

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Využití simulace jako komplementární metody pro
interpretaci experimentálních dat ve výzkumu
fluorescence jednotlivých molekul**

Diplomová práce

Bc. Zdeněk Carda

Školitel: Mgr. Tomáš Fessler, Ph.D.

České Budějovice 2017

Carda, Z., 2017: Využití simulace jako komplementární metody pro interpretaci experimentálních dat ve výzkumu fluorescence jednotlivých molekul.

[Use of simulation as a complementary method of interpretation of experimental data in single-molecule fluorescence research. Mgr. Thesis, in Czech.] – 79 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Jedno-molekulární metody pro zkoumání fluorescence jsou silným nástrojem pro výzkum zejména ve strukturní a molekulární biologii. Tyto metody přinášejí výhody oproti statistickému zpracování dat souboru mnoha molekul, poskytují kvalitativně nové informace o sledovaných vzorcích. Můžeme tak přímo charakterizovat statistické distribuce a jejich kinetiky. Mezi metody, které toto umožňují, patří fluorescenční korelační spektroskopie, FRET a analýza variance záblesků. S pokračujícím výzkumem v této oblasti jsou získávány nové poznatky a metody, pro jejichž interpretaci zatím neexistují analytické vztahy a ne vždy jsou zpočátku známy jejich limity. Zde s výhodou nastupují počítačové simulace, které šetří nejen finanční náklady při definici limit, ale zároveň pomáhají s interpretací výsledků, a na jejichž základě lze následně formulovat nové teoretické modely.

Klíčová slova

FRET, FCS, BVA, simulace, difuze, fluorescence

Annotation

Fluorescence single-molecule methods represent mighty tools for researchers in the field of structural and molecular biology. These methods are bringing in many advantages when compared to the statistical data processing of multi-molecular species. We can directly compare true statistical distributions and their kinetics. Here belongs fluorescence correlation spectroscopy, FRET and burst variance analysis. As the research advances, new methods are being developed which at the very beginning do not have proper analytical relations for data interpretation and which experimental limits we can't tell. That is the moment when the computer simulations can be used to our advantage. They can help us to specify the right direction of the future research, which is a great money-saver, while opening new perspectives and insights into the explored matter. Correct interpretation of the simulations results is key for the consequent defining of new theoretical models.

Key words

FRET, FCS, BVA, simulation, diffusion, fluorescence

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách a se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 11. 4. 2017

.....

Bc. Zdeněk Carda

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval mému školiteli Mgr. Tomáši Fesslovi, Ph.D., za cenné rady, připomínky a za odborné vedení mé diplomové práce

OBSAH

1. Úvod	1
1.1 Fluorescence	2
1.2 Pravděpodobnost absorpce	5
2. Metody SMFD	8
2.1.1 TIRFM	8
2.1.2 Difuzní konfokální mikroskopie.....	9
2.2 Brownův pohyb.....	13
2.3 FCS	15
2.4 FRET.....	18
2.5 BVA.....	24
3. Výsledky.....	27
3.1 Prostředí simulace.....	28
3.1.1 Základní parametry.....	29
3.1.2 Parametry geometrie.....	29
3.1.3 Fyzikální parametry.....	32
3.2 Efektivita detekce	35
3.3 Analýza FCS	44
3.3.1 Optimalizace časového kroku.....	45
3.3.2 Vliv velikosti a tvaru vnějšího ohraničení.....	48
3.3.3 Vliv relativního pohybu.....	58
3.3.4 Vliv rotace	61
3.4 Simulace FRET.....	63
3.5 Analýza BVA.....	66
3.5.1 Ověření funkčnosti algoritmu BVA a jeho schopnosti rozlišení FRET	66
3.5.2 Ověření časového rozlišení algoritmu BVA.....	69
4. Závěr.....	72
5. Seznam použité literatury	76
6. PŘÍLOHY	79

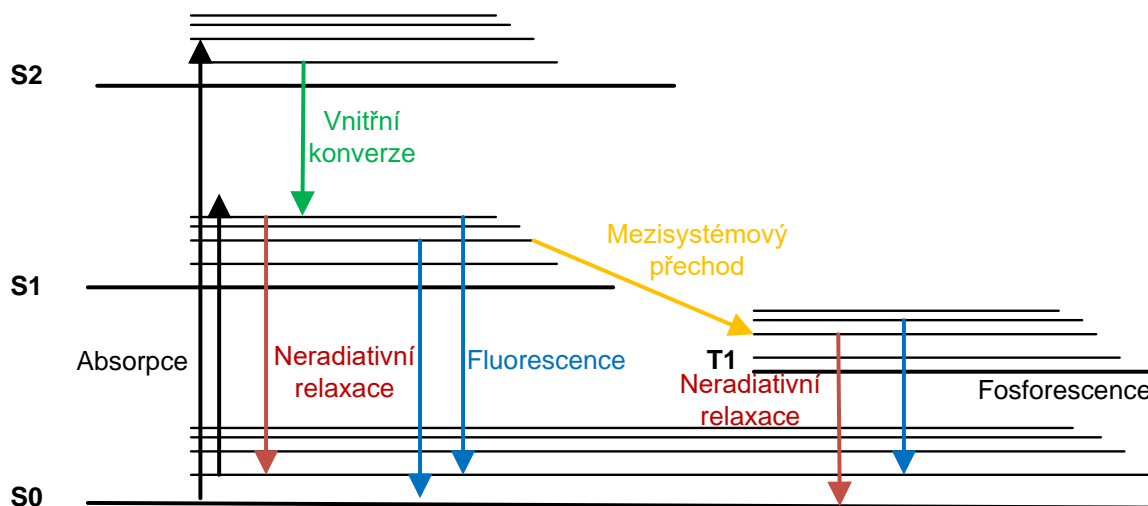
1. Úvod

V posledních třech dekádách došlo s rozvojem měřicí a výpočetní techniky k mohutnému vývoji na poli jedno-molekulární fluorescenční spektroskopie. Při souborném výzkumu molekul jsou získané výsledky obvykle statistickým průměrem sledovaných hodnot. Naproti tomu při zkoumání jednotlivých molekul je možné získat výrazně více informací o chování daných molekul. Tyto informace nabízejí donedávna netušené možnosti pro zkoumání intermolekulárních procesů, jež dále vytvářejí nové otázky, na něž je nutné hledat odpovědi. Díky bouřlivému vývoji elektroniky v posledních desítkách let je možné nejen pracovat s lepšími měřicími přístroji, ale zároveň i využívat počítačových simulací k lepšímu pochopení jevů probíhajících při jedno-molekulárních experimentech. Výpočetní technika umožňuje provádět simulace s parametry, jež jsou při reálných experimentech těžko dosažitelné. Tyto simulace zároveň mohou pomoci vysvětlit jevy, jež prozatím nejsou dostatečně pochopené, a tím dopomoci k tvorbě nových teoretických modelů. Podstatnou výhodou počítačových simulací je schopnost vyloučit slepé uličky vývoje, čímž šetří drahocenný čas a finanční náklady.

Cílem této práce bylo vytvoření simulačního softwaru, jakožto metody vhodné pro doplnění jedno-molekulárního fluorescenčního výzkumu. Tento software by měl umožnit simulace Brownova pohybu v ohraničeném 3D prostoru a následně výpočet fluorescenčních intenzit s možností simulace Försterova rezonančního přenosu energie. V druhé části by měl umožnit zpracování výsledků simulací metodami fluorescenční korelační spektroskopie a analýzou variance záblesků. Balíček by měl být rovněž připraven na implementaci a testování dalších metod.

1.1 Fluorescence

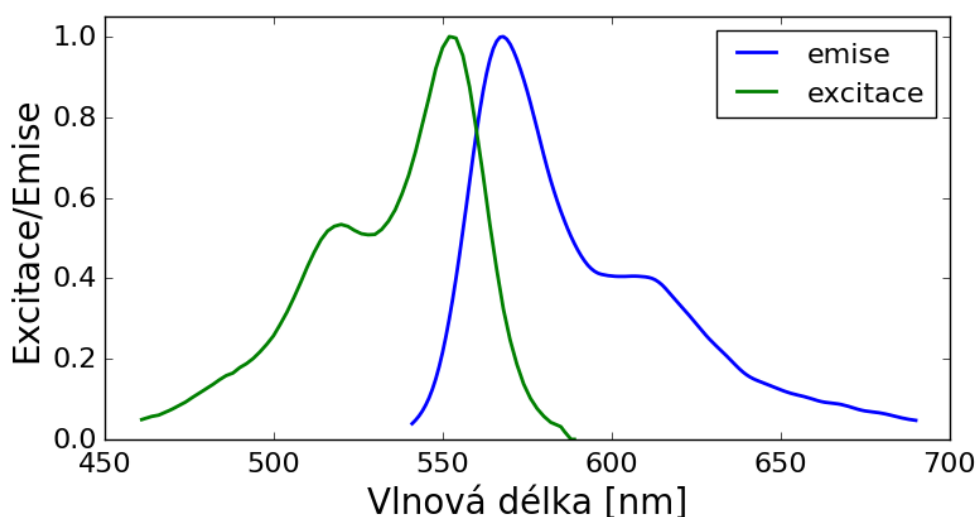
Metody jedno-molekulární fluorescenční spektroskopie jsou založeny na fyzikálním jevu zvaném luminiscence. Luminiscence je souhrnné označení pro emisi elektromagnetického záření látkou. Toto záření vzniká při přechodu elektronů mezi různými elektronickými stavy molekul. Můžeme je rozdělit do několika kategorií, z nichž dvě důležité pro výzkum jedno-molekulární spektroskopie jsou fluorescence a fosforescence. Látky schopné emitovat elektromagnetické záření jsou známy jako fluorofory. Dopadá-li na fluorescenční molekulu elektromagnetické záření s definovanou vlnovou délkou, pak je toto záření absorbováno, molekula tím přijme kvantum energie a dojde ke změně konformace elektronových orbitalů. Tento jev je obecně popisován jako tranzice elektronů mezi elektronovými stavy. Molekula se tím dostává do nestabilního excitovaného stavu, odkud po krátkém čase přechází zpět do stavu základního. Při přechodu do základního stavu ztrácí získané kvantum energie buď radiativními (fluorescence, fosforescence), nebo neradiativními procesy. Procesy probíhající při absorpci elektromagnetického záření popisuje Jablonského diagram (**Obr. 1**) [1].



Obr. 1. Jablonského diagram. Elektron molekuly absorbující elektromagnetické záření je excitován z hladiny S0 do hladin vyšších. Odtud může přecházet zpět do nižších stavů vnitřní konverzí, dále pak fluorescencí, nebo neradiativním procesem. Další možností je přechod do tripletního stavu, odkud dále přechází do základního stavu buď neradiativním procesem, nebo fosforescencí.

Excitační a emisní spektra – Stokesův posuv

Každá molekula je schopná absorbovat elektromagnetické záření pouze konkrétních vlnových délek, jež odpovídají velikosti přechodů mezi elektronickými stavy. Tato pásma jsou diskrétní a mají šířku odpovídající možným přechodům z různých vibračních hladin. Po absorpci fotonu zpravidla dochází k relaxaci excitovaného elektronu v rámci vibračních hladin. Následně dochází k deexcitaci elektronu do základního stavu a k vyzáření fotonu s energií nižší, než byla energie absorbovaného fotonu. Foton s nižší energií má delší vlnovou délku, a tímto dochází k posunu emisního spektra. Pokud přejde elektron v rámci mezi-systémového přechodu do tripletního stavu, ztratí větší část své energie a vyzářený foton má vlnovou délku ještě vyšší. Možné absorpční a emisní spektrum je pro fluorofor Cy3 vykresleno na **Obr. 2** [1].



Obr. 2. Excitační a emisní spektrum Cy3. Emisní spektrum je vůči excitačnímu posunuté do vyšších vlnových délek v důsledku ztráty energie vyzářených fotonů v rámci vibračních přechodů.

Doba života excitovaného stavu

Dobu života excitovaného stavu molekuly vyjadřuje časový interval, po který molekula, která absorbovala foton, zůstává v excitovaném stavu. Jde o recipročnou hodnotu součtu rychlostních konstant zářivých a nezářivých přechodů. Rychlostní konstanta k_{FRET} připadá v úvahu v přítomnosti vhodného akceptoru (1) [2].

$$\tau_D^{-1} = k_{IC} + k_{ISC} + k_Q + k_F + k_{FRET} \quad (1)$$

- k_{IC} – interní konverze (vibrační relaxace)
- k_{ISC} – přechod do tripletního stavu
- k_Q – relaxace zhášením
- k_F – relaxace fluorescencí
- k_{FRET} – relaxace vlivem FRET

Doby života jednotlivých procesů se výrazně liší. Doba života fluorescence se pohybuje řádově v jednotkách nanosekund. Při přechodu molekuly do tripletního stavu může být doba života fosforescence v řádech mikrosekund až milisekund.

Střední doba života excitovaného stavu souboru částic je pak dána exponenciálním rozdělením (2) [2].

$$n(t) = n_0 e^{\frac{-t}{\tau_D}} \quad (2)$$

- n_0 – počet excitovaných částic v čase $t(0)$
- $n(t)$ – počet excitovaných částic v čase t
- τ_D – doba života excitovaného stavu

Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek je jednou z nejdůležitějších charakteristik fluoroforů, a tedy klíčovým parametrem pro jejich výběr v rámci experimentů. Lze ho definovat jako poměr fotonů, které molekula emitovala, vůči fotonům, jež absorbovala. Tento poměr lze vyjádřit pomocí rychlostních konstant. Molekula absorbující foton se dostává do excitovaného stavu, následná deexcitace probíhá jedním z možných radiativních nebo neradiativních procesů. Kvantový výtěžek je tímto definován jako poměr všech radiativních procesů vůči součtu všech radiativních a neradiativních procesů (3) [1].

$$\Phi = \frac{K_r}{K_r + K_{nr}} \quad (3)$$

1.2 Pravděpodobnost absorpce

Pravděpodobnost absorpce je stanovena jako poměr fotonů, které částice absorbuje, vůči fotonům, které na ni dopadnou. Z hlediska SMFD (Single-Molecule Fluorescence Detection) je pravděpodobnost absorpce záření dopadajícího na sledované molekuly velmi důležitým parametrem, na němž závisí úspěšnost prováděného experimentu. Je potřebné získat co nejvyšší pravděpodobnost absorpce vzhledem k tomu, že od této hodnoty se nadále odvíjí intenzita naměřeného signálu [3].

Každá částice má účinný průřez, jenž definuje její absorpční plochu. Jedná se o látkovou konstantu dané částice. Základní vztah má následující tvar (4) [3].

$$\sigma_0 = \frac{\ln(10) \varepsilon}{N_a} \quad (4)$$

- ε – extinkční koeficient
- N_a – Avogadrova konstanta

Účinný průřez částice je dále závislý na intenzitě dopadajícího záření. Se zvyšující se intenzitou záření dopadá na částici více fotonů a daná částice přechází častěji ze základního stavu S_0 do vyšších energetických stavů. Při příliš vysoké intenzitě dopadajícího záření již částice nemůže přecházet mezi stavy častěji a dostane se do saturace. V tuto chvíli již není schopna absorbovat dopadající fotony s původní pravděpodobností, což lze zachytit ve vztahu popisujícím změnu velikosti účinného průřezu na intenzitě záření (5) [3].

$$\sigma = \frac{\sigma_0}{1 + \frac{I}{I_s}} \quad (5)$$

- I – intenzita dopadajícího záření
- I_s – saturační intenzita

Saturační intenzitu je možné experimentálně změřit, jako látkovou konstantu v daných podmínkách, nebo využít následující teoretický vztah (6) [3].

$$I_s = \frac{h \nu}{2\sigma_0 \tau_D} \quad (6)$$

- h – Planckova konstanta
- ν – frekvence dopadajícího záření
- τ_D – doba života excitovaného stavu

Je-li známa intenzita dopadajícího záření v poloze dané částice a zároveň její účinný průřez, je možné dle následujícího vztahu získat hodnotu počtu fotonů dopadajících na částici za sekundu (7) [4].

$$f_F = \frac{\sigma I}{h \nu} \quad (7)$$

- σ – účinný průřez částice
- I – intenzita záření v dané poloze částice
- h – Planckova konstanta
- ν – frekvence záření

Převrácená hodnota tohoto vztahu vyjadřuje periodu dopadu fotonů na částici, jinými slovy, vyjadřuje časový interval mezi dopadem dvou fotonů (8).

$$T_F = \frac{1}{f_F} \quad (8)$$

Uvažujeme-li soubor n částic se známou dobou života excitovaného stavu, pak počet excitovaných částic v čase t je dán exponenciálním rozdělením. Stejným způsobem lze uvažovat o tom, s jakou pravděpodobností je jedna částice, jež byla excitována v čase $t(0)$, stále excitovaná v čase t (9).

$$n(t) = n_0 e^{\frac{-t}{\tau_D}} \quad (9)$$

- n_0 – počet částic excitovaných v čase $t(0)$
- t – čas
- τ_D – doba života excitovaného stavu

S využitím vztahů (7), (8) a (9) je možné sestavit vztah (10), jenž určuje počet fotonů, jenž molekula vystavená intenzitě I absorbuje za jednu sekundu.

$$F_{abs} = f_F (1 - e^{-\frac{T_F}{\tau_D}}) \quad (10)$$

- f_F – frekvence dopadu fotonů na částici
- τ_D – doba života excitovaného stavu
- T_F – perioda dopadu fotonů na částici
- F_{abs} – počet fotonů, jež částice absorbuje za časový interval t

2. Metody SMFD

Fluorescenční spektroskopie využívá opakovaného ozařování sledovaných molekul elektromagnetickým zářením. Následně probíhá detekce a analýza vyzářených fotonů. K dosažení potřebných výsledků je nutné využít vysoce kvalitních optických prvků v průběhu detekční cesty a fluorescenčních látek s vysokým kvantovým výtěžkem a extinkčním koeficientem. Detekční přístup lze rozdělit na dvě základní rodiny, a to metody zobrazovací a difuzní. Nejčastěji používanou zobrazovací metodou v SMFD je TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy), která je převážně využívána pro imobilizované částice. Pro metody založené na difuzi se nejčastěji setkáme s konfokální detekcí, studující částice volně difundující konfokálním objemem [5].

2.1.1 TIRFM

TIRFM představuje metodu nejčastěji využívanou pro studium imobilizovaných částic. Elektromagnetické záření emitované laserem prochází excitační optickou cestou a v oblasti sledovaného vzorku podstupuje úplnou reflexi. Tímto je vytvořena evanescenční vlna o šířce $100\text{--}200\text{ nm}$ nad povrchem vzorku, jež následně ozáří pouze molekuly v daném rozmezí. Tímto je výrazně omezena excitace molekul z ostatních částí vzorku, z čehož vyplývá zisk signálu, který je minimálně zatížen pozadím. Vyzářené fluorescenční fotony jsou poté přiváděny detekční cestou na CCD (Charge-Coupled Device) čip pro další zpracování. Tato

metoda poskytuje obrázky, nebo přímo videa jednotlivých molekul, z nichž lze získat kinetiku v reálném čase. Nevýhodami této metody jsou relativně nízké časové rozlišení s nejkratší dobou expozice snímku kolem 30 milisekund a dále pak ovlivnění kinetik a konformačních prostor imobilizací molekul k podložce. Naopak výhodou při sledování imobilizovaných vzorků je dlouhá expoziční doba v řádech minut [5].

2.1.2 Difuzní konfokální mikroskopie

Tato metoda, jejíž simulací se převážně zabývá tato práce, je využívána pro studium volně se pohybujících molekul a bude rozebrána podrobněji. Laserový svazek je zde fokusován do ohniska umístěného ve sledovaném vzorku. Tímto ohniskem, označovaným jako CV (Confocal Volume), volně difundují sledované molekuly. Molekuly absorbují dopadající elektromagnetické záření, které následně emitují jako fluorescenční záření. To je následně odděleno od excitačního svazku a po průchodu detekční cestou zachyceno fotonovým detektorem. Tato metoda poskytuje několik výhod. Díky velmi malému konfokálnímu objemu je při nízké koncentraci částic zajištěna excitace a následná emise fotonů pouze z jedné částice v konkrétním čase. Další výhodou je, že konformace a kinetiky volně difundujících molekul nejsou ovlivněny imobilizací jako v případě TIRFM. Kinetiku je možné sledovat pomocí FRET (Förster Resonance Energy Transfer), pokud je v detekční cestě nastavena selekce stanovených vlnových délek pomocí dichroických zrcadel. Nevýhodou této metody je krátká expoziční doba molekul proplouvajících konfokálním objemem, pohybující se mezi stovkami mikrosekund až stovkami milisekund [5].

Šíření světla v konfokální mikroskopii v experimentu a simulaci

Jedním ze základních parametrů ovlivňujících měření metodou konfokální mikroskopie je intenzita a prostorové rozložení excitačního svazku. Máme-li zdroj koherentního elektromagnetického záření definované vlnové délky, pak z tohoto zdroje se prostorem šíří elektromagnetické záření, jehož výkon je roven vztahu (11) [6].

$$P = n \frac{h \nu}{t} \quad (11)$$

- n – počet fotonů
- h – Planckova konstanta
- ν – frekvence záření

Takovéto zdroje záření mají většinou uniformní nebo normální rozdělení intenzity svazku. Pro uniformní rozdělení pak při dopadu záření na plochu pro intenzitu platí (12).

$$I = \frac{P}{A} \quad (12)$$

- P – výkon
- A – plocha

Nicméně v konfokální mikroskopii se převážně využívá záření s normálním rozdělením. Intenzita záření šířící se do prostoru z ohniska je pak dána vztahem (13) [6].

$$I(r, z) = I_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{W_{xy}^2}} e^{-\frac{2(z^2)}{W_z^2}} \quad (13)$$

- I_0 – maximální intenzita
- W_{xy} – poloměr CV v rovině x, y
- W_z – poloměr CV ve směru osy z

V rovině konfokálního ohniska x, y pro $z(0)$ je pak rozdělení intenzit dáno vztahem (14).

$$I(r) = I_0 e^{\frac{-2(x^2+y^2)}{W_{xy}^2}} \quad (14)$$

Vzhledem k tomu, že u laserových diod je standardně udávána pouze hodnota výkonu, je nutné zjistit hodnotu maximální intenzity svazku dopadajícího do CV z celkového výkonu diody. Ten lze vypočítat integrací vztahu (14) přes známou plochu (15).

$$\iint_{00}^{2\pi r} I_0 e^{\frac{-2r^2}{W_{xy}^2}} r dr d\varphi \quad (15)$$

Výsledkem integrace je vztah popisující celkový výkon procházející plochou r (16) [6].

$$P(r, z) = \frac{1}{2} \pi I_0 W_{xy}^2(0) \left(1 - e^{\frac{-2r^2}{W_{xy}^2(z)}}\right) \quad (16)$$

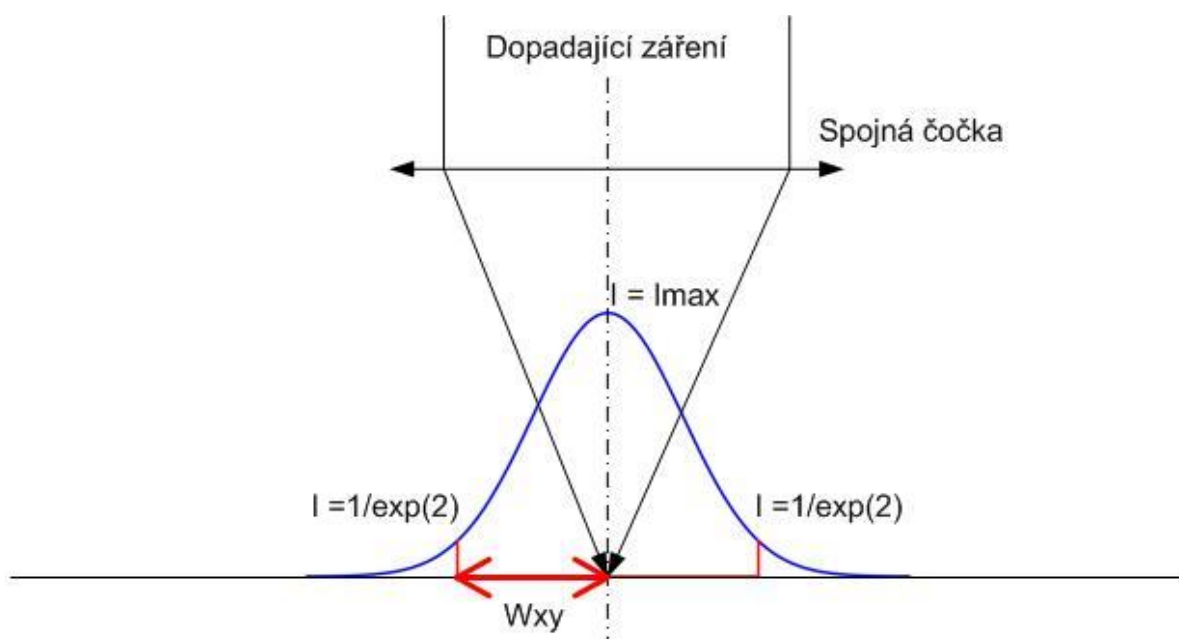
Zde platí, že P_0 je celkový výkon vyzářený zdrojem.

$$P(r, z) = P_0 \left(1 - e^{\frac{-2r^2}{W_{xy}^2(z)}}\right) \quad (17)$$

Ze vztahu (17) lze při limitním přechodu pro r jdoucím k nule získat maximální intenzitu I_0 pro libovolnou hodnotu z (18).

$$I_0(z) = \frac{2 P_0}{\pi W_{xy}^2(z)} \quad (18)$$

Hranice CV v ohniskové rovině jsou definovány velikostí poloměru svazku W_{xy} , kde má intenzita záření hodnotu $1/\exp(2)$ maximální intenzity I_0 . Zároveň platí, že v ohniskové rovině prochází CV $1-1/\exp(2)$, tedy přibližně 0,865 celkového výkonu, jak je zobrazeno na **Obr. 3** [6].



Obr. 3. Rozdělení intenzity záření dopadajícího do ohniskové roviny konfokálního objemu. Světelné záření je fokusováno do ohniska, v němž má intenzita normální rozdělení. Intenzita záření o hodnotě $1/\exp(2)$ maximální hodnoty I_0 definuje poloměr svazku W_{xy} . Kruhem s poloměrem W_{xy} pak prochází $1-1/\exp(2)$ z celkové energie.

2.2 Brownův pohyb

V roce 1827 skotský botanik Robert Brown pozoroval náhodné pohyby pylových zrněk ve vodě. Tento náhodný pohyb je způsoben neustálými srážkami molekul, díky nimž dochází k jejich neuspořádanému pohybu. K tomuto jevu dochází jak v plynném, tak v kapalném prostředí při teplotách větších než absolutní nula. Znalost fyzikálních zákonů ovlivňujících difuzi částic v kapalném roztoku je zásadně důležitá pro výzkum v oblasti difuzní konfokální mikroskopie, jež právě těchto jevů využívá [7].

Translační difuzní koeficient

Schopnost látky difundovat prostředím je závislá na několika parametrech, které jsou shrnuty v translačním difuzním koeficientu částic. Tento koeficient charakterizuje schopnost částic difundovat daným prostředím. Rychlost pohybu částic je přímo úměrná jeho velikosti. Vztah popisující difuzi odvodili Albert Einstein, George Stokes a William Sutherland a je znám jako Stokes-Einsteinova rovnice (19) [8].

$$D_t = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_h} \quad (19)$$

- k_B – Boltzmannova konstanta
- T – teplota
- η – dynamická viskozita roztoku
- R_h – Stokesův poloměr

Rotační difuzní koeficient

Objekty difundující roztokem podléhají nejen translaci, ale zároveň i rotaci. Tento parametr nabývá na důležitosti, uvažujeme-li objekt difundující roztokem (lipidický váček, bakterii), uvnitř nějž se pohybují fluorescenční molekuly. Pohyb těchto molekul je následně ovlivněn jejich vlastním translačním difuzním koeficientem, dále translačním difuzním koeficientem vnějšího objektu a zároveň rotačním difuzním koeficientem vnějšího objektu.

Vztah pro rotační difuzní koeficient je založen na stejných odvozeních jako vztah pro translační difuzní koeficient a má tedy podobný tvar **(20)** [9].

$$D_r = \frac{k_B T}{8 \pi \eta R_h^3} \quad (20)$$

Difuzní rovnice – Druhý Fickův zákon

Je-li znám difuzní koeficient, je možné si položit otázku, do jaké vzdálenosti může náhodná částice difundovat v časovém intervalu t . Pro lepší názornost je problematika probrána v jedné dimenzi pro funkci koncentrace částic. Změna koncentrace částic c v čase a prostoru je dána difuzní rovnicí **(21)** [8].

$$\frac{dc}{dt} = D_t \frac{d^2c}{dx^2} \quad (21)$$

Řešením této diferenciální rovnice je vztah **(22)**, jenž popisuje koncentraci částic v poloze x a čase t . Z tvaru řešení je zřejmé, že má tvar distribuční funkce normálního rozdělení [8].

$$c(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4 \pi D_t t}} e^{\frac{-x^2}{4 D_t t}} \quad (22)$$

Uvažujeme-li tedy soubor N částic, pak střední hodnota velikosti posunu částic v časovém intervalu t je rovna směrodatné odchylce daného rozdělení **(23)** [8].

$$\bar{x} = \sigma = \sqrt{2 D_t t} \quad (23)$$

Pro rotační pohyb okolo jedné osy pak platí **(24)** [9].

$$\bar{\varphi} = \sigma = 2\sqrt{D_r t} \quad (24)$$

2.3 FCS

FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) je známa od počátku sedmdesátých let minulého století, kdy ji v roce 1972 poprvé představili Magde, Elson, a Webb. Nicméně experimentální měření prováděná v této době byla zatížena nízkým poměrem signálu vůči pozadí a nízkou efektivitou detekce, což vyústilo v nedostatečnou citlivost. Tato metoda byla během následujících let dále vyvíjena spolu s kvalitnějšími měřicími přístroji a posléze ji v roce 1993 uvedl Rigler a spol. pro konfokální mikroskopii [10].

Typické uspořádání pro FCS

V současnosti se FCS nejčastěji kombinuje s konfokální mikroskopií. Využívá se zde fyzikálního principu Brownova pohybu, který je způsoben neustálými srážkami molekul v roztoku. Tyto srážky způsobují difuzi částic v objemu roztoku. Problematikou Brownova pohybu se ve své práci také zabýval Albert Einstein v roce 1905 [8]. Molekuly pohybující se v roztoku volně difundují konfokálním objemem, kde jsou vystaveny elektromagnetickému záření fokusovaného svazku excitačního laseru. Při následné deexcitaci pak vyzáří fotony. Ty jsou dále snímány detekční linkou a zaznamenány na fotonovém detektoru [11], [12].

Teorie FCS

FCS je založena na statistickém zpracování fluktuací naměřených intenzit. Zkoumá korelaci, jinými slovy míru podobnosti intenzit v určeném časovém intervalu. Fluorescenční intenzita v čase $I(t)$ je porovnávána se střední hodnotou intenzit $\langle I(t) \rangle$ v rámci celého měření (25) [11].

$$\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle \quad (25)$$

S využitím těchto odchylek pak lze sestavit vztah pro ACF (Autocorrelation Function) **(26)** [11].

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (26)$$

Ze získané ACF **(26)** lze následně analýzou dle teoretického modelu **(27)** vypočítat difuzní čas a střední hodnotu počtu molekul přítomných v efektivním CV. Dostupných teoretických modelů je hned několik, liší se například dle základních předpokladů, zda difundující molekuly přecházejí do tripletního stavu či ne, nebo zda při difuzi působí vnější síla. Základní teoretický model pro normální difuzi má tvar **(27)** [11].

$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{\tau}{t_d}\right)\right) \left(1 + r^{-2} \left(\frac{\tau}{t_d}\right)\right)^{\frac{1}{2}}} \quad (27)$$

- t_d – difuzní čas
- r – poměr axiálního a laterálního rozměru CV

Analýzou ACF pomocí teoretického modelu lze získat následující volné parametry. Hodnota $G(0)$ je nepřímo úměrná střední hodnotě počtu částic přítomných v konfokálním objemu a při známé velikosti tedy následně i koncentraci částic v roztoku **(28)** [11].

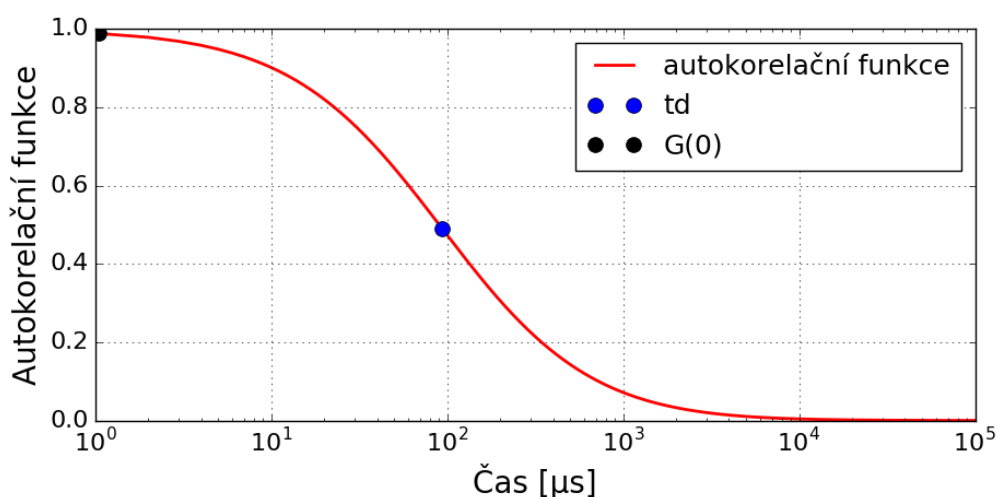
$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} \quad (28)$$

Hodnota t_d představuje difuzní čas, tedy střední dobu difuze částic konfokálním objemem, z níž lze dále určit difuzní koeficient (29) [11].

$$D_c = \frac{W_{xy}^2}{4 t_d} \quad (29)$$

- W_{xy} – laterální poloměr konfokálního objemu

Typicky se autokorelační funkce zobrazuje v logaritmickém měřítku pro nezávislou proměnnou (Obr. 4).



Obr. 4. Autokorelační funkce. Hodnota t_d představuje střední dobu difuze částic konfokálním objemem, $G(0)$ je hodnota autokorelační funkce v počátečním čase $t(1)$. Pro krátké časové intervaly vykazuje funkce relativně vysoké hodnoty odpovídající korelujícím intenzitám, v delších časových intervalech spolu již intenzity nesouvisejí a tomu odpovídají hodnoty blíží se nule.

Platnost teoretických modelů FCS v ohraničeném prostoru

Teoretické modely využívané pro interpretaci ACF jsou převážně založeny na měřeních difuze ve volném roztoku.

Obecně můžeme za volný roztok uvažovat prostor natolik velký, že se v něm částice mohou pohybovat bez omezení. Jinými slovy částice difundující konfokálním objemem připlouvají z nekonečna a okrajové podmínky, kdy jsou částice na rozmezí roztoku a okolního prostředí omezujícího jejich pohyb, lze zanedbat.

S pokračujícím výzkumem v oblasti jedno-molekulární mikroskopie se nabízí nové možnosti zkoumat chování a pohyb částic v omezeném prostoru, kupříkladu uvnitř bakterie, mikrofluidních zařízení a dalších, proto je zde nutné podotknout, že s rostoucím omezením vnějšího prostoru pro pohyb částic tyto modely výrazně ztrácejí přesnost, jak je dokázáno v praktické části této práce.

2.4 FRET

Försterův rezonanční přenos energie byl poprvé pozorován v počátcích dvacátého století. Významnými osobnostmi, jež se zabývaly jeho výzkumem, byli Francis Perrin a Theodor Förster, který jako první v roce 1946 ve své práci teoreticky popsal mechanismy neradiativního přenosu energie mezi dvěma opticky aktivními částmi molekuly označovanými jako donor a akceptor. V průběhu dalších desítek let byl FRET nadále zkoumán, přičemž se jako metoda vhodná pro sledování konformací molekul a kinetických procesů v nich stal nedílnou součástí SMFD [2].

Mechanismus FRET lze popsat jako neradiační přenos energie mezi dvěma molekulami, způsobený dipól-dipólovou interakcí emisního dipólu donoru a absorpčního dipólu akceptoru. Absorbuje-li molekula donoru foton, získá kvantum energie, které může dále ztratit několika možnými způsoby, například fluorescencí, zhášením, přechodem do tripletního stavu a následnou fosforescencí, vibrační relaxací nebo právě rezonančním přenosem energie mezi donorem a akceptorem. Tento jev nastává typicky ve vzdálenostech do 100 \AA [2].

Rychlostní konstanta FRET

Pro popsání problematiky FRET je nutné zavést několik pojmů. Prvním z nich je rychlostní konstanta. Je-li molekula donoru excitována, může při deexcitaci ztratit energii několika způsoby, jedním z nich je přenos energie pomocí FRET. Odevzdání kvanta energie trvá určitý čas, jehož reciprokou hodnotou je rychlostní konstanta, jejíž výpočet odvodil Theodor Förster (30) [2].

$$k_{FRET} = \frac{9000(\ln 10) k^2 Q_D J}{128 \pi^5 n^4 N_A \tau_D R^6} \quad (30)$$

- Q_D – kvantový výtěžek bez přítomnosti akceptoru
- k^2 – dipól-dipólový orientační faktor
- J – překryvový integrál mezi spektry donoru a akceptoru
- N_A – Avogadrova konstanta
- n – refraktivní index media mezi donorem a akceptorem
- τ_D – doba života fluorescence bez přítomnosti akceptoru
- R – vzdálenost mezi donorem a akceptorem

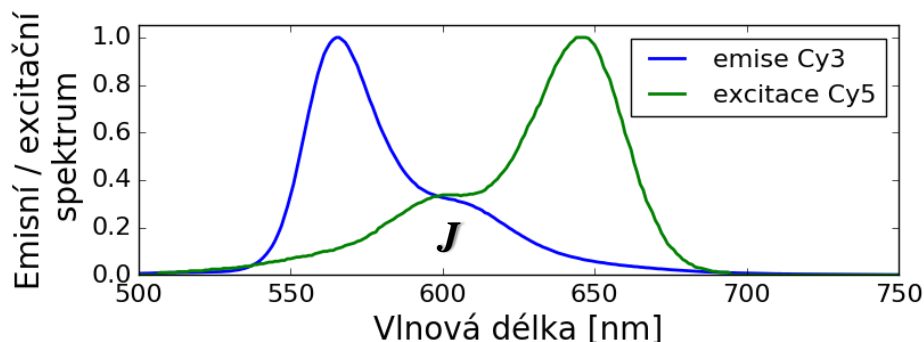
Kvantový výtěžek Q_D

Kvantový výtěžek je definován jako poměr všech radiativních procesů vůči součtu všech radiativních a neradiativních procesů (31) [2].

$$\Phi = \frac{K_r}{K_{nr} + K_r} \quad (31)$$

Překryvový integrál mezi spektry donoru a akceptoru J

Plocha, kterou se překrývají emisní spektrum donoru a absorpční spektrum akceptoru (**Obr. 5**).



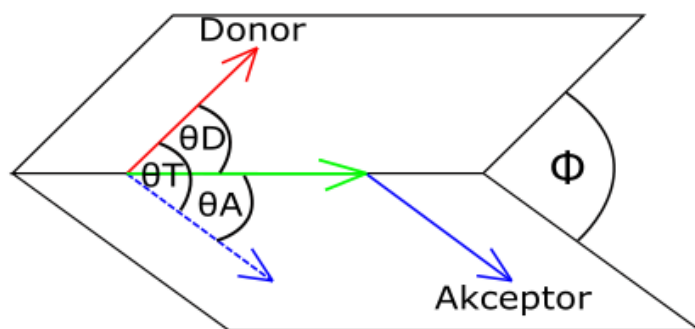
Obr. 5. Překryvový integrál. Emisní spektrum fluoroforu Cy3 se částečně překrývá s absorpčním spektrem Cy5.

Dipól-dipólový orientační faktor k

Účinnost přenosu energie mezi dvěma molekulami vlivem FRET je z velké části ovlivněna vzájemnou orientací tranzitních dipólových momentů. Každá molekula má absorpční a emisní dipólový moment. Ty lze chápat jako vektory vyjadřující změnu prostorové konformace elektronového obalu molekul při absorpci či emisi energetického kvanta. Dipól-dipólový orientační faktor k (32) vyjadřuje vzájemnou orientaci těchto přechodových dipólových momentů molekuly donoru a molekuly akceptoru (**Obr. 6**). Může nabývat hodnot mezi 0 pro kolmou orientaci, 1 pro paralelní orientaci až 4 pro kolineární orientaci. Pro náhodnou orientaci je běžně užívaná hodnota 2/3 [13].

$$k = \cos(\theta_T) - 3 \cos(\theta_D) \cos(\theta_A) \quad (32)$$

- θ_T – úhel mezi emisním dipólovým momentem donoru a absorpčním dipólovým momentem akceptoru
- θ_D – úhel mezi emisním dipólovým momentem donoru a vektorem mezi těmito dvěma dipóly
- θ_A – úhel mezi absorpčním přechodovým dipólem akceptoru a vektorem mezi těmito dvěma dipóly



Obr. 6. Dipól-dipólový orientační faktor k . Je veličinou ovlivňující účinnost přenosu FRET, θ_A - úhel mezi absorpčním přechodovým dipólem akceptoru a vektorem mezi těmito dvěma dipóly, θ_D - úhel mezi emisním dipólovým momentem donoru a vektorem mezi těmito dvěma dipóly, θ_T - úhel mezi emisním dipólovým momentem donoru a absorpčním dipólovým momentem akceptoru.

Försterova vzdálenost

Ze vztahu (30) lze vyjádřit Försterovu vzdálenost R_0 při které je padesát procent excitační energie přeneseno vlivem FRET z donoru na akceptor (33) [2].

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10) k^2 Q_D J}{128 \pi^5 n^4 N_A} \quad (33)$$

Rychlostní konstantu FRET k_{FRET} pak lze vyjádřit vztahem (34) [2].

$$k_{FRET} = \frac{R_0^6}{\tau_D R^6} \quad (34)$$

Efektivita přenosu FRET

Nyní lze efektivitu přenosu FRET vyjádřit jako poměr rychlostní konstanty k_{FRET} vůči sumě všech rychlostních konstant (radiativních i neradiativních) donoru (35). Hodnoty efektivit FRET se pohybují v rozmezí nula až jedna [2].

$$E_{FRET} = \frac{k_{FRET}}{k_r + k_{nr}} \quad (35)$$

Korekce FRET při jeho využití v SMFD

Jak již bylo řečeno, FRET je využíván pro sledování rozměrů, orientací a obecně změn konformací sledovaných molekul, případně k rozlišení populací ve sledovaném roztoku. Typickým uspořádáním při využití v konfokální mikroskopii je sledování volně difundujících molekul proplovajících konfokálním objemem. K nim jsou připevněny molekula donoru a molekula akceptoru energie. Při průchodu konfokálním objemem jsou ozařovány laserem s vlnovou délkou odpovídající excitačnímu spektru donoru. Donor při následné deexcitaci ztrácí energii radiačními a neradiačními procesy. Část této energie vyzáří v emisním spektru a část energie předává také akceptoru vlivem FRET. Akceptor následně část z přijaté energie vyzáří ve svém spektru. Vzhledem k tomu, že emisní spektra akceptoru a donoru jsou umístěná v rozdílných vlnových délkách, lze pomocí vhodně nastavené detekční optické linky tyto vyzářené fotony odseparovat do dvou odlišných kanálů. Porovnáním naměřených intenzit v akceptorovém kanálu vůči součtu akceptorového a donorového kanálu je získán obraz FRET v čase. Nicméně tato hodnota je zatížena několika nepřesnostmi, jež vytvářejí diferencii mezi reálným FRET a jeho naměřenou hodnotou (36). Tato hodnota je známá jako „Proximity Ratio“ (PR) [14].

$$E_{PR} = \frac{I_A}{I_A + I_D} \quad (36)$$

- E_{PR} – Proximity Ratio
- I_A – intenzity naměřené v akceptorovém kanále
- I_D – intenzity naměřené v donorovém kanále

Korekce přímé excitace

Excitační spektra donoru a akceptoru se často překrývají. Při excitaci donoru následně dochází k nežádoucí přímé excitaci akceptoru. Označíme-li tuto chybu jako α , pak korekce této chyby se provádí dle vztahu (37) [15].

$$E_{DE} = \frac{I_A - \alpha I_D}{I_A + I_D} \quad (37)$$

Korekce spektrálního propouštění mezi kanály, tzv. „cross-talk“

Tento termín vyjadřuje protékání fotonů emitovaných donorem do akceptorového kanálu. Chyba je způsobena nedokonalostí optických prvků. Výsledkem je nesprávný poměr naměřených fotonů v akceptorovém a donorovém kanálu. Standardně se tato chyba označuje jako β . Korekce této chyby se provádí dle vztahu (38) [14].

$$E_{\beta_corr} = \frac{I_A - \beta I_D}{(I_A - \beta I_D) + I_D} \quad (38)$$

Korekce γ

Další nepřesnosti, jimiž jsou zatíženy získané hodnoty FRET jsou:

- a) rozdílné kvantové výtěžky donoru a akceptoru,
- b) rozdílná efektivita detekce optickou linkou pro akceptor a donor, jež je dána nedokonalostmi optických prvků.

Tyto chyby jsou zahrnuty v korekčním faktoru γ (39) [14].

$$\gamma = \frac{Q_A}{Q_D} \frac{D_A}{D_D} \quad (39)$$

- Q_A – kvantový výtěžek akceptoru
- Q_D – kvantový výtěžek donoru
- D_A – efektivita detekce v akceptorovém kanálu
- D_D – efektivita detekce v donorovém kanálu

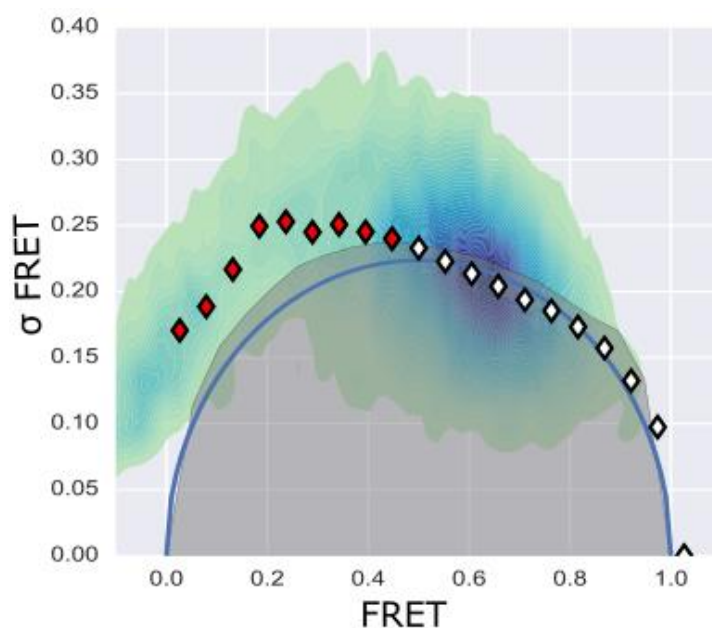
Následná korekce těchto chyb se pak provádí dle vztahu (40) [14].

$$E_{\gamma_corr} = \frac{I_A}{I_A + \gamma I_D} \quad (40)$$

2.5 BVA

Ze statistických distribucí FRET je možné rozlišit heterogenitu subpopulací ve sledovaném vzorku. Nicméně touto cestou nelze zjistit, zda tato heterogenita pochází z více populací statických molekul, nebo z přechodů mezi jednotlivými konformacemi dynamických molekul [16].

Pro získání této informace byla vyvinuta metoda BVA (Burst Variance Analysis), analýza variance FRET v jednotlivých záblescích. Tato metoda detekuje dynamické přechody FRET jednotlivých molekul při průchodu konfokálním objemem tak, že porovnává fluktuační FRET v samostatných záblescích. Získané odchylky od středních hodnot FRET dále porovnává s teoretickým modelem pro FRET statických molekul. Umožňuje tedy získat další informace o sledovaném vzorku a rozlišit statické populace od dynamických. Výsledky se běžně zobrazují v grafech (**Obr. 7**) [16].



Obr. 7. BVA vlásenek DNA. V grafu lze pozorovat experimentální data naměřená na krátké vlásence DNA, jež přechází ze složené statické konformace s hodnotou FRET 0,6 (diamanty s bílou výplní) do volně pohyblivých nesložených konformací s nízkou hodnotou FRET (diamanty s červenou výplní). Modrá křivka představuje teoretický model pro FRET statických molekul (41), šedá zóna konfidenční interval (44). V místech, kde jsou hodnoty odchylek FRET větší než hodnoty teoretického modelu a zároveň vystupují z konfidenčního intervalu (nízký FRET, diamanty s červenou výplní) jsou konformace DNA považovány za dynamické. Naopak konformace charakterizované vysokým FRET vykazují statické chování (bílé diamanty na modré lince).

Teoretický model pro odchylky FRET statických molekul

Očekávaná odchylka FRET u statických populací molekul bez zatížení signálu šumem pochází z binomického rozdělení, její teoretická hodnota je vyjádřena dle vztahu (41), kde E je hodnota daného FRET a n počet fotonů [16].

$$\sigma_E = \sqrt{\frac{E(1-E)}{n}} \quad (41)$$

Střední hodnota FRET a směrodatné odchylky v záblesku

Pro výpočet BVA je nejprve nutné vyhledat v získaných intenzitách záblesky pocházející od jednotlivých molekul. Pro výpočet standardní odchylky v rámci jednoho záblesku je tento záblesk rozdělen na N po sobě jdoucích oken obsahujících n fotonů. V každém z těchto oken je vypočtena střední hodnota FRET E_i . Následně je z hodnot E_i vypočtena střední hodnota FRET v celém záblesku μ_B a směrodatná odchylka σ_B (42). Tento krok se provede postupně pro všechny nalezené záblesky [16].

$$\sigma_B = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (E_i - \mu_B)^2}, \text{ kde } \mu_B = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N E_i \quad (42)$$

Přepočítání FRET a středních hodnot směrodatných odchylek ze všech nalezených záblesků do intervalů

V případě krátkých záblesků obsahujících pouze několik oken může dojít k nepřesnostem ve výpočtu. Z tohoto důvodu se střední hodnoty FRET získané z jednotlivých záblesků ještě dále rozdělí do předem určených intervalů a z jejich směrodatných odchylek se dále počítají střední odchylky a mediány. Jedna z možností výpočtu je následující. Rozmezí hodnot FRET mezi 0 a 1 se rozdělí na 20 intervalů o šířce $w = 0,05$. Střední hodnoty intervalů se určí dle

$S_i = \frac{w}{2} + (n_i w)$, kde $n = \{0, 1, 2, \dots, 19\}$ s dolními mezemi $L_i = S_i - \frac{w}{2}$ a horními mezemi $U_i = S_i + \frac{w}{2}$. Následně se vypočtou střední hodnoty odchylek σ_{FRET} v daných intervalech FRET (43) [16].

$$\sigma_{FRET}^{L \leq \mu_B < U} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N (\sigma_{Bi} - \mu)^2} \quad \text{kde} \quad \mu = \frac{1}{N} \sum_i^N \mu_B \quad (43)$$

Simulace Monte Carlo pro statistickou interpretaci získaných výsledků BVA

Pro statistickou interpretaci získaných výsledků je využívána simulace očekávaných výsledků pro statické hodnoty FRET (44). Zde F_i představuje náhodnou hodnotu získanou z binomického rozdělení s parametry $B(n, \mu_B)$. Po zvoleném počtu iterací pro všechny μ_B je získán konfidenční interval jako funkce $P(\sigma)$ [16].

$$\sigma_{MC_FRET}^{L \leq \mu_B < U} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N \left(\frac{F_i}{n} - \mu_{MC}\right)^2} \quad \text{kde} \quad \mu_{MC} = \frac{1}{N} \sum_i^N \frac{F_i}{n} \quad (44)$$

3. Výsledky

V praktické části práce bylo provedeno několik simulací s využitím FCS, FRET a BVA, na nichž byla ověřena funkčnost simulačního balíčku a zároveň zkoumány limitace metod použitých pro vyhodnocení dat.

Účelem simulací vyhodnocených metodou FCS bylo ověření platnosti známých teoretických modelů FCS pro difuzi molekul konfokálním objemem, a to s důrazem na omezení vnějšího ohraničení prostoru a různé tvary vnějšího prostoru. Tyto okrajové podmínky nejsou v teoretických modelech zohledněny.

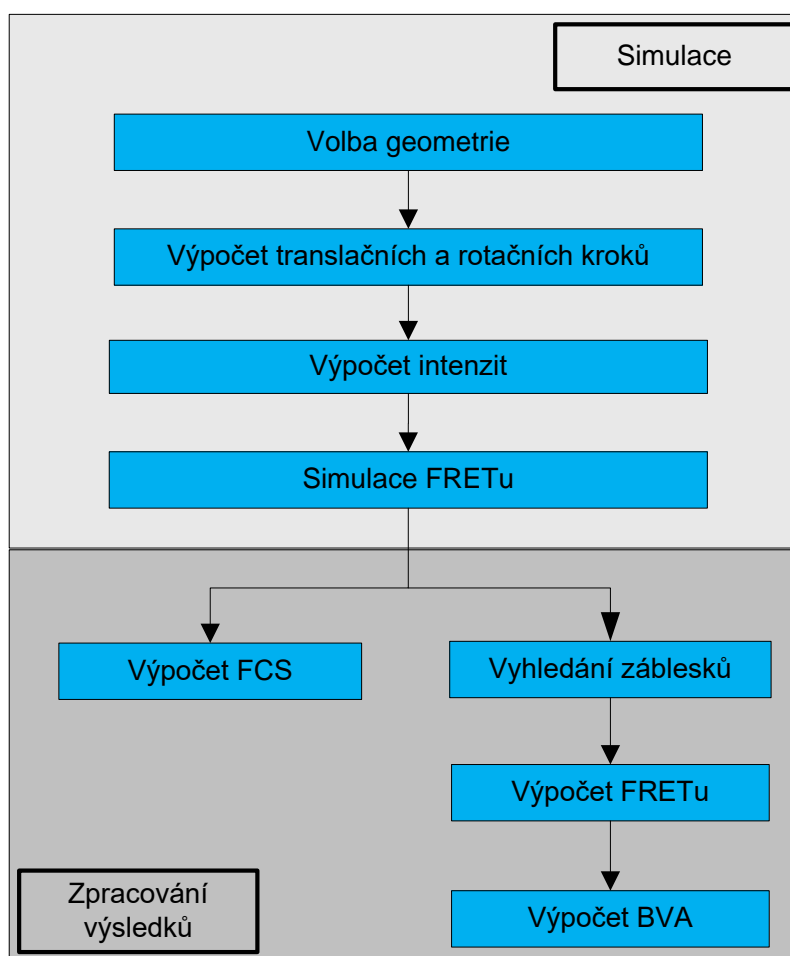
Pro simulace FRET byly z intenzitních řad zpětně vypočteny hodnoty FRET a porovnány s vloženými hodnotami.

V simulacích s využitím BVA byly porovnány výsledky s různým nastavením FRET, a to jak statickým, tak dynamickým. Dále pak rozlišovací schopnost metody BVA v závislosti na poměru rychlosti přechodů FRET mezi jednotlivými stavy a délkou nalezených intenzitních záblesků.

Před tím, než budou diskutovány výsledky, je potřebné rozebrat strukturu simulačního balíčku a parametry, za kterých byly simulace prováděny.

3.1 Prostředí simulace

Vyvinutý simulační software je určený převážně pro difuzní konfokální mikroskopii. Pro jeho tvorbu je využit programovací jazyk Python [17]. Pro spuštění simulací je doporučeno využívat některého z dostupných výpočetních center, jež umožní plné využití zabudovaných paralelních výpočtů. Simulační balíček je připraven a byl přímo testován ve výpočetním centru MetaCentrum [18]. Základní blokové schéma vypadá dle **Obr. 8**.



Obr. 8. Blokové schéma simulačního softwaru. V části simulace je nejprve zvolena geometrie, a to mezi koulí, elipsoidem a válcem, následně jsou vypočteny translační a rotační kroky, poté proběhne výpočet intenzit a FRET. Poté probíhá zpracování výsledků, v této části lze vyhodnotit FCS, vyhledat záblesky v intenzitním vektoru a z nich zpětně dopočítat FRET a následně BVA.

3.1.1 Základní parametry

Před spuštěním samotné simulace je v konfiguračním souboru potřebné nastavit parametry pro její běh. Konkrétní nastavení těchto parametrů umožňují simulovat nejrůznější možné scénáře.

Mezi základní technické parametry patří následující.

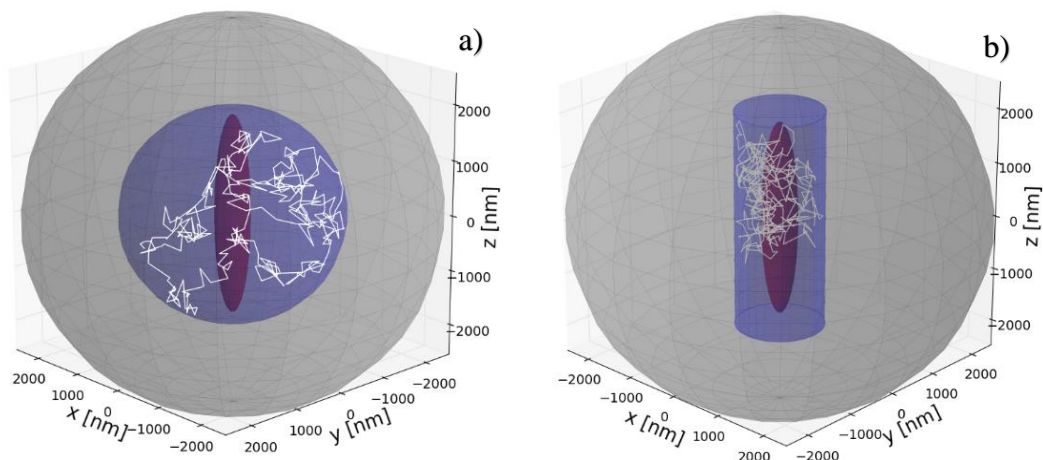
1. Časový krok – nejmenší časový interval mezi změnami v pozicích molekul a z nich vyplývajících intenzitách a dalších výpočtech.
2. Počet kroků – spolu s časovým krokem určuje celkovou délku simulace.
3. Počet procesů – určuje počet možných paralelních výpočtů. Jednu částici lze počítat pouze v jednom procesu, z toho důvodu tento parametr nabývá na významu při simulacích více částic.
4. Počet částic – nastavuje počet částic, jejichž polohy a intenzity budou v rámci simulace počítány.

Tabulka 1. Základní parametry nastavení simulace

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota	Jednotka
1	Časový krok	1	μs
2	Počet kroků	1 000 000	
3	Počet procesů	16	
4	Počet částic	10 000	

3.1.2 Parametry geometrie

Geometrie simulace zahrnuje tři základní tvary. Objekt konfokálního objemu, vnější objekt ve tvaru koule či elipsoidu (vnější ohraničení, představující např. roztok), který definuje meze, v nichž se může pohybovat vnitřní objekt. Dále pak vnitřní objekt pohybující se ve vnějším objektu, který může nabývat tvarů koule, elipsoidu nebo válce. Uvnitř vnitřního objektu se dále pohybují molekuly. Tato sestava umožňuje simulovat lipidický váček, bakterii, případně mikrofluidní zařízení v roztoku. Možné geometrie jsou zobrazeny na **Obr. 9**.



Obr. 9. Geometrie objektů používaných v simulaci. Červenou barvou je vyznačen prostor CV. Modrou barvou je zobrazen vnitřní objekt, pro a) kouli, případně elipsoid, pro b) válec. Bílá linka značí pohyby částice uvnitř vnitřního objektu. Šedou barvou je vyznačena geometrie vnějšího objektu.

Geometrie konfokálního objemu

Tvar CV je definován vztahem (13) popisujícím šíření světla prostorem ze světelného svazku fokusovaného do ohniska. Pro potřeby simulace je definován dvěma parametry.

1. Laterální poloměr – poloměr CV pro osy x a y .
2. Axiální poloměr – poloměr CV pro osu z .

Tabulka 2. Parametry geometrie konfokálního objemu

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota	Jednotka
1	Laterální poloměr	300	<i>nm</i>
2	Axiální poloměr	1800	<i>nm</i>

Geometrie vnitřního objektu

Vnitřní objekt ve tvaru koule, nebo elipsoidu může představovat např. bakterii, či lipidický váček pohybující v roztoku (vnějšího objektu). Pro kouli, případně elipsoid lze nastavit:

1. Poloměr osy x – poloměr vnitřního objektu ve směru osy x .
2. Poloměr osy y – poloměr vnitřního objektu ve směru osy y .
3. Poloměr osy z – poloměr vnitřního objektu ve směru osy z .

Vnitřní objekt ve tvaru válce, jenž je statický, může naopak představovat mikrofluidní zařízení. Pro tento tvar lze nastavit následující parametry:

4. Výšku válce.
5. Průměr válce.

Tabulka 3. Parametry geometrie vnitřního objektu

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota	Jednotka
1	Poloměr osy x	800	<i>nm</i>
2	Poloměr osy y	800	<i>nm</i>
3	Poloměr osy z	2000	<i>nm</i>
4	Výška válce	1000	<i>nm</i>
5	Průměr válce	500	<i>nm</i>

Geometrie vnějšího objektu

Vnější objekt může nabývat tvaru koule či elipsoidu a představuje prostor roztoku, v němž se pohybují částice, případně částice uzavřené ve vnitřním objektu. Správné nastavení rozměrů vnějšího objektu je základním předpokladem pro úspěšnost simulace. V případě příliš malých rozměrů nastává efekt ohraničení, kdy přestávají platit teoretické modely, podle nichž se dále počítá ACF. Naopak příliš velké rozměry vnějšího objektu při zachování konstantní koncentrace mají za následek velkou výpočetní náročnost simulace. Možné parametry jsou následující:

1. Poloměr osy x – poloměr vnějšího objektu ve směru osy x .
2. Poloměr osy y – poloměr vnějšího objektu ve směru osy y .
3. Poloměr osy z – poloměr vnějšího objektu ve směru osy z .

Tabulka 4. Parametry geometrie vnějšího objektu

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota	Jednotka
1	Poloměr osy x	3800	<i>nm</i>
2	Poloměr osy y	3800	<i>nm</i>
3	Poloměr osy z	5000	<i>nm</i>

3.1.3 Fyzikální parametry

Parametry vnitřního objektu

Pro vnitřní objekt ve tvaru koule či elipsoidu je dále potřebné nastavit translační a rotační difuzní koeficienty definující rychlost translace a rotace uvnitř vnějšího objektu.

1. Translační difuzní koeficient vnitřního objektu – definuje rychlost pohybu vnitřního objektu uvnitř vnějšího objektu.
2. Rotační difuzní koeficient vnitřního objektu – definuje rychlost rotace vnitřního objektu uvnitř vnějšího objektu.

Tabulka 5. Fyzikální parametry vnitřního objektu

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota pro lipidický váček o průměru 100 nm	Jednotka
1	Translační difuzní koeficient	4,3	$nm^2 \mu s^{-1}$
2	Rotační difuzní koeficient	1324	$rad^2 s^{-1}$

Parametry částic

Částic se týká pět základních parametrů.

1. Translační difuzní koeficient částic – definuje rychlost difuze částic v prostoru.
2. Extinkční koeficient – určuje míru absorpce fotonů dopadajících na částici.
3. Doba života excitovaného stavu – reciproká hodnota součtu všech radiativních a neradiativních rychlostních konstant.
4. Kvantový výtěžek donoru – poměr všech radiativních procesů donoru vůči součtu všech radiativních a neradiativních procesů donoru.
5. Kvantový výtěžek akceptoru – poměr všech radiativních procesů akceptoru vůči součtu všech radiativních a neradiativních procesů akceptoru.

Tabulka 6. Fyzikální parametry částic

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota pro Cy3	Jednotka
1	Translační difuzní koeficient částic	241	$nm^2 \mu s^{-1}$
2	Extinkční koeficient	150 000	$dm^3 cm^{-1} mol^{-1}$
3	Doba života excitovaného stavu	1,5e-9	s
4	Kvantový výtěžek donoru	0,15	
5	Kvantový výtěžek akceptoru	0,6 pro Cy5	

Parametry pro nastavení FRET

Pro FRET je potřebné nastavit hodnoty efektivity přenosu, a to v rozmezí 0 až 1. K nim se dále přičítají hodnoty získané z normálního rozdělení se směrodatnou odchylkou danou vztahem (41). Parametry „Doba FRET A“ až „Doba FRET D“ jsou použity jako λ pro generování časů z Poissonova rozdělení, během nichž FRET setrvává v daném stavu.

1.–4. – hodnoty efektivity FRET.

4.–8. – časový interval, během něž molekula setrvává v aktuálním stavu.

Tabulka 7. Parametry pro nastavení FRET

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota	Jednotka
1	Hodnota FRET A	0,2	
2	Hodnota FRET B	0,4	
3	Hodnota FRET C	0,6	
4	Hodnota FRET D	0,8	
5	Doba FRET A	100	μs
6	Doba FRET B	1000	μs
7	Doba FRET C	10 000	μs
8	Doba FRET D	50 000	μs

Pravděpodobnost přechodu FRET z jedné hodnoty do jiné je nastavena pomocí přechodové matice. Zde je pro ilustraci uvedena přechodová matice s uniformním rozdělením (45). V tomto případě tedy přechází FRET z aktuálního stavu do jakéhokoli dalšího se stejnou pravděpodobností.

$$\begin{array}{ccccc} & A & B & C & D & . \\ A & 0,25 & 0,25 & 0,25 & 0,25 & A \\ B & 0,25 & 0,25 & 0,25 & 0,25 & B \\ C & 0,25 & 0,25 & 0,25 & 0,25 & C \\ D & 0,25 & 0,25 & 0,25 & 0,25 & D \end{array} \quad (45)$$

Parametry týkající se zavedení chyb při simulaci FRET

Vzhledem k tomu, že úkolem simulace je co nejvíce se přiblížit reálným experimentům, jsou následujícími parametry zavedeny chyby vznikající při experimentálním měření FRET.

1. Hodnota spektrálního propouštění mezi kanály – vyjadřuje protékání fotonů emitovaných donorem do akceptorového kanálu.

2. Hodnota přímé excitace akceptoru – vyjadřuje nechtěnou přímou excitaci akceptoru excitačním laserem.

Tabulka 8. Parametry pro zavedení chyb FRET

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota
1	Hodnota spektrálního propouštění mezi kanály	0,05
2	Hodnota přímé excitace akceptoru	0,04

Parametry zdroje elektromagnetického záření

Tyto parametry přímo ovlivňují výsledky simulace. Při vysoké hodnotě nastaveného výkonu laseru dochází k saturaci ozařovaných molekul a z toho vyplývající změně naměřeného intenzitního profilu.

1. Výkon laseru – výkon excitačního laseru donoru.
2. Vlnová délka laseru – vlnová délka excitačního laseru donoru.

Tabulka 9. Parametry zdroje elektromagnetického záření

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota	Jednotka
1	Výkon laseru	100	μW
2	Vlnová délka laseru	532	nm

Efektivita detekce optickou linkou

Molekuly difundující konfokálním objemem vyzařují fluorescenční záření, to je přiváděno optickou cestou na detektor. Během této cesty dochází k významným ztrátám, které jsou dané optickými prvky a jsou odlišné pro frekvenční spektrum donoru a akceptoru.

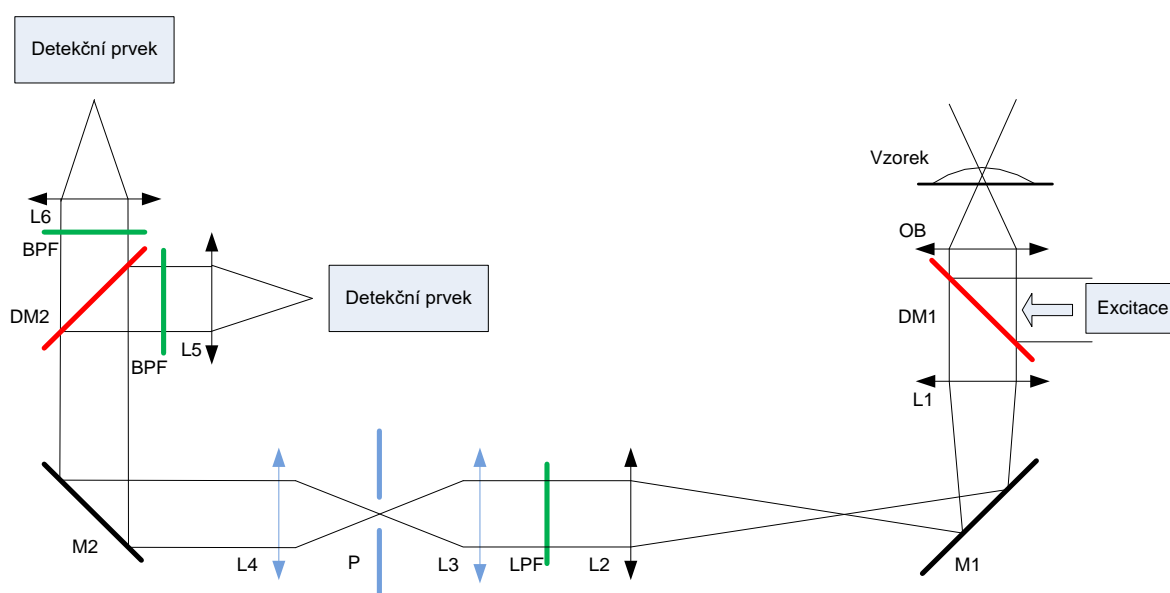
Tabulka 10. Parametry pro efektivitu detekce optickou linkou

Č.	Parametr	Ilustrační hodnota
1	Efektivita detekce v donorovém kanálu	0,03
2	Efektivita detekce v akceptorovém kanálu	0,04

3.2 Efektivita detekce

Při reálných měřeních dochází ke ztrátám na optických prvcích, a to jak v excitační, tak v detekční cestě. Intenzita excitačního záření v rovině vzorku bývá známa, a není tedy nutné tyto ztráty uvažovat. Nicméně fluorescenční záření je zachyceno až na fotonovém detektoru poté, co projde optickou detekční cestou. Při průchodu detekční cestou je část vyzářených fotonů ztracena a tuto ztrátu je potřebné zanést do výsledků simulace, protože výrazně ovlivňuje počet získaných fotonů.

Následující výpočty jsou prováděny s ohledem na konkrétní komponenty, z nichž se skládá optická linka v laboratoři jedno-molekulové spektroskopie na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Veškeré použité optické prvky mají jednopalcový průměr.



Obr. 10. Detekční cesta. Fotony vyzářené vzorkem procházejí detekční cestou, s následujícími komponentami: OB objektiv, DM1 dichroické zrcadlo oddělující vlnová spektra excitačního a fluorescenčního záření, DM2 dichroické zrcadlo oddělující vlnová spektra donoru a akceptoru, L1–L6 spojné čočky, M1 a M2 odrazová zrcadla usměřující tok fotonů, LPF filtr typu horní propust propouští vlnové délky nad 550 nm, BPF filtry typu pásmová propust propouští pouze vlnová spektra příslušející donoru a akceptoru, P štěrba, jež spolu s L3 a L4 vytváří prostorový filtr odstraňující část záření, jež není v optické ose a v rovině zaostření a definuje průměr detekčního objemu.

Ztráty způsobené detekčním úhlem objektivu

Uvažujeme-li vyzařující molekulu difundující uvnitř CV, pak tato molekula vyzařuje ve směru svého emisního přechodového dipólového momentu. Zároveň rychle rotuje, a lze ji tedy považovat za všesměrový bodový zdroj fotonů. Objektiv mikroskopu není schopen získat veškeré fotony, ale pouze ty, jež jsou vyzářeny pod určitým úhlem (46). Tento úhel je dán numerickou aperturou objektivu NA (Numerical Aperture) a refraktivním indexem imerzního oleje n [6].

$$\theta = \arcsin \frac{NA}{n} \quad (46)$$

Vyzařuje-li molekula všesměrově, pak všechny fotony projdou povrchem koule se sférickými úhy $\varphi = 2\pi$ a $\theta = \pi$.

$$S_{SPH} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} r^2 \sin\theta \, d\theta \, d\varphi = 2\pi r^2 (-\cos \pi + \cos 0) \quad (47)$$

Objektivem pak projde pouze část fotonů pod úhlem θ .

$$S_{OBJ} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta} r^2 \sin\theta \, d\theta \, d\varphi = 2\pi r^2 (-\cos \theta + \cos 0) \quad (48)$$

Efektivita detekce fotonů objektivem mikroskopu je pak rovna poměru těchto dvou povrchů a lze ji vyjádřit vztahem (49).

$$EF_{DET} = \frac{1 - \cos \theta}{2} \quad \text{kde } \theta = \arcsin \frac{NA}{n} \quad (49)$$

Kombinace objektivu Olympus APON 60 x 1,49 OTIRF s NA 1,49 [19] s imerzním olejem s refraktivním indexem 1,517 [20] zajišťuje efektivitu detekce přibližně 40 % z celkového počtu vyzářených fotonů.

Ztráty způsobené transmitancí objektivu

Transmitance pasivních optických prvků je vždy menší než jedna. Dochází zde částečně k odrazu, částečně k pohlcení a částečně k rozptylu procházejícího záření. Ztráty při transmitanci jsou dány především nedokonalostmi jak povrchové, tak objemové struktury materiálu, z něž je optický prvek sestaven, a obvykle jsou funkcí vlnové délky. Výrobce udává transmitanci objektivu Olympus APON 60x1,49 OTIRF v námi využívaných vlnových délkách 550–700 nm na úrovni hodnoty 0,9 [19].

Ztráty na dichroickém zrcadle DM1 (Dichroic Mirror)

Dichroické zrcadlo DM1 odráží excitační svazek o vlnové délce 532 nm směrem k rovině vzorku a zároveň zpětně filtruje tento svazek při jeho částečném odrazu. Jedná se o dichroické zrcadlo od firmy Edmund Optics propouštějící vlnové délky od hodnoty 552 nm [21]. Transmitanční charakteristika zrcadla DM1 byla naměřena a je zanesena v **Obr. 12** na konci této kapitoly.

Ztráty na dichroickém zrcadle DM2

Toto zrcadlo slouží k rozdělení fluorescenčního svazku na spektrum donoru a akceptoru. Jedná se o dichroické zrcadlo „#86–334; 552 nm, 25,2x35,6 mm“ od firmy Edmund Optics propouštějící vlnové délky od hodnoty 635 nm [22]. Transmitanční charakteristika zrcadla DM2 byla taktéž naměřena a je zobrazena v **Obr. 12**.

Ztráty na zrcadlech M1 a M2 (Mirror)

Zrcadla M1 a M2 slouží k usměrnění toku fotonů v optické lince. Jedná se o odrazivá stříbrem deponovaná zrcadla PF10 03P01 od firmy Thorlabs. Účinnost odrazu těchto zrcadel se udává jako reflektance, jež je poměrem odražených a dopadajících fotonů v požadovaném směru, jako funkce vlnové délky. Reflektance je zároveň závislá na polarizaci dopadajícího svazku a velikosti odrazného úhlu. Pro zrcadla M1, M2 byly využity informace od výrobce, jenž udává reflektanci v rozmezí vlnových délek $550\text{--}700\text{ nm}$ rovnou hodnotě 0,95 [23].

Ztráty na čočkách L1–L6 (Lens)

V optické lince slouží čočky k usměrnění toku fluorescenčního záření. Čočky L1 a L2 nastavují poloměr svazku vstupujícího do prostorového filtru, slouží tedy jako teleskop. L3 a L4 jsou částí prostorového filtru, L5 a L6 fokusují svazek záření do ohniska umístěného v rovině detekčních prvků. Na každé čočce dochází ke ztrátám způsobeným absorpcí, rozptylem a odrazem. V našem případě jsou použity achromatické dublety z materiálu N-BK7/SF5 od společnosti Thorlabs [24]. Vzhledem k tomu, že všechny použité čočky jsou stejné řady, a byly tedy vyrobeny stejným technologickým postupem, byla vybrána pouze jedna čočka a na ní byla naměřena transmitance, jež je zobrazena v **Obr. 12** na konci této kapitoly. Naměřená transmitance přesahuje hodnotu 0,95. Nicméně pro donor i akceptor je v optické cestě umístěno pět čoček, a celkově tedy výrazně snižují počet detekovaných fotonů.

Ztráty na filtru LPF (Long Pass Filter)

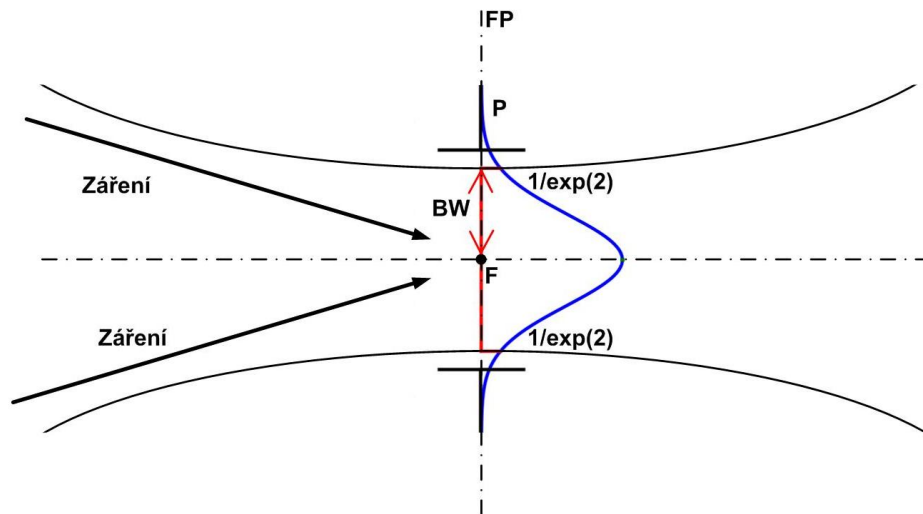
Jedná se o interferenční filtr typu horní propust FELH0550 od výrobce Thorlabs [25]. Propouští vlnové délky počínaje hodnotou 550 nm . Transmitance tohoto filtru byla naměřena a je zobrazena v **Obr. 12** na konci této kapitoly. Výrobce udává hodnoty v propustném spektru větší než 90 % a v odrazné části spektra pak optickou denzitu větší než 5.

Ztráty na filtrech BPF1 a BPF2 (Band Pass Filter)

Tyto dva filtry jsou typu pásmová propust a jsou posledními filtračními prvky už jednotlivých světelných spekter donoru a akceptoru. Pro donor je použit filtr „#67-019; 562 nm CWL, 12,5 mm Dia, 40 nm Bandwidth, OD 6“ od společnosti Edmund Optics s centrální vlnovou délkou 562 nm a šířkou pásma 40 nm [26]. Pro akceptor je pak použit filtr FF02-685/40-25 od společnosti Semrock s centrální vlnovou délkou 685 nm a šířkou pásma 40 nm [27]. Účelem těchto dvou filtrů je oříznout dopadající záření pouze pro konkrétní spektrum donoru a akceptoru. Transmittance obou filtrů byla naměřena a je zobrazena v **Obr. 12** na konci této kapitoly.

Ztráty na prostorovém filtru

Konfokální prostorový filtr je tvořen dvěma čočkami L2, L3 ($f = 74,9\text{ mm}$) AC254-075-A [24] a $75\text{ }\mu\text{m}$ šěrbinou P75S [28] od výrobce Thorlabs. Účelem prostorového filtru je odstranit záření, jež není v optické ose a v rovině zaostření. Veškeré záření, jež vznikne v jiné části zkoumaného vzorku, případně se dostane do optické cesty jiným způsobem, není prostorově koherentní s procházejícím svazkem a na šěrbině je odfiltrováno. Tím je zajištěn malý detekční objem a při vhodném naředení i jedno-molekulová detekce. K dalším ztrátám dochází přímo na fokusovaném svazku ve šěrbině. Pro vyhodnocení těchto ztrát je nejprve nutné definovat poloměr svazku, tzv. Beam-Waist. Zaostruje-li se světelný paprsek do ohniskové roviny, pak intenzita v ní má normální rozdělení se středem v geometrickém ohnisku (**Obr. 11**). Poloměr svazku v ohniskové rovině je hodnota, při které normální rozdělení intenzity poklesne na hodnotu $1/\exp(2)$ [29].



Obr. 11. Ztráty v ohniskové rovině prostorového filtru. Světelný svazek je fokusován v ohniskové rovině FP štěrbině P (Pinhole), do ohniska F, v němž má intenzita normální rozdělení. Vzdálenost, při které poklesne intenzita svazku na $1/\exp(2)$, se nazývá poloměr svazku BM (Beam-Waist). Prostor, jímž může svazek procházet, je limitován hranami štěrbině P, kde dochází ke ztrátám.

Poloměr svazku v ohniskové rovině lze určit dle vztahu (50). Významným faktorem je zde kvalita svazku Q , jež může výrazně ovlivňovat ztráty na štěrbině [29].

$$W_{xy} = \frac{\lambda Q}{\pi} \operatorname{atan}\left(\frac{W_c}{f}\right) \quad (50)$$

- W_{xy} – poloměr svazku v ohniskové rovině
- λ – vlnová délka
- f – ohnisková vzdálenost čočky
- W_c – poloměr svazku před čočkou
- Q – kvalita svazku

Úpravou vztahu (17) pak lze vyhodnotit celkové ztráty na štěrbině způsobené normálním rozdělením svazku jako poměr výstupního a vstupního výkonu (51).

$$\frac{P}{P_0} = \left(1 - e^{\frac{-2r^2}{W_{xy}^2(z)}}\right) \quad (51)$$

- P – výkon po průchodu štěrbinou
- P_0 – výkon před štěrbinou
- r – poloměr štěrbin
- W_{xy} – poloměr svazku v rovině štěrbin

Další ztráty na štěrbině vznikají chromatickými vadami čoček, jež v závislosti na vlnové délce posouvají ohniskové roviny mimo štěrbinu. Nezanedbatelně přispívají rovněž mechanické nedokonalosti v nastavení systému. Vzhledem k těmto proměnným je odhad ztrát na prostorovém filtru zatížen značnou chybou.

Ztráty na fotonových detektorech

Pro detekci fluorescenčních fotonů jsou použity moduly osazené jedno-fotonovými lavinovými fotodiodami (Perkin Elmer, v současnosti Excelitas). Konkrétně se jedná o typ SPCM AQR 16. Výrobce udává detekční pásmo v rozmezí 400–1060 nm s nejvyšší efektivitou detekce při 650 nm, kde udávaná hodnota detekce převyšuje 70 % [30]. Na těchto prvcích zároveň dochází k dalším nepřesnostem při měření. Jedna z nich je způsobena temným šumem. Tento model dle výrobce zaznamená až 25 fotonů během jedné sekundy, jež na diodu nedopadly. Další ztráty jsou způsobeny tzv. mrtvým časem. Po dopadu fotonu snímač není schopen zaznamenat další foton po dobu 50 ns. Z principu tedy tato chyba výrazně narůstá se zvyšující se frekvencí dopadajících fotonů, nicméně při piko-molární koncentraci ($< 1 \text{ foton } \mu\text{s}^{-1}$) lze mrtvou dobu zanedbat. Dále je nutné podotknout, že účinnost sběru fotonů, jež je funkcí vlnové délky, je pro detekční kanály donoru a akceptoru různá.

Celkové ztráty

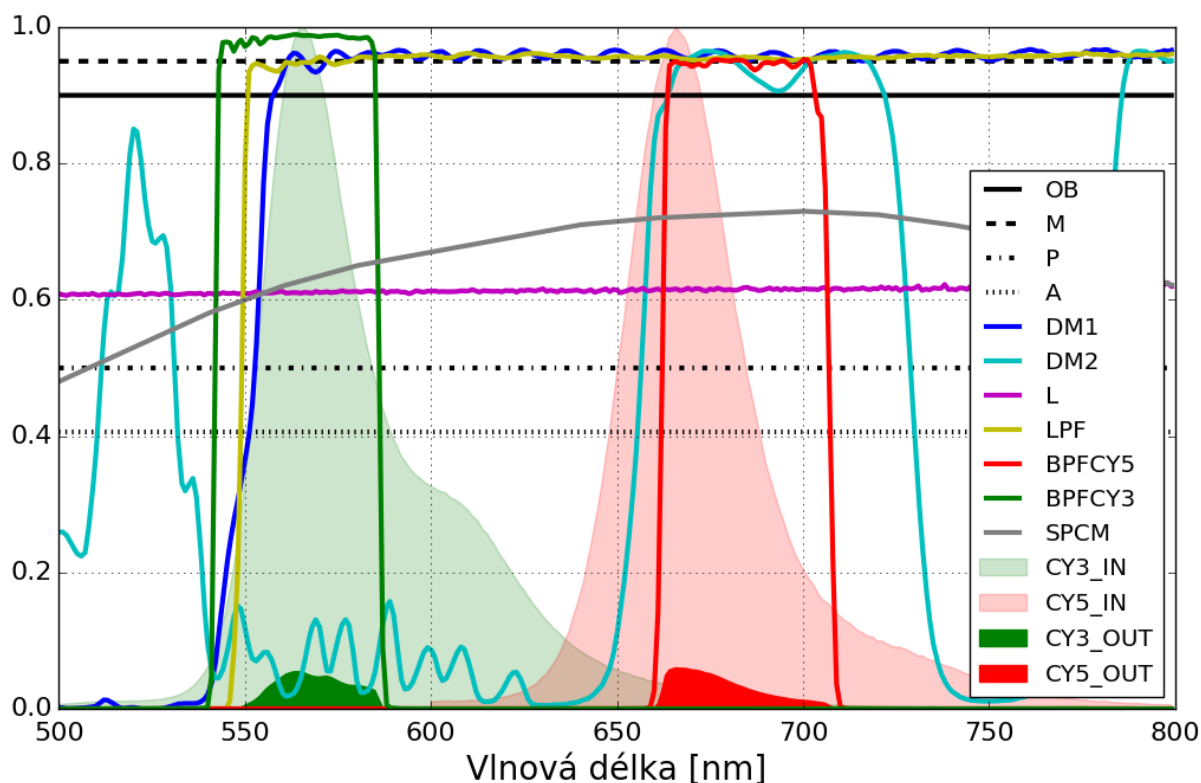
Jsou dány působením všech ztrát na světelný svazek po cestě optické linky. Výstupní počty fotonů lze tedy definovat následujícími vztahy pro donor (52) a akceptor (53).

$$F_{ND} = F_{VD} A T_O T_L^5 R_M^2 T_{F1} T_{DM1} P (1 - T_{DM2}) T_{F3} D_{SPCM} \quad (52)$$

$$F_{NA} = F_{VA} A T_O T_L^5 R_M^2 T_{F1} T_{DM1} P T_{DM2} T_{F2} D_{SPCM} \quad (53)$$

- F_{ND} – naměřená intenzita donoru
- F_{NA} – naměřená intenzita akceptoru
- F_{VD} – vyzářená intenzita donorem
- F_{VA} – vyzářená intenzita akceptorem
- A – úhlové ztráty při vstupu do objektivu
- T_O – transmitance objektivu
- T_L – transmitance čoček
- R_M – reflektance zrcadel
- $T_{F1}-T_{F3}$ – transmitance filtrů F1–F3
- T_{DM1} a T_{DM2} – transmitance dichroických zrcadel
- P – ztráty na štěrbině
- D_{SPCM} – ztráty na fotonových detektorech

Celkové ztráty pak lze vyhodnotit jako poměr obsahů pod křivkami emisních spekter donoru (Cy3), respektive akceptoru (Cy5) (**Obr. 12**), s obsahy daných spekter po aplikaci všech ztrát. Výsledný poměr naměřených a vyzářených fotonů se v našem případě pohybuje v řádech nejméně 10^{-2} .



Obr. 12. Zobrazení ztrát při detekci emitovaného záření Cy3 a Cy5. Graf zobrazuje ztráty při detekci fluorescenčního záření emitovaného molekulami Cy3 a Cy5 po cestě optické linky. OB – ztráty na objektivu, M – ztráty na zrcadlech M1 a M2, P – ztráty na štěrbině, A – ztráty dané NA objektivu, DM1, DM2 – ztráty na dichroických zrcadlech, L – ztráty na čočkách L1 až L6, LPF – ztráty na filtru horní propust, BPFCY5 a BPFCY3 – ztráty na pásmových propustech pro CY3 a CY5, CY3_IN a CY5_IN – emisní spektra Cy3 a Cy5, CY3_OUT a CY5_OUT – zachycená část emisních spekter Cy3 a Cy5.

3.3 Analýza FCS

Analýza dat FCS je založena na statistickém zpracování fluktuací naměřených intenzit. Lze ji považovat za základní metodu poskytující informace o koncentraci a rychlosti molekul pohybujících se v různých prostředích.

Z výpočetních důvodů bylo nejprve nutné určit hodnotu časového kroku simulace, která umožní získat dostatečnou přesnost a zároveň nás nebude limitovat v celkové délce experimentu.

Hlavním úkolem v FCS kapitole bylo ověřit platnost teoretických modelů pro difuzi ve volném roztoku pro prostorově ohraničená prostředí. Důraz byl kladen na velikost a tvar ohraničení vnitřního prostoru.

V následující části byla provedena simulace relativního pohybu. V tomto případě se molekula pohybovala uvnitř vnitřního objektu kulového tvaru, který se pohyboval uvnitř vnějšího objektu kulového tvaru. Získané hodnoty autokorelační funkce byly diskutovány a porovnány s upraveným teoretickým modelem. Tato sestava může při aplikaci na konkrétní podmínky představovat například pohyb lipidického váčku nebo bakterie uvnitř roztoku. Simulace tohoto typu nejsou příliš běžné, a tak výsledky poskytují zajímavý vhled do dané problematiky.

V poslední části byl ověřen vliv rotace na difuzní časy a difuzní koeficienty. Při reálných experimentech jsou často sledovány pohyby lipidického váčku, v jehož membráně se nacházejí molekuly. Tento váček přirozeně difunduje v roztoku a zároveň při tom rotuje. Pohyblivost molekul je tedy závislá nejen na difuzi váčku, ale zároveň na jeho rotaci, a z tohoto důvodu lze očekávat změny v difuzních časech, potažmo difuzních koeficientech molekul způsobené rotací. V tomto případě byla provedena simulace, během níž se rotující vnitřní koule pohybovala ve vnější kouli. Na povrchu této rotující koule byla fixována molekula, jež podstupovala stejné translační pohyby jako vnitřní koule, a navíc ještě pohyby rotační.

3.3.1 Optimalizace časového kroku

Volba časového kroku je velmi důležitý parametr, na němž závisí úspěšnost simulace. Je zřejmé, že přesnost simulací se zvyšuje se zmenšováním časového kroku, nicméně zmenšování časového kroku při udržení konstantního simulovaného času vede ke zvyšování počtu výpočtů a následně k prodloužení doby simulace. To však jde proti praktickým požadavkům kladeným na simulace, kdy je potřebné získat data z co nejdelšího simulačního času v co nejkratším čase reálném. Z toho důvodu je potřebné pro každý typ simulace hledat kompromis mezi přesností simulací s krátkým časovým krokem a reálně dosažitelným celkovým časem simulace.

Časový krok v difuzních simulacích by měl být úměrný pohyblivosti částic v roztoku a velikosti prostoru, jenž omezuje jejich pohyb. Difuzní koeficient molekul D_t se běžně pohybuje ve stovkách $nm^2 \mu s^{-1}$. V každém kroku simulace se generuje pohyb molekul z distribuce normálního rozdělení se směrodatnou odchylkou danou vztahem (54).

$$\bar{x} = \sigma = \sqrt{2D_t t} \quad (54)$$

Uvažujeme-li jednu z běžných molekul v SMFD, Alexu Fluor 488, jež má difuzní koeficient $435 nm^2 \mu s^{-1}$, získáváme při základním časovém kroku $0,1 \mu s$ 68,2 % generovaných pohybů v jednotlivých krocích ve 3D menší než $13 nm$. Tuto hodnotu považujeme za dostatečnou pro námi použité rozměry CV s poloměry W_{xy} $300 nm$ a W_z $1800 nm$. Jako základní jednotka časového kroku tedy byla z tohoto důvodu zvolena hodnota $0,1 \mu s$.

Parametry optimalizace

Pro ověření možnosti zvýšení hodnoty časového kroku ze základní hodnoty $0,1 \mu s$ na hodnotu $1 \mu s$ byly provedeny dvě simulace, každá s jednou částicí a deseti miliony kroků. První z nich byla s nastavením základního časového kroku $0,1 \mu s$, druhá pak s desetinásobným časovým krokem $1 \mu s$.

Jako hlavní parametr pro porovnání dopadu velikosti kroku na výsledek simulace byla zvolena distribuce intenzit fluorescence a ACF.

Pro porovnání byly intenzity sečteny v úsecích po $1000 \mu s$, což je běžně používaná hodnota pro analýzu distribuce intenzity fluorescence FIDA (Fluorescence Intensity Distribution Analysis). Distribuce takto získaných intenzit z obou simulací byla porovnána Kolmogorov-Smirnovovým testem pro dva výběry (KS2 test) za účelem zjištění míry podobnosti rozdělení intenzit obou simulací.

KS2 test

Tento test je jednou z metod statistické analýzy dat. Umožňuje testovat, zda dva výběry pocházejí z rozdílného rozdělení pravděpodobnosti. Metodika je následující [31].

Mějme dva vzorky dat, N_1 a N_2 , na obou vzorcích se provede výpočet relativních kumulativních četností $F_1(x)$ a $F_2(x)$ (ekvivalentem pro spojitá data je pak kumulativní distribuční funkce). Dále se na těchto četnostech vypočte maximální velikost rozdílu $D_{1,2}$.

$$D_{1,2} = \sup_x |F_1(x) - F_2(x)| \quad (55)$$

Dále je vypočtena kritická hodnota D_c pro zvolenou hladinu významnosti.

$$D_c = \sqrt{-\frac{1}{2} \ln\left(\frac{\alpha}{2}\right)} * \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}} \quad (56)$$

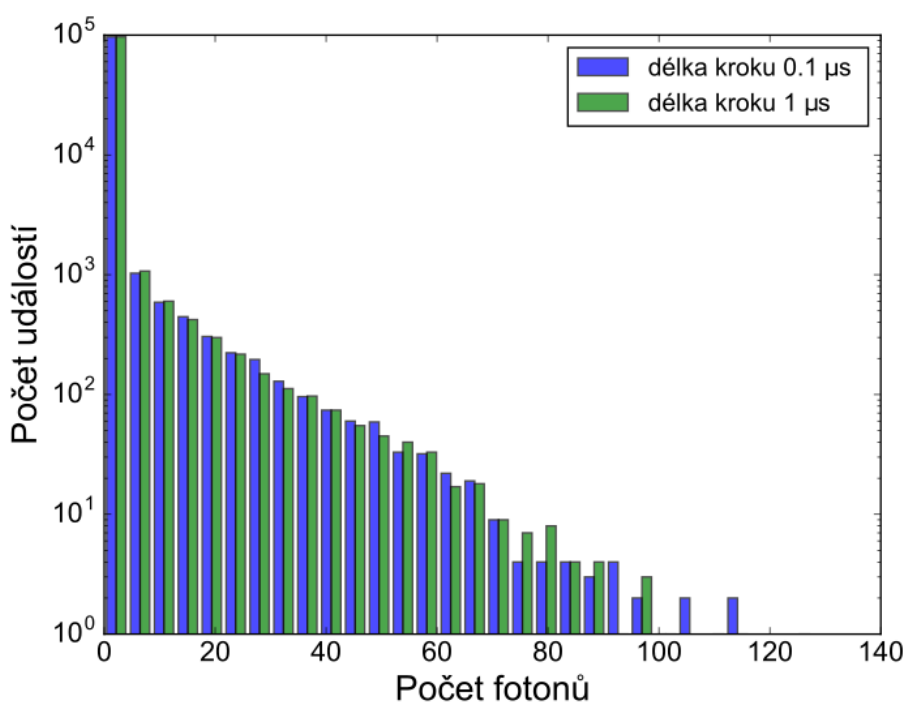
- n_1, n_2 – počet prvků v N_1 , a N_2
- α – hladina významnosti

Následně je vyslovena hypotéza H_0 , jež říká, že vzorky pocházejí ze stejného rozdělení pravděpodobnosti. Platí-li, že $D_{1,2} > D_c$, pak je hypotéza H_0 zamítnuta a distribuce srovnávaných dat jsou považovány za rozdílné s hladinou významnosti α . Zde je důležité říci,

že opačný výsledek nelze interpretovat tak, že porovnávaná data pocházejí ze stejného rozdělení. Přesto lze z výsledků testu vyvodit následující.

Běžně používaná hladina významnosti pro detekování rozdílných distribucí má hodnoty 0,01 nebo 0,05. Námi porovnávané vzorky dat byly považovány za rozdílné až při hladině významnosti 0,31. Toto lze interpretovat tak, že vyslovíme-li tvrzení, že vzorky pocházejí z rozdílné distribuce, pak existuje 31procentní pravděpodobnost chyby. Tento výsledek tedy považujeme za dostatečnou indikaci podobnosti distribučních rozdělení srovnávaných vzorků, a tedy za důkaz pro možnost zvýšení časového kroku na $1 \mu s$ bez výrazné ztráty přesnosti výpočtů.

Výsledné četnosti intenzit ze simulací s délkou kroku $0,1 \mu s$ a $1 \mu s$ sečtených do časových intervalů $1000 \mu s$ zobrazuje histogram na **Obr. 13**. Zde je zřejmá podobnost mezi oběma distribucemi. Závěrem lze tedy říci, že byla prokázána možnost zvýšení časového kroku ze základní hodnoty $0,1 \mu s$ na hodnotu $1 \mu s$ bez výrazné změny v distribuci získaných intenzitních dat.



Obr. 13. Histogram intenzit ze simulací s délkou kroku $0,1 \mu s$ a $1 \mu s$. Distribuce intenzit ze simulací s krokem $0,1 \mu s$ a $1 \mu s$ vykazují vysokou podobnost, prokazují tedy nepříliš výrazný rozdíl mezi použitím časového kroku $0,1 \mu s$ a $1 \mu s$.

3.3.2 Vliv velikosti a tvaru vnějšího ohraničení

Teoretické modely využívané pro analýzu autokorelační funkce jsou historicky založeny na měření difuze ve volném roztoku. Volný roztok je možné považovat za natolik velký, že se v něm částice mohou pohybovat bez omezení.

S pokračujícím výzkumem v SMFD se nabízejí nové možnosti zkoumat chování a pohyb částic v biologicky zajímavých podmínkách, tedy například v omezeném prostoru, jako uvnitř bakterie, mikrofluidních zařízení a dalších. Zde je nutné podotknout, že s rostoucím omezením vnějšího prostoru pro pohyb částic tyto modely přestávají platit. Z tohoto důvodu byly provedeny simulace ověřující platnost teoretických modelů FCS pro difuzi právě v omezeném prostoru.

Ohraničení kulovými tvary s proměnnou velikostí

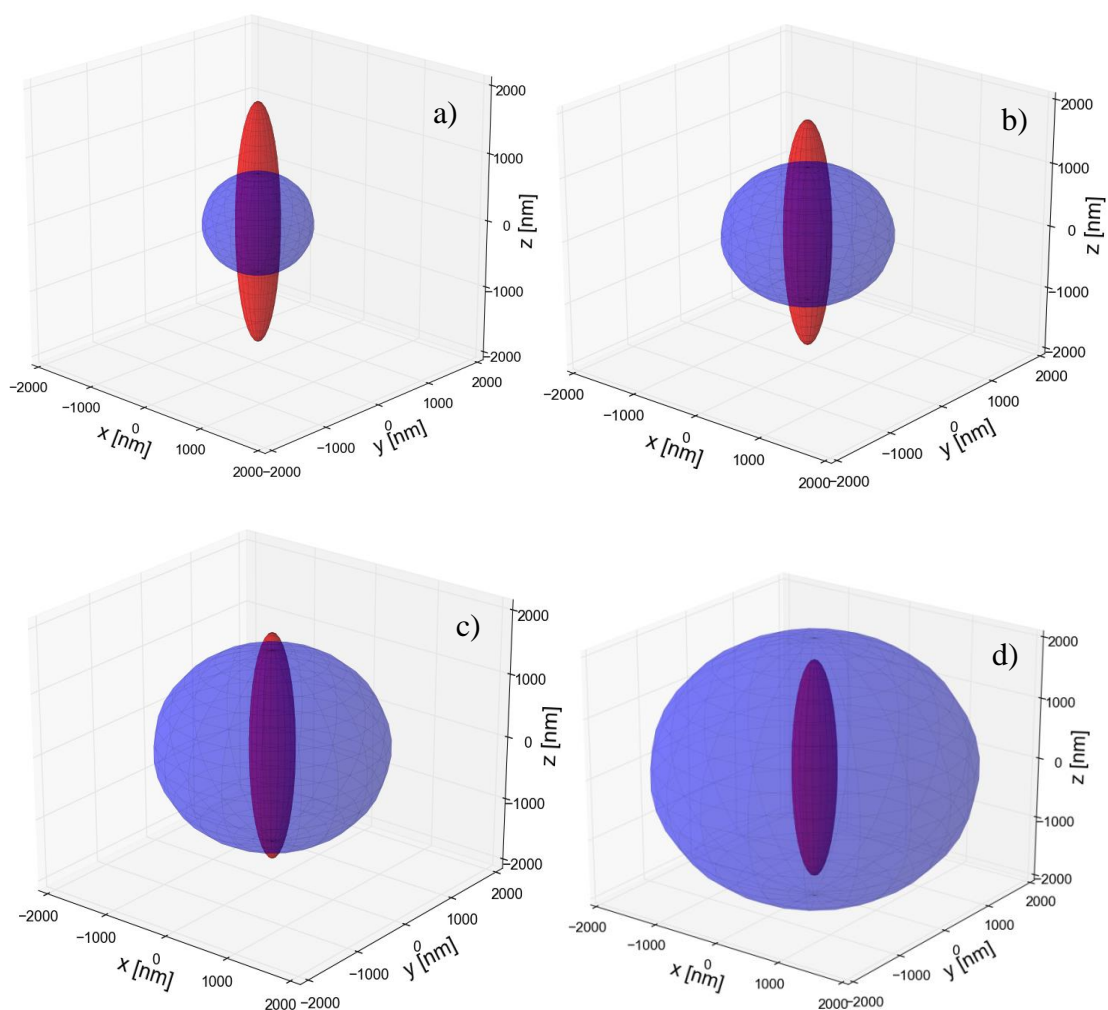
Pro ověření platnosti teoretických modelů FCS pro difuzi molekul v omezeném prostoru bylo provedeno šestnáct simulací s vnějším ohraničením kulových tvarů. Osm z nich s časovým krokem $0,1 \mu s$ a dalších osm s krokem $1 \mu s$. Objemy použité v simulacích byly rozprostřeny na logaritmické škále mezi 5násobkem a 10 000násobkem CV při udržení konstantní koncentrace částic. Konkrétní hodnoty násobků jsou 5, 15, 47, 130, 380, 1135, 3363 a 10 002. Pro lepší představu jsou geometrie vybraných simulací zobrazeny na **Obr. 14**.

Ze získaných fluorescenčních intenzit byly vypočteny autokorelační funkce a ty byly porovnány s teoretickým modelem.

Do všech simulací byly vloženy jako společné vstupní hodnoty následující parametry.

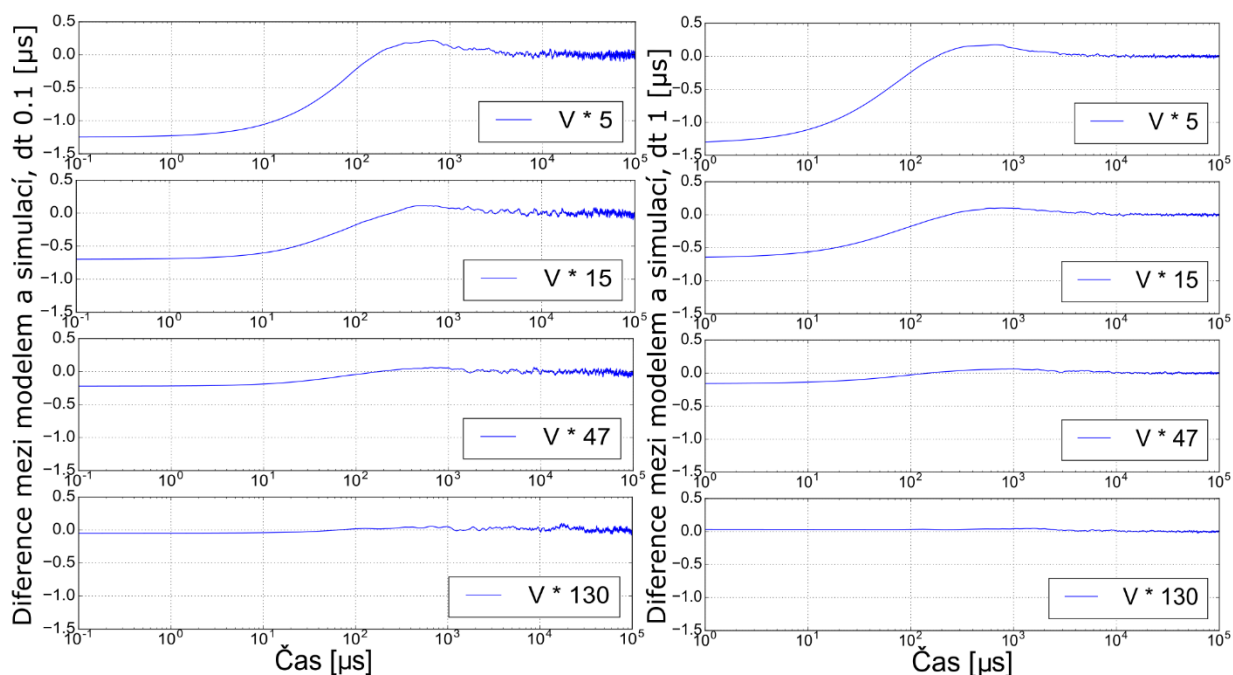
Tabulka 11. Společné parametry simulací kulových tvarů

Parametr	Hodnota
Translační difuzní koeficient molekul	$241 \text{ nm}^2 \mu s^{-1}$
Koncentrace molekul	1 nM dm^{-3}
Konfokální objem	0.679 fL
Laterální poloměr konfokálního objemu	300 nm
Axiální poloměr konfokálního objemu	1800 nm



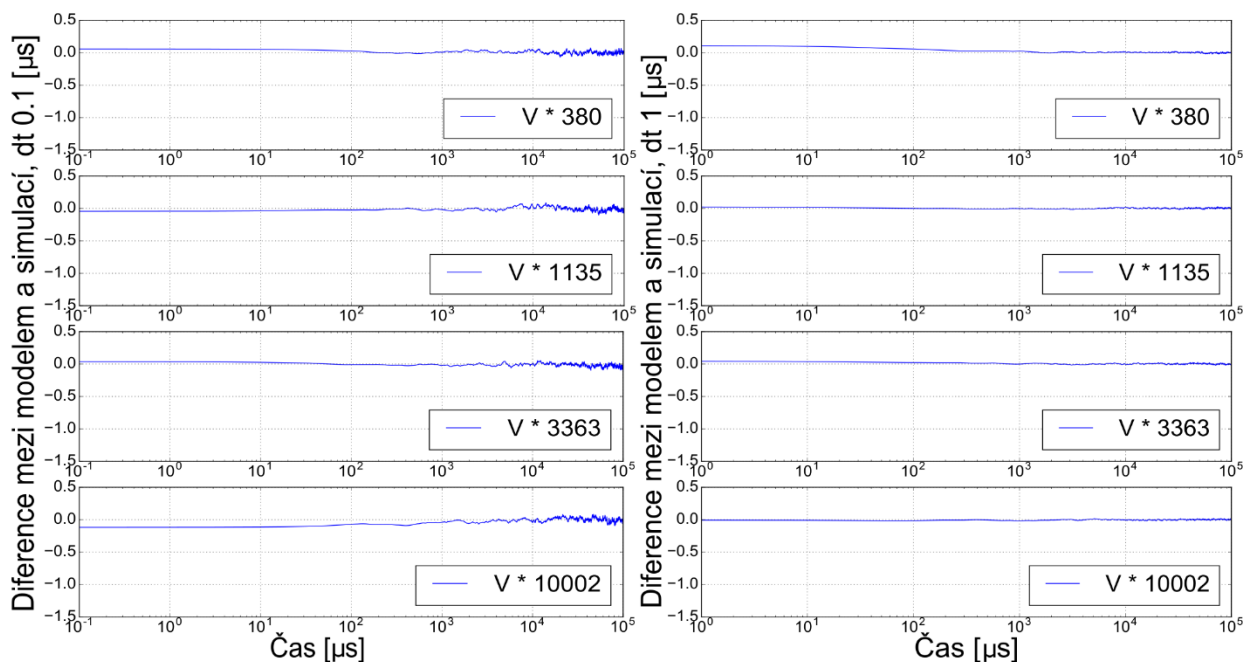
Obr. 14. Zobrazení geometrie CV a vnějšího ohraničení. CV je ve všech grafech zobrazen červenou barvou. Dále pak ohraničení možného prostoru pohybu molekul je vykreslené modrou barvou o velikostech a) 5násobek CV, b) 15násobek CV, c) 47násobek CV, d) 130násobek CV.

Výsledné diference mezi teoretickým modelem a vypočtenou ACF z intenzitních dat pro časové kroky $0,1 \mu\text{s}$ a $1 \mu\text{s}$ a pro objemy v rozmezí 5násobek až 10 000násobek konfokálního objemu zobrazují grafy na **Obr. 15** a **Obr. 16**. Zde je vidět, že volba časového kroku prakticky neovlivňuje získané výsledky. Naopak volba velikosti objemu ano. V objemech 5násobku, 15násobku a 47násobku CV je zřetelný rozdíl mezi vypočtenou ACF a teoretickým modelem.



Obr. 15. Diference mezi hodnotami teoretického modelu a vypočtenou ACF. V levé části jsou zobrazeny hodnoty pro časový krok $0,1 \mu s$, pro objemy kulového tvaru 5násobku, 15násobku, 47násobku a 130násobku CV. V pravé části jsou zobrazeny hodnoty pro časový krok $1 \mu s$. Z grafu je zřetelné, že ACF získané z intenzitních dat z objemů menších než je 130násobek CV jsou výrazně odlišné od hodnot teoretického modelu. Naopak rozdíly mezi hodnotami simulací s časovým krokem $0,1 \mu s$ a $1 \mu s$ nejsou nijak patrné a lze říci, že volba mezi těmito dvěma časovými kroky nemá na výsledek simulací vliv.

Pro objemy 130násobku CV (**Obr. 15**) a vyšší (**Obr. 16**) již vypočtené hodnoty ACF odpovídají teoretickému modelu. Pro takto velké rozměry vnějších objemů již ohraničení neovlivňuje tvar ACF.



Obr. 16. Diference mezi hodnotami teoretického modelu a vypočtenou ACF. V levé části jsou zobrazeny hodnoty pro časový krok $0,1 \mu\text{s}$, pro objemy kulového tvaru 380násobku, 1135násobku, 3363násobku a 10 002násobku CV. V pravé části jsou zobrazeny hodnoty pro časový krok $1 \mu\text{s}$. Z grafu je zřetelné, že difference pro dané rozměry nejsou příliš velké. Stejně tak rozdíly mezi hodnotami simulací s časovým krokem $0,1 \mu\text{s}$ a $1 \mu\text{s}$ nejsou nijak patrné a lze říci, že volba mezi těmito dvěma časovými kroky nemá na výsledek simulací vliv.

Ohraničení válcovými tvary s proměnnou velikostí

Pro válcové tvary bylo provedeno celkem osm simulací, čtyři simulace s časovým krokem $0,1 \mu s$ a čtyři s časovým krokem $1 \mu s$.

Zvoleny byly dvě velikosti válcových objemů, 5násobek a 1135násobek CV, při udržení konstantní koncentrace částic.

Pro obě velikosti objemů byly spuštěny dvě simulace s poměry výšky a průměru válce 1:10 (disk) a 10:1 (trubice).

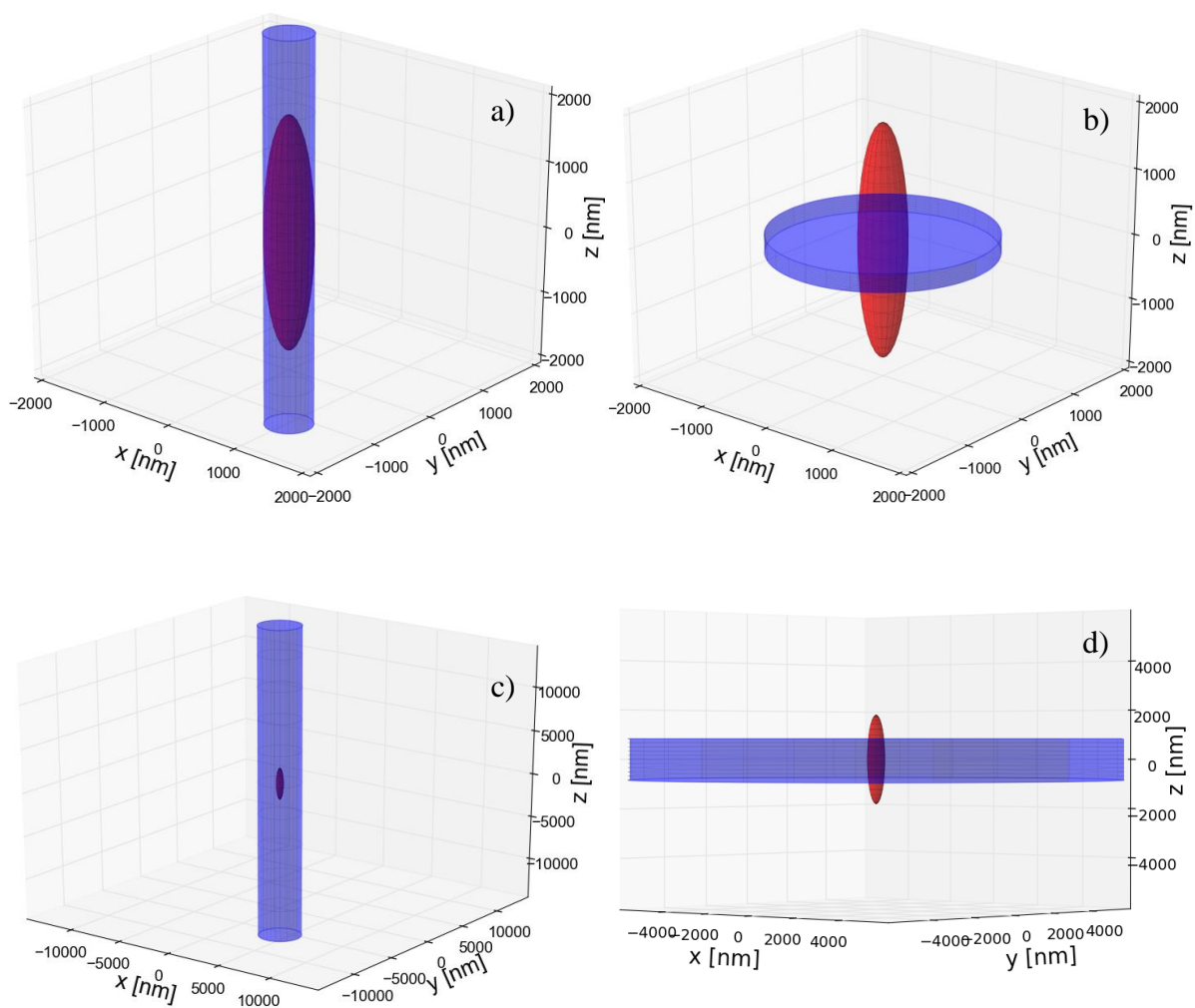
Válcové tvary byly vybrány jako možné příklady mikrofluidních zařízení. Výsledky byly opět zkoumány z pohledu vlivu změny velikosti časového kroku, tvaru a velikosti vnějšího ohraničení na výsledné hodnoty ACF.

Ze získaných fluorescenčních intenzit byly vypočteny ACF a ty byly porovnány s teoretickým modelem. Geometrie válcových simulací jsou zobrazeny na **Obr. 17**.

Do všech simulací byly vloženy jako společné vstupní hodnoty následující parametry.

Tabulka 12. Společné parametry simulací válcových tvarů

Parametr	Hodnota
Translační difuzní koeficient molekul	$241 \text{ nm}^2 \mu s^{-1}$
Koncentrace molekul	1 nM dm^{-3}
Laterální poloměr konfokálního objemu	300 nm
Axiální poloměr konfokálního objemu	1800 nm

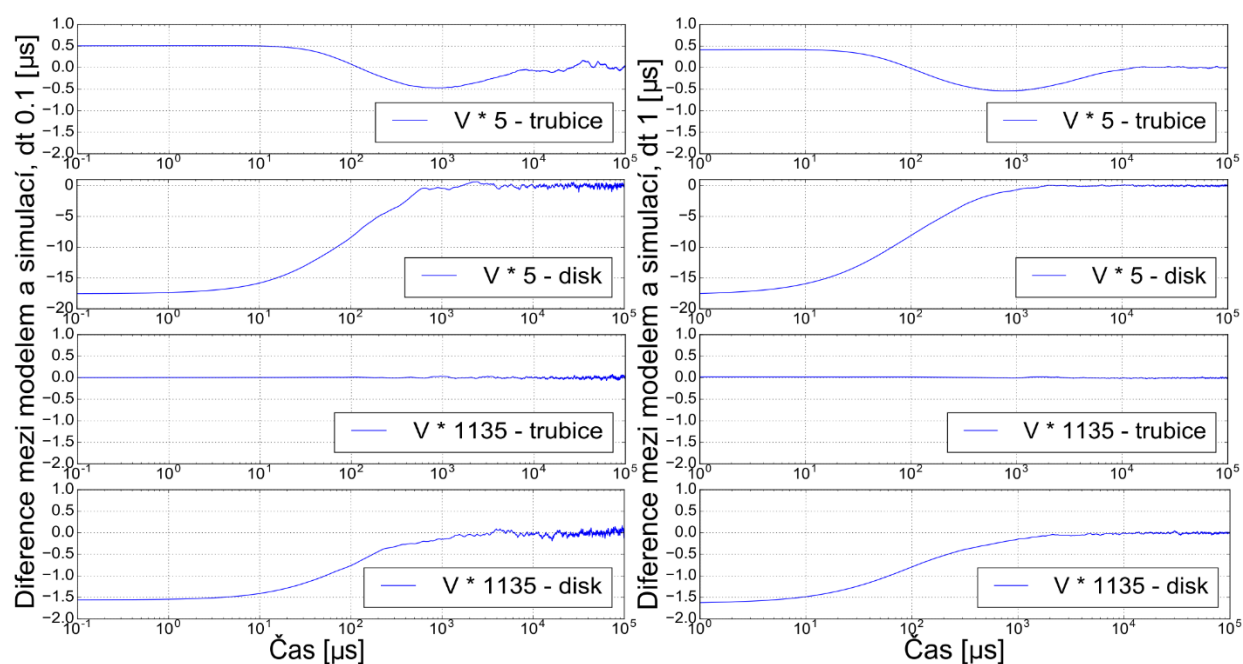


Obr. 17 Zobrazení geometrie CV a vnějšího ohraničení pro trubici a disk. CV je zobrazen ve všech grafech červenou barvou. Vnější ohraničení je zobrazeno modrou barvou. a) Trubice o velikosti 5násobku CV, b) disk o velikosti 5násobku CV, c) trubice o velikosti 1135násobku CV a d) disk o velikosti 1135násobku CV – zde je vidět, že i při tak velkém objemu stále protíná CV.

Výsledné difference ACF a teoretického modelu (**Obr. 18**) prokazují podobné výsledky jako u kulových objemů.

Trubice i disk o velikosti 5násobku CV tento konfokální objem protínají a mění tak jeho efektivní tvar i velikost, čemuž odpovídají výrazné difference mezi simulovanou ACF a teoretickým modelem pro volný roztok.

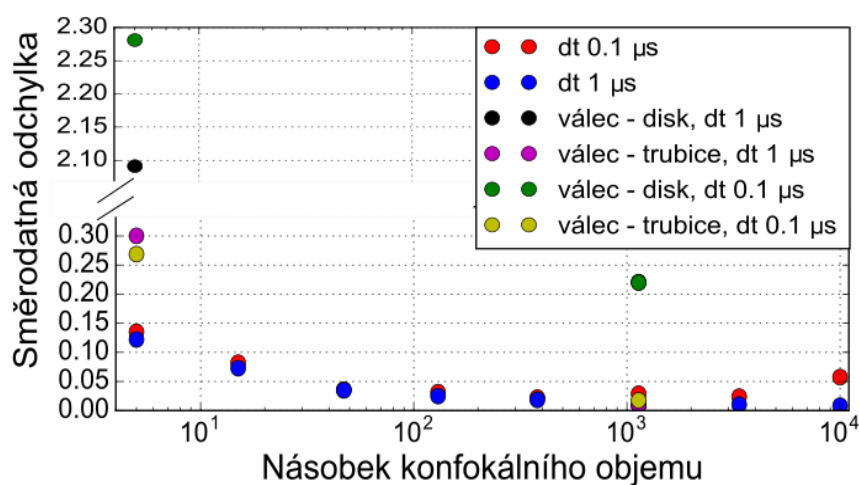
Pro objem 1135násobku CV již tvar trubice neprotíná konfokální objem v žádném místě, zde ACF odpovídá modelu, naopak tvar disku stále CV protíná a mění tedy jeho tvar a velikost. Volba časového kroku mezi $0,1 \mu\text{s}$ a $1 \mu\text{s}$ se nijak výrazně neprojevila na tvaru ACF.



Obr. 18. Diference mezi vypočtenou ACF a teoretickým modelem. V levé části jsou zobrazeny hodnoty pro časový krok $0,1 \mu\text{s}$, pro objemy válcového tvaru s poměry výšky a průměru 10:1 (trubice) a 1:10 (disk) o 5násobku a 1135násobku CV. V pravé části jsou zobrazeny hodnoty pro časový krok $1 \mu\text{s}$. Z grafu jsou patrné výrazné difference u trubice i disku o velikosti 5násobku CV, jež ho protínají a mění tak jeho efektivní tvar i velikost. Totéž platí pro disk o velikosti 1135násobku CV, který konfokální objem stále protíná. Naopak trubice o 1135násobku CV ho již neprotíná a zde se neprojevují okrajové podmínky omezující pohyb molekul. Volba časového kroku mezi $0,1 \mu\text{s}$ a $1 \mu\text{s}$ stejně jako u kulových simulací nemá vliv na výsledné ACF.

Pro celkové kvantitativní shrnutí diferencí mezi vypočtenou ACF a teoretickým modelem ze všech provedených simulací byly následně vypočteny směrodatné odchylky (**Obr. 19**).

Hodnoty směrodatných odchylek reflektují pro všechny tvary, kroky a objemy přímé difference mezi modely a výpočty. Volba časového kroku nemá výrazný vliv. Naopak objemy o 47násobku CV a menší mají odchylku výraznou. U simulace válcových tvarů pro disk s objemem 1135násobku CV pak směrodatná odchylka opět narůstá, a to vlivem protínání konfokálního objemu tvarem disku.

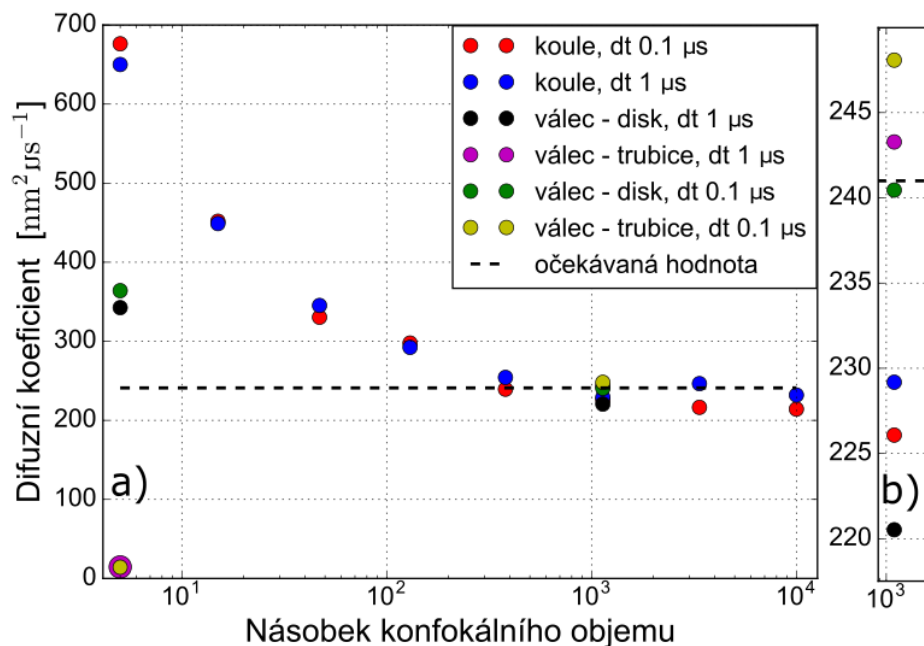


Obr. 19. Hodnoty směrodatné odchylky dle násobků CV, ohraničujících tvarů a časového kroku. Hodnoty odchylek jsou nezávislé na volbě časového kroku mezi $0,1 \mu s$ a $1 \mu s$. Naopak výrazně vzrůstají pro simulace s objemy do velikosti 47násobku CV. Výrazná odchylka je taktéž pro simulaci válce ve tvaru disku o objemu 1135násobku CV, jenž ho stále protíná a mění tak jeho geometrii.

Určení chyby difuzního koeficientu a koncentrace v ohraničených prostředích

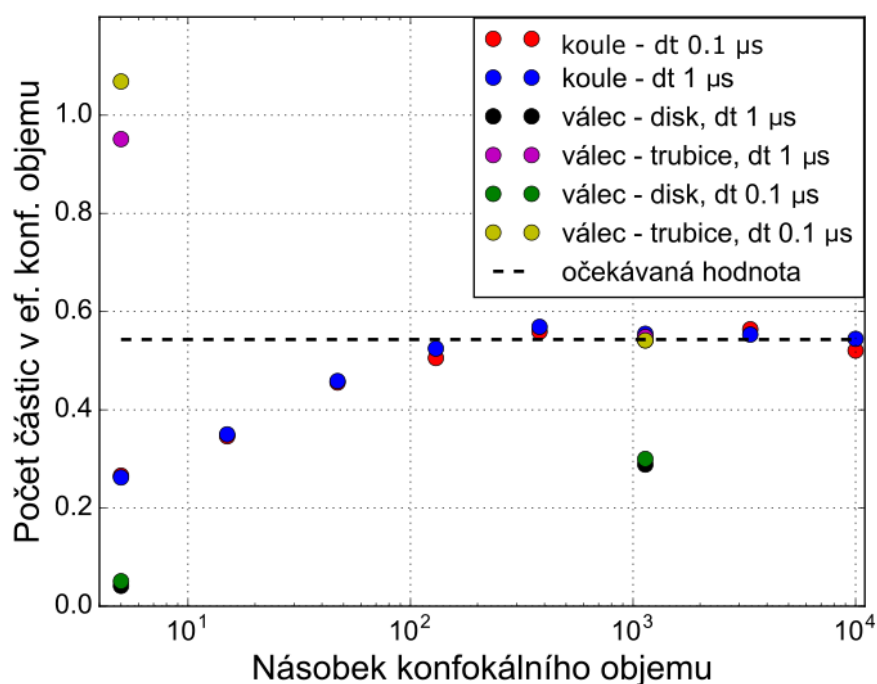
Ze všech provedených kulových i válcových simulací byl vypočten difuzní koeficient a střední počet částic v efektivním CV (koncentrace). Porovnáním s difuzním koeficientem, jenž byl do simulací vložen (**Obr. 20**) je možné vyhodnotit, že volba časového kroku neovlivňuje výsledky simulací, zatímco volba objemu ano. Pro objemy do velikosti 380násobku CV lze odečíst difuzní koeficienty s vyšší hodnotou, než je očekávaná ve volném roztoku.

Diference mezi vypočtenou ACF a teoretickým modelem byly již pro objemy o velikostech 130násobku konfokálního objemu velmi malé. Nicméně difuzní koeficienty získané analýzou ACF indikují omezení pohybu molekul až do velikosti 380násobku CV.



Obr. 20. a) Závislost vypočteného difuzního koeficientu na velikosti ohraničujícího objemu, časovém kroku a tvaru. Difuzní koeficienty pro 380násobek CV a menší jsou odchýlené od očekávané hodnoty. Výsledky jsou opět nezávislé na volbě časového kroku. **b) Přiblížení v hodnotě 1135násobku CV.**

Další porovnávanou veličinou je střední počet částic v efektivním CV (koncentrace) jako funkce velikosti a geometrie ohraničení (**Obr. 21**). Volba časového kroku opět neovlivňuje získané výsledky. Volba velikosti objemu výsledné hodnoty ovlivňuje až do 130násobku CV. Dále při hodnotě 1135násobku CV je odchýlena hodnota pro simulaci disku, jenž při daném objemu stále protíná konfokální objem a tím ovlivňuje jeho tvar a velikost.



Obr. 21. Závislost střední hodnoty počtu částic přítomných v efektivním CV na velikosti ohraničujícího objemu, časovém kroku a tvaru. Časový krok neovlivňuje počet částic, naopak velikost ohraničujícího objemu ano, až do hodnoty 130násobku konfokálního objemu. Dále simulace s vnějším ohraničením tvaru disku ovlivňuje výsledné hodnoty i při 1135násobku CV.

3.3.3 Vliv relativního pohybu

Pohyb plovoucí bakterie kapičkou pufru na mikroskopickém sklíčku a molekul uvnitř ní, či difuze lipidického váčku v měřicí komůrce patří v biofyzikálním experimentu mezi časté scénáře. V obou případech jde o relativní pohyb mezi několika vztažnými soustavami.

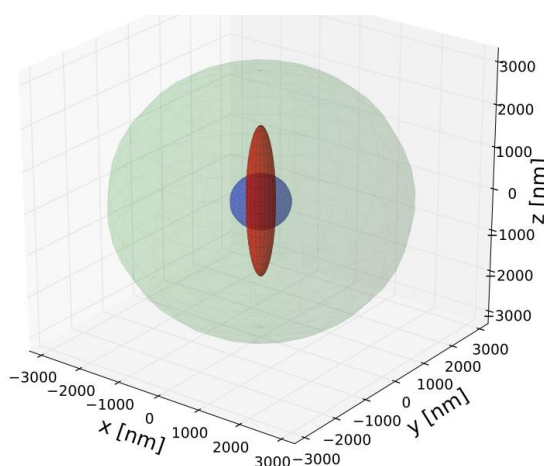
Pro porovnání vlivu unášivého pohybu způsobeného vnějším pohyblivým objektem na tvar ACF molekuly pohybující se uvnitř něj jsme provedli následující simulaci. Ve vnějším objektu kulového tvaru se pohyboval vnitřní objekt kulového tvaru, uvnitř něj se pohybovala molekula.

V rámci této simulace byl vedle molekuly pohybující se ve vnitřní kouli považován také geometrický střed vnitřní koule za fluorescenční molekulu. Ze získaných intenzitních dat byly vyhodnoceny ACF pro střed koule a pro molekulu. Pozorovanými veličinami tak zde byly translační difuzní koeficient středu koule a zároveň molekuly pohybující se uvnitř ní. Geometrie použitá v simulaci je zobrazena na (**Obr. 22**).

Do simulace byly vloženy následující vstupní parametry.

Tabulka 13. Parametry simulace relativního pohybu

Parametr	Hodnota
Translační difuzní koeficient molekuly	$241 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$
Translační difuzní koeficient vnitřní koule	$0,288 \text{ nm}^2 \text{ s}^{-1}$
Objem vnitřní koule	1 fL
Objem vnější koule	380násobek CV



Obr. 22. Zobrazení geometrie simulace s relativním translačním pohybem. Červenou barvou je vyznačen CV, zelenou barvou je zobrazena vnější koule o objemu 380násobku konfokálního objemu a v ní se pohybuje modrá koule o objemu 1 fL . Uvnitř modré koule se pak pohybuje molekula.

Teoretický model ACF pro pohybující se molekulu unášenou pohybem dalšího objektu není obecně znám, ale tento vztah lze v prvním přiblížení předpokládat ve tvaru (57), představujícím superpozici dvou samostatných teoretických modelů (27).

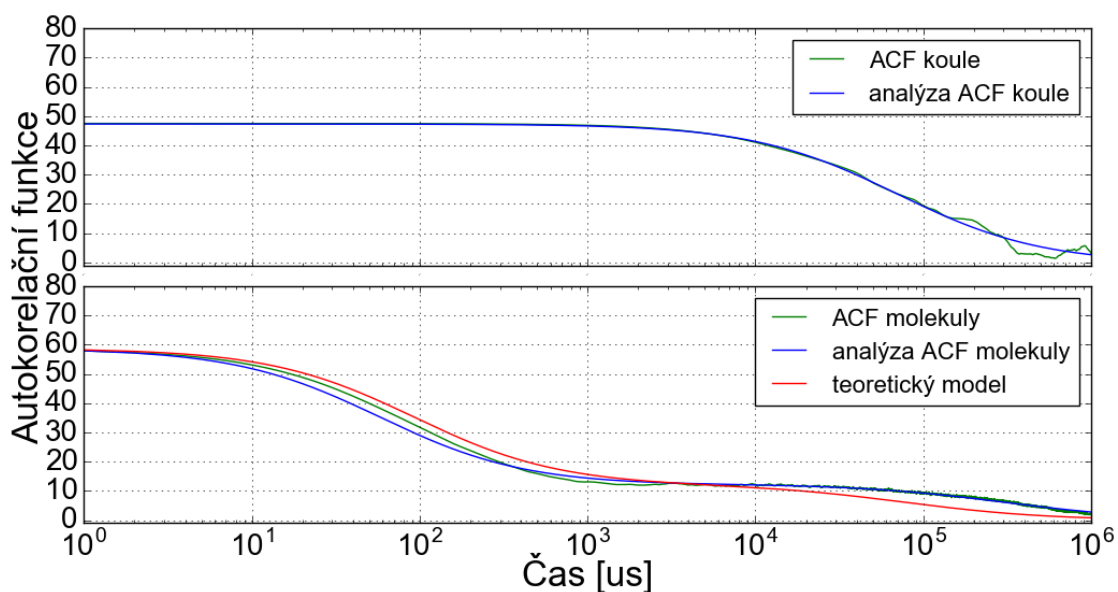
$$G(\tau) = G_1(0) \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{\tau}{t_{d1}}\right)\right) \left(1 + r^{-2} \left(\frac{\tau}{t_{d1}}\right)\right)^{\frac{1}{2}}} + G_2(0) \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{\tau}{t_{d2}}\right)\right) \left(1 + r^{-2} \left(\frac{\tau}{t_{d2}}\right)\right)^{\frac{1}{2}}} \quad (57)$$

Vypočtená ACF pro střed koule bez rotace (**Obr. 23**, horní sub-graf) byla analyzována pomocí modelu pro volnou difuzi (27). Zde odpovídá translační difuzní koeficient vložené hodnotě $0,288 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$.

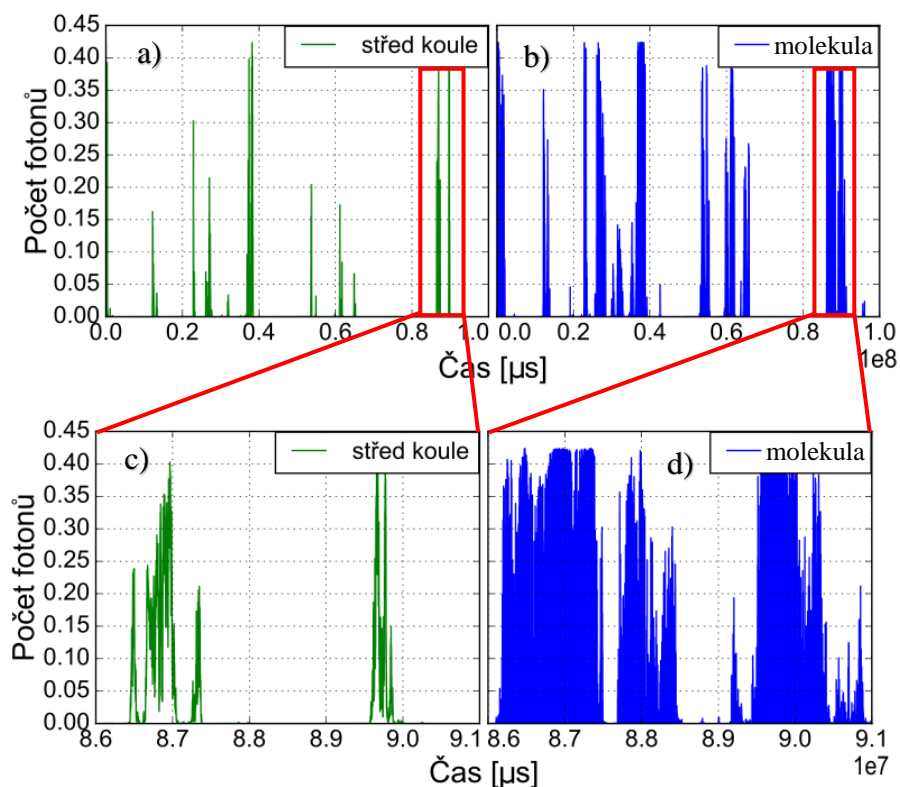
Vypočtená ACF molekuly (**Obr. 23**, zelená křivka, spodní sub-graf) pohybující se uvnitř koule má viditelně dvě komponenty, a proto byla analyzována dle rozšířeného teoretického modelu (57). V modelu byly fixovány $G_1(0)$ a $G_2(0)$ z důvodu limitovaného počtu událostí (průchodů koule konfokálním objemem). Rychlá komponenta ACF molekuly (od $1 \mu\text{s}$ do $10^3 \mu\text{s}$) popisuje rychlý pohyb molekuly ve vnitřní kouli. Translační difuzní koeficient této části ACF (po normalizaci) odpovídá vloženému. Nicméně difuzní koeficient získaný z pomalé části ACF (od $10^3 \mu\text{s}$ do $10^6 \mu\text{s}$) neodpovídá difuznímu koeficientu samotné vnitřní koule.

Difuzní čas, z něž se translační difuzní koeficient počítá, je v tomto případě přibližně třikrát delší. Lze tedy konstatovat, že rozšířený teoretický model ACF (57) plně nevysvětluje vypočtenou ACF.

Mimo toho je zároveň výrazně delší šířka záblesků fluorescence molekuly ve srovnání se samotnou vnitřní koulí (**Obr. 24**). Intenzitní data molekuly tak korespondují s násobně delším difuzním časem pomalé komponenty ACF proti očekávanému difuznímu času koule.



Obr. 23. ACF koule a molekuly. V horní části je zobrazena ACF samotné vnitřní koule. Ve spodní části pak zelená křivka zobrazuje ACF molekuly pohybující se ve vnitřní kouli. Modrá křivka představuje analýzu ACF dle rozšířeného teoretického modelu (57). Parametry jsou zde pouze difuzní časy, hodnoty $G_1(0)$ a $G_2(0)$ jsou fixovány z důvodu menšího počtu událostí (průchodů koule konfokálním objemem). Červená křivka je dána přímo modelem (57).



Obr. 24. Porovnání šířky záblesků. a) Zobrazení intenzit středu koule, b) zobrazení intenzit molekuly, c) a d) přiblížení intenzit koule a molekuly v kratším časovém rozmezí. Doba průchodu molekuly konfokálním objemem je delší než doba průchodu koule.

3.3.4 Vliv rotace

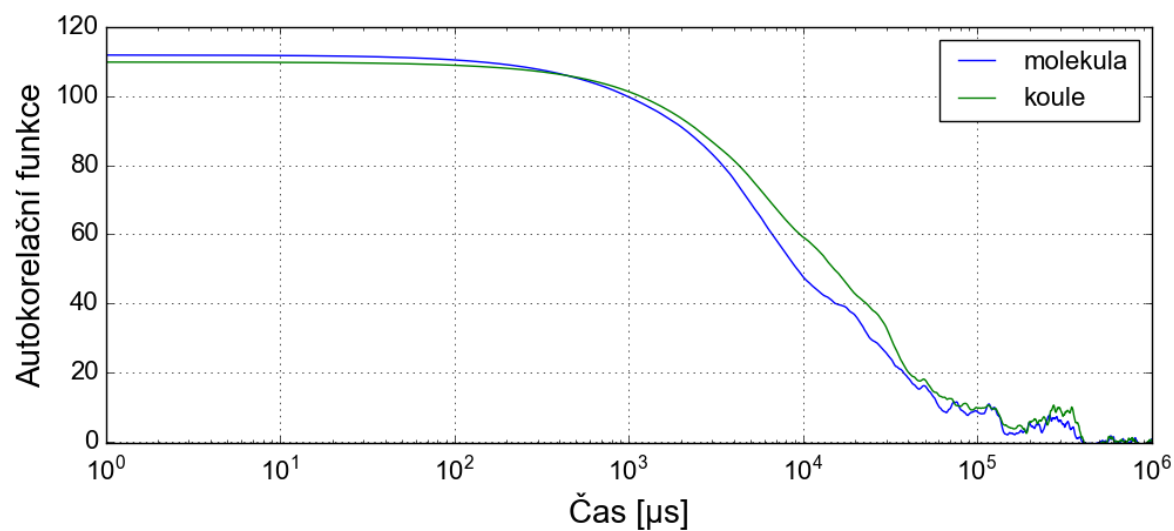
V této části jsme ověřili vliv rotace vnitřního objektu (lipidického váčku, bakterie...) na ACF. V tomto scénáři byla molekula fixována na okraji rotující difundující koule v roztoku, může tedy jít o fluorescenčně značený membránový protein zafixovaný v lipidickém váčku. Z této simulace jsme pro porovnání opět vypočítali dvě ACF, jednu pro geometrický střed pohybující se vnitřní koule a druhou pro molekulu fixovanou na okraji koule.

Do simulace byly vloženy následující parametry:

Tabulka 14. Parametry simulace s rotací

Parametr	Hodnota
Translační difuzní koeficient vnitřní koule a molekuly	$1,64 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$
Rotační difuzní koeficient vnitřní koule	$30,9 \text{ rad}^2 \text{ s}^{-1}$
Poloměr vnější koule	3070 nm
Poloměr vnitřní koule	200 nm
Axiální poloměr CV	1800 nm
Laterální poloměr CV	300 nm

Analýza získaných ACF (**Obr. 25**) dle teoretického modelu (**27**) poskytla informace o difuzních koeficientech. Difuzní koeficient molekuly představující geometrický střed vnitřní koule má hodnotu $1,87 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$, jenž se příliš neliší od vložené hodnoty. Potvrzuje tedy očekávané výsledky a správný průběh simulace. Difuzní koeficient molekuly umístěné na okraji vnitřní koule má hodnotu $2,63 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$. Tato hodnota je již 1,4násobek vloženého difuzního koeficientu a prokazuje tedy, že rotace ovlivňuje tvar ACF a z ní vyplývající hodnoty pro difuzní koeficient a difuzní čas. V závislosti na získaných výsledcích lze konstatovat, že rotace objektu ovlivňuje získanou ACF. Za jakých podmínek (rychlost rotace, poměr velikosti rotujícího objektu ku CV) je tento jev pozorovatelný, bude předmětem dalšího výzkumu.



Obr. 25 Srovnání ACF rotující difundující koule a molekuly fixované na jejím okraji. ACF molekuly fixované na okraji rotující difundující koule vykazuje rychlejší pokles hodnot než ACF samotné koule. Odtud vyplývá větší vypočtený difuzní koeficient molekuly.

3.4 Simulace FRET

Při reálných experimentech je FRET často využíván jako metoda pro měření vzdáleností a orientace v rámci jedné molekuly nebo ve větších komplexech. Kombinace FRET a SMFD umožňuje charakterizaci subpopulací, případně sledování dynamických změn konformací biologicky zajímavých molekul.

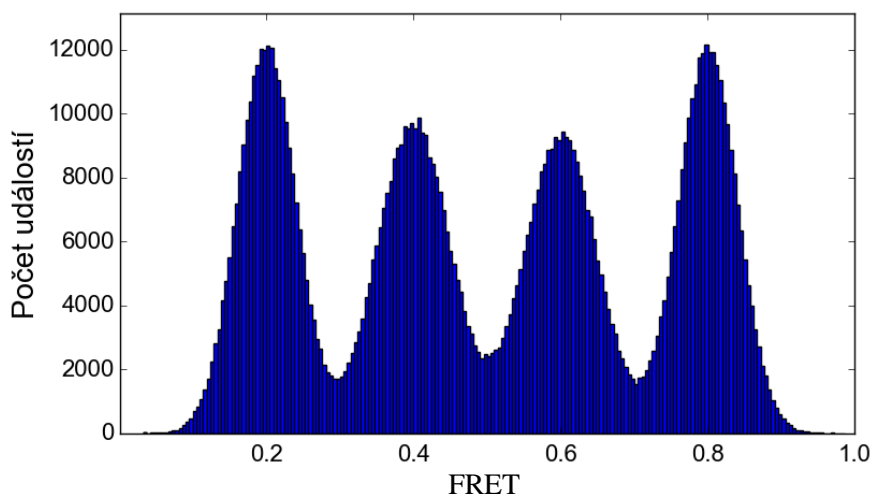
Řádně korigované hodnoty FRET jsou důležité pro následné zpracování dat pomocí pokročilejších technik, jako jsou BVA (Burst Variance Analysis), RASP (Recurrence Analysis of Single Particles [32]), ALEX-2CDE (Alternating Laser Excitation – Two-channel Kernel Based Density Distribution Estimator Function [33]), FRET-2CDE (FRET – Two-channel Kernel Based Density Distribution Estimator Function [33]), jež zpřístupňují mj. kinetické informace o měřených molekulách.

Simulace FRET je zpracována ve vyvinutém simulačním balíčku. Pro základní ověření funkčnosti FRET byl v první části vygenerován vektor hodnot FRET s následujícími parametry.

Tabulka 15. Parametry FRET

Parametr	Hodnota
Hodnota FRET A	0,2
Hodnota FRET B	0,4
Hodnota FRET C	0,6
Hodnota FRET D	0,8
Doba FRET A	10 000
Doba FRET B	10 000
Doba FRET C	10 000
Doba FRET D	10 000

Vypočtené hodnoty FRET byly zpracovány do histogramu (**Obr. 26**). Výsledky odpovídají očekáváním, hodnoty FRET jsou uniformně rozdělené, přičemž populace pro FRET 0,4 a 0,6 jsou více rozptýlené, což odpovídá větší směrodatné odchylce při generování jejich hodnot viz vztah (41).



Obr. 26. Histogram hodnot FRET. Vektor FRET vygenerovaný z hodnot FRET 0,2, 0,4, 0,6 a 0,8 s uniformním rozdělením doby trvání jednotlivých stavů je zpracován do histogramu. Připočtená odchylka normálního rozdělení je pro hodnoty 0,4 a 0,6 větší a způsobuje tedy silnější rozptýlení daných hodnot.

Dále byla spuštěna simulace pomalu se pohybující molekuly, přecházející mezi dvěma stavy reprezentovanými dvěma hodnotami FRET. V tomto případě FRET představuje přenos energie na krátkou vzdálenost mezi dvěma fluorescenčními sondami, donorem a akceptorem energie. Po dopadu fotonů na donor je část získané energie vyzářena a část předána akceptoru, odkud je následně taktéž vyzářena. Tato pomalu pohybující se molekula umožňuje zachycení delších záblesků a zachycení opakovaných přechodů mezi jednotlivými stavy v rámci jednoho záblesku.

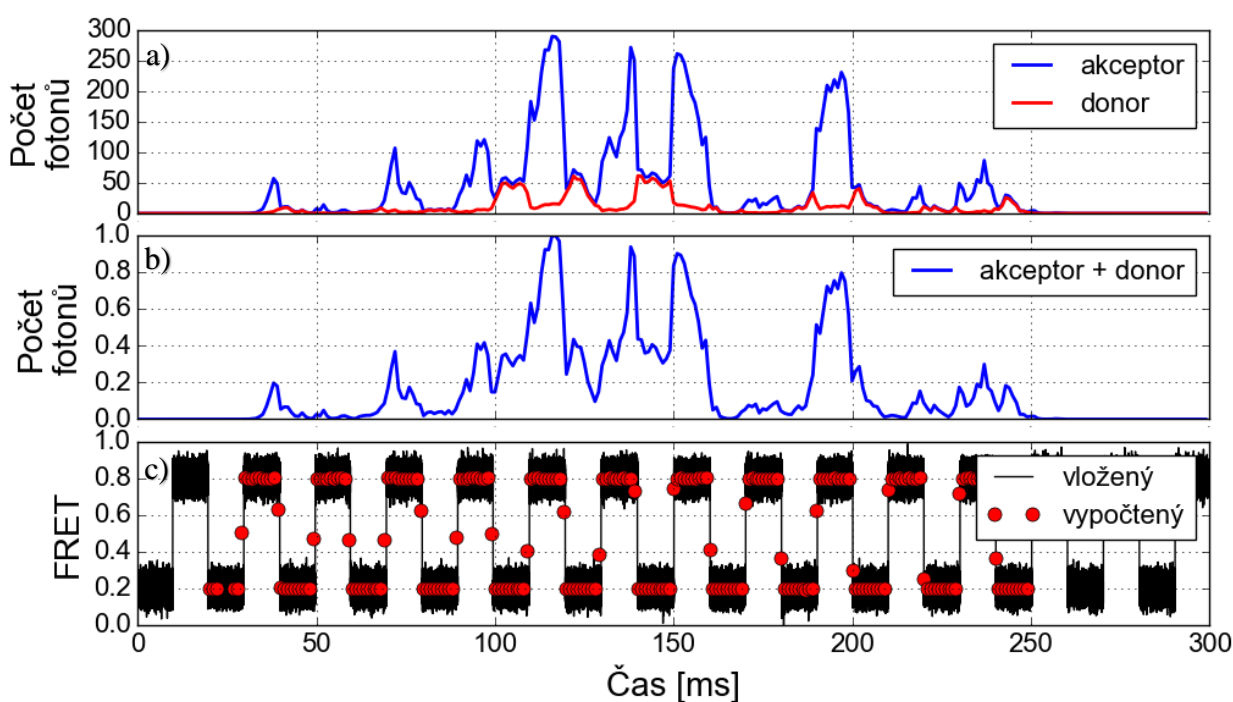
Simulace byla spuštěna s následujícími parametry.

Tabulka 16. Parametry simulace FRET

Parametr	Hodnota
Translační difuzní koeficient molekuly	$1 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$
Hodnota FRET A	0,2
Hodnota FRET B	0,8
Doba FRET A	10 000
Doba FRET B	10 000
Počet částic	1

Aplikací FRET vypočteného během simulace z vložených hodnot (**Obr. 27 c**) byly získány dva intenzitní profily, jeden pro kanál akceptoru a druhý pro kanál donoru (**Obr. 27 a**). Intenzity v obou kanálech odpovídají očekávaným přechodům FRET mezi hodnotami 0,2 a 0,8 s nastavenými odchylkami.

Pro maximální přiblížení k reálným podmínkám byly hodnoty FRET zpětně vypočteny ze získaných intenzit donoru a akceptoru. Po aplikaci korekcí byly porovnány s hodnotami simulovaného FRET (**Obr. 27 c**). Přepočtené hodnoty FRET přesně odpovídají hodnotám FRET simulovaného dle vložených hodnot.



Obr. 27. Opakované přechody FRET v rámci jednoho pomalého záblesku. Graf a) zobrazuje intenzity kanálů donoru a akceptoru. Jsou zde zřetelně vidět přechody mezi jednotlivými stavy FRET, jež přelévají intenzity mezi jednotlivými kanály. V grafu b) je zobrazena celková intenzita. Ve spodním grafu c) jsou černou linkou zobrazeny hodnoty FRET generované v průběhu simulace z vložených hodnot a červenými kruhy hodnoty FRET vypočtené ze získaných intenzit donoru a akceptoru.

3.5 Analýza BVA

BVA je pokročilá SMFD metoda založená na analýze FRET uvnitř záblesků, která byla vyvinuta pro rozlišení mezi dynamickými a statickými stavy molekul.

Je schopná detekovat dynamické přechody mezi konformacemi jednotlivých molekul, jež jsou reflektovány hodnotami FRET při průchodu konfokálním objemem. Jedná se převážně o grafickou metodu.

3.5.1 Ověření funkčnosti algoritmu BVA a jeho schopnosti rozlišení FRET

V první části analýzy metodou BVA byla ověřena schopnost vytvořeného algoritmu správně interpretovat a rozpoznat statické populace molekul a dynamiky přechodů u molekul podstupujících konformační změny.

Pro tento účel bylo provedeno celkem šest simulací. Tři z nich s FRET, s hodnotami 0,2, 0,5 a 0,8, představujícími statické populace molekul.

Další tři simulace představovaly populace molekul procházející konformačními změnami. Hodnoty FRET zde přecházely mezi 0,2 a 0,8, následně mezi 0,4 a 0,6 a na závěr mezi 0,2, 0,4, 0,6 a 0,8.

Simulace byly prováděny s následujícími parametry.

Tabulka 17. Společné parametry simulace pro ověření funkčnosti BVA

Parametr	Hodnota
Počet molekul	1
Translační difuzní koeficient molekul	$241 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$
Koncentrace molekul	1 nM dm^{-3}
Laterální poloměr konfokálního objemu	300 nm
Axiální poloměr konfokálního objemu	1800 nm
Počet fotonů v BVA sub-okně n	5

Tabulka 18. Parametry simulací statických populací

Simulace statických populací molekul	Hodnota FRET
1. simulace	0,2
2. simulace	0,5
3. simulace	0,8

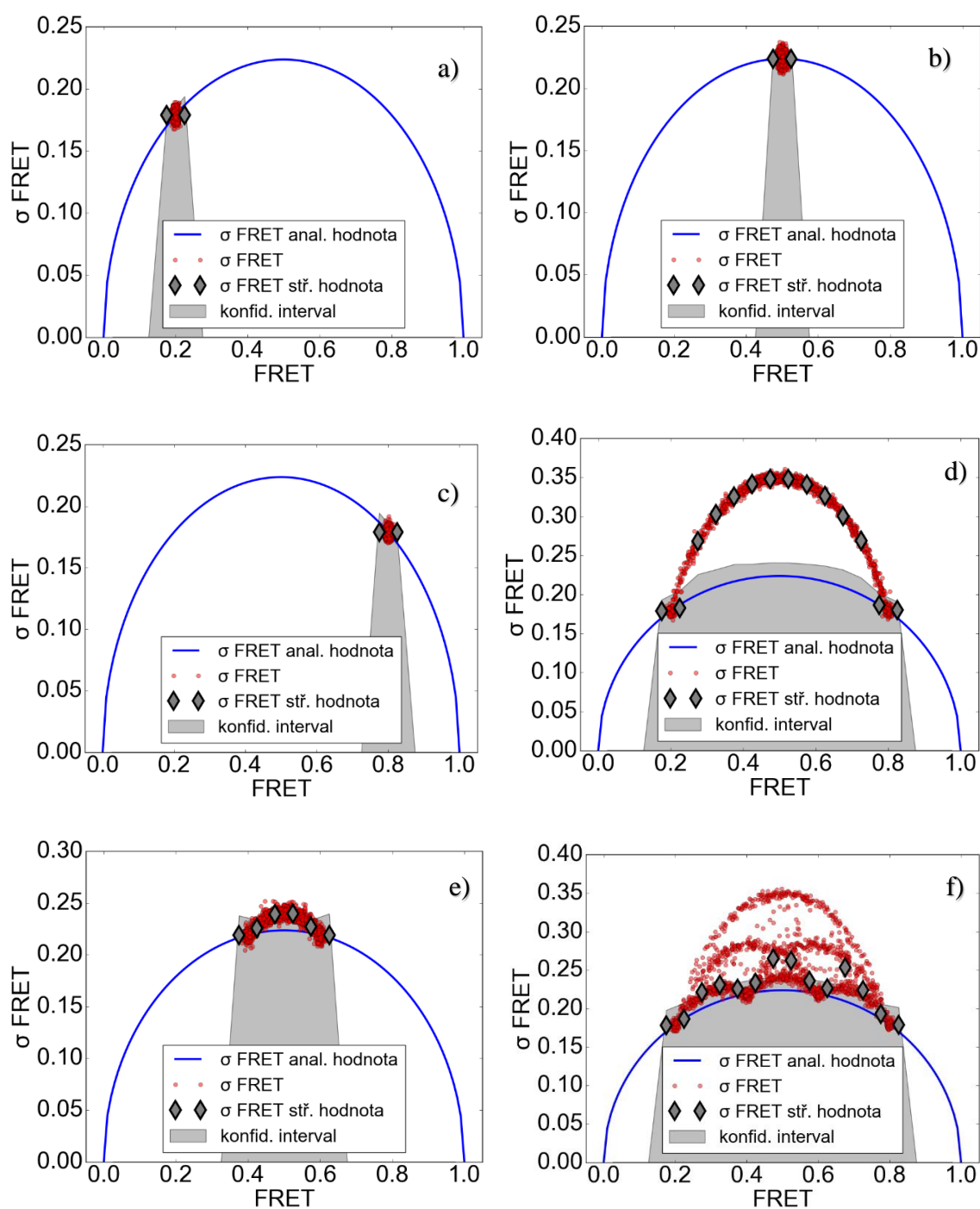
Tabulka 19. Parametry simulací dynamických populací

Simulace dynamických populací molekul	Hodnoty FRET
4. simulace	0,2 a 0,8
5. simulace	0,4 a 0,6
6. simulace	0,2, 0,4, 0,6 a 0,8

Výsledné střední hodnoty odchylek FRET ze simulací se statickým FRET (**Obr. 28. a**), **b**) a **c**) odpovídají očekávaným hodnotám stanoveným teoretickým modelem (**41**) pro statické populace a zároveň spadají do konfidenčního intervalu, čímž je prokázána schopnost algoritmu správně detekovat statické populace.

Střední hodnoty odchylek FRET pro simulace dynamických molekul s přechody $0,2 \leftrightarrow 0,8$ (**Obr. 28 d**) a $0,4 \leftrightarrow 0,6$ (**Obr. 28 e**) jsou vyšší než hodnoty stanovené teoretickým modelem pro statický FRET. Mimoto vystupují z konfidenčního intervalu a zároveň vytvářejí pomyslný most mezi středními hodnotami FRET. Takto uspořádané hodnoty jsou charakteristické pro systém dynamicky přecházející mezi dvěma stavy.

Finální zkouškou bylo otestovat algoritmus na komplikovanějším systému s vícenásobnými přechody. Zde byly vybrány molekuly přecházející náhodně mezi čtyřmi stavy: 0,2, 0,4, 0,6 a 0,8 (**Obr. 28 f**). I v tomto extrémně náročném případě byl algoritmus dostatečně citlivý pro zachycení dynamik mezi konformačními stavy molekuly.



Obr. 28 Analýza variance FRET. Grafy a), b) a c) zobrazují analýzu variance záblesků molekul se statickým FRET s hodnotami 0,2, 0,5 a 0,8. Pro statický FRET odpovídají hodnoty odchylek předpokládané analytické hodnotě vyjádřené modrou křivkou a leží uvnitř konfidenčního intervalu. Grafy d) a e) zobrazují analýzu variance záblesků molekul s dynamickým FRET, přecházejícím mezi dvěma hodnotami 0,2↔0,8 pro graf d) a 0,4↔0,6 pro graf e). Zachycené hodnoty odchylek FRET od jejich střední hodnoty formují tvar oblouku vystupujícího z konfidenčního intervalu, čímž vyjadřují dynamicky se měnící FRET. Graf f) zobrazuje analýzu variance záblesků molekul s dynamickým FRET přecházejícím náhodně mezi hodnotami 0,2, 0,4, 0,6 a 0,8. Výsledné hodnoty jsou opět charakteristické pro dynamický systém.

3.5.2 Ověření časového rozlišení algoritmu BVA

V této části byla ověřena schopnost algoritmu BVA rozpoznat dynamické populace molekul s různými rychlostmi konformačních přechodů. Ze znalosti algoritmu BVA lze předpokládat, že v případě velmi pomalých dynamik sledovaných molekul budou metodou BVA vyhodnoceny jako statické. Stejně tak pro molekuly přecházející mezi různými konformacemi velmi rychle není tato metoda schopna dynamiky dostatečně přesně rozlišit.

Algoritmus BVA zpracovává přechody mezi hodnotami FRET v jednotlivých záblescích a výsledky z jednotlivých záblesků následně opět porovnává mezi sebou. Odtud lze předpokládat, že schopnost zachytit dynamické přechody konformací molekul je funkcí poměru rychlosti přechodu mezi stavy FRET a střední hodnotou délky zpracovávaných záblesků R_{F_B} .

$$R_{F_B} = \frac{\text{čas mezi přechody FRETu}}{\text{střední délka záblesku}} \quad (58)$$

Pro ověření této hypotézy bylo provedeno celkem pět simulací, jejichž společným rysem byly přechody molekuly mezi konformacemi, jimž odpovídá FRET $0,2 \leftrightarrow 0,8$ s následujícími parametry.

Tabulka 20. Parametry simulací pro ověření časového rozlišení algoritmu BVA

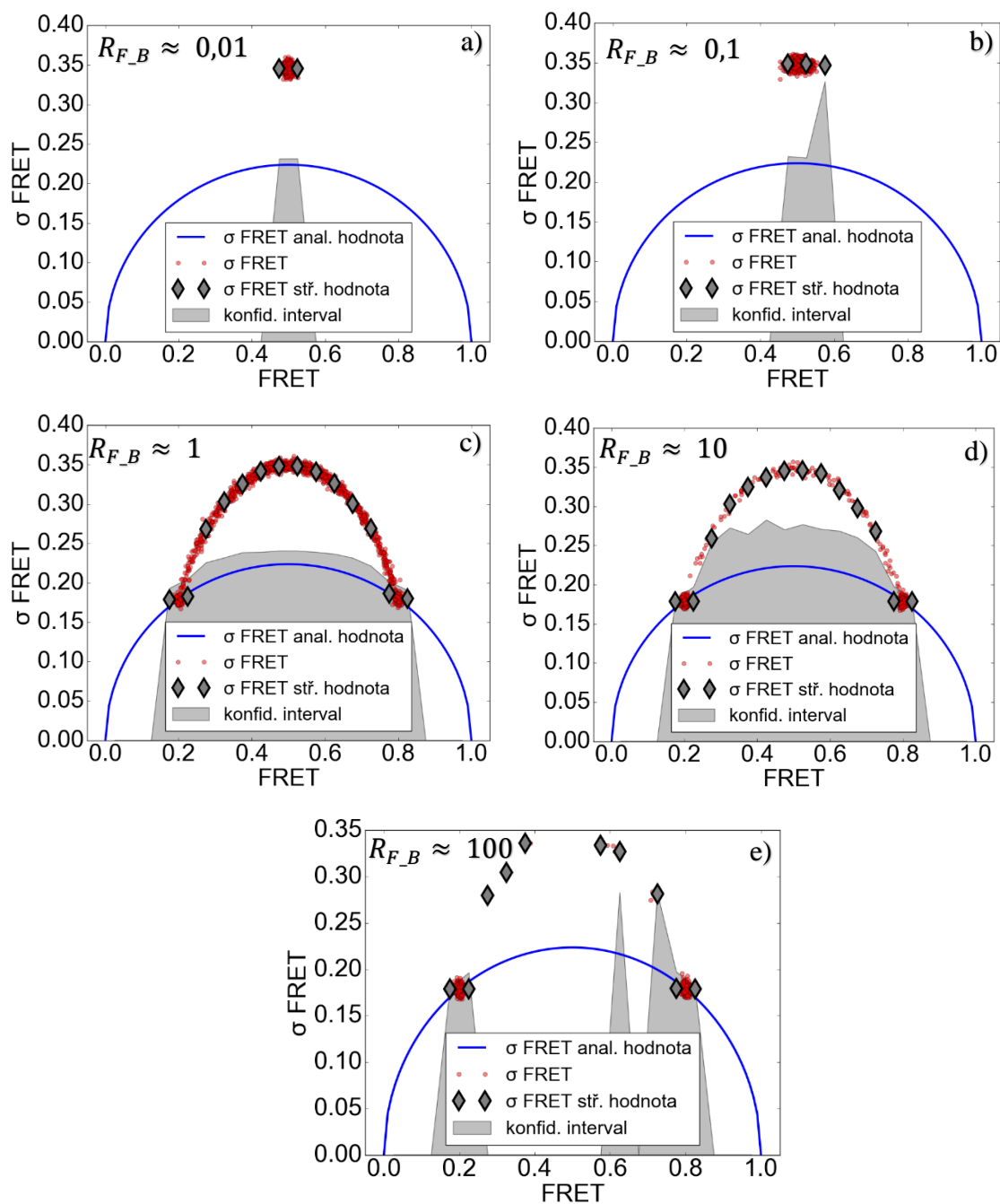
Parametr	Hodnota
Počet molekul	1
Translační difuzní koeficient molekul	$241 \text{ nm}^2 \mu\text{s}^{-1}$
Laterální poloměr konfokálního objemu	300 nm
Axiální poloměr konfokálního objemu	1800 nm
Počet fotonů v BVA sub-okně n	5
1. simulace – R_{F_B}	0,01
2. simulace – R_{F_B}	0,1
3. simulace – R_{F_B}	1
4. simulace – R_{F_B}	10
5. simulace – R_{F_B}	100

Výsledné hodnoty analýzy BVA pro $R_{F_B} = 0,01$ (**Obr. 29 a**) prokazují, že metoda nebyla schopna zachytit přechody v konformačních stavech simulované molekuly. Střední hodnoty odchylek FRET jsou sice relativně vysoké, což značí dynamický FRET, nicméně

nelze odhadnout, mezi jakými hodnotami FRET systém přecházel. Velmi podobné výsledky pak podává i simulace pro $R_{F_B} = 0,1$ (**Obr. 29 b**).

Analýza BVA pro $R_{F_B} = 1$ (**Obr. 29 c**) poskytuje zdaleka nejlepší výsledky ze všech provedených simulací v této části. Střední hodnoty odchylek FRET jsou vyšší než hodnoty stanovené teoretickým modelem pro statický FRET, dále vystupují z konfidenčního intervalu a zároveň vytvářejí pomyslný most mezi středními hodnotami FRET $0,2 \leftrightarrow 0,8$. Takto uspořádané hodnoty jsou charakteristické pro daný systém.

Střední hodnoty odchylek FRET ze simulace s parametrem $R_{F_B} = 10$ (**Obr. 29 d**) jsou opět vyšší než hodnoty stanovené teoretickým modelem pro statický FRET. Stále vytvářejí geometrický útvar oblouku značícího přechod mezi stavy FRET $0,2 \leftrightarrow 0,8$. Nicméně již v tomto případě dochází k přesunu středních hodnot odchylek FRET do statických hodnot FRET 0,2 a 0,8. Tento trend je již velmi výrazný pro hodnotu $R_{F_B} = 100$ (**Obr. 29 e**) V tomto případě jsou téměř všechny hodnoty středních odchylek FRET přesunuty do statických hodnot FRET a z provedené analýzy již nelze udělat žádné závěry.



Obr. 29. Závislost BVA na $R_{F,B}$, poměru rychlosti přechodu FRET ke střední délce záblesku (~ 1 ms). Modrá linka představuje hodnotu teoretického modelu pro statický FRET. Červené tečky jsou střední hodnoty odchylek FRET v rámci jednoho záblesku. Šedé diamanty jsou střední hodnoty odchylek FRET v rámci jednoho intervalu. Šedá zóna představuje konfidenční interval. Lze konstatovat, že výsledky BVA jsou poměrem $R_{F,B}$ výrazně ovlivněny. Z grafů a) a b) je zřetelné, že pro hodnoty $R_{F,B}$ menší než 1 nelze rozlišit, mezi kterými konformačními stavy simulovaná molekula přecházela. Graf c) s hodnotou $R_{F,B} = 1$ prokazuje nejlepší výsledky ze všech simulací. Střední hodnoty odchylek FRET jsou vyšší než hodnoty stanovené teoretickým modelem pro statický FRET, vystupují z konfidenčního intervalu a zároveň vytvářejí pomyslný most mezi středními hodnotami FRET $0,2 \leftrightarrow 0,8$ charakteristický pro daný systém. V grafech d) a e) je již patrný trend přesunu středních odchylek FRET do statických hodnot FRET, kdy v grafu e) jsou již výsledky neprokazatelné.

4. Závěr

Náplní této diplomové práce bylo vytvoření simulačního softwaru jakožto metody doplňující experimentální SMFD výzkum. Balíček zahrnuje simulaci Brownova pohybu v ohraničeném 3D prostoru definovaných tvarů a následné výpočty fluorescenčních intenzit při průchodu částic konfokálním objemem s možností simulace FRET. V druhé části pak zpracování výsledků simulací metodami FCS a BVA. Balíček je rovněž připraven na implementaci a testování dalších metod.

Při vývoji tohoto softwarového balíčku byl kladen velký důraz na realističnost celého procesu, a tak je ve výpočtech zaneseno mnoho fyzikálních vztahů, jimiž se řídí nejen Brownův pohyb, ale i následné výpočty fluorescenčních intenzit a simulace FRET. Umožňuje široké nastavení vstupních parametrů od geometrií použitých objektů přes fyzikální parametry simulovaných molekul a excitačního laseru až po vlastnosti konkrétní soustavy mikroskopu a detekční linky.

Pro případ potřeby simulace většího počtu částic byla do softwaru zabudována podpora paralelních výpočtů. Zároveň je balíček připraven a byl testován pro spouštění ve výpočetních centrech, konkrétně pro MetaCentrum, na jehož provozu se podílí i JČU.

Umožňuje simulovat pohyby molekul v prostorech ohraničených třemi základními tvary (koule, elipsoid a válec) s možností jednoduché modifikace pro další geometrie.

Zároveň umožňuje simulovat složitější scénáře relativních pohybů a rotací mezi třemi vztažnými soustavami: molekula, vnitřní objekt a vnější ohraničení. Příkladem využití může být simulace difuze rotujícího lipidického váčku, v jehož membráně je zachycena fluorescenční molekula.

Pro následné zpracování dat získaných ze simulací byl software doplněn o algoritmy pro analýzu FCS a BVA se zpětným výpočtem korigovaného FRET. Dále byl přidán algoritmus pro jednoduchou grafickou vizualizaci geometrií a poloh objektů v průběhu simulací ve formě grafů a videí.

V praktické části pak byla ověřena funkčnost simulačního softwaru a zároveň provedeny simulace vybraných fyzikálně zajímavých experimentů zpracovaných metodami FCS a BVA.

V kapitole zabývající se analýzou FCS byla nejprve zkoumána vhodná velikost délky časového kroku simulací. Jako základní hodnota byla vzhledem k poměru poloměru CV a rychlostem pohybu modelovaných molekul zvolena časová jednotka $0,1 \mu s$. Následně byla porovnáním distribucí intenzit ze dvou simulací s časovými kroky $0,1 \mu s$ a $1 \mu s$ prokázána možnost zvýšení časového kroku na $1 \mu s$. V případě výrazně vyšších difuzních koeficientů by ovšem bylo nutné opět zvážit snížení velikosti časového kroku pro udržení dostatečné přesnosti výpočtů.

Dále byl zkoumán vliv velikosti a tvaru vnějšího ohraničení na výslednou ACF a z ní počítané difuzní koeficienty a koncentrace. V rámci tohoto porovnání bylo provedeno několik simulací s postupně vzrůstajícími objemy, kde vnější ohraničení měla tvar koule a válce. Při výsledném porovnání vypočtených ACF s teoretickým modelem pro volnou difuzi a vložených parametrů s vypočtenými byly pozorovány výrazné rozdíly až do objemů 130násobku CV a menších pro simulace s kulovým ohraničením. Pro simulace s válcovým ohraničením (disk) pak i při velikosti 1135násobku CV.

Prvním možným vysvětlením těchto rozdílů je, že teoretický model pro ACF, který je základním vztahem, z nějž jsou počítány difuzní koeficienty a koncentrace, je založen na měření difuze ve volném roztoku. Omezení možného pohybu molekul tak zde není uvažováno. Druhým příspěvkem k nalezeným rozdílům pak je příliš malá velikost vnějších ohraničení při simulacích malých objemů, jež protínají geometrii CV a tím mění jeho tvar a velikost. Tyto vlivy je nutné brát v úvahu při reálných experimentech, protože mohou zanechat velké nepřesnosti do vypočtených koncentrací a rychlostí pohybu molekul.

Následně byl zkoumán vliv relativního pohybu na ACF. V tomto scénáři se pohybovala molekula ve vnitřní kouli (lipidický váček či kapička vody). Tato koule se pohybovala ve vnějším kulovém ohraničení (roztok). Sledovanými veličinami zde byly difuzní koeficient vnitřní koule a zároveň difuzní koeficient molekuly.

Vypočtený difuzní koeficient vnitřní koule dle očekávání odpovídá vložené hodnotě. Naopak získaná ACF molekuly je viditelně složena z rychlé a pomalé komponenty. Difuzní

koeficient rychlé komponenty odpovídá vloženému difuznímu koeficientu samotné molekuly. Nicméně pomalá část neodpovídá difuznímu koeficientu samotné vnitřní koule, jak jsme předpokládali, ale je přibližně třikrát delší.

Tento jev lze vysvětlit tím, že molekula pohybující se uvnitř koule efektivně prodlužuje čas, jenž vnitřní koule stráví v konfokálním objemu. Dochází zde k tomu, že ve chvíli, kdy okraj vnitřní koule vstupuje do CV a její střed je stále mimo něj, tak molekula díky rychlému pohybu uvnitř koule již emituje fotony. Stejný průběh lze uvažovat ve chvíli, kdy koule opouští CV. Z tohoto důvodu setrvává částice v konfokálním objemu delší dobu než střed koule. Tuto úvahu podporuje výrazně větší délka záblesků fluorescenčních intenzit molekuly ve srovnání se samotnou vnitřní koulí.

V další části analýzy metodou FCS byl ověřen vliv rotace na vypočtenou ACF. V tomto případě byla provedena simulace, kde na okraji rotující difundující koule v roztoku byla fixována molekula. Následně byly porovnány ACF koule a molekuly.

Vypočtený difuzní koeficient koule se příliš neliší od vložené hodnoty, čímž potvrzuje očekávané výsledky. Naopak difuzní koeficient molekuly umístěné na okraji koule má hodnotu 1,4násobek vloženého difuzního koeficientu a prokazuje tedy, že rotace ovlivňuje tvar ACF a z ní vyplývající hodnoty pro difuzní koeficient a difuzní čas. Tento jev je způsoben superpozicí translace a rotace, jež působí na molekulu zároveň. Při vzrůstajícím poloměru koule lze tedy očekávat větší rozdíly v ACF. Nicméně zde je nutné podotknout, že při vzrůstajícím poloměru koule dochází zároveň ke zpomalování rotace, tedy rozdíly v ACF jsou ovlivněny dvěma protichůdnými parametry.

V následující kapitole jsme ověřili simulaci FRET, a to porovnáním simulovaných hodnot s hodnotami vypočtenými ze získaných intenzit fluorescence donoru a akceptoru.

Pro toto ověření byla provedena simulace pomalu se pohybující molekuly přecházející mezi dvěma stavy reprezentovanými dvěma hodnotami FRET. Tato molekula vytvářela při průchodu CV delší záblesky, uvnitř nichž byly sledovány opakované přechody mezi jednotlivými stavy. Výsledné porovnání simulovaného a zpětně vypočteného FRET prokázalo správnou funkčnost algoritmů.

Poté následovala analýza BVA. Zde byla nejprve ověřena schopnost vytvořeného algoritmu správně interpretovat a rozpoznat statické populace molekul a dynamiky přechodů

u molekul podstupujících konformační změny. V tomto případě výsledky analýzy odpovídají očekávaným hodnotám jak pro statické, tak i pro dynamické populace.

Následně byla ověřena schopnost algoritmu BVA rozpoznat dynamické populace molekul s různými rychlostmi konformačních přechodů. V tomto případě se ukázalo, že pro molekuly přecházející mezi různými konformacemi řádově rychleji, než je střední délka nalezených záblesků fluorescenčních intenzit, není tato metoda schopna dynamiky dostatečně přesně rozlišit a získané výsledky odpovídají spíše statickým populacím molekul. Dále pak pro molekuly přecházející mezi různými konformacemi řádově pomaleji, než je střední délka nalezených záblesků fluorescenčních intenzit, dochází k přesunu středních hodnot odchylek FRET do statických středních hodnot FRET. V tomto případě je úspěšnost analýzy BVA úměrná délce pozorování. Pro zvýšení citlivosti metody BVA je pak možné upravit viskozitu, případně průměr štěrbin v prostorovém filtru detekční cesty, nebo velikost objektu ve kterém je sledovaná molekula uzavřena.

5. Seznam použité literatury

1. LAKOWICZ Joseph R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Singapore : Springer, 2006. ISBN 978-0387-31278-1.
2. GELL Chris, BROCKWELL David, SMITH Alastair. Handbook of single molecule fluorescence spectroscopy. Oxford : Oxford University press, 2006. ISBN 978-019-852942-2.
3. MOERNER W. E., FROMM David P. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. [Online] 2003. [Citace: 31. 03. 2017] <http://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.1589587>.
4. BERLAND Keith. Methods in Cellular Imaging. New York : Springer New York, 2001. ISBN 978-1-4614-7513-2.
5. DENIZ Ashok, MUKHOPADHYAY Samrat, LEMKE Edward. Single-molecule biophysics: at the interface of biology, physics and chemistry. [Online] 2008. [Citace: 31. 03. 2017] <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/5/18/15>.
6. MALÝ Petr. Optika. Praha : Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-2246-0.
7. HAW M. D. Colloidal suspensions, Brownian motion, molecular reality: a short history. [Online] 2002. [Citace: 01. 04. 2017] <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/14/33/315/pdf>.
8. EINSTEIN Albert. On the Movement of Small Particles Suspended in Stationary Liquids Required by the Molecular Kinetic Theory of Heat. [Online] [Citace: 02. 09. 2016] <http://home.agh.edu.pl/~dabrowa/files/Einstein-1905.pdf>.
9. SARAGOSTI Jonathan, SILBERZAN Pascal, BUGUIN Axel. Modeling E. coli Tumbles by Rotational Diffusion. Implications for Chemotaxis. [Online] 2012. [Citace: 02. 04. 2017] <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035412>.
10. KRICHEVSKY Oleg, BONNET Gregoire. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. [Online] 2002. [Citace: 01. 04. 2017] http://light.ece.illinois.edu/ECE564/Research_Projects_files/FCS_review_2002.pdf.
11. BERANOVÁ Lenka, HUMPOLÍČKOVÁ Jana, HOF Martin. Fluorescenční Korelační Spektroskopie. Chemické Listy. [Online] 2008. [Citace: 01. 04. 2017] http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf.
12. SCHWILLE Petra, HAUSTEIN Elke. Fluorescence Correlation Spectroscopy. [Online] [Citace: 01. 04. 2017] <http://pages.jh.edu/~iic/resources/ewExternalFiles/FCS-Schwille.pdf>.
13. ANSBACHER T., SRIVASTAVA HK., STEIN T., BAER R., MERKX M., SHURKI A. Calculation of transition dipole moment in fluorescent proteins--towards efficient energy transfer. [Online] 2012. [Citace: 02. 04. 2017] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331099>.

14. MCCANN JJ., CHOI UB., ZHENG L., WENINGER K., BOWEN ME. Optimizing Methods to Recover Absolute FRET Efficiency from Immobilized Single Molecules. [Online] 2010. [Citace: 02. 04. 2017] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913196/#bib5>.
15. INGARGIOLA Antonino, LERNER Eitan, CHUNG SangYoon, WEISS Shimon, MICHALET Xavier. FRET Bursts: An Open Source Toolkit for Analysis of Freely-Diffusing Single-Molecule FRET. [Online] 2016. [Citace: 02. 04. 2017] <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160716>.
16. TORELLA Joseph, HOLDEN Seamus, SANTOSO Yusdi, HOHLBEIN Johannes, KAPANIDIS Achillefs. Identifying Molecular Dynamics in Single-Molecule FRET Experiments with Burst Variance Analysis. [Online] 2011. [Citace: 02. 04. 2017] [http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495\(11\)00185-8](http://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495(11)00185-8).
17. Python Software Foundation. Python. [Online] 2017. [Citace: 02. 04. 2017] <https://www.python.org/>.
18. MetaCentrum VO. MetaCentrum. [Online] 2017. [Citace: 02. 04. 2017] <https://metavo.metacentrum.cz/cs/about/index.html>.
19. Olympus. Apon 60 x OTIRF objective. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] [http://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/tirf/#!cms\[tab\]=%2Fobjectives%2Ftirf%2F60xotirf](http://www.olympus-lifescience.com/en/objectives/tirf/#!cms[tab]=%2Fobjectives%2Ftirf%2F60xotirf).
20. Sigma Aldrich Co. Immersion oil. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/10976?lang=en®ion=CZ>.
21. Edmund Optics. Dichroic Mirror 552 nm. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] <http://www.edmundoptics.eu/optics/optical-filters/longpass-edge-filters/fluorescence-dichroic-filters/86334/>.
22. Edmund Optics. Dichroic Mirror 635 nm. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] <http://www.edmundoptics.eu/optics/optical-filters/longpass-edge-filters/fluorescence-dichroic-filters/87064/>.
23. Thorlabs. Silver Coated Mirror. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=903&pn=PF10-03-P01-10.
24. Thorlabs. Unmounted Achromatic Doublets 400-700 nm. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=AC254-075-A>.
25. Thorlabs . FELH0550 filter. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=6082&pn=FELH0550#7293.
26. Edmund Optics. Bandpass filter 562 nm 40 nm bandwitch. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] <http://www.edmundoptics.eu/optics/optical-filters/bandpass-filters/fluorescence-bandpass-filters/67019/>.

27. Semrock. Bandpass filter 685 nm 40 nm bandwitch. [Online] 2016. [Citace: 23. 11. 2016] <https://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=FF02-685/40-25>.
28. Thorlabs. Pinhole 75S. [Online] 2017. [Citace: 24. 03. 2017] <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=P75S> .
29. PASCHOTTA Rüdiger. RP Photonics. [Online] 2017. [Citace: 02. 04. 2017] https://www.rp-photonics.com/beam_divergence.html.
30. Rochester optics. SPCM AQR16 Photon counting module. [Online] 2001. [Citace: 25. 11 23.] http://www.optics.rochester.edu/workgroups/lukishova/QuantumOpticsLab/homepage/apd_spcm_aqr.PDF.
31. BAŠTINEC Jaromír. Statistika, stochastické procesy, operační výzkum. [Online] 2014. [Citace: 03. 04. 2017] http://matika.umat.feec.vutbr.cz/inovace/texty/DMA1/CZ/DMA1_plna_verze_CZ.pdf.
32. HOFFMANN A., NETTELS D., CLARK J., BORGIA A., RADFORD SE., CLARKE J., SCHULER B. Quantifying heterogeneity and conformational dynamics from single molecule FRET of diffusing molecules: recurrence analysis of single particles (RASP). [Online] 2011. [Citace: 02. 04. 2017] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21218223>.
33. TOMOV TE., TSUKANOV R., MASOUD R., LIBER M., PLAVNER N., NIR E. Disentangling Subpopulations in Single-Molecule FRET and ALEX Experiments with Photon Distribution Analysis. [Online] 2012. [Citace: 02. 04. 2017] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296060/>.

6. PŘÍLOHY

Příložené DVD obsahuje:

1. Popis algoritmu pro generování pozic v průběhu simulace
2. Popis algoritmu pro vyhledávání záblesků
3. Popis postupu při spouštění simulací v Metacentru
4. Obrázky
5. Vytvořený simulační software ve formě Python skriptů obsahující:

Simulační část

- a) Algoritmy pro výpočet pozic částic a pohyblivých vnitřních objektů
- b) Algoritmus pro výpočet fluorescenčních intenzit a FRET

Část zpracování dat

- a) Algoritmus pro výpočet FCS
- b) Algoritmus pro výpočet BVA
- c) Algoritmus pro vyhledávání a zpracování záblesků
- d) Algoritmus pro výpočet ztrát v průběhu detekční cesty
- e) Algoritmus pro vykreslení simulovaných geometrií