KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 68 2019
Numer 1 (322)
Strony 19–33

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

PAWEŁ TRZASKOMA[1], ADRIANA MAGALSKA[2]

[1]*Pracownia Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej*
[2]*Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych*
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: p.trzaskoma@nencki.gov.pl
a.magalska@nencki.gov.pl

NOWOCZESNE TECHNIKI MIKROSKOPOWE W BADANIACH NAD TRÓJWYMIAROWĄ STRUKTURĄ CHROMATYNY*

WSTĘP

Historia mikroskopii zaczyna się w XVI w., kiedy to Zachariasz i Hans Janssenowie wykorzystali (znane już znacznie wcześniej) dwie soczewki do zbudowania prekursora dzisiejszego mikroskopu. Urządzenie to pozwalało na obserwacje z dziesięciokrotnym powiększeniem. Wiek XVII to już w biologii okres fundamentalnych odkryć. W tym czasie prawdziwego przełomu dokonał Antoni van Leeuwenhoek, który często uważany jest za prekursora dzisiejszej mikroskopii. Stworzony przez niego aparat był zdolny do obserwacji z powiększeniem niemal trzystukrotnym. Pozwoliło to na wkroczenie w zupełnie nową erę – mikrobiologii. To właśnie Leeuwenhoek opisał pierwszą bakterię (patrz LANE 2015). W podobnym czasie Robert Hooke odkrył komórkę (REINHART i CARDOSO 2017), a Marcello Malphigi opisał budowę naczyń włosowatych (patrz POUYAN 2014). Dalszy rozwój mikroskopii następował znacznie wolniej. Mikroskopu zaczęto używać powszechniej u schyłku XIX w. dzięki zasługom Ernsta Abbego, który nie tylko opracował teorię mikroskopii, lecz także znacząco rozwinął mikroskopię technicznie, m.in. przez zastosowanie kondensora, ulepszając tym samym oświetlenie preparatu czy też obiektywu immersyjnego (patrz DAVIDSON 2009). Wiek XX to okres najszybszego rozwoju mikroskopii. Wtedy to dokonano prawdziwych przełomów. W 1932 r. Ernst Ruska i Maks Knoll opracowali pierwszy mikroskop elektronowy. Dość szybko zaczęto używać go do obserwacji biologicznych, co zaowocowało przyznaniem nagrody Nobla w 1974 r. dla Alberta Claude'a, Christiana de Duve'a i George'a Paladego za prace nad strukturalną i funkcjonalną organizacją komórki (ZORCA i ZORCA 2011). Przy użyciu mikroskopii elektronowej dowiedziono, że jądro komórkowe i chromatyna mają domeny, a także z wielką dokładnością opisano niektóre z nich (BERNHARD i GRANBOULAN 1963, SMETANA i współaut. 1966). Pod koniec lat 50. ubiegłego wieku pracujący nad sieciami neuronowymi Marvin Minsky stworzył i opatentował prototyp mikroskopu konfokalnego (REINHART i CARDOSO 2017). Minsky, nie będąc w stanie obserwować trójwymiarowej struktury, skonstruował mikroskop, w którym światło zbierane było w zadowalającej rozdzielczości tylko z jednej płaszczyzny. Pomysł ten pozwolił na opracowanie mikroskopów konfokalnych, a co za tym idzie, trójwymiarowych rekonstrukcji obserwowanych obiektów, i w końcu mikroskopów superrodzielczych, cechujących się dziś rozdzielczością niewyobrażalną nawet kilkanaście lat temu (patrz CREMER i współaut. 2014). Co więcej, możliwe jest wykorzystanie mikroskopii superrozdzielczej do obrazowania przyżyciowego i badania interakcji między cząsteczkami, ruchu komórek, a nawet zmian struktury chromatyny wewnątrz jądra komórkowego.

Słowa kluczowe: chromatyna, jądro komórkowe, mikroskopia elektronowa, mikroskopia superrozdzielcza, struktura chromatyny

*Praca powstała w wyniku realizacji projektów badawczych o nr UMO-2014/15/N/NZ2/00379, UMO-2015/18/E/NZ3/00730 oraz o nr UMO-2017/24/T/NZ2/00307 finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Obecnie panującym trendem w mikroskopii jest dążenie do zobrazowania coraz mniejszych struktur w coraz wyższej rozdzielczości, a także optymalizacja procesów obserwacji przyżyciowych. Nowe techniki umożliwiają konkretne, nowatorskie zastosowania mikroskopii w biologii, przykłady których przedstawimy w dalszej części pracy. Należy jednak pamiętać o pewnych ograniczeniach, które wciąż są eliminowane. Na przykład skanowanie obrazu w wysokiej rozdzielczości trwa coraz krócej, co sprzyja obserwacjom przyżyciowym. Ponadto, nowe techniki pozwalają na obserwacje z bardzo dużym powiększeniem i w wysokiej rozdzielczości coraz większych obszarów preparatu. O tym jak istotną rolę pełni mikroskopia oraz jak szybko rozwija się ostatnimi czasy, świadczy między innymi przyznana w 2014 r. Nagroda Nobla w dziedzinie chemii dla Erica Betziga, Stefana W. Hella i Williama E. Moernera, którzy otrzymali ją za wkład w rozwój superrozdzielczej mikroskopii świetlnej i ominięcie bariery rozdzielczości (patrz POMORSKI 2015). Z kolei dwa lata temu (2017) tę samą nagrodę w tej samej dziedzinie dostali Jacques Dubochet, Joachim Frank i Richard Henderson za prace nad metodą mikroskopii krioelektronowej (CRESSEY i CALLAWAY 2017).

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie wybranych najnowszych, innowacyjnych technik obrazowania o dużym znaczeniu i wkładzie w rozwój nauk biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania metod mikroskopowych w badaniach nad organizacją chromatyny w interfazowym jądrze komórkowym. Ponadto, naszym celem jest przedstawienie trendów panujących w tej dziedzinie. Niewątpliwie prowadzą one do jej rozwoju, a nas przybliżają do zrozumienia w jaki sposób dwumetrowa nić DNA upakowana jest w jądrze o średnicy zaledwie kilku mikrometrów. Praca ta umożliwi także Czytelnikowi zorientowanie się w możliwościach i ograniczeniach najnowszych metod mikroskopowych.

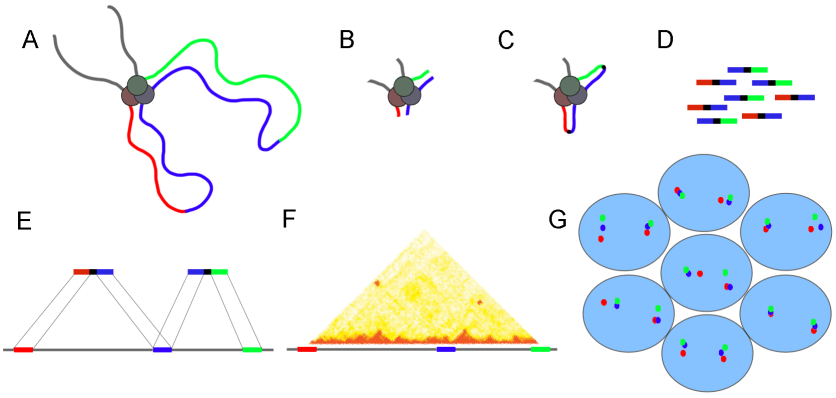
ORGANIZACJA CHROMATYNY W JĄDRZE KOMÓRKOWYM

Badania ostatnich dwóch dekad wskazują, że trójwymiarowa organizacja chromatyny jest dynamiczna i poprzez lokalne, krótkodystansowe i globalne (o dalekim zasięgu) oddziaływania między genami oraz sekwencjami regulatorowymi wpływa na regulację transkrypcji, a co za tym idzie fizjologię komórki (CAVALLI i MISTELI 2013). Mikroskopia świetlna i elektronowa, jako pierwsze, ukazały hierarchiczną budowę genomu: od pojedynczego włókna chromatynowego, aż do chromosomów mitotycznych. Ponadto, opracowane niedawno metody biochemiczne i mikroskopia superrozdzielcza pozwoliły na jeszcze głębszy wgląd w jego trójwymiarową strukturę w jądrze komórkowym (ROUQUETTE i współaut. 2010, FRASER i współaut. 2015).

W większości komórek podwójna helisa DNA o grubości ok. 2 nm, całkowitej długości 2 m, zawierająca około 6 miliardów par zasad u człowieka musi zostać upakowana w relatywnie małą objętość jądra komórkowego, którego średnica nie przekracza zazwyczaj kilkunastu mikrometrów.

Możliwe jest to dzięki zgrabnemu upakowaniu DNA za pomocą białek. Informacji o tym, w jaki sposób DNA jest zorganizowany w struktury wyższego rzędu dostarczyły zarówno techniki mikroskopowe, jak i metody biochemiczne, o czym więcej napiszemy w dalszej części tego artykułu.

Na pierwszym poziomie organizacji DNA jest nawinięty na oktamer histonowy, tworzony przez korowe białka histonowe H2A, H2B, H3 i H4. Na jeden nukleosom przypada DNA o długości 147 par zasad (u człowieka), a tak zbudowana podstawowa nić chromatyny ma grubość ok. 11 nm i wygląda jak sznur korali (ang. beads on string). Kolejny poziom upakowania DNA osiągany jest dzięki wstępowaniu łącznikowego histonu H1, który wiąże się do nici DNA pomiędzy nukleosomami (DNA łącznikowy ma długość od 20 do 75 pz) i pomaga stabilizować strukturę włókna o grubości 30 nm (OU i współaut. 2017). W oparciu o dane pochodzące z mikroskopii elektronowej i krystalografii zaproponowano dwa alternatywne modele tworzenia tego włókna: model solenoidu, w którym włókno 11 nm jest skręcone tak, że na jeden obrót przypada 6 nukleosomów, oraz model zygzaka, w którym nukleosomy są ułożone naprzemiennie w dwóch równoległych rzędach, a łącznikowy DNA wije się pomiędzy nimi. Istnienie włókna 30 nm w interfazowym jądrze komórkowym jest nadal dyskusyjne (RAZIN i GAVRILOV 2014), ponieważ większość badań pokazujących jego strukturę było przeprowadzonych na chromatynie wyizolowanej z komórki za pomocą detergentów (TREMETHICK 2007). Jednak istnieją także prace postulujące obecność włókna 30 nm również w nienaruszonym jądrze komórkowym (LI i współaut. 2015). Szczegółowych informacji o tym jak chromatyna zorganizowana jest w jądrze komórkowym dostarczyły takie metody biochemiczne jak: Hi-C (LIEBERMAN-AIDEN i współaut. 2009) czy ChIA-PET (TANG i współaut. 2015). Wywodzą się one z techniki 3C (ang. chromosome conformation capture) i są oparte na wysokoprzepustowym sekwencjonowaniu DNA. U ich podłoża leży założenie,



Rycina 1. Porównanie metod 3C i FISH.

A) Pętle chromatyny są utrzymywane przez białka strukturalne, a oddziaływania te mogą być ustabilizowane przez użycie związków sieciujących, takich jak formaldehyd. B) Utrwaloną chromatynę poddaje się izolacji i fragmentacji. C) Fragmenty DNA (utrzymywane przez usieciowane białka) są łączone za pomocą ligazy w warunkach ekstremalnie niskiego stężenia DNA. W ten sposób następuje wybiórcza ligacja fragmentów utrzymywanych przez kompleksy białkowe, a nie przypadkowych sekwencji. D) Tak otrzymane liniowe sekwencje DNA będą zawierały fragmenty genomu, które wcześniej znajdowały się w fizycznej bliskości w jądrze komórkowym, lecz naturalnie nie występujące w komórce. E) Powstałe fragmenty są sekwencjonowane i mapowane do genomu referencyjnego. F) W kolejnym kroku budowana jest mapa kontaktów, na podstawie prawdopodobieństwa występowania w badanej populacji komórek interakcji pomiędzy dwoma fragmentami chromatyny. Mapę tę można przedstawić w postaci trójkąta, u którego podstawy jest liniowa sekwencja danego fragmentu genomu, środek zaś wypełniają punkty, których zabarwienie świadczy o większym (kolor czerwony) lub bardzo niskim (kolor biały) prawdopodobieństwie interakcji między sekwencjami. G) Metoda FISH pozwala na sprawdzenie takich oddziaływań na poziomie jednej komórki, a nawet jednej kopii. Sondy do hybrydyzacji projektowane są do konkretnych sekwencji genomu (w przedstawionym przykładzie do czerwonego, zielonego i niebieskiego fragmentu pokazanego na rysunku F). Jak widać w każdym jądrze oddziaływania mogą być inne, różniąc się nie tylko pomiędzy jądrami komórkowymi, ale też kopiami w obrębie jednej komórki. Metody 3C pozwalają na zbadania jedynie uśrednionego obrazu z całej, bardzo dużej i zróżnicowanej populacji komórek.

że jeśli dwa fragmenty genomu są umiejscowione obok siebie w trójwymiarowej przestrzeni jądra komórkowego, to ich oddziaływanie można ustabilizować. Do tego celu używa się związków sieciujących, takich jak formaldehyd. Utrwaloną chromatynę poddaje się izolacji i fragmentacji, a sekwencje DNA (utrzymywane przez usieciowane białka) są łączone za pomocą ligazy w warunkach ekstremalnie niskiego stężenia DNA. W ten sposób promowana jest ligacja fragmentów znajdujących się w usieciowanych kompleksach, a nie przypadkowych sekwencji DNA. Tak powstałe nowe sekwencje DNA będą zawierały fragmenty genomu, które wcześniej znajdowały się w fizycznej bliskości w jądrze komórkowym, lecz naturalnie nie występują w komórce. Sekwencjonowanie i zmapowanie tych fragmentów do genomu referencyjnego daje nam możliwość oszacowania prawdopodobieństwa występowania interakcji pomiędzy dwoma fragmentami chromatyny w badanej, zazwyczaj dość dużej i zróżnicowanej, populacji komórek. Uzyskane wyniki są uśrednione. Oznacza to, że jeśli dana interakcja występuje tylko w jednej kopii chromosomu i tylko w części populacji komórek, to, stosując metody biochemiczne, nie jesteśmy w stanie tego wykazać. Z pomocą może przyjść tu mikroskopia i hybrydyzacja DNA *in situ*, która daje informacje na temat pozycji badanego regionu w pojedynczych komórkach, a także o różnicach pomiędzy kopiami chromosomów (Williamson i współaut. 2014, Tang i współaut. 2015). W przypadku metod biochemicznych uzyskujemy informacje o częstości występowania interakcji, mikroskopia zaś pozwala ocenić odległości między badanymi odcinkami. Oba komplementarne podejścia przyczyniają się do lepszego zrozumienia organizacji chromatyny (patrz Ryc. 1). Techniki pokrewne 3C pozwoliły na odkrycie domen TAD (ang. topologically associated domains), w obrębie których dochodzi do częstszych interakcji międzychromatynowych niż poza nimi. Te strukturalne jednostki chromatyny mają u ssaków średnią długość niespełna miliona par zasad (1 Mpz) i zawierają w sobie mniejsze pętle chromatyny o średniej długości 200 kpz, w których powstawanie zaangażowane jest białko CTCF (ang. CCCTC-binding factor) i kohezyna (Ong i Corces 2014). CTCF wiąże się do specyficznych sekwencji w DNA, a poprzez oddziaływanie z inną cząsteczką CTCF (związaną do DNA w pewnej odległości) tworzy pętle chromatyny, będące podstawą organizacji genomu. Orientacja motywu wiążą-

cego CTCF determinuje kierunek i topologię powstających pętli (TANG i współaut. 2015). W ten sposób w obrębie domeny TAD dochodzi do licznych interakcji pomiędzy np. promotorami i sekwencjami regulatorowymi, takimi jak wzmacniacze (ang. enhancers) czy represory (ang. silencers). Natomiast pomiędzy domenami TAD liczba takich interakcji jest niewielka. Domenowa organizacja genomu pozwala na funkcjonalny rozdział transkrypcyjnie aktywnej euchromatyny od fragmentów heterochromatyny, w których (przejściowo lub na stałe) ekspresja genów jest wyciszona. Co ciekawe, istnienie domen o podobnej wielkości postulowane było także na podstawie zdjęć mikroskopowych chromatyny (CREMER i współaut. 2015).

Najwyższy poziom organizacji wykazują chromosomy mitotyczne, które charakteryzują się ok. 50-krotnie wyższą kondensacją w stosunku do chromatyny interfazowej (BELMONT 2006). Ponieważ są one bardzo wdzięcznym obiektem badań, chromosomy mitotyczne zostały zobrazowane na wiele sposobów i trudno je tu wszystkie wymienić. Po raz pierwszy zostały zaobserwowane w 1842 r. przez szwajcarskiego botanika Carla Nägeliego, który także jako pierwszy opisał proces mitozy. Ostatnie badania przeprowadzone za pomocą wspomnianej metody Hi-C na synchronizowanej hodowli kurzej, limfoblastoidalnej linii komórek DT40, pokazały hierarchiczny model kondensacji chromosomów zależnej od kondensyn. Model ten porównano do spiralnych schodów, w którym rdzeń tworzą podstawy pętli chromatynowych, utrzymywanych przez kondensyny. W profazie zanikają typowe domeny TAD i interakcje krótkiego zasięgu, a zastępują je długodystansowe interakcje, formowane przez skręcającą się hierarchicznie nić chromatyny (GIBCUS i współaut. 2018). Badania te potwierdziły tezę wysnutą przez Urlicha K. Laemmliego pod koniec lat 70. ubiegłego wieku, który na postawie badań biochemicznych i obserwacji mikroskopowych chromosomów ekstrahowanych z linii ludzkich komórek raka szyki macicy HeLa wywnioskował, że chromosomy składają się z szeregu pętli chromatynowych, utrzymywanych przez niehistonowe białka (MARSDEN i LAEMMLI 1979). W jaki sposób komórka odtwarza interfazową postać chromatyny jest o dziwo procesem mało poznanym (MAGALSKA i współaut. 2014). Wiadomo natomiast, że DNA należący do poszczególnych chromosomów nie jest bezładnie rozprzestrzeniony w interfazowym jądrze, a tworzy specyficzne terytoria chromosomowe. Pod koniec XIX w. Carl Rabl jako pierwszy wskazał możliwość, że chromosomy zajmują określony region w jądrze interfazowym, natomiast termin „terytorium chromosomowe" (ang. chromosomal territory, CT) został zaproponowany na początku XX w. przez Theodora Boveriego (CREMER i współaut. 2014). Obecność spójnego, wyróżnionego terytorium, zajmowanego przez pojedynczy chromosom udowodniono ponad 80 lat później, przeprowadzając doświadczenie polegające na przyżyciowym naświetlaniu mikrowiązką promieniowania UV określonego obszaru jądra interfazowego. Naświetlane komórki inkubowano z radioaktywnie znakowaną tymidyną, która była wbudowywana w uszkodzone miejsca w DNA. Następnie, po osiągnięciu przez komórkę stadium mitozy, wykonywano preparaty chromosomowe i obserwowano rozkład znakowanej radioaktywnie tymidyny. W pracy założono dwa alternatywne scenariusze. Pierwszy z nich zakładał, że DNA pochodzący z różnych chromosomów jest przemieszany w jądrze komórkowym. Oznaczałoby to, że wówczas w niewielkim stopniu uszkodzeniu ulegałaby większość chromosomów. W drugim scenariuszu, jak się okazało trafnym, przyjęto założenie, że DNA należący do poszczególnych chromosomów zajmuje konkretny region. W tej sytuacji tylko kilka z chromosomów wykaże obecność znakowanej tymidyny (CREMER i współaut. 2014). Rozwinięcie metody DNA-FISH i wprowadzone później sondy malujące, znakujące specyficznie wybrane terytoria, pozwoliły określić pozycje poszczególnych chromosomów w jądrze komórkowym. Dzięki temu wykazano, że lokalizacja ta nie jest przypadkowa i zależy zarówno od wielkości chromosomu, jak i liczby genów w nim zawartych. Oznacza to, że duże chromosomy, o stosunkowo małej liczbie genów, wykazują tendencję do peryferyjnej lokalizacji w jądrze, natomiast chromosomy małe, gęściej upakowane sekwencjami kodującymi, będą częściej znajdowały się w centrum jądra komórkowego (CREMER i CREMER 2010). W tej chwili istnieje możliwość oznaczenia wszystkich chromosomów jednocześnie dzięki zastosowaniu sond malujących o unikatowej kombinacji fluorochromów dla każdej pary chromosomów (ang. spectral kariotyping, SKY). Metody oparte na trójwymiarowej mikroskopii fluorescencyjnej i FISH wykorzystywane są również w diagnostyce chorób związanych z aberracjami chromosomowymi (GUO i współaut. 2014). Coraz częściej okazuje się, że organizacja chromatyny jest kolejnym poziomem epigenetycznej regulacji ekspresji genów, a jej zaburzenie może prowadzić do negatywnych konsekwencji w prawidłowym funkcjonowaniu komórki (ITO i współaut. 2014, HNISZ i współaut. 2016). Ponieważ każda z wymienionych metod ma swoje ograniczenia, połączenie technik mikroskopowych i bioche-

micznych opartych na wysokoprzepustowym sekwencjonowaniu daje najpełniejszy obraz trójwymiarowej struktury chromatyny w natywnym jądrze.

MIKROSKOPIA ŚWIETLNA

Mikroskopy optyczne wykorzystują światło odbite od preparatu, przechodzące lub emitowane przez preparat. Obraz uzyskiwany w mikroskopie świetlnym pozwolił na prawdziwy przełom w biologii. Dzięki niemu, wspomniany wcześniej A. van Leeuwenhoek zaobserwował po raz pierwszy bakterię, Santiago Ramon y Cayal, opisując komórki nerwowe, stał się ojcem współczesnej neurobiologii (CAJAL i współaut. 1999), Robert Brown odkrył i opisał owalną strukturę znajdującą się w komórkach roślinnych, którą nazwał jądrem komórkowym (BROWN 1833), a Rudolph Virchow opisał po raz pierwszy podział komórki (patrz HAJDU 2005).

Kolejny przełom nastąpił w drugiej połowie XIX w., kiedy Adolf von Baeyer otrzymał pierwszy barwnik fluorescencyjny (patrz NAGENDRAPPA 2014). Stało się to początkiem narodzin mikroskopu fluorescencyjnego. Równoczesny rozwój techniczny mikroskopów i technik biologii molekularnej stał się kolejnym kamieniem milowym w naukach biomedycznych XX w. Możliwość przyłączania świecących fluorochromów, sprzężonych z drugorzędowymi przeciwciałami, do swoistych antygenów, pozwoliła na opracowanie tysięcy specyficznych markerów dla danych struktur komórkowych w utrwalonych preparatach. W latach 60. XX w. wyizolowano z meduzy *Aequorea victoria* białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescence protein, GFP) (SHIMOMURA i współaut. 1962). Opracowano także technikę pozwalającą na przyłączenie GFP do badanego białka, co umożliwiło zlokalizowanie analizowanej cząsteczki, a także obserwacje jej zmian w czasie. Za odkrycie i rozwój białka zielonej fluorescencji przyznano Osamu Shimomurze, Martinowi Chalfiemu i Rogerowi Y. Tsienowi Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii (2008). Postęp w obrazowaniu zatrzymałby się, gdyby nie nowatorskie podejście do mikroskopii nie tylko od strony biologii, lecz także fizyki i optyki.

OGRANICZENIA MIKROSKOPU ŚWIETLNEGO

Jednym z podstawowych czynników ograniczających możliwości obrazowania za pomocą mikroskopu jest zdolność rozdzielcza. Jako że światło ma naturę falową, ograniczenie zdolności rozdzielczej wynika z dyfrakcji. Rozdzielczość, w prosty sposób, można opisać jako minimalną odległość pozwalającą na rozróżnienie dwóch punktów jako oddzielnych. Dla przykładu rozdzielczość ludzkiego oka wynosi 0,2 mm, mikroskopu świetlnego zaś około 200-250 nm. Próg rozdzielczości (dla mikroskopii świetlnej) został opisany przez Ernsta Abbego i został wyrażony równaniem:

$$d = \lambda/2NA,$$

gdzie d – rozdzielczość, λ – długość fali emisji, NA – apertura numeryczna.

Apertura numeryczna jest wartością cechującą obiektyw. Im apertura jest wyższa, tym wyższa jest zdolność rozdzielcza obiektywu. Zależy ona od współczynnika załamania światła w ośrodku, czyli między obiektywem a preparatem, a także od maksymalnego kąta rozwarcia promieni świetlnych, które docierają do obiektywu. Obiektywy suche mają z reguły aperturę niższą niż immersyjne. NA opisana jest wzorem:

$$NA = n \sin\theta,$$

gdzie: n – współczynnik załamania światła ośrodka, w którym znajduje się obiektyw, θ – połowa maksymalnego kąta, pod którym może padać światło (patrz WOLNY 2013)

Dyfrakcja, czyli załamanie się światła, prowadzi do niekorzystnego zjawiska polegającego na niedokładnym odwzorowaniu przez detektor punktowego źródła światła. Powstały obraz, po przejściu światła przez przesłonę w mikroskopie fluorescencyjnym, nie jest ostrym punktem, ale tworzy charakterystyczną plamkę Airy'ego. Od jej środka odchodzą koncentrycznie jasne i ciemne kręgi. Zjawisko to może prowadzić do nakładania się na siebie rozproszonego światła pochodzącego z dwóch obiektów, a w zasadzie nakładania się na siebie dwóch plamek Airy'ego, co z kolei nie pozwala na zobaczenie ich pod mikroskopem jako rozdzielnych. Co ważne, plamka Airy'ego powstaje w osi x i y, jako koncentryczne prążki, ale także i w osi z, tworząc zniekształcony obraz punktu przypominający klepsydrę. Ponieważ wiele struktur komórkowych jest mniejszych niż zdolność rozdzielcza standardowego mikroskopu świetlnego, to nie mogą być one pod nim obserwowane.

Podsumowując, zdolność rozdzielcza mikroskopu świetlnego wynika z ograniczeń optyki i nawet dla obiektywów o wysokiej aperturze wynosi ona około 250 nm w osi x-y i około 550 nm w osi z.

OBEJŚCIE BARIERY DYFRAKCYJNEJ

Zastosowane szeregu zabiegów pozwoliło na obejście limitu Abbego i zobrazowanie struktur mniejszych niż 200 nm z użyciem

Tabela 1. Porównanie najważniejszych cech poszczególnych typów mikroskopii świetlnej oraz mikroskopii elektronowej.

	Mikroskopia konfokalna/ wysokoprzepustowa	SIM	STED	Mikroskopia pointylistyczna	Mikroskopia elektronowa
Rozdzielczość XY	250 nm	100 nm	20-70 nm	10-30 nm	<5 nm
Rozdzielczość Z	550 nm	200-300 nm	40- 150* nm	10-75* nm	3-60 nm
Fluorochromy	standardowe	standardowe	specjalne	specjalne	–
Znakowanie w wielu kolorach	+++ Najczęściej do 4 kolorów	+++ Najczęściej do 4 kolorów	++ Najczęściej do 3 kolorów	++ Najczęściej do 2 kolorów	– (Detekcja możliwa z użyciem ziaren o różnej średnicy)
Obrazowanie przyżyciowe	+	+	+	+	–
Łatwość przygotowana preparatu	+++	+++	++	+	+

* znaczna poprawa rozdzielczości w osi z osiągana jest dzięki dodatkowym zabiegom (m. in. poprzez zastosowanie dwóch obiektywów)

mikroskopu świetlnego. Mikroskopy 4Pi (Leica) oraz I^5M (Zeiss) posiadają dwa (umieszczone naprzeciw siebie) obiektywy, pomiędzy którymi znajduje się preparat. Pozwala to na funkcjonalne podwojenie apertury numerycznej, co z kolei wiąże się z poprawą zdolności rozdzielczej (BEWERSDORF i współaut. 2006). Innym podejściem do mikroskopii wysokorozdzielczej jest modyfikowanie fluoroforów i ich właściwości oraz sposobu emisji i detekcji fotonów tak, by obserwować cząsteczki fluoroforów pojedynczo (PALM, STORM), lub obrazowanie za pomocą mikroskopii światła strukturalnego SIM czy STED, działających na jeszcze innej zasadzie (TOOMRE i BEWERSDORF 2010). Techniki te zostaną omówione w dalszej części pracy. Ich porównanie pod względem rozdzielczości i innych właściwości przedstawiono w Tabeli 1. Ponadto, przy każdej z metod nakreślony zostanie zarys badań dotyczących chromatyny, w których techniki te zostały wykorzystane.

MIKROSKOPIA ŚWIATŁA STRUKTURALNEGO

SIM (ang. structured illumination microscopy), czyli mikroskopia światła strukturalnego, to technika pozwalająca na obejście bariery dyfrakcyjnej, oparta na właściwościach samego układu optycznego. Nie wymaga zatem stosowania specjalnych fluoroforów, kompatybilnych z techniką. Mikroskopia ta polega na oświetleniu preparatu światłem o określonym wzorze, uzyskiwanym przez umieszczenie siatek dyfrakcyjnych w drodze optycznej, doprowadzającej światło do preparatu. Zastosowanie światła strukturalnego prowadzi do wygenerowania tzw. prążków mory, które powstają w wyniku nałożenia pod kątem dwóch wzorców. W przypadku SIM źródłem wzorca jest sama struktura preparatu, a właściwie przestrzenne rozmieszczenie barwnika fluorescencyjnego, oraz struktura światła padającego na preparat. Powstała mora zawiera informacje o strukturze obserwowanego obiektu. Odpowiednie oprogramowanie (wykorzystujące aparat matematyczny analizy Fourierowskiej) pozwala na uzyskanie z nich szczegółowych informacji, niemożliwych do zobaczenia z użyciem konwencjonalnej mikroskopii (GUSTAFSSON 2000). SIM pozwala na uzyskanie rozdzielczości w osi x-y na poziomie 100 nm, co jest dwukrotnie lepszym wynikiem niż w przypadku tradycyjnej mikroskopii konfokalnej. Znaczna poprawa rozdzielczości możliwa jest także w osi z i osiąga wartość w zakresie 200-300 nm. Technika ta może być także wykorzystywana do badań przyżyciowych, a obraz może być uzyskiwany z kilku kanałów o różnej barwie fluoroforów (TOOMRE i BEWERSDORF 2010). Możliwe jest także połączenie SIM z omówionym wcześniej systemem dwuobiektywowym I^5M, co pozwala na uzyskanie rozdzielczości 100 nm we wszystkich trzech wymiarach (GUSTAFSSON 2000).

SIM była pierwszą superrozdzielczą metodą mikroskopii świetlnej, której użyto do badania chromatyny (SCHERMELLEH i współaut.

2008). Stosując barwienie DNA przy pomocy DAPI oraz porów jądrowych i laminy z użyciem specyficznych przeciwciał, autorzy wykazali, że chromatyna wewnątrz jądra komórkowego nie jest jednolita, lecz ma fibrylarną strukturę, a silnie skondensowana heterochromatyna znajduje się tuż pod otoczką jądrową i w chromocentrach (klastrach chromatyny przycentromerowej, bogatych w pary A-T, do których DAPI wiąże się z większym powinowactwem). Prócz tego wykazano istnienie kanałów całkowicie pozbawionych chromatyny, znajdujących się tuż pod porami jądrowymi oraz w całej objętości jądra komórkowego pomiędzy chromatyną, a także wpukleń otoczki jądrowej, lokalizujących się w pobliżu centrosomów w komórkach przygotowujących się do podziału mitotycznego. Szczegóły te, zwłaszcza interchromatynowe regiony pozbawione barwienia DAPI, nie były dobrze widoczne w zwykłej mikroskopii świetlnej ze względu na ich małe rozmiary.

Ostatnio dokonano szczegółowej analizy chromatyny zlokalizowanej w okolicy porów jądrowych przy pomocy SIM i barwień specyficznych modyfikacji i wariantów histonów. Pozwoliło to na wykazanie, że w bezpośredniej bliskości kanału poru jądrowego jednak znajduje się euchromatyna, słabo widoczna w barwieniu DAPI, która otoczona jest bardziej skondensowaną heterochromatyną. Autorzy określili również lokalizację enzymów utrzymujących domeny w tej strukturze oraz wykazali, że do ich zachowania konieczna jest aktywność transkrypcyjna komórki (Fišerová i współaut. 2017). Przez ostatnie 10 lat mikroskopia SIM była wykorzystywana do licznych badań struktury jądra komórkowego i chromatyny, w tym również przyżyciowych. Do najciekawszych prac należą publikacje pochodzące z laboratoriów Marion, Thomasa i Christopha Cremerów. To oni wykazali istnienie sieci międzychromatynowych kanałów, rozchodzących się od porów jądrowych do wnętrza jądra, których integralną częścią są cętki jądrowe (ang. nuclear speckles), zaangażowane między innymi w składanie (ang. splicing) mRNA. Sieć ta odgrodzona jest od silnie upakowanej heterochromatyny przez 100-200 nm warstwę zdekondensowanej euchromatyny (nazwanej przez autorów perichromatyną), bogatej w aktywną polimerazę II i inne markery aktywnej transkrypcyjnie chromatyny (Markaki i współaut. 2010). W kolejnej pracy (Smeets i współaut. 2014) autorzy przeprowadzili szczegółową analizę ciałka Barra, wyciszonej kopii chromosomu X, oraz jego aktywnej kopii. Wykazali, że mikroskopia SIM pozwala na znacznie bardziej szczegółową analizę stopnia kondensacji chromatyny i wyróżnienie wielu subdomen ciałka Barra, już nawet w wyniku barwienia samego DNA. Dodatkowe zastosowanie hybrydyzacji RNA *in situ* wykazało, że wraz z kondensacją chromatyny i przyłączaniem transkryptu genu *Xist*, niezbędnego do utrzymywania stanu wyciszenia transkrypcyjnego ciałka Barra, zanika obecność aktywnej polimerazy II. Autorzy sugerują, że w pełni uformowane ciałko Barra posiada resztkową aktywność transkrypcyjną i znajdują się w nim wszystkie powyżej opisane elementy strukturalne chromatyny, z tą różnicą, że aktywna perichormatyna jest częściowo zapadnięta.

MIKROSKOPIA WYMUSZONEGO WYGASZANIA EMISJI

Mikroskopia wymuszonego wygaszania emisji (STED) została rozwinięta przez nagrodzonego Nagrodą Nobla Stefana Hella i współpracowników (Hell 2015). Zasada działania mikroskopii STED polega na użyciu dwóch laserów do oświetlenia preparatu. Oprócz wiązki wzbudzającej, stosowana jest tak zwana wiązka STED, pierścieniowa wiązka wygaszająca. Jej zadaniem jest stłumienie fluorescencji na brzegach punktu, który uległ wzbudzeniu. Zabieg ten prowadzi do zmniejszenia rozmiaru plamki Airy'ego, co bezpośrednio przekłada się na zwiększenie ostrości punktu i poprawy rozdzielczości przeciętnie do 20-70 nm w osi x-y i 40-150 nm w osi z (Yamanaka i współaut. 2014, Li i współaut. 2018). Technika ta może być także stosowana do obrazowania przyżyciowego (Eggeling i współaut. 2013). Jednak przy uzyskaniu wysokiej rozdzielczości dochodzi tu do dość intensywnego fotowybielania fluoroforów. Początkowo STED stosowano do jednego kanału. Wtedy obraz z innych kanałów (o innej barwie) zbierany jest w standardowej rozdzielczości. Dziś możliwe jest zbieranie obrazu w jakości STED w wielu kolorach. Należy jednak pamiętać o ograniczeniu wynikającym z konieczności stosowania fluoroforów kompatybilnych z tą techniką (Toomre i Bewersdorf 2010).

Mikroskopia STED, pomimo znacznie lepszej rozdzielczości niż SIM, nie była dotąd szeroko używana w badaniach nad organizacją chromatyny. Tłumaczyć to może bardziej skomplikowana preparatyka oraz niemożność zastosowania powszechnie używanych barwników DNA, takich jak DAPI i Hoechst, które są niekompatybilne z tą techniką. Ograniczenie to zostało przezwyciężone przez użycie barwnika DNA SiR-Hoechst, którego widmo znajduje się w zakresie dalekiej czerwieni. Lukinavičius i współaut. (2015) za pomocą SiR-Hoechst wyznakowali DNA i zobrazowali je przyżyciowo przy użyciu mikroskopii STED, wykazując jego niską tok-

syczność i kompatybilność z technikami superrozdzielczymi. W przypadku preparatów utrwalonych alternatywne podejście może stanowić użycie przeciwciała skierowanego przeciwko DNA, a następnie przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fluorochromami kompatybilnymi ze STED. Interesującym wydaje się także użycie mikroskopii STED (z jej możliwością wielokolorowego znakowania) do identyfikacji interakcji pomiędzy badanymi *loci* za pomocą metody FISH lub lokalizacji RNA i białek (ZHANG i współaut. 2014).

PALM I STORM

Nagroda Nobla w dziedzinie chemii przyznana w 2014 r., współdzielona była przez Stefana Hella (mikroskopia STED) oraz Erica Betziga i Williama Moernera, którzy opracowali mikroskopię PALM. Zasady działania mikroskopii PALM (ang. photo-activated localisation microscopy) i STORM (ang. stochastic optical reconstruction microscopy) są bardzo podobne. Główne różnice odnoszą się do rodzaju użytych fluoroforów. W przypadku PALM używa się białek fluorescencyjnych aktywowanych światłem, zaś w technice STORM stosuje się przeciwciała drugorzędowe sprzężone z kompatybilnymi fluorochromami.

Często mikroskopie PALM i STORM określa się wspólnie jako lokalizacyjną lub mikroskopię opartą na pointylizmie, czyli technice stosowanej w sztuce neoimpresjonistycznej, polegającej na formowaniu obrazu z gęsto ułożonych punktów o różnych kolorach (BETZIG i współaut. 2006, RUST i współaut. 2006). Określenia te trafnie oddają istotę działania PALM i STORM. Uzyskanie obrazu w wysokiej rozdzielczości odbywa się tu przez wizualizacje błyśnięć pojedynczych fluoroforów, składających się na cały obraz. Możliwe to jest dzięki losowym (!) włączeniom i wygaszaniom fluoroforów, prowadzącym do zjawiska polegającego na miganiu pojedynczych cząsteczek, które (z wykorzystaniem programów obliczeniowych) składane są w obraz całości. Używając programu wyznaczającego środek plamki Airy'ego, można po kolei obliczyć dokładną pozycję wszystkich cząstek fluorochromu i zrekonstruować obraz. Pozwala to na uzyskanie rozdzielczości 10–30 nm w osi x-y i około 75 nm do nawet 10 nm w osi z (PATERCZYK 2013, YAMANAKA i współaut. 2014). Wiąże się to jednak z niską szybkością uzyskiwania obrazów oraz ze stosowaniem odpowiednich fluoroforów (TOOMRE i BEWERSDORF 2010). Po pierwsze, powinny one łatwo ulegać wzbudzaniu i wygaszaniu. Po drugie, powinny emitować dużo fotonów przed wygaszaniem. Ponadto, w momencie „wyciszenia" fluoroforu jego emisja powinna być jak najniższa. I wreszcie, fluorofory powinny cechować się jak najniższą spontaniczną aktywacją (HUANG i współaut. 2010). Dodatkowo, wykorzystanie technik pointylistycznych do obrazowania w trzech wymiarach nie jest proste. Jedną z możliwości jest użycie soczewek cylindrycznych, które modyfikują kształt obrazu punktu. Z kolei analiza kształtu, który zmienia się wraz z oddalaniem od płaszczyzny ostrości, pozwala na określenie lokalizacji punktu w trzech wymiarach (HUANG i współaut. 2008).

Podsumowując, PALM i STORM pozwalają na uzyskanie dużej poprawy rozdzielczości zarówno w osi x-y, jak i z, co umożliwia tworzenie rekonstrukcji trójwymiarowych znacznie lepiej odwzorowujących stan rzeczywisty aniżeli standardowy mikroskop konfokalny. Wiąże się to jednak z szeregiem ograniczeń, m.in. z czasem skanowania, z którego wynikają ograniczenia w wykorzystaniu mikroskopii do lokalizacji pojedynczych cząsteczek w badaniach przyżyciowych. Ponadto, użycie tu wielokolorowego znakowania (choć wciąż możliwe) jest znacznie trudniejsze aniżeli w przypadku konwencjonalnej mikroskopii. Dodatkowo, głębokość obrazowania preparatu w osi z, w porównaniu do mikroskopii konfokalnej, jest znacznie ograniczona (FISCHER i współaut. 2011).

Przechodząc do badań nad organizacją chromatyny wykorzystujących mikroskopię lokalizacyjną, nie sposób nie skupić się na wykorzystaniu techniki STORM, w połączeniu z techniką DNA-FISH, w obrazowaniu specyficznych odcinków DNA. Przykład takiego podejścia stanowi praca BOETTIGERA i współaut. (2016), którzy zobrazowali w komórkach *Drosophila* nieaktywne i aktywne transkrypcyjnie regiony chromatyny. Praca ta odpowiada na pytanie o zależność struktury chromatyny od jej stanu epigenetycznego i aktywności. Autorzy sklasyfikowali chromatynę w trzy grupy: nieaktywną, aktywną oraz wyciszoną, charakteryzowaną przez wiązanie z białkami Polycomb. W swoich badaniach naukowcy wykazali, iż regiony aktywne są upakowane najluźniej, nieaktywne – najgęściej, zaś domeny wyciszone lokują się pośrodku pod względem stopnia upakowania. Również w komórkach ssaczych (za pomocą STORM i DNA-FISH) wykazano różny stopień upakowania domen, w zależności od ich stanu epigenetycznego (FABRE i współaut. 2015). Oprócz obrazowania DNA *per se*, mikroskopia lokalizacyjna użyta została także do analizy rozmieszczenia histonów w ludzkich komórkach. Niezwykle ciekawe jest również założenie, że liczba zlokalizowanych pojedynczych cząsteczek, pochodzących z wyznakowanego histonu H2B,

odzwierciedla liczbę nukleosomów. Podejście to pozwoliło na zidentyfikowanie zgrupowań nukleosomów wzdłuż włókna chromatyny. Zgrupowania te okazały się być rozdzielone regionami wolnymi od nukleosomów. Ponadto wykazano, że większe i gęściej upakowane klastry histonów cechują zamkniętą, nieaktywną heterochromatynę (RICCI i współaut. 2015).

BALM

Do mikroskopii lokalizacyjnej, oprócz PALM i STORM, zalicza się także mikroskopię BALM (ang. binding-activated localization microscopy), której wkład w obrazowanie chromatyny jest nieoceniony. W mikroskopii BALM (w celu poprawienia precyzji lokalizacji) wprowadzono barwniki, które emitują fotony dopiero po związaniu z docelową strukturą (SCHOEN i współaut. 2011). Wiązanie to jest dynamiczne, a po odłączeniu fluorochrom przestaje być wzbudzany i nie emituje światła. Powtarzające się cykle wiązania i emisji w danej lokalizacji oraz odłączenia i wygaszenia pozwalają na rekonstrukcję obrazu badanej struktury. BALM używany jest głównie do obrazowania chromatyny dzięki dostępności kilku barwników, jak YOYO-1 czy PicoGreen, przejściowo wiążących się do DNA. Zastosowanie BALM pozwoliło na określenie różnic w architekturze chromatyny w kilku typach komórek, a także zmian w strukturze chromatyny powstających w modelu ischemii (SZCZUREK i współaut. 2017). Poprzez denaturację DNA w warunkach niskiego pH autorzy poprawili dynamikę wiązania barwnika YOYO-1 do DNA i wykazali w ten sposób istnienie nanostruktur chromatyny wewnątrz jądra komórkowego z imponującą rozdzielczością, wynoszącą ok. 50 nm. Uzyskanie obrazów trójwymiarowych tą techniką jest możliwe przy zastosowaniu (tak jak w mikroskopii 3D-STORM) soczewek cylindrycznych.

TRÓJWYMIAROWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

SBF SEM

Wyróżnia się dwa podstawowe typy mikroskopów elektronowych: transmisyjny mikroskop elektronowy TEM (ang. transmission electron microscope) oraz mikroskop skaningowy SEM (ang. scanning electron microscope). TEM wykorzystuje wiązkę elektronów, która (przechodząc przez preparat) zbierana jest przez detektor, a w SEM stosuje się inne detektory, zbierające głównie elektrony wtórne, odbite od próbki i wstecznie rozproszone. Najogólniej rzecz opisując, obraz uzyskany za pomocą SEM przedstawia topografię powierzchni próbki (jeśli zbieramy elektrony wtórne), zaś obraz TEM jej ultrastrukturę.

Preparaty do transmisyjnego mikroskopu elektronowego stanowią cienkie skrawki o grubości około 60 nm. Przygotowanie takiego materiału jest zajęciem dosyć mozolnym. Tkankę (po wcześniejszej preparatyce) zatapia się w bloczkach z żywicy, z powierzchni których, za pomocą ultramikrotomu i noża diamentowego, ścina się ultracienkie skrawki. Materiał taki umieszcza się na specjalnych niewielkich siatkach. Chcąc uzyskać trójwymiarowy obraz ultrastruktury, należy zobrazować dziesiątki czy nawet setki kolejnych skrawków. Mając na uwadze to, że przygotowanie preparatu do mikroskopii elektronowej trwa kilka dni, a samo krojenie jest czasochłonne, można sobie wyobrazić jak trudne jest to zadanie. Nawet wprawnym użytkownikom może przytrafić się zgubienie lub zniszczenie kolejnego skrawka (o grubości 60 nm!). Dopiero 15 lat temu rozwiązano ten problem, stosując mikroskop skaningowy SEM z wbudowanym ultramikrotomem (DENK i HORSTMANN 2004). Urządzenie to pozwala na stosunkowe szybkie uzyskanie obrazu trójwymiarowej struktury o rozdzielczości bez porównania wyższej niż w przypadku nawet najlepszych mikroskopów świetlnych. Mikroskop tego typu określa się często jako SBF SEM (ang. serial block-face scanning electron microscopy), czyli mikroskop seryjnych skrawków. Pomysł opisany przez Denka i Horstmanna został skomercjalizowany przez firmę Gatan Inc. pod nazwą 3View (PEDDIE i COLLINSON 2014).

W swojej zasadzie działania mikroskopia seryjnych skrawków jest dość prosta. Pozwala jednak na uzyskanie rozdzielczości dotąd nieosiąganej dla obrazów trójwymiarowych (nie licząc manualnego składania obrazu z pojedynczych skrawków, o czym wspomnieliśmy na początku podrozdziału). SBF SEM umożliwia uzyskanie rozdzielczości na poziomie około 5 nm w osiach x-y i około 20-25 nm w osi z (FRIEDRICH i współaut. 2013). Ta ostatnia wartość wynika z grubości, na jaką tniemy skrawki. Co ważne, mikroskop ten pozwala na uzyskanie obrazu dużej, w skali mikroskopii, objętości próbki, przekraczającej nawet milion mikrometrów sześciennych (HELMSTAEDTER i współaut. 2013). Wiąże się to jednak z mniejszym powiększeniem. Mikroskop skaningowy umożliwia jednak ustawienie rozdzielczości skanowanego obrazu, co oznacza, że nawet przy mniejszym powiększeniu można uzyskać wysoką rozdzielczość. Umożliwia to zbieranie dużej powierzchni przy niskim powiększeniu, ale w wysokiej rozdzielczości. Oczywiście

(kosztem objętości) mikroskopia ta pozwala na uzyskanie trójwymiarowego obrazu przy wysokich powiększeniach – rzędu 30 tysięcy razy i wyższych. Wszystko to sprawia, że SBF SEM znakomicie nadaje się do obrazowania jadra komórkowego. Zaletą seryjnej trójwymiarowej mikroskopii elektronowej jest także preparatyka, tylko nieco bardziej skomplikowana od tradycyjnej. Przygotowanie preparatu nie różni się znacznie od tego do mikroskopii transmisyjnej. Pożądany jest jednak wyższy kontrast. Powodem tego jest znacznie mniejsze napięcie przyspieszające elektronów w mikroskopie skaningowym niż w transmisyjnym. Optymalne rezultaty, w przypadku SBF SEM, uzyskuje się przy napięciach rzędu 2-6 kV. Mikroskop transmisyjny używa zaś napięć kilkadziesięciokrotnie wyższych (100 i więcej kV), a rozdzielczość mikroskopu elektronowego zależy właśnie od napięcia na dziale elektronowym. Wyższy kontrast osiąga się przez naładowanie próbki większą ilością metali ciężkich. Jednym z głównych czynników ograniczających możliwości SBF SEM jest ładowanie (ang. charging). Pod pojęciem tym rozumiemy gromadzenie się na powierzchni preparatu elektronów, które nie są odprowadzane. Dzieje się tak, ponieważ próbki biologiczne nie są przewodnikami. Kontrastowanie metalami ciężkimi w znacznym stopniu eliminuje ładowanie, jednak nie rozwiązuje problemu całkowicie. Rozwiązaniem znacznie ograniczającym problem ładowania jest mikroskop pozwalający na prace w zmiennej próżni. Możliwe jest to przez podawanie azotu do komory, w której znajduje się obrazowany preparat. Wtórne produkty jonizacji gazu obniżają ładowanie przez zmniejszenie liczby elektronów. Obniżenie próżni w tych systemach zachodzi tylko w komorze, nie zaś w dziale elektronowym, gdzie wciąż panuje wysoka próżnia, co nie zaburza stabilności wiązki elektronów. Należy jednak pamiętać, że (prowadząc do zmniejszenia liczby elektronów) pozbywamy się, przynajmniej częściowo, ładowania, ale detektor zbierze też mniej odbitych od preparatu elektronów, co zmniejszy rozdzielczość. Warto w tym miejscu wspomnieć, że nie wszystkie detektory i funkcje mikroskopu działają w zmniejszonej próżni. Choć system opracowany przez firmę Gatan (3View), to jest komora z ultramikrotomem oraz detektorami, współpracuje z mikroskopem skaningowym, to obraz uzyskiwany w tym systemie nie przypomina obrazu trójwymiarowego charakterystycznego dla SEM. Obraz dający wrażenie trójwymiarowości to obraz uzyskany z wykorzystaniem detektora zbierającego elektrony wtórne. W przypadku 3View zbierane są elektrony wstecznie rozproszone, a uzyskiwany obraz jest dwuwymiarowy i przypomina ten z mikroskopu transmisyjnego. Oczywiście dwuwymiarowy jest pojedynczy skan. Złożenie kolejnych zdjęć umożliwia łatwe uzyskanie trójwymiarowej rekonstrukcji w rozdzielczości mikroskopii elektronowej.

Trójwymiarowa mikroskopia elektronowa wykorzystywana jest także do badań nad chromatyną. Szczególnie interesującym wydaje się jej połączenie z technikami, które pozwalają na specyficzne wyznakowanie DNA. Takiego podejścia użyli ROUQUETTE i współaut. (2009), wykorzystując metodę NAMA-Ur, która pozwala uwidocznić DNA bez RNA oraz białek (TESTILLANO i współaut. 1991). Autorzy tej pracy wykorzystali różnego typu komórki i pokazali, korzystając z danych o rozdzielczości mikroskopii elektronowej (wzbogaconych o trzeci wymiar), że objętość jądra zajmowana przez DNA może się znacznie różnić w zależności od typu komórki. Co więcej, w badanych komórkach szczurzej wątroby nie wypełnia on całości czy nawet większości objętości jądra komórkowego. W przypadku hepatocytów DNA zajmował ok. 34% objętości jądra, zaś w komórkach śródbłonka ok. 58%. Szczególnie dobrze pokazują to trójwymiarowe rekonstrukcje, jako że pojedyncze płaszczyzny mogą dawać wrażenie, że jądro komórkowe jest szczelnie wypakowane DNA (ROUQUETTE i współaut. 2009).

FIB SEM

Trójwymiarowa mikroskopia elektronowa z wykorzystaniem techniki 3View niewątpliwie stanowi duży skok w dziedzinie obrazowania. Wciąż jednak prowadzone są prace nad urządzeniami pozwalającymi na uzyskanie jeszcze wyższej srozdzielczości, zwłaszcza w osi z. Przykładem tego nurtu rozwoju jest mikroskopia skaningowo-jonowa (ang. focused ion beam scanning electron microscopy, FIB SEM). Mikroskop tego typu to również mikroskop skaningowy, ale wykorzystujący dodatkową wiązkę jonów, zogniskowaną na preparat (NARAYAN i współaut. 2014, PEDDIE i COLLINSON 2014).

FIB SEM pozwala (tak jak SBF SEM) na uzyskanie rekonstrukcji trójwymiarowych. Zaletą mikroskopii jonowej jest jednak znacznie wyższa rozdzielczość, możliwa do uzyskania szczególnie w osi z. W przypadku 3View nóż ścina skrawek o zadanej grubości (~20-200 nm), mikroskop zaś skanuje powierzchnię preparatu. Zasada działania FIB SEM jest inna: nie dochodzi tu do mechanicznego cięcia preparatu, ale jego wypalania przez wiązkę jonów. Pozwala to na uzyskanie rozdzielczości 3 nm w osi x-y i w osi z, a zatem izotropowego woksela (trójwymiarowego piksela) (WEI i współ-

aut. 2012). Pomimo około dziesięciokrotnie lepszej rozdzielczości w osi z, niż w przypadku 3View, metoda ta nie pozostaje bez wad. Mikroskop FIB SEM nie pozwala na zobrazowanie tak dużych (jak SBF SEM) objętości próbki. Ponadto, proces uzyskiwania obrazu jest znacznie wolniejszy niż w przypadku SBF SEM (PEDDIE i COLLINSON 2014). Mikroskopia ta zatem świetnie nadaje się do obserwacji bardzo małych struktur w bardzo wysokiej rozdzielczości (VILLINGER i współaut. 2012, SCHERTEL i współaut. 2013). Co więcej, mikroskop skaningowo-jonowy umożliwia obrazowanie preparatów zamrażanych pod wysokim ciśnieniem (ang. high pressure freezing), technice zapewniającej wierne odwzorowanie struktury natywnej (PEDDIE i COLLINSON 2014).

Ze względu na bezprecedensową rozdzielczość mikroskopia FIB SEM wykorzystywana jest również do badań nad chromatyną. Przykład taki może stanowić praca LI i współaut. (2015), którzy, korzystając z niej, postulują występowanie włókien 30 nm w organizacji chromatyny w komórkach HeLa. Interesująca jest także praca SCHROEDER-REITER i współaut. (2009), którzy, wykorzystując mikroskopię FIB, zajrzeli w głąb metafazowego chromosomu jęczmienia pokazując, że jego wnętrze stanowi sieć połączonych wnęk czy też komór otwartych na powierzchni chromosomu. Następnie HAMANO i współaut. (2014), korzystając również z FIB, zbadali strukturę chromosomu ludzkiego. Również i oni zaobserwowali wnęki, chociaż autorzy postulują, że ich obecność i rozmiar może zależeć od preparatyki materiału. Ponadto, część badań przeprowadzano na izolowanym materiale, co może nie odzwierciedlać rzeczywistego stanu *in vivo*. Niemniej jednak trójwymiarowa mikroskopia elektronowa wraz z jej rozwojem, jak i udoskonaleniem preparatyki materiału, z całą pewnością przybliży nas do zrozumienia organizacji chromatyny w jądrze komórkowym w tkance.

TOMOGRAFIA ELEKTRONOWA

Alternatywę dla krojenia preparatu nożem diamentowym lub jego laserowego wypalania stanowi tomografia elektronowa (TE). Również i ona pozwala na uzyskanie trójwymiarowych obrazów, jednak zasada jej działania jest zupełnie inna. Tomografia elektronowa oparta jest na TEM, jednak z użyciem znacznie wyższego napięcia, co pozwala na obrazowanie o wiele grubszych skrawków (nawet do 500 nm). Standardowe dla TEM, tzw. ultracienkie skrawki są zbyt cienkie do tego typu mikroskopii. W TE preparat odchylany pod różnymi kątami, jest jednocześnie bombardowany strumieniem elektronów, a uzyskane serie obrazów mogą zostać zrekonstruowane w trzech wymiarach (MARCO i współaut. 2004). Szczególnie interesujące wykorzystanie tomografii elektronowej w badaniach nad chromatyną opisał OU i współaut. (2017). Opracowana przez nich metoda ChromEMT łączy tomografię elektronową (EMT) oraz metodę znakowania (ChromEM), która wzmacnia kontrast chromatyny. Autorzy użyli znacznika fluorescencyjnego, który wiąże się do DNA (DRAQ5). Barwnik ten wzbudzany był światłem w obecności diaminobenzydyny (DAB), co z kolei katalizuje polimeryzację DAB, skutkującą powstawaniem precypitatów, które można obrazować w mikroskopie elektronowym. Metoda ta została użyta do zobrazowania interfazowej chromatyny, a także mitotycznych chromosomów. W obu przypadkach autorzy obserwowali włókna chromatyny o średnicy od 5 do 24 nm, zamiast włókien o średnicy 30 nm i wyższej. Obserwacja włókien o podobnej średnicy w chromosomach mitotycznych i chromatynie interfazowej jest niezwykle ciekawym odkryciem, które mogłoby tłumaczyć szybkość kondensacji chromatyny. Interesujące byłoby połączenie metody ChromEMT ze świetlną mikroskopią superrodzielczą, która pozwoliłaby na identyfikację np. białek remodelujących chromatynę.

ANALIZA DANYCH MIKROSKOPOWYCH

Uzyskanie trójwymiarowych obrazów mikroskopowych nie jest dziś, przy odpowiednim sprzęcie, wyzwaniem. Jednak nie jest to ostatni krok w badaniach nad architekturą jądra komórkowego. Obrazy te muszą być poddane analizie ilościowej, czy też zostać zrekonstruowane w trzech wymiarach. Istnieje szereg programów, które umożliwiają tego typu analizy. Są to programy zarówno komercyjne, umożliwiające rekonstrukcje i analizy ilościowe [Amira (FEI), Imaris (Bitplane)], jak i dostępne bezpłatnie narzędzia służące do segmentacji, która polega na wydobyciu z obrazu struktur, którymi jesteśmy zainteresowani. Wyodrębnione struktury następnie można poddać analizie ilościowej, polegającej np. na obliczeniu ich objętości czy wyznaczeniu odległości między nimi (m.in. obliczenie odległości genu od otoczki). Do programów tych zaliczają się m.in.: PartSeg (Bokota i współaut., dane nieopublikowane), Segmentation Magick (Ruszczycki i współaut., dane niepublikowane, WALCZAK i współaut. 2013, STACHECKA i współaut. 2017), NEMO (IANNUCCELLI i współaut. 2010) czy TANGO (OLLION i współaut. 2013). Część z nich oparta jest na bezpłatnej i powszechnie używanej platformie do analizy obrazu – ImageJ, występującej w wielu wersjach,

m.in. popularnej wśród mikroskopistów wersji Fiji (SCHINDELIN i współaut. 2012). Przed analizą obrazy niejednokrotnie są poddawane także procesowi cyfrowej obróbki, dekonwolucji, która umożliwia redukcję tła, a także poprawia kontrast i rozdzielczość (patrz WOLNY 2013). Osiągnąć to można m.in. przez użycie komercyjnego program Huygens (SVI) lub bezpłatnego dodatku do ImageJ – DeconvolutionLab (SAGE i współaut. 2017).

PODSUMOWANIE

Rozwiązania ostatnich lat rewolucjonizują podejście do mikroskopii wysokorozdzielczej. Dotyczy to zarówno mikroskopii świetlnej, jak i elektronowej. Jeszcze kilkadziesiąt lat temu wydawało się, że prawa optyki nie pozwolą uzyskać lepszej rozdzielczości obrazowania. Jednak ciągły rozwój nie tylko w dziedzinie optyki, lecz także tworzenia znaczników fluorescencyjnych, barwników DNA i metod ich detekcji (co wynika także z osiągnięć informatyki oraz fizyki, chemii i matematyki), pozwala na coraz dokładniejsze odwzorowanie nawet najmniejszych struktur komórkowych. Dlatego dziś mówi się właściwie nie o mikro-, ale nanoskopii, która wykazała między innymi różnice w organizacji chromatyny w zależności od jej aktywności, a nawet zidentyfikowała nukleosomy. Wciąż jednak nie znamy odpowiedzi na wszystkie fundamentalne pytania o organizację chromatyny w jądrze komórkowym (ADRIAENS i współaut. 2018). Niewątpliwie przyniesie je rozwój technik mikroskopowych, zwłaszcza przyżyciowych, w połączeniu z ciągłym rozwojem metod biochemicznych i obliczeniowych. Wszystko to sprawia, że przyszłość w badaniach nad organizacją jądra komórkowego kreśli się w jasnych barwach i nawet najbliższe lata przybliżą nas znacznie do zrozumienia relacji pomiędzy zmianami w trójwymiarowej strukturze chromatyny a jej aktywnością.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy za dyskusje i cenne uwagi Grzegorzowi Wilczyńskiemu (IBD PAN), Pawłowi Pomorskiemu (IBD PAN), a także Annie Czerwińskiej-Trzaskomie (IPS UW) za pomoc w redakcji tekstu.

Streszczenie

Jednym z fundamentalnych pytań w dziedzinie biologii jest to, w jaki sposób dwumetrowa nić DNA upakowana jest w jądrze o średnicy około 10 μm. Odpowiedzi na to pytanie udzielić może mikroskopia XXI w. Choć pierwsze mikroskopy powstały już w XVI w., to dopiero od kilkunastu lat (dzięki obejściu bariery dyfrakcyjnej ograniczającej rozdzielczość) możemy mówić o mikroskopii superrozdzielczej. Z każdym rokiem zaawansowane techniki mikroskopowe, wraz z rozwojem metod biochemicznych oraz obliczeniowych, przybliżają nas do odpowiedzi na to pytanie. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie Czytelnikowi wstępu do badań nad organizacją chromatyny oraz przegląd technik mikroskopowych stosowanych w tych badaniach, z uwzględnieniem ich zalet oraz ograniczeń. Przy każdej z metod przedstawiono przykłady prac i odkryć uzyskanych dzięki nim. Ponieważ mikroskopia rozwija się bardzo dynamicznie w przeciągu ostatnich kilkunastu lat, opisane zostały w większości przypadków prace najnowsze. Przykłady te pozwalają Czytelnikowi zorientować się w postępie w badaniach nad organizacją chromatyny, a także (w połączeniu z opisem samych technik) w wybraniu odpowiednich metod obrazowania na etapie planowania własnych badań.

LITERATURA

ADRIAENS C., SEREBRYANNYY L. A., FERIC M., SCHIBLER A., MEABURN K. J., KUBBEN N., TRZASKOMA P., SHACHAR S., VIDAK S., FINN E. H., SOOD V., PEGORARO G., MISTELI T., 2018. *Blank spots on the map: some current questions on nuclear organization and genome architecture*. Histochem. Cell Biol. 150, 1-10.

BELMONT A. S., 2006. *Mitotic chromosome structure and condensation*. Curr. Opin. Cell Biol. 18, 632-638.

BERNHARD W., GRANBOULAN N., 1963. *The fine structure of the cancer cell nucleus*. Exp. Cell Res. 9, 19-53.

BETZIG E., PATTERSON G. H., SOUGRAT R., LINDWASSER O. W., OLENYCH S., BONIFACINO J. S., DAVIDSON M. W., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J., HESS H. F., 2006. *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science 313, 1642-1645.

BEWERSDORF J., SCHMIDT R., HELL S.W., 2006. *Comparison of I5M and 4Pi-microscopy*. J. Microsc. 222, 105-117.

BOETTIGER A. N., BINTU B., MOFFITT J. R., WANG S., BELIVEAU B. J., FUDENBERG G., ZHUANG X., 2016. *Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states*. Nature 529, 418-422.

BROWN R., 1833. *On the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae*. Transact. Linnean Soc. London 16/3, 709-737.

CAJAL S. R. Y, PASIK P., PASIK T., 1999. *Texture of the nervous system of man and the vertebrates. Vol. 1*. Springer, Switzerland.

CAVALLI G., MISTELI T., 2013. *Functional implications of genome topology*. Nat. Struct. Mol. Biol. 20, 290-299.

CREMER T., CREMER M., 2010. *Chromosome territories*. Cold Spring Harbor Persp. Biol. 2, 1-22.

CREMER T., CREMER C., LICHTER P., 2014. *Recollections of a scientific journey published in human genetics: From chromosome territories to interphase cytogenetics and comparative genome hybridization*. Human Genet. 133, 403-416.

CREMER T., CREMER M., HÜBNER B., STRICKFADEN H., SMEETS D., POPKEN J., STERR M., MARKAKI Y., RIPPE K., CREMER C., 2015. *The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments*. FEBS Lett. 589, 2931-2943.

CRESSEY D., CALLAWAY E., 2017. *Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel*. Nature 550, 167-167.

DAVIDSON M. W., 2009. *Ernst Abbe: Microscopy*. Lab. Med. 40, 502-503.

DENK W., HORSTMANN H., 2004. *Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure*. PLoS Biol. 2, 1900-1909.

EGGELING C., WILLIG K. I., BARRANTES F. J., 2013. *STED microscopy of living cells - New frontiers in membrane and neurobiology*. J. Neurochem. 126, 203-212.

FABRE P. J., BENKE A., JOYE E., NGUYEN HUYNH T. H., MANLEY S., DUBOULE D., 2015. *Nanoscale spatial organization of the* HoxD *gene cluster in distinct transcriptional states*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 13964-13969.

FISCHER R. S., WU Y., KANCHANAWONG P., SHROFF H., WATERMAN C. M., 2011. *Microscopy in 3D: A biologist's toolbox*. Trends Cell Biol. 21, 682-691.

FIŠEROVÁ J., EFENBERKOVÁ M., SIEGER T., MANINOVÁ M., UHLÍŘOVÁ J., HOZÁK P., 2017. *Chromatin organization at the nuclear periphery as revealed by image analysis of structured illumination microscopy data*. J. Cell Sci. 130, 2066-2077.

FRASER J., WILLIAMSON I., BICKMORE W.A., DOSTIE J., 2015. *An Overview of Genome Organization and How We Got There: from FISH to Hi-C*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 347-372.

FRIEDRICH R. W., GENOUD C., WANNER A. A., 2013. *Analyzing the structure and function of neuronal circuits in zebrafish*. Front. Neural Circ. 7, 1-8.

GIBCUS J. H., SAMEJIMA K., GOLOBORODKO A., SAMEJIMA I., NAUMOVA N., NUEBLER J., KANEMAKI M. T., XIE L., PAULSON J. R., EARNSHAW W. C., MIRNY L. A., DEKKER J., 2018. *A pathway for mitotic chromosome formation*. Science 359, 1-29.

GUO B., HAN X., WU Z., DA W., ZHU H., 2014. *Spectral karyotyping: an unique technique for the detection of complex genomic rearrangements in leukemia*. Translat. Pediatr. 3, 135-139.

GUSTAFSSON M. G. L., 2000. *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. J. Microsc. 198, 82-87.

HAJDU S. I., 2005. *A Note from History: Rudolph Virchow, pathologist, armed revolutionist, politician, and anthropologist*. Ann. Clin. Lab. Sci. 35, 203-205.

HAMANO T., DWIRANTI A., KANEYOSHI K., FUKUDA S., KOMETANI R., NAKAO M., TAKATA H., UCHIYAMA S., OHMIDO N., FUKUI K., 2014. *Chromosome interior observation by Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM) using ionic liquid technique*. Microsc. Microanal. 20, 1340-1347.

HELL S. W., 2015. *Nanoscopy with focused light*. Annalen der Physik 527, 423-445.

HELMSTAEDTER M., BRIGGMAN K. L., TURAGA S. C., JAIN V., SEUNG H. S., DENK W., 2013. *Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina*. Nature 500, 168-174.

HNISZ D., WEINTRAUB A. S., DAY D. S., VALTON A., BAK R. O., LI C. H., GOLDMANN J., LAJOIE B. R., FAN Z. P., ALLA A., REDDY J., BORGES-RIVERA D. i współaut. 2016. *Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods*. Science 351, 1454-1458.

HUANG B., JONES S.A., BRANDENBURG B., ZHUANG X., 2008. *Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution*. Nat. Meth. 5, 1047-1052.

HUANG B., BABCOCK H., ZHUANG X., 2010. *Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells*. Cell 143, 1047-1058.

IANNUCCELLI E., MOMPART F., GELLIN J., LAHBIB-MANSAIS Y., YERLE M., BOUDIER T., 2010. *NEMO: A tool for analyzing gene and chromosome territory distributions from 3D-FISH experiments*. Bioinformatics 26, 696-697.

ITO S., MAGALSKA A., ALCARAZ-IBORRA M., LOPEZ-ATALAYA J. P., ROVIRA V., CONTRERAS-MOREIRA B., LIPINSKI M., OLIVARES R., MARTINEZ-HERNANDEZ J., RUSZCZYCKI B., LUJAN R., GEIJO-BARRIENTOS E., WILCZYNSKI G. M., BARCO A., 2014. *Loss of neuronal 3d chromatin organization causes transcriptional and behavioural deficits related to serotonergic dysfunction*. Nat. Comm. 5, 1-14.

LANE N., 2015. *The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) „Concerning little animals"*. Philosoph. Transact. Royal Soc. B, Biol. Sci. 370, 20140344-20140344.

LI C., LIU S., WANG W., LIU W., KUANG C., LIU X., 2018. *Recent research on stimulated emission depletion microscopy for reducing photobleaching*. J. Microsc. 271, 4-16.

LI X., FENG H., ZHANG J., SUN L., ZHU P., 2015. *Analysis of chromatin fibers in Hela cells with electron tomography*. Biophys. Rep. 1, 51-60.

LIEBERMAN-AIDEN E., BERKUM N. L. VAN, WILLIAMS L., IMAKAEV M., RAGOCZY T., TELLING A., AMIT I., LAJOIE B. R., SABO P. J., DORSCHNER M. O., SANDSTROM R., BERNSTEIN B., BENDER M. A., GROUDINE M., GNIRKE A. i współaut., 2009. *Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Revelas Folding Principles of the Human Genome*. Science 326, 289-294.

LUKINAVIČIUS G., BLAUKOPF C., PERSHAGEN E., SCHENA A., REYMOND L., DERIVERY E., GONZALEZ-GAITAN M., D'ESTE E., HELL S.W., GERLICH D. W., JOHNSSON K., 2015. *SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy*. Nat. Comm. 6, 1-7.

MAGALSKA A., SCHELLHAUS A., MORENO-ANDRÉS D., ZANINI F., SCHOOLEY A., SACHDEV R., SCHWARZ H., MADLUNG J., ANTONIN W., 2014. *RuvB-like atpases function in chromatin decondensation at the end of mitosis*. Develop. Cell 31, 305-318.

MARCO S., BOUDIER T., MESSAOUDI C., RIGAUD J. L., 2004. *Electron tomography of biological samples*. Biochemistry 69, 1219-1225.

MARKAKI Y., GUNKEL M., SCHERMELLEH L., BEICHMANIS S., NEUMANN J., HEIDEMANN M., LEONHARDT H., EICK D., CREMER C., CREMER T., 2010. *Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: A topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 75, 475-492.

MARSDEN M. P. F., LAEMMLI U. K., 1979. *Metaphase chromosome structure: Evidence for a radial loop model*. Cell 17, 849-858.

NAGENDRAPPA G., 2014. *Johann Friedrich Wilhelm Adolf von Baeyer*. Resonance 19, 489-522.

NARAYAN K., DANIELSON C. M., LAGAREC K., LOWEKAMP B. C., COFFMAN P., LAQUERRE A., PHANEUF M. W., HOPE T. J., SUBRAMANIAM S., 2014. *Multi-resolution correlative focused ion beam scanning electron microscopy: Applications to cell biology*. J. Struct. Biol. 185, 278-284.

OLLION J., COCHENNEC J., LOLL F., ESCUDÉ C., BOUDIER T., 2013. *TANGO: A generic tool for high-throughput 3D image analysis for study-*

ing nuclear organization. Bioinformatics 29, 1840-1841.

ONG C. T., CORCES V. G., 2014. *CTCF: An architectural protein bridging genome topology and function*. Nat. Rev. Genet. 15, 234-246.

OU H. D., PHAN S., DEERINCK T. J., THOR A., ELLISMAN M. H., O'SHEA C. C., 2017. *ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells*. Science 357, 1-13.

PATERCZYK B., 2013. *Droga do nanoskopii*. Kosmos 62, 261-272.

PEDDIE C. J., COLLINSON L. M., 2014. *Exploring the third dimension: Volume electron microscopy comes of age*. Micron 61, 9-19.

POMORSKI P., 2015. *Nagroda Nobla z chemii za rok 2014: za „opracowanie metod superrozdzielczych w mikrosko pii fluorescencyjnej", Eric Betzig, William Moerner i Stefan Hell*. Kosmos 64, 203-209.

POUYAN N., 2014. *Marcello Malpighi, the founder of biological microscopy*. J. Microbiol. Res. 4, 2166-5931.

RAZIN S. V., GAVRILOV A. A., 2014. *Chromatin without the 30-nm fiber constrained disorder instead of hierarchical folding*. Epigenetics 9, 653-657.

REINHART M., CARDOSO M. C., 2017. *A journey through the microscopic ages of DNA replication*. Protoplasma 254, 1151-1162.

RICCI M. A., MANZO C., GARCÍA-PARAJO M. F., LAKADAMYALI M., COSMA M. P., 2015. *Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo*. Cell 160, 1145-1158.

ROUQUETTE J., GENOUD C., VAZQUEZ-NIN G. H., KRAUS B., CREMER T., FAKAN S., 2009. *Revealing the high-resolution three-dimensional network of chromatin and interchromatin space: A novel electron-microscopic approach to reconstructing nuclear architecture*. Chromos. Res. 17, 801-810.

ROUQUETTE J., CREMER C., CREMER T., FAKAN S., 2010. *Functional nuclear architecture studied by microscopy: Present and future*. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 282, 1-90.

RUST M. J., BATES M., ZHUANG X., 2006. *Stochastic optical reconstruction miscroscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution*. Nat. Meth. 3, 793-795.

SAGE D., DONATI L., SOULEZ F., FORTUN D., SCHMIT G., SEITZ A., GUIET R., VONESCH C., UNSER M., 2017. *DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy*. Methods 115, 28-41

SCHERMELLEH L., CARLTON P. M., HAASE S., SHAO L., WINOTO L., KNER P., BURKE B., CARDOSO M. C., AGARD D. A., GUSTAFSSON M. G. L., LEONHARDT H., SEDAT J. W., 2008. *Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy*. Science 320, 1332-1336.

SCHERTEL A., SNAIDERO N., HAN H. M., RUHWEDEL T., LAUE M., GRABENBAUER M., MÖBIUS W., 2013. *Cryo FIB-SEM: Volume imaging of cellular ultrastructure in native frozen specimens*. J. Struct. Biol. 184, 355-360.

SCHINDELIN J., ARGANDA-CARRERAS I., FRISE E., KAYNIG V., LONGAIR M., PIETZSCH T., PREIBISCH S., RUEDEN C., SAALFELD S., SCHMID B., TINEVEZ J. Y., WHITE D. J., HARTENSTEIN V., ELICEIRI K., TOMANCAK P., 2012. *Fiji: An open-source platform for biological-image analysis*. Nat. Meth. 9, 676-682.

SCHOEN I., RIES J., KLOTZSCH E., EWERS H., VOGEL V., 2011. *Binding-activated localization microscopy of DNA l*. Nano Lett. 11, 4008-4011.

SCHROEDER-REITER E., PÉREZ-WILLARD F., ZEILE U., WANNER G., 2009. *Focused ion beam (FIB) combined with high resolution scanning electron microscopy: A promising tool for 3D analysis of chromosome architecture*. J. Struct. Biol. 165, 97-106.

SHIMOMURA O., JOHNSON F. H., SAIGA Y., 1962. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J. Cell. Compar. Physiol. 59, 223-239.

SMEETS D., MARKAKI Y., SCHMID V. J., KRAUS F., TATTERMUSCH A., CERASE A., STERR M., FIEDLER S., DEMMERLE J., POPKEN J., LEONHARDT H., BROCKDORFF N., CREMER T., SCHERMELLEH L., CREMER M., 2014. *Three-dimensional super-resolution microscopy of the inactive X chromosome territory reveals a collapse of its active nuclear compartment harboring distinct Xist RNA foci*. Epigenet. Chromat. 7, 1-27.

SMETANA K., LANE M., BUSCH H., 1966. *Studies on nucleoli of leukemic agranulocytes and plasmacytes in multiple myeloma*. Exp. Mol. Pathol. 5, 236-244.

STACHECKA, J., WALCZAK, A., KOCIUCKA, B., RUSZCZYCKI, B., WILCZYŃSKI, G., SZCZERBAL, I., 2017. *Nuclear organization during in vitro differentiation of porcine mesenchymal stem cells (MSCs) into adipocytes*. Histochem. Cell Biol. 149, 113-126.

SZCZUREK A., KLEWES L., XING J., GOURRAM A., BIRK U., KNECHT H., DOBRUCKI J. W., MAI S., CREMER C., 2017. *Imaging chromatin nanostructure with binding-activated localization microscopy based on DNA structure fluctuations*. Nucl. Acids Res. 45, 1-11.

TANG Z., LUO O. J., LI X., ZHENG M., ZHU J. J., SZALAJ P., TRZASKOMA P., MAGALSKA A., WLODARCZYK J., RUSZCZYCKI B., MICHALSKI P., PIECUCH E., WANG P., WANG D., TIAN S. Z. i współaut., 2015. *CTCF-Mediated Human 3D Genome Architecture Reveals Chromatin Topology for Transcription*. Cell 163, 1611-1627.

TESTILLANO P. S., SANCHEZ-PINA M. A., OLMEDILLA A., OLLACARIZQUETA M. A., TANDLER C. J., RISUENO M. C., 1991. *A specific ultrastructural method to reveal DNA: The NAMA-Ur*. J. Histochem. Cytochem. 39, 1427-1438.

TOOMRE D., BEWERSDORF J., 2010. *A new wave of cellular imaging*. Ann. Rev. Cell Develop. Biol. 26, 285-314.

TREMETHICK D. J., 2007. *Higher-order structures of chromatin: The elusive 30 nm fiber*. Cell 128, 651-654.

VILLINGER C., GREGORIUS H., KRANZ C., HÖHN K., MÜNZBERG C., VON WICHERT G., MIZAIKOFF B., WANNER G., WALTHER P., 2012. *FIB/SEM tomography with TEM-like resolution for 3D imaging of high-pressure frozen cells*. Histochem. Cell Biol. 138, 549-556.

WALCZAK A., SZCZEPANKIEWICZ A. A., RUSZCZYCKI B., MAGALSKA A., ZAMLYNSKA K., DZWONEK J., WILCZEK E., ZYBURA-BRODA K., RYLSKI M., MALINOWSKA M., DABROWSKI M., SZCZEPINSKA T., PAWLOWSKI K., PYSKATY M., WLODARCZYK J., WILCZYNSKI, G. M., 2013. *Novel higher-order epigenetic regulation of the bdnf gene upon seizures*. J. Neurosci. 33, 2507-2511.

WEI D., JACOBS S., MODLA S., ZHANG S., YOUNG C. L., CIRINO R., CAPLAN J., CZYMMEK K., 2012. *High-resolution three-dimensional reconstruction of a whole yeast cell using fo-*

cused-ion beam scanning electron microscopy. BioTechniques 53, 41-48.
WILLIAMSON I., BERLIVET S., ESKELAND R., BOYLE S., ILLINGWORTH R. S., PAQUETTE D., DOSTIE J., BICKMORE W. A., 2014. *Spatial genome organization: Contrasting views from chromosome conformation capture and fluorescence in situ hybridization*. Genes Develop. 28, 2778-2791.
WOLNY A., 2013. *Wizualizacje w świecie mikroskopii świetlnej*. Kosmos 62, 161-170.
YAMANAKA M., SMITH N. I. FUJITA K., 2014. *Introduction to super-resolution microscopy*. Microscopy 63, 177-192.
ZHANG W. I., RÖHSE H., RIZZOLI S. O., OPAZO, F., 2014. *Fluorescent in situ hybridization of synaptic proteins imaged with super-resolution STED microscopy*. Microsc. Res. Techn. 77, 517-527.
ZORCA S. M., ZORCA C. E., 2011. *The legacy of a founding father of modern cell biology: George Emil Palade (1912-2008)*. Yale J. Biol. Med. 84, 113-116.

KOSMOS Vol. 68, 1, 19–33, 2019

PAWEŁ TRZASKOMA[1], ADRIANA MAGALSKA[2]

[1]Laboratory of Molecular and Systemic Neuromorphology, [2]Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteura Str., 02-093 Warszaw, E-mail: p.trzaskoma@nencki.gov.pl, a.magalska@nencki.gov.pl

MODERN MICROSCOPY METHODS IN 3D IMAGING OF CHROMATIN STRUCTURE

Summary

One of the fundamental questions in the field of biology is the way in which a two-meter-long strand of DNA is packed into a nucleus with a diameter of ca. 10 μm, several hundred times smaller than that of a pin's head. Each year advanced microscopic techniques, in combination with the development of biochemical and computational methods, bring us closer to answering this question. Although the first microscopes were created in the sixteenth century, only recently, thanks to breaking the diffraction barrier limiting their resolution, can we perform super-resolution microscopy. This work aims to introduce our current understanding of chromatin organization and to review microscopic techniques used in these studies, taking into account their advantages and limitations. These examples allow the reader to become familiar with the progress made in the research on the organization of chromatin, and, in combination with the description of the techniques, can be helpful in finding the best imaging method for planed experiments.

Keywords: cell nucleus, chromatin, chromatin organization, electron microscopy, super-resolution microscopy