

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague, Faculty of Science

Doktorský studijní program: Vývojová a buněčná biologie
Ph.D. study program: Developmental and cell biology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Development of ultrastructural methods and their application in
studies on the cell nucleus

Vývoj ultrastrukturálních metod a jejich použití pro
studium buněčného jádra

Mgr. Anatoly A. Filimonenko

Školitel/Supervisor: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: VÝVOJOVÁ A BUNĚČNÁ BIOLOGIE

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Školící pracoviště: Oddělení biologie buněčného jádra, ÚMG AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Anatoly A. Filimonenko

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

**S disertací je možno se seznámit na děkanátě
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze**

OBSAH

Abstract.....	- 4 -
Souhrn.....	- 5 -
Úvod.....	- 6 -
Analýza imunoznačení na ultratenkých řezech.....	- 6 -
Metody detekce při mnohočetném imuno-značení v elektronové mikroskopii.....	- 8 -
Příprava vzorku pro imunoelektronovou mikroskopii: optimalizace zalévání do pryskyřice.....	- 9 -
Motivace a cíle.....	- 11 -
Výsledky.....	- 12 -
Byla vyvinuta metoda pro kvantitativní analýzu imunogold-značení.....	- 12 -
Nascentní DNA v HeLa buňkách je organizovaná do zaoblených ohnisek, která rostou během replikace.....	- 13 -
Mikroarchitektura domén DNA replikace.....	- 13 -
Jaderná distribuce aktinu a NMI závisí na transkripční aktivitě buňky.....	- 15 -
Současná detekce více antigenů pro ultrastrukturální imunocytochemii.....	- 15 -
Příprava vzorku pro imunoelektronovou mikroskopii: optimalizace zalévání do pryskyřice.....	- 16 -
Diskuse.....	- 18 -
Shrnutí a závěry.....	- 24 -
Perspektiva / vyhlídky do budoucna.....	- 25 -
Přehled použitých metod.....	- 26 -
Seznam publikací.....	- 26 -
Životopis.....	- 28 -
Seznam všech publikací autora.....	- 28 -
Seznam použité literatury.....	- 30 -

ABSTRACT

Despite the capabilities of molecular-biological methods in deciphering the interplay of different biological molecules and molecular complexes, the understanding of respective functions in living cells requires application of *in situ* methods. Obviously, these methods should provide maximal resolution and the best possible preservation of the biological object in a native state, as well as correct statistical evaluation of the spatial characteristics of detected molecular players.

Transmission electron microscopy provides the highest possible resolution for analysis of biological samples. The simultaneous detection of biological molecules by means of indirect immunolabeling provides valuable information about their localization in cellular compartments and their possible interactions in macromolecular complexes. To analyze this, we have developed a complex stereological method for statistical evaluation of immunogold clustering and colocalization patterns of antigens on ultrathin sections, including a user-friendly interface. Functional microarchitecture of DNA replication and transcription sites has been successfully characterized using the developed stereological tools. Our data demonstrate that DNA replication is compartmentalized within cell nuclei at the level of DNA foci and support the view that the synthetic centers are spatially constrained while the chromatin loops are dynamic during DNA synthesis. In HeLa cells, we have ultrastructurally distinguished two morphological types of replication sites - replication bodies and replication foci. Both types contain a set of enzymatic, structural and regulatory proteins, which are known to take part in replication itself or in S-phase regulation. Some regulatory and structural proteins, however, were found only in replication sites of one type. In transcription sites, we have demonstrated on the ultrastructural level the presence of two main cellular molecular motor molecules. Using the model of PHA-stimulated human lymphocytes, the presence of actin was mainly not dependent on the activity status of the cells, while nuclear myosin I shows dynamic behavior upon transcriptional activation.

To extend the technical capabilities for analysis of multiple interactions at the ultrastructural level, we have developed a new system, which allowed us simultaneous immunolabeling of up to five antigens, as compared to only two conventionally available. Gold-silver core-shell nanoparticles, gold nanorods and cubic palladium nanoparticles distinguishable in TEM by their shape were synthesized, and PIP2, B23, actin, Sm protein, and SMC2 were simultaneously detected on ultrathin sections. We have demonstrated that PIP2-positive foci were found in a close contact with Sm-, actin-, and/or SMC2-rich foci, forming complementary 3D domains in the cell nucleus.

Simultaneous ultrastructure and antigen preservation of biological samples is not a trivial task. LR White resin is suitable for sample embedding after both chemical and cryo fixation. However, for some antigens Lowicryl HM 20 could be preferable. Addition of 1.5% water and 0.5% glutaraldehyde into the acetone for freeze substitution improves the antigen preservation in most cases, as shown by immunogold labeling and biochemical quantification of protein amount, while the ultrastructure stays well preserved.

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 imunozaťem a biochemického měření množství proteinu.

ÚVOD

Je všeobecně uznáváno, že detaily jemné buněčné struktury leží mimo rozlišovací schopnost světelné mikroskopie. Moderní super-rozlišovací techniky již dosáhly rozlišení na úrovni nanometru, nicméně, obvykle umožní pozorovat pouze obraz vytvořený barvivem navázaným na použitou protilátku, bez možnosti vidět přímo detaily ultrastruktury. Následkem toho nám nejvyšší možné rozlišení stále ještě poskytuje transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Při použití imunocytochemických markerů umožní TEM zmapovat žádoucí molekuly v souvislosti s buněčnou ultrastrukturou, spíše než jen na jaderné či cytoplasmatické úrovni. Navíc aplikace koloidních kovových nanočástic, především zlato konjugované se sekundárními protilátkami nebo s proteinem A, nabízí příležitost nejen imunolokalizovat antigeny v různých buněčných a tkáňových kompartmentech, ale také tyto lokalizace a kolokalizace kvantifikovat. Tento přístup pak může být využit při studiu dynamických procesů (např. replikace DNA nebo RNA transkripce), interakcí v rámci kompartmentů, nebo k určení funkčních kompartmentů, které nemají žádnou nápadnou morfologii. Nicméně, aby se dosáhlo optimální analýzy a správné interpretace získaných údajů, je nutné, aby vědec pečlivě vybral vhodný způsob 1) přípravy vzorku, včetně metody fixace a volby media a metody pro zalévání do pryskyřice, a 2) statistického hodnocení imunoznačení proti pozadí u různých buněčných kompartmentů.

Analýza imunoznačení na ultratenkých řezech

Imunoznačení zlatými částicemi (Immunogold) představuje specifický a sensitivní nástroj pro detekci různých antigenů v biologických vzorcích (Roth et al., 1978, 1996). Když daná buněčná struktura obsahuje marker-protein, imunoznačení se zlatými nanočásticemi může být použito k vymezení této struktury pozorováním prostorových variací hustoty značení. Ve složitějším systému může být využito pro hodnocení prostorových vztahů, kolokalizace nebo vzájemné inhibice (exkluze) dvou různých antigenů dvojitého imunoznačení s použitím dvou různých velikostí částic zlata (Roth et al., 1996).

Detekce imunoznačením je obvykle provedena na ultratenkých řezech, tenčích než 100 nm. Důvodem je potřeba docílit vysokého rozlišení, které umožní ultrastrukturální lokalizaci antigenů. Známé buněčné kompartmenty mohou být rozlišeny jako objemové (např. jádro, mitochondrie), povrchové (např. jaderná membrána) nebo délkové (např. všechny druhy vláken; Mayhew et al., 2002). Tyto kompartmenty mohou být heterogenní nebo homogenní. Nicméně, zobrazení ultratenkých řezů neodhalí skutečné velikosti a tvary rozříznutých buněčných kompartmentů.

Například jádro (s objemem měřeným v μm^3) se ukáže na ultratenkém řezu jako profil určité velikosti (s plochou řezu v μm^2) a jeho membrána (s jistou povrchovou plochou, μm^2) se pak zobrazí jako stopa membrány (s délkou měřenou v μm). To znamená, že ztrácíme informaci o rozměrech vzorku a – co by také mělo být vzato do úvahy – vizualizací ultratenkých řezů máme vlastně možnost zkoumat pouze nepatrnou část vzorku. Proto je nutné systematické, jednotné, náhodné, či jinými slovy, nestranné vybírání vzorků (Mayhew, 2011).

Když potom chceme analyzovat imunoznačení určitých antigenů na náhodných ultratenkých řezech, musíme zvolit vhodnou metodu pro analýzu dvourozměrného bodového obrazu. Analýzou bodového obrazu můžeme určit, zda je rozložení částic zlata náhodné, ve shlucích, nebo jsou pravidelně rozptýleny.

V současnosti jsou nejvíce používány dvě metody: Vzdálenost k nejbližší částici a čtvercová analýza. Čtvercová analýza je založena na analýze distribuce frekvence či hustotě nanočástic v rámci zvolené sady čtverců mřížky (Tetley et al., 1987). K zhodnocení shlukování částic zlata je pak použit poměr variance k průměru (VMR; Renau-Piqueras et al., 1989; Azorin et al., 2004). Systém kvadratického testu je aplikován na každý mikrograf a je odhadnut průměrný počet zlatých částic na čtverec a VMR. VMR o hodnotě vyšší než jedna naznačuje distribuci ve shlucích. Naopak, jestliže je VMR menší než jedna, očekává se náhodná distribuce. Významnost může být prověřena Studentovým t-testem nebo indexem disperse (Williams, 1977). Nicméně, tato metoda má nevýhodu vzhledem ke skutečnosti, že čtvercová analýza je v podstatě mírou disperse, takže výsledky mohou záviset na velikosti a orientaci kvadrantu. Variace v rámci analyzované oblasti tak nemohou být rozpoznány (Ripley, 1981).

Metoda vzdálenosti k nejbližší částici je založena na vzdálenostech měřených mezi každými dvěma sousedícími zlatými částicemi na mikrografu, které jsou následně srovnány s hodnotami získanými pro náhodný vzorek se stejným počtem bodů. I když může být tento poměr použit k hodnocení bodových vzorů, jeho hlavní nevýhodou je skutečnost, že je zkreslen efektem rozhraní. Navíc je tento přístup založen na průměrné vzdálenosti a neodráží místní variance. Aby se tento problém obešel, používají se v současnosti jiné funkce, založené na distribuci frekvencí vzdálenosti nejbližšího bodu nebo všech mezibodových vzdáleností.

Pro zhodnocení imunogold-shluků se běžně používá funkce párové korelace ($g(r)$ PCF), (Markovics et al., 1974; Renau-Piqueras et al., 1989; Martin and Medina, 1991; Rusakov et al., 1995 and Gathercole et al., 2000). Ta srovnává pravděpodobnost nalezení páru zlatých částic se vzájemnou vzdáleností r s pravděpodobností očekávanou pro náhodný vzorek, pokud byla použita stejná hustota částic. Funkce $g(r)$ může být vyjádřena jako poměr průměrné hustoty zlatých částic ve vzdálenosti r od konkrétní částice k průměrné hustotě zlatých částic. Pokud je $g(r)$ vyšší než jedna,

pozorujeme shlukování nanočástic ve vzdálenosti r , $g(r)$ nižší než jedna představuje odpudivé síly a $g(r)$ rovno jedné znamená náhodnou distribuci částic.

Nicméně, pokud je $g(r)$ odhadnuto na několika malých mikrografech (což je nutné pro získání statisticky významných výsledků), vybírání vzorků dlouhých vzdáleností r (ve srovnání s velikostí mikrofotografie) je negativně ovlivněno, protože pravděpodobnost, že jedna zlatá částice z páru je situovaná vně mikrografu či sledované oblasti, se zvyšuje. Tento negativní vliv, zvaný efekt rozhraní, může být zkorigován použitím geometrického kovariogramu (Ripley, 1988).

Nedávno (Hess et al., 2005; Philimonenko et al., 2000; Prior et al., 2003; Roy et al., 2005) byla také použita k hodnocení imunogold-klastrování či kolokalizace K-funkce odhadnutá měřením vzdáleností pro všechny kombinace párů částic. Na základě PCF představuje $K(r)$ analýzu distribuce vzájemných vzdáleností mezi všemi částicemi na mikrografu. Ve srovnání s většinou metod vzdálenosti k nejbližší částici umožňuje funkce $K(r)$ testování charakteristik obrazu zlatých částic na různých vzdálenostních stupnicích.

Závěrem, tyto metody umožňují dedukovat fyzikální interakce mezi antigeny či jejich umístění v blízkosti a tedy pravděpodobnost jejich podílení se na stejném procesu či funkci v buňce v případě statisticky významné kolokalizace (Kysela et al., 2005, Philimonenko et al., 2006). V případě signifikantního klastrování určují tyto metody velikost (Philimonenko et al., 2000) a tvar (Schofer et al., 2004) kompartmentů, které obsahují odpovídající antigen (a to i v případě, kdy tyto kompartmenty nemají žádnou nápadnou ultrastrukturu). Vědci se tak může podařit odhalit nové a neznámé účastníky známých procesů a určit nové detaily mechanismu regulace jejich funkcí. Tyto metody nám však chyběly a bylo třeba je vyvinout (Philimonenko et al., 2000; Schofer et al., 2004).

Metody detekce při mnohočetném imuno-značení v elektronové mikroskopii

Fluorescentní mikroskopie umožňuje mnohočetné značení, ale její rozlišení je často nedostatečné pro jednoznačnou lokalizaci značených molekul a jejich přiřazení do specifických buněčných kompartmentů. Elektronová mikroskopie (EM) tento problém řeší vyšším rozlišením. Od pionýrských prací Rotha a spol. využívá EM pro detekci cílových antigenů zlaté částice s navázaným imunoglobulinem či jinými bio-aktivními molekulami (Roth et al., 1996). Nicméně, počet současně detekovaných antigenů je omezený na dva, maximálně tři. Hlavním limitujícím prvkem je skutečnost, že zlaté nanočástice mohou být rozlišeny jen na základě své velikosti, která se může měnit v rámci úzkého vymezení, takže imunodetekce nemůže proběhnout správně. Při použití zlatých částic o velikosti 15 nm a víc, se sensitivita imunoznačení dramaticky snižuje. Jedním z důvodů je problém sterických efektů (Hainfeld, 1987; Seidel and Zabel, 2001). Velké zlaté částice mohou také při

značení malých struktur uměle zvětšit shluky částic (Iborra and Cook, 1998). Navíc větší nanočástice mají tendenci vykazovat větší variaci velikosti, což vede k problematickému hodnocení různých typů částic.

Příprava vzorku pro imunoelektronovou mikroskopii: optimalizace zalévání do pryskyřice

Pro získání optimálního výsledku při ultrastrukturálním imunoznačení je nutné dobře zachovat jak jemnou strukturu, tak antigenní vlastnosti vzorku. Proto je volba optimální techniky pro přípravu vzorku klíčová. Antigenní vlastnosti biologického materiálu jsou během přípravy vzorků pro imunoznačení ovlivněny po zalití do pryskyřice řadou faktorů, z nichž nejdůležitější je metoda fixace, dehydratační proces a vlastnosti pryskyřice (Skepper, 2000; Stirling, 1990). Klasické epoxydové pryskyřice nejsou ve většině případů vhodné pro následné imunoznačení. Proto byla formulována řada akrylových pryskyřic, které, spolu s mírnější fixací, pomohou obejít nevýhody epoxydových pryskyřic ve směru zachování antigenů a jejich přístupnosti (Acetarin et al., 1986; Carlemalm et al., 1985). Ačkoliv vlastnosti epoxydových a akrylových pryskyřic byly srovnány v mnoha studiích (např. Biggiogera and Fakan, 1998; Brilakis et al., 2001; Brorson, 1999; Merighi et al., 1989; Roth and Berger, 1982), pouze v několika málo publikacích najdeme srovnání mezi různými akrylovými pryskyřicemi (Hamilton et al., 1992; Philimonenko et al., 2002; Schwarz and Humbel, 1989).

Fixace biologického materiálu je dalším kritickým bodem (Muhlfeld, 2010; Webster et al., 2008). Běžná chemická fixace aldehydy poskytuje dobrou imobilizaci molekul ve vzorku, ale na druhé straně se souběžně se zvyšujícím křížovým provázáním tkáně signifikantně snižuje přístupnost protilátek k epitopům. Protože mnoho epitopů je citlivých na vysoké koncentrace glutaraldehydu (Miller, 1972; Smit et al., 1974), obecně se doporučuje jako vhodný kompromis pro zachování jak ultrastruktury, tak antigenicity mírná fixace směsí 2-4% formaldehydu a 0,1-1% glutaraldehydu (Tokuyasu, 1984). Spolu se skutečností, že tento protokol nevyžaduje žádné speciální a drahé vybavení, je to stále pro mnoho laboratoří primární metoda. Další možností je použití kryofixace či kryoimobilizace při vysokém tlaku, což je rychlý fyzický fixační proces, zastavující buněčné pochody během milisekund, vyhýbající se tak typickým artefaktům, způsobeným relativně pomalým procesem chemické fixace, závislé na difúzi (Schwarz and Humbel, 2007).

Pro zalití zmrazeného materiálu do pryskyřice musí být nejdříve voda nahrazena organickým rozpouštědlem (většinou acetonem) během procesu zvaného kryosubstituce (FS; Muhlfeld, 2010). Podle toho, jestli je preferovaným cílem lepší ultrastruktura nebo zachování antigenu, mohou FS media obsahovat vodu, uranyl acetát, osmium tetroxid a glutaraldehyd v různém procentuálním zastoupení, obvykle v acetonu (Humbel and Müller, 1985; McDonald and Morpew, 1993; Monaghan

et al., 1998; Steinbrecht and Müller, 1987). Pro imunocytochemické studie jsou pak kryoimobilizované a FS buňky zalité do akrylových pryskyřic (Acetarin et al., 1986; Roth, 1989; Roth and Taatjes, 1998; Roth et al., 1981). Obvykle jsou použity různé Lowicryl pryskyřice, ale vhodná může být i LR White (Sobol et al., 2010, 2011). Některé práce popisují vlastnosti imunocytochemického značení materiálu zmraženého pod vysokým tlakem (Chang et al., 2003; Eppenberger-Eberhardt et al., 1997; Kirschning et al., 1998; McDonald, 2007; McDonald and Müller-Reichert, 2002; Monaghan and Robertson, 1990; Monaghan et al., 1998; Young et al., 1995), ale jen několik málo z nich se zabývá kvantitativními údaji. Např. Bittermann et al. (1992) demonstrovali, že jakékoliv chemické před-ošetření nebo přítomnost chemických fixativů v FS médiu vždy snížilo hustotu značení. Strádalová et al. (2008) ukázali, že signál imunoznačení různých jaderných antigenů byl 4-13x vyšší v buňkách zmražených pod vysokým tlakem, než v buňkách chemicky fixovaných. Zatímco pro uspokojivé kryofixování vzorků bylo vyvinuto několik přístupů a přístrojů (Hawes et al., 2007; Hess, 2003; Hess et al., 2000; Hohenberg et al., 1994, 1996; Jiménez et al., 2006; Kiss et al., 1990; Lancelle and Hepler, 1989; Marsh et al., 2001; McDonald, 1999; Mims et al., 2003; Müller and Moor, 1984; Müller-Reichert et al., 2008; Neuhaus et al., 1998; Reipert et al., 2004; Studer et al., 1989; Wild et al., 2005), definice optimálního FS protokolu pro imunoznačení nebyla objektivně zhodnocena.

MOTIVACE A CÍLE

Ultrastrukturální detekce různých antigenů v buňce za použití protilátek konjugovaných ke kovovým nanočásticím představuje mocný nástroj v biologickém výzkumu. Nicméně, statistické či stereologické nástroje na testování pozorovaného značení pro významné shlukování či kolokalizaci na začátku 21. století chyběly. Proto byl adresován další úkol:

Cíl 1. Vyvinutí komplexní stereologické metody pro statistické hodnocení shlukování a kolokalizace antigenů v biologických vzorcích, včetně uživatelsky přijatelného rozhraní

Vyvinuté metody prostorové statistiky (Cíl 1) nám umožnily vyjasnit některé nezodpovězené otázky o základních buněčných procesech jako je transkripce a replikace. Koncem 20. století bylo demonstrováno, že replikace DNA je během celé S-fáze organizována do ohnisek v nukleoplasmě (Hozák et al., 1993; Hozák et al., 1994; Jackson and Pombo, 1998; Nakayasu and Berezney, 1989). Nicméně nebylo jasné, jestli tato ohniska představují replikační komplexy, pohybující se podél řetězce DNA, nebo jestli jsou tyto komplexy organizovány do struktur vyššího stupně a nějak fixované v jádře, zatímco templátová DNA jimi prochází. Přesné složení replikačních komplexů také nebylo známo. Díky nově vyvinuté metodě a celé řadě primárních protilátek proti četným strukturálním a regulačním proteinům, které dobře značí vzorky zalité v LR White pryskyřici, jsme měli příležitost studovat složení replikačních továren na ultrastrukturální úrovni. Co se týká transkripce, soustředili jsme se na projevy NMI and actin v transkripčních ohniscích během aktivace transkripce. Dalším cílem tedy bylo:

Cíl 2. Charakterizovat funkční mikroarchitekturu replikačních a transcripčních míst za použití vyvinutých nástrojů

Sensitivní imunodetekce elektronovou mikroskopií je v současnosti omezená na imunoznačení pouze dvou antigenů současně (Roth et al., 1996). Tato skutečnost omezuje možnosti studia prostorových mnohačetných interakcí v komplexních biologických procesech. Proto jsme naplánovali:

Cíl 3. Vyvinutí systému pro simultánní mnohonásobné ultrastrukturální imunoznačení více než tří antigenů

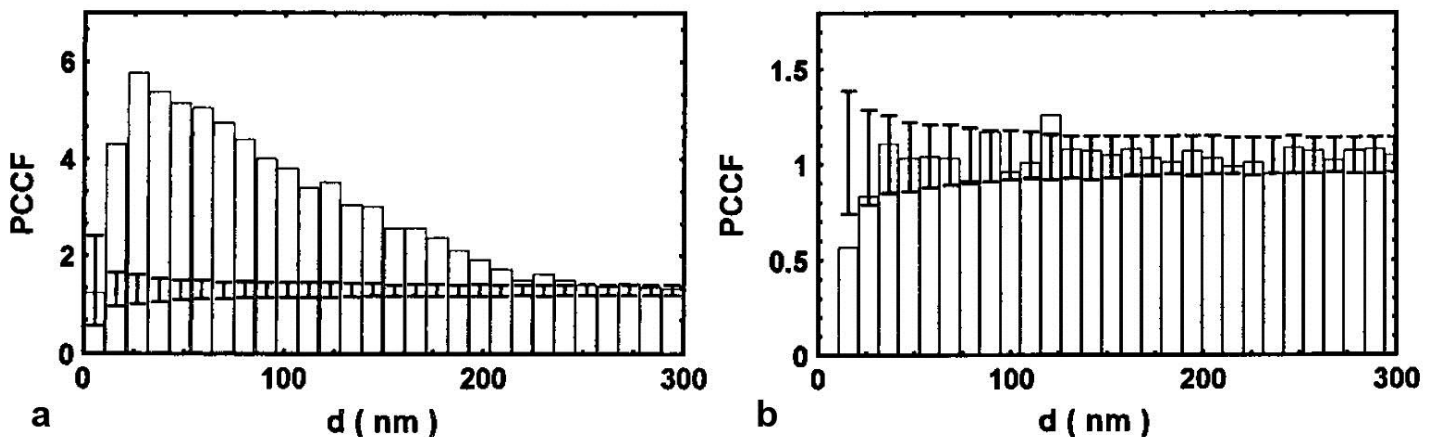
Klíčovou podmínkou pro úspěšné imunoznačení je zachování antigenů biologického vzorku, což je ovlivněno řadou faktorů. Nejdůležitějším z nich je metoda fixace, proces dehydratace a vlastnosti pryskyřice (Skepper, 2000; Stirling, 1990). Proto jsme naplánovali:

Cíl 4. Optimalizovat proces zalévání biologických vzorků do pryskyřice pro imunoznačení

VÝSLEDKY

Byla vyvinuta metoda pro kvantitativní analýzu imunogold-značení

Imunoznačení kovovými nanočásticemi umožňuje vizualizaci různých antigenů na ultratenkých řezech. Nicméně, pro zhodnocení pozorovaného značení je zapotřebí vhodná stereologická metoda. Zdola-cenzurovaná funkce $K - K(r_1, r_2)$ – byla použita za účelem testování shlukování a kolokalizace antigenů. Tato funkce je vhodná také pro testování statistické významnosti pozorovaného značení. Dále jsme převedli standardní funkci $K(r)$ na $K^{-1}(r_1, r_2)$. Protože jde o integrály PCF a PCCF, jsou K^{-1} funkce snadno interpretovány jako plocha sloupce histogramu pro každý interval vzdáleností $r_2 - r_1$ a tak mohou být použity pro názorné vyjádření vlastností PCF a PCCF. Výpočty funkce K , stejně jako funkce K^{-1} byly opraveny na efekt rozhraní. Naši metodu jsme pak otestovali na modelu replikace DNA. DNA polymeráza α , hlavní replikační DNA polymeráza v aktivně se dělících eukaryotických buňkách (Salas et al., 1999), ukazuje silnou kolokalizaci s nascentní DNA v intervalu vzdáleností, který odpovídá známé velikosti replikačních ohnisek 30-200 nm (Obr. 1a; Hughes et al., 1995). Naproti tomu, nukleolární protein Nopp 140 (Meier and Blobel, 1992), u kterého se nepředpokládá, že se účastní replikace DNA, nekolokalizoval s nascentní DNA (Obr. 1b).



Obr. 1. Kolokalizace DNA polymerázy α a Nopp 140 s nascentní DNA. **a** DNA polymeráza α a nascentní DNA silně lokalizují v intervalu 20-175 nm, kdy PCCF funkce dosahuje hodnoty vyšší než 1; **b** Nopp 140 a nascentní DNA spolu nelokalizují: PCCF nemá v žádném intervalu vrchol a fluktuuje okolo 1.

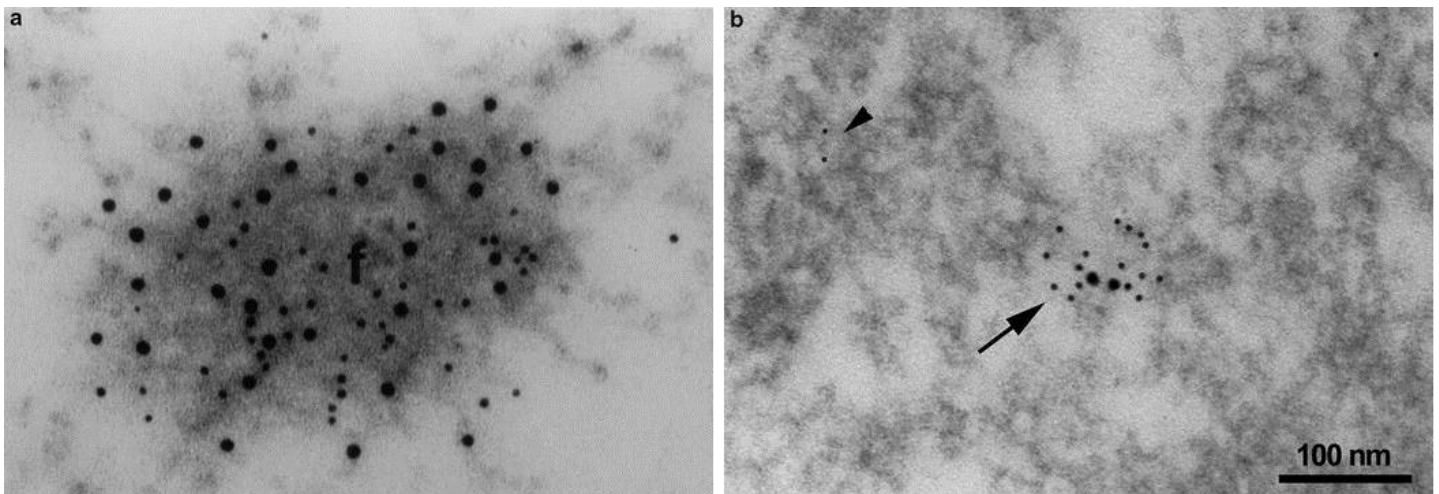
Na základě této metody byly vyvinuty plug-iny k programu Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovensko). Plug-iny umožňují provést celý hodnotící proces, počínaje automatickou detekcí zlatých částic až ke statistickému zpracování a vytvoření grafů, ve stejné podobě jako ty uvedené v Philimonenko et al. (2000) a v Schofer et al. (2004). Plug-iny jsou volně přístupné na <http://nucleus.img.cas.cz/gold/>

Nascentní DNA v HeLa buňkách je organizovaná do zaoblených ohnisek, která rostou během replikace

Použitím „pulse“ (5, 15 a 30 min) a „pulse-and-chase“ (5+10 and 5+25 min) strategie s inkorporací biotin-dUTP do nascentní DNA jsme demonstrovali, že průběhem replikace zvětšují značené lokality svoji velikost až do 240 nm (30 min inkorporace), za současného udržování široce zakulaceného tvaru. V pokusech „pulse-and-chase“ tvořila značená DNA ohniska o průměru asi 400 nm. Ve všech experimentálních skupinách byla cirkularita $\sim 0,7$ a elongace $\sim 2,3$, což naznačuje, že shluky, obsahující nascentní DNA byly vždy kulaté/elipsoidní. Tyto výsledky demonstrují, že replikace DNA je v buněčném jádře rozčleněna na úrovni ohnisek DNA, a podporují názor, že syntetická centra jsou prostorově vymezena, kdežto smyčky chromatinu jsou během syntézy DNA dynamické.

Mikroarchitektura domén DNA replikace

V našich pokusech jsme demonstrovali, že v jádře HeLa buněk je možno vidět dva ultrastrukturálně odlišné typy replikačních míst. Replikační tělíska (RB – replication bodies) jsou denzní struktury (Obr. 2a; Hozak et al., 1993 and 1995), kdežto replikační ohniska (RF - replication foci) odpovídají místům značení nascentní DNA mimo tělíska a nemají žádnou typicky zahuštěnou strukturu v pozadí (Obr. 2b).



Obr. 2. Mikrografy RB a RF. Buňky permeabilizované uprostřed S-fáze byly ponechány syntetizovat DNA v přítomnosti biotin-dUTP, pak byly připraveny ultratenké řezy a provedeno imunoznačení. Zlaté částice o velikosti 5 nm značí DNA polymerázu α , 10-nm částice značí místa obsahující inkorporovaný biotin (t.j. nascentní DNA); **a** RB (f) je silně značeno oběma protilátkami; **b** shluky DNA polymerázy α jsou detekovatelné odděleně (samostatná hlavička šipky) nebo spojené s RF (šipka). Měřítka: 100 nm.

Jak RB, tak RF obsahují sadu enzymatických, strukturálních a regulačních proteinů, o nichž je známo, že se účastní vlastní replikace (DNA polymeráza α , PCNA) nebo regulace S-fáze (Cyclin A a E, p21, Cdk 2, viz Tab. 1). V obou typech replikačních míst jsme našli také několik proteinů, zahrnutých v metabolismu RNA. Některé regulační a strukturální proteiny byly ale nalezeny jenom v replikačních místech jednoho typu. Konkrétně, Cdk 1 a cyclin B1 byly nalezeny pouze v RB, kdežto PML a lamin B1 pouze v RF.

Tabulka 1. Antigeny detekované v rámci obou typů replikačních míst DNA.

Skupina	Antigen	RF	RB	
		Významnost kolokalizace s nově syntetizovanou DNA	LD	Lokalizace
Proteiny, které se účastní DNA replikace	DNA polymerase α	**	+++	difuzní
	PCNA	**	+++	difuzní
Regulátory buněčného cyklu	Cdk1 (cdc2-kinase)	NS	+++	difuzní
	Cdk2	**	- až +	malé zóny
	p21 WAF1/Cip1	**	- až +	malé zóny
	Cyclin A	**	- až +	malé zóny
	Cyclin B1	NS	- až +	malé zóny
	Cyclin E	**	+++	malé zóny v místech kontaktu chromatinů a RB
	Cyclin D1	NS	-	-
	Cdc34	NS	-	-
Proteiny zapojené do metabolismu RNA	A1 hnRNP	**	+	difuzní
	C1/C2 hnRNP	**	- až +	jen na periferních chromatinových vláknech
	Nopp 140	NS	-	-
	p80-coilin	**	++	zonální
	Sm	**	+++	difuzní
	SS-B/La	**	+++	difuzní
Ostatní proteiny	PML	**	-	-
	Lamin A/C	NS	-	-
	Lamin B1	**	-	-

Hustoty značení (labeling densities, LD) v RB byly vyjádřeny jako “-” (<30 částic/ μm^2), “+” (30–59 částic/ μm^2), “++” (60–89 částic per μm^2) a “+++” (>89 částic/ μm^2). V RF byla významnost

kolokalizace nascentní DNA s různými jadernými proteiny testována pomocí K-funkce v intervalu vzdáleností 30–250 nm při 1% (**) a 5% (*) kritických hodnotách získaných Monte-Carlo-simulacemi Poisson-procesu. Výsledky, lišící se pro RB a RF, jsou zvýrazněny šedou barvou.

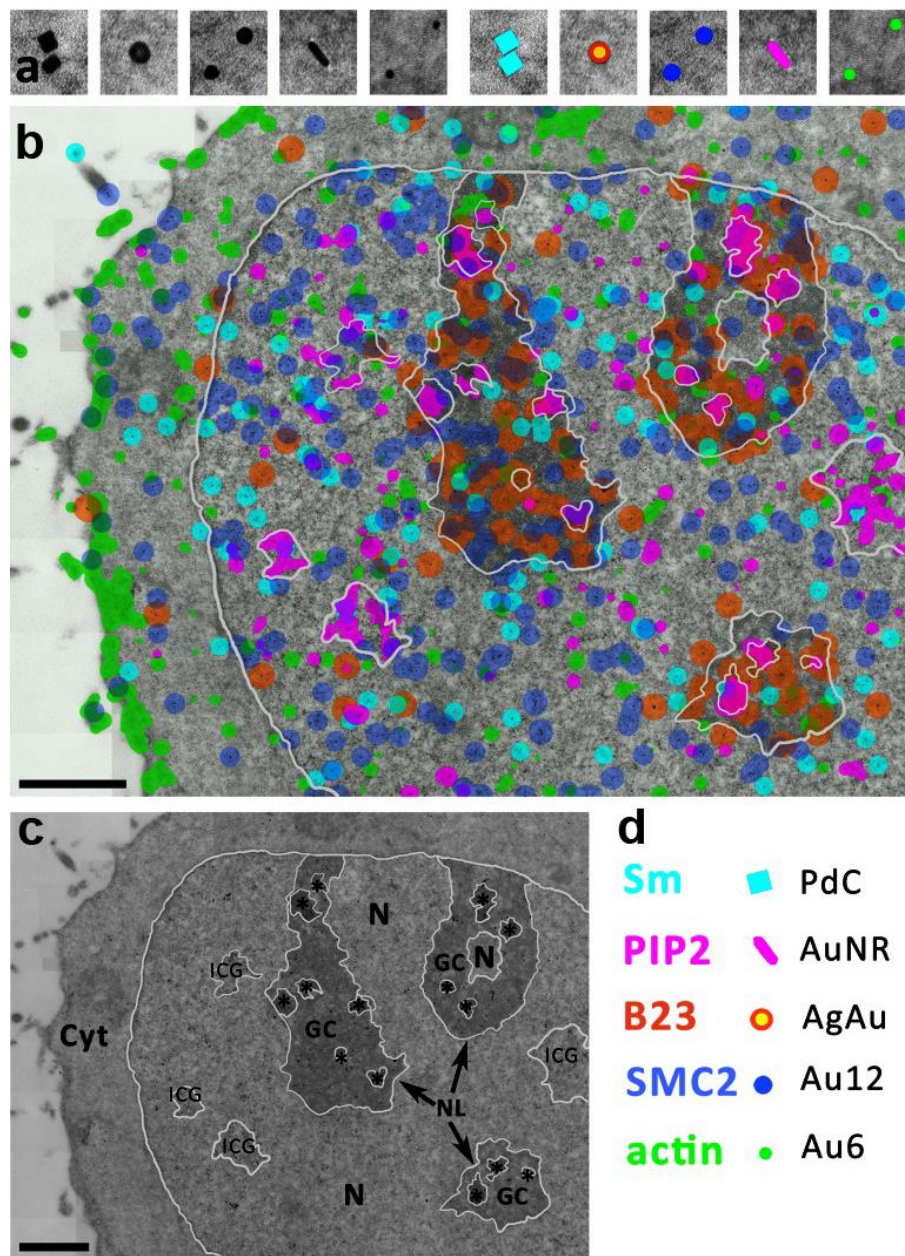
Jaderná distribuce aktinu a NMI závisí na transkripční aktivitě buňky

Odhadli jsme dynamické vlastnosti nukleárního aktinu a myosinu (NMI) na modelu fytohemaglutininem (PHA) stimulovaných lidských lymfocytů. Po stimulaci prochází lymfocyty rapidní transkripční aktivací, provázenou dramatickými změnami morfologie jádra a jadérka. Charakteristickými znaky tohoto procesu je zvětšení jádra, dekondenzace chromatinu a aktivace jadérek (Smetana a Potměšil, 1968; Busch a Smetana, 1970; Hozák et al., 1989). Ukázali jsme, že aktivace lidských lymfocytů byla provázena zvýšením exprese NMI mRNA a proteinu v buňkách, kdežto exprese aktinu byla relativně stabilní. Podobné výsledky byly získány imunogold-značením na ultratenkých řezech. Demonstrovali jsme také, že v jadéřkách klidových nebo PHA-stimulovaných lymfocytů byl aktin lokalizován převážně v FCs, kdežto NMI hlavně v DFC. Během aktivace transkripce byl aktin přemístěn z FCs do jiných nukleolárních kompartmentů, kdežto NMI byl akumulován v DFC, kde probíhá transkripce rDNA. V nukleoplasmě byl po aktivaci aktin i NMI přemístěn z kondenzovaného chromatinu do chromatinu dekondenzovaného a oba proteiny kolokalizovaly s transkripčními místy. Nicméně, v klidových buňkách byl v transkripčních místech detekován pouze aktin.

Současná detekce více antigenů pro ultrastrukturální imunocytochemii

Připravili jsme tři nové typy stabilních nanočástic snadno rozlišitelných na konvenčním TEM podle tvaru: dvojvrstvé nanočástice se zlatým povrchem a stříbrným jádrem (AgAu), zlaté tyčinkovité nanočástice (AuNR) a kubické paládiové nanočástice (PdC).

Úspěšně jsme otestovali použití těchto částic pro ultrastrukturální imunoznačení. Průměrná velikost nanočástic, počítaná jako jejich průměr, se pohybovala mezi 10.5 a 14.9 nm, což odpovídá rozsahu vhodnému pro imunoznačení, a distribuce velikosti byla úzká. Získané konjugáty se sekundární protilátkou byly plně funkční, jak demonstrují výsledky imunoznačení na ultratenkých řezech. Použitím tohoto nástroje jsme detekovali na ultratenkých řezech chemicky fixovaných a do LR White pryskyřice zalitých buněk HeLa, při ultrastrukturálním rozlišení, pět buněčných antigenů současně (PIP2, B23, aktin, Sm protein a SMC2; Obr. 3). Oblasti hustého značení PIP2 (fialová; Obr. 3b) jsou pozorovány v FC a DFC v jadéřkách a ve shlucích interchromatinových granulí, spolu s menšími ohnisky v nukleoplasmě a cytoplasmě. Podle očekávání se B23 (oranžová) nachází v jadéřkách vedle oblastí bohatých na PIP2, převážně v GC. Aktin (zelená) je ve vysoké míře



Obr. 3. Ultrastrukturální mapování všech pěti testovaných antigenů (Sm, PIP2, B23, SMC2, actin) v buňce HeLa.

a Elektronové mikrografy jednotlivých typů nanočástic. PdC, AgAu a AuNR byly nově vyvinuty, kdežto 6 nm (Au6) a 12 nm (Au12) zlaté nanočástice byly komerční konjugáty sekundárních protilátek se zlatem.

b Statisticky významné hustoty jednotlivých biomolekul (antigenů) jsou zvýrazněny barevným značením na oddálené mikrofotografii složené ze 70 jednotlivých obrázků. Hlavní buněčné kompartmenty jsou ohraničeny bílou linií.

c Přehled, zdůrazňující ohraničené kompartmenty. Cyt cytoplazma, ICG interchromatinové granule, GC granulární složka jaderka, N nukleoplasma, hvězdička – fibrilární centrum a hustá fibrilární složka jaderka.

d Barevné značení.

Měřítko: 1 μ m.

lokalizován v kortikální vrstvě cytoplasmy a také roztroušený v malých ohniscích v jádře, jaderku a cytoplasmě. Sm protein (tyrkysová) se také nachází v malých shlucích v nukleoplasmě, pravděpodobně zpojený ve splicingu. SMC2, protein vázaný hlavně na chromatin, je lokalizovaný v jádře a byl zjištěn také v nukleoplasmě. V některých případech byly pozorovány kolokalizace v rámci malých struktur při vzdálenostech <100 nm. Nicméně, většina PIP2-pozitivních ohnisek byla v těsném kontaktu s místy bohatými na Sm, aktin, anebo SMC2, vytvářejíc komplementární 3D domény.

Příprava vzorku pro imunoelektronovou mikroskopii: optimalizace zalévání do pryskyřice

Způsob přípravy vzorku pro ultrastrukturální imunohistochemii význačně ovlivňuje kvalitu následné detekce antigenu. Každý z jednotlivých kroků přípravy má svůj vliv, klíčová je ale metoda

fixace, druh použité pryskyřice, podmínky dehydratace a infiltrace pryskyřicí (Skepper, 2000; Webster et al., 2008). Provedli jsme kvantitativní zhodnocení imunogold-značení při použití čtyř různých akrylových pryskyřic - LR White, LR Gold, Lowicryl HM20 a Lowicryl K4M – a dvou různých způsobů fixace - mírná chemická fixace a fyzická fixace se zmražením pod vysokým tlakem. Abychom odhalili možné výhody některých srovnávaných pryskyřic před druhými, analyzovali jsme nejdříve nanostrukturu čistých pryskyřic pomocí mikroskopie atomárních sil. Všechny pryskyřice ukázaly jemně-granulární nanostrukturu s boční velikostí zrna asi 20 nm. Řezná plocha byla ve všech třech případech rovná a faktor hrubosti byl stejný. Tyto výsledky tedy neukázaly žádný zřejmý rozdíl mezi vybranými pryskyřicemi. Dále jsme kvantifikovali intenzitu imunogold-značení na ultratenkých řezech buněk HeLa, zalitých - po chemické fixaci nebo fixaci zmražením pod vysokým tlakem - ve čtyřech různých, výše zmíněných, pryskyřicích, a byla analyzována hustota značení čtyř různých antigenů – DNA, hnRNP C1/C2, histonu H1 a Sm. Mezi srovnávanými pryskyřicemi byly ve většině případů pozorovány ne velmi dramatické, ale signifikantní rozdíly. Žádná ze studovaných pryskyřic nevykazovala tendenci konsistentně lepších výsledků. Variace vlastností pryskyřic byly silně závislé na antigenu. Navíc se značení lišilo v závislosti na použité fixaci. Obecně můžeme říct, že vlastnosti pryskyřic v souvislosti s různými antigeny byly jednodušší po chemické fixaci a různorodější po zmražení pod vysokým tlakem či po kryosubstituci.

Vzhledem k tomu, že se při přípravě biologických vzorků dává přednost kryofixaci, soustředili jsme se na hledání optimálních podmínek pro automatizovaný krok kryosubstituce (FS). Na ultratenkých řezech buněk HeLa, zmražených pod vysokým tlakem, zpracovaných za použití tří různých médií pro FS a zalitých do pryskyřice LR White, jsme detekovali DNA, hnRNP C1/C2, histon H3 a RNA polymerázu II CTD. Paralelně byly ve vzorcích, použitých před zmražením, bezprostředně po zmražení a po FS s použitím každého z FS-médií, porovnány koncentrace proteinů (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) a celkové množství hnRNP C1/C2 (Western blotting). Nezaznamenali jsme žádné významné změny v množství antigenů po zmražení pod vysokým tlakem, ale kryosubstituce s použitím acetonu měla za následek jejich signifikantní ztrátu. Zatímco přidání vody může zlepšit vizibilitu některých buněčných struktur, posílilo to negativní efekt kryosubstituce na ztrátu antigenů. Všechny čtyři sledované nukleární antigeny vykazovaly významně nižší hustotu imunogold-značení, když byl aceton doplněn jedním procentem vody. Biochemická měření demonstrovala stejný efekt, ukazující dramatickou ztrátu jak celkového proteinu, tak množství hnRNP C1/C2. Nicméně, přidání 0,5% glutaraldehydu k acetonu s 1,5% vody významně výsledek převrátilo a v případě protilátek anti-histon H3 a anti-RNA polymeráza II CTD dokonce zvýšilo hustotu značení až o 50%.

DISKUSE

Transmisní elektronová microscopie umožňuje mapovat žádoucí molekuly v souvislosti s buněčnou ultrastrukturou s nejvyšším možným rozlišením. Vyvinuli jsme efektivní metodu pro hodnocení kolokalizace a shlukování různých antigenů v biologických vzorcích. Dříve popsané postupy měly několik nevýhod. Překonali jsme problém krátkého rozmezí vyvinutím zdolacenzurované K-funkce $K(r_1, r_2)$, kalkulované pouze ze vzdáleností žádoucího intervalu (r_1, r_2) . Toto také umožňuje zúžit interval pro studium shlukování či kolokalizaci na žádoucí hodnoty. Údaje získané ve 2D je možno aplikovat také na 3D, protože kalkulované charakteristiky jsou stejné ve 2D i 3D. $K^{-1}(r_1, r_2)$ poskytuje grafické znázornění shlukování/kolokalizace. Kolekce dat je také jednodušší, jelikož data mohou být shomažďována z jakéhokoliv počtu náhodně vybraných mikrografů, díky tomu, že na výpočty K-funkce i K^{-1} funkce byla aplikována korekce pro efekt rozhraní. Nižší hodnoty imunozačnění mohou být kompenzovány vyšším počtem zhodnocených mikrografů. Spolehlivost metody byla úspěšně otestována na antigenech, známých svou účastí v replikaci DNA. Vytvořili jsme také sadu softwarových nástrojů, jednoduchých k ovládní, umožňujících provést celé zhodnocení, počínaje automatickou detekcí zlatých částic až ke statistickému ohodnocení shlukování/kolokalizace a vytvoření grafického znázornění. Tato metoda má velký význam, protože ji může snadno použít kdokoliv, kdo pracuje na transmisním imunoelektronovém mikroskopu, bez potřeby speciálních matematických znalostí.

Použitím vyvinutých stereologických nástrojů jsme úspěšně charakterizovali funkční mikroarchitekturu replikačních a transkripčních míst. Koncem 20. století bylo demonstrováno, že během celé S-fáze je replikace DNA zorganizována v ohniskách skrze nukleoplasmu (Hozák et al., 1993; Hozak et al., 1994; Jackson and Pombo, 1998; Ma et al., 1998; Nakamura et al., 1986; Nakayasu and Berezney, 1989). Nicméně nebylo jasné, jestli tato ohniska představují replikační komplexy, pohybující se podél řetězce DNA, nebo jestli jsou tyto komplexy organizovány do struktur vyššího stupně a nějak fixované v jádře, zatímco templátová DNA jimi prochází. Na ultrastrukturální úrovni jsme zkontrolovali, jestli jsou stopy nascentní DNA významně prodlouženy (což by naznačovalo pohyb polymerizačního komplexu podél templátu), nebo jestli jsou naopak rozloženy radiálně, což by naznačovalo fixovanou 3D-organizaci replikačních míst. Ukázali jsme, že s pokračující replikací se značená místa zvětšují až do 240 nm (30 min inkorporace), udržujíce přitom široce zaokrouhlený tvar. Tyto výsledky demonstrují, že replikace DNA je v rámci jádra kompartmentalizována na úrovni ohnisek DNA a podporují názor, že syntetická centra jsou prostorově vymezena, kdežto smyčky chromatinu jsou během syntézy DNA dynamické. V nedávné době byla replikační místa vizualizována pomocí super-rozlišovací techniky STED (Cseresnyes et al., 2009) a jejich velikost byla změřena. Byla velká asi 150 nm při imunozačnění PCNA a 160 nm při

značení RPA. To je v souladu s našimi údaji, kdy jsme vizualizovali smyčky nascentní DNA, ale ne samotnou replikaci. Jaunin et al. (2000) demonstrovali za použití metody "pulse-chase-pulse", že značení nascentní DNA se nachází primárně v oblasti perichromatinu a že replikovaná DNA se pak přesunuje do sousední oblasti, bohaté na chromatin. Navzdory skutečnosti, že DNA replikace organizovaná do ohnisek nebyla prokázána, obě práce podporují hypotézu, že replikace probíhá v rámci definovaného inter-chromatinového kompartmentu, tak, že během replikace musí být DNA přemístěna ze sousedního kompartmentu bohatého na chromatin do aktivního místa na hranici domény chromatinu.

Složení těchto vázaných replikačních komplexů nebylo známo. Díky nově vyvinuté metodě (Philimonenko et al., 2000) a docela rozsáhlé knihovně primárních protilátek proti četným strukturním a regulačním proteinům, dobře fungujících na materiálu zalitým do pryskyřice LR White, jsme měli možnost odhalit molekulární složení replikačních továren a navrhnout nové hráče v daném procesu. Demonstrovali jsme, že v jádrech buněk HeLa mohou být pozorovány dva ultrastrukturálně se lišící typy replikačních míst: denzní struktury (Hozák et al., 1993; Hozák et al., 1994), zde pojmenované jako replikační tělíska (RB - replication bodies), a replikační ohniska (RF - replication foci), které odpovídají místům značení nascentní DNA mimo tělíska a nemají žádnou typicky zahuštěnou strukturu v pozadí. Funkční rozdíly mezi těmito dvěma replikačními strukturami stále nejsou známy, nicméně mohou být navrženy. Přesto, že oba typy replikačních míst obsahují uprostřed S-fáze očekávanou sadu syntetických a regulačních nukleárních proteinů, našli jsme mezi nimi také významné rozdíly. Jak se očekávalo, DNA polymeráza α a PCNA silně kolokalizovaly s nascentní DNA v RF a byly pozorovány ve velkém množství v RB. Regulační buněčného cyklu cyclin A a cyclin E byly také detekovány uprostřed S-fáze v obou typech replikačních míst. Ačkoliv nebyla demonstrována žádná přímá funkce v replikaci DNA pro Sm, Coilin a La proteiny (všechny tři jsou zahrnuty v metabolismu RNA), ukázali jsme jejich vysokou kolokalizaci s replikačními místy obou typů. To může být vysvětleno skutečností, že replikace a transkripce často kolokalizují (Hassan et al., 1994), a že splicing je zahájen před dokončením transkripce nascentní RNA (Wuarin a Schibler, 1994). Tyto výsledky naznačují existenci funkčních domén v buněčném jádře, kde mohou být různé procesy, propojené substrátem či účastníky se faktory, prostorově uspořádány velmi ekonomickým způsobem.

Laminy typu B (ale ne A/C) byly dříve lokalizovány, za použití imunofluorescence, v myších 3T3-buňkách v replikačních místech střední až pozdní S-fáze. (Moir et al., 1994). My jsme ukázali přítomnost laminu B1 v RF, ale ne v RB, což naznačuje, že v RB je strukturální organizace replikace udržována odlišnou sadou proteinů.

PML protein je lidský růstový supresor a je soustředěn hlavně ve speciálních strukturách - PML tělískách. Specifické funkce PML proteinu nejsou známy, ale PML tělíska byla spojena s

procesy jako alternativní prodlužování telomér v savčích buňkách (Henson et al., 2002), replikace virové DNA a post-replikační procesy (Jul-Larsen et al., 2004; Maul, 1998). Bylo také ukázáno, že velká část PML tělísek (50–80%) je těsně spojena s doménami replikace DNA, ale výhradně během střední až pozdní S-fáze (Grande et al., 1996). Naše pokusy demonstrovaly, že pouze RF kolokalizují s proteinem PML. Myslíme si, že odstraňovací a podpůrné mechanismy v RB jsou zajištěny jejich vlastní strukturou, kdežto RF možná potřebují spojení s PML. Navíc přímý a nepřímý důkaz podporuje hypotézu že PML tělíska interagují se specifickými geny či genomovými lokusy (reviewed in Ching et al., 2005). Takže replikace takových genů by také mohla nastat ve spojení s PML tělísky a my navrhuje, že jsou replikovány v RF, ale ne v RB.

Závěrem navrhuje, že existence dvou typů replikačních míst reflektuje rozdíly ve struktuře genomových oblastí, které jsou v nich replikovány. RB mohou představovat hlavní replikační struktury a být zodpovědné za replikaci většího množství DNA, což je organizováno takovým způsobem, že shluky replikonů jsou v každém RB replikovány společně. Naproti tomu RF jsou menší a méně složité struktury, které, zdá se, provádějí replikaci izolovaných replikonů či replikonových shluků s velmi málo spojenými replikony.

Bylo ukázáno, že aktin je pro transkripci polymerázou I, II a III nepostradatelný (Fomproix and Percipalle, 2004; Hofmann et al., 2004; Hu et al., 2004; Philimonenko V. et al., 2004) a nukleární myosin I (NMI) se účastní transkripce polymerázou I a II (Castano et al., 2010; de Lanerolle, 2012; Pestic-Dragovich et al., 2000; Philimonenko V. et al., 2004). V této studii jsme na modelu PHA-stimulovaných lidských lymfocytů odhalili dynamické vlastnosti nukleárního aktinu a NMI. Po stimulaci dochází v lymfocytech k rapidní transkripční aktivaci, provázené dramatickými změnami v morfologii jádra a jadérka.

V jadérku byl NMI lokalizován především v DFC, což je místo transkripce rRNA. Lokalizace NMI a jeho nahromadění v DFC během transkripční aktivace je v souladu s jeho rolí při syntéze rRNA, anebo to může také indikovat účast NMI v časných stádiích procesování prekursorů rRNA. Důležité je, že NMI je spojen s transkripčním faktorem TIF-IA, základním transkripčním faktorem, který propůjčuje iniciační kompetenci polymeráze I a zprostředkovává regulaci syntézy rRNA závislou na růstu (Philimonenko V. et al., 2004). Takže regulační role NMI v aktivaci transkripce ribosomálních genů ve stimulovaných lidských lymfocytech nemůže být vyloučena.

Aktin a NMI jsou v klidových buňkách nahromaděny převážně v doménách kondenzovaného chromatinu a méně jich je v oblastech obsahujících dekonenzovaný chromatin. Naše údaje, ukazující, že aktin je obohacen v kondenzovaném chromatinu, také odpovídají dřívějším pozorováním, která odhalila spojení aktinu-příbuzného proteinu Arp4 se středovým heterochromatinem a kolokalizaci Arp4 s heterochromatinovým proteinem HP1 u *Drosophila* (Frankel et

al., 1997). Jedna z funkcí aktinu v chromatinu by mohla souviset se spojením aktinu a Ino80 chromatin-remodelizujícím komplexem (Kapoor and Shen, 2014; Treisman, 2013). Ačkoliv role NMI v remodelování chromatinu byla zatím demonstrována jenom pro nukleolární geny (Percipalle et al., 2006; Sarshad et al., 2013), je NMI také obohacen v kondenzovaném chromatinu nestimulovaných lymfocytů. Transkripční aktivace lidských lymfocytů vede k přemístění aktinu i NMI do oblasti dekonenzovaného chromatinu. Jak aktin, tak NMI kolokalizují s transkripčními místy v nukleoplasmě aktivovaných lidských lymfocytů. V klidových buňkách byl ale detekován v transkripčních místech pouze aktin. Vysoké množství NMI v heterochromatinu klidových lymfocytů naznačuje, že heterochromatin možná představuje zásobní místo NMI, který je po stimulaci přemístěn do jaderných kompartmentů s aktivní transkripcí DNA. Tyto výsledky demonstrují, že aktin a NMI jsou v jádře kompartmentalizovány a mohou se dynamicky přemisťovat v závislosti na transkripční aktivitě buněk.

Za účelem získání nástroje pro současné značení více než tří antigenů jsme připravili tři nové typy konjugovaných kovových nanočástic, lišících se svými tvary, a proto při použití TEM pohotově rozlišitelných navzájem i od komerčně dostupných kulatých zlatých nanočástic. Nové nanočástice - kubické paládiové nanočástice (PdC), dvojrstevné nanočástice se zlatým povrchem a stříbrným jádrem (AgAu) a zlaté tyčinkovité nanočástice (AuNR) - splnily všechna požadovaná kritéria jako jsou vhodné rozmezí velikostí, stabilita v roztocích a po vystavení elektronovému paprsku v TEM a úspěšná konjugace s protilátkami a tedy vhodnost pro imunodetekci.

Otestovali jsme tento nástroj na imunoznačení pěti buněčných antigenů současně: PIP2, B23, aktin, Sm protein a SMC2. Protože role PIP2 v buněčném jádře je stále nejasná, zajímaly nás zvláště prostorové interakce PIP2-obsahujících struktur s ostatními čtyřmi proteiny, jejichž funkce jsou známy. V některých případech byly pozorovány kolokalizace dvou až tří typů značených molekul v rámci malých struktur ve vzdálenostech <100 nm. PIP2-positivní ohniska se nacházela většinou v těsném kontaktu s ohnisky bohatými na SM, aktin, anebo SMC2, tvořící komplementární 3D-domény. Protože mechanismus kompartmentalizace PIP2 v buněčném jádře zůstává značně neznámý (Barlow et al., 2010), toto zjištění komplementární lokalizace výše zmíněných druhů molekul v jaderných pod-odděleních může trochu osvětlit prostorovou organizaci relevantních buněčných procesů.

Uvedená metoda pro násobné imunoznačení významně posunuje vpřed možnosti stereologické analýzy vzájemné distribuce žádoucích molekul v biologických objektech. Zatímco dvojitě značení umožňuje analýzu jednoho typu prostorových interakcí mezi různými molekulami a dvou typů interakcí mezi molekulami téhož typu, zvyšuje se při pětinasobném značení možný počet stanovených interakcí až na deset a pět, přinášejíce podrobnější pochopení mikroarchitektury funkčních domén v buňce.

Kvalita detekce antigenu je významně ovlivněna přípravou vzorku pro ultrastrukturální imunohistochemii. Každý krok celého procesu má svůj vliv, klíčová je ale metoda fixace, druh použité pryskyřice, podmínky dehydratace a infiltrace pryskyřicí (Skepper, 2000; Webster et al., 2008). Provedli jsme kvantitativní ohodnocení vlastností pro imunoznačení u čtyř různých akrylových pryskyřic – LR White, LR Gold, Lowicryl HM20 a Lowicryl K4M – po mírné chemické fixaci, nebo po fyzické fixaci zmražením pod vysokým tlakem.

Abychom odhalili potenciální výhodu některých pryskyřic před ostatními, analyzovali jsme nanostrukturu pryskyřice pomocí mikroskopie atomárních sil. LR White, LR Gold a Lowicryl HM20 ukázaly jemně zrnitou strukturu (laterální rozměr granulí byl ~20 nm) a faktor zrnitosti byl ve všech třech případech stejný. Tyto výsledky tedy neukázaly žádné zřejmé povrchové rozdíly mezi testovanými pryskyřicemi.

Potom jsme kvantifikovali intenzitu imunogold-značení na ultratenkých řezech buněk HeLa, zalitých v pryskyřicích LR White, LR Gold, Lowicryl HM20, nebo Lowicryl K4M po chemické fixaci nebo zmražení pod vysokým tlakem. Byla analyzována hustota značení čtyř různých antigenů – DNA, hnRNP C1/C2, histonu H1 a Sm. Ve většině případů byly mezi srovnávanými pryskyřicemi pozorovány významné, i když ne velmi dramatické, rozdíly. Žádná ze studovaných pryskyřic nevykázala zřetelně lepší výsledky, než ostatní. Variace v projevech pryskyřic byly silně závislé na antigenu. Značení se také lišilo v závislosti na použité fixaci. Obecně můžeme říct, že projev pryskyřic pro různé antigeny byl jednodušší po chemické fixaci a variabilnější po zmražení pod vysokým tlakem a kryosubstituci.

Co by mohlo být příčinou pozorovaných variací? Důvod zřejmě není spojen s povrchovou plochou a přístupností antigenu na řezu, protože jsme nedetkovali zřejmé rozdíly v nanostruktuře pryskyřic. Rozdíl tedy musí být způsoben dřívějšími kroky přípravy vzorku. Předpokládáme, že různé antigeny mají různou sensitivitu vůči extrakci během infiltrace pryskyřicí. Byly popsány význačné extrakční vlastnosti monomerních akrylových pryskyřic (Hamilton et al., 1992). To by vysvětlilo jednodušší výsledky u chemicky fixovaných vzorků, kde jsou možná lehce kroslinkované molekuly odolnější vůči extrakci. V buňkách, zmražených pod vysokým tlakem, by pak tyto efekty byly výraznější, což odpovídá našemu pozorování. Ve shrnutí - pro rutinní použití může být doporučena nízkotoxická pryskyřice LR White, protože všechny testované pryskyřice vykázaly celkově podobné výsledky. Nicméně, pro optimální detekci některých antigenů mohou být nutné jiné pryskyřice a to by mělo být testováno individuálně.

Protože kryofixace je považována za vhodnější pro přípravu biologických vzorků, soustředili jsme se dále na hledání optimálních podmínek pro automatizovanou kryosubstituci (FS). Detekovali

jsme různé jaderné antigeny na ultratenkých řezech buněk HeLa, zmražených pod vysokým tlakem, zpracovaných za použití tří různých médií pro automatizovanou kryosubstituci a zalitých do pryskyřice LR White. Souběžně byly srovnány celkové koncentrace proteinů ve vzorcích před zmražením, bezprostředně po zmražení a po jejich zpracování za použití každého z FS médií, aby se určily kritické kroky, které nejvíce přispívají ke ztrátě antigenů. Hawes et al. (2007) uvážili, že experimentální požadavky immunogold-značení a morfologie se vzájemně vylučují a navrhli, že pro současné dosažení viditelné ultrastruktury a úspěšného imunoznačení je nevyhnutelné přidat do FS media osmium (0.1–2%) nebo uranyl acetát (0.2%). Jiní autoři však navrhuji, že dobře zachovaná ultrastruktura koreluje s udržení antigenicity jaderných cílů i bez použití jakéhokoliv cross-linking fixativa (Agarwal et al., 2009; Sobol et al., 2010). Zhodnotili jsme různé protokoly automatizované FS pro přípravu biologických vzorků na imunoelektronovou mikroskopii na základě kvantitativního ohodnocení značení a obsahu antigenů. Extrakce proteinů z kryo-imobilizovaných buněk byla identifikována jako kritický bod během kryosubstituce. Ztráta antigenů pro immunogold-značení nebyla zmražením pod vysokým tlakem významně ovlivněna, kdežto kryosubstituce s acetonem způsobila signifikantní ztrátu antigenů. Zatímco přidání vody může zlepšit viditelnost některých buněčných struktur, zesílilo to negativní efekt kryosubstituce na ztrátu antigenů extrakcí. Všechny čtyři studované jaderné antigeny demonstrovaly nižší hustotu immunogold-značení, když byl aceton doplněn jedním procentem vody. Přidání 0,5% glutaraldehydu do acetonu s 1,5% vody však výsledek významně převrátilo a v případě protilátek anti-histon H3 a anti-RNA polymeráza II CTD způsobilo dokonce až 50%-zvýšení hustoty značení. Závěrem – obecně mohou být doporučeny pro kryosubstituce nízké koncentrace glutaraldehydu, spíše než čistá rozpouštědla, ale přesné podmínky je třeba pro určité antigeny optimalizovat.

SHRnutí A Závěry

1. Byla vyvinuta komplexní stereologická metoda pro statistické zhodnocení shlukování a kolokalizace antigenů v biologických vzorcích, včetně uživatelsky přijatelného rozhraní. Vyvinuli jsme dvě zdola-cenzurované K-funkce. $K^{-1}(r_1, r_2)$ poskytuje grafické znázornění shlukování/kolokalizace. $K(r_1, r_2)$ je vhodná pro testování statistické významnosti pozorovaného značení a pomáhá překonat problém efektů krátkého rozmezí. Na výpočty K-funkce i K^{-1} funkce byla aplikována korekce pro efekt rozhraní. Naši metodu jsme úspěšně otestovali na modelu replikace DNA. Na základě této metody byly vyvinuty softwarové nástroje, které umožňují provést celý hodnotící proces, počínaje automatickou detekcí zlatých částic až ke statistickému zpracování a vytvoření grafů a jsou uživatelsky přijatelné.

2. S použitím vyvinutých stereologických nástrojů byla úspěšně charakterizována funkční mikroarchitektura replikačních a transkripčních míst. V HeLa buňkách jsme ultrastrukturálně demonstrovali, že během replikace se značená místa zvětšují až do 400 nm, zatímco si udržují široce okrouhlý tvar. Replikace DNA je kompartmentalizována v rámci buněčného jádra na úrovni ohnisek DNA a podporuje názor, že syntetická centra jsou prostorově vymezena, kdežto smyčky chromatinu jsou během syntézy DNA dynamické. Elektronovou mikroskopií je možno rozlišit dva morfologické typy replikačních míst (replikační tělíška - RB a replikační ohniska - RF). RB představuje hlavní replikační struktury v buňkách HeLa a jsou odpovědné za replikaci většiny DNA. Mají specifickou ultrastrukturu jaderných tělíšek. Naproti tomu RF, jsou menší, méně komplexní struktury, bez prominentní struktury v pozadí. RB i RF obsahují sadu enzymatických, strukturálních a regulačních proteinů, o nichž je známo, že se účastní vlastní replikace nebo regulace S-fáze. Nicméně, některé regulační a strukturální proteiny byly nalezeny v replikačních místech jenom jednoho typu. Aktin i NMI kolokalizují s transkripčními místy v nukleoplasmě aktivovaných lidských lymfocytů, což je v souladu s významem obou proteinů pro transkripci. V klidových buňkách byl však v transkripčních místech nalezen pouze aktin. Vysoký obsah NMI v heterochromatinu klidových lymfocytů může naznačovat, že heterochromatin představuje zásobní místo pro NMI, který je pak po stimulaci přemístěn do jaderných kompartmentů s aktivní transkripcí DNA.

3. Bylo zrealizováno simultánní mnohonásobné ultrastrukturální imunoznačení pěti jaderných antigenů. Byly nasyntetizovány tři nové typy stabilních nanočástic snadno rozlišitelných v konvenčním TEM podle tvaru (dvojvrstvé AgAu nanočástice se zlatým povrchem a stříbrným jádrem, zlaté tyčinkovité AuNR nanočástice a kubické paládiové PdC nanočástice). Nanočástice pak byly úspěšně otestovány na použitelnost při ultrastrukturálním imunoznačení. Na chemicky fixovaných ultratenkých řezech buněk HeLa, zalitých v pryskyřici LR White, byly při ultrastrukturálním rozlišení simultánně detekovány PIP2, B23, aktin, Sm protein a SMC2. PIP2-pozitivní ohniska se nacházela většinou v těsném kontaktu s ohnisky bohatými na Sm, aktin, anebo SMC2, tvoříce komplementární 3D-domény.

4. Optimalizovali jsme proces zalévání biologických vzorků do pryskyřice pro imunoznačení. Pryskyřice LR White je vhodná pro zalévání vzorku jak po chemické fixaci, tak po kryofixaci. Pro některé antigeny by ale mohla mít přednost pryskyřice Lowicryl HM 20. Přidání 1,5% vody a 0,5% glutaraldehydu do acetonu pro kryosubstituci zlepší ve většině případů uchování antigenu, jak ukazuje immunogold-značení a biochemická kvantifikace množství proteinu.

PERSPEKTIVA / VYHLÍDKY DO BUDOUCNA

Naše nově vyvinuté a optimalizované metody přípravy vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii a stereologické metody zvýšily možnosti analýzy biologických vzorků. Pro úspěšné získání ještě komplexnějších informací o prostorových interakcích funkčních molekul v biologickém materiálu se nabízejí další řešení:

1. Vyvinutí metod, umožňujících komplexní analýzu biologických vzorků v 3D.

Detekce antigenu v objemu biologických vzorků představuje pro současnou elektronovou mikroskopii jednu z největších výzev. Možnosti detekce násobných antigenů v objemu vzorku prostřednictvím imunoznačení před zalitím vzorku do pryskyřice jsou technicky omezené. Plánujeme vyvinout spolehlivou metodu s kombinací imunoznačení před- a pozalítí vzorku do pryskyřice, což by nám umožnilo získat informace o mnoha antigenech současně, jeden v 3D a až čtyři ve 2D. Dalším směrem bude testování různých markerů pro detekci, pro značení intrabuněčných struktur před zalitím do pryskyřice. Toto však může být omezeno nízkou penetrací markerů spojenou s jejich rostoucí velikostí. Podstatným úkolem bude vytvoření 3D prostorových algoritmů, umožňujících statistické hodnocení značení v objemu vzorku.

2. Vyvinutí metod pro korelativní světelnou a elektronovou mikroskopii

Korelativní světelná-elektronová mikroskopie je efektivní nástroj pro studování vztahů mezi strukturou a funkcí při různých hladinách rozlišení. Tento přístup je zvláště užitečný pro analýzu vzácných událostí v buněčné populaci a pro korelaci pozorování na živých buňkách s analýzou sub-nanometrického rozlišení. Plánujeme vypracovat metody přípravy vzorků pro korelativní světelnou a transmisní elektronovou mikroskopii, které by umožnily uchování nejlepší ultrastruktury a současné značení mnohých antigenů za použití našich nových přístupů.

PŘEHLED POUŽITÝCH METOD

Kultivace buněk
Izolace lidských lymfocytů
DNA replikace v permeabilizovaných buňkách
Značení nově syntetizovaných transkriptů v nepermeabilizovaných buňkách
Transmisní elektronová mikroskopie
Vysokotlakové zamrazování
Mrazová substituce
Imunoznačení na tenkých řezech
SDS-PAGE
Imunoblotování
Izolace RNA a RT-qPCR
Morfometrie a prostorová statistika
Syntéza nanočástic ve vodních roztocích
Konjugace protilátek na nanočástice

SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments

Philimonenko, A. A., Janacek, J., and Hozak, P.

Journal of Structural Biology 132, 201-210, 2000

IF: 3.36 (2012)

A. Ph. prováděl experimenty s imunoznačením, pořizoval TEM obrázky vzorků, účastnil se diskusí v průběhu vývoje statistické metody, napsal biologickou část článku.

2. Dynamics of DNA replication: an ultrastructural study

Philimonenko, A. A., Jackson, D. A., Hodny, Z., Janacek, J., Cook, P. R., and Hozak, P.

Journal of Structural Biology 148, 279-289, 2004

IF: 3.36 (2012)

A. Ph. prováděl experimenty s imunoznačením, pořizoval TEM obrázky vzorků a vyhodnocoval je statisticky, napsal článek spolu s Z. H.

3. The microarchitecture of DNA replication domains

Philimonenko, A. A., Hodny, Z., Jackson, D. A., and Hozak, P.

Histochemistry and cell biology 125, 103-117, 2006

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. prováděl experimenty s imunoznačením, pořizoval TEM obrázky vzorků a vyhodnocoval je statisticky, napsal článek spolu s Z. H.

4. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell

Kysela, K., Philimonenko, A. A., Philimonenko, V. V., Janacek, J., Kahle, M., and Hozak, P.

Histochemistry and Cell Biology 124, 347-358, 2005

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. statisticky vyhodnocoval rozložení imunoznačení aktinu a NMI v kompartmentech buněčného jádra.

5. Preparation of stable Pd nanoparticles with tunable size for multiple immunolabeling in biomedicine

Slouf, M., Pavlova, E., Bhardwaj, M.S., Plestil, J., Onderkova, H., Philimonenko A. A., Hozak P.

Materials Letters 65, 1197-1200, **2011**

IF: 2.22 (2012)

A. Ph. prováděl konjugaci protilátek na nanočástice včetně titrace a saturace analyzovaných pomocí SDS-PAGE, prováděl a vyhodnocoval experimenty s imunozačením.

6. Preparation of stable Pd nanocubes and their use in biological labeling

Slouf, M., Hruby, M., Bakaeva, Z., Vlkova, H., Nebesarova, J., Philimonenko, A. A., and Hozak, P.

Colloids and surfaces B, Biointerfaces 100, 205-208, **2012**

IF: 3.55 (2012)

A. Ph. prováděl konjugaci protilátek na nanočástice včetně titrace a saturace analyzovaných pomocí SDS-PAGE, prováděl a vyhodnocoval experimenty s imunozačením.

7. Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry

Philimonenko, V. V., Philimonenko, A. A., Sloufova, I., Hruby, M., Novotny, F., Halbhuber, Z., Krivjanska, M., Nebesarova, J., Slouf, M., and Hozak, P.

Histochemistry and Cell Biology 141, 229-239, **2014**

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. prováděl konjugaci protilátek na nanočástice včetně titrace a saturace analyzovaných pomocí SDS-PAGE, účastnil se plánování a vyhodnocování experimentů s imunozačením.

8. Quantitative evaluation of freeze-substitution effects on preservation of nuclear antigens during preparation of biological samples for immunoelectron microscopy

Sobol, M. A., Philimonenko, V. V., Philimonenko, A. A., and Hozak, P.

Histochemistry and Cell Biology 138, 167-177, **2012**

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. prováděl experimenty s imunozačením, pořizoval TEM obrázky vzorků a vyhodnocoval intenzity imunozačení.

9. Comparing immunolabeling properties in HeLa cells embedded in LR White, Lowicryl, or LR Gold resins after chemical or physical fixation

Philimonenko, A. A., Philimonenko, V. V., Janda, P., and Hozak, P.

Manuscript

A. Ph. prováděl experimenty s imunozačením, pořizoval TEM obrázky vzorků, vyhodnocoval intenzity imunozačení, napsal článek spolu s V. Ph.

ŽIVOTOPIS

Jméno: Anatoly A. Filimonenko

Adresa: Department of Biology of the Cell Nucleus
Institute of Molecular Genetics
Videnska 1083
14220 Prague 4
Czech Republic

E-mail: anatoly.philimonenko@img.cas.cz

Vzdělání: 1986-1992 Study at the Leningrad State University, Leningrad, Russia
1988-1992 M.Sc. thesis, Department of Genetics, Leningrad State University
1992-1995 Postgraduate student, Laboratory of Evolutionary Animal Genetics,
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

October 1996 – September 2010 External postgraduate student, 1st Medical Faculty, Charles
University, Prague, Czech Republic

October 2011 – present External postgraduate student, Faculty of Science, Charles
University, Prague, Czech Republic

SEZNAM VŠECH PUBLIKACÍ AUTORA

1. Osadchuk, L.V., L. Jalkanen, A.A. Filimonenko, and V.V. Gul'tiaeva. **1995**. [The reproductive function of young male silver foxes *Vulpes vulpes* after long-term selection for domesticated behavior]. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 31:662-667.
2. Osadchuk, L.V., V.V. Gul'tiaeva, A.A. Filimonenko, and L. Jalkanen. **1996**. [Spermatogenesis and the testosterone level in young male silver foxes in their reproductive period]. *Fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova / Rossiiskaia akademiia nauk*. 82:102-108.
3. Nowak, G., L. Pestic-Dragovich, P. Hozak, A. Philimonenko, C. Simerly, G. Schatten, and P. de Lanerolle. **1997**. Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *The Journal of biological chemistry*. 272:17176-17181. **IF: 4.66**
4. Novikov, S.N., G.A. Churakov, A.A. Filimonenko, and V.E. Sukonina. **2000**. Organ specificity of the Gus gene expression under the effect of testosterone as related to the activity of lysosomal beta-glucuronidase (EC 3.2.1.31) and of androgen-dependent pheromones in laboratory mice. *Doklady biological sciences : proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections / translated from Russian*. 374:452-454.
5. Pestic-Dragovich, L., L. Stojiljkovic, A.A. Philimonenko, G. Nowak, Y. Ke, R.E. Settlege, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, P. Hozak, and P. de Lanerolle. **2000**. A myosin I isoform in the nucleus. *Science*. 290:337-341. **IF: 31.03**
6. Philimonenko, A.A., J. Janacek, and P. Hozak. **2000**. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *Journal of structural biology*. 132:201-210. **IF: 3.36**

7. Philimonenko, A.A., D.A. Jackson, Z. Hodny, J. Janacek, P.R. Cook, and P. Hozak. **2004**. Dynamics of DNA replication: an ultrastructural study. *Journal of structural biology*. 148:279-289. **IF: 3.36**
8. Kysela, K., A.A. Philimonenko, V.V. Philimonenko, J. Janacek, M. Kahle, and P. Hozak. **2005**. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochemistry and cell biology*. 124:347-358. **IF: 2.63**
9. Philimonenko, A.A., Z. Hodny, D.A. Jackson, and P. Hozak. **2006**. The microarchitecture of DNA replication domains. *Histochemistry and cell biology*. 125:103-117. **IF: 2.63**
10. Novikov, S.N., G.A. Churakov, A.A. Filimonenko, Ermakova, II, E.M. Fedorova, and I.A. Burkot. **2009**. [The pattern of major urinary proteins (MUPS) expression during postnatal ontogenesis of a laboratory mouse depends on genotype and sex]. *Ontogenez*. 40:261-269.
11. Manaskova-Postlerova, P., N. Davidova, M. Sulc, A. Philimonenko, P. Hozak, and V. Jonakova. **2011**. Reproductive tissue expression and sperm localization of porcine beta-microseminoprotein. *Cell and tissue research*. 344:341-353. **IF: 3.68**
12. Philimonenko, A.A., J. Janacek, L. Snyers, M. Almeder, W. Berger, W. Schmidt, C. Schofer, P. Hozak, and K. Weipoltshammer. **2011**. Chromosomal dynamics of cell cycle regulator gene p21 during transcriptional activation. *Journal of structural biology*. 173:382-390. **IF: 3.36**
13. Rohlena, J., L.F. Dong, K. Kluckova, R. Zobalova, J. Goodwin, D. Tilly, J. Stursa, A. Pecinova, A. Philimonenko, P. Hozak, J. Banerjee, M. Ledvina, C.K. Sen, J. Houstek, M.J. Coster, and J. Neuzil. **2011**. Mitochondrially targeted alpha-tocopheryl succinate is antiangiogenic: potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antioxidants & redox signaling*. 15:2923-2935. **IF: 7.19**
14. Slouf, M., E. Pavlova, M.S. Bhardwaj, J. Plestil, H. Onderkova, A.A. Philimonenko, and P. Hozak. Preparation of stable Pd nanoparticles with tunable size for multiple immunolabeling in biomedicine. **2011**. *Materials Letters*. 65:1197-1200. **IF: 2.22**
15. Horejsi, B., S. Vinopal, V. Sladkova, E. Draberova, V. Sulimenko, T. Sulimenko, V. Vosecka, A. Philimonenko, P. Hozak, C.D. Katsetos, and P. Draber. **2012**. Nuclear gamma-tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein C53. *Journal of cellular physiology*. 227:367-382. **IF: 4.22**
16. Slouf, M., M. Hruby, Z. Bakaeva, H. Vlkova, J. Nebesarova, A.A. Philimonenko, and P. Hozak. **2012**. Preparation of stable Pd nanocubes and their use in biological labeling. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 100:205-208. **IF: 3.55**
17. Sobol, M.A., V.V. Philimonenko, A.A. Philimonenko, and P. Hozak. **2012**. Quantitative evaluation of freeze-substitution effects on preservation of nuclear antigens during preparation of biological samples for immunoelectron microscopy. *Histochemistry and cell biology*. 138:167-177. **IF: 2.63**
18. Hartlova, A., M. Link, J. Balounova, M. Benesova, U. Resch, A. Straskova, M. Sobol, A. Philimonenko, P. Hozak, Z. Krocova, N. Gekara, D. Filipp, and J. Stulik. **2014**. Quantitative proteomics analysis of macrophage-derived lipid rafts reveals induction of autophagy pathway at the early time of Francisella tularensis LVS infection. *Journal of proteome research*. 13:796-804. **IF: 5.06**
19. Philimonenko, V.V., A.A. Philimonenko, I. Sloufova, M. Hruby, F. Novotny, Z. Halbhuber, M. Krivjanska, J. Nebesarova, M. Slouf, and P. Hozak. **2014**. Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry. *Histochemistry and cell biology*. 141:229-239. **IF: 2.63**
20. Philimonenko, A.A., V.V. Philimonenko, P. Janda, and P. Hozak. Comparing immunolabelling properties in HeLa cells embedded in LR White, Lowicryl, or LR Gold resins after chemical or physical fixation. Manuscript.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Acetarin, J.D., E. Carlemalm, and W. Villiger. 1986. Developments of new Lowicryl resins for embedding biological specimens at even lower temperatures. *Journal of microscopy*. 143:81-88.
- Agarwal, R., S. Ortleb, J.K. Sainis, and M. Melzer. 2009. Immunoelectron microscopy for locating calvin cycle enzymes in the thylakoids of *synechocystis* 6803. *Molecular plant*. 2:32-42.
- Azorin, I., M. Portoles, P. Marin, F. Lazaro-Dieguez, L. Megias, G. Egea, and J. Renau-Piqueras. 2004. Prenatal ethanol exposure alters the cytoskeleton and induces glycoprotein microheterogeneity in rat newborn hepatocytes. *Alcohol Alcohol*. 39:203-212.
- Barlow, C.A., R.S. Laishram, and R.A. Anderson. 2010. Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum. *Trends in cell biology*. 20:25-35.
- Biggiogera, M., and S. Fakan. 1998. Fine structural specific visualization of RNA on ultrathin sections. *J Histochem Cytochem*. 46:389-395.
- Bittermann, A.G., G. Knoll, A. Nemeth, and H. Plattner. 1992. Quantitative immuno-gold labelling and ultrastructural preservation after cryofixation (combined with different freeze-substitution and embedding protocols) and after chemical fixation and cryosectioning. Analysis of the secretory organelle matrix of *Paramecium trichocysts*. *Histochemistry*. 97:421-429.
- Brilakis, H.S., C.R. Hann, and D.H. Johnson. 2001. A comparison of different embedding media on the ultrastructure of the trabecular meshwork. *Curr Eye Res*. 22:235-244.
- Brorson, S.H. 1999. Fixative-dependent increase in immunogold labeling following antigen retrieval on acrylic and epoxy sections. *Biotech Histochem*. 74:248-260.
- Busch, H., Smetana, K. 1970. The nucleolus. Academic, New York
- Carlemalm, E., W. Villiger, J.A. Hobot, J.D. Acetarin, and E. Kellenberger. 1985. Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. *Journal of microscopy*. 140:55-63.
- Castano, E., V.V. Philimonenko, M. Kahle, J. Fukalova, A. Kalendova, S. Yildirim, R. Dzajak, H. Dingova-Krasna, and P. Hozak. 2010. Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field. *Histochemistry and cell biology*. 133:607-626.
- Chang, P., T.H. Giddings, Jr., M. Winey, and T. Stearns. 2003. Epsilon-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nature cell biology*. 5:71-76.
- Ching, R.W., G. Delleire, C.H. Eskiw, and D.P. Bazett-Jones. 2005. PML bodies: a meeting place for genomic loci? *Journal of cell science*. 118:847-854.
- Cseresnyes, Z., U. Schwarz, and C.M. Green. 2009. Analysis of replication factories in human cells by super-resolution light microscopy. *BMC cell biology*. 10:88.
- de Lanerolle, P. 2012. Nuclear actin and myosins at a glance. *Journal of cell science*. 125:4945-4949.
- Eppenberger-Eberhardt, M., S. Aigner, M.Y. Donath, V. Kurer, P. Walther, C. Zuppinger, M.C. Schaub, and H.M. Eppenberger. 1997. IGF-I and bFGF differentially influence atrial natriuretic factor and alpha-smooth muscle actin expression in cultured atrial compared to ventricular adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 29:2027-2039.
- Fomproix, N., and P. Percipalle. 2004. An actin-myosin complex on actively transcribing genes. *Experimental cell research*. 294:140-148.
- Frankel, S., E.A. Sigel, C. Craig, S.C. Elgin, M.S. Mooseker, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. An actin-related protein in *Drosophila* colocalizes with heterochromatin protein 1 in pericentric heterochromatin. *Journal of cell science*. 110 (Pt 17):1999-2012.
- Gathercole, D.V., D.J. Colling, J.N. Skepper, Y. Takagishi, A.J. Levi, and N.J. Severs. 2000. Immunogold-labeled L-type calcium channels are clustered in the surface plasma membrane overlying junctional sarcoplasmic reticulum in guinea-pig myocytes-implications for excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 32:1981-1994.

- Grande, M.A., I. van der Kraan, B. van Steensel, W. Schul, H. de The, H.T. van der Voort, L. de Jong, and R. van Driel. 1996. PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem.* 63:280-291.
- Hainfeld, J.F. 1987. A small gold-conjugated antibody label: improved resolution for electron microscopy. *Science.* 236:450-453.
- Hamilton, G., B. Hamilton, and R. Mallinger. 1992. Effects of monomeric acrylic embedding media on the antigenicity of two epitopes of the MIC2-encoded Ewing's sarcoma cell membrane antigen. *Histochemistry.* 97:87-94.
- Hassan, A.B., R.J. Errington, N.S. White, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1994. Replication and transcription sites are colocalized in human cells. *Journal of cell science.* 107 (Pt 2):425-434.
- Hawes, P., C.L. Netherton, M. Mueller, T. Wileman, and P. Monaghan. 2007. Rapid freeze-substitution preserves membranes in high-pressure frozen tissue culture cells. *Journal of microscopy.* 226:182-189.
- Henson, J.D., A.A. Neumann, T.R. Yeager, and R.R. Reddel. 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene.* 21:598-610.
- Hess, M.W. 2003. Of plants and other pets: practical aspects of freeze-substitution and resin embedding. *Journal of microscopy.* 212:44-52.
- Hess, M.W., M. Muller, P.L. Debbage, M. Vetterlein, and M. Pavelka. 2000. Cryopreparation provides new insight into the effects of brefeldin A on the structure of the HepG2 Golgi apparatus. *Journal of structural biology.* 130:63-72.
- Hess, S.T., M. Kumar, A. Verma, J. Farrington, A. Kenworthy, and J. Zimmerberg. 2005. Quantitative electron microscopy and fluorescence spectroscopy of the membrane distribution of influenza hemagglutinin. *The Journal of cell biology.* 169:965-976.
- Hofmann, W.A., L. Stojiljkovic, B. Fuchsova, G.M. Vargas, E. Mavrommatis, V. Philimonenko, K. Kysela, J.A. Goodrich, J.L. Lessard, T.J. Hope, P. Hozak, and P. de Lanerolle. 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nature cell biology.* 6:1094-1101.
- Hohenberg, H., K. Mannweiler, and M. Muller. 1994. High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes. *Journal of microscopy.* 175:34-43.
- Hohenberg, H., M. Tobler, and M. Muller. 1996. High-pressure freezing of tissue obtained by fine-needle biopsy. *Journal of microscopy.* 183:133-139.
- Hozák, P., A.B. Hassan, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1993. Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell.* 73:361-373.
- Hozák, P., D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1994. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *Journal of cell science.* 107 (Pt 8):2191-2202.
- Hozák, P., Novák, J. T., Smetana, K. 1989. Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biology of the Cell.* 66:225-233.
- Hu, P., S. Wu, and N. Hernandez. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes & development.* 18:3010-3015.
- Hughes, T.A., A. Pombo, J. McManus, P. Hozak, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1995. On the structure of replication and transcription factories. *J Cell Sci Suppl.* 19:59-65.
- Humbel, B.M. and M Müller. 1985. Freeze substitution and low temperature embedding. In: Müller, M., R.P. Becker, A. Boyde, and J.J. Wolosewick (eds). The science of biological specimen preparation. SEM Inc., Illinois, pp. 175-183
- Iborra, F.J., and P.R. Cook. 1998. The size of sites containing SR proteins in human nuclei. Problems associated with characterizing small structures by immunogold labeling. *J Histochem Cytochem.* 46:985-992.
- Jackson, D.A., and A. Pombo. 1998. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *The Journal of cell biology.* 140:1285-1295.

- Jimenez, N., B.M. Humbel, E. van Donselaar, A.J. Verkleij, and K.N. Burger. 2006. Aclar discs: a versatile substrate for routine high-pressure freezing of mammalian cell monolayers. *Journal of microscopy*. 221:216-223.
- Jul-Larsen, A., T. Visted, B.O. Karlsen, C.H. Rinaldo, R. Bjerkvig, P.E. Lonning, and S.O. Boe. 2004. PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Experimental cell research*. 298:58-73.
- Kandela, I.K., R. Bleher, and R.M. Albrecht. 2007. Multiple correlative immunolabeling for light and electron microscopy using fluorophores and colloidal metal particles. *J Histochem Cytochem*. 55:983-990.
- Kapoor, P., and X. Shen. 2014. Mechanisms of nuclear actin in chromatin-remodeling complexes. *Trends in cell biology*. 24:238-246.
- Kirschning, E., G. Rutter, and H. Hohenberg. 1998. High-pressure freezing and freeze-substitution of native rat brain: suitability for preservation and immunoelectron microscopic localization of myelin glycolipids. *J Neurosci Res*. 53:465-474.
- Kysela, K., A.A. Philimonenko, V.V. Philimonenko, J. Janacek, M. Kahle, and P. Hozak. 2005. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochemistry and cell biology*. 124:347-358
- Kiss, J.Z., T.H. Giddings, Jr., L.A. Staehelin, and F.D. Sack. 1990. Comparison of the ultrastructure of conventionally fixed and high pressure frozen/freeze substituted root tips of *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Protoplasma*. 157:64-74.
- Loukanov, A., N. Kamasawa, R. Danev, R. Shigemoto, and K. Nagayama. 2010. Immunolocalization of multiple membrane proteins on a carbon replica with STEM and EDX. *Ultramicroscopy*. 110:366-374.
- Ma, H., J. Samarabandu, R.S. Devdhar, R. Acharya, P.C. Cheng, C. Meng, and R. Berezney. 1998. Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 143:1415-1425.
- Markovics, J., L. Glass, and G.G. Maul. 1974. Pore patterns on nuclear membranes. *Experimental cell research*. 85:443-451.
- Marsh, B.J., D.N. Mastronarde, K.F. Buttle, K.E. Howell, and J.R. McIntosh. 2001. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:2399-2406.
- Martin, M., and F.J. Medina. 1991. A *Drosophila* anti-RNA polymerase II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase I, which is mostly localized in fibrillar centres. *Journal of cell science*. 100 (Pt 1):99-107.
- Maul, G.G. 1998. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays*. 20:660-667.
- Mayhew, T.M. 2011. Mapping the distributions and quantifying the labelling intensities of cell compartments by immunoelectron microscopy: progress towards a coherent set of methods. *J Anat*. 219:647-660.
- Mayhew, T.M., J.M. Lucocq, and G. Griffiths. 2002. Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. *Journal of microscopy*. 205:153-164.
- McDonald, K. 2007. Cryopreparation methods for electron microscopy of selected model systems. *Methods Cell Biol*. 79:23-56.
- McDonald, K., and M.K. Morphew. 1993. Improved preservation of ultrastructure in difficult-to-fix organisms by high pressure freezing and freeze substitution: I. *Drosophila melanogaster* and *Strongylocentrotus purpuratus* embryos. *Microsc Res Tech*. 24:465-473.
- McDonald, K., and T. Muller-Reichert. 2002. Cryomethods for thin section electron microscopy. *Methods Enzymol*. 351:96-123.
- Meier, U.T., and G. Blobel. 1992. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell*. 70:127-138.

- Merighi, A., J.M. Polak, G. Fumagalli, and D.T. Theodosios. 1989. Ultrastructural localization of neuropeptides and GABA in rat dorsal horn: a comparison of different immunogold labeling techniques. *J Histochem Cytochem.* 37:529-540.
- Meyer, D.A., J.A. Oliver, and R.M. Albrecht. 2005. A Method for the Quadruple Labeling of Platelet Surface Epitopes for Transmission Electron Microscopy. *Microsc Microanal.* 11:142-143.
- Meyer, D.A., J.A. Oliver, and R.M. Albrecht. 2010. Colloidal palladium particles of different shapes for electron microscopy labeling. *Microsc Microanal.* 16:33-42.
- Miller, H.R. 1972. Fixation and tissue preservation for antibody studies. *Histochem J.* 4:305-320.
- Monaghan, P., N. Perusinghe, and M. Muller. 1998. High-pressure freezing for immunocytochemistry. *Journal of microscopy.* 192:248-258.
- Monaghan, P., and D. Robertson. 1990. Freeze-substitution without aldehyde or osmium fixatives: ultrastructure and implications for immunocytochemistry. *Journal of microscopy.* 158:355-363.
- Muhlfeld, C. 2010. High-pressure freezing, chemical fixation and freeze-substitution for immuno-electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 611:87-101.
- Muller-Reichert, T., J. Mantler, M. Srayko, and E. O'Toole. 2008. Electron microscopy of the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Journal of microscopy.* 230:297-307.
- Nakamura, H., T. Morita, and C. Sato. 1986. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Experimental cell research.* 165:291-297.
- Nakayasu, H., and R. Berezney. 1989. Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *The Journal of cell biology.* 108:1-11.
- Percipalle, P., N. Fomproix, E. Cavellan, R. Voit, G. Reimer, T. Kruger, J. Thyberg, U. Scheer, I. Grummt, and A.K. Farrants. 2006. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO reports.* 7:525-530.
- Pestic-Dragovich, L., L. Stojiljkovic, A.A. Philimonenko, G. Nowak, Y. Ke, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, P. Hozak, and P. de Lanerolle. 2000. A myosin I isoform in the nucleus. *Science.* 290:337-341.
- Philimonenko, A.A., J. Janacek, and P. Hozak. 2000. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *Journal of structural biology.* 132:201-210.
- Philimonenko, A.A., Z. Hodny, D.A. Jackson, and P. Hozak. 2006. The microarchitecture of DNA replication domains. *Histochemistry and cell biology.* 125:103-117.
- Philimonenko, V.V., J. Janacek, and P. Hozak. 2002. LR White is preferable to Unicryl for immunogold detection of fixation-sensitive nuclear antigens. *Eur J Histochem.* 46:359-364.
- Philimonenko, V.V., J. Zhao, S. Iben, H. Dingova, K. Kysela, M. Kahle, H. Zentgraf, W.A. Hofmann, P. de Lanerolle, P. Hozak, and I. Grummt. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nature cell biology.* 6:1165-1172.
- Prior, I.A., C. Muncke, R.G. Parton, and J.F. Hancock. 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *The Journal of cell biology.* 160:165-170.
- Reipert, S., I. Fischer, and G. Wiche. 2004. High-pressure freezing of epithelial cells on sapphire coverslips. *Journal of microscopy.* 213:81-85.
- Renau-Piqueras, J., R. Zaragoza, P. De Paz, R. Baguena-Cervellera, L. Megias, and C. Guerri. 1989. Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem.* 37:229-240.
- Ripley, B.D. 1981. *Spatial Statistics.* Wiley, New York.
- Ripley, B.D. 1988. *Statistical Inference for Spatial Processes.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Roth, J. 1989. Postembedding labeling on Lowicryl K4M tissue sections: detection and modification of cellular components. *Methods Cell Biol.* 31:513-551.
- Roth, J., M. Bendayan, E. Carlemalm, W. Villiger, and M. Garavito. 1981. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J Histochem Cytochem.* 29:663-671.

- Roth, J., M. Bendayan, and L. Orci. 1978. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J Histochem Cytochem.* 26:1074-1081.
- Roth, J., and E.G. Berger. 1982. Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae. *The Journal of cell biology.* 93:223-229.
- Roth, J., and D.J. Taatjes. 1998. Tubules of the trans Golgi apparatus visualized by immunoelectron microscopy. *Histochemistry and cell biology.* 109:545-553.
- Roth, J., C. Zuber, P. Komminoth, T. Sata, W.P. Li, and P.U. Heitz. 1996. Applications of immunogold and lectin-gold labeling in tumor research and diagnosis. *Histochemistry and cell biology.* 106:131-148.
- Roy, S., S. Plowman, B. Rotblat, I.A. Prior, C. Muncke, S. Grainger, R.G. Parton, Y.I. Henis, Y. Kloog, and J.F. Hancock. 2005. Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol Cell Biol.* 25:6722-6733.
- Rusakov, D.A., H.A. Davies, M.G. Stewart, and M. Schachner. 1995. Clustering and co-localization of immunogold double labelled neural cell adhesion molecule isoforms in chick forebrain. *Neurosci Lett.* 183:50-53.
- Salas, M., T. J. Miller, J. Leis, and M. L. DePamphilis. 1999. Mechanisms for priming DNA synthesis. In: Concepts in Eucaryotic DNA Replication, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarshad, A., F. Sadeghifar, E. Louvet, R. Mori, S. Bohm, B. Al-Muzzaini, A. Vintermist, N. Fomproix, A.K. Ostlund, and P. Percipalle. 2013. Nuclear myosin 1c facilitates the chromatin modifications required to activate rRNA gene transcription and cell cycle progression. *PLoS genetics.* 9:e1003397.
- Schofer, C., J. Janacek, K. Weipoltshammer, J. Pourani, and P. Hozak. 2004. Mapping of cellular compartments based on ultrastructural immunogold labeling. *Journal of structural biology.* 147:128-135.
- Schwarz, H., and B.M. Humbel. 1989. Influence of fixatives and embedding media on immunolabelling of freeze-substituted cells. *Scanning Microsc Suppl.* 3:57-63; discussion 63-54.
- Seidel, J., and M. Zabel. 2001. Application of colloidal gold to ultrastructural studies. *Folia Histochem Cytobiol.* 39:107-108.
- Skepper, J.N. 2000. Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *Journal of microscopy.* 199:1-36.
- Smetana, K., Potměšil, M. 1968. Ring shaped nucleoli in liver cells of rats after treatment with actinomycin D. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 92(1):62-69.
- Smit, J.W., C.J. Meijer, F. Decary, and T.M. Feltkamp-Vroom. 1974. Paraformaldehyde fixation in immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Preservation of tissue and cell surface membrane antigens. *J Immunol Methods.* 6:93-98.
- Sobol, M., J. Nebesarova, and P. Hozak. 2011. A method for preserving ultrastructural properties of mitotic cells for subsequent immunogold labeling using low-temperature embedding in LR White resin. *Histochemistry and cell biology.* 135:103-110.
- Sobol, M., V.V. Philimonenko, and P. Hozak. 2010. Comparison of methods of high-pressure freezing and automated freeze-substitution of suspension cells combined with LR White embedding. *Histochemistry and cell biology.* 134:631-641.
- Steinbrecht R.A. and M. Müller. 1987. Freeze-substitution and freeze-drying. In: Steinbrecht R.A. and K. Zierold (eds). *Cryotechniques in biological electron microscopy.* Springer, Berlin, pp. 149-172.
- Stirling, J.W. 1990. Immuno- and affinity probes for electron microscopy: a review of labeling and preparation techniques. *J Histochem Cytochem.* 38:145-157.
- Stradalova, V., K. Gaplovska-Kysela, and P. Hozak. 2008. Ultrastructural and nuclear antigen preservation after high-pressure freezing/freeze-substitution and low-temperature LR White embedding of HeLa cells. *Histochemistry and cell biology.* 130:1047-1052.
- Tetley, L., C.M. Turner, J.D. Barry, J.S. Crowe, and K. Vickerman. 1987. Onset of expression of the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly studied using immunoelectron microscopy. *Journal of cell science.* 87 (Pt 2):363-372.

- Tokuyasu K.T. 1984. Immuno-cryoultramicrotomy. In: Polak, J.M. and I.M. Varndell (eds). Immunolabeling for electron microscopy. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 71-96
- Treisman, R. 2013. Shedding light on nuclear actin dynamics and function. *Trends in biochemical sciences*. 38:376-377.
- Vancova, M., M. Slouf, J. Langhans, E. Pavlova, and J. Nebesarova. 2011. Application of colloidal palladium nanoparticles for labeling in electron microscopy. *Microsc Microanal*. 17:810-816.
- Webster, P., H. Schwarz, and G. Griffiths. 2008. Preparation of cells and tissues for immuno EM. *Methods Cell Biol*. 88:45-58.
- Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E.M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther. 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *Journal of virology*. 79:1071-1083.
- Williams, M.A. 1977. Quantitative methods in biology. In: Glauert, A.M. (ed). Practical Methods in Electron Microscopy. Elsevier Biomedical Press, North Holland, pp. 208–210.
- Wuarin, J., and U. Schibler. 1994. Physical isolation of nascent RNA chains transcribed by RNA polymerase II: evidence for cotranscriptional splicing. *Mol Cell Biol*. 14:7219-7225.
- Young, R.D., P.A. Lawrence, V.C. Duance, T. Aigner, and P. Monaghan. 1995. Immunolocalization of type III collagen in human articular cartilage prepared by high-pressure cryofixation, freeze-substitution, and low-temperature embedding. *J Histochem Cytochem*. 43:421-427.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague, Faculty of Science

Doktorský studijní program: Vývojová a buněčná biologie
Ph.D. study program: Developmental and cell biology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Development of ultrastructural methods and their application in
studies on the cell nucleus

Vývoj ultrastrukturálních metod a jejich použití pro
studium buněčného jádra

Mgr. Anatoly A. Filimonenko

Školitel/Supervisor: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: VÝVOJOVÁ A BUNĚČNÁ BIOLOGIE

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Školící pracoviště: Oddělení biologie buněčného jádra, ÚMG AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Anatoly A. Filimonenko

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

**S disertací je možno se seznámit na děkanátě
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze**

TABLE OF CONTENTS

Abstract.....	- 4 -
Souhrn.....	- 5 -
Introduction.....	- 6 -
Immunolabeling pattern analysis on ultrathin sections.....	- 6 -
Detection methods for multiple immunolabeling in electron microscopy.....	- 8 -
Sample preparation for immunoelectron microscopy: optimalization of resin embedding.....	- 9 -
Motivation and aims.....	- 11 -
Results.....	- 12 -
The method for quantitative analysis of immunogold labeling patterns was developed.....	- 12 -
Nascent DNA in HeLa cells is organized into roundish foci, which are growing while replication occurs...-	- 13 -
The microarchitecture of DNA replication domains.....	- 13 -
Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell.....	- 14 -
Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry.....	- 15 -
Sample preparation for immunoelectron microscopy: optimalization of resin embedding	- 16 -
Discussion.....	- 17 -
Summary and conclusions.....	- 24 -
Prospects.....	- 25 -
Overview of used methods.....	- 26 -
Research papers.....	- 26 -
Curriculum vitae.....	- 28 -
List of all author's publications.....	- 28 -
References.....	- 30 -

ABSTRACT

Despite the capabilities of molecular-biological methods in deciphering the interplay of different biological molecules and molecular complexes, the understanding of respective functions in living cells requires application of in situ methods. Obviously, these methods should provide maximal resolution and the best possible preservation of the biological object in a native state, as well as correct statistical evaluation of the spatial characteristics of detected molecular players.

Transmission electron microscopy provides the highest possible resolution for analysis of biological samples. The simultaneous detection of biological molecules by means of indirect immunolabeling provides valuable information about their localization in cellular compartments and their possible interactions in macromolecular complexes. To analyze this, we have developed a complex stereological method for statistical evaluation of immunogold clustering and colocalization patterns of antigens on ultrathin sections, including a user-friendly interface. Functional microarchitecture of DNA replication and transcription sites has been successfully characterized using the developed stereological tools. Our data demonstrate that DNA replication is compartmentalized within cell nuclei at the level of DNA foci and support the view that the synthetic centers are spatially constrained while the chromatin loops are dynamic during DNA synthesis. In HeLa cells, we have ultrastructurally distinguished two morphological types of replication sites - replication bodies and replication foci. Both types contain a set of enzymatic, structural and regulatory proteins, which are known to take part in replication itself or in S-phase regulation. Some regulatory and structural proteins, however, were found only in replication sites of one type. In transcription sites, we have demonstrated on the ultrastructural level the presence of two main cellular molecular motor molecules. Using the model of PHA-stimulated human lymphocytes, the presence of actin was mainly not dependent on the activity status of the cells, while nuclear myosin I shows dynamic behavior upon transcriptional activation.

To extend the technical capabilities for analysis of multiple interactions at the ultrastructural level, we have developed a new system, which allowed us simultaneous immunolabeling of up to five antigens, as compared to only two conventionally available. Gold-silver core-shell nanoparticles, gold nanorods and cubic palladium nanoparticles distinguishable in TEM by their shape were synthesized, and PIP2, B23, actin, Sm protein, and SMC2 were simultaneously detected on ultrathin sections. We have demonstrated that PIP2-positive foci were found in a close contact with Sm-, actin-, and/or SMC2-rich foci, forming complementary 3D domains in the cell nucleus.

Simultaneous ultrastructure and antigen preservation of biological samples is not a trivial task. LR White resin is suitable for sample embedding after both chemical and cryo fixation. However, for some antigens Lowicryl HM 20 could be preferable. Addition of 1.5% water and 0.5% glutaraldehyde into the acetone for freeze substitution improves the antigen preservation in most cases, as shown by immunogold labeling and biochemical quantification of protein amount, while the ultrastructure stays well preserved.

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 tělíška 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 tělíškách 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 imunozaťem a biochemického měření množství proteinu.

INTRODUCTION

It is widely acknowledged that details of cell fine structure are below the resolving power of light microscopy. Modern superresolution techniques have already approached the nanometer resolution, however they usually allow to observe only the pattern of a dye coupled to an antibody used, without the possibility to see the ultrastructure details themselves. Thus, transmission electron microscopy (TEM) still gives the highest possible resolution. When used in conjunction with immunocytochemical marker probes, TEM allows molecules of interest to be mapped in the context of cellular ultrastructure rather than only visualized at nuclear or cytoplasmic levels. Furthermore, the application of colloidal metal nanoparticles, mainly, gold conjugated to secondary antibodies or protein A suggests opportunities not only to immunolocalize antigens in different cell or tissue compartments but also to quantify these localizations and co-localizations. This approach can be then utilized in the studies on dynamic processes (like e.g. DNA replication or RNA transcription), interactions within compartments or defining of functional compartments which has no visible/prominent morphology. However, for the optimal analysis and correct interpretation of ultrastructural and immunolabeling data, a scientist needs to thoroughly select the appropriate way of (1), sample preparation, including the fixation method and embedding media and procedure, and (2), statistical evaluation of immunolabeling patterns over the background of different cellular compartments.

Immunolabeling pattern analysis on ultrathin sections

Immunogold labeling is a specific and sensitive tool for detection of various antigens in biological samples (Roth et al., 1978; Roth et al., 1996). When a given cell structure contains a marker protein, immunogold labeling can be used for delineating this structure by observing spatial variations in labeling density. In a more complicated system, double immunogold labeling using gold particles of two sizes can be used for an assessment of spatial relationships, colocalization or mutual inhibition (exclusion) of two kinds of antigens (Roth et al., 1996).

Usually, the immunogold detection is performed on ultrathin sections less than 100 nm thick. This is done in order to achieve the high resolution which allows ultrastructural localization of antigens. The known cellular compartments can be distinguished to volume- (e.g., nucleus, mitochondria), surface- (e.g., nuclear envelope, plasmalemma) or length-occupying (e.g., all kinds of filaments; Mayhew et al., 2002). At the same time, these compartments may also be either heterogeneous or homogeneous. However, the images of ultrathin sections in general do not display the real sizes and shapes of cut cellular compartments. For example, a nucleus (with a volume, measured in μm^3) appears on an ultrathin section as a profile of a certain size (with a section area in μm^2) and its envelope (with a certain surface area, μm^2) is then seen as a membrane trace (with a length, measured in μm). This means that we lose the dimensional information about the specimen and, what should be also rigorously taken into account – via visualization of ultrathin sections,

we, actually, have an opportunity to examine only a tiny fraction of a specimen. Thus, systematic uniform random or, in other words, unbiased sampling is needed (Mayhew, 2011).

If then we want to analyze the immunogold labeling of certain antigens on random ultrathin sections, we need to choose an appropriate method for two dimensional point pattern analysis. With point pattern analysis, we can analyze whether the distribution of gold particle is random, clustered, or regularly dispersed.

Currently, two methods are mostly used: the Nearest Neighbor Distance and the Quadrat analysis. The Quadrat analysis approach is based on the analysis of the frequency distribution or density of nanoparticles within a suggested set of grid squares (Tetley et al., 1987). The variance to mean ratio (VMR) is then used to evaluate clustering of gold particles (Azorin et al., 2004; Renau-Piqueras et al., 1989). A quadratic test system is superimposed over each micrograph, and the mean number of gold particles per quadrat and VMR is estimated. A VMR higher than one suggests a clustered distribution. On the contrary, if VMR is less than one, a random distribution is expected. The significance can be checked by Student's t-test or by the index of dispersion (Williams, 1977). The disadvantage, however, is appearing from the fact that the quadrat analysis is essentially a measure of dispersion, so the results may depend on quadrat size and orientation. Thus, variations within the analyzed region cannot be recognized (Ripley, 1981).

Nearest Neighbor Analysis is based on the distances measured between each two most closely neighboring gold particles on the micrograph, which are subsequently compared to such values obtained for a random sample with the same number of points. Although nearest neighbor index can be used, the main disadvantage is that it is biased by the boundary effect (see below). Moreover, this approach is based on the mean distance and does not reflect the local variations. In order to overcome this, other functions based on the nearest neighbor or all interpoint distances frequency distributions are currently used.

The pair correlation function ($g(r)$, PCF) is widely used for the evaluation of immunogold clustering (Gathercole et al., 2000; Markovics et al., 1974; Martin and Medina, 1991; Renau-Piqueras et al., 1989; Rusakov et al., 1995). It compares the probability of finding a pair of gold particles with a distance r between them, to the probability expected for a random pattern if the same density of particles was used. The function $g(r)$ can be expressed as the ratio of the mean gold particles density at a distance r from a particular particle to the mean gold particle density. When $g(r)$ is more than one, we observe nanoparticles clustering at the distance r , $g(r)$ less than one means a repulsion, and $g(r)$ equal to one - random distribution of particles.

The $g(r)$ can be then estimated on several micrographs (which is necessary for obtaining statistically significant results). The sampling of long distances r is, however, negatively biased because of the increasing probability that one gold particle from the pair is situated outside of a micrograph (or a region of interest). This negative bias, called boundary effect may be corrected using the geometric covariogram (Ripley, 1988).

More recently (Hess et al., 2005; Philimonenko et al., 2000; Prior et al., 2003; Roy et al., 2005), the K-function (or second-order function) was used for the evaluation of immunogold clustering or colocalization via measuring distances for all combinations of pairs of particles. Based on PCF, the $K(r)$ represents an analysis of distribution of distances between each particle on the micrograph and all the others. Comparing to most nearest neighbor approaches, the $K(r)$ function allows testing the characteristics of gold particles pattern at different distance scales.

In conclusion, these methods allow one to deduce physical interaction between antigens or their placement in close vicinity while being responsible for the same process or function in the cell, In the case of statistically significant colocalization (Kysela et al., 2005, Philimonenko et al., 2006). In the case of significant clustering, the methods define the size (Philimonenko et al., 2000), and the shape (Schofer et al., 2004) of the compartments occupied with corresponding antigen (even in case, when these compartments have no distinguishable ultrastructure). This may allow a researcher to depict new and unknown players of known processes, thus delineating new details of mechanisms of the regulation of these functions. However, as at the beginning of 2000s such methods were missing, we needed to develop them (Philimonenko et al., 2000; Schofer et al., 2004).

Detection methods for multiple immunolabeling in electron microscopy

Fluorescent microscopy enables multiple immunolabeling, however its resolution is often insufficient for an unequivocal localization of the labeled molecules and their assignment to specific cellular compartments. Owing to higher resolution, electron microscopy largely removes such ambiguity. Since pioneering works by Roth and co-workers, it employs gold nanoparticles tagged with immunoglobulin or other bioactive molecules for the detection of molecular targets (Roth et al., 1996). However, the number of simultaneously detected antigens is limited to two or three at most. The main limitation is that the gold nanoparticles can only be distinguished by their size which may be varied in a narrow range for the immunodetection to work well. When using the gold particles of 15 nm and larger, the sensitivity of immunolabeling dramatically decreases, one of the reasons being the steric hindrance problems (Hainfeld, 1987; Seidel and Zabel, 2001). Large gold particles may also artificially increase the dimensions of particle clusters when labeling small structures (Iborra and Cook, 1998). Moreover, larger nanoparticles tend to have higher variations in sizes, thus leading to problematic discrimination between different particle types.

To increase the number of mutually discernible nanoparticles types within an acceptable size range, two approaches may be employed: discrimination by elemental composition or by shape of the nanoparticle. Several reports have been presented on using nanoparticles of elemental composition different from gold. They can be distinguished from conventional gold nanoparticles by dark-field STEM (Loukanov et al., 2010), energy-dispersive X-ray (EDX) microanalysis (Loukanov et al., 2010), BSE imaging in high-resolution SEM (Vancova et al., 2011), or by electron energy filtering microscopy (Kandela et al., 2007). The results clearly demonstrated the feasibility of such approaches, however the drawback is the need for highly specialized and expensive equipment not available in most laboratories. To the best of our knowledge, only one group has so far explored the option of distinguishing among nanoparticles by their shape (Meyer et al., 2005; Meyer et al., 2010). A clear advantage of this approach is that samples can be routinely analyzed by conventional transmission electron microscopy (TEM) readily available in most laboratories. However, the size of their nanoparticles was often out of the optimal range, and the variability of the shapes could also pose a problem.

Sample preparation for immunoelectron microscopy: optimization of resin embedding

In order to obtain an optimal result with ultrastructural immunolabeling, it is necessary to preserve well both the fine structure and the antigenic properties of the sample. The choice of optimal technique for the sample preparation is therefore crucial. During the preparation of samples for post-embedding immunolabeling, the antigenic properties of the biological material are influenced by a number of factors, the most important being the fixation method, dehydration procedure, and the resin properties (Skepper, 2000; Stirling, 1990). Classical epoxy resins are in most cases not suitable for subsequent immunolabeling, therefore, a number of acrylic resins have been formulated, which, along with milder fixation, help to overcome the drawbacks of epoxy resins in the antigen preservation and accessibility (Acetarin et al., 1986; Carlemalm et al., 1985). Although the properties of epoxy and acrylic resins have been compared in many studies (see e.g. Biggiogera and Fakan, 1998; Brilakis et al., 2001; Brorson, 1999; Merighi et al., 1989; Roth and Berger, 1982), only a few papers report comparisons between different acrylic resins (Hamilton et al., 1992; Philimonenko et al., 2002; Schwarz and Humbel, 1989).

Fixation of biological material is another critical point (Muhlfeld, 2010; Webster et al., 2008). Routine chemical fixation with aldehydes provides good immobilization of the molecules within the sample, but on the other hand, with increasing degree of cross-linking the tissue the accessibility of the epitopes for antibodies significantly decreases. As many epitopes are sensitive to high concentrations of glutaraldehyde (Miller, 1972; Smit et al., 1974), a gentle fixation with a mixture of 2-4% formaldehyde with 0.1%-1.0% glutaraldehyde is generally recommended as a good compromise for both ultrastructure and antigenicity preservation (Tokuyasu, 1984). Together with the fact that this protocol does not require any special and expensive equipment, it is still the method of choice for many laboratories until now. Another option is the use of cryofixation or cryoimmobilization at high pressure which is a fast physical fixation procedure arresting cellular processes within milliseconds, thus avoiding the typical artifacts introduced by the relatively slow diffusion-dependent chemical fixation process (Schwarz and Humbel, 1989).

To embed the frozen material into the resin, it should be then typically freeze-substituted (FS; Muhlfeld, 2010). Depending on the preferable purpose of better ultrastructure or antigen preservation, the FS media may contain water, uranyl acetate, osmium tetroxide, and glutaraldehyde at various percentages, usually in acetone (Humbel and Müller 1985, McDonald and Mophew, 1993; Monaghan et al., 1998, Steinbrecht and Müller 1987). For immunocytochemical studies cryoimmobilized and FS cells are then embedded into acrylic resins (Acetarin et al., 1986; Roth, 1989; Roth et al., 1981; Roth and Taatjes, 1998). Various Lowicryl resins are usually utilized, however LR White can also become the resin of choice (Sobol et al., 2011; Sobol et al., 2010). Some reports describe properties of immunocytochemical labeling of high-pressure frozen material (Chang et al., 2003; Eppenberger-Eberhardt et al., 1997; Kirschning et al., 1998; McDonald, 2007; McDonald and Muller-Reichert, 2002; Monaghan et al., 1998; Monaghan and Robertson, 1990; Young et al., 1995); however, only a few of them deal with quantitative data. For example, Bittermann et al. (1992) demonstrated, that any chemical pretreatments or presence of any chemical fixatives in FS medium always reduced the labeling density.

Strádalová et al. (2008) showed that the immunolabeling signal for different nuclear antigens was 4-to-13 times higher in high-pressure frozen than in chemically fixed cells. While several approaches and machines have been devised to cryo-fix samples satisfactorily (Hawes et al., 2007; Hess, 2003; Hess et al., 2000; Hohenberg et al., 1994; Hohenberg et al., 1996; Jimenez et al., 2006; Kiss et al., 1990; Marsh et al., 2001; Muller-Reichert et al., 2008; Reipert et al., 2004; Wild et al., 2005), the definition of optimal FS protocol for immunolabeling has not been critically evaluated.

MOTIVATION AND AIMS

The ultrastructural detection of various antigens in a cell using antibodies conjugated to metal nanoparticles is a powerful instrument in biological research. However, statistical or stereological tools for testing the observed patterns for significant clustering or colocalization at the beginning of 2000-s were missing. Therefore the further task had been addressed:

Aim 1. To develop a complex stereological method for statistical evaluation of clustering and colocalization of antigens in biological samples, including a user-friendly interface.

The developed methods of spatial statistics (Aim 1) allowed us to clarify some unanswered questions in such fundamental cellular processes as transcription and replication. In the end of 1900-s it was demonstrated, that during the whole S-phase DNA replication is organized into foci throughout nucleoplasm (Hozak et al., 1993; Hozak et al., 1994; Jackson and Pombo, 1998; Nakayasu and Berezney, 1989). However, it was not definitely clear, if these foci are reflecting a snapshot of replicating DNA synthetic complexes, moving along the DNA string or they are organized into higher-level structures and somehow fixed to an appropriate position in the nucleus, while template DNA is reeling through them. The exact composition of tethered replication complexes were also not known. With the newly developed method and owning quite a rich library of primary antibodies against numerous structural and regulatory proteins working well on LR White-embedded material, we got an opportunity to study the replication factories composition on the ultrastructural level. Concerning transcription, we focused on interplay of NMI and actin in transcription foci during transcriptional activation. The aim therefore was:

Aim 2. To characterize functional microarchitecture of DNA replication and transcription sites using the developed tools.

Sensitive electron microscopic immunodetection is currently limited to simultaneous immunolabeling of only two antigens (Roth et al., 1996). This is limiting the possibility of spatial studying multiple interactions in complex biological processes. We therefore planned:

Aim 3. To develop a system for simultaneous multiple ultrastructural immunolabeling of more than three antigens.

A key condition for successful immunodetection is the antigen preservation of a biological sample which is influenced by a number of factors, the most important being the fixation method, dehydration procedure, and the resin properties (Skepper, 2000; Stirling, 1990). We therefore planned:

Aim 4. To optimize the procedure of resin embedding of biological samples for post-embedding immunolabeling.

RESULTS

The method for quantitative analysis of immunogold labeling patterns was developed

Immunolabeling with metal nanoparticles allows visualization of different antigens on ultrathin sections. However, for the evaluation of the observed labeling pattern an appropriate stereological method is needed. The bottom-censored K function $K(r_1, r_2)$ was introduced in order to test clustering and/or colocalization of antigens. This function is also suitable for testing the statistical significance of the observed patterns. We further transformed the standard $K(r)$ functions into $K^{-1}(r_1, r_2)$. Being the integrals of PCF and PCCF (pair (cross) correlation functions), they have an easy interpretation as an area of the histogram bar for each interval of distances $r_2 - r_1$ and thus can be used for graphical representation of the PCF and PCCF. The correction for boundary effect was also applied to the calculations of both K and K^{-1} functions. We then tested our method on the model of DNA replication. DNA polymerase α , the principal replicative DNA polymerase in actively multiplying eukaryotic cells (Salas et al., 1999), demonstrates a strong colocalization with nascent DNA over the range of distances that corresponds to the known size of replication foci of 30 - 200 nm (Fig. 1a; Hughes et al., 1995), as expected. In contrast, the nucleolar protein Nopp 140 (Meier and Blobel, 1992) that is not expected to be involved in DNA replication did not colocalize with nascent DNA (Fig. 1b).

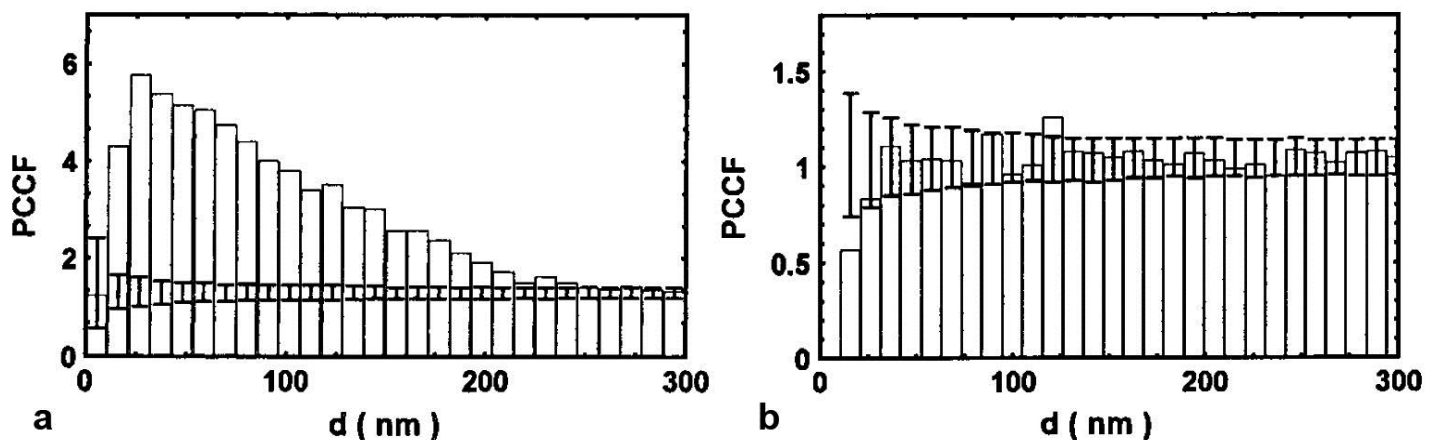


Fig. 1. Colocalization patterns of DNA polymerase α and Nopp 140 with nascent DNA. **a** DNA polymerase α and nascent DNA strongly colocalize in the interval of 20–175 nm as the PCCF function reaches values well above 1; **b** Nopp 140 and nascent DNA do not colocalize: the PCCF has no peak in any interval and is fluctuating around 1.

On the base of the method, a set of user-friendly software tools in the form of “Gold” plug-ins for the Ellipse program (ViDiTo, Košice, Slovakia) was developed in collaboration with Dr. Jiří Janáček (Department of Biomathematics, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic). They allow to perform the whole evaluation procedure starting with the automated detection of gold particles till the statistical evaluation and producing the graphical output in the form identical to those presented in Philimonenko et al. (2000) and in Schofer et al. (2004). The plug-ins are available free of charge at <http://nucleus.img.cas.cz/gold/>

Nascent DNA in HeLa cells is organized into roundish foci, which are growing while replication occurs

Using pulsed (5, 15 and 30 min) and pulsed-and-chase (5+10 and 5+25 min) strategies of biotin-dUTP incorporation into nascent DNA, we have demonstrated that as replication proceeds, the labeled sites increase in size up to 240 nm (30 min incorporation) while maintaining a broadly round shape. In pulse-and-chase experiments the labeled DNA was shown to spread to occupy DNA foci of about 400 nm in diameter. The circularity of ~ 0.7 and elongation of ~ 2.3 in all experimental groups indicate that the clusters containing nascent DNA were always round/ellipsoid. These results demonstrate that DNA replication is compartmentalized within cell nuclei at the level of DNA foci and support the view that the synthetic centers are spatially constrained while the chromatin loops are dynamic during DNA synthesis.

The microarchitecture of DNA replication domains

In our experiments we have demonstrated that two ultrastructurally differing types of replication sites can be observed in the nuclei of HeLa cells. Replication bodies (RB) are electron-dense structures (Fig. 2a; Hozak et al., 1993; Hozak et al., 1994), while replication foci (RF) correspond to the sites of extra-bodies labeling and have no typical dense underlying structure (Fig. 2b).

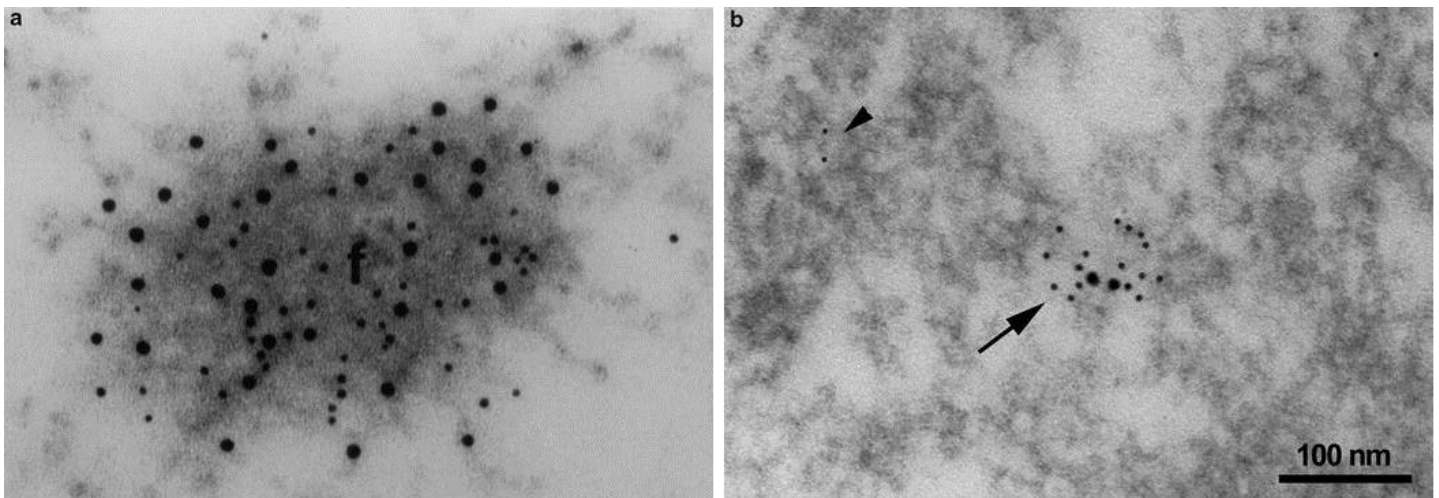


Fig. 2. Micrographs of RB and RF. Permeabilized cells in mid S-phase were allowed to synthesize DNA in the presence of biotin-dUTP, ultrathin sections prepared and immunolabeled. 5 nm gold particles mark DNA polymerase α , whilst 10 nm particles label sites containing incorporated biotin (i.e., nascent DNA). (a) RB (f) is strongly labeled with both antibodies. (B) Clusters of DNA polymerase α are detectable separately (arrowhead) or intermingled with RF (arrow). Bar: 100 nm.

Both RB and RF contain a set of enzymatic, structural and regulatory proteins, which are known to take part in replication itself (DNA polymerase α , PCNA) or in S-phase regulation (Cyclin A and E, p21, Cdk 2, see Table 1). We also have found several proteins involved in RNA metabolism in both types of the sites of replication. Some regulatory and structural proteins, however, were found only in replication sites of one type. Namely, Cdk 1 and Cyclin B1 were found only in RB, while PML and lamin B1 – only in RF.

Table 1. Antigens detected within DNA replication sites of both types

Group	Antigen	RF	RB		
			LD	Pattern	
Proteins involved in DNA replication Cell cycle regulators	DNA polymerase α	**	+++	Diffuse	
	PCNA	**	+++	Diffuse	
	<i>Cdk1 (cdc2-kinase)</i>	<i>NS</i>	+++	<i>Diffuse</i>	
	Cdk2	**	- to +	Small zones	
	p21 WAF1/Cip1	**	- to +	Small zones	
	Cyclin A	**	- to +	Small zones	
	<i>Cyclin B1</i>	<i>NS</i>	- to +	<i>Small zones</i>	
	Cyclin E	**	+++	Small zones enriched at chromatin contact sites with RB	
	Cyclin D1	NS	-	-	
	Cdc34	NS	-	-	
	Proteins involved in RNA metabolism	A1 hnRNP	**	+	Diffuse
		C1/C2 hnRNP	**	- to +	Only in peripheral chromatin threads
		Nopp 140	NS	-	-
p80-coilin		**	++	Zonal	
Sm		**	+++	Diffuse	
Other proteins	SS-B/La	**	+++	Diffuse	
	<i>PML</i>	**	-	-	
	Lamin A/C	NS	-	-	
	<i>Lamin B1</i>	**	-	-	

Labeling densities (LD) in RB were expressed as “-” (<30 particles/ μm^2), “+” (30–59 particles/ μm^2), “++” (60–89 particles per μm^2) and “+++” (>89 particles/ μm^2). In RF the significance of colocalization of nascent DNA and various nuclear proteins was tested using K-function in the interval of distances 30–250 nm at 1% (**) and 5% (*) critical values obtained by Monte-Carlo simulations of Poisson process. The results that differ for RB and RF are shown in ***bold italic***.

Nuclear distribution of actin and NMI depends on transcriptional activity of the cell

We revealed the dynamic properties of nuclear actin and nuclear myosin I (NMI) on the model of phytohemagglutinin (PHA)-stimulated human lymphocytes. Upon stimulation, lymphocytes undergo rapid transcriptional activation accompanied by dramatic changes in nuclear and nucleolar morphology. Enlargement of nuclei, chromatin decondensation and activation of nucleoli are the characteristic signs of this process (Smetana and Potměšil 1968; Busch and Smetana 1970; Hozák et al. 1989). We showed that activation of human lymphocytes was accompanied by an increase in the expression of NMI mRNA and protein in the cells, whereas actin expression was relatively stable. Similar results were obtained using immunogold labeling on ultrathin sections. We also demonstrated that in nucleoli of resting or PHA-stimulated lymphocytes, actin localized predominantly to FCs, while NMI localized mainly in the DFC. During transcriptional activation, actin was recruited from FCs to other nucleolar compartments, whereas NMI was accumulated in DFC where transcription of rDNA takes place. In the nucleoplasm, both actin and NMI relocalized from condensed chromatin to decondensed chromatin upon activation. Finally, actin and NMI colocalized with transcription sites in the nucleoplasm of activated human lymphocytes. In resting cells, however, only actin was found in transcription sites.

Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry

We have prepared three new types of stable nanoparticles easily distinguishable in conventional TEM by their shape: gold-silver core-shell nanoparticles (AgAu), gold nanorods (AuNR) and cubic palladium nanoparticles (PdC).

We then successfully tested these nanoparticles for their applicability in ultrastructural immunolabeling. The average size of the nanoparticles calculated as equivalent diameter ranged from 10.5 to 14.9 nm, which is within the suitable range for immunolabeling, and the size distribution was narrow. The obtained secondary antibody conjugates were fully functional, as demonstrated by the results of immunolabeling on ultrathin sections.

Using this tool, we detected simultaneously five cellular antigens (PIP2, B23, actin, Sm protein, and SMC2) at ultrastructural resolution on ultrathin sections of chemically fixed HeLa cells, embedded into LR White resin (Fig. 3). The areas of dense PIP2 labeling (purple; Fig. 3b) are observed in the FC and DFC in nucleoli and interchromatin granule clusters, along with smaller foci in nucleoplasm and cytoplasm.

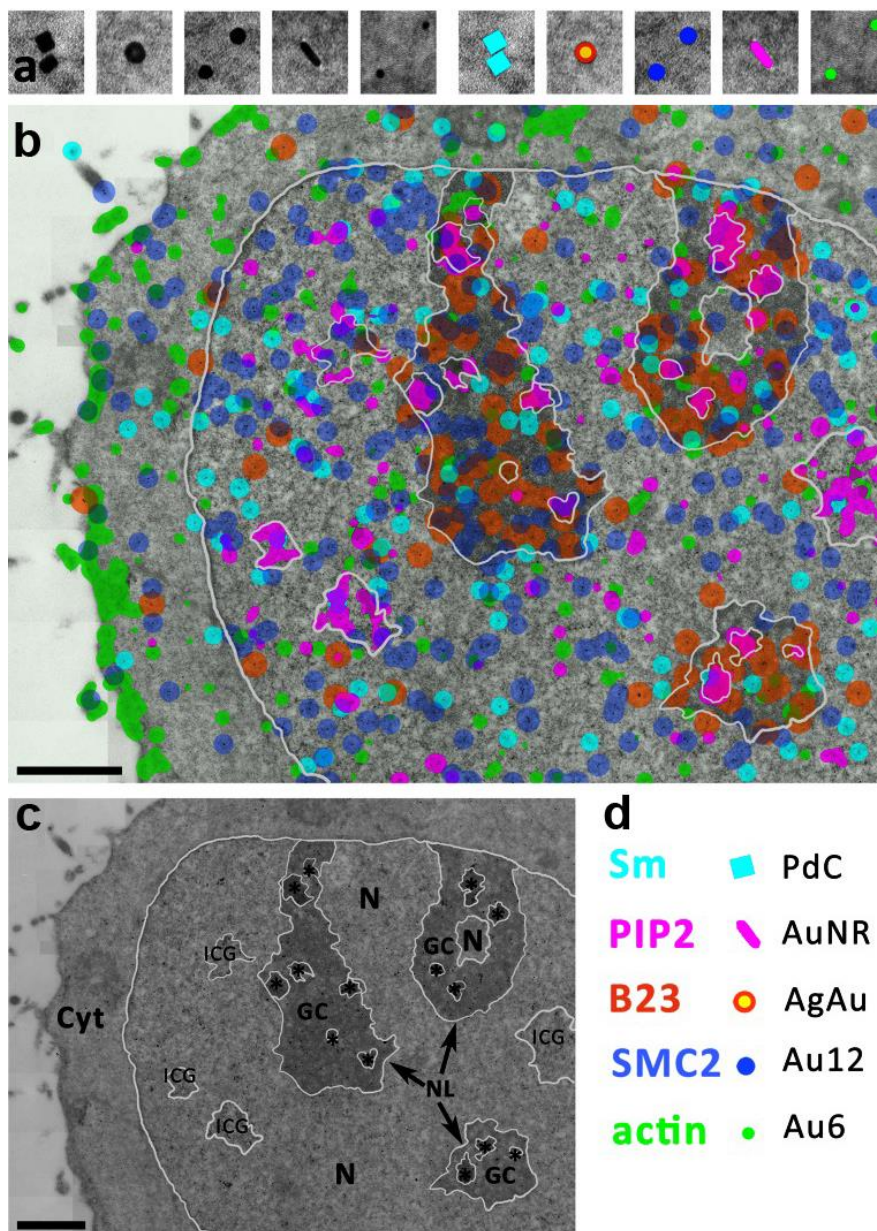


Fig. 3. Ultrastructural mapping of all five examined antigens (Sm, PIP2, B23, SMC2, actin) in a HeLa cell.

a Electron micrographs of individual types of nanoparticles. PdC, AgAu and AuNR were newly developed, while 6 nm (Au6) and 12 nm (Au12) gold nanospheres were commercial secondary antibodies-gold conjugates.

b Statistically significant densities of individual biomolecules (antigens) are highlighted by color-coding in a zoom-out electron micrograph obtained by ‘stitching’ of 70 individual images. Main cellular compartments are delineated with a white line.

c An overview highlighting the delineated compartments. Cyt cytoplasm, ICG interchromatin granules, GC granular component of the nucleolus, N nucleoplasm, asterisk–fibrillar center and dense fibrillar component of the nucleolus.

d Color-coding. Scale bars: 1 μ m.

As expected, B23 (orange) is neighboring the PIP2-rich areas in nucleoli, occupying predominantly the GC. Actin (green) is heavily localized in the cortical layer of cytoplasm and also scattered in small foci in the nucleus, nucleolus, and cytoplasm. Sm protein (turquoise) is also found in small clusters throughout the nucleoplasm, presumably involved in splicing. SMC2 being a protein bound mainly to chromatin is localized throughout the nucleus and found also in the nucleoplasm. Co-localizations within small structures at distances <100 nm were observed in some cases. However, the majority of patterns constituted of PIP2-positive foci was in a close contact with Sm-, actin-, and/or SMC2-rich foci, forming complementary 3D domains.

Sample preparation for immunoelectron microscopy: optimization of resin embedding

The sample processing for ultrastructural immunohistochemistry influences significantly the quality of subsequent antigen detection. Each of the steps in the procedure have their impact, the most crucial being the fixation method, the resin used, and the conditions of dehydration and resin infiltration (Skepper, 2000; Webster et al., 2008). We performed quantitative evaluation of immunogold labeling properties of four acrylic resins – LR White, LR Gold, Lowicryl HM20, and Lowicryl K4M – after either mild chemical fixation or physical fixation with high-pressure freezing. To reveal potential advantage of some of the compared resins over the others, we first analyzed the nanostructure of pure resins by atomic force microscopy. All the resins showed fine-granular nanostructure with the grain lateral size ~20 nm. The sectioned area was flat in all three cases, and the roughness factor was the same. So, these results did not show any obvious difference between LR White, LR Gold, and two Lowicryls. We then quantified the intensity of immunogold labeling on ultrathin sections of HeLa cells embedded in LR White, LR Gold, Lowicryl HM20 or Lowicryl K4M after chemical fixation or high-pressure freezing. Labeling density of four different antigens – DNA, hnRNP C1/C2, histone H1, and Sm antigen was analyzed. Not very dramatic, but significant differences were observed between compared resins in most cases. Notably, there was no clear tendency for any of the studied resins to show consistently better results over the others. The variations in the resins performance were strongly dependent on the antigen. Moreover, the picture was different depending on the fixation used. Generally, we can state that the performance of the resins for different antigens was more uniform after chemical fixation, and more variable after high-pressure freezing and freeze-substitution.

As cryofixation is considered to be preferable for the preparation of biological samples, we then concentrated on the search of the optimal conditions for automated freeze substitution (FS) step. We detected DNA, hnRNP C1/C2, histone H3 and RNA polymerase II CTD on ultrathin sections of high-pressure frozen HeLa cells processed using three different media for automated FS and

embedded into LR White resin. In parallel, the protein concentrations (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) and the total hnRNP C1/C2 amount (Western blotting) were compared in samples taken before freezing, immediately after freezing, and after freeze substitution using each of the FS media. We have not recognized any significant alteration of antigens amount after high-pressure freezing, however the cryosubstitution with acetone caused their significant loss. While addition of water can improve visibility of some cell structures, it strengthened the negative effect of cryosubstitution on antigen loss by extraction. All four studied nuclear antigens demonstrated significantly lower densities of immunogold labeling, when acetone was supplemented with 1% water. Biochemical measurements demonstrated the same effect, showing dramatic loss of both total protein and hnRNP C1/C2 amount. However, the addition of 0.5% glutaraldehyde to the acetone with 1,5% water significantly reversed the result and in case of anti-histone H3 and anti-RNA polymerase II CTD antibodies even provided up to 50% increase of labeling density.

DISCUSSION

Transmission electron microscopy allows molecules of interest to be mapped in the context of cellular ultrastructure with the highest possible resolution. We have developed a powerful method that allows one to evaluate the colocalization and clustering of different antigens in biological samples. The previously described approaches had several drawbacks. We had overcome the problem of short-range effects by the development of bottom-censored K function $K(r_1, r_2)$, calculated only from distances of the desired interval (r_1, r_2) . This also allows to narrow the interval investigated for clustering or colocalization to the desirable values. The data obtained in 2D can be also applied on 3D volume, because the calculated characteristics are the same in 2D and 3D. The $K^{-1}(r_1, r_2)$ provides the graphical representation of clustering/colocalization patterns. The collection of the data also becomes easier as one can compile data from any number of randomly taken micrographs as the correction for boundary effect was applied to the calculations of both K and K^{-1} functions. Lower immunolabeling densities can be compensated by a higher number of evaluated micrographs. Reliability of the method was successfully tested using the antigens with known participation in DNA replication. We also have created a set of user-friendly software tools, allowing to perform the whole evaluation procedure starting with the automated detection of gold particles till the statistical evaluation of clustering/colocalization and producing the graphical output. This is of great significance, as the method can be easily applied by anybody who uses transmission immunoelectron microscopy on ultrathin sections, without special mathematical background.

Using the developed stereological tools we have successfully characterized functional microarchitecture of replication and transcription sites. In the end of 1900-s it was demonstrated that during the whole S-phase, DNA replication is organized into foci throughout nucleoplasm (Hozak et al., 1993; Hozak et al., 1994; Jackson and Pombo, 1998; Ma et al., 1998; Nakamura et al., 1986; Nakayasu and Berezney, 1989). However, it was not clear if these foci reflect a snapshot of replicating DNA synthetic complexes, moving along the DNA string or if they are organized into higher-level structures somehow fixed in the nucleus, while template DNA is reeling through them. We checked on the ultrastructural level if nascent DNA traces are significantly elongated (thus, suggesting the movement of polymerization complex along a template) or, oppositely, these traces are radially spread, suggesting a fixed 3D organization of replication sites. We showed that as replication proceeds, the labeled sites increase in size up to 240 nm (30 min incorporation) while maintaining a broadly round shape. These results demonstrate that DNA replication is compartmentalized within cell nuclei at the level of DNA foci and support the view that the synthetic centers are spatially constrained while the chromatin loops are dynamic during DNA synthesis. Recently, replication sites were visualized using STED super-resolution technique (Cseresnyes et al., 2009) and their size was measured. It was about 150 nm for PCNA immunolabeling and 160 nm for RPA. This is in agreement with our data as we have visualized nascent DNA loops, but not the machinery itself. Jaunin et al. (2000) while using pulse-chase-pulse approach demonstrated that nascent DNA label was primarily found in the perichromatin zone, and that the replicated DNA then moved into the adjacent chromatin-rich area. Despite of the fact that they did not report the focal organization of DNA replication, both studies support the hypothesis that replication occurs within a defined inter-chromatin compartment so that during replication DNA from the adjacent chromatin-rich compartment must be translocated to the active site at the border of the chromatin domain.

The composition of these tethered replication complexes was not known. With the newly developed method (Philimonenko et al., 2000) and owning quite a rich library of primary antibodies against numerous structural and regulatory proteins working well on LR White-embedded material, we had an opportunity to reveal the molecular composition of replication factories, and to suggest new players of the process. We have demonstrated that two ultrastructurally differing types of replication sites can be observed in the nuclei of HeLa cells: electron-dense structures (Hozak et al., 1993; Hozak et al., 1994), termed here as RB (replication bodies), and sited extra-bodies nascent DNA labeling, termed here as RF (replication foci). Functional differences between these two replication structures are still unknown. However, they can be suggested, as while in mid S-phase both types of replication sites contain expected set of synthetic and regulatory nuclear proteins, we have also found some significant differences between them. As expected, both DNA polymerase α

and PCNA strongly colocalized with nascent DNA in RF and were found in large amounts in RB. Cell cycle regulator cyclin A and cyclin E were also found in both types of replication sites in mid-S phase. Although no direct function in DNA replication was demonstrated for Sm, Coilin and La proteins (all three are involved in RNA metabolism), we have shown their high colocalization with replication sites of both types. This can be explained by the fact, that replication and transcription often colocalize (Hassan et al., 1994), and that splicing starts before finishing the transcription of nascent RNA (Wuarin and Schibler, 1994). These results suggest the existence of functional domains in the cell nucleus where different processes connected by substrate or participating factors can be spatially arranged in a very economical way.

B-type lamins (but not A/C) were previously localized in mid-late S-phase replication sites in mouse 3T3 cells using immunofluorescence (Moir et al. 1994). We have shown the presence of lamin B1 in RF, but not in RB, suggesting that in RB the structural organization of replication is maintained by a different set of proteins.

PML protein is a human growth suppressor and is concentrated mainly in special structures - PML bodies. The specific functions of PML protein are unknown, however, PML bodies have been associated with such processes as alternative lengthening of telomeres in mammalian cells (Henson et al., 2002), viral DNA replication and post-replication processes (Jul-Larsen et al., 2004; Maul, 1998), and it was shown that a large fraction of PML bodies (50–80%) is closely associated with DNA replication domains but exclusively during middle-late S-phase (Grande et al., 1996). Our experiments demonstrated that only RF colocalize with the PML protein. We suggest that the sequestering and facilitating mechanisms in RB are provided by their own structure, while RF may need association with PML. Furthermore, direct and indirect evidence supports the hypothesis that PML bodies interact with specific genes or genomic loci (reviewed in Ching et al., 2005). Thus, replication of such genes could also take place in connection with PML bodies and we can suggest that they are replicated in RF but not in RB.

In conclusion, we suggest that the existence of two types of replication sites reflects differences in the structure of the genome regions that are replicated by them. RB may represent the major replication structures and are responsible for replication of the bulk of DNA, which is organized in such a way that clusters of replicons are replicated together in each RB. RF, in contrast, are smaller, less complex structures, which appear to perform replication of isolated replicons or replicon clusters with very few linked replicons.

It has been shown that actin is indispensable for transcription by Pol I, II, and III (Fomproix and Percipalle, 2004; Hofmann et al., 2004; Hu et al., 2004; Philimonenko V. et al., 2004) and nuclear myosin I (NMI) has been found to participate in transcription by Pol I and II II (Castano et al., 2010; de

Lanerolle, 2012; Pestic-Dragovich et al., 2000; Philimonenko V. et al., 2004). In this study, we revealed the dynamic properties of nuclear actin and NMI on the model of PHA-stimulated human lymphocytes. Upon stimulation, lymphocytes undergo rapid transcriptional activation accompanied by dramatic changes in nuclear and nucleolar morphology.

In the nucleolus, NMI was preferentially localized in the DFC which is the site of rDNA transcription. The localization of NMI and its accumulation in DFC during transcriptional activation is in agreement with its role in the synthesis of rRNA, and/or it may also indicate the involvement of NMI in the early processing events of rRNA precursors. Importantly, NMI is associated with transcription factor TIF-IA, a basal transcription factor that confers initiation competence to Pol I and mediates the growth-dependent regulation of rRNA synthesis (Philimonenko V. et al., 2004). Thus, the regulatory role of NMI in activation of ribosomal genes transcription in stimulated human lymphocytes cannot be excluded.

In resting cells, actin and NMI are both concentrated predominantly in condensed chromatin domains, and they are less abundant in regions containing decondensed chromatin. Our data showing that actin is enriched in condensed chromatin are also consistent with earlier observations that revealed an association of actin-related protein ARP4 with centric heterochromatin and a colocalization with heterochromatin protein HP1 in *Drosophila* (Frankel et al., 1997). One of the functions of actin in chromatin might be connected with the association of actin and Ino80 chromatin-remodeling complex (Kapoor and Shen, 2014; Treisman, 2013). Although a role of NMI in chromatin remodeling has yet been demonstrated only for nucleolar genes (Percipalle et al., 2006; Sarshad et al., 2013), it is also enriched in condensed chromatin in unstimulated lymphocytes. The transcriptional activation of human lymphocytes leads to the relocalization of both actin and NMI to decondensed chromatin area. Both actin and NMI colocalize with transcription sites in the nucleoplasm of activated human lymphocytes. In resting cells, however, only actin was found in transcription sites. High amount of NMI in heterochromatin of resting lymphocytes allows us to suggest that heterochromatin may represent a storage site of NMI, which after stimulation is redistributed to nuclear compartments with active DNA transcription. These results demonstrate that actin and NMI are compartmentalized in the nuclei where they can dynamically translocate depending on transcriptional activity of the cells.

In order to establish a tool for simultaneous labeling of more than three antigens, we prepared three novel types of conjugated metal nanoparticles differing by their shapes and therefore readily distinguishable by TEM from each other, and from commercially available spherical gold nanoparticles of various sizes. The novel nanoparticles - cubic palladium nanoparticles (PdC), core-shell silver-gold nanoparticles (AgAu), and gold nanorods (AuNR) - fulfilled all the criteria, such as

suitable size range, stability in the solution and upon exposure to electron beam in TEM, as well as successful conjugation to antibodies and thus were suitable for immunodetection.

Using this tool, we performed a proof-of-concept testing of the multiple simultaneous immunolabeling. Five cellular antigens - PIP2, B23, actin, Sm protein, and SMC2 - were immunolabeled in parallel. As the role of PIP2 in the cell nucleus is poorly understood, we were especially interested in spatial interactions of PIP2-containing structures with the other four proteins with established cellular functions. Co-localizations of two or three types of labeled molecules within small structures at distances <100 nm were observed in some cases. However, the majority of patterns constituted of PIP2-positive foci in a close contact with Sm-, actin-, and/or SMC2-rich foci, forming complementary 3D domains. As the mechanism underlying PIP2 compartmentalization in the cell nucleus remains largely unknown (Barlow et al., 2010), this finding of the complementary localization of the above-mentioned molecular species in the nuclear sub-compartments may shed light on the spatial organization of relevant cellular processes.

The presented method for multiple immunolabeling significantly advances the possibilities of the stereological analysis of the mutual distribution of molecules of interest in biological objects. While double-labeling enables analysis of one type of spatial interactions between different molecules and two types of interactions between the molecules of the same type, with the five types of labeling the possible number of assessed interactions increases up to ten and five, respectively, bringing more detailed understanding of the microarchitecture of functional domains in the cell.

The sample processing for ultrastructural immunohistochemistry influences significantly the quality of subsequent antigen detection. Each of the steps in the procedure have their impact, the most crucial being the fixation method, the resin used, and the conditions of dehydration and resin infiltration (Skepper, 2000; Webster et al., 2008). We performed quantitative evaluation of immunogold labeling properties of four acrylic resins – LR White, LR Gold, Lowicryl HM20, and Lowicryl K4M – after either mild chemical fixation or physical fixation with high-pressure freezing.

To reveal the potential advantage of some of the compared resins over the others, we analyzed the resin nanostructure by atomic force microscopy. LR White, LR Gold, and Lowicryl HM20 showed fine-granular nanostructure (grains lateral size was ~20 nm), and the roughness factor was the same in all three cases. So, these results did not show any obvious surface differences between these resins.

We then quantified the intensity of immunogold labeling on ultrathin sections of HeLa cells embedded in LR White, LR Gold, Lowicryl HM20 or Lowicryl K4M after chemical fixation or high-pressure freezing. Labeling density of four different antigens – DNA, hnRNP C1/C2, histone H1, and Sm antigen was analyzed. Not very dramatic, but significant differences were observed between

compared resins in most cases. Notably, there was no clear tendency for any of the studied resins to show consistently better results over the others. The variations in the resins performance were strongly dependent on the antigen. Moreover, the picture was different depending on the fixation used. Generally, we can state that the performance of the resins for different antigens was more uniform after chemical fixation, and more variable after high-pressure freezing and freeze-substitution.

What could be the reason for the observed variations? As we do not detect obvious differences in the nanostructure of the resins, the reason is probably not connected with the surface area and epitope accessibility on the section. So, the difference is caused by earlier steps of sample processing. We assume that different antigens have different sensitivity to the extraction during the infiltration of the resin. Considerable extraction properties of monomeric acrylic resins have been described (Hamilton et al., 1992). This would explain more uniform results for chemically fixed samples, where slightly cross-linked molecules are possibly more resistant to extraction. In high-pressure frozen cells, these effects would be more pronounced, which is consistent with our observation. To summarize, as all the tested resins gave overall similar results, the routine use of low-toxic LR White can be recommended. However, for optimal detection of some antigens, other resins may be needed, and this should be tested individually.

As the cryofixation is considered to be preferable for the preparation of biological samples, we then concentrated on the search of the optimal conditions for automated freeze substitution (FS) step. We detected various nuclear antigens on ultrathin sections of high-pressure frozen HeLa cells processed using three different media for automated FS and embedded into LR White resin. In parallel, the total protein concentrations were compared in samples taken before freezing, immediately after freezing, and after processing using each of the FS media to specify the critical steps most contributing to the loss of antigens. Hawes et al. (2007) considered that the experimental requirements of immunogold labeling and morphology are mutually exclusive and suggested that the addition of osmium (0.1–2%) or uranyl acetate (0.2%) is unavoidable for simultaneous visible ultrastructure and successful immunolabeling. Other authors, however, reported well-preserved cell ultrastructure with minimal apparent segregation patterns correlated with retention of antigenicity for nuclear targets without use of any cross-linking fixative (Agarwal et al., 2009; Sobol et al., 2010). We evaluated various automated FS protocols for preparation of biological samples for immunoelectron microscopy using quantitative evaluation of immunogold labeling and antigen content. The protein extraction from cryoimmobilized cells was identified as a critical point during the FS. The loss of antigens available for immunogold labeling was not significantly affected by high-pressure freezing, while the cryosubstitution with acetone caused a significant loss of antigens. While addition of water

can improve visibility of some cell structures, it strengthened the negative effect of cryosubstitution on antigen loss by extraction. All four studied nuclear antigens demonstrated lower densities of immunogold labeling when acetone was supplemented with 1% water. However, the addition of 0.5% glutaraldehyde to the acetone with 1,5% water significantly reversed the result and in case of anti-histone H3 and anti-RNA polymerase II CTD antibodies even provided up to 50% increase of labeling density. In conclusion, low concentrations of glutaraldehyde can be generally recommended for cryosubstitution rather than the use of pure solvent, but the exact conditions need to be elaborated individually for certain antigens.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. A complex stereological method for statistical evaluation of clustering and colocalization of antigens in biological samples, including a user-friendly interface has been developed. We have developed two bottom-censored K functions. The $K^{-1}(r_1, r_2)$ provides the graphical representation of clustering/colocalization patterns, while the $K(r_1, r_2)$ is necessary for testing of the statistical significance of these patterns and helps to overcome the problem of short-range effects. We have also applied the correction for boundary effect to the calculations of both K and K^{-1} functions. Reliability of the method was tested using the antigens with known participation in DNA replication. We have created a set of user-friendly software tools, allowing to perform the whole evaluation procedure starting with the automated detection of gold particles till the statistical evaluation of clustering/colocalization and producing the graphical output.

2. Functional microarchitecture of DNA replication and transcription sites has been successfully characterized using the developed stereological tools. We have demonstrated ultrastructurally in HeLa cells that as replication proceeds, the labeled sites increase in size up to 400 nm, while maintaining a broadly round shape. DNA replication is compartmentalized within cell nuclei at the level of DNA foci and support the view that the synthetic centers are spatially constrained while the chromatin loops are dynamic during DNA synthesis. Two morphological types of replication sites (replication bodies, RB and replication foci, RF) can be distinguished by electron microscopy. RB represent the major replication structures in HeLa cells and they are responsible for replication of the bulk of DNA. They have specific ultrastructure of respective nuclear bodies. RF, in contrast, are smaller, less complex structures, without prominent underlying structure. Both RB and RF contain a set of enzymatic, structural and regulatory proteins, which are known to take part in replication itself or in S-phase regulation. Some regulatory and structural proteins, however, were found only in replication sites of one type. Both actin and NMI colocalize with transcription sites in the nucleoplasm of activated human lymphocytes, which is in agreement with the importance of both proteins for transcription. In resting cells, however, only actin was found in transcription sites. High amount of NMI in heterochromatin of resting lymphocytes allows us to suggest that heterochromatin may represent a storage site of NMI, which after stimulation is redistributed to nuclear compartments with active DNA transcription.

3. Simultaneous multiple ultrastructural immunolabeling of five nuclear antigens have been performed. Three new types of stable nanoparticles easily distinguishable in conventional TEM by their shape (gold-silver core-shell nanoparticles, gold nanorods and cubic palladium nanoparticles) were synthesized. The nanoparticles have been successfully tested for their applicability in ultrastructural immunolabeling. PIP2, B23, actin, Sm protein, and SMC2 were simultaneously detected at ultrastructural resolution on ultrathin sections of chemically fixed HeLa cells, embedded into LR White resin. The PIP2-positive foci were found in a close contact with Sm-, actin-, and/or SMC2-rich foci, forming complementary 3D domains.

4. We have optimized the procedure of resin embedding of biological samples for post-embedding immunolabeling. LR White resin is suitable for sample embedding after both chemical and cryo fixation. However, for some antigens Lowicryl HM 20 could be preferable. Addition of 1.5% water and 0.5% glutaraldehyde into acetone for freeze substitution improves the antigen preservation in most cases, as shown by immunogold labeling and biochemical quantification of protein amount.

PROSPECTS

Our newly developed and optimized methods of sample preparation for transmission electron microscopy and stereological methods advanced the possibilities of analysis of biological samples. In order to successfully obtain yet more complex information about the spatial interactions of functional molecules in biological object, the following tasks arise:

1. To develop methods allowing for complex analysis of biological samples in 3D.

Detection of antigens in the volume of biological samples represents one of the challenges for contemporary electron microscopy. The possibilities of multiple antigens detection in the volume of the sample by means of pre-embedding immunolabeling are currently technically limited. We plan to develop a reliable method with a combination of pre-embedding and post-embedding immunolabeling, which would allow us to collect the information about multiple antigens simultaneously, one in 3D and up to four in 2D. Another direction will be testing of various detection labels for labeling of intracellular structures before embedding. This can be, however, limited by low penetration of the markers with their increasing size. An essential part would be the development of 3D spatial algorithms allowing for statistical evaluation of labeling patterns in the volume of the sample.

2. To develop methods for correlative light and electron microscopy.

Correlative light-electron microscopy is a powerful tool for studying relationships between structure and function at various levels of resolution. This approach is especially useful for analysis of rare events in cell population, and for correlation of live cell observations with analysis at sub-nanometer resolution. We plan to develop methods of sample preparation for correlative light and transmission electron microscopy allowing for the best ultrastructure preservation and simultaneous detection of multiple antigens using our new approaches.

OVERVIEW OF USED METHODS

Cultivation of cells
Isolation of human lymphocytes
DNA replication in permeabilized cells
Labeling of nascent transcripts in non-permeabilized cells
Transmission electron microscopy
High pressure freezing
Freeze substitution
Immunolabeling on ultrathin sections
SDS-PAGE
Immunoblotting
RNA isolation and RT-qPCR
Morphometry and Spatial statistics
Nanoparticle synthesis in aqueous solutions
Conjugation of antibodies to nanoparticles

RESEARCH PAPERS

1. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments

Philimonenko, A. A., Janacek, J., and Hozak, P.

Journal of Structural Biology 132, 201-210, 2000

IF: 3.36 (2012)

A. Ph. performed immunolabeling experiments, collected TEM pictures and participated in discussions during development of statistical method, wrote the biological part of the manuscript.

2. Dynamics of DNA replication: an ultrastructural study

Philimonenko, A. A., Jackson, D. A., Hodny, Z., Janacek, J., Cook, P. R., and Hozak, P.

Journal of Structural Biology 148, 279-289, 2004

IF: 3.36 (2012)

A. Ph. performed immunolabeling experiments, collected and statistically evaluated TEM pictures, wrote the manuscript together with Z. H.

3. The microarchitecture of DNA replication domains

Philimonenko, A. A., Hodny, Z., Jackson, D. A., and Hozak, P.

Histochemistry and cell biology 125, 103-117, 2006

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. performed immunolabeling experiments, collected and statistically evaluated TEM pictures, wrote the manuscript together with Z. H.

4. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell

Kysela, K., Philimonenko, A. A., Philimonenko, V. V., Janacek, J., Kahle, M., and Hozak, P.

Histochemistry and Cell Biology 124, 347-358, 2005

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. statistically evaluated actin and NMI labeling patterns in cellular compartments.

5. Preparation of stable Pd nanoparticles with tunable size for multiple immunolabeling in biomedicine

Slouf, M., Pavlova, E., Bhardwaj, M.S., Plestil, J., Onderkova, H., Philimonenko A. A., Hozak P.

Materials Letters 65, 1197-1200, **2011**

IF: 2.22 (2012)

A. Ph. performed conjugation of nanoparticles to antibodies, including titration and saturation analysed by SDS-PAGE; conducted and evaluated immunolabeling experiments.

6. Preparation of stable Pd nanocubes and their use in biological labeling

Slouf, M., Hruby, M., Bakaeva, Z., Vlkova, H., Nebesarova, J., Philimonenko, A. A., and Hozak, P.

Colloids and surfaces B, Biointerfaces 100, 205-208, **2012**

IF: 3.55 (2012)

A. Ph. performed conjugation of nanoparticles to antibodies, including titration and saturation analysed by SDS-PAGE; conducted and evaluated immunolabeling experiments.

7. Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry

Philimonenko, V. V., Philimonenko, A. A., Sloufova, I., Hruby, M., Novotny, F., Halbhuber, Z., Krivjanska, M., Nebesarova, J., Slouf, M., and Hozak, P.

Histochemistry and Cell Biology 141, 229-239, **2014**

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. performed conjugation of nanoparticles to antibodies, including titration and saturation analysed by SDS-PAGE; and participated in designing and evaluation of immunolabeling experiments.

8. Quantitative evaluation of freeze-substitution effects on preservation of nuclear antigens during preparation of biological samples for immunoelectron microscopy

Sobol, M. A., Philimonenko, V. V., Philimonenko, A. A., and Hozak, P.

Histochemistry and Cell Biology 138, 167-177, **2012**

IF: 2.63 (2012)

A. Ph. performed immunolabeling experiments, collected TEM pictures and quantified immunogold labeling intensities.

9. Comparing immunolabeling properties in HeLa cells embedded in LR White, Lowicryl, or LR Gold resins after chemical or physical fixation

Philimonenko, A. A., Philimonenko, V. V., Janda, P., and Hozak, P.

Manuscript

A. Ph. performed immunolabeling experiments, collected TEM pictures and quantified immunogold labeling intensities, wrote the manuscript together with V. Ph.

CURRICULUM VITAE

Name: Anatoly A. Filimonenko

Current address: Department of Biology of the Cell Nucleus
Institute of Molecular Genetics
Videnska 1083
14220 Prague 4
Czech Republic

E-mail: anatoly.philimonenko@img.cas.cz

Education: 1986-1992 Study at the Leningrad State University, Leningrad, Russia
1988-1992 M.Sc. thesis, Department of Genetics, Leningrad State University
1992-1995 Postgraduate student, Laboratory of Evolutionary Animal Genetics,
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

October 1996 – September 2010 External postgraduate student, 1st Medical Faculty, Charles
University, Prague, Czech Republic

October 2011 – present External postgraduate student, Faculty of Science, Charles
University, Prague, Czech Republic

LIST OF ALL AUTHOR'S PUBLICATIONS

21. Osadchuk, L.V., L. Jalkanen, A.A. Filimonenko, and V.V. Gul'tiaeva. **1995**. [The reproductive function of young male silver foxes *Vulpes vulpes* after long-term selection for domesticated behavior]. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 31:662-667.
22. Osadchuk, L.V., V.V. Gul'tiaeva, A.A. Filimonenko, and L. Jalkanen. **1996**. [Spermatogenesis and the testosterone level in young male silver foxes in their reproductive period]. *Fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova / Rossiiskaia akademiia nauk*. 82:102-108.
23. Nowak, G., L. Pestic-Dragovich, P. Hozak, A. Philimonenko, C. Simerly, G. Schatten, and P. de Lanerolle. **1997**. Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *The Journal of biological chemistry*. 272:17176-17181. **IF: 4.66**
24. Novikov, S.N., G.A. Churakov, A.A. Filimonenko, and V.E. Sukonina. **2000**. Organ specificity of the Gus gene expression under the effect of testosterone as related to the activity of lysosomal beta-glucuronidase (EC 3.2.1.31) and of androgen-dependent pheromones in laboratory mice. *Doklady biological sciences : proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections / translated from Russian*. 374:452-454.
25. Pestic-Dragovich, L., L. Stojiljkovic, A.A. Philimonenko, G. Nowak, Y. Ke, R.E. Settlege, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, P. Hozak, and P. de Lanerolle. **2000**. A myosin I isoform in the nucleus. *Science*. 290:337-341. **IF: 31.03**
26. Philimonenko, A.A., J. Janacek, and P. Hozak. **2000**. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *Journal of structural biology*. 132:201-210. **IF: 3.36**
27. Philimonenko, A.A., D.A. Jackson, Z. Hodny, J. Janacek, P.R. Cook, and P. Hozak. **2004**. Dynamics of DNA replication: an ultrastructural study. *Journal of structural biology*. 148:279-289. **IF: 3.36**

28. Kysela, K., A.A. Philimonenko, V.V. Philimonenko, J. Janacek, M. Kahle, and P. Hozak. **2005**. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochemistry and cell biology*. 124:347-358. **IF: 2.63**
29. Philimonenko, A.A., Z. Hodny, D.A. Jackson, and P. Hozak. **2006**. The microarchitecture of DNA replication domains. *Histochemistry and cell biology*. 125:103-117. **IF: 2.63**
30. Novikov, S.N., G.A. Churakov, A.A. Filimonenko, Ermakova, II, E.M. Fedorova, and I.A. Burkot. **2009**. [The pattern of major urinary proteins (MUPS) expression during postnatal ontogenesis of a laboratory mouse depends on genotype and sex]. *Ontogenez*. 40:261-269.
31. Manaskova-Postlerova, P., N. Davidova, M. Sulc, A. Philimonenko, P. Hozak, and V. Jonakova. **2011**. Reproductive tissue expression and sperm localization of porcine beta-microseminoprotein. *Cell and tissue research*. 344:341-353. **IF: 3.68**
32. Philimonenko, A.A., J. Janacek, L. Snyers, M. Almeder, W. Berger, W. Schmidt, C. Schofer, P. Hozak, and K. Weipoltshammer. **2011**. Chromosomal dynamics of cell cycle regulator gene p21 during transcriptional activation. *Journal of structural biology*. 173:382-390. **IF: 3.36**
33. Rohlena, J., L.F. Dong, K. Kluckova, R. Zobalova, J. Goodwin, D. Tilly, J. Stursa, A. Pecinova, A. Philimonenko, P. Hozak, J. Banerjee, M. Ledvina, C.K. Sen, J. Houstek, M.J. Coster, and J. Neuzil. **2011**. Mitochondrially targeted alpha-tocopheryl succinate is antiangiogenic: potential benefit against tumor angiogenesis but caution against wound healing. *Antioxidants & redox signaling*. 15:2923-2935. **IF: 7.19**
34. Slouf, M., E. Pavlova, M.S. Bhardwaj, J. Plestil, H. Onderkova, A.A. Philimonenko, and P. Hozak. Preparation of stable Pd nanoparticles with tunable size for multiple immunolabeling in biomedicine. **2011**. *Materials Letters*. 65:1197-1200. **IF: 2.22**
35. Horejsi, B., S. Vinopal, V. Sladkova, E. Draberova, V. Sulimenko, T. Sulimenko, V. Vosecka, A. Philimonenko, P. Hozak, C.D. Katsetos, and P. Draber. **2012**. Nuclear gamma-tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein C53. *Journal of cellular physiology*. 227:367-382. **IF: 4.22**
36. Slouf, M., M. Hruby, Z. Bakaeva, H. Vlkova, J. Nebesarova, A.A. Philimonenko, and P. Hozak. **2012**. Preparation of stable Pd nanocubes and their use in biological labeling. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 100:205-208. **IF: 3.55**
37. Sobol, M.A., V.V. Philimonenko, A.A. Philimonenko, and P. Hozak. **2012**. Quantitative evaluation of freeze-substitution effects on preservation of nuclear antigens during preparation of biological samples for immunoelectron microscopy. *Histochemistry and cell biology*. 138:167-177. **IF: 2.63**
38. Hartlova, A., M. Link, J. Balounova, M. Benesova, U. Resch, A. Straskova, M. Sobol, A. Philimonenko, P. Hozak, Z. Krocova, N. Gekara, D. Filipp, and J. Stulik. **2014**. Quantitative proteomics analysis of macrophage-derived lipid rafts reveals induction of autophagy pathway at the early time of Francisella tularensis LVS infection. *Journal of proteome research*. 13:796-804. **IF: 5.06**
39. Philimonenko, V.V., A.A. Philimonenko, I. Sloufova, M. Hruby, F. Novotny, Z. Halbhuber, M. Krivjanska, J. Nebesarova, M. Slouf, and P. Hozak. **2014**. Simultaneous detection of multiple targets for ultrastructural immunocytochemistry. *Histochemistry and cell biology*. 141:229-239. **IF: 2.63**
40. Philimonenko, A.A., V.V. Philimonenko, P. Janda, and P. Hozak. Comparing immunolabeling properties in HeLa cells embedded in LR White, Lowicryl, or LR Gold resins after chemical or physical fixation. Manuscript.

REFERENCES

- Acetarin, J.D., E. Carlemalm, and W. Villiger. 1986. Developments of new Lowicryl resins for embedding biological specimens at even lower temperatures. *Journal of microscopy*. 143:81-88.
- Agarwal, R., S. Ortleb, J.K. Sainis, and M. Melzer. 2009. Immunoelectron microscopy for locating calvin cycle enzymes in the thylakoids of *synechocystis* 6803. *Molecular plant*. 2:32-42.
- Azorin, I., M. Portoles, P. Marin, F. Lazaro-Dieguez, L. Megias, G. Egea, and J. Renau-Piqueras. 2004. Prenatal ethanol exposure alters the cytoskeleton and induces glycoprotein microheterogeneity in rat newborn hepatocytes. *Alcohol Alcohol*. 39:203-212.
- Barlow, C.A., R.S. Laishram, and R.A. Anderson. 2010. Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum. *Trends in cell biology*. 20:25-35.
- Biggiogera, M., and S. Fakan. 1998. Fine structural specific visualization of RNA on ultrathin sections. *J Histochem Cytochem*. 46:389-395.
- Bittermann, A.G., G. Knoll, A. Nemeth, and H. Plattner. 1992. Quantitative immuno-gold labelling and ultrastructural preservation after cryofixation (combined with different freeze-substitution and embedding protocols) and after chemical fixation and cryosectioning. Analysis of the secretory organelle matrix of *Paramecium trichocysts*. *Histochemistry*. 97:421-429.
- Brilakis, H.S., C.R. Hann, and D.H. Johnson. 2001. A comparison of different embedding media on the ultrastructure of the trabecular meshwork. *Curr Eye Res*. 22:235-244.
- Brorson, S.H. 1999. Fixative-dependent increase in immunogold labeling following antigen retrieval on acrylic and epoxy sections. *Biotech Histochem*. 74:248-260.
- Busch, H., Smetana, K. 1970. The nucleolus. Academic, New York
- Carlemalm, E., W. Villiger, J.A. Hobot, J.D. Acetarin, and E. Kellenberger. 1985. Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. *Journal of microscopy*. 140:55-63.
- Castano, E., V.V. Philimonenko, M. Kahle, J. Fukalova, A. Kalendova, S. Yildirim, R. Dzajak, H. Dingova-Krasna, and P. Hozak. 2010. Actin complexes in the cell nucleus: new stones in an old field. *Histochemistry and cell biology*. 133:607-626.
- Chang, P., T.H. Giddings, Jr., M. Winey, and T. Stearns. 2003. Epsilon-tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nature cell biology*. 5:71-76.
- Ching, R.W., G. Dellaire, C.H. Eskiw, and D.P. Bazett-Jones. 2005. PML bodies: a meeting place for genomic loci? *Journal of cell science*. 118:847-854.
- Cseresnyes, Z., U. Schwarz, and C.M. Green. 2009. Analysis of replication factories in human cells by super-resolution light microscopy. *BMC cell biology*. 10:88.
- de Lanerolle, P. 2012. Nuclear actin and myosins at a glance. *Journal of cell science*. 125:4945-4949.
- Eppenberger-Eberhardt, M., S. Aigner, M.Y. Donath, V. Kurer, P. Walther, C. Zuppinger, M.C. Schaub, and H.M. Eppenberger. 1997. IGF-I and bFGF differentially influence atrial natriuretic factor and alpha-smooth muscle actin expression in cultured atrial compared to ventricular adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 29:2027-2039.
- Fomproix, N., and P. Percipalle. 2004. An actin-myosin complex on actively transcribing genes. *Experimental cell research*. 294:140-148.
- Frankel, S., E.A. Sigel, C. Craig, S.C. Elgin, M.S. Mooseker, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. An actin-related protein in *Drosophila* colocalizes with heterochromatin protein 1 in pericentric heterochromatin. *Journal of cell science*. 110 (Pt 17):1999-2012.
- Gathercole, D.V., D.J. Colling, J.N. Skepper, Y. Takagishi, A.J. Levi, and N.J. Severs. 2000. Immunogold-labeled L-type calcium channels are clustered in the surface plasma membrane overlying junctional sarcoplasmic reticulum in guinea-pig myocytes-implications for excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 32:1981-1994.

- Grande, M.A., I. van der Kraan, B. van Steensel, W. Schul, H. de The, H.T. van der Voort, L. de Jong, and R. van Driel. 1996. PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem.* 63:280-291.
- Hainfeld, J.F. 1987. A small gold-conjugated antibody label: improved resolution for electron microscopy. *Science.* 236:450-453.
- Hamilton, G., B. Hamilton, and R. Mallinger. 1992. Effects of monomeric acrylic embedding media on the antigenicity of two epitopes of the MIC2-encoded Ewing's sarcoma cell membrane antigen. *Histochemistry.* 97:87-94.
- Hassan, A.B., R.J. Errington, N.S. White, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1994. Replication and transcription sites are colocalized in human cells. *Journal of cell science.* 107 (Pt 2):425-434.
- Hawes, P., C.L. Netherton, M. Mueller, T. Wileman, and P. Monaghan. 2007. Rapid freeze-substitution preserves membranes in high-pressure frozen tissue culture cells. *Journal of microscopy.* 226:182-189.
- Henson, J.D., A.A. Neumann, T.R. Yeager, and R.R. Reddel. 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene.* 21:598-610.
- Hess, M.W. 2003. Of plants and other pets: practical aspects of freeze-substitution and resin embedding. *Journal of microscopy.* 212:44-52.
- Hess, M.W., M. Muller, P.L. Debbage, M. Vetterlein, and M. Pavelka. 2000. Cryopreparation provides new insight into the effects of brefeldin A on the structure of the HepG2 Golgi apparatus. *Journal of structural biology.* 130:63-72.
- Hess, S.T., M. Kumar, A. Verma, J. Farrington, A. Kenworthy, and J. Zimmerberg. 2005. Quantitative electron microscopy and fluorescence spectroscopy of the membrane distribution of influenza hemagglutinin. *The Journal of cell biology.* 169:965-976.
- Hofmann, W.A., L. Stojiljkovic, B. Fuchsova, G.M. Vargas, E. Mavrommatis, V. Philimonenko, K. Kysela, J.A. Goodrich, J.L. Lessard, T.J. Hope, P. Hozak, and P. de Lanerolle. 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nature cell biology.* 6:1094-1101.
- Hohenberg, H., K. Mannweiler, and M. Muller. 1994. High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes. *Journal of microscopy.* 175:34-43.
- Hohenberg, H., M. Tobler, and M. Muller. 1996. High-pressure freezing of tissue obtained by fine-needle biopsy. *Journal of microscopy.* 183:133-139.
- Hozák, P., A.B. Hassan, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1993. Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell.* 73:361-373.
- Hozák, P., D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1994. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *Journal of cell science.* 107 (Pt 8):2191-2202.
- Hozák, P., Novák, J. T., Smetana, K. 1989. Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biology of the Cell.* 66:225-233.
- Hu, P., S. Wu, and N. Hernandez. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes & development.* 18:3010-3015.
- Hughes, T.A., A. Pombo, J. McManus, P. Hozak, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1995. On the structure of replication and transcription factories. *J Cell Sci Suppl.* 19:59-65.
- Humbel, B.M. and M Müller. 1985. Freeze substitution and low temperature embedding. In: Müller, M., R.P. Becker, A. Boyde, and J.J. Wolosewick (eds). The science of biological specimen preparation. SEM Inc., Illinois, pp. 175-183
- Iborra, F.J., and P.R. Cook. 1998. The size of sites containing SR proteins in human nuclei. Problems associated with characterizing small structures by immunogold labeling. *J Histochem Cytochem.* 46:985-992.
- Jackson, D.A., and A. Pombo. 1998. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *The Journal of cell biology.* 140:1285-1295.

- Jimenez, N., B.M. Humbel, E. van Donselaar, A.J. Verkleij, and K.N. Burger. 2006. Aclar discs: a versatile substrate for routine high-pressure freezing of mammalian cell monolayers. *Journal of microscopy*. 221:216-223.
- Jul-Larsen, A., T. Visted, B.O. Karlsen, C.H. Rinaldo, R. Bjerkvig, P.E. Lonning, and S.O. Boe. 2004. PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Experimental cell research*. 298:58-73.
- Kandela, I.K., R. Bleher, and R.M. Albrecht. 2007. Multiple correlative immunolabeling for light and electron microscopy using fluorophores and colloidal metal particles. *J Histochem Cytochem*. 55:983-990.
- Kapoor, P., and X. Shen. 2014. Mechanisms of nuclear actin in chromatin-remodeling complexes. *Trends in cell biology*. 24:238-246.
- Kirschning, E., G. Rutter, and H. Hohenberg. 1998. High-pressure freezing and freeze-substitution of native rat brain: suitability for preservation and immunoelectron microscopic localization of myelin glycolipids. *J Neurosci Res*. 53:465-474.
- Kysela, K., A.A. Philimonenko, V.V. Philimonenko, J. Janacek, M. Kahle, and P. Hozak. 2005. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochemistry and cell biology*. 124:347-358
- Kiss, J.Z., T.H. Giddings, Jr., L.A. Staehelin, and F.D. Sack. 1990. Comparison of the ultrastructure of conventionally fixed and high pressure frozen/freeze substituted root tips of *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Protoplasma*. 157:64-74.
- Loukanov, A., N. Kamasawa, R. Danev, R. Shigemoto, and K. Nagayama. 2010. Immunolocalization of multiple membrane proteins on a carbon replica with STEM and EDX. *Ultramicroscopy*. 110:366-374.
- Ma, H., J. Samarabandu, R.S. Devdhar, R. Acharya, P.C. Cheng, C. Meng, and R. Berezney. 1998. Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 143:1415-1425.
- Markovics, J., L. Glass, and G.G. Maul. 1974. Pore patterns on nuclear membranes. *Experimental cell research*. 85:443-451.
- Marsh, B.J., D.N. Mastronarde, K.F. Buttle, K.E. Howell, and J.R. McIntosh. 2001. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:2399-2406.
- Martin, M., and F.J. Medina. 1991. A *Drosophila* anti-RNA polymerase II antibody recognizes a plant nucleolar antigen, RNA polymerase I, which is mostly localized in fibrillar centres. *Journal of cell science*. 100 (Pt 1):99-107.
- Maul, G.G. 1998. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays*. 20:660-667.
- Mayhew, T.M. 2011. Mapping the distributions and quantifying the labelling intensities of cell compartments by immunoelectron microscopy: progress towards a coherent set of methods. *J Anat*. 219:647-660.
- Mayhew, T.M., J.M. Lucocq, and G. Griffiths. 2002. Relative labelling index: a novel stereological approach to test for non-random immunogold labelling of organelles and membranes on transmission electron microscopy thin sections. *Journal of microscopy*. 205:153-164.
- McDonald, K. 2007. Cryopreparation methods for electron microscopy of selected model systems. *Methods Cell Biol*. 79:23-56.
- McDonald, K., and M.K. Morphew. 1993. Improved preservation of ultrastructure in difficult-to-fix organisms by high pressure freezing and freeze substitution: I. *Drosophila melanogaster* and *Strongylocentrotus purpuratus* embryos. *Microsc Res Tech*. 24:465-473.
- McDonald, K., and T. Muller-Reichert. 2002. Cryomethods for thin section electron microscopy. *Methods Enzymol*. 351:96-123.
- Meier, U.T., and G. Blobel. 1992. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell*. 70:127-138.

- Merighi, A., J.M. Polak, G. Fumagalli, and D.T. Theodosios. 1989. Ultrastructural localization of neuropeptides and GABA in rat dorsal horn: a comparison of different immunogold labeling techniques. *J Histochem Cytochem.* 37:529-540.
- Meyer, D.A., J.A. Oliver, and R.M. Albrecht. 2005. A Method for the Quadruple Labeling of Platelet Surface Epitopes for Transmission Electron Microscopy. *Microsc Microanal.* 11:142-143.
- Meyer, D.A., J.A. Oliver, and R.M. Albrecht. 2010. Colloidal palladium particles of different shapes for electron microscopy labeling. *Microsc Microanal.* 16:33-42.
- Miller, H.R. 1972. Fixation and tissue preservation for antibody studies. *Histochem J.* 4:305-320.
- Monaghan, P., N. Perusinghe, and M. Muller. 1998. High-pressure freezing for immunocytochemistry. *Journal of microscopy.* 192:248-258.
- Monaghan, P., and D. Robertson. 1990. Freeze-substitution without aldehyde or osmium fixatives: ultrastructure and implications for immunocytochemistry. *Journal of microscopy.* 158:355-363.
- Muhlfeld, C. 2010. High-pressure freezing, chemical fixation and freeze-substitution for immuno-electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 611:87-101.
- Muller-Reichert, T., J. Mantler, M. Srayko, and E. O'Toole. 2008. Electron microscopy of the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Journal of microscopy.* 230:297-307.
- Nakamura, H., T. Morita, and C. Sato. 1986. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus. *Experimental cell research.* 165:291-297.
- Nakayasu, H., and R. Berezney. 1989. Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *The Journal of cell biology.* 108:1-11.
- Percipalle, P., N. Fomproix, E. Cavellan, R. Voit, G. Reimer, T. Kruger, J. Thyberg, U. Scheer, I. Grummt, and A.K. Farrants. 2006. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO reports.* 7:525-530.
- Pestic-Dragovich, L., L. Stojiljkovic, A.A. Philimonenko, G. Nowak, Y. Ke, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, P. Hozak, and P. de Lanerolle. 2000. A myosin I isoform in the nucleus. *Science.* 290:337-341.
- Philimonenko, A.A., J. Janacek, and P. Hozak. 2000. Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *Journal of structural biology.* 132:201-210.
- Philimonenko, A.A., Z. Hodny, D.A. Jackson, and P. Hozak. 2006. The microarchitecture of DNA replication domains. *Histochemistry and cell biology.* 125:103-117.
- Philimonenko, V.V., J. Janacek, and P. Hozak. 2002. LR White is preferable to Unicryl for immunogold detection of fixation-sensitive nuclear antigens. *Eur J Histochem.* 46:359-364.
- Philimonenko, V.V., J. Zhao, S. Iben, H. Dingova, K. Kysela, M. Kahle, H. Zentgraf, W.A. Hofmann, P. de Lanerolle, P. Hozak, and I. Grummt. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nature cell biology.* 6:1165-1172.
- Prior, I.A., C. Muncke, R.G. Parton, and J.F. Hancock. 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *The Journal of cell biology.* 160:165-170.
- Reipert, S., I. Fischer, and G. Wiche. 2004. High-pressure freezing of epithelial cells on sapphire coverslips. *Journal of microscopy.* 213:81-85.
- Renau-Piqueras, J., R. Zaragoza, P. De Paz, R. Baguena-Cervellera, L. Megias, and C. Guerri. 1989. Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem.* 37:229-240.
- Ripley, B.D. 1981. *Spatial Statistics.* Wiley, New York.
- Ripley, B.D. 1988. *Statistical Inference for Spatial Processes.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Roth, J. 1989. Postembedding labeling on Lowicryl K4M tissue sections: detection and modification of cellular components. *Methods Cell Biol.* 31:513-551.
- Roth, J., M. Bendayan, E. Carlemalm, W. Villiger, and M. Garavito. 1981. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J Histochem Cytochem.* 29:663-671.

- Roth, J., M. Bendayan, and L. Orci. 1978. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J Histochem Cytochem.* 26:1074-1081.
- Roth, J., and E.G. Berger. 1982. Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae. *The Journal of cell biology.* 93:223-229.
- Roth, J., and D.J. Taatjes. 1998. Tubules of the trans Golgi apparatus visualized by immunoelectron microscopy. *Histochemistry and cell biology.* 109:545-553.
- Roth, J., C. Zuber, P. Komminoth, T. Sata, W.P. Li, and P.U. Heitz. 1996. Applications of immunogold and lectin-gold labeling in tumor research and diagnosis. *Histochemistry and cell biology.* 106:131-148.
- Roy, S., S. Plowman, B. Rotblat, I.A. Prior, C. Muncke, S. Grainger, R.G. Parton, Y.I. Henis, Y. Kloog, and J.F. Hancock. 2005. Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol Cell Biol.* 25:6722-6733.
- Rusakov, D.A., H.A. Davies, M.G. Stewart, and M. Schachner. 1995. Clustering and co-localization of immunogold double labelled neural cell adhesion molecule isoforms in chick forebrain. *Neurosci Lett.* 183:50-53.
- Salas, M., T. J. Miller, J. Leis, and M. L. DePamphilis. 1999. Mechanisms for priming DNA synthesis. In: Concepts in Eucaryotic DNA Replication, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarshad, A., F. Sadeghifar, E. Louvet, R. Mori, S. Bohm, B. Al-Muzzaini, A. Vintermist, N. Fomproix, A.K. Ostlund, and P. Percipalle. 2013. Nuclear myosin 1c facilitates the chromatin modifications required to activate rRNA gene transcription and cell cycle progression. *PLoS genetics.* 9:e1003397.
- Schofer, C., J. Janacek, K. Weipoltshammer, J. Pourani, and P. Hozak. 2004. Mapping of cellular compartments based on ultrastructural immunogold labeling. *Journal of structural biology.* 147:128-135.
- Schwarz, H., and B.M. Humbel. 1989. Influence of fixatives and embedding media on immunolabelling of freeze-substituted cells. *Scanning Microsc Suppl.* 3:57-63; discussion 63-54.
- Seidel, J., and M. Zabel. 2001. Application of colloidal gold to ultrastructural studies. *Folia Histochem Cytobiol.* 39:107-108.
- Skepper, J.N. 2000. Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *Journal of microscopy.* 199:1-36.
- Smetana, K., Potměšil, M. 1968. Ring shaped nucleoli in liver cells of rats after treatment with actinomycin D. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 92(1):62-69.
- Smit, J.W., C.J. Meijer, F. Decary, and T.M. Feltkamp-Vroom. 1974. Paraformaldehyde fixation in immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Preservation of tissue and cell surface membrane antigens. *J Immunol Methods.* 6:93-98.
- Sobol, M., J. Nebesarova, and P. Hozak. 2011. A method for preserving ultrastructural properties of mitotic cells for subsequent immunogold labeling using low-temperature embedding in LR White resin. *Histochemistry and cell biology.* 135:103-110.
- Sobol, M., V.V. Philimonenko, and P. Hozak. 2010. Comparison of methods of high-pressure freezing and automated freeze-substitution of suspension cells combined with LR White embedding. *Histochemistry and cell biology.* 134:631-641.
- Steinbrecht R.A. and M. Müller. 1987. Freeze-substitution and freeze-drying. In: Steinbrecht R.A. and K. Zierold (eds). Cryotechniques in biological electron microscopy. Springer, Berlin, pp. 149-172.
- Stirling, J.W. 1990. Immuno- and affinity probes for electron microscopy: a review of labeling and preparation techniques. *J Histochem Cytochem.* 38:145-157.
- Stradalova, V., K. Gaplovska-Kysela, and P. Hozak. 2008. Ultrastructural and nuclear antigen preservation after high-pressure freezing/freeze-substitution and low-temperature LR White embedding of HeLa cells. *Histochemistry and cell biology.* 130:1047-1052.
- Tetley, L., C.M. Turner, J.D. Barry, J.S. Crowe, and K. Vickerman. 1987. Onset of expression of the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly studied using immunoelectron microscopy. *Journal of cell science.* 87 (Pt 2):363-372.

- Tokuyasu K.T. 1984. Immuno-cryoultramicrotomy. In: Polak, J.M. and I.M. Varndell (eds). Immunolabeling for electron microscopy. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 71-96
- Treisman, R. 2013. Shedding light on nuclear actin dynamics and function. *Trends in biochemical sciences*. 38:376-377.
- Vancova, M., M. Slouf, J. Langhans, E. Pavlova, and J. Nebesarova. 2011. Application of colloidal palladium nanoparticles for labeling in electron microscopy. *Microsc Microanal*. 17:810-816.
- Webster, P., H. Schwarz, and G. Griffiths. 2008. Preparation of cells and tissues for immuno EM. *Methods Cell Biol*. 88:45-58.
- Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E.M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther. 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *Journal of virology*. 79:1071-1083.
- Williams, M.A. 1977. Quantitative methods in biology. In: Glauert, A.M. (ed). Practical Methods in Electron Microscopy. Elsevier Biomedical Press, North Holland, pp. 208–210.
- Wuarin, J., and U. Schibler. 1994. Physical isolation of nascent RNA chains transcribed by RNA polymerase II: evidence for cotranscriptional splicing. *Mol Cell Biol*. 14:7219-7225.
- Young, R.D., P.A. Lawrence, V.C. Duance, T. Aigner, and P. Monaghan. 1995. Immunolocalization of type III collagen in human articular cartilage prepared by high-pressure cryofixation, freeze-substitution, and low-temperature embedding. *J Histochem Cytochem*. 43:421-427.