



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Optimalizace mikroskopického zobrazování technikou TOCCSL

Optimalization of TOCCSL microscopy

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský inženýr

Autor diplomové práce: Bc. Barbora Chmelová

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Martin Rožánek, Ph.D.

Externí vedoucí diplomové práce: RNDr. Radek Šachl, Ph.D.

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Chmelová** Jméno: **Barbora** Osobní číslo: **434151**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**
Studijní obor: **Biomedicínský inženýr**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Optimalizace mikroskopického zobrazování technikou TOCCSL

Název diplomové práce anglicky:

Optimization of microscopy imaging TOCCSL

Pokyny pro vypracování:

Navrhněte metodiku měřicího protokolu pro využití fluorescenční mikroskopie pomocí techniky TOCCSL pro hodnocení biologických vzorků. Vytvořte fluorescenční snímky pro sérii laboratorních vzorků a snímky zpracujte navrženým algoritmem v programovém prostředí Matlab. Výsledky měření statisticky vyhodnoťte a diskutujte vlastnosti použité mikroskopické techniky.

Seznam doporučené literatury:

[1] Moertelmaier, M.; et al., Thinning out Clusters While Conserving Stoichiometry of Labeling, Appl. Phys. Lett., ročník 87, číslo 26, 2005

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

doc. Ing. Martin Rožánek, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

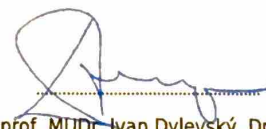
RNDr. Radek Šachl, Ph.D., Ing. Dalibor Pánek, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: **10.02.2020**

Platnost zadání diplomové práce: **19.09.2021**



prof. Ing. Peter Kneppo, DrSc., dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry




prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Optimalizace mikroskopického zobrazování technikou TOCCSL“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 21.05.2020

.....


Bc. Barbora Chmelová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému externímu vedoucímu RNDr Radku Šachlovi Ph. D., který mě prováděl celým vypracováním mé diplomové práce a poskytl mi zázemí na Akademii věd. Další poděkování patří vedoucímu mé práce doc. Ing. Martinu Rožánkovi Ph. D. za jeho vstřícný přístup při mém výběru tématu a za pomoc s formálními záležitostmi. V neposlední řadě patří mé poděkování Joaně Ricardo Ph. D., která mě provedla úvodem do metody TOCCSL a strávila se mnou mnoho hodin v laboratořích. Na závěr bych ráda poděkovala panu Ing. Jiřímu Tomčalovi za poskytnutí cenných rad.

ABSTRAKT

Optimalizace mikroskopického zobrazování technikou TOCCSL

Tato diplomová práce se zabývá problematikou metod fluorescenční mikroskopie, pomocí kterých je možné detekovat pohyb jednotlivých molekul v reálném čase. Jejím hlavním cílem je vytvořit měřicí protokol, který popisuje postup využití metody TOCCSL (Thinning Out Clusters while Conserving the Stoichiometry of Labelling) pro měření nanoskopické organizace gangliosidů v modelových systémech plazmatických membrán. Dále naměřit sérii vzorků a pomocí zpracování v prostředí Matlab určit velikost gangliosidových klastrů, které každý konkrétní vzorek tvoří.

Měření probíhala na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského Akademie věd na fluorescenčním mikroskopu určeném pro metody TIRF a TOCCSL s využitím modrého laseru o vlnové délce 488 nm. Tvorba klastrů byla pozorována u dvou typů gangliosidů, každého na třech různých podpůrných fosfolipidových dvojvrstvách. Zaznamenaná data jsem předzpracovala v prostředí Matlab a dále dopočítala hustotní pravděpodobnostní funkci pro jasové body.

Ze získaných výsledků bylo patrné, že každý gangliosid vykazuje jinou ochotu tvořit nanoskopické klastry. Změna ve struktuře lipidové dvojvrstvy, ve které se daný gangliosid vyskytuje, má na nanoskopickou segregaci gangliosidů prokazatelný vliv. Výsledky ukazují, že metoda TOCCSL je vhodná především pro detekci menších a pohyblivějších molekul a tudíž pro vzorky, kde očekáváme nižší ochotu vazebných partnerů.

Klíčová slova

Fluorescenční mikroskopie, TOCCSL, gangliosid, fosfolipidová dvojvrstva

ABSTRACT

Optimization of TOCCSL microscopy

This thesis deals with the problematics of fluorescence microscopy techniques that are able to detect the single molecule movement in the real time. The main aim is to create measuring protocol describing usage of TOCCSL (Thinning Out Clusters while Conserving the Stoichiometry of Labelling) method for measuring nanoscopic organisation of gangliosides on synthetic plasmatic membranes. Next aim is to measure several samples and perform the data analysis in Matlab software to define size of ganglioside clusters in each sample.

The measurements take place at The Czech Academy of Sciences, J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry using the microscope suited for TIRF and TOCCSL measurements. Cluster formation is observed on three compositions of lipid bilayer and two types of gangliosides. I analysed the acquired data in Matlab and counted the probability density function for brightness spots.

The results showed that different gangliosides create clusters of different sizes. Changes in bilayer structures have significant impact on nanoscopic ganglioside segregation. As a result it is possible to claim that TOCCSL method is suitable primarily for detection of smaller and more mobile molecules, therefore is more convenient for samples with lower willingness to bind.

Keywords

Fluorescence microscopy, TOCCSL, ganglioside, phospholipid bilayer

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Seznam symbolů a zkratk..... | 8 |
| 1 Úvod | 10 |
| 2 Přehled současného stavu..... | 11 |
| 2.1 Fluorescence..... | 11 |
| 2.1 Fluorescenční mikroskopie | 13 |
| 2.1.1 Konfokální fluorescenční mikroskopie | 15 |
| 2.1.2 TIRF | 19 |
| 2.1.3 FRAP | 21 |
| 2.1.4 Gangliosidy..... | 24 |
| 3 Cíle práce..... | 27 |
| 4 Metody | 28 |
| 4.1 TOCCSL..... | 28 |
| 4.2 Měřicí protokol..... | 30 |
| 4.2.1 Příprava vzorků | 30 |
| 4.2.2 Záznam dat metodou TOCCSL | 33 |
| 4.2.3 Zpracování a analýza dat | 37 |
| 4.3 Metoda kontroly a ověření výsledků..... | 39 |
| 5 Výsledky..... | 42 |
| 5.1 Výsledky metody TOCCSL | 42 |
| 5.2 Ověření výsledků..... | 46 |
| 6 Diskuze..... | 48 |
| 7 Závěr | 52 |
| Seznam použité literatury | 53 |
| Příloha A: Optimalizovaný měřicí protokol..... | 57 |
| Příloha B: Kód pro zpracování výsledků metody FRAP vytvořený v prostředí Matlab | 58 |

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

| Symbol | Jednotka | Význam |
|-------------|-----------------------|--|
| A | - | dolní hranice intervalu |
| a_0 | nm^2 | plocha molekuly gangliosidu |
| B | - | hloubka propadu |
| B | - | horní hranice intervalu |
| c_G | - | poměrná koncentrace gangliosidů ku lipidům |
| d | s | poločas rozpadu |
| D | m^2/s | difuzní koeficient |
| d_{min} | m | minimální vzdálenost dvou bodů, aby byly rozeznatelné na obrazu jako dva |
| E_0 | A/m | intenzita evanescentního pole na rozhraní |
| E_z | A/m | intenzita evanescentního pole pole ve vzdálenosti z |
| I | N fotonů/s | intenzita fluorescence před photobleachingem |
| $I(t)$ | N fotonů/s | intenzita fluorescence v čase t |
| I_0 | N fotonů/s | intenzita fluorescence vzorku po photobleachingu |
| I_1 | N fotonů/s | intenzita fluorescence vzorku v iniciační fázi měření |
| I_∞ | N fotonů/s | maximální návratná intenzita fluorescence vzorku |
| K | - | míra tzv. bělicí konstanty (zahrnuje tok fotonů) |
| k | J/K | Boltzmannova konstanta |
| M | - | mobilní frakce |
| n | - | index lomu v prostředí před objektivem |
| n_1, n_2 | - | různé hodnoty indexů lomu dvou prostředí |
| NA | - | numerická apertura |
| NA_{cond} | - | numerická apertura kondenzátoru |
| NA_{obj} | - | numerická apertura objektivu |
| N_G | - | počet gangliosidů v jedné nanodoméně |
| P | - | pravděpodobnost |
| $p(x)$ | - | hustota pravděpodobnosti |
| R | m | hydrodynamický poloměr |
| r_{Airy} | m | poloměr první tmavé kružnice |
| R_D | nm | velikost jedné lipidové domény |

| | | |
|----------------------|--------------------|--|
| t | s | čas, ve kterém určujeme intenzitu fluorescence |
| T | K | termodynamická teplota |
| w | m | poloměr oblasti aplikace laseru |
| z | m | vzdálenost od rozhraní, ve které se měří I _z |
| β | ° | polovina vrcholového úhlu kužele paprsků vstupujících do objektivu |
| η | m ² /s | viskozita |
| λ_0 | m | vlnová délka světla ve vakuu |
| Π | - | Ludolfovo číslo |
| Π_0 | m ³ /kg | hustota ⁻¹ |
| τ_D | s | charakteristická časová konstanta extrahovaná z matematického fitování dat |
| θ_1, θ_2 | ° | různé hodnoty úhlů dopadu a odrazu paprsku na rozhraní dvou prostředí |

Seznam zkratek

| Zkratka | Význam |
|---------|--|
| AFM | Atomic Force Microscopy |
| CCD | Charged-coupled device (zařízení s vázanými náboji) |
| DOPC | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin |
| FRAP | Fluorescence recovery after photobleaching (obnovení fluorescence po photobleachingu) |
| HEPES | Kyselina 4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazinethansulfonová |
| Chol | Cholesterol |
| NaCl | Chlorid sodný |
| NatGM1 | Přírodní gangliosid GM1 |
| NatGM3 | Přírodní gangliosid GM3 |
| nGM1g | Přírodní zeleně značený gangliosid GM1 |
| pGM3g | Palmitoylated (má kovalentně připojenou mastnou kyselinu na cystein) zeleně značený gangliosid GM3 |
| ROI | Region of interest (oblast zájmu) |
| Sph | Sfingomyelin |
| TIRF | Total internal reflexion fluorescence (úplný vnitřní odraz fluorescence) |
| TOCCSL | Thinning out clusters while conserving the stociometry of labelling |
| tzn. | To znamená |
| tzv. | Takzvaný |

1 Úvod

Tato diplomová práce se zabývá problematikou nové fluorescenční metody, která umožňuje sledovat pohyby molekul na membráně v reálném čase. Téma zahrnuje jak technickou problematiku, tak má přesah do medicínského zaměření a proto je vhodné pro obor biomedicínského inženýrství.

Technickou část práce reprezentuje především měření pomocí fluorescenčního mikroskopu, aplikace nové metody a také analýza pomocí algoritmu. Medicínská část je potom zastoupena konkrétními měřeními vzorky. Měření je prováděno na dvou typech gangliosidů, které se vyskytují především v nervové tkáni člověka a hrají významnou roli při výskytu např. Alzheimerovy choroby. Přiblížení se porozumění nemocem, které postihují nervovou tkáň, bych také označila za hlavní motivaci práce a její přesah do klinické praxe.

Veškerá měření probíhala na Heyrovského ústavu Akademie věd, kde se nachází i mikroskop uzpůsoben pro měření vzorků metodou, kterou jsem si vybrala pro zpracování své diplomové práce. Jedná se konkrétně o fluorescenční metodu TOCCSL (Thinning Out Clusters while Conserving the Stochiometry of Labeling), která je založená na principu photobleachingu a Brownově pohybu. Měřeny byly vzorky dvou různých gangliosidů na třech lipidových dvojvrstvách. Data byla získána pomocí fluorescenčního mikroskopu s laserem o vlnové délce 488 nm a digitální kamery. Nastavení měřících parametrů probíhala v programech LabVIEW a Micro-Manager. Pro zpracování dat byl poté využit software vytvořený v prostředí Matlab. Pro všechny tyto kroky byly vytvořeny návodné protokoly přiložené k této diplomové práci.

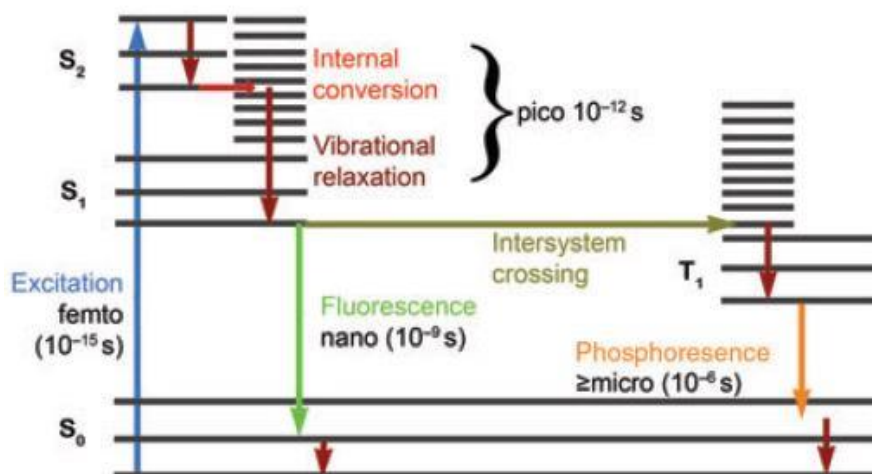
2 Přehled současného stavu

Mikroskopie a její techniky jsou dnes již běžnými nástroji pro pozorování biologických struktur v mnoha odvětvích, medicínu nevyjímaje. [1] Pomocí mikroskopických metod využívajících fluorescenci lze monitorovat fyziologii buněk, pohyb na jejich membránách a interakce s okolím. Existuje mnoho druhů fluorescenční mikroskopie, přičemž každý z nich je určen pro jiné struktury a nabízí jiné zobrazovací možnosti, dle potřeby uživatele.[2]

2.1 Fluorescence

Fluorescence, stejně jako fosforescence, je druhem luminiscence, která je popisována jako emise světla ze substance. První zmínky o pozorování luminiscence pochází již ze starověku. Fluorescence samotná byla pojmenována až o mnoho let později, kdy ji v polovině devatenáctého století představil veřejnosti Sir George Gabriel Stokes. [3] Dalším mužem, který významně přispěl k porozumění fluorescence, byl astronom sir John Frederick William, který v roce 1845 pozoroval fluorescenci chininu v roztoku alkoholu a jehož pozorování byla základem, díky kterému dnes známe fluorescenci tak, jak ji známe. [4]

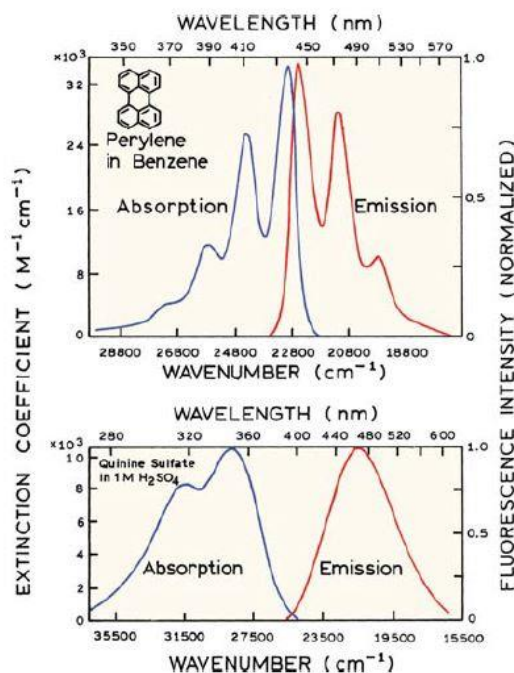
Fluorescence je emise světla, která vzniká vyzářením fotonu na základě absorpce elektromagnetického záření určité vlnové délky. Absorbované záření vybudí elektron fluoroforu a ten díky dodané energii přeskóčí do vyšší elektronové vrstvy. Při návratu na původní energetickou hladinu vyzáří foton. Emise fotonu probíhá pouhé nanosekundy po absorpci excitačního záření, což je hlavní rozdíl mezi ní a fosforescencí, u které dochází k emisi mnohem později. Velké množství takových vyzářených fotonů se nám potom jeví jako záření dané látky, tedy fluorescence. Tento jev je možné pozorovat především u látek aromatického charakteru. [4] [5]



Obrázek 1: Jablonského diagram – vyobrazení pohybu elektronu v rámci elektronických hladin a vznik fluorescence a fosforescence. [6]

Pohyb elektronu mezi energetickými hladinami je vyobrazen pomocí Jablonského diagramu na obrázku 1. Odtud je možné vyčíst, že elektron po excitaci přeskočí na vyšší energetickou hladinu, do tzv. prvního excitovaného stavu, zde ztratí část své energie ve formě tepla, vibrační relaxací atp. Následně se vrací zpět na původní hladinu za vzniku fluorescence. Elektrony při fluorescenci přeskakují do tzv. singletových stavů, což znamená, že v orbitalu se nachází dva elektrony s antiparalelními spiny. V obrázku 1 jsou tyto stavy označeny písmenem S. Pokud dochází k přesunu elektronů pouze v rámci těchto tzv. povolených stavů, vzniká fluorescence. [7] V některých případech ovšem může docházet k mezosystémovému přechodu, tedy zakázanému přechodu mezi singletovým a tripletovým stavem (značen T). U tripletovém stavu dochází k jevu, kdy se v jednom orbitalu objevují elektrony s paralelním spinem, což neodpovídá Pauliho principu, a proto k tomuto jevu dochází méně často, než k přechodům v rámci singletových stavů. Pokud dojde k zakázanému přechodu, jeví se to pod fluorescenčním mikroskopem jako vyhasínání. Při návratu elektronu z tripletového do singletového stavu dochází k fosforescenci. [6] Zakázaných přechodů se využívá i při photobleachingu, který je důležitou součástí metody TOCCSL.

Jak je z diagramu také zřejmé, excitační a emitované záření mají různou vlnovou délku, což je naprosto klíčová vlastnost fluorescence a díky ní je možné detekovat i slabou emisi na pozadí silného excitačního paprsku. [6] Tato změna vlnové délky se nazývá Stokesův posun a je pozorovatelný u fluorescenčních spekter různých látek. Absorpční a emisní spektra fluoroforů jsou zpravidla symetrická, ale je u nich patrný posun v oblasti vlnové délky, jak je znázorněno na Obrázku 2. [4] [5] Využívá jej i metoda TOCCSL, kde je nutné detekovat jednotlivé molekuly, jejichž fluorescence je mnohem slabší, než excitační paprsek a bez Stokesova posunu by nikdy nebylo možné je pozorovat.



Obrázek 2: Absorpční a emisní spektra dvou různých fluoroforů, u nichž je patrný Stokesův posun. [4]

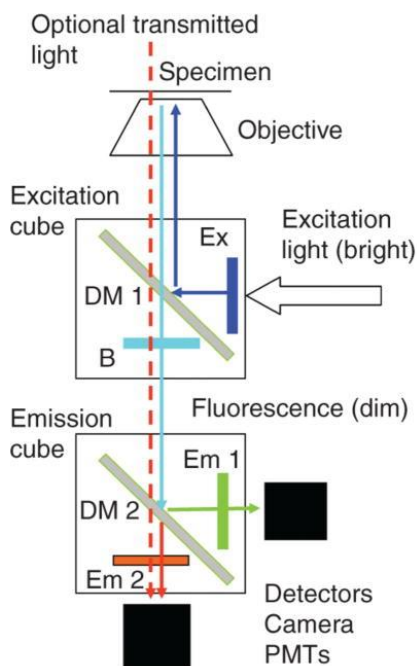
2.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie nám umožňuje sledovat rozložení fluorescenčního signálu ve značených mikroobjektech. Jedná se o základní metodu využívanou pro zkoumání buněčné fyziologie. Její kořeny sahají do konce devatenáctého století, kdy byla prováděna první pozorování fluorescenčních vzorků a v roce 1871 došlo k syntetizaci prvního umělého fluorescenčního barviva, čímž bylo umožněno pozorování struktur, které nejsou přirozeně fluorescentní. V polovině dvacátého století se poprvé objevilo dichromatické zrcadlo, které odráží jen úzké pásmo vlnových délek. [8] Dalším důležitým milníkem ve vývoji fluorescenční mikroskopie byla detekce fluoroforů, které dokážou specificky zacílit na různé buněčné struktury jako lipidy, proteiny atd. Tento objev posunul pozorování buněčné fyziologie na úroveň, kterou známe dnes. [2] V současné době se cílí hlavně na zlepšení kontrastu a na časové a prostorové rozlišení získaného obrazu. Rozrůstá se nejen její využití, množství technik a možnosti zobrazení ale také využívané technologie pro zpracování dat a nová fluorescenční barviva. [6] [9]

Základní princip fluorescenční mikroskopie spočívá v excitaci vzorku zářením se specifickou vlnovou délkou blízkou modrému světlu, což vybudí fluorescenční látky ve

vzorku, které absorbují dopadající fotony, které excitují elektrony a ty přeskakují na vyšší energetické úrovně. Následně při návratu na původní energetickou hladinu vyzáří fluorofor foton o nižší energii, než kterou má foton absorbovaný. Paprsek ozařující vzorek se označuje jako excitační a sekundárně vyzářené fotony jako emisní. Protože emisní fotony mají nižší energii a jimi emitovaná fluorescence má jinou vlnovou délku než záření excitační, je potřeba před detektor umístit filtry, které odstraní excitační záření. [2] Podrobněji je tento proces popsán v předchozí kapitole o fluorescenci.

Existuje také druhá možnost excitace elektronu pomocí červeného světla, kde na rozdíl od excitace modrým světlem nedochází k absorpci jednoho, nýbrž dvou fotonů za vyzáření jediného fotonu. Emitovaný foton má potom vyšší energii než oba absorbované a proto lze využít červené světlo k tvorbě světla zeleného. Výhody této metody jsou hlubší průnik do vzorku díky delší vlnové délce a nižšímu rozptylu světla. Při absorpci modrého světla vyšší energii je také větší pravděpodobnost narušení buněčných struktur. [2] Využívá se i kombinace buzení elektronů oběma typy laserů. Nicméně pro měření v této diplomové práci je využití modrého světla efektivnější, proto je zde tzv. metoda dvoufotonové mikroskopie zmíněna jen okrajově.



Obrázek 3: Stavba fluorescenčního mikroskopu. [2]

Základní stavba fluorescenčního mikroskopu je zobrazena na obrázku **Chyba! nalezen zdroj odkazů..** Hlavními stavebními prvky každého fluorescenčního mikroskopu jsou: zdroj excitačního záření, dichromatická zrcadla, objektiv, detektory emisního záření a zobrazovací zařízení. Zdrojem záření mohou být xenonové či rtuťové výbojky, které jsou v současné době často nahrazovány modrými a červenými lasery.

Excitační paprsek generovaný zdrojem dopadá na dichromatický dělič svazku, neboli dichroické zrcadlo, které má tu vlastnost, že dokáže odrazit jen velmi úzké spektrum elektromagnetického záření o určité vlnové délce a ostatní dopadající záření propouští. Tato vlastnost umožňuje zacílit excitační paprsek do vzorku a nechat projít emisní záření zpět do objektivu. Paprsek emisního záření projde dichroickým zrcátkem určeným na manipulaci s excitačním paprskem, protože má díky Stokesově posunu jinou vlnovou délku. Následně dopadá na druhé dichroické zrcátko, které dokáže rozdělit emisní fotony vybuzené modrým a červeným laserem. Mezi oběma dichroickými zrcadly se nachází bariéra, která zabraňuje rozptýlenému excitačnímu záření dopadat na detektory záření. Fotony emisního paprsku dopadají na fotodetektory (nejčastěji CCD čipy digitálních kamer), které pomocí fotoelektrického jevu přeměňují fotony na elektrony. Tento signál je dále přenášen do počítače, kde díky digitálnímu zpracování obrazu můžeme získat záznam vzorku v reálném čase. [10]

Tato stavba a princip zobrazování jsou společné pro epifluorescenční a inverzní mikroskopy, jejichž stavba je totožná a liší se pouze pozicí vzorku vůči objektivu. Existuje také metoda transmisní fluorescenční mikroskopie, nicméně ta se dnes využívá spíše jako doplňková a nejnovější mikroskopy jsou již konstruovány tak, aby je bylo možné využít pro kombinaci obou metod. Existují i další metody fluorescenčního zobrazování jako vertikální nebo Kölerova metoda, ty jsou však již hodně specifické a v pro tuto práci irelevantní. [10]

Další modifikace stavby mikroskopu či hodnot vlnové délky excitačního záření jsou zaměřeny především na zlepšení kontrastu mezi signálem emitovaným vzorkem a pozadím. Kontrast a další zobrazovací parametry jsou ovlivněny také fluorescenčním barvivem, kterým se označují zobrazované struktury. Fluorescenční mikroskopie prošla v posledních desetiletích velmi významným rozvojem a existuje široký rozsah metod speciálně upravených pro zkoumání jednotlivých struktur. [6]

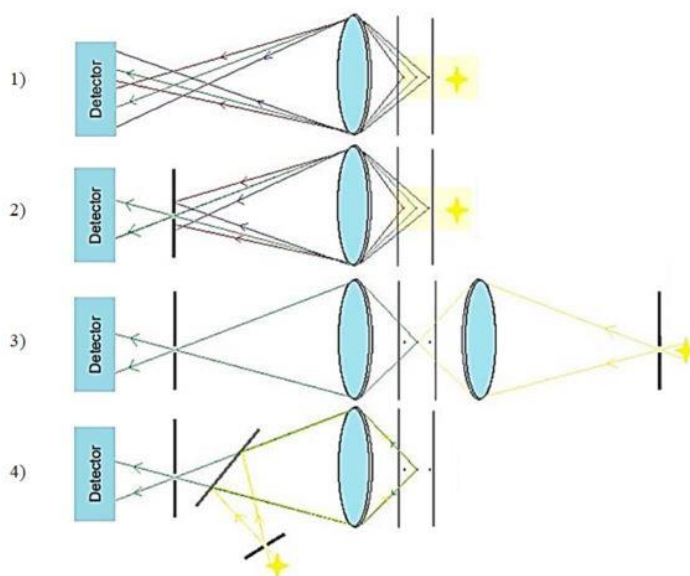
2.1.1 Konfokální fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopii lze dělit dle zobrazovaného pole na dva základní druhy, mikroskopii širokého pole a na skenovací konfokální mikroskopii. V prvním případě je současně ozařován celý vzorek a je snímán fluorescenční signál celé jeho plochy. Ve druhém případě se zaměřujeme pouze na určité pole zájmu, obvykle označované ROI. Vybrané pole je ozařeno fokusovaným paprskem excitačního světla a bod po bodu se zaznamenává intenzita záření v každém místě zobrazované oblasti. Výsledný obraz je složen z těchto naměřených intenzit – odtud název skenovací. [2]

První konfokální mikroskop byl sestaven Marvinem Minským ke konci šedesátých let minulého století, k velkému rozvoji této zobrazovací techniky pak došlo v druhé polovině let sedmdesátých. Minsky studoval nervové sítě v mozku a měl snahu zaznamenat děje v živých tkáních. Aby byl schopen ostře zobrazit takto miniaturní

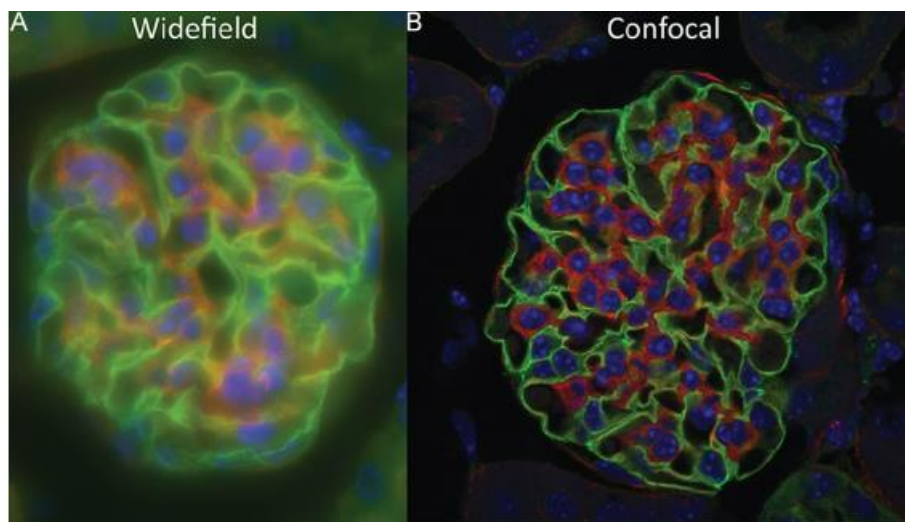
struktury, potřeboval upravit klasickou mikroskopii širokého pole pro své účely. [11] Při zobrazování preparátů dochází ke snížení obrazového kontrastu, protože jsou potlačeny jemné strukturální detaily, nacházející se mimo zaostřenou rovinu. To tedy znamená, že zachycení fluorescence okolních struktur mimo rovinu ostrosti zhoršuje kvalitu obrazu zaostřené části vzorku. Tento problém Minsky vyřešil pomocí dvou konfokálních bodových clonek, které fungují na principu dírkové komory. Jedna je umístěna před zdrojem světla a umožňuje průchod pouze úzkému paprsku světla, což má za následek ozáření konkrétní oblasti vzorku. Druhá clonka se nachází před detektorem a propustí do něj jen emisní záření ze zaostřené roviny. Protože tento postup nám umožní zobrazit pouze jeden jediný bod obrazu, který chceme získat, je nutné postup opakovat také pro okolní body. [12]

Základní princip konfokální mikroskopie spočívá v definování roviny ostrosti a jejím zaostření pomocí dvou bodových clon. Clony redukují průchod nežádoucí fluorescence na detektor a umožňují tak zobrazit vybranou část vzorku s mnohem vyšší ostrostití, než by bylo možné dosáhnout mikroskopii širokého pole. V některých případech může být za clonkou umístěnou u zdroje dichroické zrcadlo, toto uspořádání umožňuje, aby byl zdroj světla umístěn v mikroskopu ve stejné rovině jako detektor. Obě bodové clonky musí být v konjugovaných rovinách ostrosti, což znamená, že musí být současně zaostřené na jednu konkrétní rovinu ostrosti. Průchod paprsku soustavou je znázorněn na obrázku 4. Rozdíl v zobrazení metodou širokého pole a konfokální je porovnán na obrázku 5. [11]



Obrázek 4: Znázornění průchodu paprsku vzorkem. 1) Průchod bez clonek – na detektor dopadá mnoho paprsků. 2) Průchod s clonkou před detektorem – na detektor dopadá svazek z určeného místa, ale obraz může být zkreslený odraženými paprsky. 3) Průchod s clonkou před detektorem i před zdrojem – na detektor dopadá paprsek z jednoho konkrétního místa, nehrozí výskyt odražených paprsků. 4) Modifikace případu 3 za použití dichroického zrcadla.

[13] (Upraveno)



Obrázek 5: Porovnání zobrazení tkáně myši ledviny. Vlevo (A) je zobrazení pomocí metody širokého pole a vpravo (B) metodou konfokální. [14]

Rozlišení obrazu je determinováno difrakcí jednotlivých světelných bodů. Definujeme tzv. difrakční limit, který nám určuje, jakou vzdálenost mezi sebou mohou mít dva body, aby byly ve výsledném obrazu ještě identifikovatelné jako dva a ne jako jeden zářivý bod. Na tuto vlastnost má velký vliv numerická apertura, což vyplývá i ze vzorce (1). [12]

$$d_{min} = \frac{1,22 \cdot \lambda_0}{NA_{obj} + NA_{cond}} \quad (1)$$

d_{min} – minimální vzdálenost dvou bodů, aby byly rozeznatelné na obrazu jako dva (m)

λ_0 – vlnová délka světla ve vakuu (m)

NA_{obj} – numerická apertura objektivu (-)

NA_{cond} – numerická apertura kondenzátoru (-)

Numerická apertura je účinnost objektivu a lze ji vyjádřit rovnicí (2). [12]

$$NA = n \cdot \sin(\beta) \quad (2)$$

NA – numerická apertura (-)

n – index lomu v prostředí před objektivem (-)

β – polovina vrcholového úhlu kužele paprsků vstupujících do objektivu ($^\circ$)

Difrakce má za následek to, že se bodový zdroj světla na výsledném obraze nejeví jako bod, ale jako Airyho disk. Ten má podobu světlého středového kruhu, kolem

kterého se střídají tmavé a světlé soustředné kružnice s neostrými přechody. Poloměr první tmavé kružnice okolo světlého středu vychází z rovnice 3. Podle Rayleighova kritéria platí, že vzdálenost dvou zdrojů nekoherentního záření o stejné intenzitě musí být větší nebo rovna r_{Airy} , aby bylo možné takové dva body rozlišit. Je třeba vzít v úvahu, že pokud se jedná o koherentní zdroje záření, rozlišovací schopnost výrazně klesá, zamezit se tomu dá například zmenšením zorného pole, jako je tomu právě v případě konfokální mikroskopie. [12]

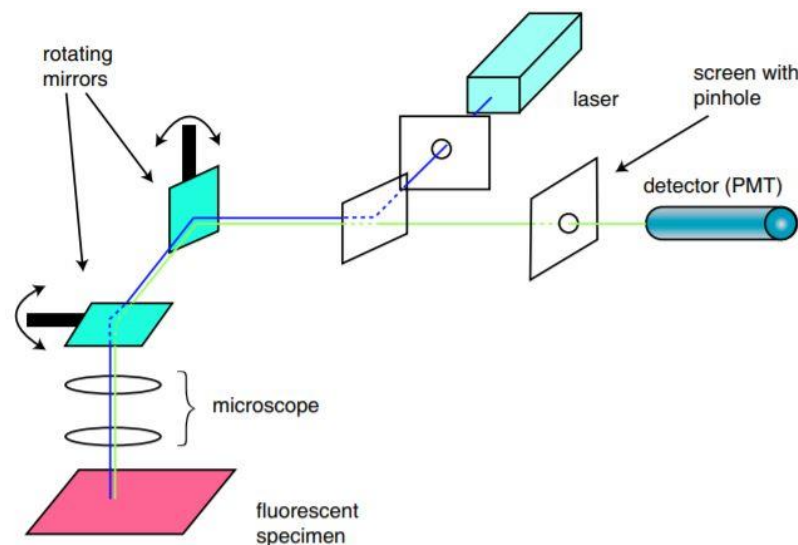
$$r_{Airy} = 0,61 \cdot \frac{\lambda_0}{NA_{obj}} \quad (3)$$

r_{Airy} – poloměr první tmavé kružnice (m)

λ_0 – vlnová délka světla ve vakuu (m)

NA_{obj} – numerická apertura objektivu (-)

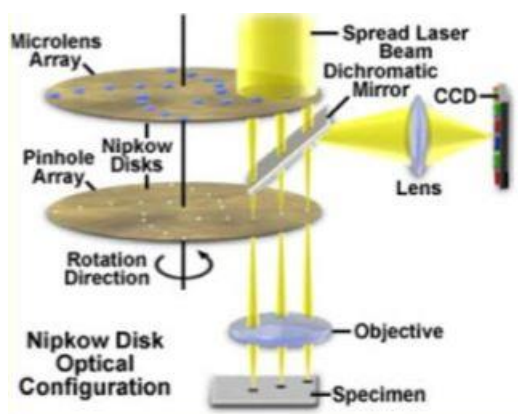
Existují tři možnosti snímání vzorku. Jedná se o pohyb vzorkem, pohyb objektivem a rastrování pomocí pohybu excitačního paprsku [13]. Jednoduché schéma takového konfokálního mikroskopu je znázorněno na obrázku 6.



Obrázek 6: Základní schéma konfokálního mikroskopu využívajícího skenovací zrcadel pro pohyb laserového paprsku po zkoumané části vzorku. [11]

V dnešní době se již využívá pouze snímání pomocí rastrovacích konfokálních mikroskopů, protože tento postup je nejméně náchylný na mechanickou chybu a je nejrychlejší. Skenování vzorku může probíhat jedním ze dvou způsobů. První z nich je založen na principu rotujícího disku, který má na svém povrchu až 200 000 otvorů uspořádaných do spirály. Tzv. Nipkowův disk rotuje až rychlostí několik Hz a obraz je tvořen z emisního záření procházejícího otvory disku. Otvory jsou konjugované v dopadajícím a detekovaném světle. Jinak můžeme tuto metodu nazývat také metoda

tandemového skenovacího konfokálního mikroskopu a její princip je vyobrazen na obrázku 7. [15]



Obrázek 7: Schéma principu rastrovacího konfokálního mikroskopu využívajícího záznam obrazu pomocí Nipkowova disku. [15]

Druhou rastrovací metodou je skenování pomocí pohybu laserového paprsku po zobrazované části vzorku. Tohoto pohybu lze dosáhnout otočnými řádkovacími zrcadly, dichroickým zrcadlem nebo jedno z otočných zrcadel můžeme nahradit tzv. akusticko-optickým deflektorem. V tomto případě se společně se záznamem obrazu přenáší informace o souřadnicích laseru a výsledný obraz je složen z jednotlivých pixelů na základě jejich pozice. Princip této metody je na obrázku 6. [15]

Pokud bychom chtěli obě metody porovnat z hlediska rychlosti snímání obrazu, jednoznačně rychlejší je metoda Nipkowova disku, kde je obraz rastrován až 1000krát rychleji než u laserové metody, kde je snímkovací frekvence přibližně 30 snímků za sekundu. Další výhodou tandemové metody oproti laserové je možnost využití nižší intenzity excitačního paprsku a tím snížení rizika photobleachingu. U laserové metody je fotonásobič schopen detekovat jen zhruba polovinu fluorescence a toto číslo se při zvýšení rychlosti snímání ještě snižuje, což může mít za následek tvorbu šumu ve výsledném obrazu. Na druhou stranu má metoda využívající laser lepší axiální rozlišení, protože neumožňuje průchod odraženého záření přes okolní otvory, jako je tomu u disku. [13]

2.1.2 TIRF

Technika TOCCSL, kterou se zabývá tato práce, využívá fluorescence s totálním vnitřním odrazem, neboli TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). Tato metoda se stala velmi využívanou v posledních letech v oboru buněčné biologie, protože je možné s její pomocí pozorovat struktury a děje na buněčné plazmatické membráně. Díky svým vlastnostem, jako je vysoké rozlišení a vysoký kontrast, je současně považována za zlatý standard v zobrazování dějů na přisedlé buněčné plazmatické

membráně. [16] Využívá speciální techniku osvětlování vzorku, která excituje pouze fluorofory umístěné do vzdálenosti 100 nanometrů od krycího sklíčka případně rozhraní mezi substrátem a imerzním médiem. Při totálním vnitřním odrazu dopadajících paprsků dochází ke vzniku tzv. evanescentní vlny, která neproniká hlouběji do vzorku a umožňuje se vyhnout kontaminaci výsledného obrazu fluorescencí ostatních struktur mimo zájmovou oblast, jinými slovy je zajištěn velký poměr signálu ku šumu (signal-to-noise ratio). [1] [17]

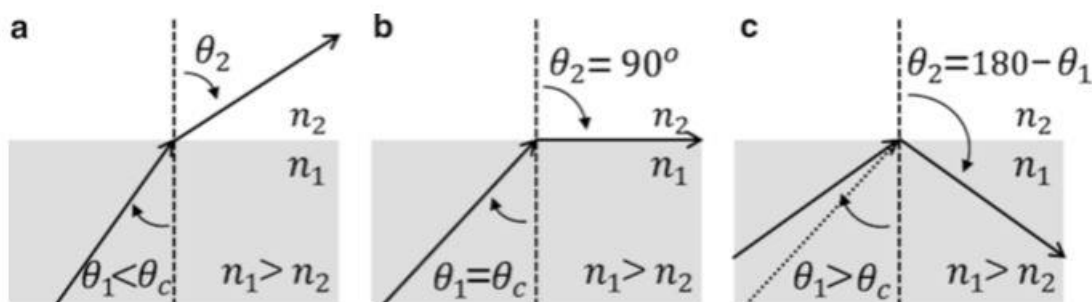
Fyzikální princip metody je založen na Snellově zákoně (4), který popisuje lom a odraz světla při průchodu prostředí s různým indexem lomu. [1]

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (4)$$

n_1, n_2 – různé hodnoty indexů lomu dvou prostředí (-)

θ_1, θ_2 – různé hodnoty úhlů dopadu a odrazu paprsku na rozhraní dvou prostředí ($^\circ$)

Různé případy lomu záření jsou znázorněny na obrázku Obrázek 8.



Obrázek 8: Diagramy průběhu paprsků z prostředí s indexem lomu n_1 (šedé) do prostředí s indexem lomu n_2 (bílé). V případě a je úhel menší než úhel kritický, v případě b je kritickému úhlu roven, a v případě c je větší než úhel kritický. Případ c odpovídá ději na rozhraní vzorku při TIRF metodě. [1]

K totálnímu vnitřnímu odrazu paprsku dochází, když je úhel lomu paprsku procházejícího do prostředí s jiným indexem lomu větší než kritický úhel. Snellův zákon popisuje chování paprsku ve smyslu směru odrazu, ale nemá výpovědní hodnotu ve smyslu proporcí odraženého záření. Při odrazu dochází sice k totálnímu odrazu světla, nicméně je zde i elektrická složka záření, která prochází do druhého prostředí a způsobuje tak vznik pole. Toto pole se označuje jako evanescentní a jeho intenzita klesá exponenciálně s hloubkou průniku. Pro popis tohoto jevu využijeme Fresnelův zákon upravený pro totální vnitřní odraz. [1] [18]

$$E_z = E_0 \exp\left(\frac{-z}{d}\right) \quad (5)$$

E_z – intenzita evanescentního pole ve vzdálenosti z (A/m)

d – poločas rozpadu (s)

E_0 – intenzita evanescentního pole na rozhraní (A/m)

z – vzdálenost od rozhraní, ve které se měří I_z (m)

Tato metoda slouží ke sledování děje na přisedlé buněčné membráně, ale kvůli vysoké koncentraci fluoroforů ve vzorcích není pomocí ní možné detekovat jednotlivé molekuly. Proto v roce 2005 vznikla nová metoda sledování molekulárních agregací v buněčné plazmatické membráně založená na jednomolekulové fluorescenční mikroskopii, metoda TOCCSL. [19]

2.1.3 FRAP

Metoda FRAP bude v této kapitole popsána poměrně podrobně, protože je to hlavní fluorescenční metoda, ze které vychází metoda TOCCSL. Hlavní rozdíl mezi nimi je, že při metodě FRAP sledujeme mobilitu všech molekul buňky v rámci ROI v reálném čase, ale nesoustředíme se na jednotlivé molekuly jako u metody TOCCSL. Kořeny metody FRAP sahají do sedmdesátých let dvacátého století a od té doby je hojně využívána ve výzkumu biologických struktur, membránové difuze, dynamiky proteinů a jejich interakcí. [20] [21] [9]

FRAP využívá fenoménu photobleachingu, což je v podstatě destrukce fluoroforů a jejich tzv. vypnutí v rámci pozorovaného pole. Takového jevu lze dosáhnout vystavením fluoroformu laserovému paprsku o vysoké intenzitě, následkem toho dojde v jeho chemické struktuře k nevratným změnám, které zapříčiní, že molekula není nadále fluorescentní. K tomu dochází, když elektron ze singletového stavu podstoupí tzv. zakázaný přechod do tripletového stavu, v tomto okamžiku je fluorofor mnohem více reaktivní a reaguje s přítomným kyslíkem. Touto reakcí dojde nejen ke ztrátě fluorescence, ale vznikají i radikály, které mohou ničit buněčné struktury. Photobleaching se objevuje i při klasickém zobrazování fluorescenční mikroskopii a všeobecně se označuje za nežádoucí efekt, protože snižuje intenzitu signálu získaného ze vzorku a může způsobit i jeho poškození. [22] Existují ovšem metody jako FRAP a TOCCSL, které by bez něj nebylo možné provádět.

Pokles intenzity v čase způsobený photobleachingem má exponenciální charakter a lze jej popsat rovnicí 6. Pro dosažení co nejlepšího výsledku je důležitá správná volba fluorescenčního značení. Ideální je takové, které nepodléhá photobleachingu při běžném pozorování, ale jde snadno „vypnout“ při aplikaci vysoké intenzity záření. [20]

$$I(t) = I \cdot e^{-Kt} \quad (6)$$

$I(t)$ – intenzita fluorescence v čase t (N fotonů/s)

I – intenzita fluorescence před photobleachingem (N fotonů/s)

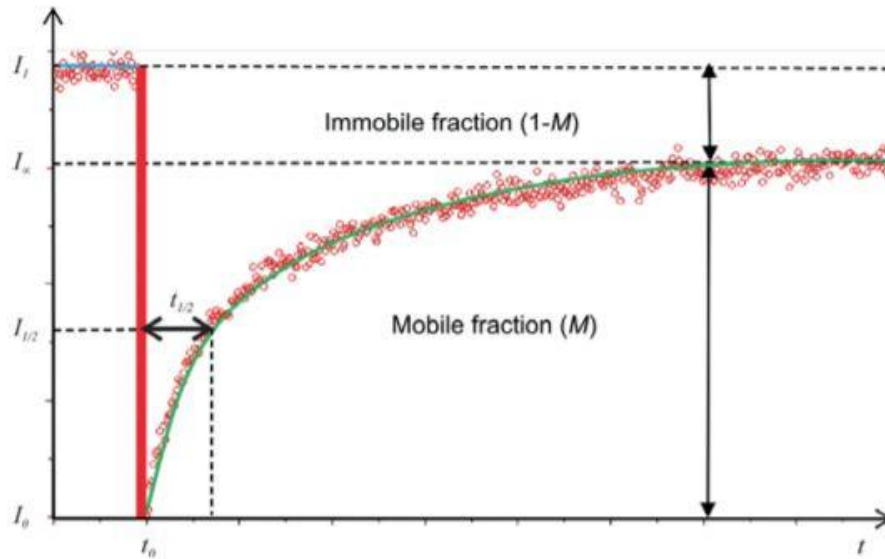
K – míra tzv. bělící konstanty (zahrnuje tok fotonů) (-)

t – čas, ve kterém určíme intenzitu fluorescence (s)

Průběh měření zahrnuje čtyři fáze, které jsou shodné s metodou TOCCSL. Jedná se o fázi před photobleachingem, laserový puls, fáze zotavení a zpracování dat. [22] [23] V první, iniciační fázi je cílem zvolit vhodnou část vzorku, na které bude provedeno měření, ideálně na tmavém pozadí. Zároveň je zvolen ROI, na který bude působeno laserovým paprskem. Důležité je uzpůsobit nastavení zobrazení tak, aby docházelo k co nejmenšímu možnému photobleachingu, který by působil chybu v následných výpočtech. Iniciační fáze slouží také k zaznamenání intenzity fluorescence v ustáleném stavu, která by ve výsledném grafu měla být intenzitou maximální. [20] [22]

Druhým krokem je aplikace laserového paprsku o vysoké intenzitě na vybranou část vzorku. Laserový paprsek může být aplikován na jeden konkrétní ROI, ale je možné vybit fluorofory postupně na více místech rastrováním pomocí zrcadel v případě, že to vyžaduje měření. Vždy by se však mělo jednat jen o malý zlomek povrchu vzorku, aby nedošlo k porušení biologických struktur. Intenzita fluorescence by v tomto bodě měření měla být ideálně nulová. [20] [22]

Třetí fáze je fází zotavovací, kdy nevybité fluorofory z okolí pronikají do části, na kterou byl aplikován laserový puls a tím se zvyšuje intenzita fluorescence na ROI. V této fázi jsou parametry zobrazování nastaveny na stejné hodnoty jako v inicializační fázi. Je zvolen časový krok, po kterém jsou zaznamenávány hodnoty intenzity v pozorované oblasti. Očekávaným výsledkem je logaritmicky rostoucí funkce s postupným zpomalováním růstu hodnot intenzit. Záznam může být ukončen, když se hodnota ustálí kolem konstantní hodnoty a není zaznamenáván žádný další růst. Přibližný očekávaný průběh všech tří fází je znázorněn na obrázku 9.



Obrázek 9: Průběh změn intenzity fluorescence na vzorku měřeném metodou FRAP. [20]

Poslední fází měření je, jako u všech vědeckých metod, zpracování zaznamenaných dat, v tomto případě je možné provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Nejprve je nutné data normalizovat dle pozadí a nastavit nejnižší hodnotu intenzity jako nulovou. Ze získaných dat lze extrahovat míru návratnosti intenzity, detekovat zastoupení mobilní a imobilní frakce a vyčíslit molekulární mobilitu zkoumaného vzorku. V některých případech, kdy jsou přesně definované okrajové podmínky, lze využít pokročilé fitování dat a získat difuzní koeficient a míru chemické výměny ve sledované oblasti a jejím okolí. [20]

Kvalitativní parametry měření, které lze porovnávat mezi vzorky jsou především poločas obnovení intenzity ($t_{1/2}$), ten poskytuje informaci o průměrné rychlosti pohybu molekul ve vzorku a získáme jej z obnovovací křivky intenzity tak jako na obrázku 9. Dalším parametrem je poměr mobilní a imobilní frakce, v obrázku 9 označeny jako M – mobilní fáze a $1-M$ – imobilní fáze. Ty reprezentují počet molekul, které jsou schopny se pohybovat a počty molekul, které jsou pevně vázané na buňku nebo jsou zachyceny jinými strukturami ve vzorku, a to jim pohyb znemožňuje. Mobilní frakci můžeme vypočítat dle vzorce 7. Je nutné mít na paměti, že tento parametr může být silně ovlivněn akvizičními parametry. [20]

$$M = \frac{I_{\infty} - I_0}{I_1 - I_0} \quad (7)$$

M – mobilní frakce (-)

I_{∞} – maximální návratná intenzita fluorescence vzorku ($N \text{ fotonů/s}$)

I_0 – intenzita fluorescence vzorku po photobleachingu ($N \text{ fotonů/s}$)

I_1 – intenzita fluorescence vzorku v iniciační fázi měření (N fotonů/s)

Dalším parametrem, který je možné získat z výsledné křivky intenzit je hloubka propadu, kterou dostaneme výpočtem 8. Ta je důležitá pro kvantitativní analýzu a zdroje uvádí, že by v praxi neměla překračovat hodnotu 80 %. [20]

$$B = \frac{I_1 - I_0}{I_1} \quad (8)$$

B – hloubka propadu (-)

I_0 – intenzita fluorescence vzorku po photobleachingu (N fotonů/s)

I_1 – intenzita fluorescence vzorku v iniciační fázi měření (N fotonů/s)

Pokročilé zpracování dat nám poskytuje informaci o difuzním koeficientu molekul, který vychází ze Stokes-Einsteinovy rovnice 9. Tu lze pro účely metody FRAP upravit do tvaru vzorce 10. [20]

$$D = \frac{kT}{6\Pi_0\eta R} \quad (9)$$

D – difuzní koeficient (m^2/s)

k – Boltzmannova konstanta (J/K)

T – termodynamická teplota (K)

η – viskozita (m^2/s)

Π_0 – hustota⁻¹ (m^3/kg)

R – hydrodynamický poloměr (m)

$$D = \frac{w^2}{4\tau_D} \quad (10)$$

w – poloměr oblasti aplikace laseru (m)

τ_D – charakteristická časová konstanta extrahovaná z matematického fitování dat (s)

2.1.4 Gangliosidy

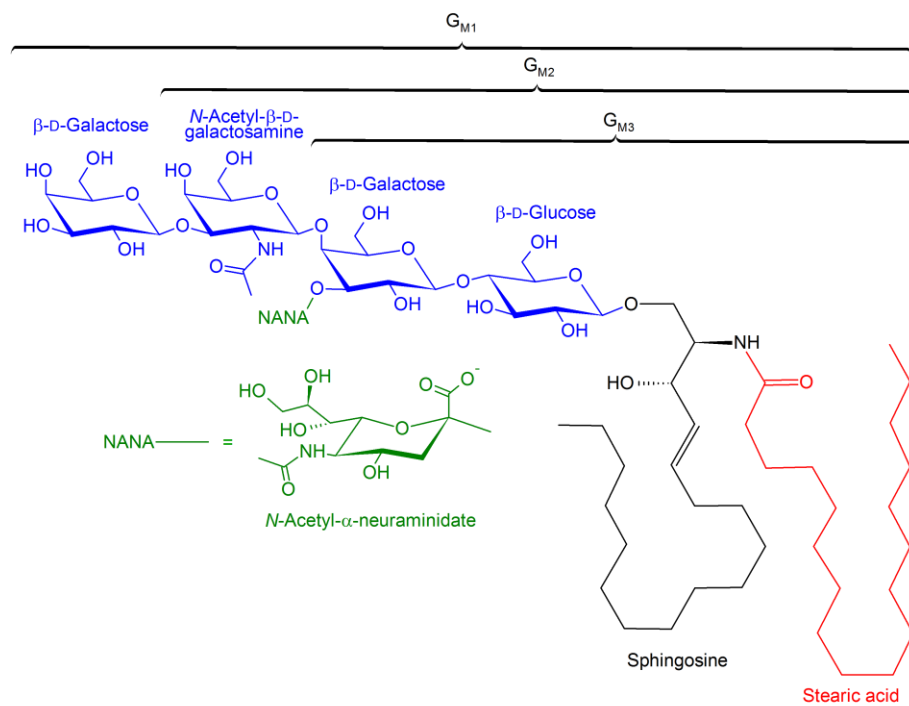
Název gangliosid byl poprvé použit na začátku roku 1939 Ernestem Klenkem, německým chemikem, nicméně první galglisidová struktura byla popsána až v roce 1963 po objevení sfingosinu a kyseliny sialové. [24] Gangliosidy jsou glykosfingolipidy skládající se z ceramidových bází a oligosacharidů, které mají jednu nebo více molekul kyseliny sialové, což způsobuje silně amfifilní charakter těchto molekul. [25] [26] Kyselina sialová zajišťuje, že gangliosidy mají v neutrálním pH vždy záporný náboj na rozdíl od ostatních glykosfingolipidů, čímž mohou lokálně měnit i náboj na buněčné membráně. Jedná se o látky vyskytující se ve všech tkáních lidského těla a to především

v buněčné membráně. [27] Byly však popsány i gangliosidy nacházející se v jádře buňky či mitochondriích. Jejich zastoupení je však minoritní v porovnání s ostatními skladebními prvky buňky. Nejvyšší koncentrace gangliosidů v lidském těle je v nervových buňkách, především pak v mozku, kde dosahuje 10-12 % celkového obsahu lipidů v nervové tkáni. Zde stabilizují a podporují tvorbu synapsí, čímž mají nepřímo vliv na paměť. [24]

Gangliosidy se dělí dle stavby a to především podle počtu tetrasacharidových řetězců, pozice a počtu molekul kyseliny sialové. Pro označení gangliosidů se využívá nomenklatury podle Svennerholma, kde se na prvním místě nachází písmeno G, následně druhé písmeno podle počtu sialových kyselin (M, D, T, Q) a číslo, které je definováno počtem neutrálních sacharidových řetězců (1, 2). Jako poslední se u některých gangliosidů uvádí izomerická pozice kyseliny sialové označovaná a, b. Tato pravidla dávají vzniknout názvům jako GM1, GD1a, GT2b a jiné. Doposud bylo popsáno více než 200 různých gangliosidů lišících se strukturou oligosacharidu a uhlovodíkovým řetězcem kyseliny. S největší pravděpodobností se nejedná o konečný počet druhů těchto glykosfingolipidů. [24] [25] [28]

Díky jedinečné struktuře mají gangliosidy silnou tendenci se shlukovat v roztocích a na buněčných membránách, kde mohou tvořit nanoskopická seskupení, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí několika jednotek až stovek nanometrů. Gangliosidy mají velkou schopnost reagovat s ostatními molekulami na buněčné membráně, případně s molekulami v extracelulárním prostoru v blízkém okolí buňky. Tato vlastnost umožňuje jejich využití jako receptorů pro různé druhy virů a toxinů, například pro adenovirus nebo cholera toxin. Mohou také interagovat s transmembránovými proteiny nebo regulovat aktivitu ostatních receptorů. [29]

Jak již bylo zmíněno, existuje mnoho dnes již známých druhů gangliosidů. Na základě konzultace jsem pro svá měření zvolila dva typy gangliosidů a to více komplexní typ GM1 a jednodušší GM3. Jejich struktury jsou zobrazeny na obrázku 10. První z mnou zkoumaných gangliosidů, GM1, se nachází především v mozkové tkáni a tvoří tak jeden ze čtyř nejčastějších gangliosidů vyskytujících se v lidské mozkové tkáni. GM3 je rozšířen hlavně v periferních oblastech nervové soustavy savců, u člověka se poté vyskytuje jako majoritní gangliosid především v srdci, kosterním svalstvu, ledvinách, játrech a kožní tkáni. [24] V průběhu vývoje se poměry gangliosidů v lidském těle mění a zatímco v dětství je vyšší procento zastoupení komplexnějších gangliosidů, časem ustupují a zvyšuje se podíl gangliosidů s jednoduššími strukturami. Tyto změny v rámci buněk jsou velmi významné a mají vysokou strukturální variabilitu v průběhu stárnutí či při nemoci, což poukazuje na jejich významnou roli ve fyziologické funkci lidských buněk. Porušení gangliosidových interakcí se pojí se vznikem závažných nervových onemocnění, jako například Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. [30]



Obrázek 10: Struktury gangliosidů GM1, GM2 a GM3 a rozdíly mezi nimi. [31]

3 Cíle práce

Tato práce se zaměřuje na novou metodiku fluorescenční mikroskopie, díky které je možné sledovat pohyb jednotlivých molekul. Metody umožňující takové zobrazování existují již poměrně dlouhou dobu, nicméně metoda TOCCSL vnáší do oboru nové možnosti pozorování pohybu jednotlivých molekul v reálném čase, což doposud možné nebylo.

Hlavním cílem této práce je vytvořit měřicí protokol, pomocí kterého bude možné pod fluorescenčním mikroskopem metodou TOCCSL určit počet molekul, které se segregují na fosfolipidových dvojvrstvách do nanoskopických útvarů známých jako lipidové nanodomény (zkráceně jen nanodomény). Dle vytvořeného protokolu zaznamenat výsledky pro dva typy gangliosidů na podpůrných vrstvách o třech různých složeních. Protokol se skládá ze tří částí, stejně jako postup získávání dat. V první části je nutné vytvořit měřené vzorky, ve druhé části bude vysvětleno, jak pořídit záznam obrazu pomocí fluorescenčního mikroskopu a ve třetí části budou uvedeny jednotlivé kroky ve zpracování dat.

Díličí cíle této práce jsou upravit fotografie z fluorescenčního mikroskopu pomocí algoritmu v prostředí Matlab, statisticky zpracovat získaná data a pomocí této analýzy určit, jak se od sebe velikostně liší klastry v různých vzorcích. Výsledky budou ověřeny metodou FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) a porovnány s daty, které na Akademii věd již naměřili pomocí metody FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a budou diskutovány případné rozdíly ve velikostech klastrů jednotlivých vzorků.

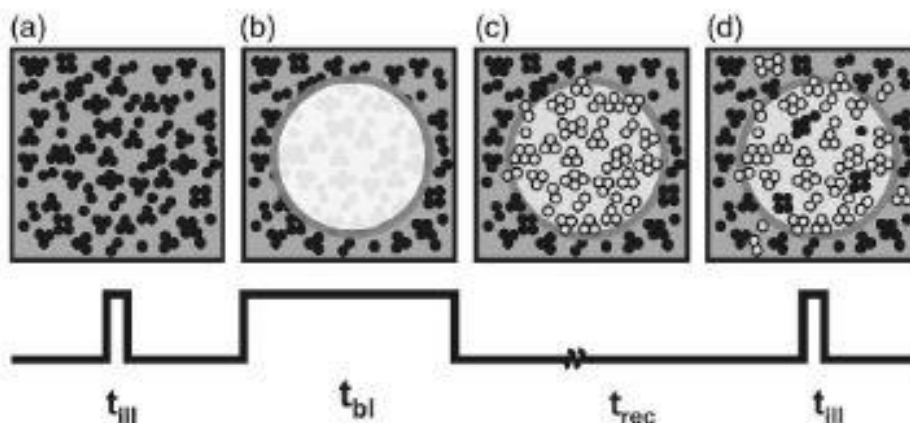
4 Metody

V této kapitole jsou popsány všechny postupy a metody, které byly použity pro získání dat a jejich zpracování. Hlavním cílem práce bylo vytvořit a optimalizovat měřicí protokol, který se skládá z několika částí, popsaných níže. Jak již bylo zmíněno v úvodu, má práce svou medicínsky a technicky zaměřenou část. I v jejím zpracování je možné tyto sekce oddělit a to na práci v biochemické laboratoři, která reprezentuje medicínskou případně klinickou část problému, a na práci v laboratoři zaměřené na fluorescenční mikroskopii, na kterou navazuje zpracování dat v prostředí Matlab. Druhé dvě zmíněné sekce zastupují technickou část problematiky. Toto rozdělení zmiňuji i z toho důvodu, že měřicí protokol je rozdělen právě na tři podkapitoly. Každá z nich obsahuje popis konkrétního postupu řešení dané problematiky.

Kromě tvorby měřicího protokolu v této kapitole popisují také použité přístroje, postup získání, zpracování a analýzy dat a zaměřuji se na řešení problémů, na které jsem v průběhu vypracování narazila. Chtěla bych se zde zaměřit na bližší popsání kroků měřicího protokolu, které nebylo možné do něj zahrnout, případně vysvětlit části postupu, které mohou být nejasné z důvodu velké komplexnosti a širokého záběru práce.

4.1 TOCCSL

Cílem metody je stanovit stechiometrii lipových/proteinových klastrů vzniklých na fosfolipidové dvojvrstvě. Protože hustota lipidů/proteinů na membráně je příliš vysoká a při běžném zobrazení není možné překrývající se molekuly identifikovat, byla vynalezena nová metoda TOCCSL, která je založená na ozáření části vzorku laserem o vysokém výkonu, jehož paprsek deaktivuje fluorofory v dané oblasti. Díky Brownově pohybu fluorescentní molekuly z okolí pronikají do vyzářené oblasti a v určitém časovém úseku po laserovém pulzu je možné jednotlivé fluorescentní molekuly rozeznat a dle jejich intenzity záření určit z kolika podjednotek se skládají. Proces TOCCSL je znázorněn na obrázku 11. [19]



Obrázek 11: Model TOCCSL metody. Horní řádek zobrazuje vzorek viditelný skrze mikroskop a dolní řádek časový průběh všech fází metody. V části a je část vzorku před aplikování laserového pulzu, kde je možné pozorovat vzorek s vysokou hustotou molekul na membráně. V části b je aplikován laserový pulz. V části c jsou patrné deaktivované fluorofory a vzorku je ponechán zotavovací čas, kdy nezasažené fluorofory z okolí pronikají zpět do vzorku. V poslední části d je možné od sebe rozeznat jednotlivé difundované molekuly a v tu chvíli je možné molekuly spočítat a určit jejich velikost. [19]

Celý popsaný postup se v podstatě shoduje s metodou FRAP, rozdílem je počet molekul v pozorovaném poli. U metody TOCCSL je možné rozlišit jednotlivé molekuly a následně počítat intenzitu vyzařované fluorescence pro každý zobrazovaný bod. Míra intenzity nám poskytuje informaci o velikosti konkrétní sledované molekuly. Abychom byli schopni tuto velikost určit, je potřeba nejprve stanovit intenzitu záření, která odpovídá monomeru, tzn. jedné reaktivní molekule. Této intenzity lze dosáhnout přípravou speciálního vzorku, ve kterém očekáváme pouze monomery, opakovaným aplikováním laserového paprsku na jednu oblast vzorku, či dlouhým působením laserového paprsku. Ani jedna z těchto tří metod však není stoprocentní a proto je důležité provést měření vícekrát, aby bylo možné určit nejlepší výsledek. Z tohoto důvodu je důležité stanovit přesnou sekvenci měření a stanovit a optimalizovat délku jednotlivých fází měření. Je také důležité mít na paměti, že photobleaching je žádoucí ve fázi vybíjení fluoroforů, ale je cílem se mu co nejvíce vyhnout u fáze následného zaznamenávání obrazu, aby uměle nesnižoval intenzitu klastrů a tím nezaváděl chybu do finálního zpracování dat.

Pro metodu TOCCSL existuje i verze s využitím dvou laserů různé vlnové délky pro přesnější detekci emitorů, tedy zda se v případě výskytu více fotonů jedná o jednu molekulu s více podjednotkami, či o větší počet molekul s jednou podjednotkou. Na základě tohoto rozšíření byla v roce 2018 dokončena část výzkumu rozpoznávání antigenů T-lymfocyty. [32] Nicméně toto rozšíření metody se v průběhu vypracování této práce využívat nebude, proto je zde zmíněno jen okrajově.

4.2 Měřící protokol

Pro přípravu protokolu (Příloha A) bylo nejprve nutné se seznámit s teorií problematiky, v mém případě se jednalo o samostudium materiálů a z velké části hlavně o konzultace s kolegy z Heyrovského ústavu Akademie věd. Protokol se skládá ze tří hlavních částí, které jsou doplněny o úkony ne přímo svázané s touto konkrétní tematikou, ale bez nichž by nebylo možné práci dokončit.

4.2.1 Příprava vzorků

Protože metoda TOCCSL byla v této práci použita poprvé pro pozorování gangliosidů, bylo nasnadě použít jiná měření pro kontrolu výsledků. Po konzultaci s odborníky na gangliosidy jsem se rozhodla využít jako referenční měření metodu FRET, která se pro měření nanodomén v membránách vesikul používá na Akademii věd v současné době již několik let. [33] Z tohoto zdroje jsem proto čerpala i složení a koncentrace vzorků, u kterých probíhala měření. Přehledy těchto údajů jsou v Tabulkách Tabulka 1, Tabulka 2 a Tabulka 3. Původ všech lipidů a dalších chemikálií využitých při vypracování zadání této diplomové práce je zaznamenán v tabulce 4.

Tabulka 1: Složení a procentuální koncentrace lipidů a gangliosidů v konkrétních měřených vzorcích na celkový objem vzorku 400 μ l a celkovou 1mM koncentraci lipidů.

| č. vzorku | Procentuální zastoupení látky (%) | | | | |
|-----------|-----------------------------------|------|-----|--------|--------|
| | DOPC | Chol | Sph | NatGM1 | NatGM3 |
| 1 | 100 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 2 | 100 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 3 | 75 | 25 | 0 | 4 | 0 |
| 4 | 65 | 25 | 10 | 4 | 0 |
| 5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 7 | 75 | 25 | 0 | 0 | 4 |
| 8 | 65 | 25 | 10 | 0 | 4 |

Tabulka 2: Koncentrace poskytnutých roztoků jednotlivých lipidů a gangliosidů

| Látka | Koncentrace (mM) |
|--------|------------------|
| DOPC | 10 |
| Chol | 6,465 |
| Sph | 1 |
| NatGM1 | 1 |
| NatGM3 | 0,756 |
| nGM1g | 0,025 |
| pGM3g | 0,025 |

Tabulka 3: Konkrétní spočítané objemy lipidů a gangliosidů v měřených vzorcích na celkový objem vzorku 400 μ l a celkovou 1mM koncentraci lipidů.

| č. vzorku | Objem látky ve vzorku (μ l) | | | | | | |
|-----------|----------------------------------|------|-----|--------|--------|-------|-------|
| | DOPC | Chol | Sph | NatGM1 | NatGM3 | nGM1g | pGM3g |
| 1 | 40 | 0 | 0 | 16 | 0 | 1,6 | 0 |
| 2 | 40 | 0 | 0 | 16 | 0 | 16 | 0 |
| 3 | 30 | 15,5 | 0 | 16 | 0 | 16 | 0 |
| 4 | 26 | 15,5 | 40 | 16 | 0 | 16 | 0 |
| 5 | 40 | 0 | 0 | 0 | 21,2 | 0 | 1,6 |
| 6 | 40 | 0 | 0 | 0 | 21,2 | 0 | 16 |
| 7 | 30 | 15,5 | 0 | 0 | 21,2 | 0 | 16 |
| 8 | 26 | 15,5 | 40 | 0 | 21,2 | 0 | 16 |

Tabulka 4: Specifikace původu chemikálií

| Typ | Název | Původ |
|----------------------------|--------------|-------------------------------------|
| Organické pufovací činidlo | HEPES | Sigma Aldrich |
| Anorganická sloučenina | NaCl | Sigma Aldrich |
| Lipid | DOPC | Avanti Lipids |
| Lipid | Cholesterol | Avanti Lipids |
| Lipid | Sfingomyelin | Avanti Lipids |
| Gangliosid | NatGM1 | Vlastní syntéza, Dr. Ilya Mikhaylov |
| Gangliosid | NatGM3 | Vlastní syntéza, Dr. Ilya Mikhaylov |
| Gangliosid | nGM1g | Vlastní syntéza, Dr. Ilya Mikhaylov |
| Gangliosid | pGM3g | Vlastní syntéza, Dr. Ilya Mikhaylov |

Z popisu metody v teoretickém úvodu této práce vyplývá, že je nezbytné získat hodnoty intenzity monomeru a poté hodnoty pro vzorek obsahující klastry různé velikosti. Je několik způsobů, jak hodnoty pro monomer naměřit. Já jsem zvolila metodu, kdy si vyberu vzorek, u kterého očekávám nejmenší klastry a zároveň tedy očekávám největší počet monomerů a u tohoto vzorku snížím koncentraci značeného gangliosidu, abych měla větší pravděpodobnost, že každá doména bude obsahovat pouze jednu jeho molekulu. Dalšími možnostmi je tento postup opakovat u všech vzorků a pro každý vzorek mít tedy jiné hodnoty monomeru, nebo například zvolit vyšší počet opakování vysokoenergetického laserového pulzu do té doby, dokud zkoumaná oblast nebude obsahovat pouze monomery.

Pro mnou zvolenou metodu je nutné pro každý gangliosid vytvořit dva typy vzorků. První typ, který bude s co největší pravděpodobností obsahovat pouze monomery a druhý typ, který bude charakterizovat konkrétní vzorek a jeho tvorbu klastrů. Pro

vzorky zastupující monomery jsem volila koncentraci značeného gangliosidu ku lipidům 1:10 000. Pro vzorky, které měly reprezentovat koncentraci klastrů, jsem poté použila koncentraci stejných látek 1:1000. Volba této koncentrace byla založená na tom, aby bylo možné pod mikroskopem sledovat jednotlivé molekuly (nesměla být příliš vysoká, aby se nepřekrývaly) a na druhou stranu, aby bylo ještě možné detekovat dostatečné množství molekul pro kvalitní statistiku.

Mimo jiné mi pro určení těchto koncentrací sloužila rovnice (11), který nám říká, kolik molekul značeného gangliosidu se bude při jeho dané koncentraci vyskytovat v každé lipidové doméně. Při výpočtu zohledňujeme velikost domény, velikost molekuly gangliosidu a skutečnost, že se gangliosid může vyskytovat ve dvou lipidových vrstvách. Také uvažujeme, že domény zabírají cca 51 % plochy a gangliosidy mají tendenci se shlukovat do domén. [34]

$$N_G = \frac{R_D^2 \cdot \Pi}{a_0} \cdot \frac{4}{c_G} \quad (11)$$

N_G – počet gangliosidů v jedné nanodoméně (-)

R_D – velikost jedné domény (nm)

a_0 – plocha gangliosidu (nm²)

c_G – poměrná koncentrace gangliosidů ku lipidům (-)

Π – Ludolfovo číslo (-)

Po dosazení do vztahu pro koncentraci 1:1000, vychází na každou doménu 6000 neznačených a 150 značených gangliosidů, což by znamenalo, že je možné označit klastr o velikosti 150 molekul, to je dostatečná koncentrace pro požadované měření. Zároveň taková koncentrace umožňovala při měření detekci jednotlivých klastrů. Analogicky bylo postupováno u více zředěných vzorků.

Po vytvoření vzorku dle návodu dojde k tvorbě malých unilamelárních vezikul (SUV), jejichž složení lipidové dvojvrstvy je definováno složením vzorku. Takto připravené vezikuly je možné uskladnit v lednici po dobu cca jednoho týdne. Před měřením je potřeba z vezikul vytvořit lipidovou vrstvu na povrchu krycího sklíčka testovací komůrky. Postup pro tvorbu této vrstvy je taktéž uveden v protokolu. Protože je při měření využito metody TIRF je důležité vytvořit homogenní vrstvu bez trhlin a jiných artefaktů, ty by mohly mít za následek neschopnost detekovat molekuly a klastry v oblasti zájmu.

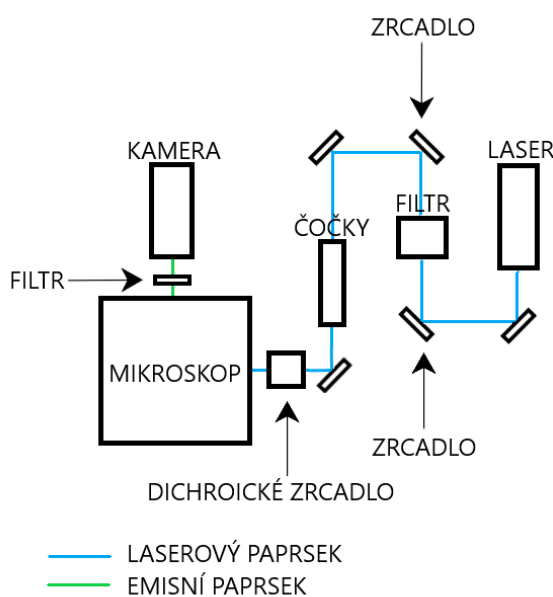
Jednotlivé kroky přípravy vzorků jsou popsány v protokolu, proto není třeba je rozepisovat v této kapitole. V průběhu práce v laboratoři jsem narazila pouze na jeden problém, a tím bylo použití plastových mikrozkuhavek při umístění vzorku do vakua.

V tomto případě jsem již nebyla schopna oddělit lipidy od stěny zkuševky a proto je i v protokolu zvýrazněno použití skleněných zkuševky v této části přípravy. Všechny vezikuly byly připraveny dvakrát a výsledky jsou složeny z měření z obou připravených vzorků. Výsledky dvou totožných kompozic vůči sobě byly porovnány, aby bylo jisté, že při přípravě lipidů, kdy se manipuluje s objemy v jednotkách mikrolitrů, nedošlo k žádné chybě.

4.2.2 Záznam dat metodou TOCCSL

Pro záznam dat byla využita aparatura skládající se z laseru, soustavy zrcadel, které odráží laserový paprsek do pásmového filtru viditelného světla. Požadovaná část paprsku je dále odrazena další soustavou zrcadel do soustavy čoček, které fokusují paprsek procházející clonou až na první dichroické zrcadlo mikroskopu. Účelem celého tohoto procesu je dostat co nejsymetrickější a nejfokusovanější paprsek, jehož kolmý průmět bude mít Gaussovské rozdělení. Tyto vlastnosti paprsku jsou klíčové pro správnou excitaci vzorku a co nejvyšší ostrost výsledného obrazu.

Po vstupu paprsku do mikroskopu je vnitřními zrcadly odražen na první dichroické zrcadlo a dále do objektivu, kterým prochází do vzorku, jehož fluorofory excituje. Emitované záření ze vzorku prochází skrz objektiv a první dichroické zrcadlo a dopadá na druhé, emisní dichroické zrcadlo, které jej odráží skrze optický filtr na detektor digitální kamery s možností velmi vysoké snímkovací frekvence. Obraz z kamery je následně převeden do počítače, zobrazen na monitoru a sekvence obrazů nastavená uživatelem je uložena jako soubor vybraného formátu. Schéma uspořádání aparatury je na obrázku 12. Konkrétní přístroje využitě při záznamu dat jsou uvedeny v tabulce 5.

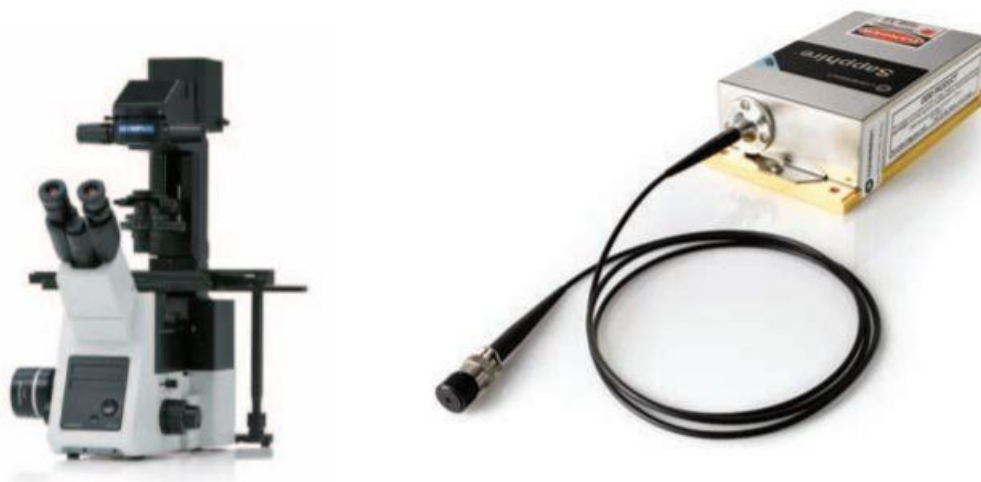


Obrázek 12: Schéma měřicí aparatury využívané pro záznam dat (autorský obrázek)

Tabulka 5: Konkrétní informace o přístrojích využitých při vypracování DP

| přístroj | název | výrobce | země původu |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------|----------------|
| Generátor excitačního paprsku (laser) | Sapphire 488 FP | COHERENT | USA |
| Intenzitní filtr | AOTF _n C-400.650-TN | AA OPTO-ELECTRONIC | Francie |
| Mikroskop | IX73 | OLYMPUS | Japonsko |
| Detektorový filtr | OptoSplit II | Cairn Research Ltd | Velká Británie |
| Kamera | iXon Ultra 897 Andor | Oxford Instruments | Velká Británie |

Kromě stolního počítače, kde probíhala úprava parametrů měření a zpracování dat, byly tyto části aparatury nejdůležitějšími technickými prvky. Laser a mikroskop, využitě pro záznam, jsou vyobrazeny na obrázku 13.



Obrázek 13: Mikroskop a laser využitě při vypracování zadání diplomové práce [35] [36]

Kromě hardwarové části aparatury je nutné nastavit také softwarovou, která se skládá především z programu Micro-Manager, kterým je možné ovládat kameru s vysokou snímkovací frekvencí a z programu LabVIEW, ve kterém nastavujeme sekvence a parametry měření. Postup práce s oběma programy je popsán v protokolu, a proto zde nebude detailně rozebrán. Zaměřím se na skladbu měřící sekvence, která vznikla mnohonásobným opakováním měření a práce s konkrétními vzorky. Je nutné mít na paměti, že toto nastavení je silně závislé na typu vzorku, především

fluorescentního barviva, nastavení parametrů laseru a dalších mnoha skutečnostech. Sekvence měření se skládá z několika parametrů. Jedná se o počet opakování sekvencí, intenzitu a délku hlavního laserového pulzu, zotavovací čas, počet kontrolních obrázků (záznam před začátkem sekvence), pauzu mezi sekvencemi, počet obrázků po hlavním pulzu, čas expozice, pauzu mezi dvěma obrázky a intenzitu excitačního paprsku. Všechny tyto parametry bylo nutné přizpůsobit tak, abych dostala co nejlepší výsledek, co se týče rozpoznatelnosti jednotlivých molekul. Zároveň jsem se ale snažila docílit co nejvyššího počtu tzv. událostí, což jsou v podstatě světlé body v záznamu obrazu, které reprezentují přítomné klastry. Příliš nízký počet klastrů by nestačil pro statistické zpracování, zatímco příliš vysoký počet by zvyšoval riziko překrývání a tím zkreslování velikostí výsledných klastrů. Aby bylo možné tvrdit, že naměřená data jsou průkazná, je potřeba mít alespoň 200 klastrů v jednom měření. Tato hodnota byla určena jako hraniční na základě konzultace s autorem metody. Finální nastavení parametrů bylo shodné pro všechny měřené vzorky a je zaznamenáno v tabulce 6.

Tabulka 6: Hodnoty parametrů měřící sekvence

| Parametr | Hodnota | Jednotka |
|------------------------------|---------|----------|
| Počet opakování | 30 | - |
| Intenzita pulzu | 9 | V |
| Délka pulzu | 500 | ms |
| Zotavovací čas | 2000 | ms |
| Počet kontrolních obrázků | 1 | - |
| Pauza mezi sekvencemi | 0 | ms |
| Počet obrázků | 20 | - |
| Čas expozice | 10 | ms |
| Pauza mezi expozicemi | 20 | ms |
| Intenzita excitačního záření | 2,5 | V |

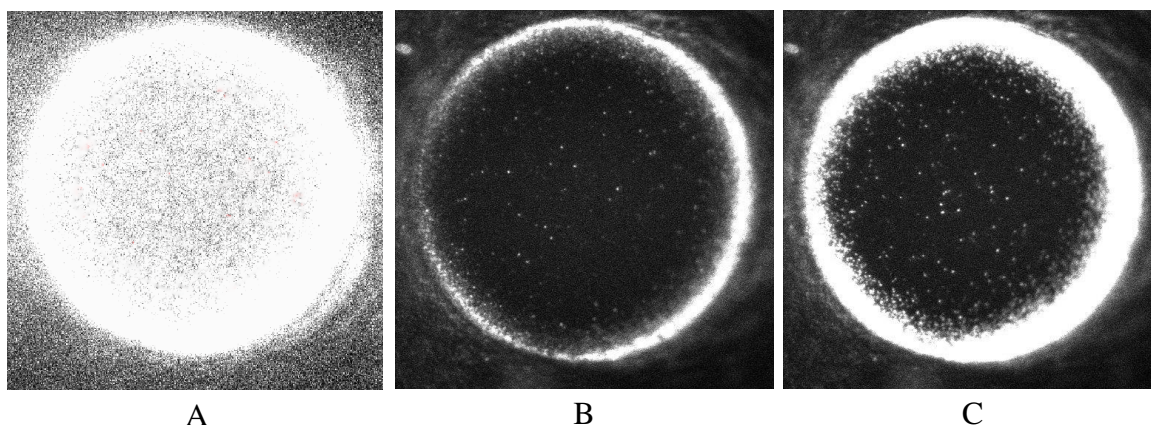
Po zapnutí a nastavení všech elektronických zařízení dle protokolu je důležité vhodně umístit vzorek nad objektiv mikroskopu. Pro tuto práci bylo využíváno čtyřmístných komůrek, aby bylo možné měřit více vzorků bez rizika kontaminace podkladového sklíčka, objektivu či imerzního oleje. Po aplikaci imerzního oleje na objektiv a umístění vzorku na nosič je důležité přiblížit objektiv dostatečně blízko ke krycímu sklíčku tak, aby mezi nimi nebyl žádný vzduch, pouze imerzní olej. Následně se pomocí šroubů na zrcadle vycentruje laserový paprsek tak, aby procházel vzorkem

kolmo na podkladové skličko. Úspěšné splnění tohoto kroku je možné překontrolovat na stropě místnosti, kde by se měl objevit souměrný Airyho disk. V případě, že je odraz paprsku neostrý či nesouměrný, je nutné vyčistit objektiv, případně upravit postavení čoček. Neostrý paprsek by mohl negativně ovlivnit kvalitu obrazu, což při zobrazování jednotlivých molekul může znamenat velké problémy.

Dalším krokem je zaostření vzorku. Nejprve je nutné pomocí makroskopického zaostřovacího šroubu najít správnou pozici, ve které je jednoznačně definovatelné osvětlené kruhové pole a následně pomocí mikroskopického šroubu dosáhnout co nejvyšší ostroty vzorku. Po zaostření struktur je nutné se upravit na pozici paprsku do takového stavu, kdy dojde k vytvoření evanescentní vlny, jako je popsáno v kapitole o metodě TIRF. Paprsek musí být v kritickém úhlu, tedy přibližně 90° od výchozí pozice, pro lepší orientaci je možné sledovat jeho pohyb na stěně komůrky, ve které je umístěn vzorek. Dalším ukazatelem správné pozice může být aktuální hodnota intenzity obrazu, všeobecně platí, že v bodě nejvyšší intenzity záření je paprsek ve správné poloze, to je způsobeno zaostřením na jednu konkrétní tenkou vrstvu, tudíž zaostření na konkrétní molekuly a zachycení většiny fotonů, které emitují, na rozdíl od záznamu odraženého a zkresleného a rozptýleného záření.

V případě, že všechny popsané kroky byly provedeny správně, mělo by být v obraze vzorku snadno detekovatelné, kde se jednotlivé klastry nachází. Jedná se o světlé body o vyšší intenzitě záření, než je na pozadí vzorku. Ukázka takové situace je na obrázku 14 případ A. Po dokončení fokusace je čas přistoupit k zaznamenání celé sekvence. Konkrétní postup pomocí softwaru je opět zaznamenán v protokolu. V průběhu sekvence je nutné obraz sledovat, a pokud dojde ke zhoršení jeho kvality, sekvenci zastavit a upravit obraz zpět do původní kvality. Mikroskop se nachází na optickém stole, a proto by teoreticky k těmto jevům nemělo docházet. Protože se ale jedná o zaostření na velmi specifickou tloušťku vzorku (do 100 nm), je možné, že i přes opatření dojde ke snížení ostroty obrazu. V průběhu sekvence dojde k vybití fluoroforů v pozorované oblasti vzorku a k jejich následnému pronikání z okolí zpět do části, na kterou byl aplikován laser. Všechny tři stavy, které by se měly v průběhu měření vyskytovat, jsou vyobrazeny na obrázku 14. Pro úspěšnost měření je nezbytné, aby všechny parametry zůstávaly stejné po celou dobu měření a aby bylo celkově dosaženo co největší homogenity veškerých úkonů v rámci záznamu dat z jednotlivých vzorků.

Po ukončení měření je důležité vrátit světelný paprsek do původní polohy, odstranit vzorek z nosiče a ořídit objektiv speciálním čistícím papírovým ubrouskem napuštěným etanolem. Pro kontrolu čistoty objektivu opět může sloužit ostrost odrazu paprsku na stropě místnosti. Po použití je také nutné vypnout všechna elektronická zařízení, postup je zaznamenán v protokolu.

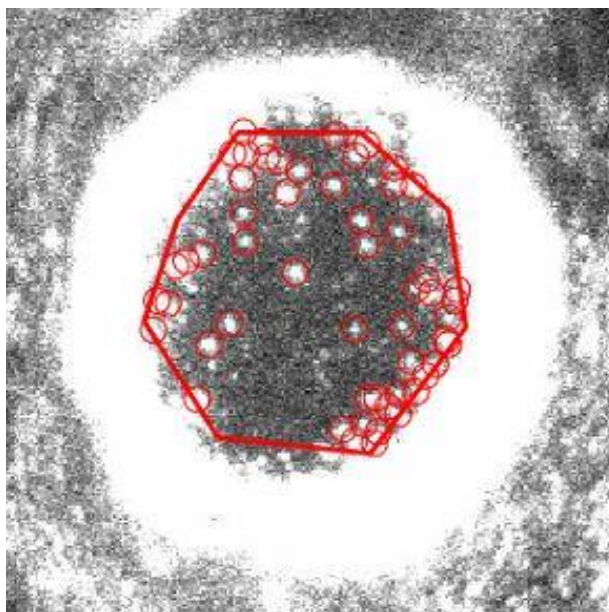


Obrázek 14: Ukázka obrazu pod mikroskopem. A – obraz před photobleachingem. B – obraz po photobleachingu. C – obraz po uběhnutí zotavovacího času. (autorský obrázek)

4.2.3 Zpracování a analýza dat

Nejprve je v této podkapitole nutné zmínit, že nejsem autorkou kódů určených pro zpracování dat, proto také nejsou přiloženy k této diplomové práci. Jedná se o značně pokročilé programování, které mimo jiné zahrnuje trekování molekul a další složité mechanismy, na jejichž naprogramování je potřebná vysoce pokročilá znalost. Části zpracování, které jsou zde popsány, jsem konzultovala s autory kódů a mohu tedy popsat jejich základní funkci, nicméně pokud by byla vyžadována hlubší znalost konkrétních postupů, je nutné kontaktovat přímo autory.

Data zaznamenaná pomocí měření metodou TOCCSL je nutné zpracovat tak, aby výsledky co nejlépe odpovídaly realitě. V prvním kroku zpracování je nutné upravit formát dat. Protože software uložil data jako jeden soubor s příponou .tiff (Tagged Image File Format), což je přípona využívaná pro soubory rastrové grafiky, je nutné tento jeden soubor rozdělit na konkrétní počet obrázků, který se v něm nachází. V průběhu zpracování je poté krok, ve kterém volíme naši oblast zájmu, tedy ROI. Ta se volí pomocí myši, kde v podstatě obkreslíme vnitřní stranu světlého kruhu tak, abychom obsáhli co nejvíce klastrů uvnitř zkoumané oblasti, ale abychom nezanášeli chybu do zpracování zářením z oblasti, na kterou nebyl aplikován laserový puls. Příklad takového výběru je na obrázku 15.



Obrázek 15: Ukázka definování oblasti zájmu při zpracování dat. (autorský obrázek)

Dalším krokem je stanovení parametrů zaznamenaných signálů s omezenou difrakcí pro každou jednu molekulu ve všech obrázcích zpracovávané sekvence. Tento krok je z celého zpracování dat tím nejvíce výpočetně náročným a může trvat i poměrně dlouhou dobu v závislosti na výkonnosti počítače využitého pro zpracování dat. Na začátku stanovení parametrů je nutné zvolit typ kamery a typ dat, která jsou k dispozici. V tomto případě tedy single-TIFF Andor, protože jsou data rozdělena z předchozího kroku do jednotlivých souborů s příponou .tiff a záznam byl proveden pomocí kamery iXon Ultra Andor. Dále je potřeba zvolit typ obrazu, kde je v tomto případě postačující „1 color“, protože využíváme pouze jednoho laseru a tím pádem je zaznamenáno emitované záření jen o jedné vlnové délce. Jako poslední se volí místo uložení finálního souboru.

Následně je důležité zamyslet se nad skutečnými ději na membráně a uvědomit si, že v průběhu měření dochází k výraznému pohybu molekul. Protože gangliosidy jsou obsaženy v obou vrstvách lipidové membrány a v obou se také pohybují, může dojít k několika situacím, které způsobí zkreslení velikosti klastrů. Jedná se o překryv dvou klastrů na jedné membránové vrstvě, překryv dvou klastrů, přičemž každý se vyskytuje v jiné vrstvě membrány a dále přiblížení klastrů na takovou vzdálenost, že není možné rozeznat, zda se jedná o jeden či více klastrů. Takové události se dají vyřadit statisticky, ale stále může docházet k poměrně výrazné chybě. Proto další část zpracování dat sleduje jednotlivé klastry a jejich pohyb. Protože překryv dvou a více klastrů v jednom momentu nastane s poměrně vysokou pravděpodobností, na rozdíl od překryvu v čase, kde by se klastry musely po určitou dobu pohybovat stejným směrem a nevzdalovat se od sebe, což už je mnohem méně pravděpodobný jev. Software je schopen detekovat, kudy se klastr pohybuje v čase a pokud se výrazně změní jeho intenzita při přiblížení

k jinému klastru, je tato hodnota vyloučena. V této části zpracování dat jsou také odstraněny všechny imobilní části vzorku. Pokud je některá z oblastí emitujících záření imobilní, je vysoce pravděpodobné, že se jedná o nechtěný artefakt a proto je bezpečnější takový objekt vyřadit z analýzy. Takto upravená data pochází z celé sekvence a jsou rozdělena do složek podle počtu obrázků v jedné sekvenci. To znamená, že každé kolo sekvence poskytne jeden záznam a tedy finální výsledky pro každý soubor jsou složeny v případě této práce z 30 fotografií.

Pro statistické zpracování výsledků se využívá hustota pravděpodobnosti počtu fotonů emitovaného molekulou s jednou fluorescentní podjednotkou. Hustota pravděpodobnosti je nezáporná reálná funkce, pod jejíž křivkou se nachází plocha definující pravděpodobnost výskytu spojité náhodné veličiny v daném intervalu. Můžeme ji vyjádřit rovnicí 12. V případě, že budeme uvažovat celý interval hustoty pravděpodobnosti, musí se jeho integrál rovnat jedné, protože všechny hodnoty náhodné veličiny leží se 100% pravděpodobností v tomto intervalu. [37]

$$\int_A^B p(x)dx = P \quad (12)$$

B – horní hranice intervalu

A – dolní hranice intervalu

$p(x)$ – hustota pravděpodobnosti

P – pravděpodobnost

V konkrétním případě zpracování dat získaných metodou TOCCSL, pokud zintegrujeme danou hustotu pravděpodobnosti, dostaneme pravděpodobnost, s jakou měření intenzity odhalí počet detekovaných fotonů ve zkoumaném intervalu. Za pomoci konvoluce dostaneme rozložení intenzity nezávislých emitůrů nacházejících se v oblasti pozorování. Z odpovídajícího intenzitního rozložení a počtu emitůrů je následně vytvořen histogram, který podává informaci o zastoupení molekul s různým počtem podjednotek v dané konkrétní oblasti zájmu. Aby bylo možné určit velikosti molekul, je nutné stanovit referenční histogram pro monomer, který je možné získat hned několika způsoby, nejčastěji však opětovným vyzářením jedné oblasti. Pokud je jedna oblast vyzářena vícekrát, je vysoce pravděpodobné, že bude obsahovat pouze monomery, protože ty se díky své velikosti pohybují nejrychleji a tudíž mají větší šanci proniknout do vyzářené oblasti. Výsledky tohoto zpracování dat jsou uvedeny v kapitole 5 této práce. Zde jsou uvedeny výsledné histogramy.

4.3 Metoda kontroly a ověření výsledků

Protože metoda TOCCSL je poměrně komplexní a komplikovaná fluorescenční metoda, má mnoho kroků a poměrně snadno se může stát, že dojde k chybě, vyzvala

potřeba kontroly výsledků. Přestože tato část již není v zadání práce, myslím si, že se na něj úzce váže a bylo by chybou ji zde nezmínit. Abychom si byli jisti, že výsledky odpovídají realitě, zvolila jsem metodu FRAP k ověření výsledků. Tato fluorescenční metoda má s metodou TOCCSL mnoho společného, jak je možné vyčíst z popisů obou metod výše v této diplomové práci. Mimo jiné lze využít stejný mikroskop, jako pro metodu TOCCSL a není nutné vzorky jinak upravovat, či přenastavit aparaturu, čímž by mohlo dojít ke vzniku dalších chyb. Postup byl tedy shodný jako při metodě TOCCSL až na nastavení parametrů sekvence. Také nebylo nutné tak precizní zaostřování jako u metody TOCCSL, protože nešlo o zkoumání jednotlivých molekul, nýbrž o celkovou intenzitu emisního záření vycházející z oblasti zájmu.

Nastavení parametrů sekvence je možné vyčíst z tabulky 7. Změny v parametrech jsou zapříčiněny tím, že od metody FRAP očekáváme jiné informace, než od metody TOCCSL. Místo pohybu molekul a velikosti klastrů se snažíme zjistit, za jakou dobu a do jaké míry se obnoví intenzita vzorku po photobleachingu. Protože je zde snaha získat co největší množství intenzity světla, není možné provádět více sekvencí na jednom místě vzorku a je potřeba po každé sekvenci změnit oblast působení laserového paprsku. Další změnou je redukce zotavovacího času, který se zde rovná nule a to z toho důvodu, že je důležité zjistit stav intenzity okamžitě po photobleachingu. Pro získání časového průběhu změny intenzity jsem zvolila krok 500ms mezi expozicemi, které probíhaly po dobu dvou minut, kdy je již obnovena intenzita na svém maximu a dále nestoupá. Výsledky měření jsou uvedeny v kapitole 5, podkapitole ověření výsledků.

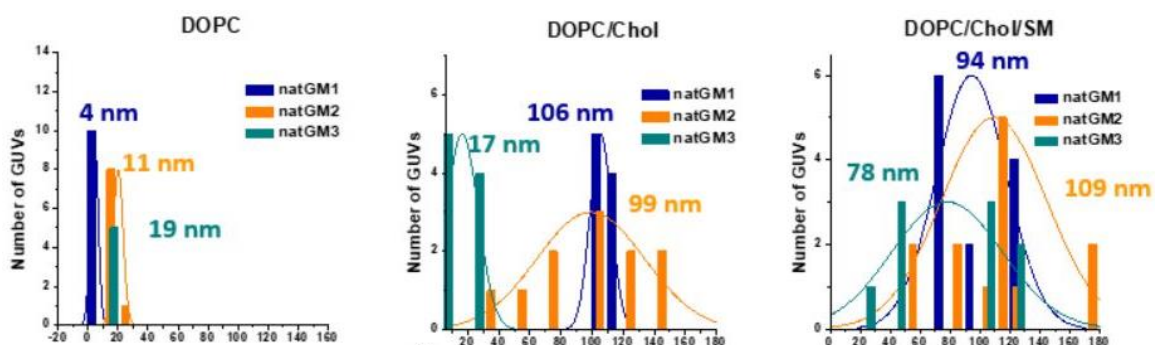
Tabulka 7: Porovnání nastavení parametrů sekvence pro měření vzorků metodou FRAP a TOCCSL

| Parametr | FRAP | TOCCSL | Jednotka |
|------------------------------|------|--------|----------|
| Počet opakování | 1 | 30 | - |
| Intenzita pulzu | 9 | 9 | V |
| Délka pulzu | 500 | 500 | ms |
| Zotavovací čas | 0 | 2000 | ms |
| Počet kontrolních obrázků | 1 | 1 | - |
| Pauza mezi sekvencemi | 0 | 0 | ms |
| Počet obrázků | 240 | 20 | - |
| Čas expozice | 10 | 10 | ms |
| Pauza mezi expozicemi | 500 | 20 | ms |
| Intenzita excitačního záření | 2,5 | 2,5 | V |

Pro tato kontrolní měření byly použity prozatím pouze dva vzorky, u kterých byl dle výsledků TOCCSL velký rozdíl ve velikosti klastrů a to vzorky DOPC+GM1 a DOPC+Chol+Sph+GM1. Tyto vzorky byly zvoleny také z důvodu větších zásob gangliosidu GM1 než GM3.

Pro analýzu dat zaznamenaných metodou FRAP jsem vytvořila algoritmus v prostředí Matlab, ten se nachází v kapitole výsledků této práce. Jedná se o algoritmus, který načte soubor s příponou .tiff, rozdělí jej na takové množství souborů, kolik obsahuje obrázků a následně nechá uživatele vybrat oblast zájmu dle mřížky. Ořízne a uloží obrázky podle zvoleného vzoru a spočítá v každém z nich intenzitu. Následně hodnoty intenzit vykreslí do grafu, aby bylo možné porovnávat měření různých vzorků.

Jako další kontrolu, případně porovnání jsem využila výsledky naměřené pomocí metody FRET na obrovských unilamelárních vezikulách (GUV) o stejném složení jako mnou vytvořené SUV. Výsledky těchto měření jsou na obrázku 16. Jejich interpretace odpovídá tomu, že v případě GM1 očekáváme v základním vzorku jen velmi malé nanodomény, po přidání cholesterolu výrazně větší domény a po přidání sfingomyelinu by klastry měly být přibližně stejně velké jako v případě přítomnosti pouze cholesterolu. U gangliosidu GM3 by se v případě nejjednoduššího složení a složení s cholesterolem mělo jednat o malé domény, zatímco po přidání sfingomyelinu by mělo dojít k jejich výraznému zvětšení.



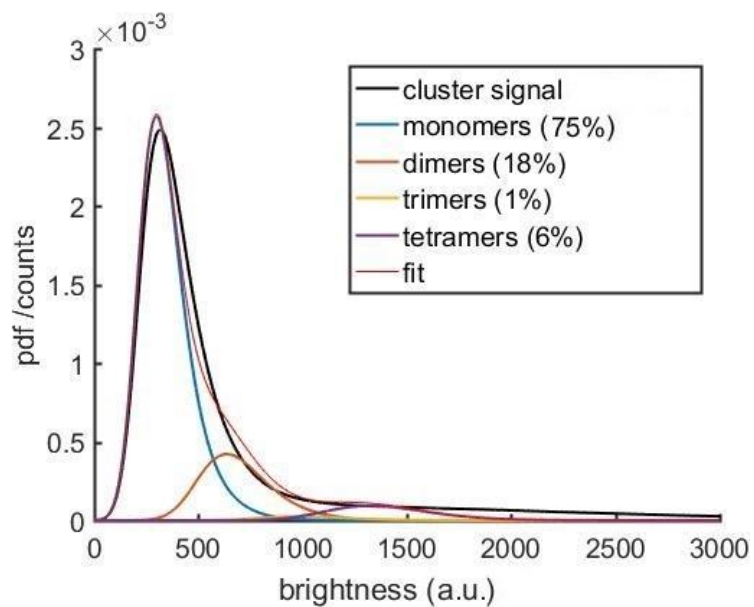
Obrázek 16: Velikosti nanodomén na třech různých lipidových dvojvrstvách pro gangliosidy GM1, GM2 a GM3 [38]

5 Výsledky

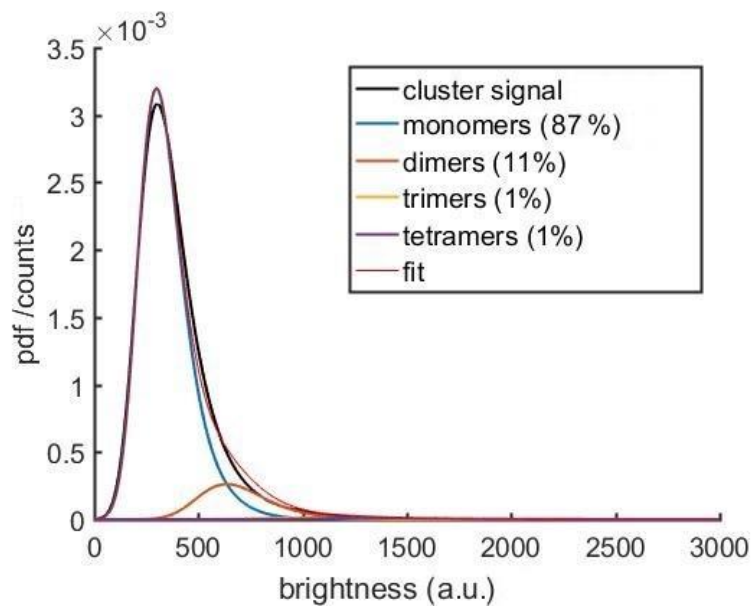
V této kapitole jsou uvedeny výsledky všech měření provedených v rámci této diplomové práce. Nacházejí se zde dvě podkapitoly, z nichž jedna obsahuje výsledky vlastní části práce a druhá poté dosavadní ověření těchto výsledků. Toto rozdělení jsem zvolila kvůli přehlednosti a cílem bylo jasně oddělit výsledky metod TOCCSL, která je hlavním tématem této práce a výsledky metody FRAP, která je zde použita pouze doplňkově.

5.1 Výsledky metody TOCCSL

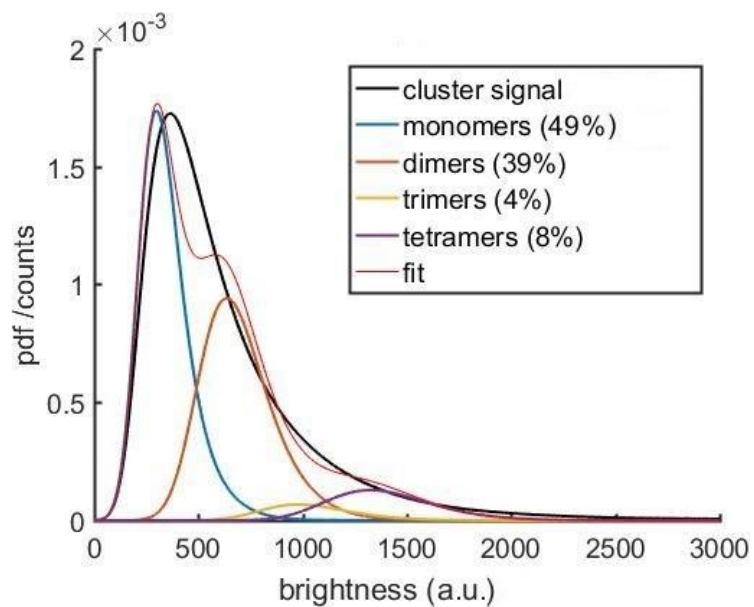
Zde se nachází shrnutí všech výsledků metody TOCCSL pro šest různých vzorků obsahujících dva druhy gangliosidů. V příloze je poté zahrnut vytvořený protokol, v němž jsou popsány všechny kroky práce, tedy tvorba vzorků, záznam a analýza dat pro metodu TOCCSL. Výsledky měření jsou reprezentovány grafy na obrázcích 17 až 22 a v jejich popisu je vždy zaznamenána kompozice konkrétního vzorku, ke kterému náleží. V legendě v pravém horním rohu jsou poté uvedena procenta zastoupení jednotlivých klastů od monomerů až po tetramery. Větší domény nebyly ze získaných dat prokázány. Na ose x je vždy vyneseno rozložení jasů, který byl u molekul zaznamenán a na ose y je poté hustota pravděpodobnosti vztažená k počtu zaznamenaných událostí tak, aby bylo možné porovnávat monomery a signály klastrů, které mají diametrálně jiný počet událostí. Poslední informací, která je obsažena v grafech, je nafitovaná křivka složená z kontribucí všech n-merů obsažených ve vzorku. První tři obrázky náleží vzorkům obsahujícím gangliosid GM1.



Obrázek 17: DOPC+GM1 (autorský obrázek)

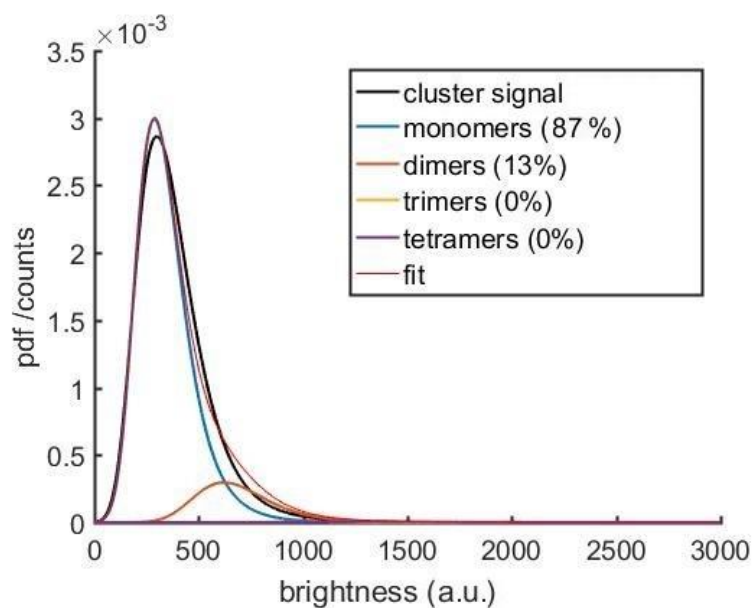


Obrázek 18: DOPC+Chol+GM1 (autorský obrázek)

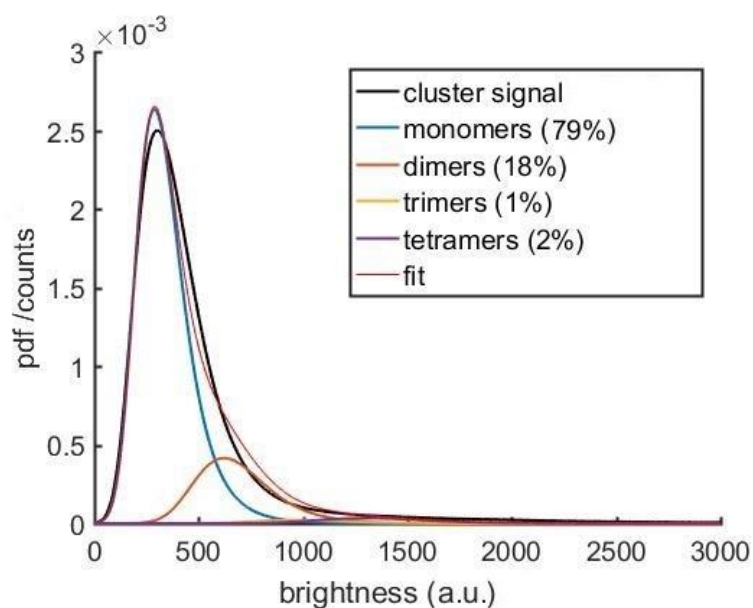


Obrázek 19: DOPC+Chol+Sph+GM1 (autorský obrázek)

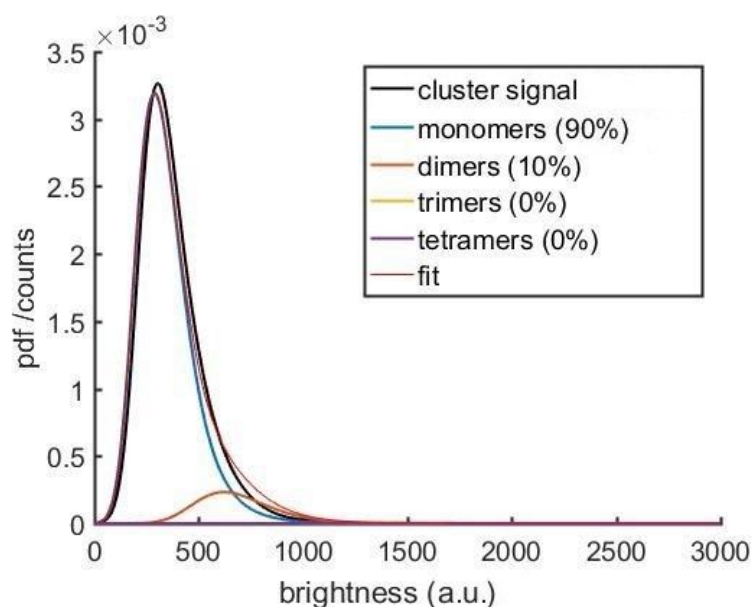
Další tři grafy odpovídají datům naměřených na vzorcích obsahujících gangliosid GM3.



Obrázek 20: DOPC+GM3 (autorský obrázek)



Obrázek 21: DOPC+Chol+GM3 (autorský obrázek)



Obrázek 22: DOPC+Chol+Sph+GM3 (autorský obrázek)

Pro výpočty i následné zhodnocení výsledků jsou velice důležité počty všech zaznamenaných klastrů v jednotlivých vzorcích. Tyto hodnoty jsou také důležité jako ukazatel průkaznosti měření. V kapitole o záznamu dat je zmíněno, že minimální počet detekovaných událostí je 200, protože nejnižší počet klastrů zaznamenaných v průběhu měření v této práci je 8 176, je možné tvrdit, že výsledky jsou průkazné. Jak je z tabulky 8 patrné, hodnoty se u vzorků poměrně liší. Toto chování je vysvětleno v diskuzi práce.

Pro vzorky obsahující totožný gangliosid byl využit vždy totožný monomer, proto se počty událostí monomerů shodují.

Tabulka 8: Počty detekovaných událostí v jednotlivých vzorcích

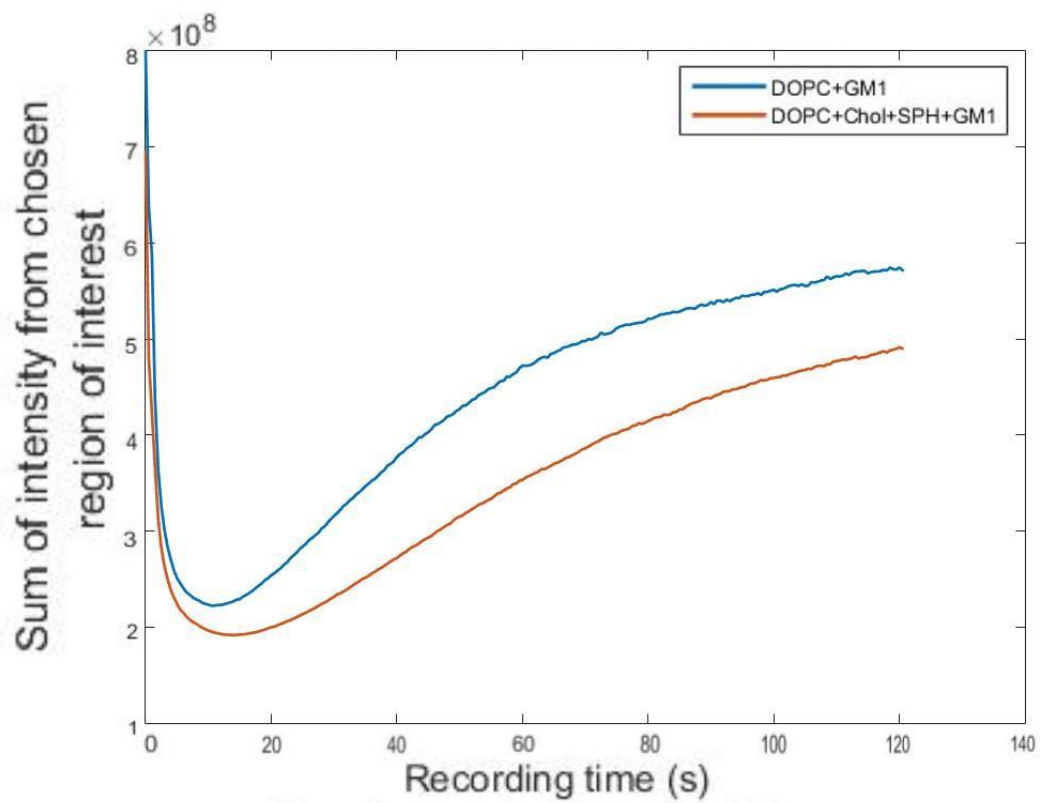
| Vzorek | Monomer | Klastr |
|-------------------|---------|---------|
| DOPC+GM1 | 35 851 | 131 934 |
| DOPC+Chol+GM1 | 35 851 | 101 900 |
| DOPC+Chol+Sph+GM1 | 35 851 | 207 181 |
| DOPC+GM3 | 46 625 | 47 393 |
| DOPC+Chol+GM3 | 46 625 | 69 270 |
| DOPC+Chol+Sph+GM3 | 46 625 | 8 176 |

Tyto výsledky naznačují, že přidání cholesterolu nemá na tvorbu klastrů žádný prokazatelný účinek ani u jednoho z gangliosidů. Naopak přidání sfingomyelinu vyvolává u gangliosidu GM1 vyšší vazebnou ochotu a tím tvorbu větších klastrů. U gangliosidu GM3 graf naznačuje, že by se tvorba klastrů měla přidáním sfingomyelinu ještě snížit, nicméně zde musíme vzít v potaz i počet detekovaných událostí, který je oproti ostatním vzorkům výrazně nižší.

5.2 Ověření výsledků

Pro ověření výsledků byla využita metoda FRAP na vzorcích obsahující gangliosid GM1. V příloze jsou uvedeny části kódu, který jsem vypracovala a který slouží k analýze dat získaných pomocí metody FRAP. Popis procesu zpracování je v kapitole metody v podkapitole Metoda kontroly a ověření výsledků

Obnovovací křivky obou vzorků jsou zaznamenány na obrázku 23. Odtud je patrné, že u vzorku s komplikovanějším složením lipidové membrány dochází k pomalejší obnově intenzity a že podíl imobilní části vzorku je mnohem vyšší, než je tomu u základní kompozice. Výsledky metody FRAP tímto podporují výsledky metody TOCCSL.



Obrázek 23: Výsledky metody FRAP (autorský obrázek)

6 Diskuze

Hlavním výstupem této diplomové práce je upravený měřicí protokol, který popisuje postup vhodný pro využití metody TOCCSL na pozorování lipidových membránových dvojvrstev za přítomnosti gangliosidů. Jedná se o upravené postupy této fluorescenční metody tak, aby co nejlépe vyhovovaly vlastnostem konkrétních struktur, a bylo tak dosaženo co nejkvalitnějšího obrazového záznamu, který bude vypovídat o skutečné situaci na membráně. Postupy byly konzultovány s odborníky na konkrétní problematiku a všechny kroky, kde mohlo docházet k modifikacím, byly opakovány, dokud nebylo dosaženo co nejpreciznějšího výsledku. Nastavení a úpravy byly prováděny na základě praktických pozorování a metodou pokus omyl jsem se snažila přijít na nejvhodnější nastavení všech specifikací tak, aby vyhovovaly předpokladům daným kompozicemi vzorků.

Po optimalizování měřicího postupu jsem připravila dohromady osm vzorků, z nichž dva sloužily jako základ pro měření signálu, který očekáváme u monomerů, a zbytek potom sloužil pro záznam signálu z klastrů. Rozdíly mezi vzorky byly hlavně v koncentraci značeného gangliosidu, v případě vzorků pro záznam monomerů, a v kompozici lipidové dvojvrstvy, kde jsem očekávala různé velikosti klastrů. Předpoklady o zastoupení klastrů ve vzorcích jsem čerpala z jich naměřených dat na obrovských vezikulách, jejichž membrány měly stejné složení, jako mnou vytvořené malé vezikuly.

Provedená měření nepotvrdila předpoklady a výsledné velikostí klastrů se pro membrány obrovských a malých vezikul liší. V následujících odstavcích popisují rozdíly, které jsme pozorovali, a vysvětlím, proč k nim mohlo dojít a zda výsledky opravdu naznačují, že se na membránách tvoří jiné klastry, nebo zde může docházet ke špatné interpretaci, která vychází z podstaty metody.

Nejprve se zaměřím na výsledky gangliosidu GM1. Zde dle měření metodou FRET na obrovských unilamelárních vezikulách mělo být možné pozorovat pouze velmi malé nanodomény na nejjednodušší základní lipidové kompozici skládající se pouze z DOPC a gangliosidu. Tento předpoklad, jak je možné z výsledků vyčíst, byl splněn, protože v nejjednodušší lipidové kompozici za přítomnosti GM1 bylo detekováno 75% monomerů a pouze 7% klastrů přesahovalo velikost dimerů. S přidáním cholesterolu a následně sfingomyelinu jsem očekávala velmi výrazné zvětšení nanodomén až do velikosti 150 molekul v jednom klastru. Z výsledků ovšem jednoznačně vyplývá, že největší detekované klastry byly tetramery.

Abychom mohli vysvětlit tyto nesrovnalosti, je nutné si uvědomit důležitou skutečnost. Je jí závislost metody TOCCSL na Brownově pohybu. Ze základních

fyzikálních principů vyplývá, že velké objekty se budou pohybovat mnohem pomaleji, než objekty menších rozměrů. Tento jev by mohl být důvodem k tomu, že velké shluky molekul se pohybují jen velice pomalu a nestihnou se přemístit do oblasti se zhasenými fluorofory a proto nejsou detekovatelné v oblasti zájmu. Protože malé klastry, případně jednotlivé molekuly se pohybují mnohem rychleji, vyplní zorné pole dřív, než je možné pozorovat klastry velké. Příliš dlouhý zotavovací čas by ovšem způsobil, že by již nebylo možné od sebe jednotlivé klastry rozeznat a nebylo by možné provádět měření. Pokud by se oba popsané faktory spojily a do oblasti zájmu by pronikaly pouze menší klastry s méně značenými molekulami, než kolik doopravdy obsahují, mohlo by se jednat o příčinu vzniku rozdílu mezi měřeními pomocí metody FRET a pomocí metody TOCCSL. Dalším faktorem, který může mít vliv na rozdílnost výsledků je samotná fosfolipidová membrána. Při metodě FRET probíhá měření přímo na vezikulách, zatímco metoda TOCCSL zaznamenává data z membrány přisedlé na krycí sklíčko/podložku. Tato podložka již dříve měla prokazatelný vliv na vlastnosti membrány na ní připravené, což může mít za následek i jiné chování gangliosidů.

Na základě těchto předpokladů vyvstala potřeba ověřit, jaká část klastrů se do zorného pole navrátí a jak je vzorek schopen se obnovovat. K tomuto účelu jsem využila kontrolní metodu FRAP, díky které je možné určit nejen čas, za který dojde k obnovení intenzity záření do její maximální návratnosti, ale také je možné s její pomocí detekovat imobilní fázi. Tyto informace by tedy mohly být klíčové při ověřování skutečné velikosti klastrů vyskytujících se na membráně. U vzorků, které obsahují větší domény, by mělo být zotavování intenzity pomalejší. Pokud by membrána obsahovala klastry, jejichž velikost jim buď znemožňuje pohyb, případně jej značně zpomaluje, došlo by také k výraznému zvýšení podílu imobilní části ve vzorku.

Na základě předpokladu, že membrána s nejjednodušší lipidovou kompozicí obsahuje nejmenší klastry, jsem pro porovnání metodou FRAP zvolila tento vzorek a vzorek s nejsložitější kompozicí, tedy s přidaným cholesterolem i sfingomyelinem. Z obrázku v podkapitole ověření výsledků je jasně vidět, že modrá křivka reprezentující zotavování intenzity fluorescence vzorku s jednodušší kompozicí má strmější trend a ustaluje se na vyšší hodnotě. Obě tyto informace naznačují, že vzorek obsahuje menší klastry a to z toho důvodu, že rychleji pronikají do oblasti zájmu a také proto, že jeho podíl mobilní části je vyšší, než u druhého porovnávaného vzorku. Na základě tohoto výsledku můžeme tvrdit, že klastry ve vzorku obsahujícím cholesterol a sfingomyelin jsou prokazatelně větší, než ve vzorku bez těchto lipidů.

Co se týče velikosti klastrů u gangliosidu GM3, zde se dle referenčních výsledků očekává, že první dvě kompozice budou obsahovat malé klastry, zatímco nejsložitější lipidová membrána bude obsahovat klastry větší. Výsledky metody TOCCSL se shodují s referencí v prvních dvou případech, k rozkolu dochází u poslední kompozice, kde namísto očekávaného výsledku velkých shluků molekul pozorujeme velice úzký tvar

křivky připomínající monomer. Z důvodu nedostatku zásob gangliosidu GM3 nebylo možné provést ověření pomocí metody FRAP a proto bylo nutné ověřit a vysvětlit výsledek jiným způsobem.

Samozřejmě i v tomto případě platí předpoklad o nízké mobilitě velkých struktur. Protože nemáme možnost porovnání výsledků metodou FRAP, musíme se zaměřit na jiný ukazatel, který by mohl souviset s velikostí domén. Jako důkaz by zde mohl posloužit počet zachycených klastrů v průběhu měření. Jelikož předpokládáme, že do zorného pole proniknou jen menší shluky a všechny tři kompozice membrán měly stejnou koncentraci jak neznačeného, tak značeného gangliosidu, můžeme předpokládat, že výrazně nižší počet detekovaných značených molekul by znamenal jejich navázání na větší, méně pohyblivé a tudíž nepozorovatelné velké struktury. Vzhledem k tomu, že vzorek s cholesterolem i sfingomyelinem má přibližně sedmkrát nižší počet zaznamenaných klastrů, mohlo by se jednat o případ, kdy většina fluoroforů zůstává mimo zorné pole zachycena většími strukturami. Odpovídal by tomu i průběh měření, kdy se před photobleachingem vzorek choval stejně, jako ostatní kompozice, ale po aplikaci laseru bylo jednoznačné, že nedochází k takovému obnovení, jaké bylo možné pozorovat u ostatních měřených membrán. Je tedy pravděpodobné, že na středně velké klastry se navázalo jen málo molekul a proto se z finálního zaznamenaného signálu zdá, že se na membráně vyskytují v podstatě jen monomery, zatímco většina značených molekul zůstala v imobilní fázi vzorku. To by mohlo vysvětlovat, proč dochází k tak významnému rozdílu mezi očekávanými a naměřenými hodnotami.

Co by mohlo vyvracet tuto teorii, je počet zaznamenaných emitorů v případě nejsložitější membrány u gangliosidu GM1. Zde je detekováno přibližně dvakrát více událostí, než v ostatních dvou membránách. Vysvětlením může být, že vzorek obsahuje nejen velké, ale i malé klastry a tím dochází k pronikání velkého množství malých shluků stejně tak jako k zachycení ve větších strukturách, kterých může být menší množství, než v případě gangliosidu GM3. Jak je zřejmé z grafické interpretace referenčních výsledků, křivky reprezentující velikost klastrů jsou v některých případech široké a zabírají celé uvedené velikostní spektrum. Dalším důvodem proč může docházet k rozdílu ve výsledcích metody TOCCSL a FRET je skutečnost, že velikost vezikul může mít vliv na chování gangliosidů a na jejich ochotu tvořit shluky. Přestože teoreticky by tyto skutečnosti neměly hrát při tvorbě klastrů roli, jedná se stále o nové a experimentální měření a nelze tvrdit s jistotou, že se gangliosidy chovají na membránách o stejné kompozici a jiném tvaru a velikosti stejně.

Dalším krokem k získání více informací o dějích na membráně tvořené malými unilamelárními vezikulami by měla být aplikace metody FRAP na všechny vzorky měřené metodou TOCCSL. Výsledky by mohly potvrdit případně vyvrátit teorii o počtu detekovaných fluoroforů a přiblížit pozorovateli skutečné chování gangliosidů na lipidových dvojvrstvách. Jako svůj další krok bych volila také ověření lipidových

kompozic metodou FRAP bez gangliosidů pouze s fluorescentním barvivem, kde neočekáváme imobilní fázi, aby bylo jasné, zda pouhá lipidová kompozice nemá vliv na návratnost intenzity. Dalším krokem do budoucna je aplikovat na vzorky měření pomocí metody AFM (Atomic Force Microscopy). Tato metoda je přímo využitelná pro záznam dat z membrány, nikoliv z vezikul, a mohla by proto být ještě důvěryhodnějším referenčním zdrojem, než metoda FRET.

Shrnutím poznatků a informací získaných při vypracování této diplomové práce je fakt, že fluorescenční metoda TOCCSL je vhodná pro zkoumání jednomolekulových fluorescentních struktur na lipidové membráně. Doporučila bych však zkoumat spíše vzorky, ve kterých jsou očekávány malé a vysoce mobilní struktury. Pro vzorky s imobilními, případně pomalu se pohybujícími se částmi není metoda vhodnou měřicí alternativou. K tomuto závěru mě dovedla shoda s referenčními výsledky v případě vzorků s menšími klastry a také se zakládá na fyzikálním principu metody.

7 Závěr

V průběhu práce byl vytvořen optimalizovaný měřicí protokol pro využití fluorescenční metody TOCCSL ke zjišťování velikosti klastrů gangliosidů na fosfolipidové membráně. Podle zadaných postupů bylo naměřeno postupně šest vzorků obsahujících dva různé gangliosidy GM1 a GM3 na třech různých kompozicích lipidových dvojvrstev. Zpracování dat ze všech vzorků a jejich statistické vyhodnocení ukázaly, že se v žádném ze vzorků nevyskytuje větší shluk molekul než tetramer. Pro gangliosid GM1 na nejjednodušší kompozici lipidů výsledky potvrdily přítomnost 75 % monomerů, 18 % dimerů, 1 % trimerů a 6 % tetramerů. Po přidání cholesterolu se zvýšil počet monomerů na 87 % a počet dimerů se snížil na 11 % trimery a tetramery v tomto případě byly zastoupeny vždy 1 %. U nejsložitější kompozice se projevila přítomnost sfingomyelinu poklesem počtu monomerů na 49 %, zvýšením podílu dimerů na 39 %, trimery dosahovaly 4 % a tetramery 8 % z celkového počtu domén. V případě gangliosidu GM3 bylo chování klastrů na prvních dvou kompozicích podobné jako u gangliosidu GM1. U kompozice složené pouze z DOPC a GM3 bylo detekováno 87 % monomerů, 13 % dimerů a trimery a tetramery v tomto případě detekovány nebyly. Přidáním cholesterolu se domény mírně zvětšily a to ovlivnilo jejich rozdělení na 79 % monomerů, 18 % dimerů, 1 % trimerů a 2 % tetramerů. Nejsložitější kompozice lipidů obsahovala pouze monomery a dimery a to v poměru 90 % ku 10 %. Tyto výsledky se přímo neshodují s očekáváními a důvody, proč tomu tak může být, jsou popsány v diskuzi této diplomové práce. Závěrem po zkušenostech získaných s touto metodou mohou říci, že její využití je vhodnější na malé pohyblivé fluorescentní struktury, které s ní lze jednoduše a velmi přesně detekovat.

Seznam použité literatury

- [1] VERVEER, Peter J. *Advanced fluorescence microscopy: methods and protocols*. 1st ed. New York: Humana Press, 2015. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 1251. ISBN ISBN 978-1-4939-2079-2.
- [2] SANDERSON, Michael J., Ian SMITH, Ian PARKER a Martin D. BOOTMAN. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014, (10), 1042-1065. DOI: 10.1101/pdb.top071795.
- [3] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-29919-X.
- [4] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 0387312781.
- [5] HERMAN, Brian. *Fluorescence Microscopy*. 2nd ed. USA: Bios Scientific Publishers, 1998. ISSN 0957-0365.
- [6] LICHTMAN, Jeff W a José-Angel CONCHELLO. Fluorescence Microscopy. *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 2005, **2**(12), 910-919. DOI: 10.1038/nmeth817.
- [7] ROST, F. W. D. *Quantitative Fluorescence Microscopy*. 1st ed. UK: Cambridge University Press, 1991. ISBN 0521394228.
- [8] VALEUR, Bernard a Mario N. BERBERAN-SANTOS. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education*. 2011, **88**(6), 731-738. DOI: <https://doi.org/10.1021/ed100182h>.
- [9] ISHIKAWA-ANKERHOLD, Hellen C., Richard ANKERHOLD a Gregor P. C. DRUMMEN. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*. 2012, **17**(4), 4047-4132. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules17044047>.
- [10] ABRAMOWITZ, Mortimer, Brian HERMAN, Douglas B. MURPHY a Miacheal W. DAVIDSON. Anatomy of the Fluorescence Microscope. *Olympus-Lifescience* [online]. USA, b.r. [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy/>

- [11] WNEK, Gary E. a Gary L. BOWLIN, ed. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2nd ed. New York: Informa healthcare, 2008. ISBN 978-142007953-1.
- [12] PAWLEY, James B. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3rd ed. New York, NY: Springer, 2006. ISBN 038725921X.
- [13] ŠKODA, RNDr. Jan. Konfokální mikroskopie a nové trendy ve fluorescenční mikroskopii. *Is.muni.cz* [online]. ČR (Praha): Ústav experimentální biologie PřF MU, 2017 [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi8920/um/2017_05_Konfokalni_mikroskopi_e_a_nove_trendy.pdf
- [14] JONKMAN, James, Claire M. BROWN a Richard COLE. Quantitative confocal microscopy: Beyond a pretty picture. *Methods in cell biology*. 2014, **123**(), 113-134. DOI: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00007-0.
- [15] SEHADOVÁ, Hana. *Fluorescenční a konfokální mikroskopie* [online]. In: . ČR (České Budějovice): Biologické centrum AVČR, 2011 [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/1558673-Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.html>
- [16] FISH, Kenneth N. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Current Protocols in Cytometry*. 2009, **50**(1). DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1218s50>.
- [17] REICHERT, W.M. a G.A. TRUSKEY. Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. I. Modelling cell contact region fluorescence. *Journal of Cell Science*. 1990, **96**, 219-230.
- [18] MATTHEYSES, Alexa L., Sanford M. SIMON a Joshua Z. RAPPOPORT. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *Journal of Cell Science*. 2010, **123**, 3621-3628. DOI: 10.1242/jcs.056218 Article.
- [19] MOERTELMAIER, Manuel, Mario BRAMESHUBER, Mario LINIMEIER, Gerhard J. SCHÜTZ a Hannes STOCKINGER. Thinning out clusters while conserving stoichiometry of labeling. *Applied Physics Letters*. 2005, **87**(26). DOI: 10.1063/1.2158031.
- [20] WRIGHT, Graham a Jean-Baptiste SIBARITA. Fluorescence Recovery after Photobleaching. AHMED, Sohail, Sudhaharan THANKIAH, Radek MACHAN et al. *Practical Manual for Fluorescence Microscopy Techniques*. 1st. Singapore: Institute of Medical Biology in Singapore, 2016, s. 130-138.

- [21] ZHENG, Chan-Ying, Ronald S. PETRALIA, Ya-Xian WANG a Bechara KACHAR. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) of Fluorescence Tagged Proteins in Dendritic Spines of Cultured Hippocampal Neurons. *Journal of Vizualized Experiments*. 2011, **2568**(50). DOI: 10.3791/2568.
- [22] ISHIKAWA-ANKERHOLD, Hellen, Richard ANKERHOLD a Gregor DRUMMEN. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). In *eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.)*. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003114>.
- [23] CARISEY, Alexandre F., Matthew J. STROUD, Ricky TSANG a Christoph BALLESTREM. Fluorescence Recovery After Photobleaching. *Methods in molecular biology: (Clifton, N.J.)*. 2011, **769**, 387-402. DOI: 10.1007/978-1-61779-207-6_26.
- [24] RICARDO, Maria J., Joana C. SARMENTO, Mariana AMARO a Radek ŠACHL. Organisation of Gangliosides into Membrane Nanodomains. *Nepublikováno*. J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, b.r.
- [25] GU, Ruo-Xu, Helgi I. INGÓLFSSON, Alex H. DE VRIES, Siewert J. MARRINK a D. Peter TIELEMAN. Ganglioside-Lipid and Ganglioside-Protein Interactions Revealed by Coarse-Grained and Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY*. 2017, **121**(15), 3262-3275.
- [26] VAN ECHTEN, Gerhild a Konrad SANDHOFF. Ganglioside Metabolism: Enzymology, Topology, and regulation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1993, **268**(8), 5341-5344.
- [27] KOLTER, Thomas. Ganglioside Biochemistry: Review Article. *ISRN Biochemistry*. 2012. DOI: 10.5402/2012/506160.
- [28] CEBECAUER, Marek, Martin HOF a Mariana AMARO. Impact of GM1 on Membrane-Mediated Aggregation/Oligomerization of β -Amyloid: Unifying View. *Biophysical Journal*. 2017, **113**(6), 1194-1199. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.009>.
- [29] SCHWARZMANN, Günter. Labeled gangliosides: their synthesis and use in biological studies. *FEBS Letters*. 2018, **592**(23), 3771-3772. DOI: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13239>.

- [30] MAGISTRETTI, Pierre J., Fred H. GEISLER, Jay S. SCHNEIDER, Andy LI, Hubert FIUMELLI a Simonetta SIPIONE. Gangliosides: Treatment Avenues in Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Neurology*. 2019, **10**(859). DOI: 10.3389/fneur.2019.00859.
- [31] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT. *Principles of Biochemistry*. 4th ed. UK: John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-1118092446.
- [32] BRAMESHUBER, Mario, Florian KELLNER a Benedikt K. ROSSBOTH. Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition. *Nature Immunology*. 2018, **19**(5), 487-496.
- [33] AMARO,, Mariana, Radek ŠACHL, Ilya I. MIKHALYOV, Gokcan AYDOGAN, Ilya I. MIKHALYOV a Robert VÁCHA. GM1 Ganglioside Inhibits b-Amyloid Oligomerization Induced by Sphingomyelin. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016, **55**(32), 9411-9415. DOI: DOI: 10.1002/anie.201603178.
- [34] ŠACHL, Radek, Mariana AMARO, Gokcan AYDOGAN, Alena KOUKALOVÁ, Ilya I. MIKHALYOV, Ivan A. BOLDYREV, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. On multivalent receptor activity of GM1 in cholesterol containing membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015, **1853**(4), 850-857. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.07.016>.
- [35] Research Inverted Microscope IX83/IX73/IX53. *OLYMPUS* [online]. Japonsko: Olympus Croperation, 2018 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: <http://www.optik-foto-mueller.com/Olympusmikro/IX3%20Catalog.pdf>
- [36] Sapphire FP Fiber Pigtailed Lasers from Deep Blue to Orange. *COHERENT* [online]. USA (Kalifornie): Coherent, Inc., 2019 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: https://www.coherent.com/assets/pdf/COHR_SapphireFP_DS_1119_1.pdf#page=2
- [37] MENDENHALL, William, Robert J. BEAVER a Barbara M. BEAVER. *Introduction to probability and statistics: metric version*. 15 edition. Boston: Cengage, 2018. ISBN 978-0-357-11446-9.
- [38] SARMENTO, M., J. RICARDO, M. AMARO, M. HOF a R. ŠACHL. *Ganglioside nanodomains 2019: Unpublished results*. Praha, 2019. J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Czech Academy of Sciences.

Příloha A: Optimalizovaný měřicí protokol

- Příloha č. 1: Měřicí protokol pro přípravu vzorků
- Příloha č. 2: Měřicí protokol pro záznam dat a manipulaci s hardwarem
- Příloha č. 3: Měřicí protokol pro zpracování dat

Příloha B: Kód pro zpracování výsledků metody FRAP vytvořený v prostředí Matlab

- Příloha č.4: Kód pro zpracování dat zaznamenaných fluorescenční metodou FRAP



Měřicí protokol pro přípravu vzorků

SUV PREPARATION

- 1) BUFFER PREPARATION:
 - a) 10mM HEPES
 - b) 150mM NaCl
 - c) milliQ water
 - d) final pH between 7,0 and 7,4

- 2) LIPID MIXTURE PREPARATION (SUV):
 - a) prepare a mixture of lipids in GLASS TUBES final concentration 1mM
 - b) dry under the stream of nitrogen
 - c) put under vacuum for 1 hour
 - d) dissolve the lipid film in the appropriate volume of SUV buffer by rigorous vortexing (milky solution should appear)
 - e) SONICATION:
 - i) clean the outside with cleaning methanol
 - ii) sonicate 5 min, 20% power, cycles 9, cool by ice water from the bottom with spectroscopic methanol
 - iii) dry the bottom so it does not have any drops of methanol before putting your sample)
 - iv) sonicate yourfor 5min, 20% power, cycles 9, cool by ice water from the bottom
 - v) clean with cleaning methanol if the sample is different so you don't contaminate it
 - f) transfer all your samples to safe-lock eppendorfs
 - i) store in the fridge
 - g) centrifuge for 20 min at full speed, transfer 350 μ L of SUVs to another eppendorfs

- 3) SPBs - supported phospholipid bilayers
 - a) Ionize the glass coverslip under the UV light for 30min
 - b) Add 267 μ L SPB buffer in the chamber
 - c) add SUVs to the same chamber, SUVs to buffer volume ratio 1:10 (30 μ L)
 - d) add CaCl₂ (1 mM, 3 μ L from a 100 mM solution)
 - e) incubate for 1h
 - f) flush remaining SUVs with +- 8 mL with buffer in each chamber
 - g) leave +- the same volume – 300 μ L



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

- 4) Coverslips cleaning
 - a) fill rack holder with coverslips (25 mm for TOCCSL)
 - b) place holder into beaker (Best supercleaned before)
 - c) fill with 2% Hellmanex in MilliQ-H₂O solution, cover top with aluminium foil
 - d) put into water tank, overnight incubation 56°C.
 - e) sonicate for 30 min, heating on (37°)
 - f) wash 3x with MilliQ-H₂O, fill with MilliQ-H₂O
 - g) sonicate for 30 min, heating on (37°)
 - h) wash 5x with MilliQ-H₂O water fill with MilliQ-H₂O
 - i) store in MilliQ-H₂O for max 3 weeks covered with aluminium foil



Měřicí protokol pro záznam dat a manipulaci s hardwarem

TOCCSL data recording + operating hardware

- 1) TURN ON HARDWARE:
 - a) Turn on the power plug in the wall
 - b) The rest under the table:
 - i) Blue Laser - power button (behind box) + the key
 - ii) The intensity can be modulated by the front button: set the intensity to 110%, 220 mW
 - c) Turn on the power supply - shows 2 voltages: 24V and 10V
 - d) Turn on the Camera - press the button (ON is the position to the inside)

 - 2) MICROSCOPE, CABLES AND FILTERS:
 - a) Microscope body
 - i) Carousel position 3
 - ii) Shutter bellow the carousel on open symbol
 - iii) On the back side of the microscope body - the lower screw is turning the laser beam to the TIRF position
 - b) Check for proper filter
 - i) Filters available: - 515, 600, 650 (for TOCCSL choose 515 nm)

 - 3) Set SOFTWARE
 - a) Camera - controlled by MicroManager
 - i) Open Micromanager 1.4 (desktop) - Select ' C:\Data\TOCCSLconfig2.cfg'
 - ii) Press OK
 - iii) Tools - Device Property Browser - temperature -70 Celsius
 - (1) Andor-optAcquireMode - Set to 'Acquire mode fastest framerate'
 - (2) Andor Pre-Amp Gain - Gain 1
 - (3) Andor Gain - 300
 - (4) Andor-optAcquireMode - Set to 'Fastest Frame 8'

 - 4) PLACING AND FOCUSING SAMPLE
 - a) Clean the objective with alcohol
 - b) Place a drop of immersion oil in the objective without air bubbles
 - c) Place the chamber leaning to the left/back microscope sample holder
 - d) Set Device Property Browser to 'Andor trigger - Software'
-



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

- e) Press 'live' in MicroManager
 - f) Using the micrometric and macrometric screw of the microscope search for the surface. Use the intensity histogram to look for the highest intensity possible.
- 5) TOCCSL settings for the measurement
- a) LabView - TOCCSL2
 - i) Create sequence - everything positive non-zero in the graph means either turned on/opened/intensity level
 - ii) Press 'Create the sequence' to confirm it
 - iii) After any change one must press again to save it
 - b) Shutter window - make the exposed area bigger or smaller manually by opening/closing camera shutter
- 6) In MicroManager
- a) Device Property Browser - just before the TOCCSL measurement
 - i) Andor trigger - External
 - ii) Exposure time - has to be the exactly the same as 'Camera exposure time' in TOCCSL2 software (e.g. 10ms)
 - b) Multi-dimensional acquisition
 - i) Number of images - set to the same number as the number of images in the LabView TOCCSL2 software
 - ii) Multiply by the number of runs ($30 \cdot 24 = 720$)
 - iii) Press 'Acquire'
- 7) In LabView - TOCCSL2 -> Press 'Measure' (beneath the 'Create sequence')
- a) NOTE: you need to hear the shutter opening and shutting. Otherwise, stop the measurement, and do it again
- 8) IF SOMETHING IS WRONG (PRACTICAL NOTES):
- 9) You always see some blur with the blue laser
- 10) If you cannot focus properly you might need some more immersion oil or try to change ROI



Měřicí protokol pro zpracování dat

TOCCSL data analysis

- 1) `tif2singletif0`(first image, last image);
 - a) example: `tif2singletif0(2,24)`;
 - i) Makes single images from the stack, can exclude images in the beginning and at the end.

- 2) `prepare_peakposition`(first image, last image);
 - a) example: `prepare_peakposition(1, 690)`;
 - i) If you made 30 runs, you have $30 \text{runs} * 24 \text{images} = 720$ images. If you selected 2-24, you deleted 30 1st images, so $720 - 30 = 690$ images
 - b) select one folder above the folder with images
 - c) select single tiff Andor
 - d) select 1 color

- 3) `check_fit`
 - a) possibility to select ROI
 - b) select 'Andor single TIFFs folder'
 - c) press Load
 - d) Select folder with the 690 images,
 - e) select ROI: choose Poly ROI - whatever shape you want - double click to select (it turns red)
 - f) press 'set image'
 - g) Press Apply

- 4) `TOC_delDoubleEvents`(total number of images, images per run, searching distance)
 - a) example: `TOC_delDoubleEvents(690,23,7)`
 - i) 7 - distance in pixels which the function searches for double events and immobile or unbleached spots
 - ii) Immediate information about number of unbleached events

- 5) `filter_pks`(periodicity, min distance of 2 peaks)
 - a) example: `filter_pks(23,2)`
 - i) in case each run has 23 images

- 6) `ImX=pk_data`
 - a) Example: `Im23=pk_data`



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

- i) change X for number of image which data you want to read
- 7) `plotpdf(lmX*15.3/300,3000,2,'b')` or `fitpdf(lmMonomer*15.3/300,lmX*15.3/300,3000,2)`
 - a) depends on what we want to display (pdf/counts for one image or comparison)
 - i) plots the histogram from `lmX=pk_data`, corrected to photons
 - ii) 15.3 regulation factor for reaching the proper intensity
 - iii) 300 gain defined in the camera acquisition settings
 - iv) 3000 definition of brightness value on x axis
 - v) 2 smoothin factor for fitting curve
 - b) `lmMonomer` – choose img for monomer `lmX` – choose img for cluster signal


```

clear all;
close all;
clc;
%Opening file chosen by user
userinput = input('Enter tif stack name: ', 's')
filename = userinput;
numimgs = size(imfinfo(filename),1);
%Creating two folders
mkdir SeparatedImages;
mkdir CroppedImages;
%% Tiff stack of images division
for i = 1:numimgs,
    I = imread(filename,i);
    Im=imadjust(I);

    FileName = sprintf('Image %d.png', i);
    fullFileName = fullfile('SeparatedImages', FileName);
    imwrite(Im,fullFileName);
end

%% Choosing ROI from one image
Filename = sprintf('Image %d.png', 110);
fullFileName = fullfile('SeparatedImages',Filename);
mask = imread(fullFileName);
[nx,ny,d] = size(mask) ;
[X,Y] = meshgrid(1:ny,1:nx) ;
MaskIm = figure;
[rows, columns, numberOfColorChannels] = size(mask);
for row = 1 : 50 : rows
    mask(row, :) = 300000;
end
for col = 1 : 50 : columns
    mask(:, col) = 300000;
end
imshow(mask) ;
title({'Define your region of interest ' ;
    'by choosing the center point and approximate radius respectively.!' ;
    'When your choice is done, press Enter.!'})
hold on
% click at the center and approximate Radius
[px,py] = getpts ;
r = sqrt(diff(px).^2+diff(py).^2) ;
th = linspace(0,2*pi) ;
xc = px(1)+r*cos(th) ;
yc = py(1)+r*sin(th) ;
plot(xc,yc,'r') ;

% Keep only points lying inside circle
idx = inpolygon(X(:),Y(:),xc',yc) ;
for i = 1:d
    I1 = mask(:,:,i) ;
    I1(~idx) = 255 ;
    mask(:,:,i) = I1 ;
end
%figure
%imshow(mask)
pause(2);
close(MaskIm);

```

```

%% Cropping ROI from all images
for k = 1:numimgs
    jpgFilename = sprintf('Image %d.png', k);
    fullFileName = fullfile('SeparatedImages', jpgFilename);
    if exist(fullFileName, 'file')
        IM = imread(fullFileName );
    else
        warningMessage = sprintf('Warning: image file does not exist:\n%s', fullFileName);
        uiwait(warndlg(warningMessage));
    end
    [nx,ny,d] = size(IM) ;
    [X,Y] = meshgrid(1:ny,1:nx) ;
    r = sqrt(diff(px).^2+diff(py).^2) ;
    th = linspace(0,2*pi) ;
    xc = px(1)+r*cos(th) ;
    yc = py(1)+r*sin(th) ;
    idx = inpolygon(X(:),Y(:),xc',yc) ;
    for i = 1:d
        I1 = IM(:,:,i) ;
        I1(~idx) = 255 ;
        IM(:,:,i) = I1 ;
    end
    FileName = sprintf('CroppedImage %d.png', k);
    fullFileName = fullfile('CroppedImages', FileName);
    imwrite(IM,fullFileName);
end

```

```

%% Intensity calculation
Intensity=zeros(1,numimgs);
for k = 1:numimgs
    jpgFilename = sprintf('CroppedImage %d.png', k);
    fullFileName = fullfile('CroppedImages', jpgFilename);
    IM = imread(fullFileName );
    INT=sum(sum(IM));
    Intensity(k)=INT;
end
%% Ploting results
TimeSamples=120/numimgs;
RecTime = (0:TimeSamples:120-TimeSamples);
figure
plot(RecTime,Intensity,'LineWidth',3)
title({'Intensity changes before and after photobleaching pulse.';
'Displayed data represent recovery of bleached sample.'})
xlabel({'Recording time (s)';'Samples were taken every 500 ms'})
ylabel({'Sum of intensity from chosen ';'region of interest'})

```