení této práce jsme měli možnost pracovat s unikátním zařízením. Jednalo se o prototyp Biplane FPALM mikroskopu, který svého času byl, a nejspíš stále ještě je, jediný ve střední Evropě. Díky této jedinečnosti jsme museli čelit mnoha komplikacím od hledání způsobu kultivace a transfekce buněk až po odlaďování softwaru a hledání metody pro zpracování dat. Ani po roce a půl práce nejsme zcela hotovi, ale určitého pokroku jsme dosáhli.

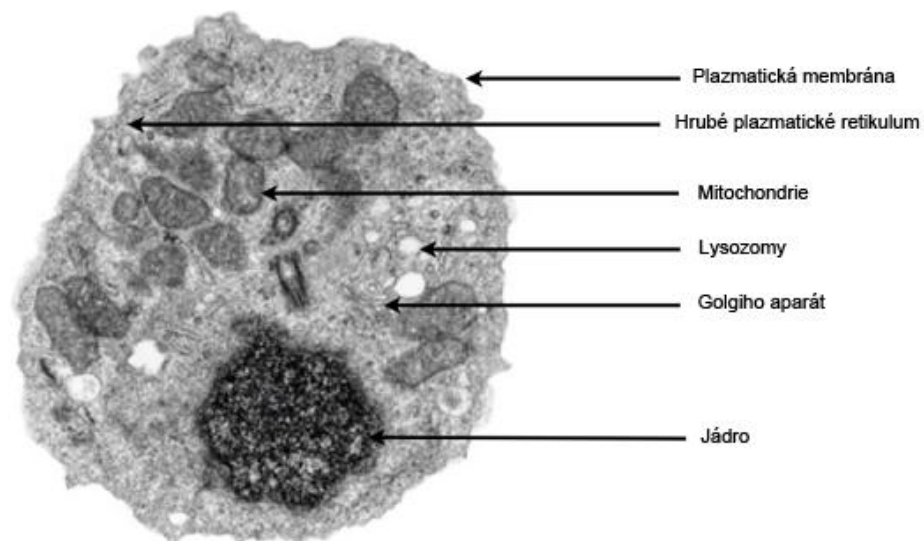
Hlavními cíli této práce bylo nalezení PCFP markrů pro značení vnitřní a vnější mitochondriální membrány a plazmatického retikula a také stanovení metody pro zpracování 3D obrazu mitochondriálních sítí a endoplazmatického retikula v jaterních buňkách.



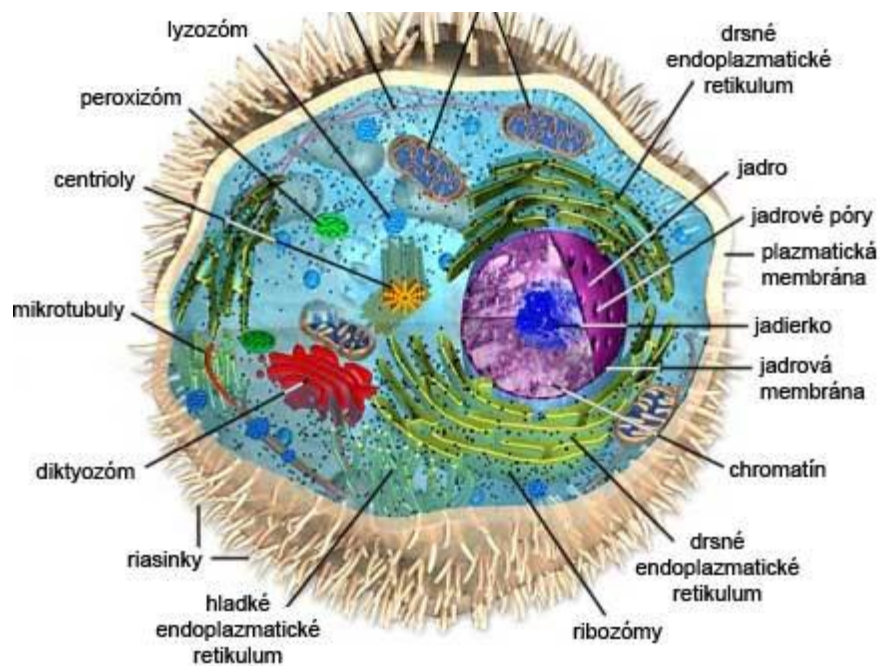
## 2 Biologická část

### 2.1 Eukaryotická buňka

V této kapitole si připomeneme základní poznatky týkající se cytologie eukaryotických buněk. Budeme se zabývat pouze hlavními organelami, které jsou přítomny ve většině živočišných eukaryotických buněk, viz obr. 1. a obr. 2.



Obr. 1. – Snímek živočišné buňky pořízený elektronovým mikroskopem [1].



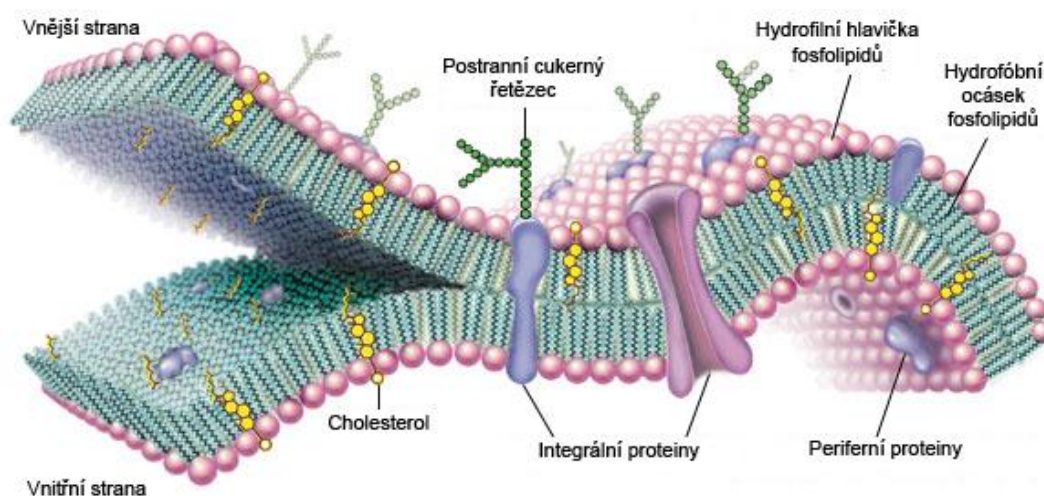
Obr. 2. – Schématické znázornění živočišné buňky [2].

### 2.1.1 Plazmatická membrána

Plazmatická membrána je nepostradatelná součást každé buňky. Její hlavní funkce spočívá v oddělení okolí od vnitřního prostoru buňky vyplněného cytoplasmou. Taktéž slouží jako vysoce účinná bariéra vstupujících a vystupujících látek. Procházejí skrz ni důležité živiny, odpadní látky, minerály a další látky. Za toto chování vděčí své komplikované struktuře.

Základním stavebním kamenem membrány jsou lipidy a proteiny. Jejich množství se může velmi lišit dle typu buňky. Lipidy jsou uspořádány do fosfolipidové dvojvrstvy tak, že hydrofobní ocásky směřují k sobě a hydrofilní hlavičky od sebe. Tato struktura je tlustá přibližně 80Å a je protkána proteiny a sacharidy, které jsou zodpovědné za transport látek, signalizaci a další procesy, viz [9]. Dvojvrstva lipidů má polotekutou konzistenci. Díky tomu dochází k neustálé difúzi mnohých membránových molekul. Tato difúze je jak laterální (v rovině), tak rotační (kolem osy kolmé na membránu), přičemž laterálně rychleji difundují lipidy než proteiny, jejichž difúze je výrazně pomalejší.

Plazmatická membrána neodděluje pouze buňku od okolí, ale i její orgány od cytosolu buňky. Mitochondrie mají dokonce dvojitou membránu, která je využívána v řízení energetiky buňky.



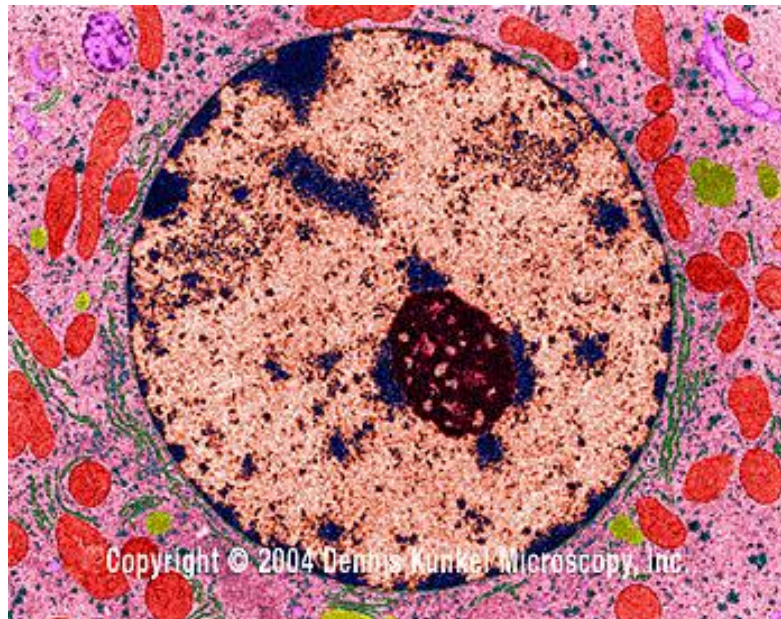
Obr. 3. – Struktura plazmatické membrány [3].

### 2.1.2 Jádro

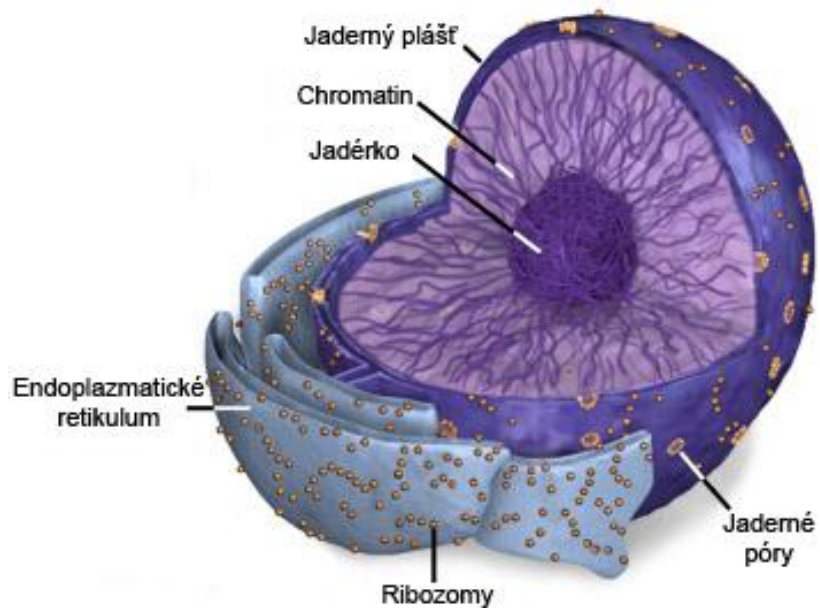
Jádro je základní organela a je obsaženo v každé plnohodnotné buňce se schopností reprodukce. Bezjaderné buňky se již nemohou dělit a mají omezenou dobu života. Klasickým příkladem bezjaderné buňky jsou savčí červené krvinky, jež u dospělého člověka žijí kolem 120 dní. Na druhou stranu existují i buňky, které obsahují víc než jedno jádro.

Jádro o velikosti 5 až 10  $\mu\text{m}$  je ohraničeno jaderným obalem a vyplněno jadernou matrix. Jaderný obal je dvojitá paralelní membrána o tloušťce kolem 60 nm, v níž se nachází jaderné póry o poloměru přibližně 30 nm. Vnější jaderná membrána plynule přechází do endoplazmatického retikula, kterým se budeme zabývat později. V jaderné matrix se také nachází jadérko kulovitého tvaru o průměru až 1  $\mu\text{m}$ . Jadérko je suborganelou bez vlastní membrány. Jeho primární funkce je transkripce DNA na RNA, proto je tvořeno převážně RNA a proteiny. V buňkách syntetizujících ve větší míře proteiny, můžeme nalézt v jednom jádře i více jadérek.

V jádře existují dva druhy chromatinu. Jedním je heterochromatin a druhým euchromatin. Heterochromatin tvoří hrudky o velikosti 30 nm, jež představují dehydratované úseky chromozomů. Je složen z histonů H1, na které se navazuje dsDNA. Na euchromatinu probíhá syntéza RNA a není možné jej pozorovat světelným mikroskopem, neboť je tvořen vlákny pouze o průměru 10 nm. Proto je pozorovatelný jen elektronovým mikroskopem. Viz obr. 4. a obr. 5.



Obr. 4. – Snímek jádra hepatocytu elektronovým mikroskopem [7].

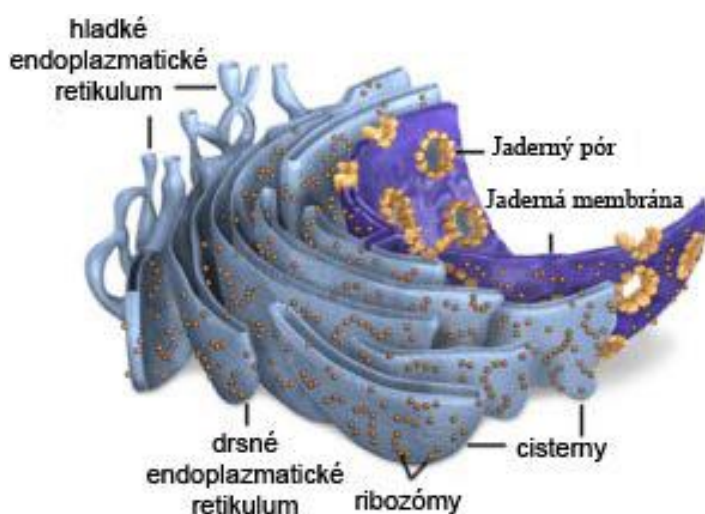


Obr. 5. – Schéma jádra [8].

### 2.1.3 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum (ER) je rozsáhlý systém membrán, který může představovat až polovinu veškerých membrán v buňce. ER poprvé popsal Garnier roku 1889 pomocí světelného mikroskopu. V důsledku mírně odlišného vzhledu v různých typech buněk mělo endoplazmatické retikulum dlouho rozličné názvy, např. ergastoplazma v buňce pankreatu nebo Nisslova substance v neuronech. Až s příchodem přístrojů s lepší rozlišovací schopností bylo určeno, že se jedná o jednu a tutéž organelu.

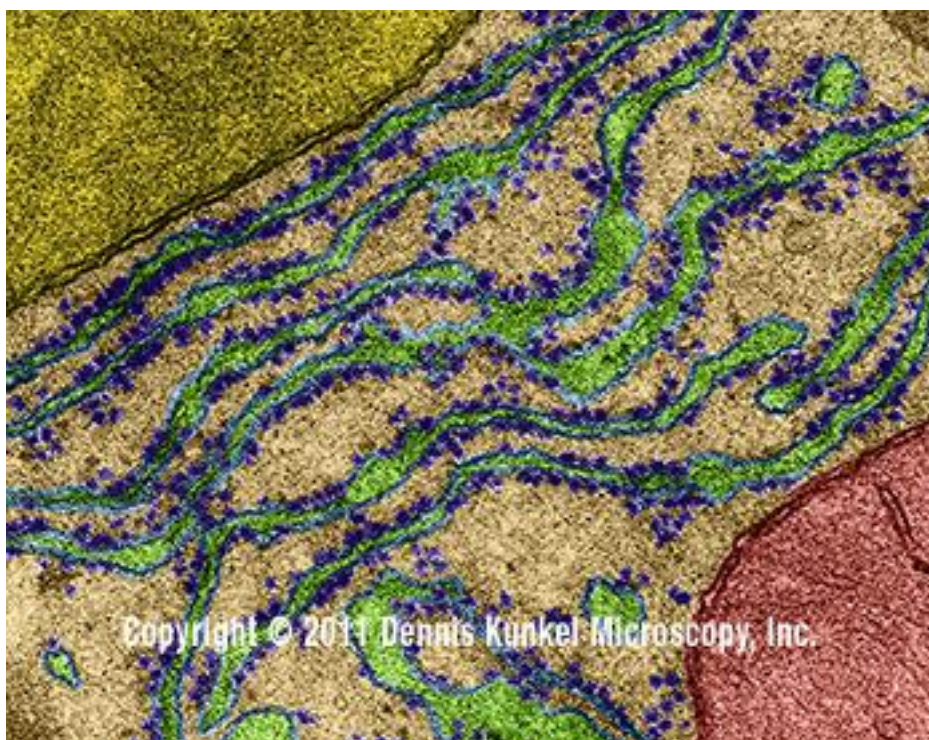
ER je tvořeno membránou, jež je pokračováním vnější membrány jádra, viz obr. 6. Membrána odděluje cytosol od vnitřní části ER, kterému se říká cisternální prostor. V ER dochází k syntéze jednotlivých komponent potřebných pro tvorbu všech membrán (proteiny a lipidy). ER se dělí na dva základní typy - drsné ER a hladké ER.



**Obr. 6. – Schéma endoplazmatického retikula [10].**

Drsné ER je posázeno ribozomy. V hepatocytu je na 1  $\mu\text{m}^2$  kolem 335 ribozomů. Celkově se v jedné buňce nachází 13 milionů ribozomů vázaných na drsné ER. Snímek drsného ER z elektronového mikroskopu je na obr. 7. a jsou zde zvýrazněny ribozomy na ER (modrá barva) a cisternální prostor ER (žlutá barva).

Hladké ER postrádá na svém povrchu ribozomy, protože jeho hlavní funkce není syntéza bílkovin. V hladkém ER dochází k různým metabolickým procesům, jakými například jsou: hydrolýza glukózy-6-fosfát, syntéza vitamínu C, oxidace i redukce steroidních hormonů a další. Proto je hladké ER více rozšířené v buňkách syntetizujících steroidy (nadledvinky, Leydigovy buňky), HCl (žaludeční buňky) či odbourávajících glykogen (jaterní buňky).

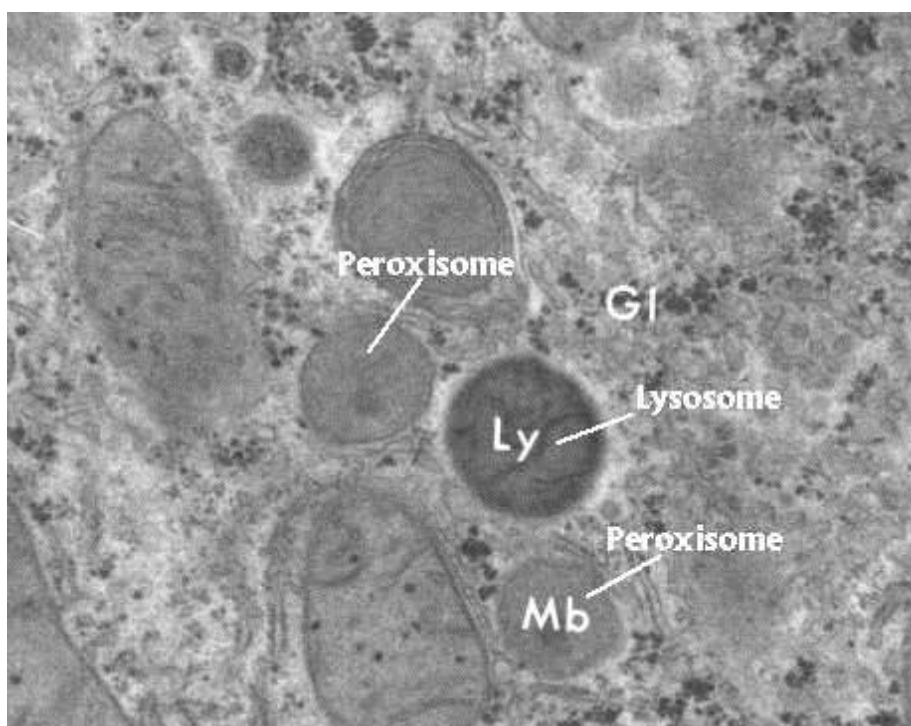


**Obr. 7. – Snímek pořízený elektronovým mikroskopem zachycující drsné ER hepatocytu [11].**

#### **2.1.4 Lysozomy a peroxizomy**

Lysozomy poprvé popsal Christian De Duve v roce 1955. Jejich hlavní funkce je intracelulární trávení pomocí katabolických reakcí. Jsou to malé kulovité váčky o průměru 50 až 500 nm ohraničené membránou. Vnitřní prostor je vyplněn elektrodenzitní matrix, která je tvořena víc než 40 druhy hydrolytických enzymů. Jejich funkční pH se pohybuje kolem 5, díky čemuž mohou trávit většinu biologických makromolekul. Proto se ve velké míře vyskytují v makrofázích.

Peroxisomy jsou také kulovitá tělíska od 0,5 do 1,2  $\mu\text{m}$  a již podle názvu lze poznat, že obsahují peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nejsou standardně obsaženy ve všech buňkách, ale nachází se hlavně v hepatocytech a buňkách ledvin. Jejich plazmatická membrána není odvozena od membrány ER, a proto vykazují jistou dávku autonomie. Jedna z jejich funkcí je obrana buňky před peroxidem vodíku. Lysozomy a peroxizomy můžeme vidět na obr. 8.



Obr. 8. – Snímek z elektronového mikroskopu lysozomu a peroxizomu [12].

### 2.1.5 Mitochondrie

Mitochondrie byla objevena roku 1880 R. Köllikerem při studii svalu hmyzu a dostala název sarkozom. V roce 1882 ji také pozoroval Fleming, který ji nazýval fila. Název mitochondrie, jenž se skládá z řeckých slov *mito* (vlákno) a *chondrion* (zrnko), použil poprvé roku 1898 německý lékař K. Benda. Prvním badatelem, který studoval mitochondrii *in vivo*, byl v roce 1900 Michaelis, když ji obarvil azo-barvivem nazývaným Janusova zeleň.

Izolovat mitochondrii se podařilo v roce 1934 Bensleyovi a Hoerovi z jaterních buněk, a to metodou založenou na

centrifugaci tkáňového homogenátu. Poté následoval jeden z nejdůležitějších objevů. Tým okolo Hogebooma dokázal v roce 1948, že v mitochondriích probíhá buněčné dýchání. Ve stejném roce dokázali Lehninger a Kennedy pomocí Hogeboomovy techniky, že mitochondrie katalyzují všechny reakce jak citrátového cyklu, tak oxidace mastných kyselin i fosforylace. Rok 1963 přinesl objev cirkulární mitochondriální DNA.

Běžně mají mitochondrie vláknité nebo elipsovité tvary. V průměru jsou 0,5 až 1  $\mu\text{m}$  široké a 2 až 8  $\mu\text{m}$  dlouhé. Ovšem jsou známy i případy, kdy jsou výrazně větší. Například mitochondrie v buňkách nezralých vajíček (oocytů) severoamerické žaby rodu *Rana pipiens* dosahují délky 20 až 40  $\mu\text{m}$ .

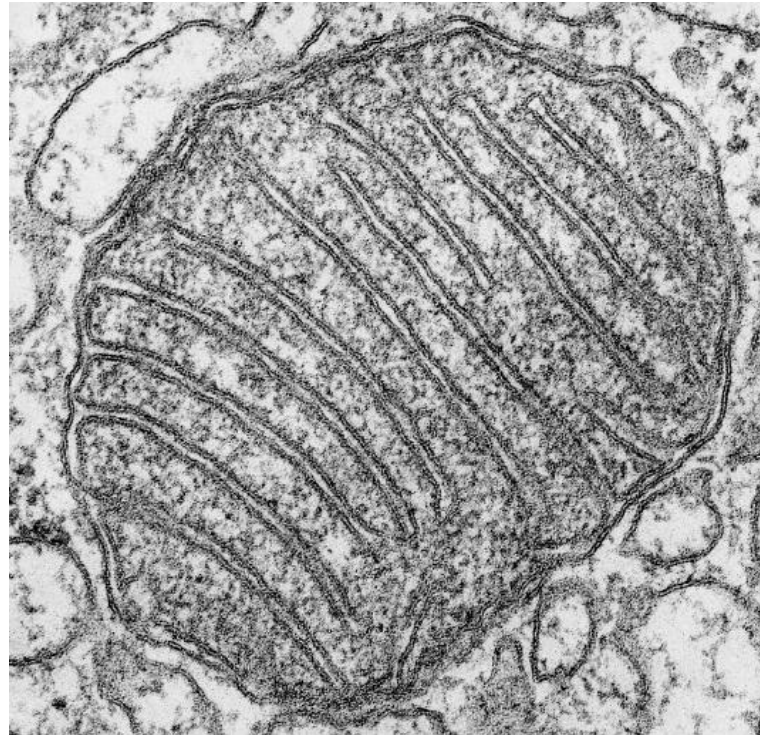
V buňce je průměrně 300 až 800 mitochondrií a mohou zabírat 15 až 20 % z celkového objemu buňky. Jejich počet je v každé buňce jiný. Nejvíce mitochondrií obsahují jaterní buňky (*hepatocyty*). U myších *hepatocytů* se pohybuje toto číslo od 1000 do 1600. Mitochondrie se mohou v buňce většinou volně pohybovat. Ovšem ve svalových buňkách bránice jsou mitochondrie uspořádané do prstence a pevně uchyceny v blízkosti I-vazby myofibrilu, aby mohly rychle a dostatečně zásobovat sval energií.

Mitochondrie je tvořena dvojitou plazmatickou membránou. Vnější membrána je tlustá 6 až 7,5 nm a ta vnitřní je o něco málo tenčí - 5 až 7 nm. Mezi sebou mají mezimembránový prostor široký 6 až 8 nm a vyplněný řidší kapalinou než vnitřní část mitochondrie. Vnitřní membrána tvoří spoustu zákrutů (tzv. krist), aby svůj celkový povrch zvýšila. Tyto kristy jsou zřetelně viditelné na snímku z elektronového mikroskopu na obr. 9.

Vnitřní prostor je vyplněn mitochondriální matrix. Je to relativně hustá homogenní kapalina, ve které se nachází malé



intra-mitochondriální granule (4 až 5 nm), ribozomy (12 až 15 nm), RNA a jedna nebo více cirkulárních DNA o délce 4,7 až 5,4  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 9. – Snímek mitochondrie z elektronového mikroskopu [9].**

Mitochondrii můžeme označit za semiautonomní organelu, protože obsahuje cirkulární DNA. Kdysi bývala bakterií, která byla fagocytována buňkou, a nakonec je ve stavu vzájemné a dodnes trvající symbiózy.

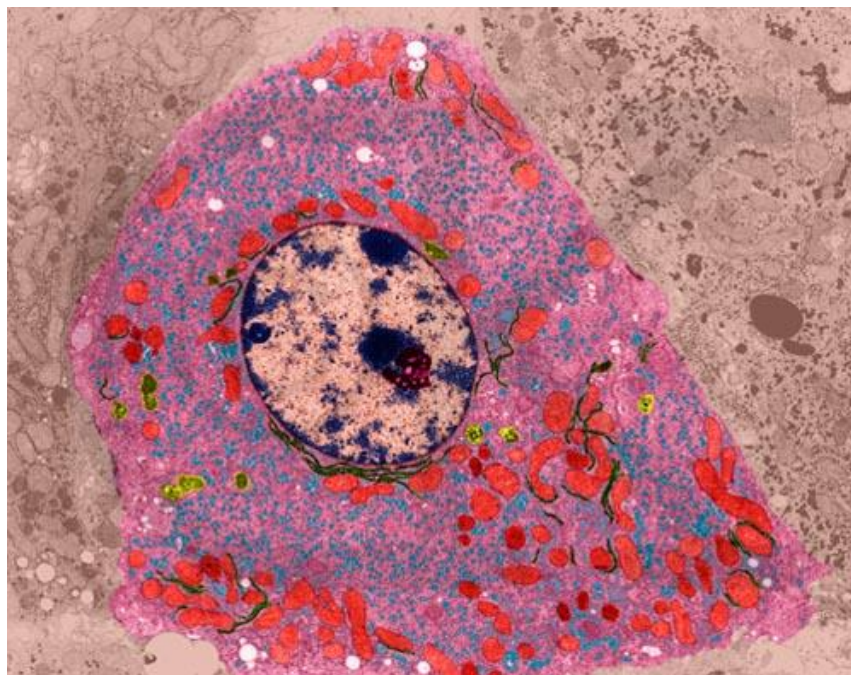
Kationty vápníku a hořčíku, potřebné při enzymologických procesech, se ukládají v intra-mitochondriálních granulích. Hlavní funkce mitochondrií je buněčné dýchání. To se skládá ze tří hlavních částí - glykolýza, Krebsův cyklus a transport elektronů. Všechno to jsou enzymatické reakce, a pokud je reakce přerušena v některé své fázi, tak nemůže dál pokračovat. Ve vnitřní membráně jsou mimo jiné zapuštěny i ATP syntetázy, které pomocí transportu elektronů syntetizují z ADP a fosfátu ATP.

Další funkce mitochondrií je jejich proteolytická aktivita a probíhá v nich také histogeneze. V roce 1947 Bensley dokázal na

jaterních buňkách, že mitochondrie metabolizují tuky. Hrají také důležitou roli při formování zárodku buňky při buněčném dělení.

## 2.2 Hepatocyt

Lidská játra jsou hlavní orgán zodpovědný za intermediární metabolismus. Tvoří je pět typů buněk - Kupffrovy, žlučové, sinusoidální, Itovy a hepatocyty. V játrech probíhá metabolismus cukrů, tuků a bílkovin. Vytvářejí a degradují se zde steroidní hormony, detoxikuje se krev, uskladňují se různé látky (železo, měď, vitamíny), dochází k tvorbě lymfy a žluče. Za většinu těchto procesů jsou zodpovědné hepatocyty. Proto hepatocyty tvoří přibližně 60 % všech jaterních buněk a představují 80 – 90 % celkové hmotnosti jater. Kvůli své funkci obsahují velké množství mitochondrií, jejichž počet někdy dosahuje až dvou tisíců. Vysoký počet mitochondrií byl jedním z klíčových faktorů, proč jsme se rozhodli použít hepatocyty jako testovací objekt. Zvýšený počet mitochondrií (značeny červeně) je viditelný na obr. 10.



Obr. 10. – Snímek hepatocytu elektronovým mikroskopem [13].

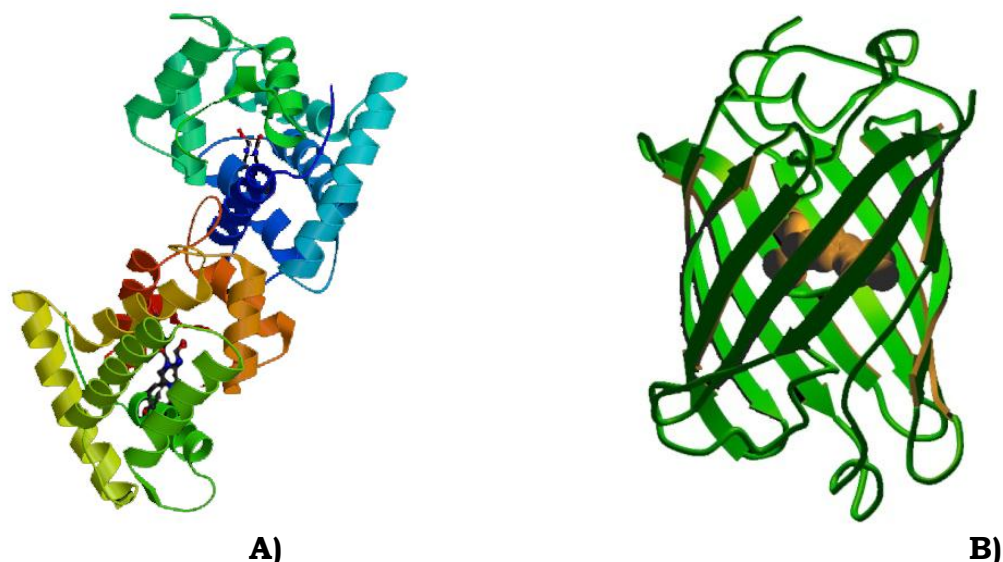
## 2.3 Fotoaktivovatelné fluorescenční proteiny

### 2.3.1 Objev a využití

V roce 1960 přijel O. Shimomura studovat na univerzitu v americkém městě Princeton bioluminiscenci křišťálové medúzy rodu *Aequorea victoria*. Tato medúza má po obvodě svého talíře buňky zvané fotocyty, které emitují nazelenalé světlo. V roce 1978 Shimomurův tým zjistil, že za toto záření jsou odpovědny dva proteiny - aequorin a zelený fluorescenční protein (GFP, z anglického Green Fluorescent Protein).

Aequorin je vápníkem aktivovaný fotoprotein složený z apo-aequorinu a těsně vázaného substrátu coelenterazinu. Po navázání vápníku aequorin podstupuje konformační změnu. Transformuje se na oxygenázu, která oxiduje coelenterazin. Produktem této reakce je světlo ( $\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$ ),  $\text{CO}_2$  a coelenteramid [38]. Jestli se v blízkosti nachází chromofor GFP, tak dochází k přenosu energie z aequorinu na GFP a nedochází k emisi modrého světla, ale zeleného. Jedním z nejefektivnějších přenosů energie mezi donorem a akceptorem je BRET (z angl. Bioluminescence Resonance Energy Transfer), jenž byl pozorován u mnohých interakcí fotoproteinů a GFP.

Aequorin se díky této reakci hojně využívá při zjišťování přítomnosti vápníku v živých organismech. Takto byla objevena přítomnost vápenatých iontů ve svalových vláknech Ashleyem a Ridgwayem v roce 1968. Strukturu těchto proteinů můžeme vidět na obr. 11.

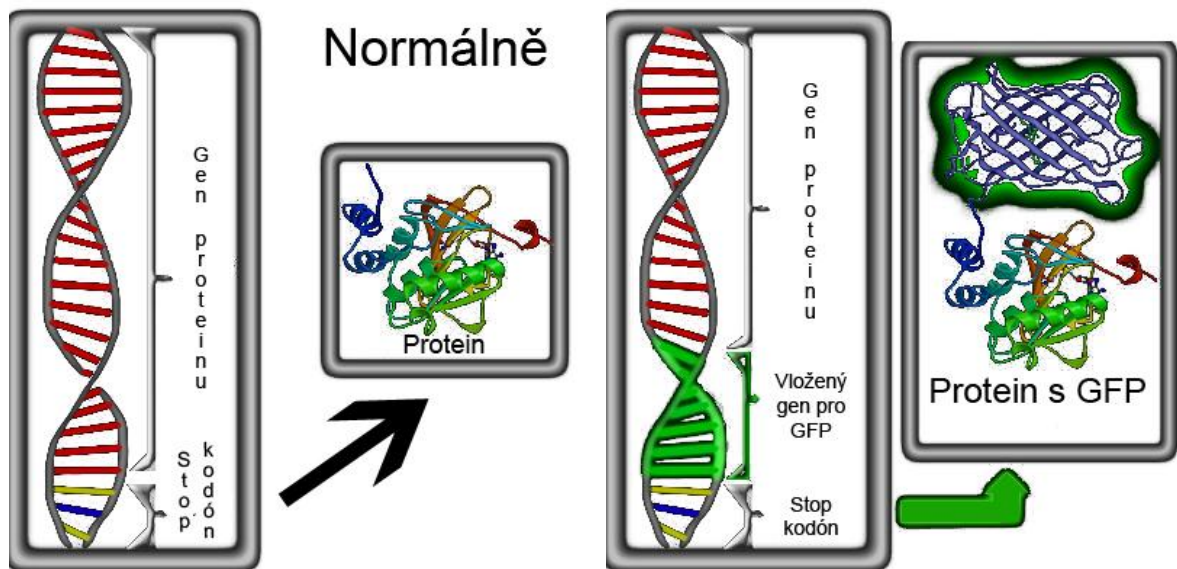


**Obr. 11. - A) Struktura aequorinu [16], B) Struktura GFP [17].**

V roce 1987 D. Prasher využil GFP jako fluorescenční značky pro sledování molekul. Přihlédneme-li k velikosti proteinů, které jsou viditelné pouze elektronovým mikroskopem, může být velmi výhodné na něj navázat GFP a sledovat fluorescenci, čímž můžeme určit jeho polohu. Ovšem připojení GFP k proteinu představuje komplikovaný problém.

### **2.3.2 Úprava a transfekce**

Veškeré informace o proteinech jsou zakódovány v DNA. Pokud organismus potřebuje nové proteiny, dochází k transkripci DNA na RNA a poté k proteosyntéze a vzniku nového proteinu. DNA obsahuje tzv. stop kodón, který ukončuje transkripci. D. Prasher využil tohoto stop kodónu a zabudoval před něj úsek DNA, z něhož po transkripci a proteosyntéze vznikne GFP. Tento jev zachycuje obr. 12.



**Obr. 12. - Schéma zabudování genu pro napojení GFP [18,19].**

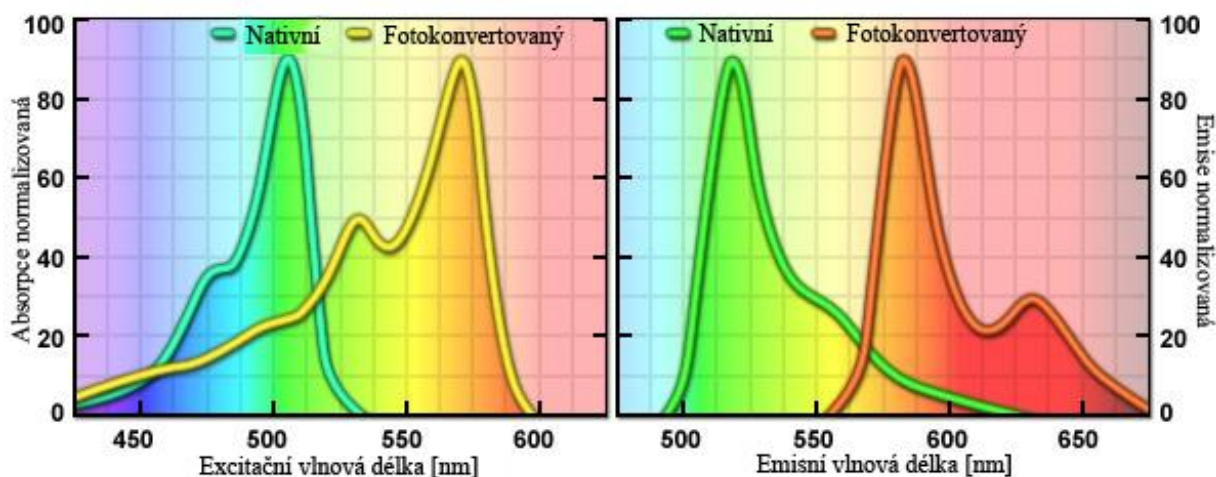
Proces, při kterém dopravujeme cizí genetický materiál ve formě DNA či RNA do eukaryotické buňky, nazýváme transfekce. Využívá se zejména při studiu významu a regulace proteinů a porozumění mechanismů jejich drah [41]. Existuje několik různých metod transfekce, kdy se používá např. elektroporéza, virové vektory nebo kalcium fosfátová metoda.

Podíváme se blíže na metodu virových vektorů. K dopravení cizího genetického materiálu do buňky je možné využít viry. Ty jsou všudypřítomné a napadají většinu živých organismů (archea, bakterie i eukarioty), přičemž jen malé procento z nich je patogenních. Jsou schopny dopravit genetický materiál jak v DNA formě, tak i v RNA. Jejich použití se neomezuje pouze na umělé tkáně, ale i na živé organismy. Jejich vysoká účinnost transfekce a následné exprese je dělá jedním z nejefektivnějších transportérů genetického materiálu do hostitelské buňky. Virový vektor je označení pro vir, na jehož cirkulární genom se navázala cizorodá část, která např. vyvolá syntézu GFP při translaci.

Při měření využíváme lentivirální vektory. První zmínka o jejich úspěšném použití při transfekci je z roku 2006 [42]. Doposud

existují tři generace lentivirálních vektorů a jejich první generace byla odvozena z HIV. Ve většině lidských buněk se ukazuje první generace účinnější než ty ostatní jak při transdukci, tak při expresi. To ovšem neplatí např. u neuronů nebo u kožních pigmentových buněk.

Ke značení vnitřní mitochondriální membrány používáme mitochondriální protein Eos (mtEos), který se napojuje na sekvenci COX4 a spontánně tvoří tetramer. Jako vektor pro vložení mtEos do buňky využíváme lentivirální vektor pLenti6.3/V5-DEST (Invitrogen, San Diego, CA). Pro značení vnější membrány mitochondrií využíváme FIS-Eos, který je napojen na stejnou sekvenci i vektor jako mtEos.



**Obr. 13. – Excitační a emisní spektrum fluorescence mtEos [43].** Zelená křivka zobrazuje excitační a emisní spektrum přírodního mtEOS. Po ozáření světlem blízkým UV dochází k fotokonverzi a excitační i emisní spektrum se posouvá k červené straně spektra.

## 3 Fyzikální část

### 3.1 Základy optické mikroskopie

Na úvod musíme poznamenat, že většina obrázků v této kapitole pochází z webových stránek předních mikroskopických společností, jakými je Olympus, Carl Zeiss či Nikon. Informace z jejich výukových materiálů jsou na dobré úrovni a představují ekvivalent solidních učebnic mikroskopie.

První, komu se podařilo popsat fyzikální podstatu rozlišovací schopnosti objektivů optických mikroskopů, byl německý fyzik Ernst Abbe, který roku 1873 publikoval práci o teorii čoček. V ní odvodil vztah pro rozlišovací limit optické mikroskopie.

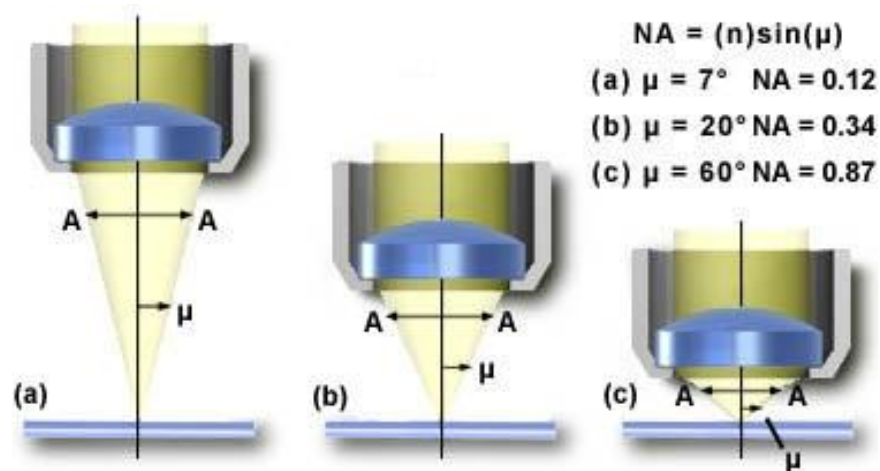
$$d = \frac{\lambda}{2 n \sin(A)} \quad (1)$$

V tomto vztahu  $\lambda$  představuje vlnovou délku světla,  $n$  index lomu světla a  $A$  je maximální úhel, pod nímž vstupují paprsky do objektivu, viz obr. 14. Součinu indexu lomu a sinu úhlu  $A$  se říká numerická apertura (NA).

$$NA = n \sin(A) \quad (2)$$

Když využijeme k popisu Rayleighovu teorii, dostaneme obdobnou hodnotu pro teoretickou rozlišovací schopnost objektivu. Pro zobrazování nekoherentním světlem platí:

$$d = \frac{0,61 \lambda}{NA} \quad (3)$$



Obr. 14. - Schéma numerické apertury [20].

Objektivy dělíme na tři základní typy:

- achromatické,
- fluoritové,
- apochromatické.

Tyto objektivy se liší počtem a typem čoček, ze kterých jsou složeny a které velmi ovlivňují barevnou vadu čočky.

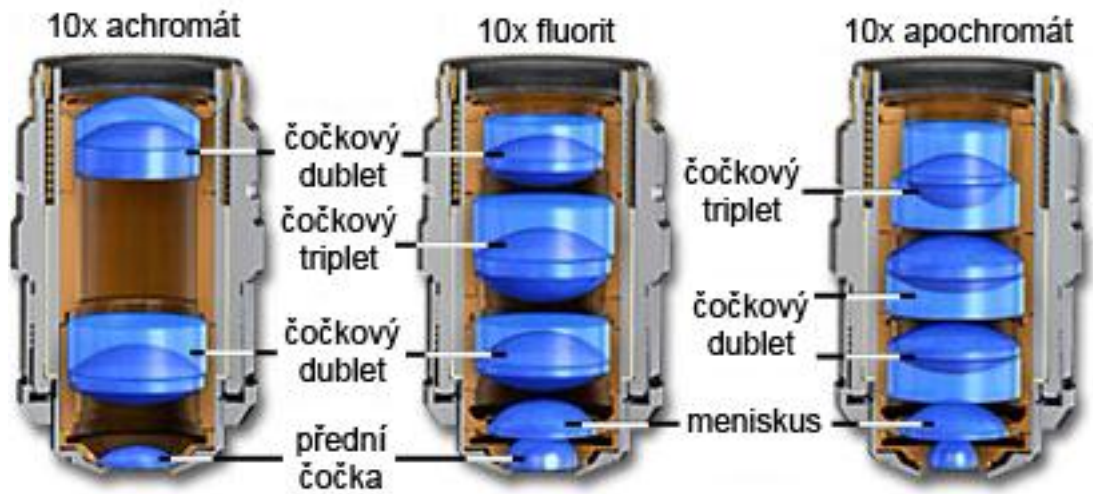
Barevná vada čočky je jev, jenž vzniká v důsledku odlišného indexu lomu pro světlo o různých vlnových délkách, a díky tomu existují různá ohniska pro různé barvy světla. Tuto vadu nelze zcela odstranit, ale lze ji alespoň korigovat. Podle toho, jak výrazně potřebujeme barevnou vadu korigovat, si vybíráme objektiv.

Achromatické objektivy představují nejjednodušší stupeň korekce barevné vady. Materiály a tvary čoček jsou vybrány tak, aby se ohniska modrého a červeného světla překrývala. Ovšem ostatní barvy zůstávají stále nekorigované.

Pokud budeme potřebovat korigovat barevnou vadu o něco lépe, můžeme použít fluoritový objektiv pro korekci dvou až čtyř barev. Apochromatický objektiv může korigovat barevnou vadu až pro pět barev. Obecně můžeme říci, že apochromatické objektivy

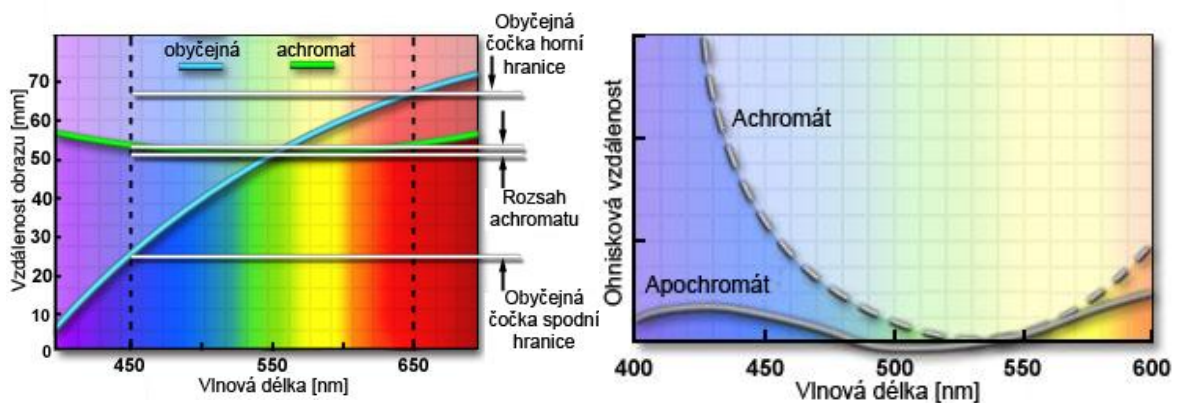


jsou nejkvalitnější, ovšem také nejdražší. Kvalita fluoritových objektivů zaostává za apochromatickými jen nepatrně, ale z finančního hlediska jsou výhodnější.



**Obr. 15. – Konstrukce objektivů [26].**

Závislost vzdálenosti obrazu na vlnové délce světla můžeme pozorovat na obr. 16. Zde je jasně patrný markantní rozdíl nejen mezi achromátem a nekorigovanou čočkou, ale také mezi achromátem a apochromátem.

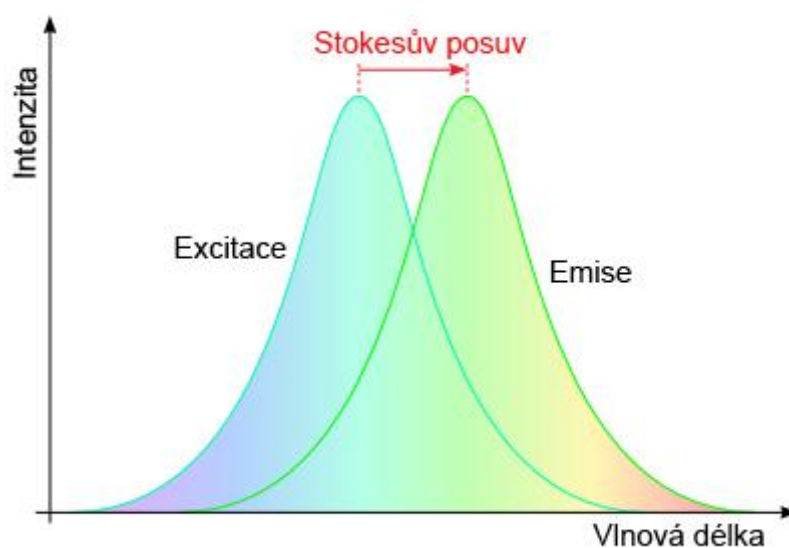


**Obr. 16. – Objektivy pro korekci barevné vady [27,28].**

### 3.2 Fotoluminiscence

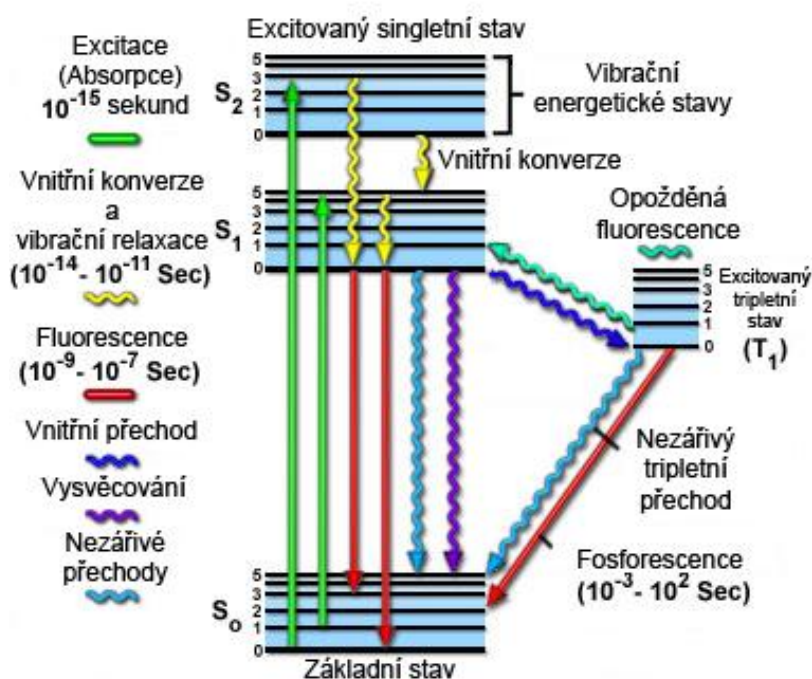
Proces, při kterém excitovaná molekula nacházející se v termodynamicky nerovnovážném stavu vyzáří světlo, se nazývá luminiscence. Molekuly mohou být uvedeny do excitovaného stavu různými způsoby. Můžeme využít mechanických procesů (tření), chemických procesů nebo elektromagnetického záření. Jestliže k excitaci molekuly využijeme světlo nebo UV záření, pak mluvíme o fotoluminiscenci. Podle vzniku emitujícího záření můžeme fotoluminiscenci rozdělit na dvě základní skupiny - fluorescenci a fosforescenci. První odpovídá přechodům ze singletních excitovaných stavů do stavů základních a druhá emisi ze stavů tripletních. Ty vznikají interkombinační konverzí (nezářivým přechodem) z původních singletních excitovaných stavů.

Protože jsou energie stacionárních stavů elektronů kvantované, může molekula absorbovat pouze světlo o určité frekvenci. Když vyneseme do grafu závislost absorpčního koeficientu na vlnové délce, dostáváme absorpční spektrum dané molekuly, obr. 17. Po určité době dochází k opětovnému přechodu elektronu z excitované hladiny do základního stavu. Tento jev může být doprovázen vyzářením fotonu o vlnové délce, která odpovídá rozdílu energií základního a excitovaného stavu. Pokud vyneseme do grafu závislost intenzity fluorescence (počet fotonů za čas, resp. energie za čas) připadající na jednotkový interval vlnových délek, dostáváme emisní spektrum dané molekuly. Toto spektrum je oproti absorpčnímu spektru posunuto k větším vlnovým délkám, což znamená, že emitované fotony mají menší energii než fotony absorbované. Rozdílu vlnových délek emisního a absorpčního maxima se říká Stokesův posuv.



Obr. 17. – Excitační a emisní spektrum a Stokesův posuv [24].

Jednoduchý a přehledný způsob jak znázornit energetické hladiny a procesy spojené s fotoluminiscencí je znám jako Jablonského diagram.



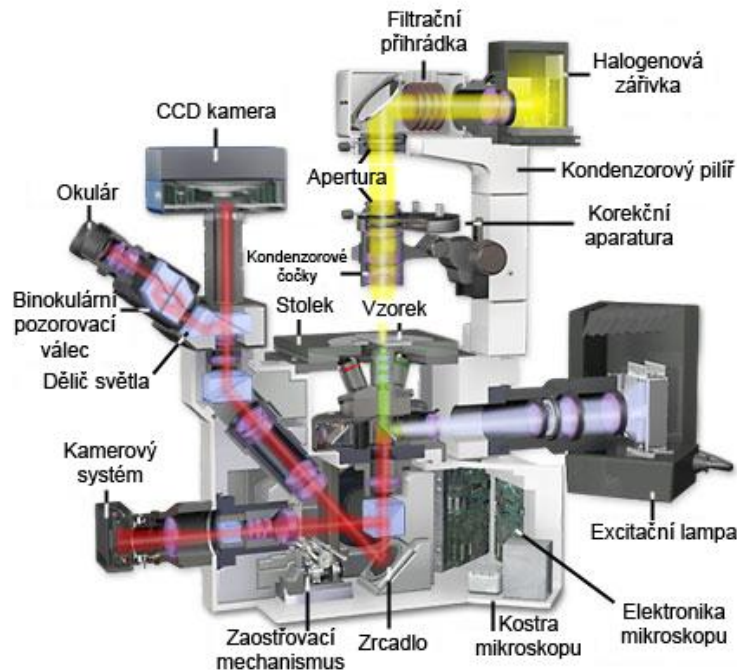
Obr. 18. – Jablonského diagram [21], podle typu šipek můžeme rozpoznat zářivé (rovné šipky) a nezářivé (vlnité šipky) přechody. Při vnitřní konverzi a vibrační relaxaci předává elektron přebytečnou energii do svého okolí. V kondenzovaných fázích tento přechod trvá  $10^{-14} - 10^{-11}$  s. Oproti tomu vnitřní přechod (mezisystémová konverze) nastává mezi dvěma hladinami o rozdílných multiplicitách (singlet-triplet i triplet-singlet). Tento přechod je z hlediska spinu zakázán a dochází k němu pomocí spin-orbitální interakce. Proto se elektron udrží v tripletním stavu déle než v singletním ( $10^{-3} - 10^2$  s).

Druhé důležité pravidlo, jež nesmíme opomenout, je Kashovo-Vavilovo pravidlo, někdy též nazýváno pouze Vavilovo. Toto pravidlo nám říká, že kvantový výtěžek luminiscence a doba, po kterou se elektron nachází v excitovaném stavu, jsou nezávislé na frekvenci excitujícího záření.

### 3.3 Fluorescenční mikroskopie

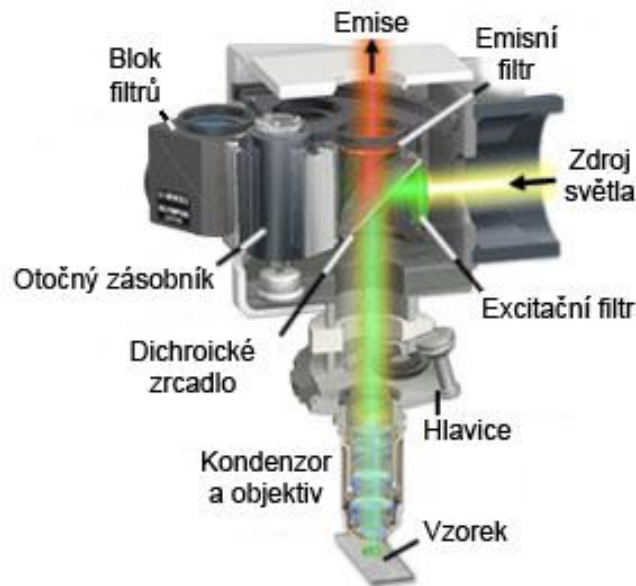
První fluorescenční mikroskop byl vyroben německými fyziky A. Köhlerem a C. Reichertem kolem roku 1912. Ovšem největší rozmach fluorescenčních mikroskopů nastal ve 40. letech 20. století, kdy Albert Coons objevil techniku barvení biologických objektů fluorescenčními značkami a Stanislav von Provezek využil fluorescenční mikroskop ke sledování živých, fixovaných buněk.

Fluorescenční mikroskop je velmi sofistikovaný přístroj, jež obsahuje celou řadu komponentů. V této práci si zmíníme pouze nejzákladnější komponenty, které jsou pro náš experiment důležité. Celý mikroskop je vyobrazený na obr. 19.



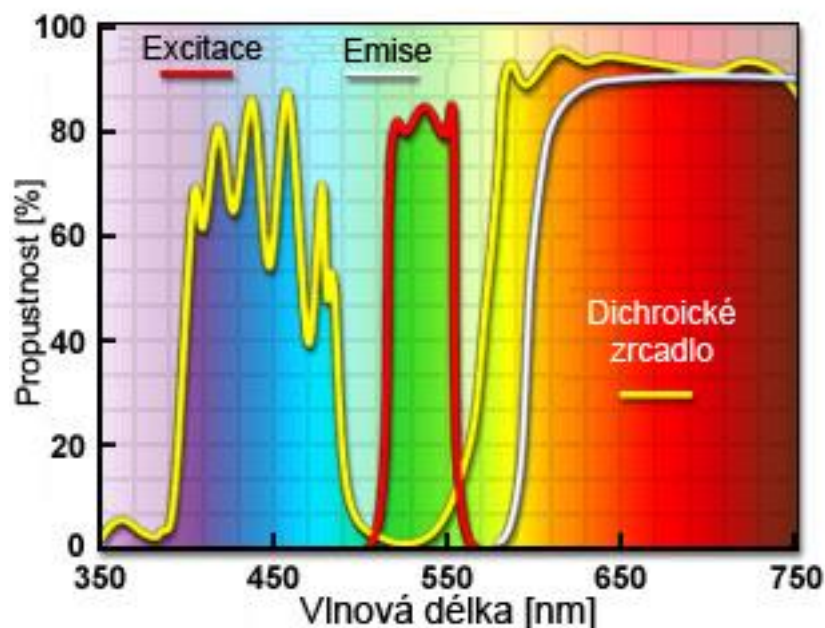
**Obr. 19. – Konstrukce invertovaného fluorescenčního mikroskopu [22].**

Moderní fluorescenční mikroskopy využívají episkopické (reflexní) osvětlení. Jedná se o takové vedení excitačního světla od zdroje na vzorek a vedení luminiscence od vzorku k detektoru, kdy jsou oba svazky v jednom úseku vedeny společně. Tato konfigurace je možná pouze díky odrazu světla na dichroickém zrcadle, obr. 20.



**Obr. 20. – Ozařování vzorku pomocí dichroického zrcadla [23].**

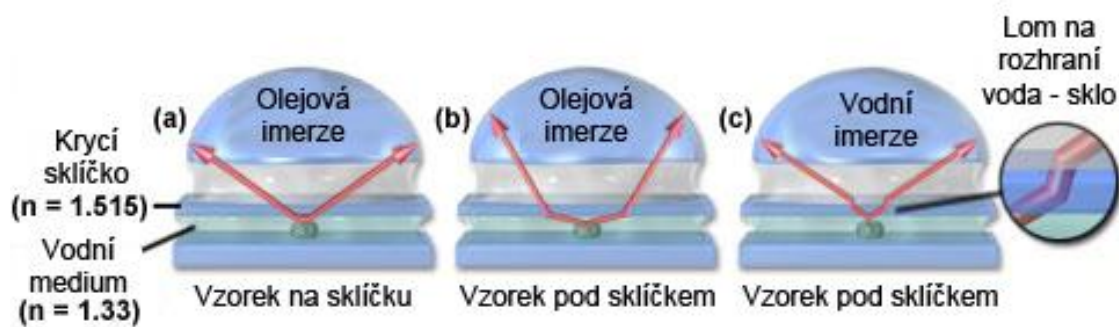
Toto zrcadlo neslouží jen k odrazu excitačního světla na vzorek, ale má také funkci barevného filtru, protože emitované záření propustí dále na detektor, ale odražené emitující světlo ne. Stejně tak napomáhá k omezení pozadí. Ovšem samotné dichroické zrcadlo by nestačilo. Pro přesnější vymezení vlnových délek excitačního a emisního světla se používají optické filtry. Ty velmi efektivně propouští pouze určitou část spektra a ty ostatní potlačují. Na obr. 21. vidíme ukázkový graf propustnosti dichroického zrcadla společně s excitačním a emisním filtrem v závislosti na vlnové délce. Existuje spousta filtrů a zrcadel o různých kvalitách a musíme si dát pozor, abychom nevybrali jejich nevhodnou kombinaci.



Obr. 21. – Propustnost dichroického zrcadla, emisního a excitačního filtru [25].

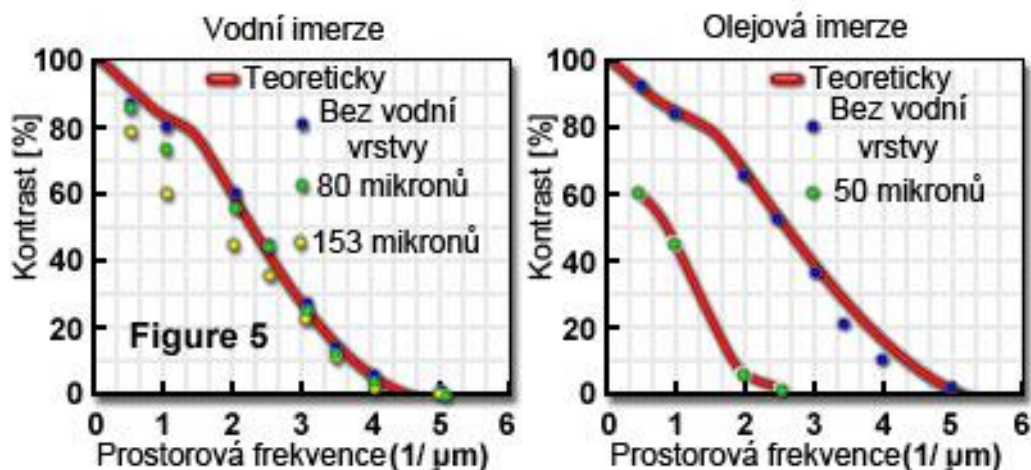
Faktorem, který napomáhá ke zvětšení numerické apertury, a tím větší rozlišovací schopnosti, je využití olejové imerze. Využívá se olej o stejném indexu lomu, jaký má sklo, a proto dochází ke zvětšení numerické apertury. Navíc na rozhraní olej-sklo nedochází k totálnímu odrazu světla. Je dobré si uvědomit, že při používání objektivů s numerickou aperturou větší než 0,4 musíme uvažovat i s lomem světla na krycím sklíčku.

Ovšem jakmile chceme pozorovat biologické preparáty, které většinou obsahují větší množství vody a jsou tlustší, je lepší použít vodní imerzi místo olejové. Když se objekt nachází na krycím skle, nepozorujeme žádný problém. Pokud se ovšem vzorek malinko od krycího sklíčka odlepí, dochází ke ztrátě kontrastu, a čím hlouběji se pokusíme zaostřit, tím bude rozostření markantnější. Průchod paprsků je zobrazen na obr. 22., kde vidíme, že při použití vodní imerze dochází k menšímu odklonu paprsků než u olejové.



Obr. 22. – Olejová vs. vodní imerze [29].

Obr. 23. zachycuje změnu kontrastu obrazu při zobrazení periodicky opakujícího se obrazu v závislosti na prostorové frekvenci v různých hloubkách vodního vzorku. Je vidět velký rozdíl mezi vodní a olejovou imerzí.



Obr. 23. – Úbytek kontrastu olejové imerze [30].

Další vztah, který si zmíníme, je zvětšení objektivu. To je důležité při výpočtu hloubky ostroty, jenž nám říká, jak tlustou vrstvu vzorku uvidíme ostře, při daném zaostření. Vypočítá se podle vztahu (4) a vidíme, že čím větší zvětšení budeme mít, tím lépe budeme moci pozorovat tenčí vrstvu.

$$d_{tot} = \frac{\lambda n}{NA^2} + \frac{n NA}{M} e \quad (4)$$

$\lambda$  je vlnová délka,  $n$  index lomu,  $NA$  numerická apertura,  $M$  zvětšení objektivu a  $e$  je nejmenší vzdálenost, jež může být zaznamenána detektorem.

Pro intenzitu světla dopadající na detektor po průchodu luminiscenčním mikroskopem platí řádová rovnost (5).

$$I \sim \frac{NA^4}{M^2} \quad (5)$$

$NA$  je numerická apertura a  $M$  je zvětšení objektivu.

Když přihlídneme k tomu, že v apochromatické objektivu se nachází přibližně 7 čoček s rozhraním vzduch - sklo, což představuje 14 odrazových ploch a každá zeslabí světlo přibližně o 4 %, pak po průchodu klesne intenzita přibližně na 56 % původní intenzity. Proto jsou čočky potaženy vrstvou z dielektrického materiálu, který snižuje odrazivost čočky.

## **3.4 FPALM**

### **3.4.1 Základní principy**

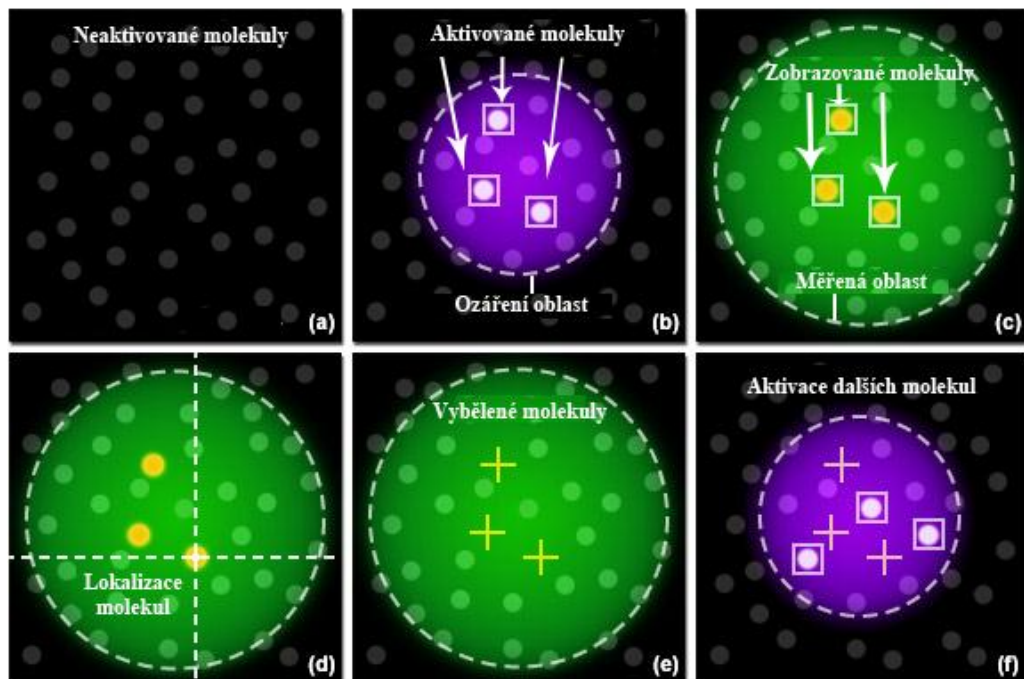
Hlavní význam fluorescenční fotoaktivovatelné lokalizační mikroskopie (FPALM) je schopnost lokalizovat a zobrazovat fotoaktivovatelné fluorescenční proteiny s rozlišením, jež je v řádech 10 nm, a to by podle Rayleighova kritéria nemělo být dosažitelné pomocí optického mikroskopu. Existují dva různé optické systémy, které využívají FPALM ke konstrukci 3D obrazů. Axiální rozlišení bývá přibližně 3krát horší než laterální, ale i tak se stále nachází pod Rayleighovým kritériem.

Tato metoda ovšem není proveditelná s libovolným fotoaktivovatelným fluorescenčním proteinem. Takový protein musí splňovat následující podmínky:



1. míra spontánních přechodů z aktivované do neaktivované formy musí být menší než míra světlem řízených přechodů;
2. pro ireverzibilní fotoaktivaci musí být kvantový výtěžek fotovybělování konečný, a pokud jej vynásobíme mírou excitace v saturovaném stavu, musí být míra fotovybělování větší nebo rovna míře fotoaktivace;
3. pro reverzibilní fotoaktivaci musí být součet míry fotovybělování a světlem řízené deaktivace větší nebo roven míře fotoaktivace;
4. průměrný počet detekovaných fotonů na jednu molekulu před fotovybělením musí být dostatečně velký pro zlepšení rozlišení;
5. fluorescence proteinu v neaktivním stavu musí být malá ve srovnání s fluorescencí aktivního stavu [39].

Pokud protein splňuje předchozí podmínky, můžeme jej využít pro jedno molekulovou lokalizační mikroskopii (Single-Molecule Localization Microscopy), která je základním principem FPALM. Její názorná ukázka je na obr. 24.

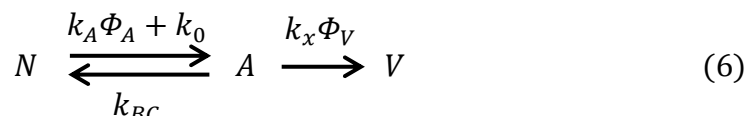


Obr. 24. – Princip jednomolekulové lokalizační mikroskopie [40].

Abychom byly schopni nastavit a udržet podmínky měření v souladu s nutnými předpoklady, musíme vybrat správný protein. Proto se nyní blíže seznámíme s kinetikou aktivace proteinu.

### 3.4.2 Kinetika aktivace

Proces aktivace a vybělování můžeme shrnout do následujícího schématu.



$N$  nám udává počet proteinů v neaktivovaném stavu,  $A$  v aktivované formě a  $V$  je počet nenávratně vybělených proteinů.  $k_A$  je míra řízené aktivace,  $k_0$  míra spontánní aktivace,  $k_{BC}$  míra spontánní a světlem řízené inaktivace a  $k_x$  představuje míru vybělování.  $\Phi_A$ , resp.  $\Phi_V$  jsou kvantové výtěžky aktivace, resp. vybělování. Nyní si vyjádříme časovou změnu stavů, ve kterých se protein může nacházet.

$$\frac{dN}{dt} = -N(k_A \Phi_A + k_0) + k_{BC}A \quad (7)$$

$$\frac{dA}{dt} = -Ak_x \Phi_V + N(k_A \Phi_A + k_0) - k_{BC}A \quad (8)$$

$$\frac{dV}{dt} = Ak_x \Phi_V \quad (9)$$

Nyní je třeba si uvědomit, že míry  $k_A$  a  $k_x$  můžeme nastavit tak, aby vztah (8) byl nulový. Řešením soustavy rovnic (7 - 9) za těchto podmínek dostaneme následující vztah.

$$A = N \left( \frac{k_A \Phi_A + k_0}{k_x \Phi_V + k_{BC}} \right) \quad (10)$$

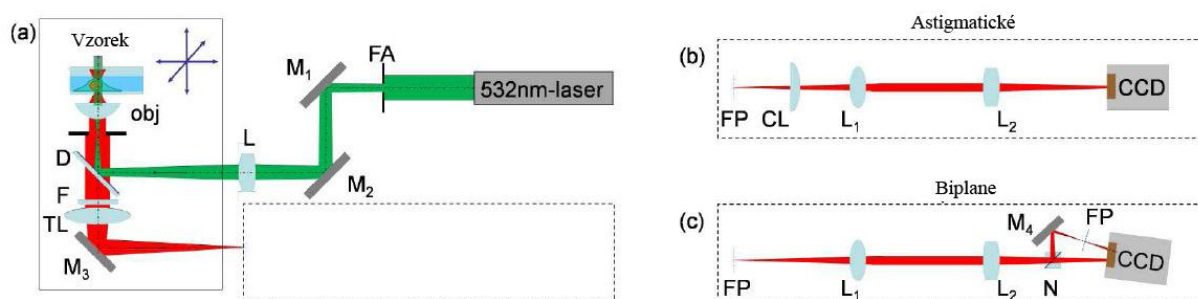
Tímto nastavením docílíme neměnného počtu aktivovaných proteinů, který si můžeme na počátku měření stanovit. Námí určený počet by měl být dostatečně velký, abychom splnili

podmínku 4, a zároveň dostatečně malý, abychom minimalizovali pravděpodobnost emise dvou proteinů, jejichž vzájemná vzdálenost je menší než Rayleighova vzdálenost (3).

Když splníme všechny předchozích podmínky, budeme moci považovat zdroje fluorescence (proteiny) za bodové zdroje.

### 3.4.3 Konstrukce FPALM

Konstrukce FPALM mikroskopů pro 3D zobrazení je limitována faktem, že jsme schopni detekce pouze ve 2D. K určení axiální souřadnice proteinu můžeme využít dva různé způsoby, jejichž fyzikální podstata je ovšem totožná. Musíme rozostřit 2D difrakční obrazec, který dostáváme na CCD detektoru. Největší problém následné analýzy rozostřeného obrazu je axiální symetrie distribuce intenzity fluorescence. V poloze  $z$  je 2D obrazec totožný s pozicí  $-z$  (v případě perfektního mikroskopu). K porušení této symetrie můžeme použít astigmatické uspořádání systému nebo biplane uspořádání. Obě tato uspořádání jsou na obr. 25.



**Obr. 25. – Schéma optické konstrukce FPALM [31],** FA – apertura; L – čočky; N – neutrální dělič paprsků; M – zrcadla; CL – cylindrická čočka; D – dichroické zrcadla; TL – tube lens; FP – zaostřovací rovina; F – pásmový filtr. (a) zjednodušené jádro mikroskopu s prázdným okénkem pro dané uspořádání; (b) astigmatické uspořádání; (c) biplane uspořádání

Vložením cylindrické čočky do světelné dráhy dojde k eliptickému protažení distribuce intenzity v jednom laterálním směru, čímž se poruší symetrie a tak můžeme zpracovávat výsledný obraz [32,33].

Biplane metoda je založena na prodloužení části paprsku o danou délku pomocí polopropustného zrcadla. Tím nám vznikne druhý obraz, který je zaostřen na jinou hloubku, jež je daná dráhovým posunem. Souběžná detekce takto vzniklých obrazů nám umožňuje analyzovat obraz a rekonstruovat 3D obraz [34,35].

### 3.4.4 Rozlišovací schopnost FPALM

Rozlišovací schopnost biplane FPALM mikroskopu můžeme rozdělit dvě části – laterální (v ploše XY) a axiální (v ploše XZ a YZ). Pro odvození a výpočet je jednodušší laterální rozlišovací schopnost. Pro výpočet axiální rozlišovací schopnosti jsme nenalezli žádný zdroj. Detailní odvození laterální rozlišovací schopnosti provedl R. E. Thompson a spol. [36]. My si zde zmíníme pouze základní principy.

Vycházíme z běžné statistické formule pro standardní chybu.

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2}{N} \quad (11)$$

$\Delta x$  je chyba v lokalizaci,  $s$  je standardní deviace funkce bodové odezvy (PSF) a  $N$  je počet detekovaných fotonů. Pro přesnější výpočet odchylky musíme započítat i chybu, která je způsobena tzv. pixelovým šumem, jenž je důsledkem konečné velikosti jednoho pixelu na CCD čipu. Velikost tohoto šumu je rovna  $a^2/12$ , kde  $a$  je velikost jednoho pixelu. Pixelový šum negativně ovlivňuje výslednou lokalizaci fluoreskujícího bodu.

Posledním faktorem, který výrazněji ovlivňuje laterální přesnost měření, je šum pozadí. Ten je způsoben detekcí fotonů, jež nemusejí nutně pocházet od zkoumané částice. Určení šumu pozadí je komplikovanější, a proto si uvedeme pouze výslednou rovnici.

$$\langle(\Delta x)^2\rangle_{\text{pozadi}} = \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2} \quad (12)$$

$a$  je velikost pixelu,  $s$  je standardní odchylka PSF a  $b$  je konstanta šumu pozadí. Celková odchylka lokalizace pro jednu dimenzi je popsána následující rovnicí.

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2} \quad (13)$$

Laterální lokalizace je ovšem dvoudimenzionální, a tak musíme vztah (12) upravit.

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (14)$$

## **4 Praktická část**

Dříve než se pustíme k popisu metod měření a jejich vyhodnocení, musíme si připomenout, že veškerá naše práce je prováděna na jednom z prvních prototypů biplane FPALM mikroskopů. Další obdobný přístroj se v Evropě nachází pouze v Curychu. Spolupracujeme s výrobcem přístroje a softwaru na jejich zdokonalování, odlaďování a opravách případných chyb a nedostatků. Taktéž kultivace buněk a jednotlivé kroky při přípravě vzorků jsou ve fázi vývoje a testování.

Naším primárním cílem je zobrazit vnitřní a vnější membrány mitochondrií a endoplazmatického retikula. Dále chceme nalézt vhodné metody pro přípravu vzorků, zobrazování a zpracování obrazu tak, aby bylo prokazatelné navázání proteinu na vnitřní, resp. vnější membránu, případně stanovení fyzikálních parametrů, jakými jsou průměr a délka. Náš cíl se rozšířil o studium buněk v normoxickém a hypoxickém stavu.

### **4.1 Vutara**

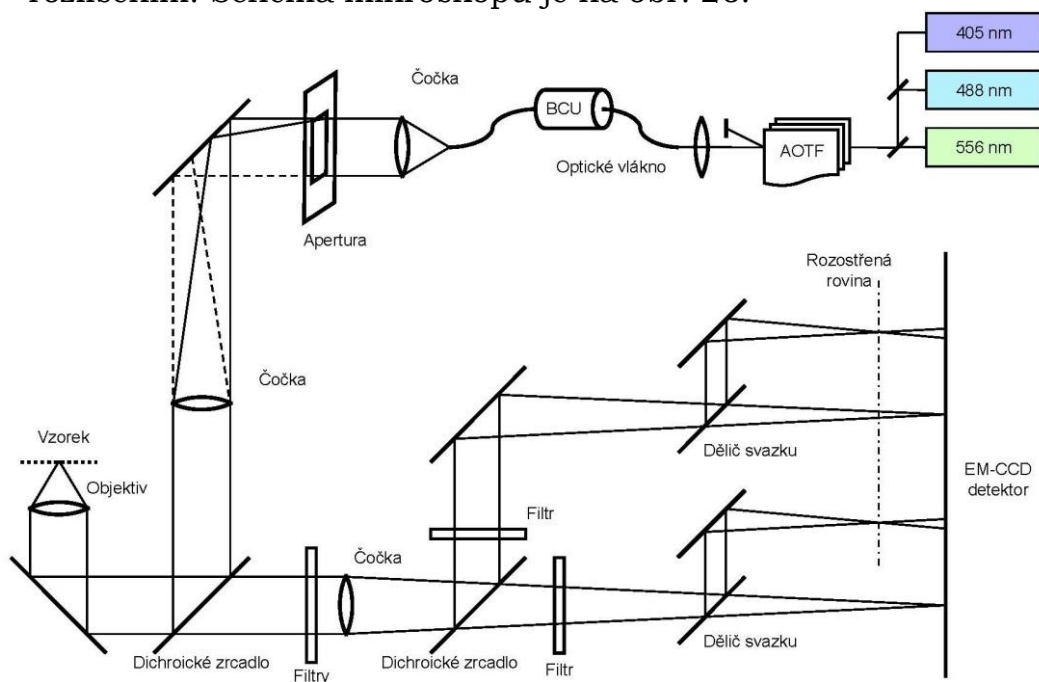
Společnost Vutara, Inc. byla založena 22. 1. 2010 v USA ve městě Salt Lake City, UT. Zabývá se studiem struktury a procesů buněk na molekulární úrovni pomocí mikroskopu Vutara SR-200. Tento první mikroskop se super rozlišením je jediným produktem Vutary.

#### **4.1.1 Vutara SR-200**

Jako zdroje záření systém využívá tři lasery o vlnových délkách 405 nm (crystalaser, Reno, Andor Technology, South Windsor, CT), 488 nm (Innova 70, Coherent Inc., Santa Clara, CA) a 556 nm (Laserglow, Toronto, ON, Canada). Laserové paprsky jsou optickými vlákny společně vedeny do akusticko-opticky laditelného filtru (AOTFnC-400.650, AA Opto-Electronic, Orsay Cedex, France) a následně do BCU (z angl. Beam Conditioning

Unit), kde dochází k odstranění nechtěné koherence paprsku. Světlo je vedeno přes obdélníkovou aperturu na vícehrané dichroické zrcadlo (Di01-R405/488/561/635, Semrock, Rochester, NY) a následně skrz objektiv (Plan-Apo 63x/1,2w, Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood, NY) na vzorek.

Fluorescence je shromažďována objektivem a prochází skrz dichroické zrcadlo a multispektrální pásový filtr (FF01 – 446/523/600/677-25, Semrock, Rochester, NY) na dělič svazku. Svazek je rozdělen dichroickým zrcadlem a dvěma pásovými spektrálními filtry na dva svazky o různých vlnových délkách. Každý z těchto svazků je pak dále rozdělen pomocí polopropustného zrcadla na dva další svazky, které kvůli odlišným délkám optické dráhy vytvářejí na detektoru dva obrazy vybrané roviny vzorku – obraz zaostřený a rozostřený, které jsou souběžně detekovány EM-CCD detektorem (iXon DU897DCS-BV, Andor Technology, South Windsor, CT). Díky tomuto rozdělení můžeme detekovat dvě různobarevné fluorescence souběžně s vysokým rozlišením. Schéma mikroskopu je na obr. 26.



**Obr. 26. – Schéma mikroskopu Vutara SR-200.**

Mikroskop je umístěn v tmavé místnosti s černými stěnami na antivibračním stole. Teplota je udržovaná na konstantní hodnotě 24°C a měření probíhá za tmy, aby se minimalizoval šum pozadí.



**Obr. 27. – Měřicí laboratoř a biplane mikroskop Vutara SR-200.**

#### **4.1.2 Software a jeho odladění**

Společnost Vutara, Inc. vytváří i software pro zobrazení a následné zpracování naměřených dat Vutara SRX. Program pro jednoduché prohlížení obrázků je veřejně dostupný na jejich webu [37]. Ovšem pro samotné měření využíváme plnohodnotnou verzi programu, která není veřejně přístupná. Samotný program nemá vysoké nároky na výkon počítače, ale protože pro minimalizaci odchylky měření je dobré detekovat co nejvíce fotonů, viz rovnice (14), samotná měření trvají kolem jedné hodiny a velikost takto získaných dat může dosáhnout i 25 GB na jedno měření. Tento velký objem dat je zapříčiněn ukládáním každého detekovaného



obrazu z CCD detektoru. Jeden snímek má 512 kB a během měření získáme řádově desetitisíce snímků.

Před samotným měřením je třeba provést kalibraci programu a nastavení optimální PSF. Tato kalibrace se provádí na fluorescenčních kvantových tečkách o průměru 100 nm. Program podle naměřených údajů automaticky vypočítá optimální PSF a tu následně aplikuje při určování souřadnic jednotlivých proteinů z naměřeného vzorku. Jakým způsobem program stanovuje PSF, nám nebylo společností prozrazeno a nemáme možnost získat ani matematický předpis výsledné PSF.

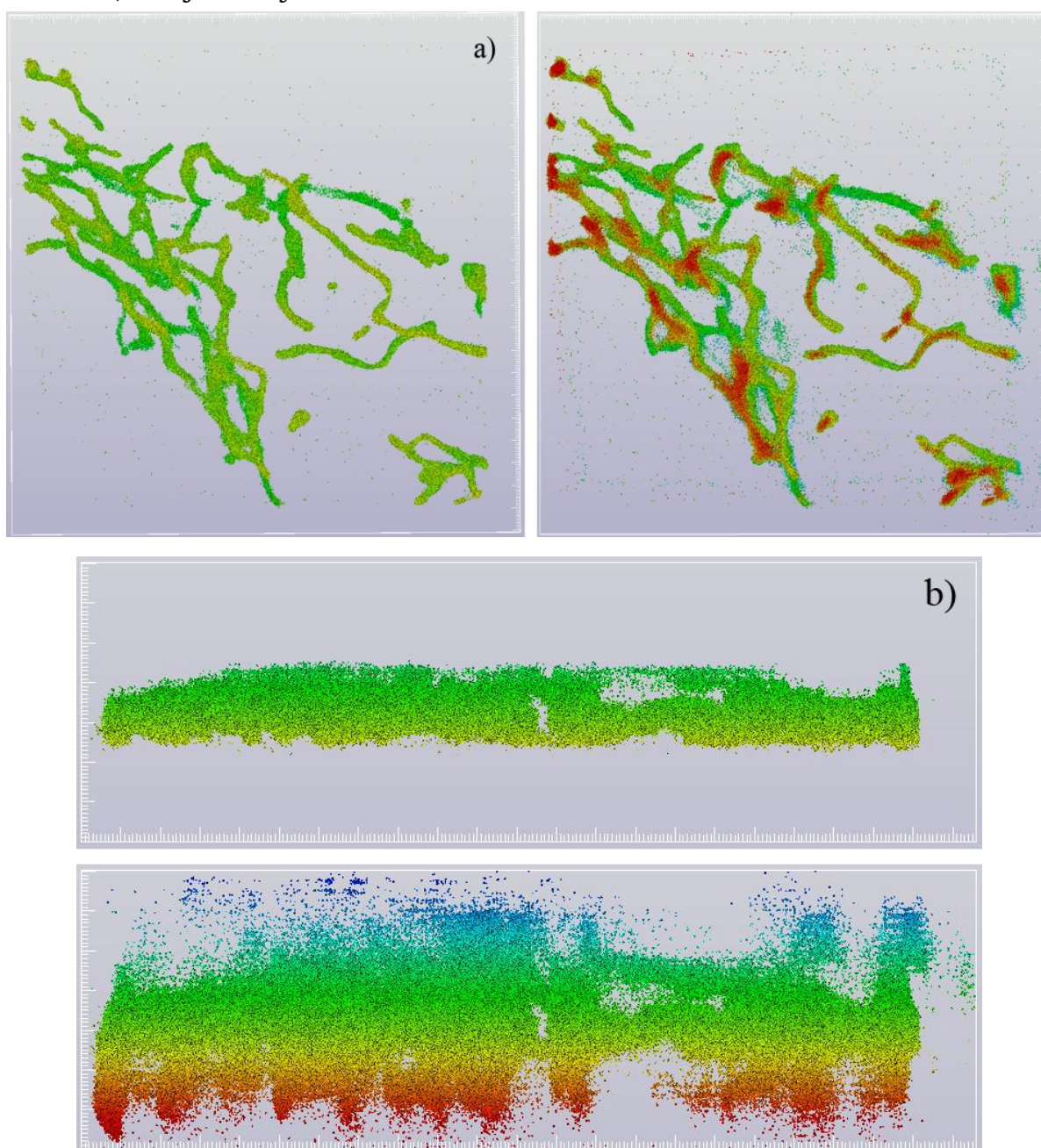
Krátce po zakoupení nebyl systém dobře odladěn a chybělo mu několik zásadních funkcí, které byly na naši žádost doplněny. Nejprve jsme neměli možnost vidět ani graf PSF v jednotlivých osách, což jsme považovali za zásadní problém. Program také uměl ukládat pouze všechna naměřená data do jednoho velkého souboru typu csv. Nemohli jsme si vybrat menší oblast našeho zájmu a exportovat pouze ji. Tímto výběrem se zmenší nároky na hardware a zpracování probíhá rychleji.

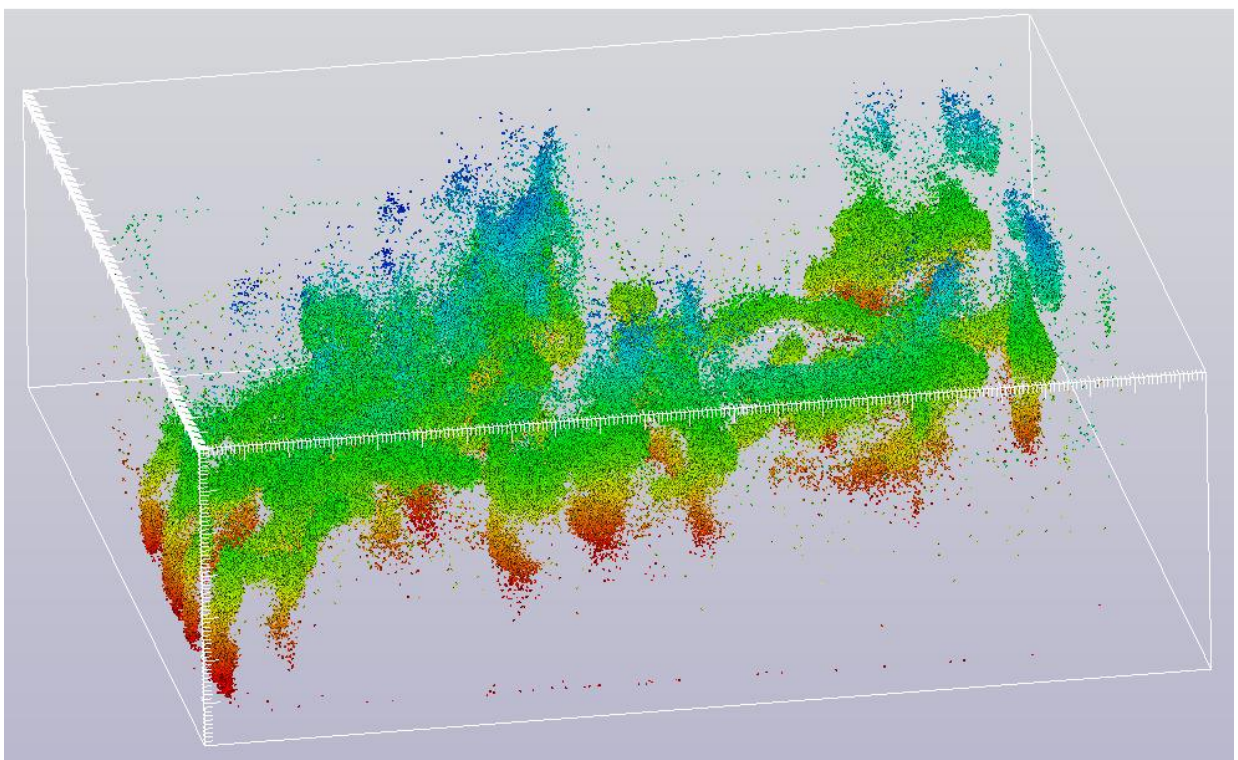
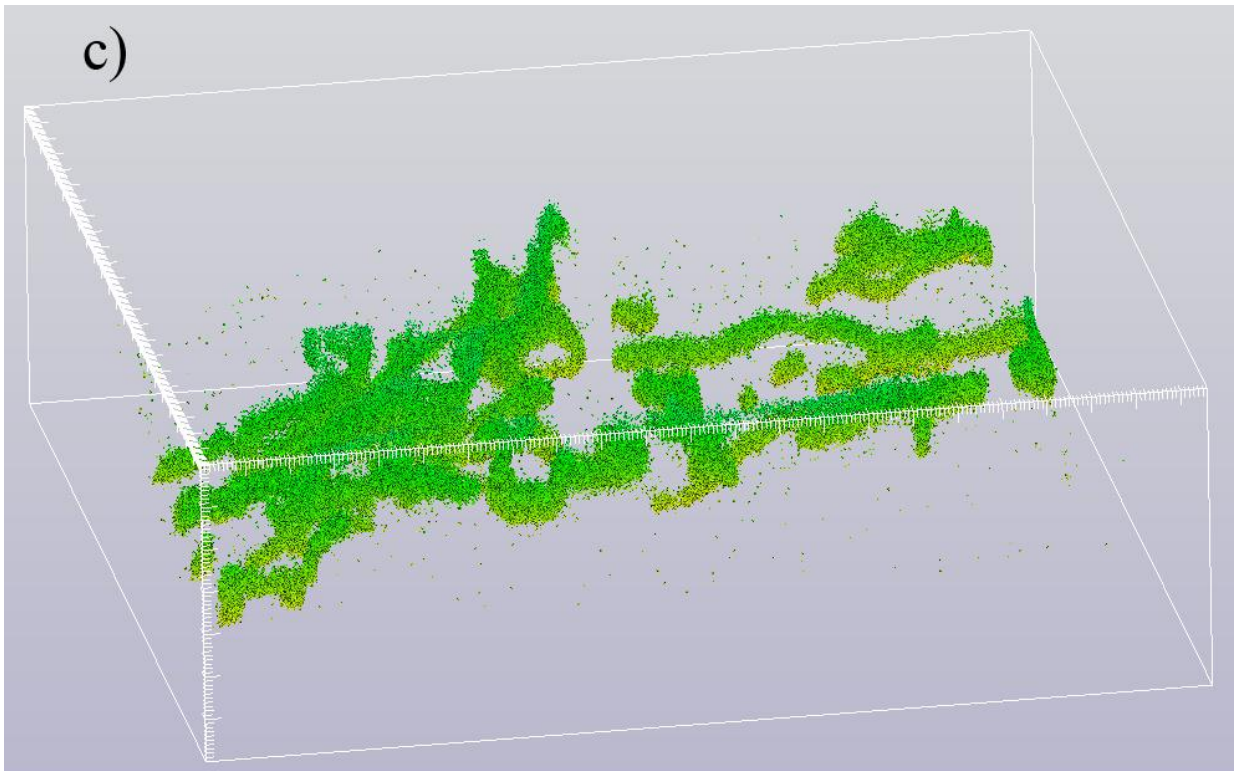
Abychom byli schopni ověřit, že se fluorescenční proteiny opravdu nacházejí na správných membránách, museli jsme software obohatit o možnost zobrazení histogramu pozic částic v libovolných osách.

Pro některé metody zpracování byl export do csv souboru nepraktický (tabulka dvaceti tří sloupců na několik tisíc řádků). Proto jsme si zažádali o doplnění možnosti exportu jako rastrových obrázků. Nyní můžeme exportovat data ve formátu tiff. Navíc program umožňuje nastavit počet pixelů na jeden mikrometr od 1 do 128. Taktéž počet řezů v rovině XY je nastavitelný od 1 do 128. Součástí každého exportu je textový soubor, jenž obsahuje informace o rozlišení obrázku a rozměry reálně exportované oblasti

v nanometrech. Tento soubor je nesmírně důležitý pro další zpracování.

Automaticky se provádí filtrace špatně detekovaných bodů. Přesný způsob této filtrace nám bohužel také není znám. I při správné kalibraci tato filtrace vyloučí přibližně třetinu získaných bodů. Počet nepoužitelných bodů je velmi náhodný jev, který je ovlivněn nepravidelným růstem buňky a úspěšností transfekce a fixace buňky. Míru filtrace si můžeme nastavit ručně od 0 do 100 %, což je zachyceno na obr. 28.





**Obr. 28. – Pohled na data při filtru 80 % a 0 % v rovině a) XY, b) XZ, c) levý horní náhled.** Barevné schéma je dle velikosti souřadnice v ose z. Především z b) a c) je patrný význam filtru, když téměř třetinu všech bodů odfiltruje.

## **4.2 Materiál a kultivace**

### **4.2.1 Chemikálie**

Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich, čistota >99,9 %, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - Invitrogen, Glutamin - Sigma-Aldrich, čistota >99,9 %, Fetální telecí sérum – Gibco, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) Sigma-Aldrich, čistota >99,5 %, Penicilin/streptomycin – Sigma-Aldrich; Polylysin – Sigma-Aldrich, Glukóza – Sigma-Aldrich, Solný fosfátový pufru (PBS z anglického Phosphate Buffered Salin) - Invitrogen, Trypsin – Sigma-Aldrich, Kyselina ethylendiamin-tetraoctová (EDTA z anglického ethylenediamine- tetraacetic acid) - Invitrogen, Lipofectamin 2000 transfection reagent – Invitrogen, E-xtremeGENE 9 DNA transfection reagent – Roche, 32% paraformaldehyd (PFA) – Electron microscopy science, 8% glutaraldehyd (GA) – Electron microscopy science, Borohydrát sodný – Sigma-Aldrich, čistota >98,5 %.

### **4.2.2 Příprava buněk**

K měření používáme lidské jaterní buňky linie ECACC 85011430. Buňky jsou uskladněny ve zmrazovacím médiu. Abychom omezili riziko vzniku krystalické formace buněk, přidáváme 5 % (v/v) dimethylsulfoxidu (DMSO). Poté jsou při koncentraci přibližně  $10^6$  buněk na 1 ml roztoku pozvolna zamrazovány rychlostí 1°C/hod, dokud teplota neklesne na -80°C.

Při rozmrazování se ampule s buňkami rychle rozmrazí ve vodní lázni o teplotě 37°C. Obsah přelejeme do nové ampule s 5 ml vhodného media a centrifugujeme 10 minut při relativní centrifugační síle 200-220 rcf. Pak odsajeme staré medium a přidáme 5-10 ml nového. Důkladně suspenzi protřepeme a máme připravené buňky k výsevu.

Buňky po rozmražení není vhodné ihned používat k měření. Nejprve necháme buňky množit v lahvičkách nebo Petriho miskách a až po prvním dělení, tzv. pasáži, jsou buňky použitelné k měření.

Z buněk odsajeme medium, přidáme 1 ml PBS a po chvíli odsajeme. Poté přidáme roztok trypsinu a EDTA v poměru 1:1. Takto připravený roztok necháme 5 minut v termostatu a poté lehce protřepeme. Opatrně odsajeme medium a přidáme 5 ml nového. Spočítáme buňky pomocí automatického sčítače buněk (Invitrogen Countess, Automated Cell Counter). Na 1,5 mm krycí sklíčko pokryté slabou vrstvou poly-L-lysinu kápneme dvakrát 250  $\mu$ l suspenze buněk od středu ven. Takto připravený vzorek necháme 10 minut odstát a pak velice opatrně přidáme 2,5 – 3,5 ml media.

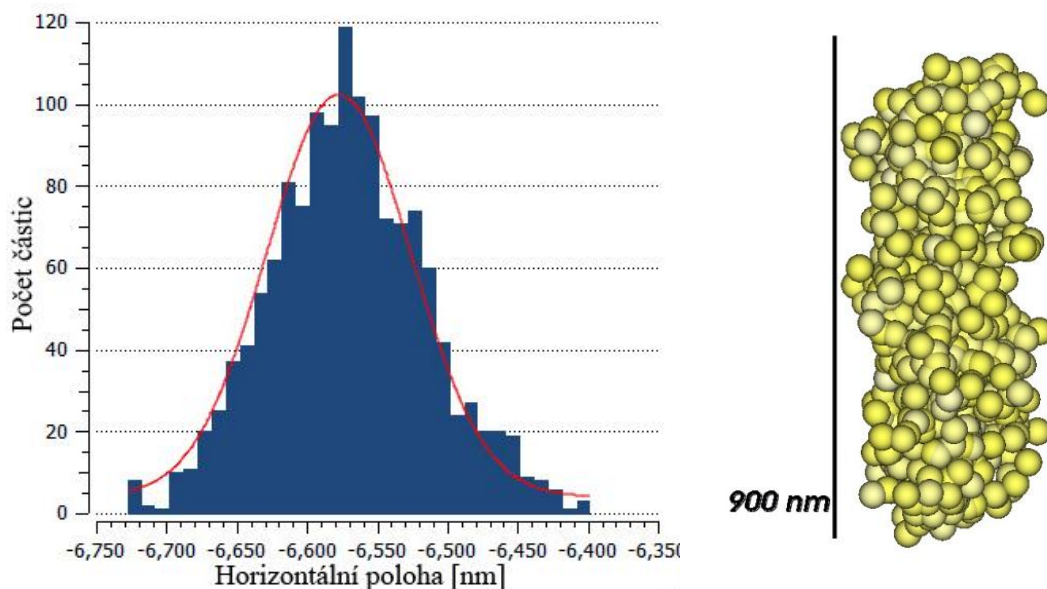
Buňky se kultivují na krycích sklech v DMEM bez glukózy. Do média jsme přidávali 3 mM glutaminu, 5% (v/v) fetální telecí sérum, 10 mM HEPES, 100 IU/ml penicilinu a 100  $\mu$ g/ml streptomycinu. Jako zdroje uhlíku jsme používali buď glukózu při dvou různých koncentracích (25 mM nebo 5 mM), nebo směs galaktózy (10mM) a glutaminu (2mM). Následně jsou vzorky vloženy do termostatu o teplotě 37°C, kde je vzduch zvlhčený a obsahuje 5 % CO<sub>2</sub>. Buňky jsou teoreticky schopny se množit libovolně dlouho, ale doporučuje se po patnácté pasáži buňky vyměnit za nové.

Normoxické buňky jsou kultivovány při normálním množství kyslíku (tj. 21 %). Hypoxické buňky mají množství kyslíku po určitou dobu snížené na 5 %, což u nich vyvolává stresovou situaci.

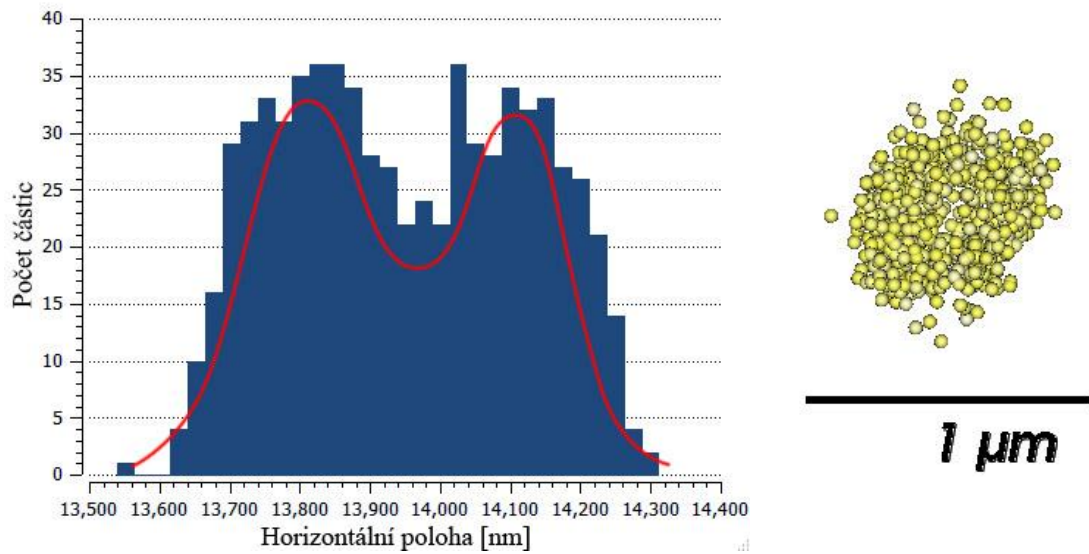
Z počátku řešení práce jsme při transfekci využívali transfekční činidlo x-tremeGENE 9 DNA. Transfekční účinnost byla dobrá,

ovšem buňky na činidlo špatně reagovaly. Scvrkávaly se a nepůsobily přirozeně. Proto jsme zkusili použít lipofectamin 2000, jehož účinnost se ukázala jen o trochu nižší, ale k buňkám je mírnější a ty jej lépe snáší.

Také jsme museli zajistit a ověřit, zda námi používaný lentivirální vektor (pLenti6.3/V5-DEST) opravdu vloží danou sekvenci na správné místo v DNA a zda je vzniklý protein vázán v mitochondriální membráně a ne jinde. Abychom byli schopni tuto skutečnost ověřit, museli jsme opět trochu vyladit software od Vutary. Pomocí histogramu polohy částic, jsme byli schopni určit, zdali je protein navázán na vnitřní nebo na vnější membráně. Jakmile je většina naměřených bodů uprostřed vlákna, jedná se o naměření vnitřní membrány. Pokud měříme vnější membránu, měla by být hustota bodů větší po okrajích. Tento jev je na obr. 29. a 30.



**Obr. 29. – Ověření rozložení mt-EOSu v mitochondriálním vlákně.** Histogram zachycuje rozložení počtu částic při jejich promítnutí do osy x. Největší hustota je ve středu vlákna, a to značí vaznost na vnitřní membránu.



**Obr. 30. – Ověření rozložení FIS-EOSu v mitochondriálním vlákně.** Histogram zachycuje rozložení počtu částic při jejich promítnutí do osy x. Největší hustota proteinu je po krajích, kde se na osu x promítne větší část povrchu válce, což svědčí o navázání proteinu na povrchu válce, tudíž na vnější membráně.

### 4.3 Metody zpracování dat

Ke zpracování výstupů ze softwaru Vutara SRX, Inc. využíváme program Amira od společnosti VSG (Visualization Sciences Group). Amira je software pro 3D analýzu a vizualizaci fyzikálních, chemických a biomedicínských dat a má široké pole působnosti. Její pole působnosti se rozšířilo v roce 2012, kdy společnost VSG skoupila FEI, jež je jedním z nejvýznamnějších výrobců elektronových mikroskopů.

Amira je velmi flexibilní, takže k vizualizaci naměřených dat a případně k určení rozměrů vláken můžeme využít výchozí data jak ve formátu csv, tak rastrových obrázků typu tiff. V průběhu zpracovávání se ukázalo, že pro mtEos, který slouží k zobrazování vnitřní membrány, je výhodnější vycházet z rastrových obrázků. Ovšem při analýze dat pro FIS-Eos, jež slouží k zobrazení vnější membrány, musíme používat výhradně data z formátu csv.

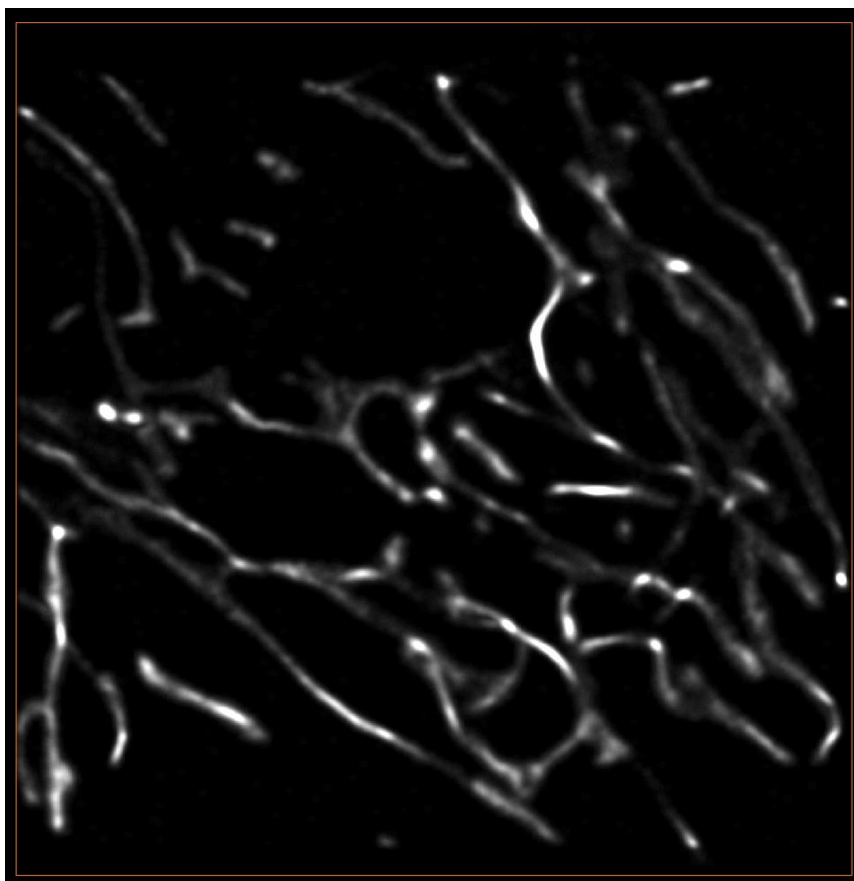
#### 4.3.1 Analýza rastrových obrázků

Nejprve si ukážeme analýzu dat získaných z rastrových obrázků, jež je použitelná pouze pro zobrazení vnitřní mitochondriální membrány (mt-Eos). Rozlišení exportu je nastaveno na 128 pixelů/ $\mu\text{m}$  v rovině XY a na 64 řezů v ose Z.

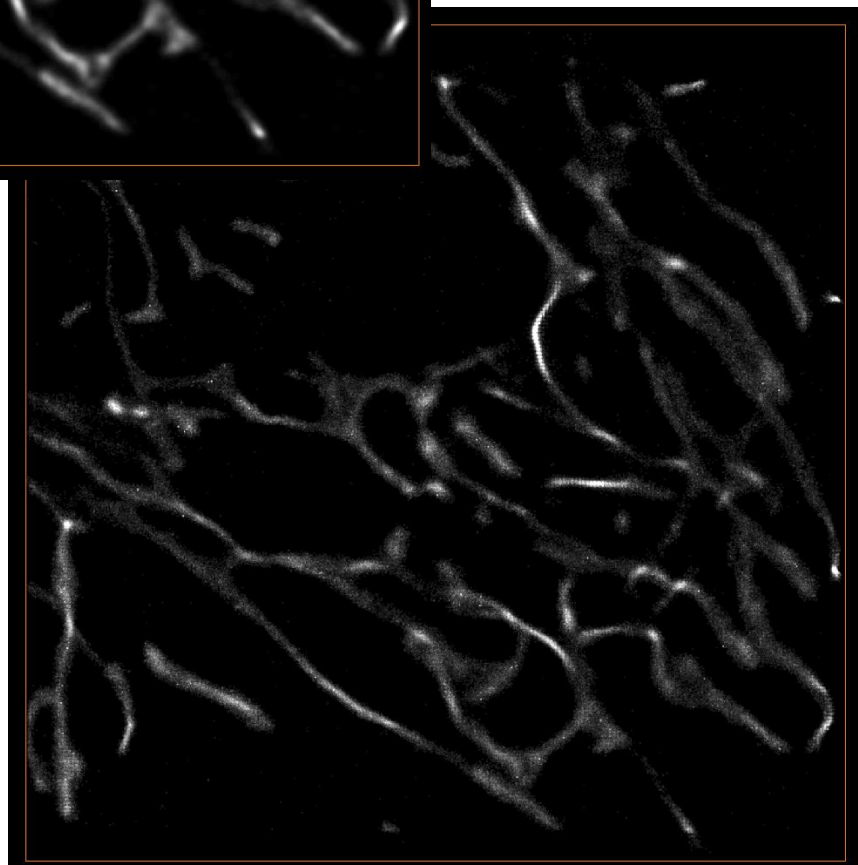
Při nahrávání obrázků do Amiry musíme zadat velikost jednoho voxelu. Voxel je obdoba pixelu, ale ve 3D. Tyto parametry nalezneme v textovém souboru, který je součástí každého exportu, a uvedeme reálné rozměry voxelu ve všech třech osách. Tento krok je velmi důležitý, protože při špatných rozměrech voxelu nám budou všechny výsledky vycházet špatně.

Na obrázky aplikujeme funkci Amiry, jež se jmenuje Gaussian smoothing. Jedná se o konvoluci obrazu s jádrem Gaussova filtru. Konvoluční jádro můžeme nastavit jako 2D nebo 3D. Poté nastavíme jeho velikosti v různých osách a aplikujeme na obrázky.





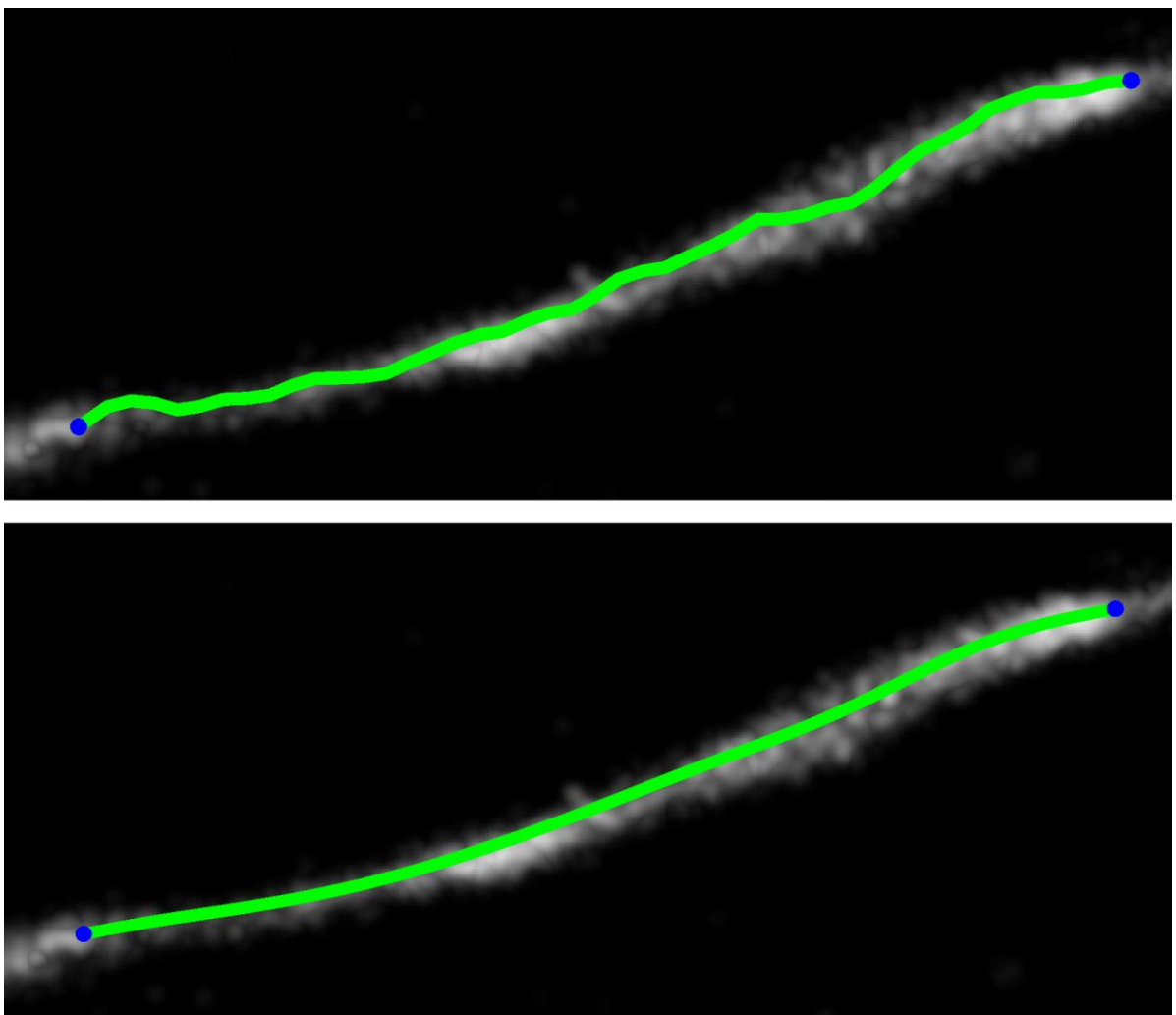
a)



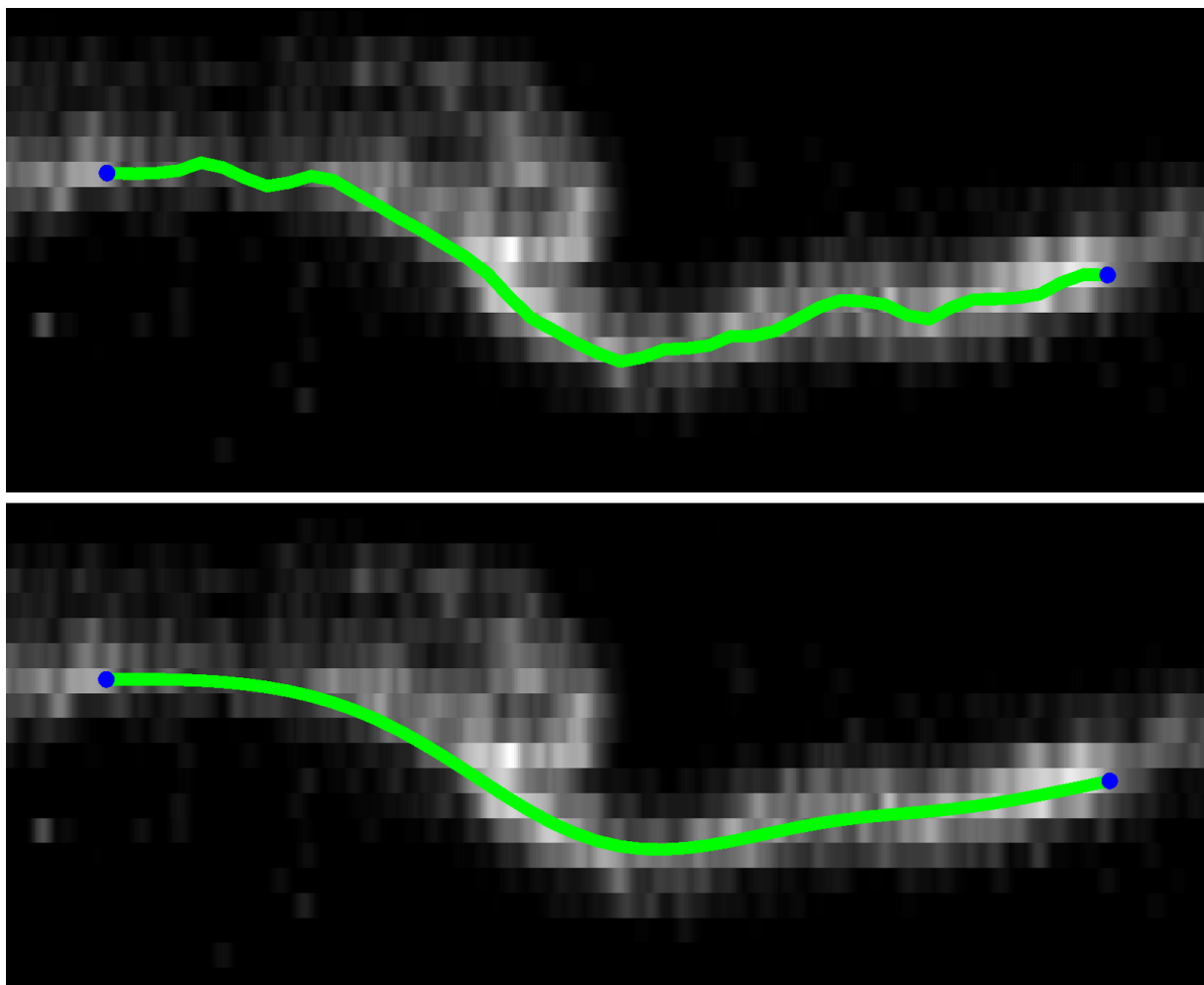
b)

**Obr. 31. – Srovnání naměřených dat a) po aplikaci funkce Gaussian smoothing, b) bez aplikace funkce Gaussian smoothing.**

Nyní přichází aplikace funkce, kterou nelze použít na data typu csv. Autoskeleton je modul zahrnující několik výpočetních operací. Nejprve se podle námi nastavené prahové citlivosti vypočítá mapa vzdáleností pro jednotlivé segmenty obrazu. Poté na základě poklesu intenzity světla je obraz rozdělen na jednotlivá vlákna. Tato kostra voxelů je přetransformována na finální objekt typu SpatialGraph. Tento objekt v sobě obsahuje informace o vzdálenostech hraničních bodů a můžeme pomocí nich určit tloušťku vláken. Můžeme využít funkci vyhlazení vláken.

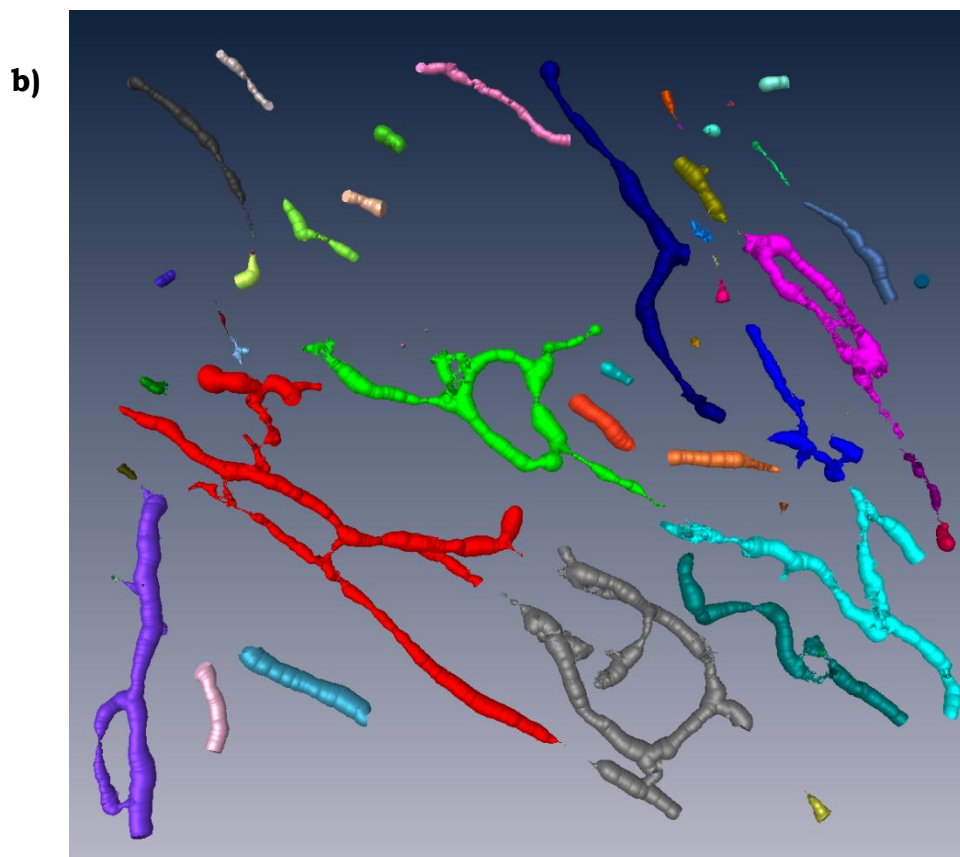
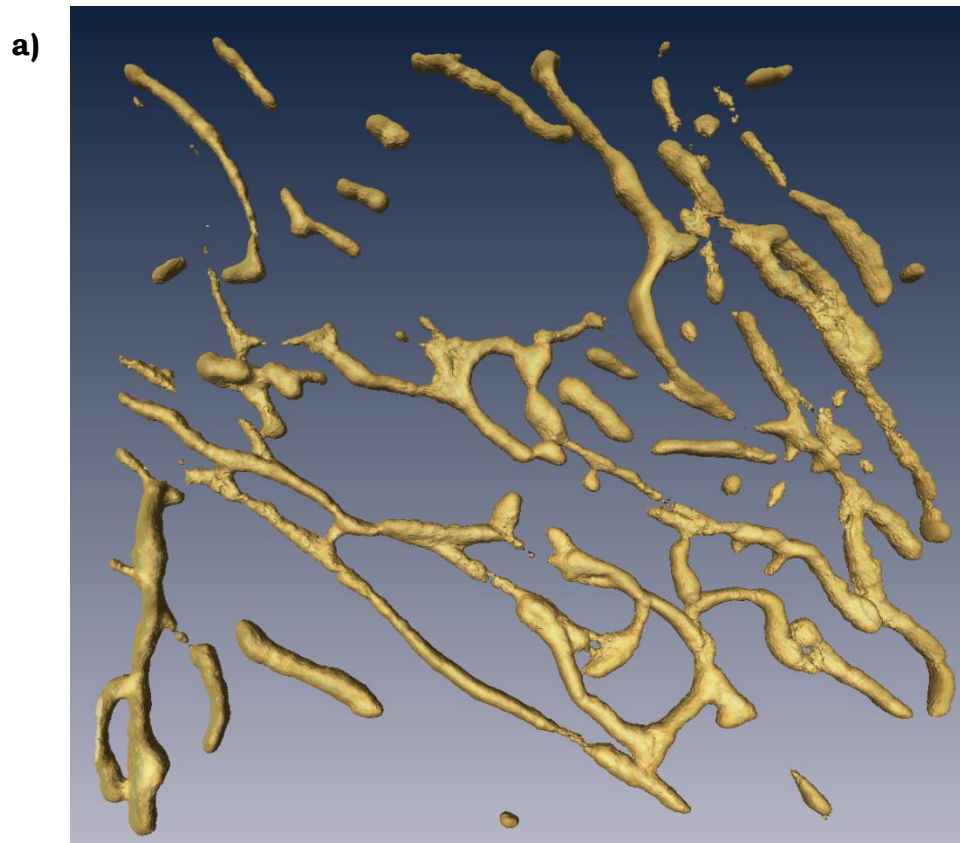


**Obr. 32. – Srovnání vyhlazené a nevyhlazené křivky modulu Skeleton v rovině XY.**



**Obr. 33. – Srovnání vyhlazené a nevyhlazené křivky modulu Skeleton v rovině xz.**

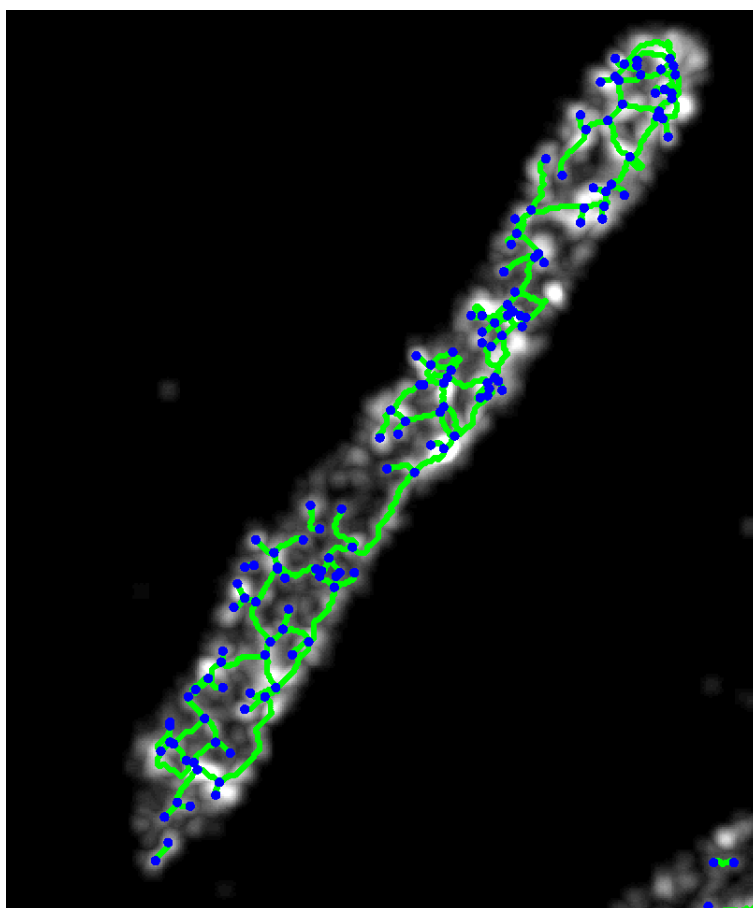
Nyní musíme jednotlivá vlákna identifikovat. K tomuto účelu Amira obsahuje speciální mód - filamenta editor. Výsledkem je tabulka obsahující střední délky a poloměry jednotlivých segmentů, celkovou délku, poloměr a objem vlákna. Pro určení poloměru v reálných jednotkách musíme nastavit tube scale faktor a jím poloměr vynásobit. Nastavení tohoto faktoru se provádí ručně a to tak, že porovnáme Autoskeleton a rastrové obrázky.



Obr. 34. – A) Grafické znázornění vláken z naměřených dat B) Separovaná vlákna pomocí filamenta editoru.

### 4.3.2 Analýza csv souborů

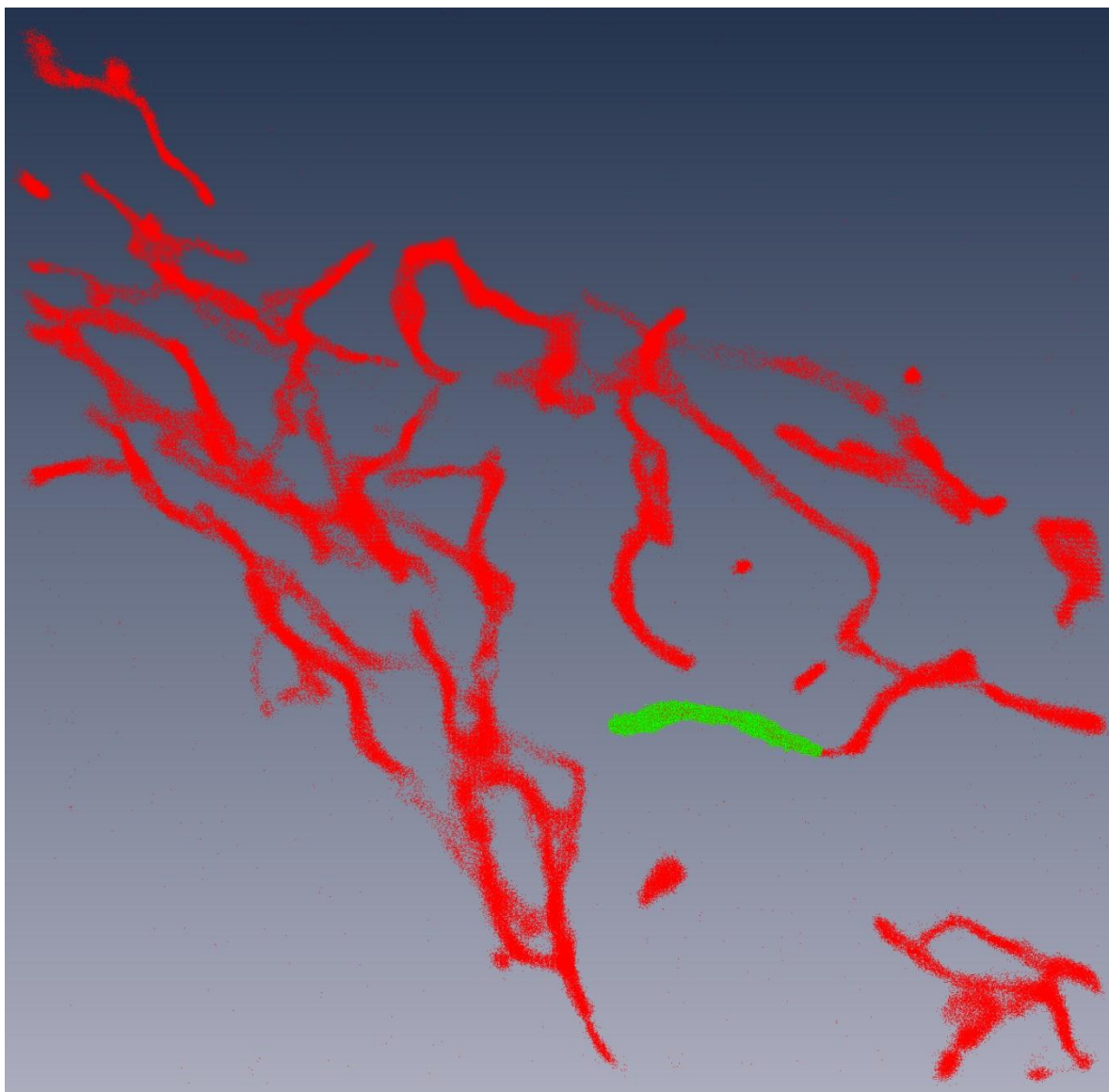
Ke zpracování měření mitochondrií barvených FIS-EOSem nemůžeme použít stejnou metodu jako při aplikaci mtEOSu. To z toho důvodu, že při aplikaci funkce Skeleton na rastrové obrázky dochází k hrubým nepřesnostem při segmentaci mapy vzdáleností. Zapříčinila to omezená využitelnost funkce Skeleton, která je zřejmě navržena ke zpracovávání pouze plných vláken a nikoliv dutých. Proto musíme ke zpracování dat z vnější mitochondriální sítě přistupovat jinak.



**Obr. 35. – Výsledek aplikace funkce Skeleton na data získaná za použití FIS-EOSu.**

Naměřená data můžeme exportovat z programu Vutara SRX i do excelovského souboru typu csv. Zpracování za pomoci csv souborů by měla být přesnější než při exportu dat do tiff obrázků, protože pracujeme přímo se souřadnicemi bodů a nejsme omezeni rozlišením.

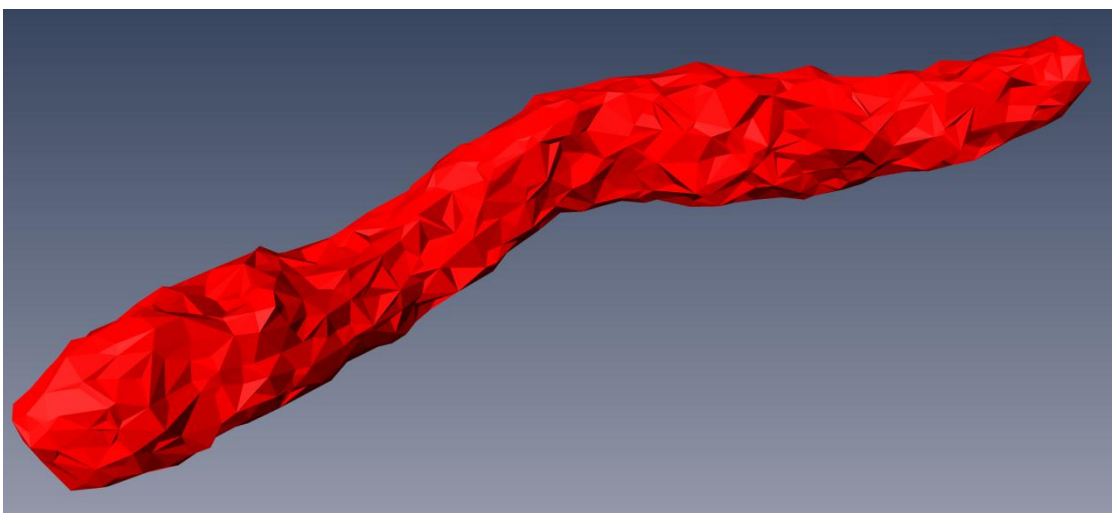
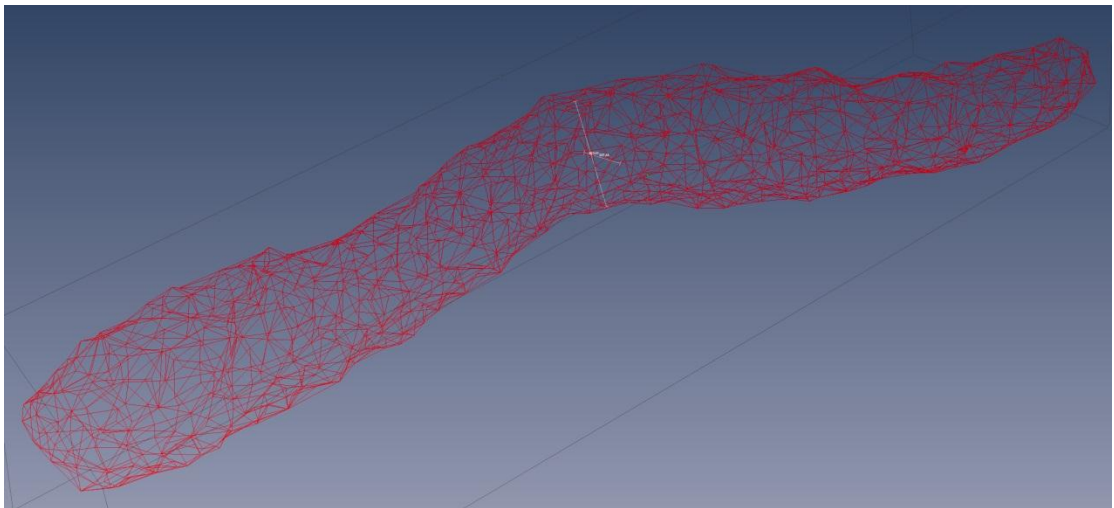
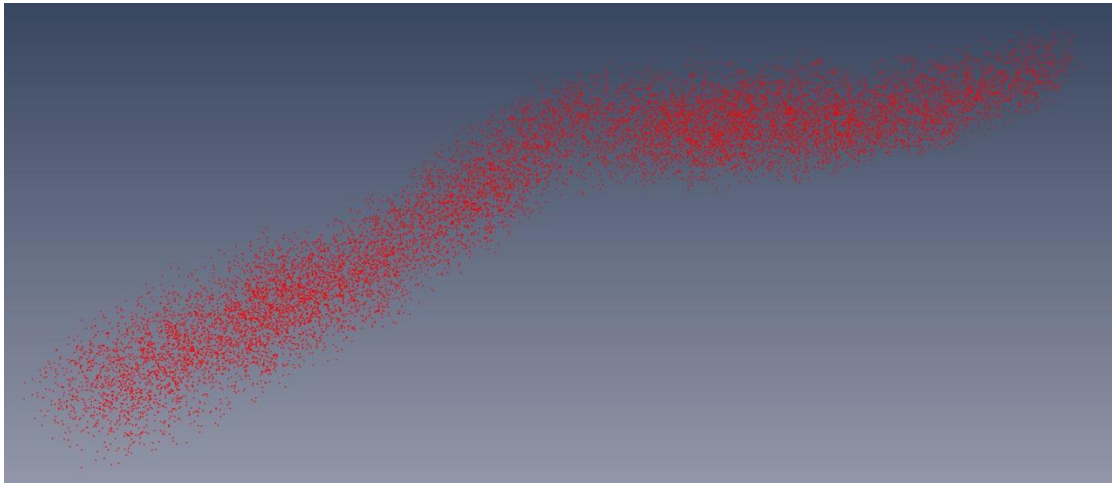
Zpracování opět budeme provádět v programu Amira Visage Imaging, Inc. Poté, co si převedeme csv soubor na formát, se kterým Amira lépe pracuje, vybereme si oblast bodů, jež tvoří námi zkoumané vlákno. Při tomto výběru můžeme eliminovat body, které zcela zřejmě nejsou součástí vlákna.



**Obr. 36. – Výběr oblasti zkoumání.**

Nyní využijeme funkci Point Wrap, jež nám „obalí“ vybrané body orientovanou nadpolchou trojúhelníků, která nám simuluje zkoumané vlákno. Když máme tuto nadplochu, program je schopen vypočítat její povrch a objem, jenž ohraničuje. Následující

obrázky zachycují přechod od bodů k orientované nadploše trojúhelníků.



**Obr. 37. – Tvorba orientované nadplochy a) naměřená data, b) tvorba sítě, c) celistvá nadplocha.**

Kvůli rozmazání v axiálním směru mají průřezy vláken tvar elipsy. Proto pro určení délky vlákna aproximujeme vlákno na válec, jehož podstavou je elipsa. Nyní si vybereme několik úseků vlákna a změříme délku hlavní a vedlejší osy elipsy. Stanovíme si průměrnou hodnotu délky hlavní a vedlejší osy a pak si určíme jejich poměr  $x$ .

$$x = \frac{a}{b} \quad (15)$$

$a$  je délka hlavní poloosy a  $b$  je délka vedlejší poloosy.

Protože známe objem a plochu vlákna, vycházíme ze vzorců pro jejich výpočet, kde ovšem vystupují tři neznámé  $a$ ,  $b$ ,  $l$ . Abychom se jedné z nich zbavili, zavedli jsme poměr poloos  $x$ .

$$V = \pi a b l \quad (16)$$

$l$  je délka válce  $a$  je délka hlavní poloosy a  $b$  vedlejší.

Vztah pro plochu válce s eliptickou podstavou bude trochu komplikovanější:

$$S = 2\pi ab + o_{eli} l \quad (17)$$

Obvod elipsy  $o_{eli}$  si můžeme určit pomocí eliptického integrálu, anebo součtem nekonečné řady.

$$o_{eli} = 2\pi a \left[ 1 - \left(\frac{1}{2}\right)^2 \varepsilon^2 - \left(\frac{13}{24}\right)^2 \frac{\varepsilon^4}{3} - \left(\frac{135}{246}\right)^2 \frac{\varepsilon^6}{5} - \dots \right] \quad (18)$$

$a$  je délka hlavní poloosy a  $\varepsilon$  je číselná excentricita, pro kterou platí:

$$\varepsilon^2 = \frac{e^2}{a^2} = 1 - \frac{b^2}{a^2} = 1 - \frac{1}{x^2} \quad (19)$$

V našem případě jsme se spokojili s částečným součtem do 4. řádu. Když si z rovnice (16) vyjádříme délku a dosadíme do vztahu



(17) a následně dosadíme i obvod elipsy, dostáváme kubickou rovnici pro délku hlavní poloosy  $a$ .

$$2\pi \frac{1}{x^2} a^3 - \frac{S}{x} a + 2V \left[ 1 - \left(\frac{1}{2}\right)^2 \left(1 - \frac{1}{x^2}\right) - \left(\frac{13}{24}\right)^2 \frac{\left(1 - \frac{1}{x^2}\right)^2}{3} - \left(\frac{135}{246}\right)^2 \frac{\left(1 - \frac{1}{x^2}\right)^3}{5} \right] = 0 \quad (20)$$

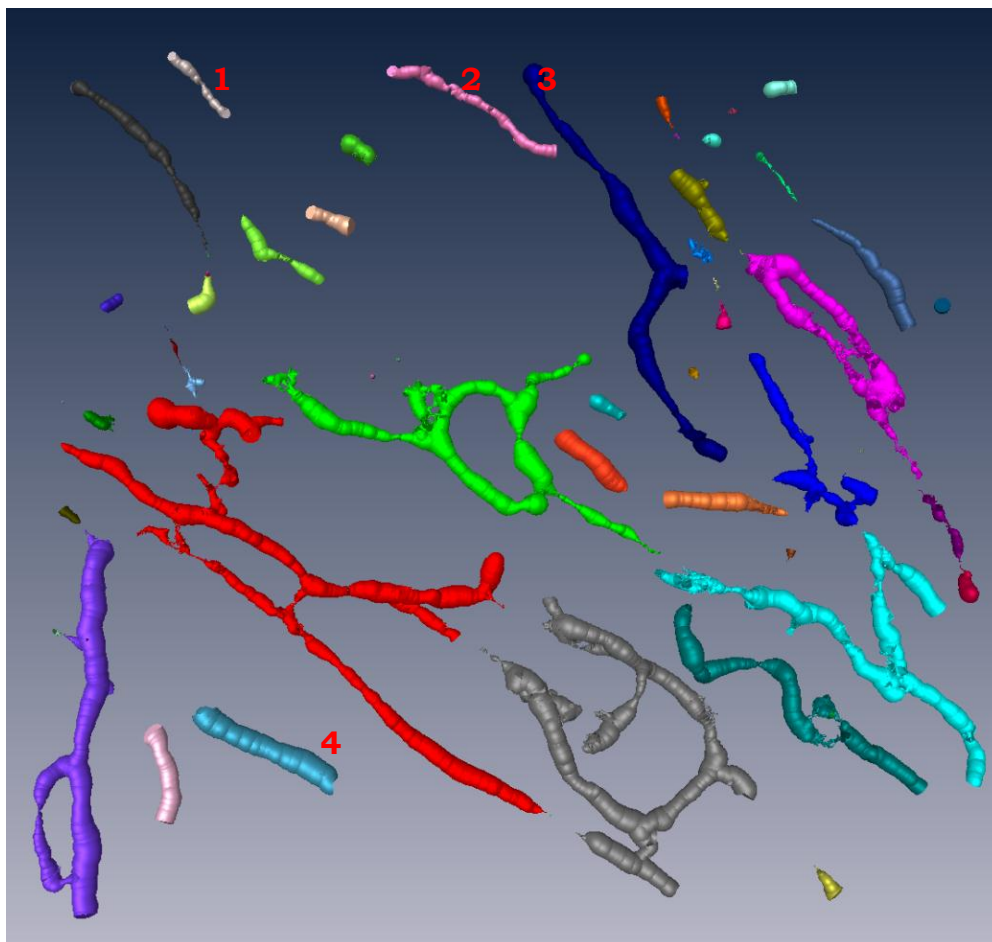
Teď jsme schopni si určit délku hlavní a vedlejší poloosy, při zachovaném poměru a délku celého vlákna.

## 5 Výsledky

Nyní si ukážeme aplikaci výše zmíněných metod na námi pořízená data.

### 5.1 Vnitřní membrána

Nejprve se zaměříme na zobrazování vnitřní mitochondriální membrány. K jejímu značení využíváme mtEOS a získaná data exportujeme v podobě rastrových obrázků a aplikujeme první metodu. Výsledný obraz je na obr. 38. Vybrali jsme si čtyři vlákna, u kterých jsme vypočítali fyzikální parametry. Ty jsou značeny čísly 1 až 4.



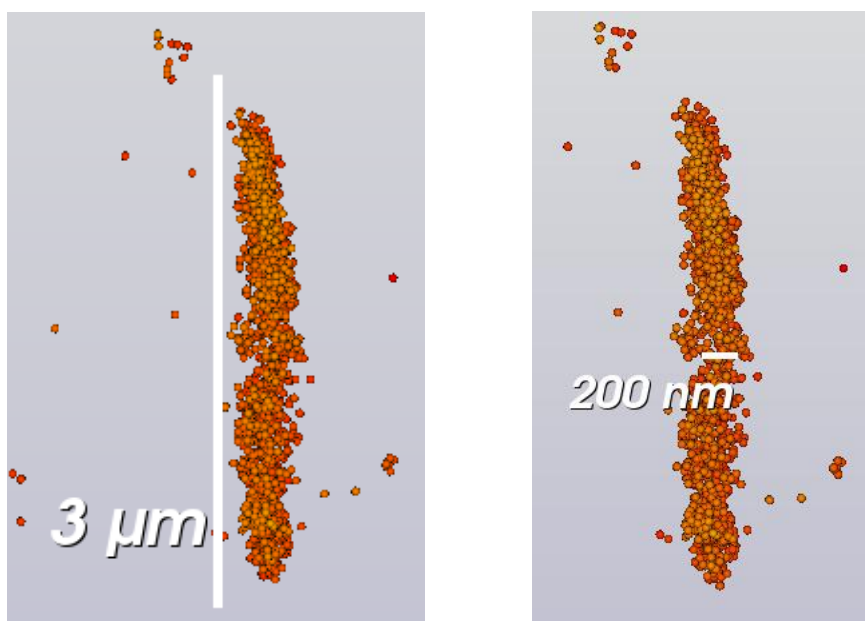
Obr. 38. – Separovaná vlákna pomocí filamenta editoru.

Hodnoty, které jsou určeny modulem Autoskeleton, jsou zaznačeny v tab. 1.

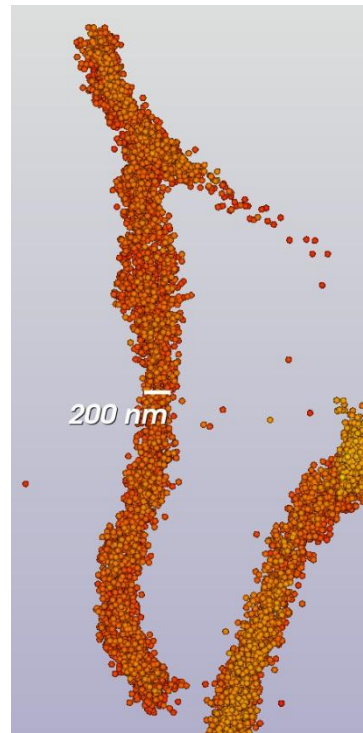
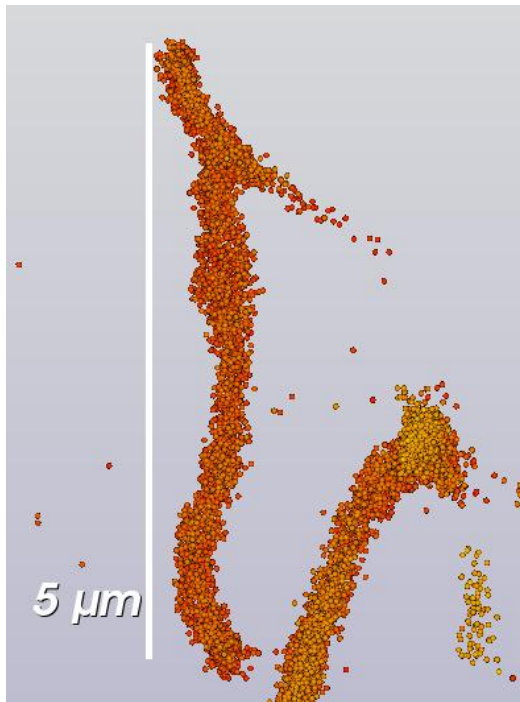
Vlákno	Poloměr	Scale faktor	Poloměr [nm]	Délka [ $\mu\text{m}$ ]
1	60,0	1,73	103,8	3,05
2	84,8	1,89	160,3	7,64
3	133,3	1,64	218,6	20,81
4	216,9	1,54	334,0	4,66

**Tab. 1. – Fyzikální parametry mitochondriálních vláken značených mtEOS metodou rastovaných obrázků.** Data získaná z Amiry jsou v prvních dvou sloupcích. Skutečné rozměry vláken jsou v posledních dvou sloupcích.

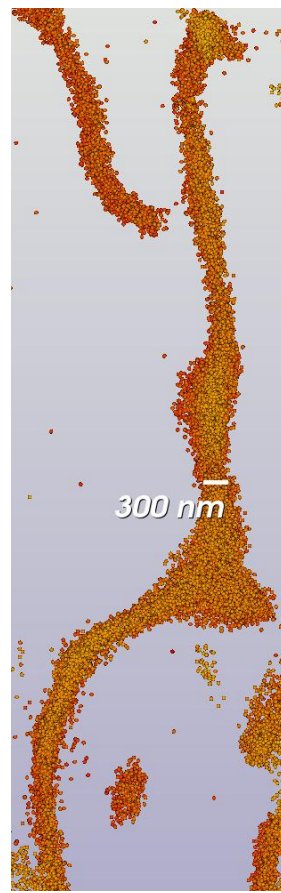
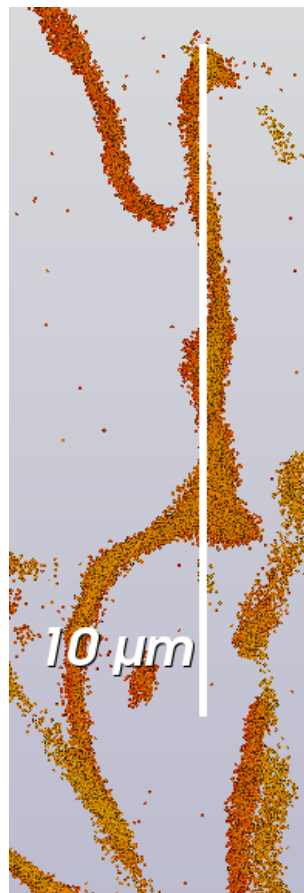
Na následujících obrázcích jsou náhledy na naměřená data v programu Vutara SRX, abychom byli schopni porovnat vypočítané hodnoty s naměřenými. Program neumožňuje provádět dvě měření souběžně, a proto jsou všechna vlákna zobrazena dvakrát, nejprve při měření délky a následně pak i šířky.



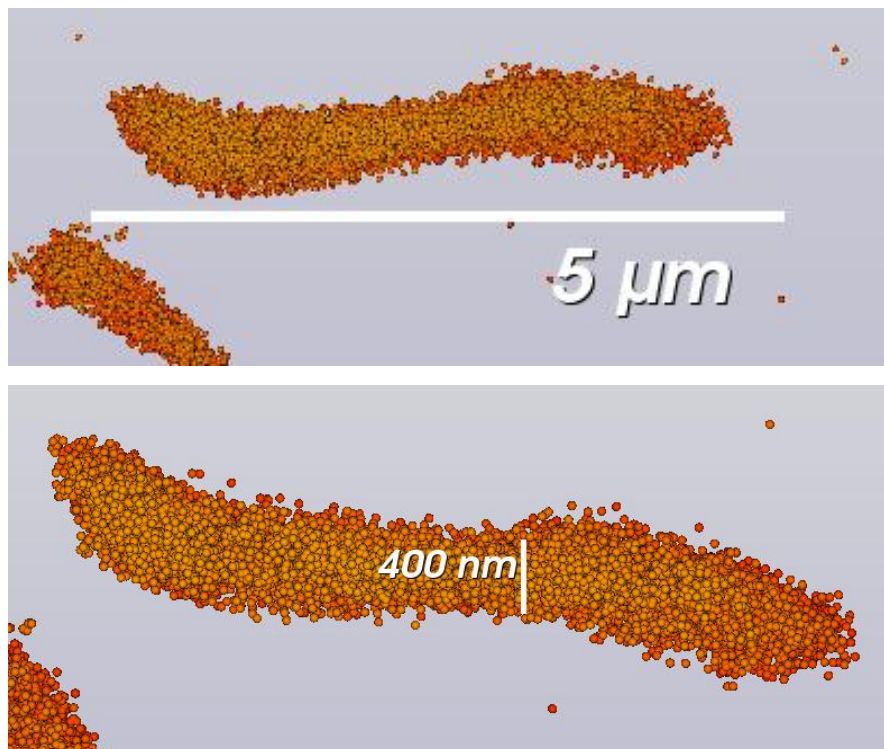
**Obr. 39. – Délka a šířka vlákna 1 z programu Vutara SRX.**



Obr. 40. – Délka a šířka vlákna 2 z programu Vutara SRX.



Obr. 41. – Délka a šířka vlákna 3 z programu Vutara SRX.

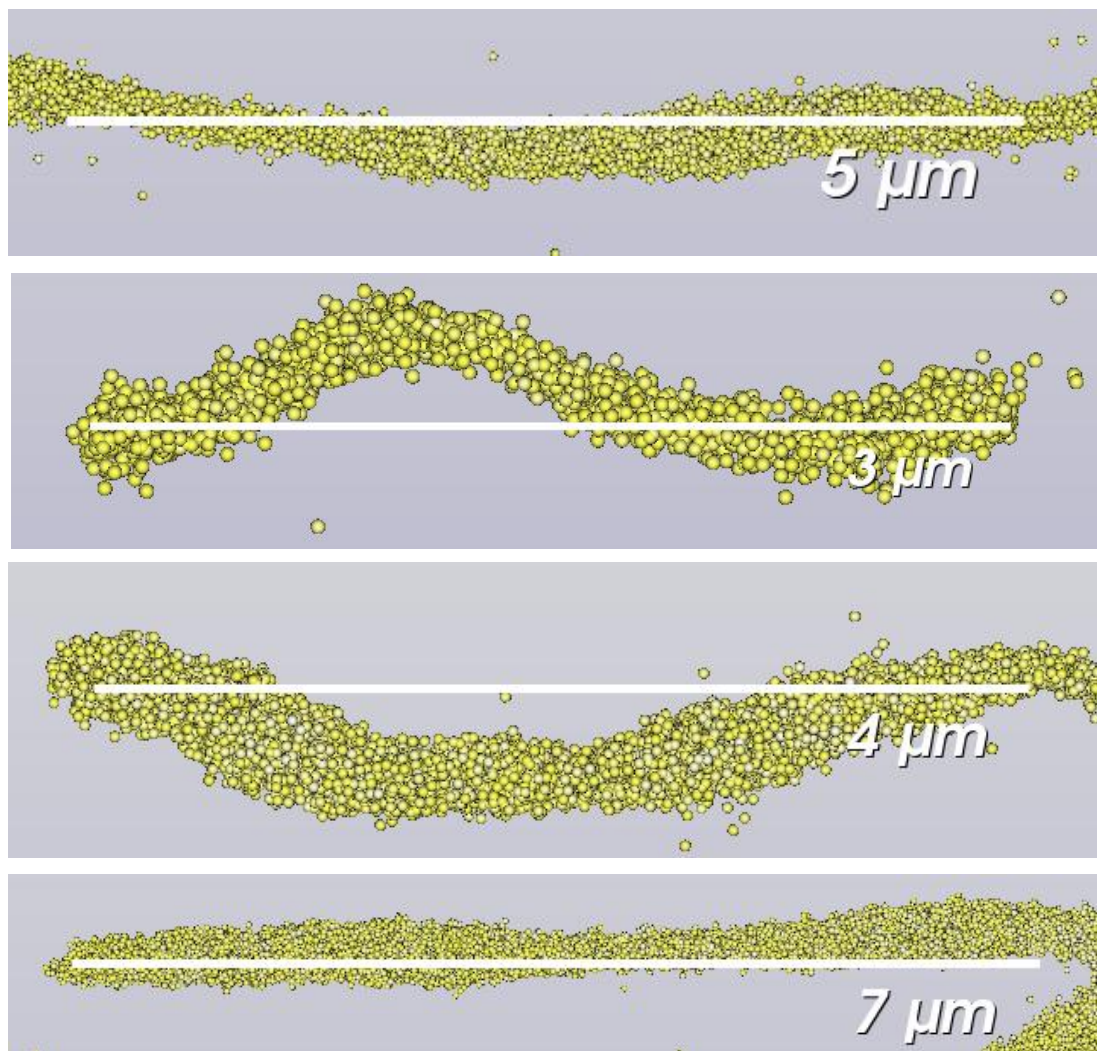


**Obr. 42. – Délka a šířka vlákna 4 z programu Vutara SRX.**

Při porovnání vypočítaných údajů a změřených údajů v softwaru docházíme k předpokladu, že tato metoda je přesnější při určování rozměrů užších a kratších vláken. K obdobnému závěru jsme dospěli i při aplikaci metody na několik málo cytoskeletálních aktinových vláken, jejichž tloušťka se pohybovala okolo 7 nm. Tento předpoklad není zatím doložen dostatečným počtem dat pro statistické vyhodnocení.

## 5.2 Vnější membrána

Určení parametrů mitochondriálních vláken pomocí markerů pro vnější membránu provedeme na čtyřech vláknech, která jsou na obr. 43.



Obr. 43. – Délka vláken 1 - 4 z programu Vutara SRX.

	V [ $\mu\text{m}^3$ ]	S [ $\mu\text{m}^2$ ]	a <sub>změr</sub> [nm]	b <sub>změr</sub> [nm]	x	a <sub>vypoč</sub> [nm]	b <sub>vypoč</sub> [nm]	l [nm]
1	0,4491	6,2255	240	116	2,066	235	114	5324
2	0,2157	4,0642	117	103	1,131	115	102	5840
3	0,5683	6,6272	250	119	2,102	287	136	4626
4	1,3912	14,041	316	196	1,608	268	166	9944

Tab. 2. – Fyzikální parametry mitochondriálních vláken metodou csv souborů.

V druhém a třetím sloupci jsou objem a povrch, které získáme z Amiry. Ve čtvrtém a pátém sloupci jsou změřené poloosy a v šestém je jejich poměr. V posledních třech sloupcích jsou vypočítané hodnoty poloos a délka vlákna.

Vypočítané fyzikální veličiny pro vlákna 1 a 3 se shodují s naměřenými hodnotami z Vutary SRX. U vlákna 2 je patrná odchylka při určení délky, i když přihlédneme k zakřivení vlákna. U vlákna 4 pozorujeme již znatelnou odchylku od naměřené hodnoty, přestože je vlákno rovné. U této metody jsme doposud nevyozorovali žádnou souvislost velikosti chyby a tloušťky vlákna, jak tomu bylo u první metody.

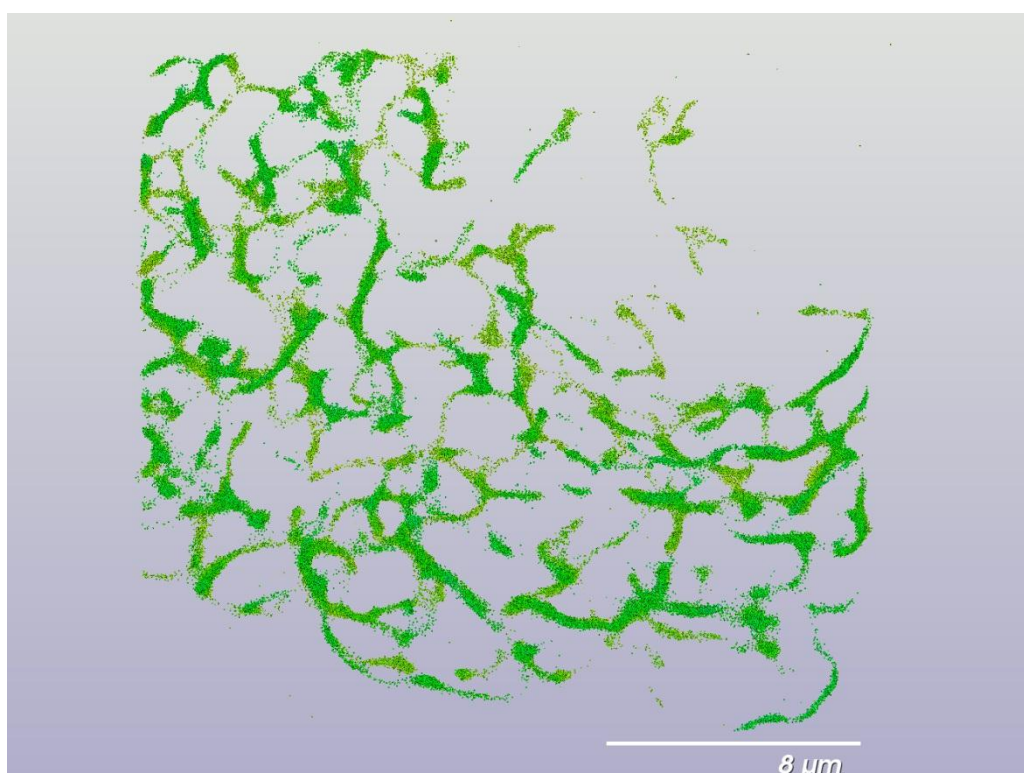
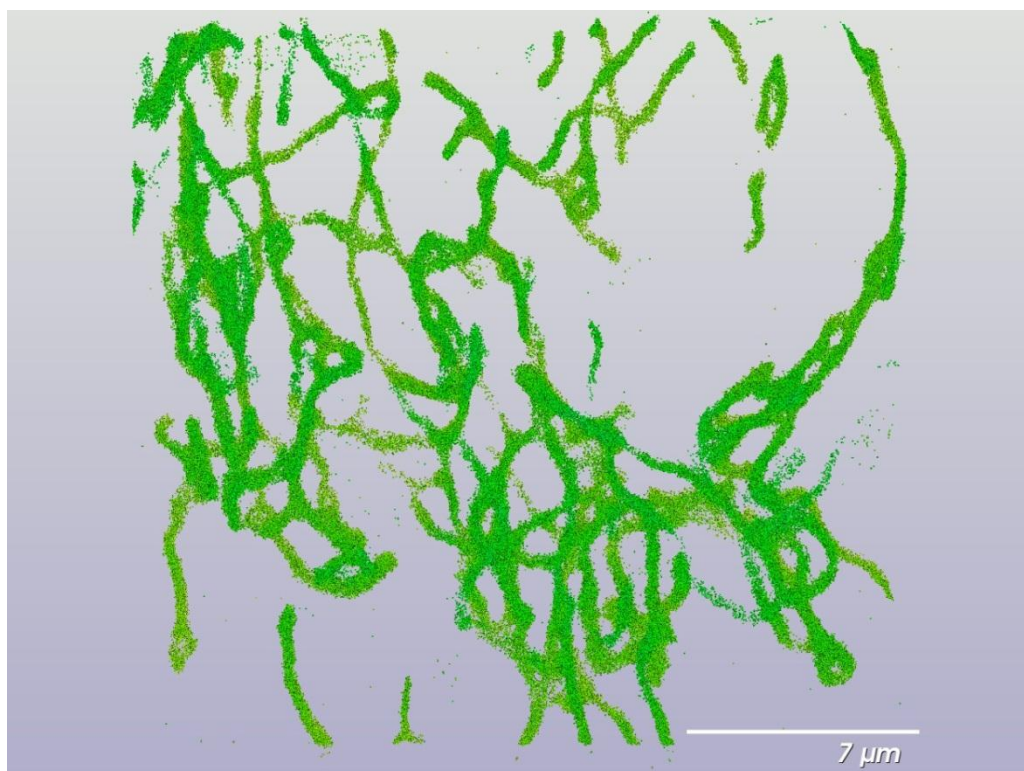
### **5.3 Zobrazování endoplazmatického retikula**

Při stanovování cílů práce jsme plánovali zobrazování endoplazmatického retikula jaterních buněk. V průběhu řešení tohoto úkolu jsme ovšem nebyli schopni naleznout vhodný fluorescenční protein, díky kterému bychom ER byli schopni zobrazit.

Očekávali jsme, že se nám podaří zobrazit ER s velkým rozlišením a byli bychom schopni pozorovat jednotlivé jeho záhyby. Toto očekávání jsme nepřímo vyvrátili pomocí zobrazování vnitřní mitochondriální sítě, kde se nám také nepodařilo zobrazit jednotlivé kristy, které mají přibližně srovnatelnou velikost. Tato skutečnost je patrná na obr. 35 – 36 a 43.

### **5.4 Hypoxické vs. normoxické buňky**

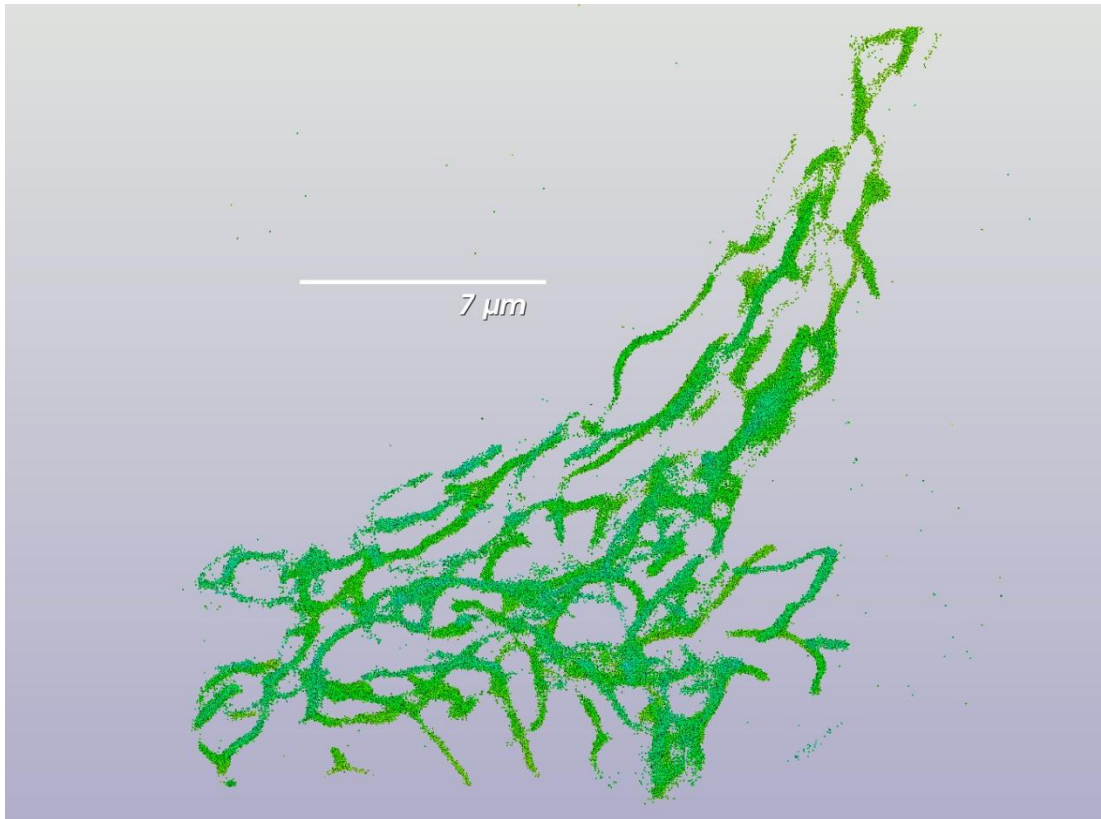
V průběhu řešení diplomové práce se náš cíl zkoumání mírně rozšířil. Všimli jsme si totiž, že na fyzikální parametry mitochondriální sítě i na její spojitost mají značný vliv stresové podmínky při kultivaci. Naší modelovou situací, pro vyvolání stresu bylo omezení množství kyslíku. Dle průběžných výsledků, jež ještě nejsou podloženy dostatečným statistickým souborem dat, vše ukazuje na tendenci zužování a shlukování až trhání sítě, v prvních minutách po vložení do prostoru s menším množstvím kyslíku, viz obr. 44.



**Obr. 44. – Srovnání mitochondriální sítě buňky normoxické (horní) a buňky po 2 hodinách v hypoxii (dolní), které byly kultivovány společně.**

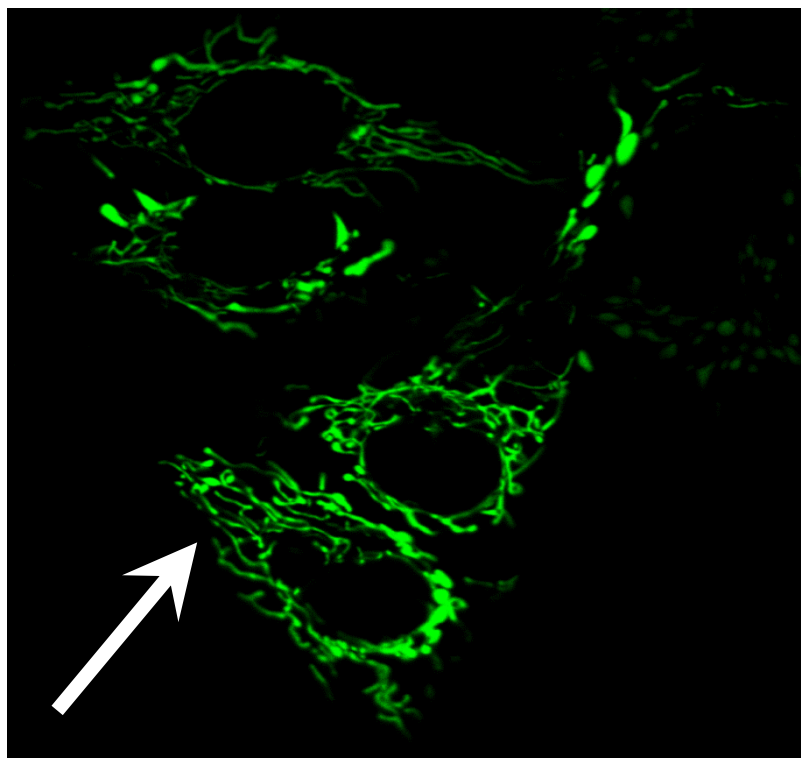


Když ovšem necháme buňku v hypoxii déle, dojde k něčemu, co bychom nazvali adaptací na snížené množství kyslíku. Mitochondrie se přestanou shlukovat a opět vytvoří síť. Ta je ovšem jemnější než u normoxické buňky, viz obr. 45.

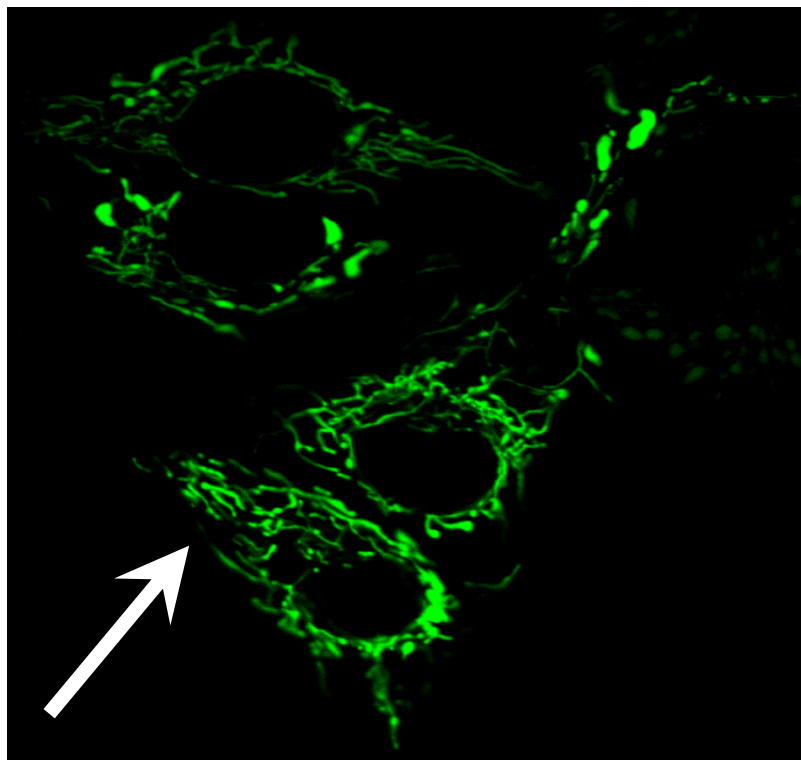


**Obr. 45. – Znovu obnovení mitochondriální sítě po 3 dnech v hypoxii.**

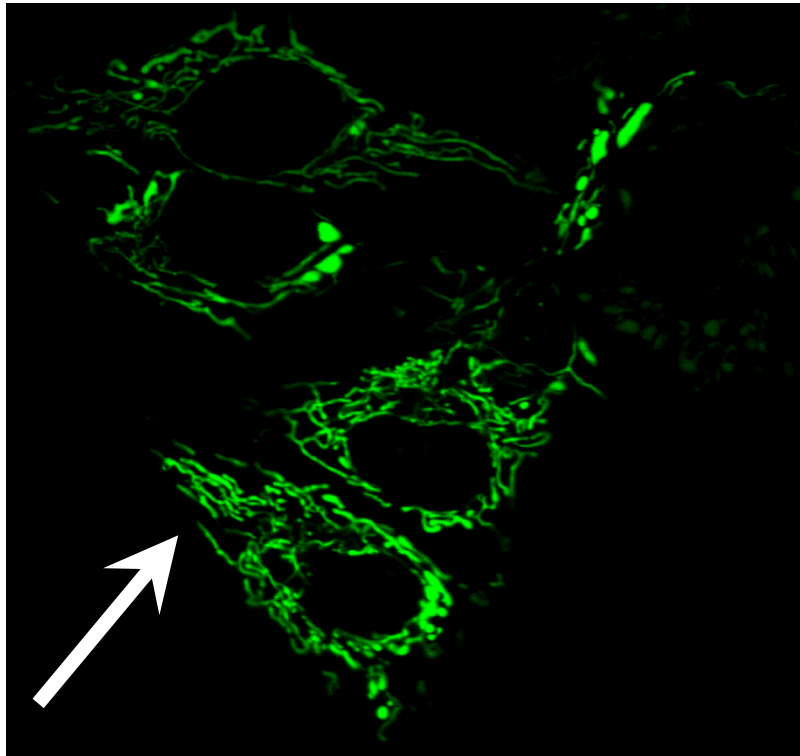
Protože při FPALM jsou buňky fixované, nemůžeme sledovat působení hypoxie postupem času na jedné a téže buňce. Z tohoto důvodu jsme využili fluorescenční konfokální mikroskop, který je opatřen hypoxickým boxem. Ten nám umožňuje měření fluorescence při hypoxii. Konfokální mikroskop sice nemá pod difrakční rozlišení, ale mitochondriální síť je i tak zřetelná. Na obr. 46 – 50. si všimněme sítě dolní buňky (vyznačena bílou šipkou). Z počátku je opravdu tvořena menším počtem tlustších a kompaktnějších vláken. Na posledním snímku (obr. 50) je již síť značně potrhaná na menší segmenty.



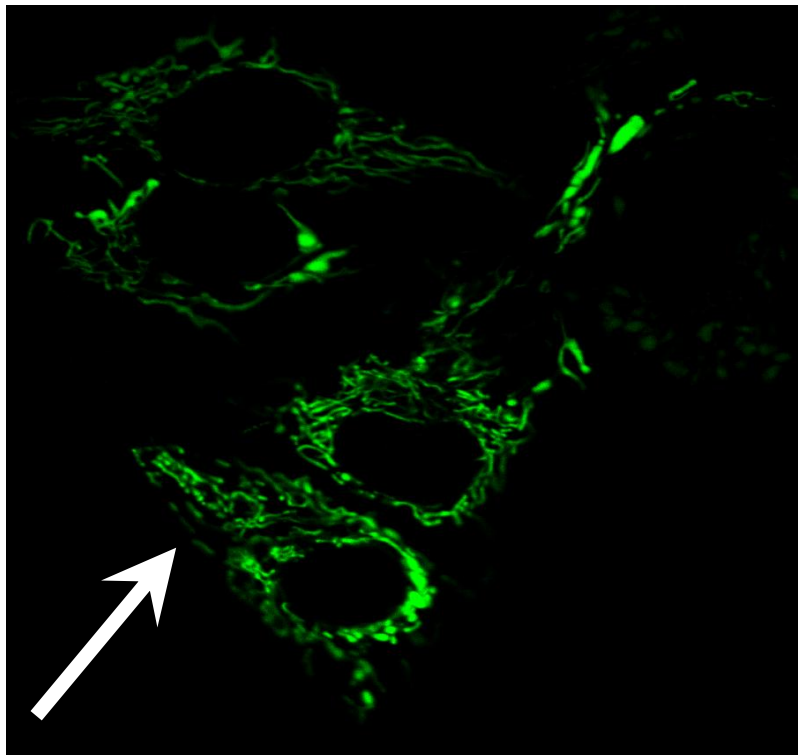
**Obr. 46. – Snímek z konfokálního mikroskopu čtyř hepatocytů v normoxickém stavu.** Mitochondriální síť je spojitá a jednotlivá vlákna jsou relativně tlustá.



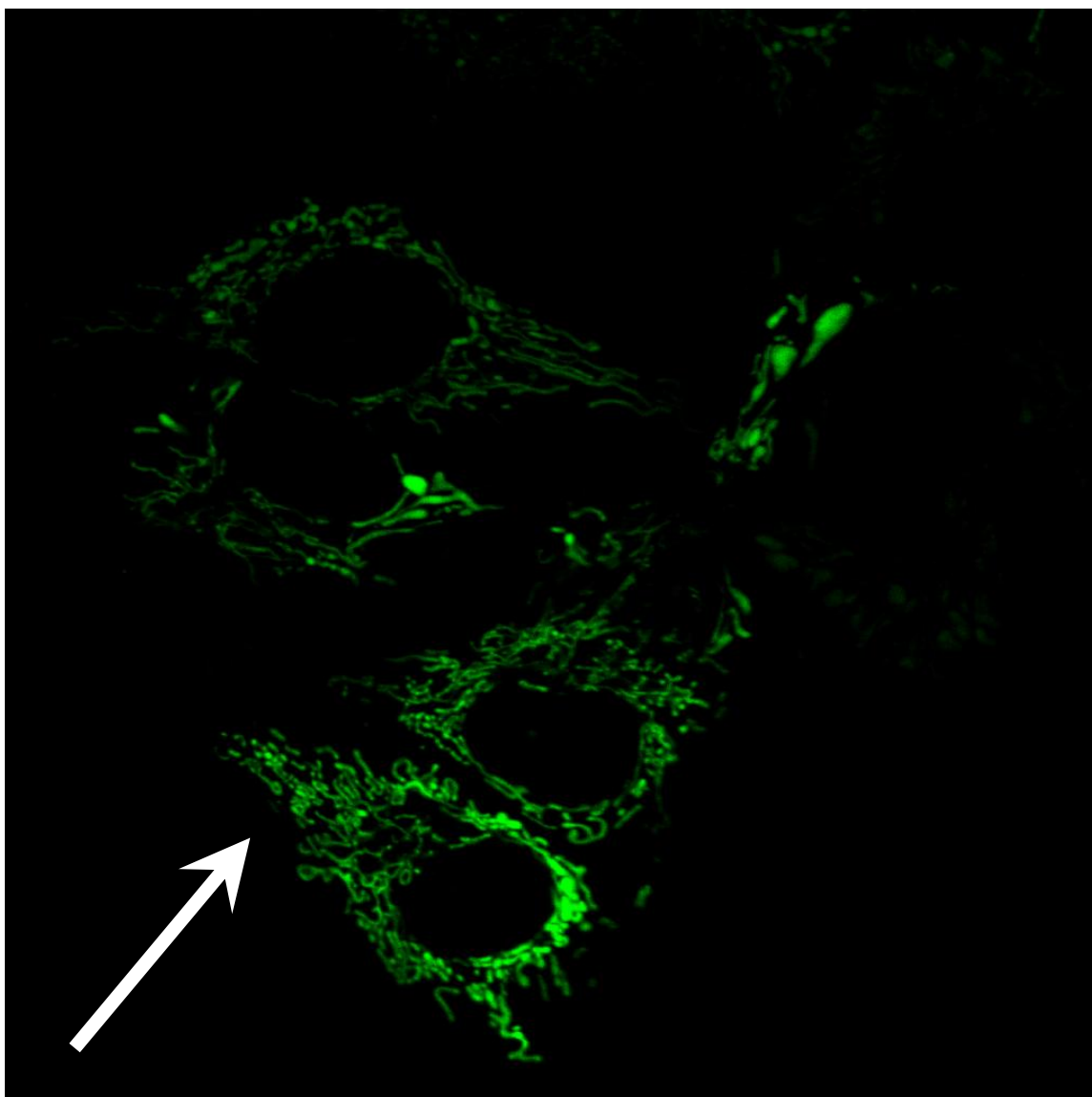
**Obr. 47. – Snímek z konfokálního mikroskopu čtyř hepatocytů po 5 minutách v hypoxii.** Nejsou patrné žádné výrazné změny ve struktuře mitochondriální sítě.



**Obr. 48. – Snímek z konfokálního mikroskopu čtyř hepatocytů po 20 minutách v hypoxii.** Mitochondriální síť se začíná pozvolna shlukovat v malé chomáčky a mírně trhat.



**Obr. 49. – Snímek z konfokálního mikroskopu čtyř hepatocytů po 30 minutách v hypoxii.** Mitochondriální síť je již více potrhána.



**Obr. 50. – Snímek z konfokálního mikroskopu čtyř hepatocytů po 75 minutách v hypoxii. Mitochondriální síť je velmi potrhaná a vzniklé chuchvalce jsou úzké.**

## 5.5 Dvojbarevné zobrazování

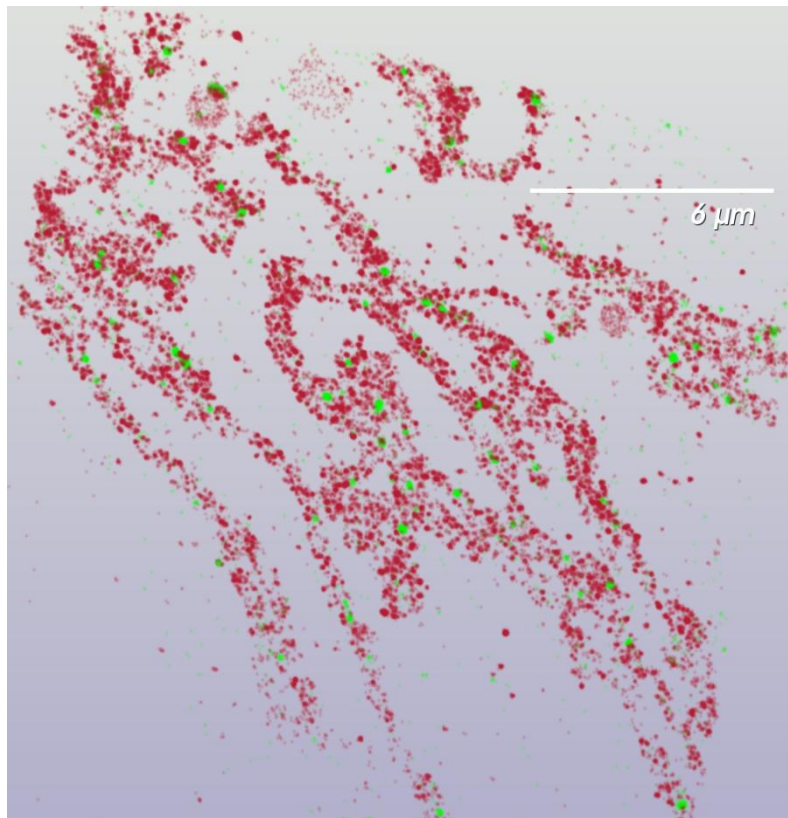
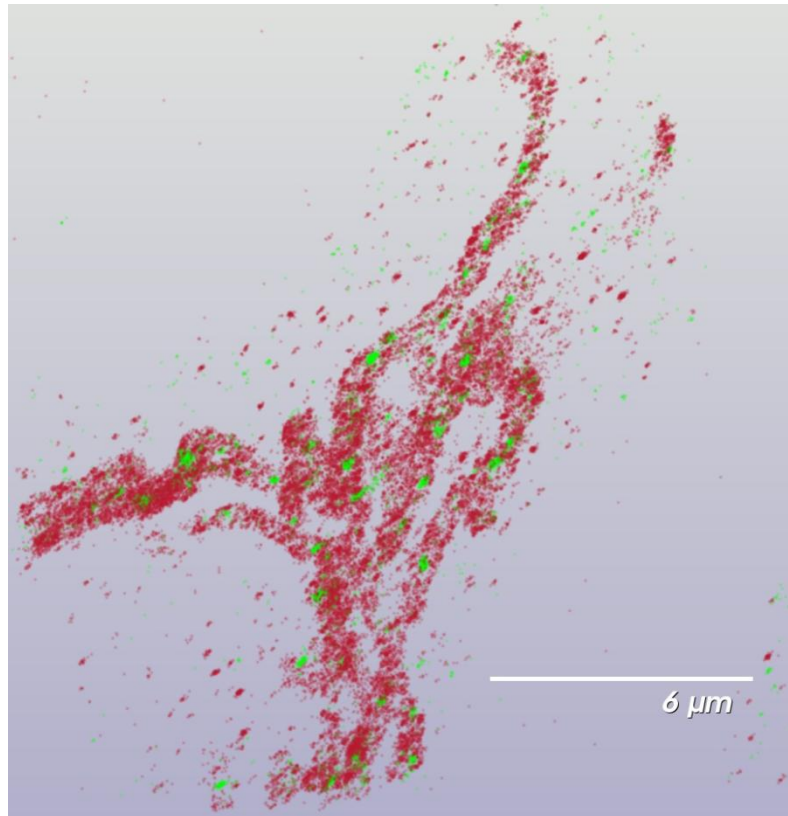
Po neúspěšném pokusu naleznout fluorescenční protein pro označení endoplazmatického retikula, jsme se začali zabývat využitím možností simultánního nebo sekvenčního dvojbarevného zobrazování, které náš mikroskop umožňuje.

Simultánní zobrazování lze aplikovat pouze na proteiny, jejichž hlavní emisní pásy se nepřekrývají. A to z toho důvodu, že se nejprve snímá jeden cyklus při emisi prvního proteinu a následně se snímá jeden cyklus emise druhého proteinu. Těchto cyklů jsou při měření řádově stovky až tisíce.

Oproti tomu sekvenční zobrazování se využívá u proteinů, jejichž emisní pásy se překrývají. Nejprve se snímají všechny cykly prvního proteinu, který musíme úplně vysvítit (vybělit) a teprve potom můžeme začít zobrazovat druhý protein.

Doposud se nám podařilo vcelku úspěšně použít sekvenční metody, protože naše proteiny mají velmi podobné emisní spektrum. Pro dvojbarevné zobrazování jsme používali sekvenci na bázi proteinu EOS (SSB EOS P1) pro značení vnější mitochondriální sítě a TIM23 A647 na bázi proteinu Alexa 647 pro značení nukleoidů.

Výsledky těchto našich pokusů jsou na obr. 51.



**Obr. 51. – Dvojbarevné zobrazení vnější mitochondriální membrány (červeně) a nukleoidu (zeleně).**

## 6 Diskuze

Pro určení rozměrů mitochondriálních vláken, která mají obarvenou vnitřní membránu, jsme objevili metodu, jež je jednoduchá a rychlá. Jelikož nevycházíme z aproximace vlákna na válec, můžeme zpracovávat různě klikatá vlákna, jejichž průměr je značně proměnlivý, a chyba určení průměru a délky vlákna by neměla být značně velká. Tento předpoklad není ovšem potvrzený dostatečně velkým statistickým souborem dat a jak jsme si ukázali na příkladu, významnou roli může sehrát i schopnost programu zpracovávat tlustá a tenká vlákna, u nichž může docházet ke značným odchýlkám. Nevýhodou této metody je také to, že pracujeme s rastrovými obrázky, které mají omezenou přesnost. Tato přesnost je menší než při práci s přímo naměřenými daty.

Podíváme-li se nyní na metodu pro zpracování vláken s barvenou vnější membránou, zjistíme, že je značně nepohodlná. Jednak není téměř vůbec automatizována a člověk musí ručně vybírat oblasti zájmu a měřit délky poloos, ale také hlavně kvůli předpokladu, že aproximace vlákna na válec není dobře použitelná pro jiná vlákna než s nepříliš proměnlivým poloměrem. I když jsme se snažili vymyslet jednodušší metodu s aplikací jiných programů než Amiry, bohužel se nám nepodařilo naleznout žádnou elegantnější metodu, u které bychom mohli její výsledky považovat za použitelné. Ovšem pro vlákna s přibližně konstantním poloměrem se jeví jako velmi přesná. Také musíme podotknout, že množství zpracovaných dat nelze považovat za dostatečné k učinění jednoznačného závěru.

Taktéž způsob kultivace a především transfekce nám zpočátku velmi ovlivňoval výsledky měření. Od doby, kdy jsme začali používat lipofektamin jako transfekční činidlo, se buňky jeví jako stálé a změna jejich tvaru a účinnost transfekce už pro nás

nepředstavují takové problémy jako v počáteční fázi hledání vhodného postupu.

Při studiu tvaru mitochondriálních sítí ve stresových situacích jsme zjistili, že biplane FPALM není optimální metodou k jejich zkoumání. Především z toho důvodu, že neumožňuje sledovat změny sítě v čase. Také proces jejich náhodného růstu u každé buňky dělá toto studium velmi obtížným. Opět bychom museli mít k dispozici velký statistický soubor dat, abychom mohli udělat závěry vlivu stresových situací na tvar mitochondriální sítě. Jak jsme si však demonstrovali na příkladu normoxických a hypoxických buněk, konfokální mikroskopie je k prokázání jasné změny praktičtější, i když nejsme schopni určit změny průměrů a délek vláken.

Pokoušeli jsme se studovat endoplazmatické retikulum, ale během krátké doby vymezené na diplomovou práci se nám nepodařilo najít správný vektor a protein, kterým bychom mohli značit membrány endoplazmatického retikula. Taktéž jsme hledali fluorescenční proteiny o jiných excitačních spektrech, než mají námi používané fluorescenční proteiny třídy EOS. Pomocí nich jsme chtěli využít možnost sekvenčního zobrazování dvou různých proteinů. Při těchto pokusech jsme zaznamenali dílčí úspěchy a v blízké budoucnosti bude možné v laboratoři Dr. Ježka využívat i tato dvojbarevná zobrazování.



## 7 Závěr

V průběhu řešení diplomové práce jsem se seznámil s unikátním fyzikálním principem biplane FPALM mikroskopie. V počátečních fázích diplomové práce jsem se musel naučit kultivovat, transfekovat a fixovat tkáňové buňky, obsluhovat a provádět samostatná měření na prototypu biplane FPALM mikroskopu Vutara SR-200. K významným výsledkům této práce patří odlaďování softwaru k mikroskopu Vutara SRX, který je stále ještě spíše vývojovým typem než běžným komerčním přístrojem. Díky zmíněnému odlaďování vývojového softwaru bylo možné prokázat, že dochází k požadované specifické lokalizaci fluorescenčních proteinů, a dále pak provádět rutinní zpracování výsledků měření.

Za pomoci softwaru pro 3D vizualizaci Amira se podařilo vytvořit a na menším souboru dat aplikovat dvě metody pro určení fyzikálních parametrů mitochondriálních vláken, která jsou barvena fluorescenčním proteinem mtEOS resp. FIS-EOS pro značení vnitřní resp. vnější mitochondriální membrány.

Obdobného úspěchu se bohužel nepodařilo dosáhnout v experimentech zaměřených na zobrazování endoplazmatického retikula. Konkrétně se nepodařilo nalézt vhodný vektor a fluorescenční protein k jeho značení.

V souvislosti s experimenty směřujícími k optimalizaci metody biplane FPALM při zobrazování mitochondriálních sítí byly pozorovány změny tvaru mitochondriální sítě při stresových situacích. Zkoumali jsme pak tento jev při uměle vyvolaném definovaném stresu v podobě snížení množství kyslíku při měření. Bylo zjištěno, že za těchto podmínek mitochondriální síť ztrácí svoji konzistenci a fragmentuje se na menší části. Pro studium zmíněného jevu se však více osvědčila klasická konfokální mikroskopie než FPALM se super rozlišením.

Podářilo se objevit dva proteiny, které lze použít pro sekvenční dvojbarevné zobrazování vnější mitochondriální membrány a nukleoidů. Tato metoda se ovšem bude muset ještě lépe odladit.

Při měření fluorescenčních teček bylo dosaženo rozlišovací schopnosti v laterální rovině okolo 40 nm a v axiální 80 nm. Při zobrazování mitochondriální sítě je rozlišovací schopnost o něco málo horší.

## 8 Literatura

- [1] Biological web, eukaryotická buňka, [online], říjen 2012  
<http://www.ibguides.com/images/biology/2.3.2.png>
- [2] Bioweb, eukaryotická buňka, [online], říjen 2012  
<http://www.bioweb.genezis.eu/bunka/cytomorfologia/bunkazi v.jpg>
- [3] ByAllOhGee web, Membrane, [online], říjen 2012  
<http://byallohgee.wikispaces.com/file/view/53074-004-9F65D813.jpg/41399951/53074-004-9F65D813.jpg>
- [4] SLÁDEK, Zbyšek. *Buněčná biologie*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 106 s. ISBN 978-80-7375-086-2.
- [5] GUPTA, P. *Cell and molecular biology*. Rev. ed. Meerut, India: Rastogi Publications, 2009, 940 p. ISBN 978-81-7133-817-7.
- [6] GARDNER, Richard L, David GOTTLIEB a Daniel R MARSHAK. *Stem cell biology*. Vyd. 1. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2001, ix, 550 p. Cold Spring Harbor monograph series, 40. ISBN 0-87969-673-7.
- [7] Dennis Kunkel Web, Liver Cell, [online], říjen 2012  
<http://www.denniskunkel.com/gallery/medical/1531A.jpg>
- [8] Micro magnet web, The Cell Nucleus, [online], říjen 2012  
<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/nucleus/images/nucleusfigure1.jpg>
- [9] ALBERTS, Bruce, David GOTTLIEB a Daniel R MARSHAK. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998, 630 s. Cold Spring Harbor monograph series, 40. ISBN 80-902-9060-4.
- [10] Bioweb, Endoplazmatické retikulum, [online], říjen 2012  
<http://www.bioweb.genezis.eu/bunka/cytomorfologia/er.jpg>
- [11] Dennis Kunkel WEB, ER, [online], říjen 2012  
<http://www.denniskunkel.com/gallery/medical/1536A.jpg>

- [12] Cytochemistry web, Lysosome, [online], říjen 2012  
<http://www.cytochemistry.net/cell-biology/PEROX.JPG>
- [13] Dennis Kunkel WEB, Hepatocyt, [online], říjen 2012  
<http://www.denniskunkel.com/gallery/medical/1541A.jpg>
- [14] M. Langmeier a kolektiv, *Základy lékařské fyziologie*, Grada, Praha 2009, ISBN 978-80-247-2526-0
- [15] O. Kittnar a kolektiv, *Lékařská fyziologie*, Grada, Praha 2011, ISBN 978-80-247-3068-4
- [16] M.A.Clark web, struktura aequorinu, [online], říjen 2012  
<http://www.whozoo.org/mac/Music/3Dimages/PDBAequorin.jpg>
- [17] Green fluorescence protein web, struktura GFP, [online], říjen 2012,  
<http://thagreenplanet.yolasite.com/resources/IMAGE%20-%20Rendered%20GFP%20-%20640.jpg>
- [18] Conncoll web, History of GFP, [online], říjen 2012  
<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/images/DNAnormalsmall.jpg>
- [19] Conncoll web, History of GFP, [online], říjen 2012  
<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/images/DNAgfpsmall.jpg>
- [20] Microscopy resource center, Numerical aperture and resolution, [online], listopad 2012,  
<http://www.olympusmicro.com/primer/images/numeraper/numeraper.jpg>
- [21] Microscopy resource center, Basic concepts in fluorescence, [online], listopad 2012,  
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/images/fluorescenceintrofigure1.jpg>

- [22] Microscopy resource center, Anatomy of the fluorescence microscope, [online], listopad 2012,  
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/images/fluoromicrofigure10.jpg>
- [23] Microscopy resource center, Anatomy of the fluorescence microscope, [online], listopad 2012,  
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/images/fluoromicrofigure2.jpg>
- [24] Georg-Augustin Universität, Göttingen, Fluoreszenzmikroskopie, [online], listopad 2012,  
<https://lp.uni-goettingen.de/get/image/6754>
- [25] Microscopy resource center, Anatomy of the fluorescence microscope, [online], listopad 2012,  
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/images/fluoromicrofigure3.jpg>
- [26] Microscopyu, Introduction to microscope objectives, [online], listopad 2012,  
<http://www.microscopyu.com/articles/optics/images/objectives/objectivesfigure2.jpg>
- [27] Microscopyu, Chromatic aberration, [online], listopad 2012,  
<http://www.microscopyu.com/articles/optics/images/aberrations/chromaticfig2.jpg>
- [28] Microscopyu, Chromatic aberration, [online], listopad 2012,  
<http://www.microscopyu.com/articles/optics/images/aberrations/chromaticfig3.jpg>
- [29] Microscopyu, Water immersion objectives, [online], listopad 2012,  
<http://www.microscopyu.com/articles/optics/images/objectives/waterimmersionfigure2.jpg>

- [30] Microscopyu, Water immersion objectives, [online], listopad 2012  
<http://www.microscopyu.com/articles/optics/images/objectives/waterimmersionfigure5.jpg>
- [31] MLODZIANOSKI, M. J., JUETTE, M. F., BEANE, G. L., BEWERSDORF, J. Experimental characterization of 3D localization techniques for particle-tracking and super-resolution microscopy. *Optics Express*. 2009, **17**(10), 8264-77 ISSN 1094-4087.
- [32] HOLTZER, L., MECKEL, T., SCHMIDT, T., BEWERSDORF, J. Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells. *Applied Physics Letters*. 2007, **90**(5), 053902-1-3 ISSN 00036951
- [33] HUANG, B., WANG, W., BATES, M., ZHUANG, X. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science*. 2008, **319**(5864), 810-813 ISSN 0036-8075.
- [34] PRABHAT, P., RAM, S., WARD, E. S., OBER, R. J. Simultaneous Imaging of Different Focal Planes in Fluorescence Microscopy for the Study of Cellular Dynamics in Three Dimensions. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. 2004, **3**(4), 237-242 ISSN 1536-1241.
- [35] RAM, S., PRABHAT, P., CHAO, J., SALLY WARD, E., OBER, R. J. High Accuracy 3D Quantum Dot Tracking with Multifocal Plane Microscopy for the Study of Fast Intracellular Dynamics in Live Cells. *Biophysical Journal*. 2008, **95**(12), 6025-6043 ISSN 00063495.
- [36] THOMPSON, R. E., LARSON, D. R., WEBB, W. W., Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent

Probes. *Biophysical Journal*. 2002, **82**(5), 2775-2783 ISSN 00063495.

- [37] Vutara, Inc, Vutara SRX Viewer, [online], únor 2013, <http://blog.vutara.com/vutara-srx-viewer--free/>
- [38] GOROKHOVATSKY, A. Y., MARCHENKOV, V. V., RUDENKO, N. V., IVASHINA, T. V., KSENZENKO, V. N., BURKHARDT, N., SEMISOTNOV, G. V., VINOKUROV, L. M., ALAKHOV, Y. B., Fusion of Aequorea victoria GFP and aequorin provides their Ca<sup>2+</sup> -induced interaction that results in red shift of GFP absorption and efficient bioluminescence energy transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, **320**(3), 703-711 ISSN 0006291x.
- [39] HESS, S. T., GIRIRAJAN, T. P. K., MASON, M. D., Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*. 2006, **91**(11), 4258-4272 ISSN 00063495.
- [40] Zeiss Microscopy Online Campus, [online], březen 2013, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/images/practicalfigure1.jpg>
- [41] MARKUS R. WENK, Markus R.Aaron Zefrin Fernandis a Aaron Zefrin FERNANDIS. *A manual for biochemistry protocols*. Singapore: World Scientific, 2007, s. 64-67. Manuals in biomedical research, v. 3. ISBN 9789812708311.
- [42] DROPULIC, Boro a Barrie CARTER. *Concepts in genetic medicine*. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, c2008, s. 19-37. ISBN 9780471703204.
- [43] Zeiss Microscopy Online Campus, [online], březen 2013, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/images/highlighterfpsfigure4.jpg>