

SOUHRN

Navzdory možnostem, které přinášejí molekulárně-biologické metody při odhalování souhry různých biologických molekul a molekulárních komplexů, pochopení jednotlivých funkcí v živých buňkách vyžaduje použití *in situ* metod. Je zřejmé, že tyto metody by měly zajistit maximální rozlišení a nejlepší možné zachování biologického objektu v přirozeném stavu, stejně jako správné statistické vyhodnocení prostorových charakteristik lokalizace detekovaných molekulárních komplexů.

Transmisní elektronová mikroskopie poskytuje nejlepší možné rozlišení pro analýzu biologických vzorků. Současná detekce více biologických molekul metodou nepřímého imunoznačení je zdrojem cenných informací o jejich lokalizaci v buněčných kompartmentech a jejich potenciálních interakcí v makromolekulárních komplexech. Vyvinuli jsme komplexní stereologickou metodu pro statistické hodnocení klastrování a kolokalizace značených antigenů na ultratenkých řezech, včetně uživatelsky přívětivého softwarového rozhraní. Dále jsme charakterizovali funkční mikroarchitekturu replikačních a transkripčních domén pomocí vyvinutých algoritmů. Výsledky ukazují, že DNA replikace je v buněčném jádře kompartmentalizována na úrovni DNA ohnisek a nasvědčují modelu, ve kterém centra syntézy DNA jsou zakotvena a chromatinové smyčky se pohybují. V HeLa buňkách jsme ultrastrukturálně popsali dva odlišné morfologické typy replikačních míst – replikační tělíska a replikační ohniska. Oba druhy replikačních míst obsahují seskupení enzymů, strukturních a regulačních proteinů se známou účastí v samotném procesu replikace nebo v regulaci průběhu S-fáze buněčného cyklu. Nicméně, některé regulační a strukturní proteiny byly detekovány pouze v replikačních tělískách nebo replikačních ohniskách. V transkripčních místech jsme ultrastrukturálně popsali přítomnost dvou hlavních molekulárních motorů v buňce. Na modelu stimulovaných lidských lymfocytů jsme ukázali, že přítomnost aktinu v buněčných kompartmentech byla většinou nezávislá na úrovni fyziologické aktivace buňky, zatímco lokalizace jaderného myosinu I vykazovala dynamické změny během aktivace transkripce.

Pro rozšíření technických možností analýzy mnohočetných interakcí molekul na ultrastrukturální úrovni jsme vyvinuli nový systém umožňující současné imunoznačení až pěti antigenů oproti stávající možnosti označení pouze dvou. Detekce se provádí za použití nových kovových nanočástic rozdílného tvaru snadno rozlišitelných v transmisním elektronovém mikroskopu. Nanočástice se stříbrným středem a zlatým povrchem, zlaté tyčinkovité nanočástice a kubické paládiové nanočástice byly syntetizovány, konjugovány s protilátkami a použity k současné detekci PIP2, B23, aktinu, Sm proteinu, a SMC2 na ultratenkých řezech HeLa buněk. Ukázali jsme, že ohniska značená PIP2 se nachází v těsném kontaktu s oblastmi značení Sm proteinu, aktinu, a/nebo SMC2 a tvoří komplementární 3D domény v buněčném jádře.

Optimální zachování struktury biologického vzorku a zároveň jeho antigenních vlastností není jednoduchým úkolem. Ukázali jsme, že akrylová pryskyřice LR White je vhodná pro zalití chemicky fixovaných vzorků a vzorků po mrazové fixaci. Nicméně některé antigeny mohou být lépe zachovány po zalití do Lowicrylu HM 20. Přidání 1.5% vody a 0.5% glutaraldehydu do acetonu během mrazové substituce ve většině případů zlepšuje zachování antigenů při dobře zachované ultrastruktuře, jak ukazují výsledky značení imunozlatem a biochemického měření množství proteinu.