



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE VE VÝZKUMU ORGANIZACE BIOLOGICKÝCH MEMBRÁN

FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN RESEARCH ON THE ORGANIZATION OF BIOLOGICAL MEMBRANES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ondřej Vítek

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1782/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Ondřej Vítek**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu organizace biologických membrán

Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na téma studie vlastností biologických membrán pomocí fluorescenční spektroskopie.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodnou kombinaci technik, fluorescenčních sond a dostupných mikroorganismů a ověřit prakticky možnosti stanovení fyzikálně chemických vlastností jejich membránových domén.
- 3) Zhodnotit dosažené výsledky a navrhnout standardní postup pro měření s vybranými technikami a fluorescenčními sondami.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Ondřej Vítek
student

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá srovnáním a optimalizací metod studia biologických membrán pomocí fluorescenční spektroskopie a mikroskopie s využitím bakterie *Cupriavidus necator* H16 (obsahující PHB granule) a PHB⁻4 (neobsahující PHB granule) jako modelového organismu.

Experimentálně byla určena vhodná koncentrace sondy laurdan pro barvení biologických membrán a čas potřebný k jejímu průniku do buňky. Takto obarvené organismy byly dále studovány pomocí steady-state spektrofotometrie, při které byl zkoumán vliv teploty na tvar emisního spektra a také možnost promývání jako jednoho z kroků při přípravě vzorků. Obě tato měření naznačují výhodnost promývání, ale neposkytují nezpochybnitelné výsledky. Rozdíl mezi dvěma kmeny bakterie byl ale pozorován. Dále byly bakterie podrobeny fluorescenční mikroskopii. Tato metoda se projevila jako potenciálně užitečná pro studium výraznějších variací ve stupni uspořádání membrán buněčné membrány a pro zobrazování dalších větších útvarů. Distribuce laurdanu v rámci *Cupriavidu necator* H16 působí nerovnoměrněji ve srovnání s PHB⁻4. Získané poznatky tak naznačují vliv přítomnosti granulí při barvení fluorescenčními sondami, nelze je ale interpretovat jednoznačně.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the comparison and optimization of methods for studying biological membranes using fluorescence spectroscopy and microscopy, utilizing the bacteria *Cupriavidus necator* H16 (containing PHB granules) and PHB⁻4 (not containing PHB granules) as model organisms.

The appropriate concentration of the membrane probe laurdan for staining biological membranes and the time required for its penetration into the cell were determined. Organisms stained in this way were further studied using steady-state spectroscopy, which helped examine the influence of temperature on the shape of the emission spectrum and the possibility of washing as one of the steps in sample preparation. Both of these measurements suggest the advantages of washing but do not provide definite results. However, a clear difference between the two bacterial strains was observed. Furthermore, the bacteria were studied by fluorescence microscopy. This method proved to be potentially useful for studying significant variations in the membrane order of the cell membrane and for imaging other larger structures. The distribution of laurdan within *Cupriavidus necator* H16 appears more uneven compared to PHB⁻4. The findings thus suggest the influence of granule presence when staining with fluorescent probes, but they cannot be interpreted definitively.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cupriavidus necator, fluorescenční spektroskopie, fluorescenční mikroskopie, laurdan, biomembrána

KEY WORDS

Cupriavidus necator, fluorescence spectroscopy, fluorescence microscopy, laurdan, biomembrane

VÍTEK, Ondřej. *Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu organizace biologických membrán* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-22]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148007>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svému vedoucímu doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za cenné rady, pomoc s měřením a obecně neutuchající podporu a trpělivost při tvorbě mé bakalářské práce. Také bych rád poděkoval prof. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za přípravu a dodávání potřebných vzorků. Poděkování patří i mé rodině a přátelům (jmenovitě Mgr. Martin Kubů) a obzvláště Dopravnímu podniku města Brna, protože bez něj bych ještě seděl doma.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORIE	8
2.1	Biomembrána.....	8
2.1.1	Složky	8
2.1.2	Membrány prokaryot.....	9
2.1.3	Modely	9
2.1.4	Fyzikální vlastnosti	10
2.2	<i>Cupriavidus necator</i>	11
2.2.1	Autofluorescence <i>Cupriavidu necator</i> H16	11
2.2.2	PHB granule v <i>Cupriavidu necator</i> H16.....	11
2.2.3	<i>Cupriavidus necator</i> PHB ⁻⁴	12
2.3	Fluorescence	12
2.3.1	Princip	12
2.3.2	Stokesův posun.....	13
2.3.3	Kashovo pravidlo	14
2.3.4	Excitační a emisní spektrum	14
2.4	Pro fluorescenci charakteristické veličiny a děje.....	15
2.4.1	Základní používané veličiny	15
2.4.2	Försterův rezonanční přenos energie (FRET)	15
2.4.3	Zhášení	16
2.4.4	Fotovybělování.....	16
2.5	Fluorescenční sondy	16
2.5.1	Struktura	16
2.5.2	Mechanismus fungování	17
2.5.3	Laurdan (6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen)	17
2.5.4	Další běžné fluorescenční sondy	19
2.6	Fluorescenční techniky	20
2.6.1	Steady-state fluorescenční spektroskopie.....	20
2.6.2	Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie.....	21
2.6.3	Fluorescenční mikroskopie	21
2.7	Nežádoucí děje při fluorescenci	22
2.7.1	Rozptyl světla.....	22

2.7.2	Vnitřní fluorescence organismů	23
2.7.3	Snahy o ujasnění později používaných pojmů – pozadí a autofluorescence.....	23
2.7.4	Efekt vnitřního filtru (IFE).....	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1	Použité materiály, chemikálie, přístroje	25
3.1.1	Bakterie	25
3.1.2	Chemikálie	25
3.1.3	Přístroje a software.....	25
3.2	Příprava zásobních roztoků	26
3.3	Číslování vzorků.....	26
3.4	Výběr vhodné koncentrace laurdanu pro barvení bakterií.....	27
3.5	Kalibrační křivka pro určování <i>GP</i> fluorescenčním mikroskopem.....	28
3.6	Zobrazování <i>GP</i> fluorescenčním mikroskopem	29
3.7	Promývání vzorků.....	29
3.8	Vliv teploty na fluiditu membrán	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	Výběr vhodné koncentrace laurdanu pro barvení bakterií.....	31
4.2	Kalibrační křivka pro určování <i>GP</i> fluorescenčním mikroskopem.....	32
4.3	Zobrazování <i>GP</i> fluorescenčním mikroskopem	34
4.3.1	Zpracování hodnot, korekce	34
4.3.2	Snímky distribuce <i>GP</i> vzorků	35
4.3.3	Alternativní metoda korekce <i>GP</i>	36
4.4	Promývání vzorků.....	37
4.5	Vliv teploty na fluiditu membrán	38
5	ZÁVĚR.....	40
6	CITOVANÁ LITERATURA	42
7	PŘÍLOHY	48
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	50

1 ÚVOD

Fluorescenční techniky nachází široké uplatnění v řadě vědních oborů, pravděpodobně nejčastěji v materiálově vědě, mikrobiologii a biochemii. Obrovský vývoj v oblasti výpočetních technologií navíc umožňuje velice efektivně, přesně a rychle provádět měření, která by dříve zabrala dny. Rozvoji napomáhá také neustálé navrhování nových fluorescenčních sond o různých parametrech a účelech. Podobně široké uplatnění nachází i biotechnologie – od těch nejstarších, jako je výroba piva, po nové pokročilé bioreaktory s mikroorganismy schopnými produkce léčiv, polymerů nebo biopaliv. Je pak naprosto přirozené, že se někteří jedinci dobrodružnějšího charakteru pokouší tyto obory spojit.

Možností pro kombinaci těchto dvou oblastí je mnoho, tato práce se ale může zaměřit pouze na jedno téma. Zabývá se tedy bakterií *Cupriavidus necator*, kterou využívá jako modelový organismus pro fluorescenční barvení. Tento organismus je již delší dobu předmětem zájmu kvůli jeho schopnosti produkovat vysoké množství polymeru PHB v relativně širokém rozmezí životních podmínek.

Je nepochybně žádoucí mít co nejlepší povědomí o fyziologii a obecně vlastnostech používaných mikroorganismů. Je zde tedy prozkoumána možnost barvení buněčných membrán pomocí základních technik steady-state fluorescenční spektroskopie a mikroskopie. Zvolena byla sonda laurdan pronikající do lipofilních oblastí buňky. Laurdan je nejvíce používán právě při studiu buněčných membrán, protože se v nich ochotně rozpouští a je pomocí něj možné sledovat změny v jejich fluiditě. Ty mohou být způsobeny teplotou, ale i působením různých xenobiotik nebo vývojem samotné buňky.

Cílem této práce bylo prozkoumat chování sondy v bakterii a na základě těchto informací navrhnout optimalizovaný postup pro její používání v dalších experimentech. Na základě kombinace steady-state spektroskopie a mikroskopie byla zkoumána nejen odezva sondy v membráně, ale také rychlost internalizace do buňky a distribuce molekuly v rámci buňky. Byly zkoumány ideální koncentrace sondy pro barvení, doba potřebná pro proniknutí do buňky nebo také rozdíl mezi vzorkem ihned po obarvení a vzorkem promytým fosfátovým pufrem.

2 TEORIE

2.1 Biomembrána

Biomembrána je bariéra vyskytující se na povrchu buněk, membránových organel, jiných buněčných struktur a některých virů. Jedná se o fosfolipidovou dvojvrstvu, tedy útvar tvořený dvěma vrstvami amfifilních molekul fosfolipidů. Její tloušťka dosahuje jednotek nanometrů [1]. Plní funkci transportní, komunikační a kompartentační. První dvě zmíněné zajišťují i další nestrukturní složky biomembrán, jako například proteiny nebo různé glykokonjugáty.

2.1.1 Složky

Lipidy

Hlavní strukturní složkou membrán jsou amfifilní molekuly fosfolipidů. Ty se skládají z polární hlavičky (glycerol nebo sfingosin s různými substituenty) a esterově vázaných zbytků mastných kyselin, které se chovají jako nepolární část molekuly a orientují se do středu dvojvrstvy. Díky tomu je střed membrány lipofilní a umožňuje rozpouštění nepolárních molekul [2]. Mezi nejčastější substituenty patří různé alkoholy (glycerol, inositol), aminokyseliny (serin) nebo aminy [3]. Kromě biomembrán jsou fosfolipidy často používány ke tvorbě umělých vezikulárních struktur, jako jsou micely a liposomy, které se používají např. jako nosičové systémy pro řízené uvolňování léčiv a jiných bioaktivních látek [4].

Poměr těchto fosfolipidů se výrazně liší pro různé typy membrán i pro různé organismy. U bakterií to bývají primárně PG a PE. Obsah mastných kyselin je také závislý na typu membrán (u některých bakterií se výjimečně vyskytují acylové řetězce i 56 uhlíků dlouhé, přestože nejčastější jsou „tradičnější“ kyseliny, jako kyselina palmitová, stearová nebo olejová) a významně ovlivňuje fluiditu. Sfingolipidy mnohdy obsahují pouze jeden acylový řetězec, oproti dvěma řetězcům u fosfolipidů [1].

Steroidy

Steroidy jsou malé rigidní molekuly odvozené od struktury sterolu. Využívají se jednak jako prekurzory adrenokortikoidních a gonadotropních hormonů a také jako příměsi biomembrán [5]. Nejznámější zástupce, cholesterol, snižuje fluiditu membrán. Mechanismus toho to jevu je vysvětlen v kapitole *Fyzikální vlastnosti*.

Nestrukturní lipofilní složky

Různé molekuly lipidového charakteru v membránách plní funkci jinou než strukturní. Patří mezi ně například terpeny, vosky, estery mastných kyselin a jiných alkoholů, sulfolipidy nebo i chlorofyl. Tyto molekuly často, i když ne nutně, postrádají typickou fosfolipidovou konfiguraci s polární hlavičkou a nepolárními zbytky.

Proteiny

Proteiny tvoří velkou část funkčních molekul biologické membrány. Plní převážně funkci signální a transportní a podle způsobu vazby na membránu se dělí na integrální (pevně zapuštěné ve dvojvrstvě) nebo periferní (na povrchu dvojvrstvy).

Glykokonjugáty

Na povrchu membrány se vyskytují konjugáty oligosacharidů s lipidy a proteiny. Ty plní důležité rozpoznávací a informační funkce. Zajišťují mj. imunitní odezvu.

2.1.2 Membrány prokaryot

U eukaryot se setkáváme s membránovými organelami (mitochondrie, vakuoly, ...), prokaryota ale takovéto útvary postrádají. Jedinými relevantními membránami prokaryot je tedy membrána plasmatická a inkluze/granule.

Plasmatická

Plasmatická membrána buňky je velmi často (např. v případě buněčné stěny rostlin a hub) kryta dalšími strukturami z celulózy, ligninu a polysacharidů obecně. U prokaryot se vyskytuje buněčná stěna z peptidoglykanu. Podle složení a charakteristik buněčné stěny se rozlišují grampozitivní a gramnegativní bakterie, přičemž gramnegativní mají mimo jiné dvojistou plasmatickou membránu.

Membrána eukaryot i prokaryot je velmi často zvrásněná; úplně hladká je prakticky pouze membrána erytrocytu, která se také používá jako jakási standardní jednotka zvrásněnosti. Zvrásněnost kartáčových střevních buněk dosahuje až stonásobku erytrocytu, zatímco třeba *Bacillus subtilis* je zvrásněn zhruba dvojnásobně [1].

Granule, inkluze

V prokaryotických buňkách se vyskytují i další membránové útvary, které ale bývají spjaty se specifickými metabolickými funkcemi konkrétní buňky. V kapitole *PHB granule v Cupriavidu necator H16* budou popsány PHB granule v *Cupriavidu necator H16*, které jsou jako jediné pro tuto práci relevantní. Jejich zařazení do membránových útvarů je ovšem kontroverzní z dále popsaných důvodů.

2.1.3 Modely

Samotné fosfolipidy vykazují poměrně silnou schopnost pohyblivosti a membrána je proto popisována modelem tzv. **tekuté mozaiky** [6], protože se jedná de-facto o dvourozměrnou kapalinu. Podle něj je biomembrána tvořena lipidovou dvojrůstvou s nehomogenně rozmístěnými proteiny i lipidy. Vysvětluje zároveň závislost některých funkcí proteinů na fyzikálních vlastnostech membrány [7].

Zároveň ale model tekuté mozaiky předpokládá naprosto volnost pohybu lipidů i proteinů, což se projevilo jako ne docela pravdivé. Úplně volná difúze nemůže být schopna zajistit relativní organizovanost, která je na reálných membránách pozorována [4].

Lipidové rafty

Model s lipidovými rafty uspokojivěji popisuje na membránách pozorované tuhé shluky lipidů. Ty jsou popisovány jako oblasti bohaté na cholesterol a sfingolipidy. Jedná se o tlustší a pevnější ostrovy vyčnívající nad okolní membránu a často obsahují větší množství proteinů. Díky jejich vlastnostem lépe odolávají detergentům. Tento model je pro studium membrán poměrně zásadní, protože přisuzuje lipidům kromě funkce strukturní i funkci regulační [4].

Domény

Ve skutečnosti jsou membrány vysoce organizované struktury obsahující domény bohaté na různé typy lipidů a proteinů, plnící specifickou funkci a disponující svými specifickými fyzikálními vlastnostmi. Zpravidla se domény dělí podle své fluidity na rigidní a oblasti zvýšené fluidity (RIFs). Právě fluidita je aspektem, který tyto domény na první pohled separuje od

zbytku membrány. Buňky ji mohou ovlivňovat změnou poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin nebo změnou délky jejich řetězce [8].

2.1.4 Fyzikální vlastnosti

Fázové přechody

Obvyklá schémata zobrazují membránu v takzvané lamelární fázi, což je fáze v biologických systémech převažující, ale zdaleka ne jediná. U membrán se totiž definuje teplota „tání“ T_i , na kterou má zásadní vliv délka acylových zbytků a jejich nasycenost (přičemž se zvyšováním obou T_i stoupá). Mastné kyseliny se totiž v základním stavu vyskytují v *trans* konformaci. Dodáváním energie zahříváním vznikají zakrytové konformace, které jsou energeticky nevýhodné a spontánně přechází do konformace *gauche*. Zvýšený počet *gauche* konformací vede ke zvýšení fluidity a přechodu z gelové fáze l_β do fáze tekuté l_α [7]. Dalším nezanedbatelným vlivem je přítomnost cholesterolu, jehož 3- β -hydroxylová skupina zabraňuje fosfolipidům ve změně konformace a fluiditu výrazně snižuje. Jiné steroly, jež disponují hydroxylovou skupinou na jiné pozici (ergosterol), tento efekt zpravidla nevykazují [1].

Membrána v kapalně fázi vykazuje vyšší propustnost, fluiditu a plochu, naopak její tloušťka a obecně stabilita se snižuje.

Fluidita

Pro kapaliny se fluidita definuje jako obrácená hodnota viskozity. Membrána je ale silně anizotropní prostředí, proto je potřeba vzít v potaz více faktorů. Definujeme tři základní druhy pohybů částice v membráně – posuvný pohyb po ploše membrány (laterální difúze), rotační pohyb molekuly po podélné ose a tzv. flip-flop (tedy difúze lipidů z jedné strany membrány na druhou). Fluidita se navíc mění se vzdáleností od povrchu membrány, čímž vzniká určitý gradient, měřitelný mimo jiné metodou NMR, kterou se ale tato práce nezabývá. Hodnota fluidity není uniformní ani na různých místech povrchu membrány, proto lze pozorovat specializované úseky („microdomains“) plnící specifické biologické funkce a významně se lišící ve fyzikálních vlastnostech [2].

Místo jednoduchých fyzikálních metod se na její měření využívá různých molekulových sond, které jsou popisovány v kapitole 2.5.

Stupeň uspořádání membrány (membrane order) bývá často používán téměř jako synonymum fluidity [4]. Definice uspořádání membrány je ale značně problematická a závislejší na kontextu. Zastřešuje totiž řadu různých charakteristik, jako hustotu lipidů v membráně, jejich vlastnosti, přítomnost cizích látek, membránovou tloušťku a mnohé další. Tyto jednotlivé charakteristiky jsou měřeny různými metodami, přičemž každá metoda pak ale poskytuje lehce odlišné výsledky, protože reflektuje jen určitý specifický parametr (často pouze přibližně) korespondující se zastřešujícím pojmem „uspořádání membrány“ [9].

Velice jasně definuje tento pojem F. M. Harris jako „přístupnost membrány vodě“. Fluiditu pak vnímá jako veličinu, která s membránovým uspořádáním často koresponduje, ale fakticky odpovídá pouze možnosti pohybu samotných lipidových molekul [10]. Takové pojetí je poměrně silně ovlivněno oblastí jeho studie.

V této práci bude pojem fluidity a uspořádání membrány zaměňován. Tyto dvě veličiny totiž velmi silně korelují a jejich rozlišení není v možnostech tohoto výzkumu.

Další fyzikální charakteristiky membrán

Mezi další charakteristiky patří např. transmembránový a elektrostatický potenciál membrány. Ty jsou způsobeny jednak potenciálovým gradientem způsobeným polopropustností membrány, případně i nábojem samotných polárních hlaviček fosfolipidů.

2.2 *Cupriavidus necator*

Námi zkoumaná bakterie nese název *Cupriavidus necator*, je ale známá i pod staršími názvy *Ralstonia eutropha*, *Hydrogenomonas eutropha*, *Wautersia eutropha* nebo *Alcaligenes eutrophus* [11]. Jedná se o gramnegativní fakultativně chemolitoautotrofní organismus ze třídy β -proteobacteria schopný růst na velkém rozsahu substrátů [12], produkovat polyhydroxybutanoát (PHB) a mimo jiné i fixovat CO₂ ze vzduchu. Je také častým předmětem genového inženýrství – jeho metabolické dráhy lze modifikovat a zpracování uhlíku směřovat k produkci různých jiných polymerů a uhlovodíků [13; 14]. Bude využíván kmen *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantní kmen PHB⁻⁴.

2.2.1 Autofluorescence *Cupriavidu necator* H16

Většina buněk obsahuje určité množství látek vykazujících fluorescenční vlastnosti. Samotný fenomén autofluorescence bude popsán v oddíle 2.7. Zde jsou popsány konkrétní problémy týkající se námi zkoumaného organismu.

Největším objektem zájmu jsou v tomto případě molekuly skupiny flavinů, nikotinamidů a aromatických aminokyselin. Flaviny emitují přibližně v oblasti 500–600 nm, zatímco NADH a NADPH zhruba o 100 nm méně. Bylo zjištěno, že se emisní spektrum skupiny flavinů mění v závislosti na fyziologickém stavu buňky a reflektuje i tvorbu PHB granulí [15]. To je dobře využitelné pro sledování stavu buněk, ale spíše nežádoucí pro účely této práce.

2.2.2 PHB granule v *Cupriavidu necator* H16

Polyhydroxybutanoát (PHB) je typickým příkladem bakteriemi produkováných polyesterů z rodiny polyhydroxyalkanoátů. Jedná se, jak už název naznačuje, o derivát kyseliny máselné. Pro řadu organismů plní roli zásobního polymeru (zásobní zdroj uhlíku i energie) syntetizovaného při nadbytku uhlíku a nedostatku ostatních živin [16]. To umožňuje jeho schopnost akumulace ve formě granulí a zároveň dobrá biokompatibilita a biodegradabilita. Pozornost průmyslu se na PHB zaměřuje právě kvůli jeho relativní biokompatibilitě a ekologickému charakteru výroby.

Cupriavidus necator H16 produkuje tento polymer ve velkém množství. PHB je ukládán v takzvaných granulích, tedy intracelulárních útvech zvětšujících se a zmenšujících podle momentálního stavu buňky. Uvádí se, že intracelulární granule PHB mohou při specifických podmínkách tvořit až 80 % hmotnosti bakterie [13]. Organismus je též schopný produkovat PHB fixací CO₂, kde již ovšem limitujícím faktorem produkce většinou není metabolismus bakterie samotné, ale rychlost přísunu plynu [17]. Existují i studie zkoumající zvýšenou rezistenci bakterií obsahujících PHB granule stresovým podmínkám (zvýšená teplota, oxidace) [18], primárně je ale PHB považován za látku zásobní.

Granule obsahují PHB v amorfním stavu, přičemž v *Cupriavidu necator* H16 se jich vyskytuje obvykle několik (počet se pohybuje v jednotkách až nižších desítkách). Jejich velikost je silně ovlivněna podmínkami růstu, ale zpravidla nepřesahuje 1 μ m. Díky lipofilnímu charakteru

polymeru nedochází při formování (a zpětnému odbourávání) granulí ke změně osmotického tlaku v cytoplasmě [19].

Dříve se předpokládalo, že granule obsahují fosfolipidovou membránu. Bylo ale prokázáno, že je povrchová vrstva složena pouze z řady proteinů (PHB syntáza, strukturální proteiny bránící agregaci povrchové vrstvy, depolymerázy, ...) [20].

2.2.3 *Cupriavidus necator* PHB-4

Jedná se o mutantní kmen, který nevytváří PHB, a to nehlédě na dodávané živiny. Tento kmen byl spolu s dalšími čtyřmi kmeny připraven chemicky indukovanými mutacemi v přírodě se vyskytujícího kmenu H16 v roce 1970. Buňky rostou v podobných podmínkách jako kmen H16 a také se příliš neliší svou fyziologií. Snížení obsahu PHB ale zvyšuje jejich hustotu a mutantní kmen lze tudíž od H16 oddělit centrifugací v hustotním gradientu [21].

V této práci bude využíván právě pro svou neschopnost tvořit PHB granule, tedy pro srovnávání s *Cn* H16.

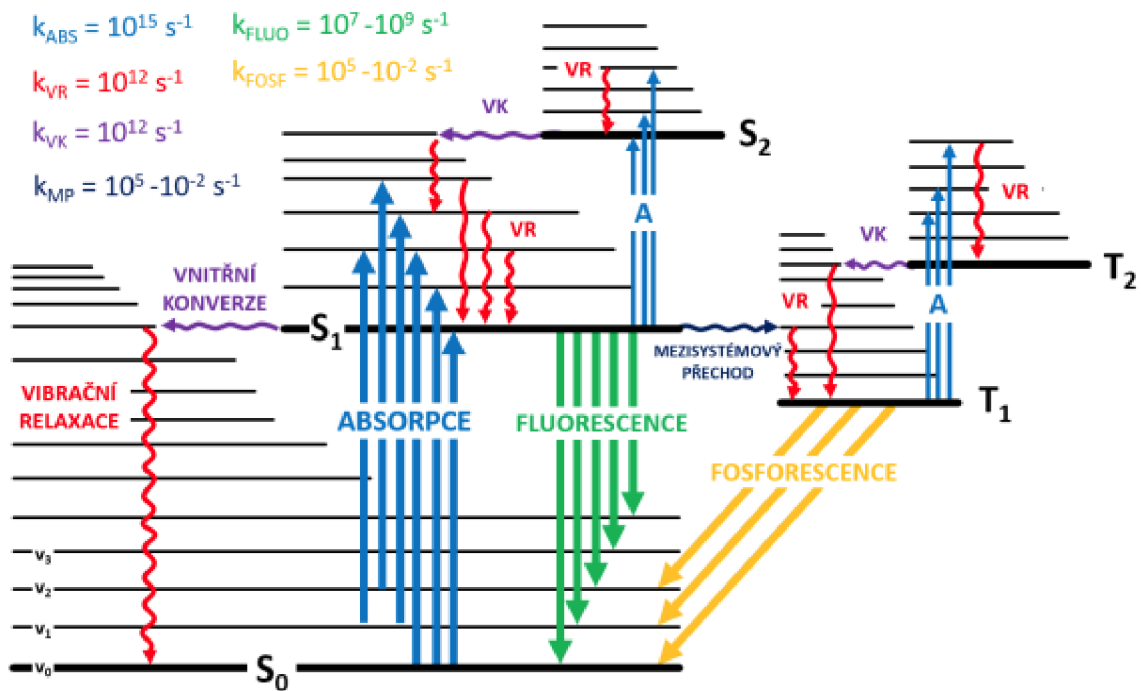
2.3 Fluorescence

Fluorescence je jeden z jevů souhrnně označovaných luminiscence. Při ní dochází k excitaci molekuly důsledkem absorpce elektromagnetického záření (případně i chemickými nebo fyzikálními procesy při bioluminiscenci, chemiluminiscenci nebo triboluminiscenci) a její následné deexcitaci doprovázené emisí záření o zpravidla rozdílné vlnové délce. Předmětem této práce je emise vyvolaná absorpcí elektromagnetického záření UV/VIS spektra, tedy fotoluminiscence, konkrétně fluorescence. Látka vykazující fluorescenční vlastnosti je nazývána fluorofor [22].

2.3.1 Princip

Excitační i deexcitační procesy v molekule při fotoluminiscenci bývají znázorňovány tzv. Jablůnskiho diagramem (*Obrázek 1*). Ten ukazuje základní singletové excitované hladiny (S_1 , S_2), které jsou rozděleny na několik rotačních a vibračních hladin, přičemž vibrační a rotační hladiny jednotlivých excitovaných stavů se mohou částečně překrývat. Také znázorňuje tripletovou hladinu T_1 , ve které jsou elektronové spiny orientovány paralelně a přechod na níž je zakázaný [1].

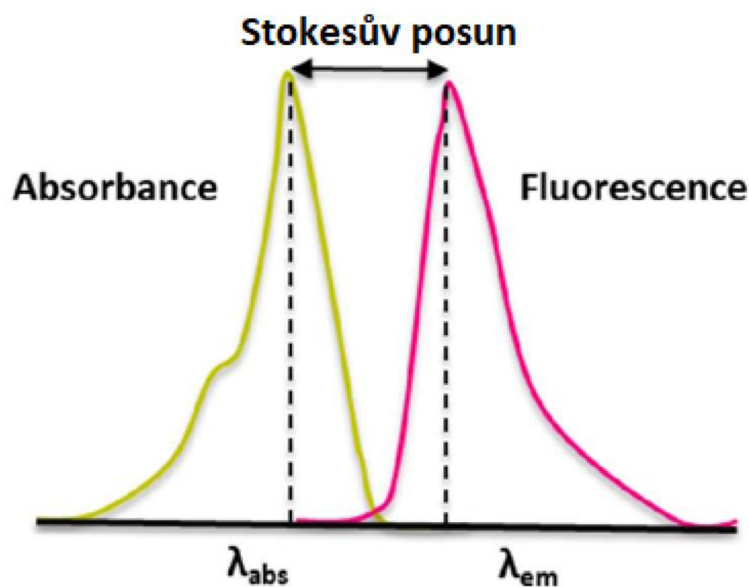
Absorpcí záření o vhodné vlnové délce dojde k přechodu valenčního elektronu molekuly ze základního singletového stavu S_0 do jednoho ze singletových excitovaných stavů o vyšší energii. Zde probíhá řada různých přechodů, první z nichž jsou nazývány **nezářivé přechody**. Může docházet k deexcitaci vibrační relaxací (přechodem mezi vibračními hladinami), k tzv. vnitřní konverzi (přechodu mezi vibračními hladinami o podobné energii mezi jednotlivými singletovými stavy) nebo k tzv. mezisystémovému přechodu do zakázaného tripletového stavu. Dále dochází k **přechodům zářivým**, tedy k deexcitaci buď ze singletového stavu (fluorescence) nebo ze stavu tripletového (fosforescence) za emise fotonu. Procesy doprovázející fosforescenci jsou výrazně pomalejší, neboť musí docházet ke změně spinu elektronu [23]. Právě zářivé přechody mezi singletovými stavy jsou z hlediska fluorescenční spektroskopie důležité.



Obrázek 1 – Perrin-Jabloňského diagram spolu s přibližnými rychlostními konstantami jednotlivých přechodů. Plné šipky znázorňují přechody, při nichž figuruje foton (absorpce a zářivé přechody), vlnovka nezářivé přechody [67].

2.3.2 Stokesův posun

Stokesův posun (angl. Stokes shift) je pravidlem, které uvádí, že vlnová délka emitovaného fotonu je vždy vyšší než vlnová délka fotonu, který emisi způsobil [24]. Nezářivými přechody dochází totiž ke ztrátě energie elektronu, což vyústí v pozorovatelné snížení vlnové délky emise [25].



Obrázek 2 – V praxi se Stokesův posun projevuje posunem celého emisního spektra oproti spektru absorpčnímu [28].

2.3.3 Kashovo pravidlo

Podle tohoto pravidla před emisí fotonu dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi tak, aby fluorescenční přechod probíhal z nejnižší vibrační hladiny stavu S_1 nehladě na hladinu, do které byl elektron absorpcí excitován. Je to způsobeno nízkými rozdíly mezi první excitovanou hladinou a vyššími excitovanými hladinami, mezi kterými se tak upřednostňují převážně rychlé nezářivé přechody.

Z něj vyplývá i **pravidlo Vavilovovo** – kvantový výtěžek, doba trvání excitovaného stavu, a tedy i výsledný tvar emisního spektra jednoho fluoroforu nezáleží na excitační vlnové délce. Ta ovlivňuje pouze jeho výšku (intenzitu emitovaného záření) [26].

2.3.4 Excitační a emisní spektrum

Excitační spektrum zobrazuje závislost fluorescence vzorku na excitační vlnové délce – ukazuje, jaké vlnové délky jsou nejlépe absorbovány fluoroforem. Stanovuje tedy například, kterou vlnovou délku je vhodné zvolit pro efektivní excitaci vzorku. Při zvolení záření o nevhodné vlnové délce se významně snižuje jeho fluorescence. Pojem excitační spektrum fluoroforu je u systémů obsahujících pouze jeden fluorofor obvykle zaměnitelný se spektrem absorpčním. V přítomnosti více látek (příp. i komplexnějších sloučenin) se ale absorpční a emisní spektrum liší.

Emisní spektrum znázorňuje intenzitu záření emitovaného excitovanou molekulou na jednotlivých vlnových délkách. Obě spektra jsou charakteristická pro jednotlivé fluorofory za specifických podmínek a poskytují tak údaje o stavu analyzovaného vzorku, co se týče složení i fyzikálních vlastností.

Pro excitační a emisní spektrum platí tzv. **pravidlo zrcadlové symetrie**. Vibrační hladiny základního a excitovaného stavu jsou si zpravidla velmi podobné a emisní spektrum je tak zrcadlově symetrické se spektrem excitačním (viz *Obrázek 2*). Vzdálenost mezi těmito spektry je již dříve zmíněný Stokesův posun [22].

Komplikovanější situace ovšem nastává v systémech s více fluorofory, případně i látkami absorbujícími, ale neemitujícími. Uvedená pravidla totiž platí pro jednotlivé fluorofory a spektra vzniknuvší kombinací několika látek se jimi pak (byť pouze zdánlivě) neřídí.

Změny tvaru spektra

Různé vlivy prostředí mohou způsobit změnu tvaru spektry. Mezi základní jevy se řadí změna výšky, tedy intenzity záření (hyperchromní a hypochromní) a posun do jiných vlnových délek. Takové posuny se nazývají bathochromní - červený (do vyšších vlnových délek) a hypsochromní - modrý (do nižších vlnových délek).

Oblasti, ve kterých nabývá měřená veličina viditelně nejvyšší hodnoty, jsou často nazývány **peaky**. V případě fluorescence se jedná o oblasti nejvyšší intenzity emitovaného záření. Jedná se o jakési orientační body, které mohou sloužit ke kvantitativní i kvalitativní analýze látky. Fluorescenční spektra ale mají obvykle komplexnější tvar determinovaný řadou mechanismů a pojem **peak** se tak používá jen ve velmi specifických situacích (např. v případě nežádoucích artefaktů, jako je rozptyl).

2.4 Pro fluorescenci charakteristické veličiny a děje

Různé fluorescenční techniky sledují různé parametry a fenomény. Ty nejběžnější jsou uvedeny zde. Další sledované veličiny jsou popsány u konkrétních fluoroforů v jim věnované kapitole.

2.4.1 Základní používané veličiny

Zde jsou uvedeny základní veličiny používané k popisu a chování fluoroforů.

Extinkční (absorpční) koeficient

Extinkční koeficient udává schopnost látky absorbovat světlo dané vlnové délky. Nejčastěji se používá vztažen na látkovou koncentraci látky jako **molární absorpční koeficient** ε [27]. Figuruje v Lambert-Beerově zákoně o absorpci elektromagnetického záření.

Doba života excitovaného stavu τ

Průměrná doba, kterou molekula stráví v excitovaném stavu. Jednotlivé přechody mají své vlastní rychlostní konstanty – proto například zakázaný mezisystémový přechod způsobuje vyšší dobu života u fosforeskujících látek oproti fluoroforům, ale také nižší intenzitu fosforescence. Jedná se prakticky o děj popsatený rovnicí reakce prvního řádu

$$\tau = \frac{1}{k}, \quad (1)$$

kde k je sumou rychlostních konstant jednotlivých přechodů [28]. Doba života je studována časově rozlišenou fluorescenční spektroskopií.

Kvantový výtěžek fluorescence Φ_f

Představuje jakousi efektivitu fluoroforu. Udává poměr počtů fotonů absorbovaných ku počtu fotonů emitovaných (N_{em} , N_{abs}).

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}} = \frac{k_f}{k}, \quad (2)$$

kde k_f je rychlostní konstanta fluorescence (samotného zářivého přechodu) [28].

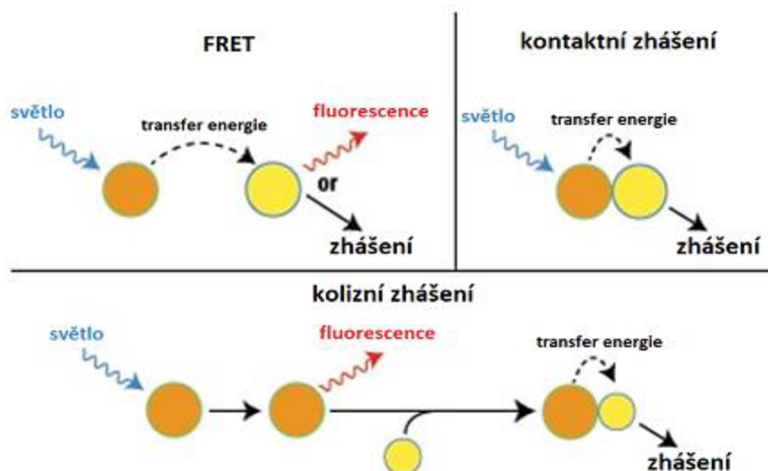
2.4.2 Försterův rezonanční přenos energie (FRET)

Försterův rezonanční přenos energie představuje nezářivý přenos energie mezi dvěma molekulami v bezprostřední vzdálenosti. Excitovaná donorní molekula přenáší svoji energii na molekulu akceptoru díky dalekodosahovým dipólovým interakcím. Tento děj je nazýván Coulombický efekt a je velmi podobný klasickému přechodu elektronu v rámci jedné molekuly. Efekt je silně ovlivněn vzdáleností a orientací fluoroforů, může ho proto být využíváno jako metody pro zjišťování např. vzdálenosti molekul. Za předpokladu, že je akceptoru molekula také fluorofor, dochází k emisi záření podle jejího vlastního emisního spektra. V ostatních případech probíhá zhášení.

Podmínkou průběhu tohoto děje je alespoň částečný překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru [29].

2.4.3 Zhášení

Emisi fluoroforu lze přímo ovlivňovat interakcí s jinými molekulami. Zhášení (angl. quenching) je definováno jako ztráta fluorescence způsobena krátkodobými interakcemi mezi fluoroforem a jeho prostředím. Různé mechanismy zhášení jsou uvedeny na *Obrázek 3*.



Obrázek 3 – mechanismy zhášení fluorescence [30].

2.4.4 Fotovybělování

Fotovybělování (angl. photobleaching) je další z jevů, v jehož důsledku intenzita fluorescence klesá. Na rozdíl od předchozích případů se ale jedná o ireverzibilní změny molekuly v důsledku příliš intenzivního nebo dlouhotrvajícího ozáření. Mechanismus fotovybělování jednotlivých molekul se liší.

Fotovybělování se zabráňuje výběrem správného fluoroforu a použitím co možná nejcitlivější metody, která umožňuje minimalizaci intenzity excitačního záření nebo dobu osvětlení fluoroforu [9].

2.5 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou molekuly využívané často např. při studiu biochemických a biologických systémů. Reagují na měřené podněty specifickou změnou fluorescence (často změnou její intenzity, případně vlnové délky). Označení sonda a barvivo jsou často zaměňována, u mnoha molekul závisí čistě na způsobu použití dané látky. V určitém smyslu by se fluorescenční sondy daly nazvat jakýmsi barvivem s odezvou odpovídající sledované veličině. Barviva jsou vnímána pasivněji.

2.5.1 Struktura

Struktura molekul většinou odráží i způsob jejich zakomponování do membrány. Podle toho se také fluorofory rozdělují na několik typů.

Barviva nepodobná lipidům, ale díky své hydrofobicitě pronikající do membrány (DPH, pyren) se zpravidla neváží na konkrétní oblast membrány, ale mohou být užitečná pro zjišťování některých fyzikálních charakteristik.

Deriváty lipidů mohou nést fluorescenční skupinu buď na své polární hlavičce nebo na acylovém řetězci. Mezi ně se často zahrnují i sterolové deriváty. Příkladem fluoreskujících

molekul, které se používají k vazbě na lipid je 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD) nebo skupina BODIPY [31]. Většinou platí pravidlo, že méně polární fluorofory se navazují na acylové řetězce a naopak, byť zrovna v případě NBD je toto pravidlo často porušováno [32]. Membránové sondy na bázi fosfolipidů se používají k vybarvování specifických oblastí buňky, do kterých se preferenčně začleňují na základě své struktury [33].

Třetí typ derivátů jsou **molekuly specifického tvaru**, které se anisotropicky včleňují do membrán. Patří mezi ně například Prodan a jemu podobné (Laurdan, Patman). Reagují na širokou škálu podnětů. Těchto barviv a sond je velké množství, a proto nemá smysl je obecně představovat. Někteří zástupci budou popsáni v následujících odstavcích.

V současné době existuje celá řada sond s rozmanitými vlastnostmi a reagujících na mnoho různých podnětů. Tato variabilita umožňuje mimo jiné i použití více barviv při jednom experimentu. Obvykle se hledají barviva s jednoduchou reakční kinetikou, vysokou stabilitou a neměnnými parametry v závislosti např. na teplotě a tlaku, pro využití ve studiu biologických systémů je navíc požadována biokompatibilita. Zároveň musí sonda pozorovatelně reagovat na měřené změny v biologických membránách a vykazovat vysokou afinitu k požadovaným oblastem [31].

2.5.2 Mechanismus fungování

Fluorofory musí poskytovat spolehlivou odezvu. Je proto potřeba sledovat mechanismy, jakými případný analyt ovlivňuje fluorescenci molekuly.

Intramolekulární přenos náboje (ICT)

Molekuly fungující na principu ICT obsahují elektrondonorní skupiny spojené konjugovanými vazbami s elektroneakceptorní skupinou. Excitací dochází k výraznému zvýšení dipólového momentu. Navázání analytu tento efekt významně ovlivňuje tím, že buď snižuje donorní charakter donoru, nebo zvyšuje akceptorní schopnosti akceptoru. Toto může zapříčinit červený/modrý posun, tedy posun spektra do vyšších/nížších vlnových délek [27].

2.5.3 Laurdan (6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen)

Biologická membrána obvykle nedisponuje uniformními fyzikálními vlastnostmi po celé své ploše. Laurdan umožňuje identifikovat změny v organizaci membrány s rozlišením okolo jednoho mikrometru [34]. Je to užitečná sonda reflektující fyzikální vlastnosti jako je fluidita, čímž umožňuje pochopit biologické funkce jednotlivých domén nebo například pochopit mechanismy účinku membránových antibiotik. Ve skutečnosti neměří fluiditu, ale reaguje na obsah vody v membráně, respektive na polaritu prostředí, která s fluiditou přímo souvisí [8].

Bylo navíc prokázáno, že polární hlavičky fosfolipidů ani jejich náboj (při změně pH) nemají na fluorescenci vliv. Ani přítomnost různých peptidů a proteinů neovlivňuje výsledky měření. Spektrální změny jsou tak při nižších teplotách čistě otázkou přítomnosti polárních molekul uvnitř lipidové dvojvrstvy. Vliv $\text{pH} < 4$ byl prokázán až pro teploty okolo $60\text{ }^\circ\text{C}$ a způsobuje mírný nárůst generalizované polarizace *GP* [35]. Při takových teplotách už ale dochází k denaturaci mnoho biomolekul a obecnému narušení struktur buňky.

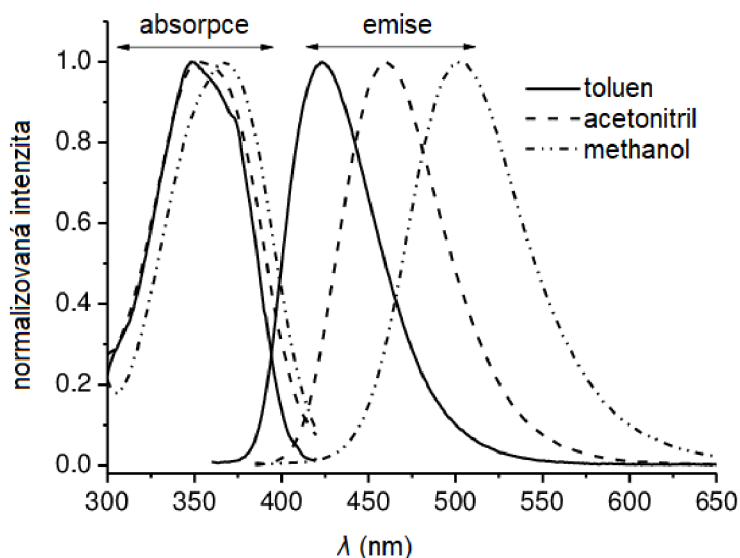
Laurdan je nerozpustný ve vodě (je jí dokonce zhášen), ale rozpustný ve většině organických rozpouštědel, proto ochotně přestupuje z vody do buněk. To umožňuje po zvolení vhodné koncentrace velmi jednoduše obarvit pouze lipofilní částice a prakticky eliminovat fluorescenci pozadí. Inkorporace do buněk není okamžitá, výzkumy ale naznačují, že ustálení intenzity a *GP*

netrvá obvykle déle než hodinu [33; 36]. Rychlost závisí na druhu barvené buňky, koncentraci, teplotě a dalších obvyklých faktorech.

Kladně nabitá hlavička laurdanu znemožňuje volnou distribuci do vnitřní části membrány a dvanáctihlíkový řetězec zapříčiňuje jeho pevnější ukotvení (v porovnání např. s prodanem).

Mechanismus

Polarita rozpouštědla způsobuje červený posun emisního spektra. Například pro dodekan se hlavní peak vyskytuje v oblasti 400 nm, zatímco pro methanol je posunut až na 500 nm [35]. Hlavní roli v tomto procesu hraje interakce polární molekuly rozpouštědla s dipólem excitované molekuly laurdanu, která umožňuje průběh intramolekulárního přenosu náboje [37]. Předpokládá se totiž, že laurdan může existovat ve třech excitovaných stavech, a to lokálně excitovaném (LE, emituje kolem 400 nm), ICT a twisted-ICT (vyšší vlnové délky). Z prvního jmenovaného probíhá relaxace velmi rapidně, v přítomnosti vody ale dochází i k dipolární relaxaci a tedy výraznému červenému posunu [38; 22]. Se stoupající fluiditou tak proniká mezi lipidové řetězce membrán více polárních molekul (primárně vody) a zároveň se zvyšuje jejich mobilita [35].



Obrázek 4 – normalizovaná absorpční a emisní spektra laurdanu v rozpouštědlech o různé polaritě. S rostoucí polaritou dochází k výraznému zvýšení vlnové délky emise. Nepatrný efekt lze pozorovat i u spektra absorpčního [66].

Zhášení fluorescence laurdanu vodou

Posun spektra se zvýšením polarity membrány je hlavním důvodem užitečnosti této molekuly. Přítomnost vody ale také významně snižuje intenzitu emise. Dochází k takzvanému koliznímu zhášení, které způsobuje významné snížení doby života excitovaného stavu [39].

Experimentální využití

Pro zpracování experimentálních dat se definuje mj. takzvaná generalizovaná polarizace

$$GP = \frac{I_{440} - I_{500}}{I_{440} + I_{500}}, \quad (3)$$

kde I jsou intenzity fluorescence o vlnové délce 440, resp. 500 nm. Hodnota GP se pohybuje v hodnotách -1 až 1, přičemž nižší hodnoty představují vyšší polaritu (a tedy přeneseně i fluiditu membrány) [36]. Například závislost GP na teplotě vypadá jako klasická klesající sigmoidní křivka, kde inflexní bod představuje bod tání membrány [35]. Právě pro výzkum fázových přechodů a jiných fluktuací ve fluiditě membrán se laurdan nejčastěji používá.

Obvyklá hodnota excitačního záření se pohybuje mezi 350 a 380 nm. Používání různých excitačních vlnových délek vede k malé, ale postřehnutelné změně GP [40].

Anisotropie

Anisotropie vyjadřuje nerovnoměrnost směru polarizace světla. V případě fluorescence se určuje porovnáním intenzity excitačního a emitovaného záření v určitém směru polarizace jako

$$r = \frac{I_0 - fI_{90}}{I_0 + 2fI_{90}}, \quad (4)$$

kde I jsou intenzity záření snímaného za polarizačním filtrem nastaveným rovnoběžně a kolmě vůči polaritě excitačního záření. Místo 0 a 90 ° lze v literatuře často narazit na označení vv/vh , které značí vertikálitu/horizontalitu polarizačních filtrů [33]. Paralelní pozici 0 ° by tedy odpovídalo vv , kdy jsou filtry pro excitační i emitované záření nastaveny vertikálně. Korekční faktor f udává poměr intenzity záření s filtrem nastaveným rovnoběžně a kolmě a je specifický pro daný přístroj. Přístroje často nabízí výpočet anisotropie přímo v přístrojovém software.

V mnoha případech koresponduje s GP a využívá se pro podobné účely. Nejedná se ale o spektrální charakteristiku, tudíž na rozdíl od GP například reflektuje i pohyblivost samotné molekuly laurdanu [41].

Deriváty

Množství molekul založených na struktuře laurdanu vykazuje podobné fluorescenční a membránově-afinitní vlastnosti. Mezi ně patří M-laurdan, C-laurdan nebo MoC-laurdan, lišící se funkční skupinou nahrazující jeden methyl aminoskupiny laurdanu. Jejich vlastnosti jsou dostatečně popsány, ale pro tuto práci irelevantní. Často se liší například rozpustností, a tedy schopností pronikat do různých membrán [33].

2.5.4 Další běžné fluorescenční sondy

V této práci je používána pouze membránová sonda laurdan. Pro kontextualizaci je ale vhodné zmínit i další molekuly, které je možné pro podobné aplikace zvážit.

BODIPY

Skupina BODIPY se používá pro určování změn v pH. Molekula disponuje poměrně vysokým molárním absorpčním koeficientem a kvantovým výtěžkem. Často se vyskytuje navázána na fosfolipidy, ale může být i součástí jiných molekul [27].

Prodan (6-propionyl-2-(dimetylamino)naftalen)

Prodan je prakticky kratším ekvivalentem laurdanu - jeho spektrum se v nepolárním prostředí výrazně posouvá k vyšším vlnovým délkám na základě identického mechanismu.

Studie zkoumající vliv obsahu cholesterolu v membráně naznačila preferenční interakce prodanu s cholesterolem, ústící ve specifické změny tvaru emisního spektra. Distribuce prodanu v rámci membrány tak není v přítomnosti cholesterolu uniformní [42].

DPH (1,6-difenylhexatrien)

Jedná se o amfifilní fluorescenční sondu, která se podobně jako laurdan používá primárně ve studiu struktury a fyzikálních vlastností biologických membrán. Předpokládanou polohou sondy v rámci membrány je v důsledku jejího podlouhlého charakteru pozice paralelní s acylovými řetězci fosfolipidů, navíc díky její nepolárnosti proniká hlouběji do středu membrány a pohybuje se výrazně volněji než dříve zmíněný laurdan [43]. Nedávné studie se zabývají použitím DPH pro zkoumání efektu sterolů a jiných strukturních molekul na fyzikální vlastnosti membrány [44; 45].

Primárním analytickým využitím DPH je měření jeho anisotropie, která významně klesá v tuhých membránách, které zabraňují rotaci molekuly, a tedy i změně polohy/konformace v excitovaném stavu [46].

TMA-DPH

Na rozdíl od laurdanu, jehož deriváty jsou do značné míry jen rozmarem organických chemiků, přináší kationtový derivát TMA-DPH řadu výhod. Jeho polární hlavička umožňuje snadnější inkorporaci do fosfolipidové dvojvrstvy a pevnější ukotvení blíže k povrchu. Doba excitovaného stavu molekuly je též nižší, což vede k nižším rozdílům v anisotropii v porovnání s DPH při experimentech o stejných podmínkách [43]. Vzhledem k rozdílné pozici DPH a TMA-DPH v rámci membrány je možno porovnáním fluorescence těchto dvou sond zjišťovat parametry jako třeba profil laterálního tlaku. Toto využití ještě ovšem nebylo dostatečně popsáno [47].

Kyanobarviva (DiI, DiO, DiD, DiA, DiR)

Anglicky nazývána „carbocyanine dyes“ (v některých dokumentech lze najít české označení karbokyaniny), barviva této třídy patří mezi velmi oblíbené lipofilní molekuly pro výzkum živých buněk a tkání. Jedná se o molekuly podobné struktury, lišící se délkou uhlíkového řetězce a polohou heteroatomů v hlavičce.

Jejich spektrální vlastnosti na délce řetězce nezávisí, jsou ovlivněny výhradně hlavičkou obsahující aromatické heterocyklické systémy, které se pro jednotlivá barviva liší [30]. Barviva bývají vyzdvihována pro svůj vysoký molární absorpční koeficient, nízkou dobu excitovaného stavu a vysokou stabilitu, které zastiňují tragický kvantový výtěžek [48]. Široké spektrum molekul podobných vlastností prezentuje řadu výhod, například možnost výběru barviva o specifické excitační vlnové délce při výzkumu fotocitlivých biologických systémů nebo v kombinaci s jinými fluorescenčními sondami.

2.6 Fluorescenční techniky

Fluorescence je využívána v celé řadě analytických technik. Zde jsou uvedeny pouze ty nejběžnější nebo v této práci využívané.

2.6.1 Steady-state fluorescenční spektroskopie

Nezákladnější fluorescenční technikou je pravděpodobně steady-state fluorescenční spektroskopie (spektrofluorimetrie). Spektrofluorimetr je přístroj, který excituje vzorek definovaným úzkým rozsahem vlnových délek a detekuje emitované záření (také specifické vlnové délky). Emise je detekována po delší časový úsek (řádově desítky sekund až sekundy), čímž získáváme průměrnou intenzitu emise. Vzorek je tedy excitován konstantním tokem excitační energie a je snímán konstantní tok energie emise.

Díky excitačním a emisním monochromátorům je možné získávat excitační i emisní spektra (případně i excitačně-emisní mapy). Použití polarizačních filtrů umožňuje měřit anisotropii, tepelné články zase umožňují sledovat změny ve tvaru spekter v závislosti na teplotě. Běžné laboratorní přístroje pracují v rozsahu vlnové délky přibližně 200 – 1000 nm.

Technika je použitelná ke kvantitativní i kvalitativní analýze; umožňuje v závislosti na použitém fluoroforu zjišťovat např. koncentrace vzorků, průměrnou fluiditu buněčných membrán nebo polaritu rozpouštědla, nelze s ní ale zjišťovat detailnější informace, jako je distribuce barviva v rámci membrány nebo velikost obarvených částic.

2.6.2 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Tato metoda oproti steady-state sleduje změnu intenzity fluorescence nebo anisotropie v čase po krátkém excitačním impulsu. Puls excitačního světla je zde kratší než doba života excitovaného stavu, díky čemuž můžeme sledovat změnu intenzity emise v řádu nanosekund (od chvíle excitace do vyhasnutí).

Měření časově rozlišené fluorescence se provádí metodou TCSPC (Time-correlated single photon counting), kdy se počítá velké množství událostí (dopadů jednotlivých fotonů na detektor) spolu s dobou jejich nastání od momentu vyslání excitačního impulsu. Kombinací mnoha měření (řádově tisíců) se pak získá shluk bodů, které lze proložit a získat závislost intenzity fluorescence na čase [49].

Díky této metodě lze například rozlišit dva fluorofory, jejichž spektra se překrývají, ale jejichž doba života je jiná, nebo efekty různých látek na fluorofory (vliv rozpouštědla, zhášení, ...). Tato metoda je tak vhodná pro studium samotného mechanismu fluorescence. Tento přístup je použitelný jak při studiu celého vzorku, tak pro mapování doby života pomocí fluorescenčního mikroskopu [50].

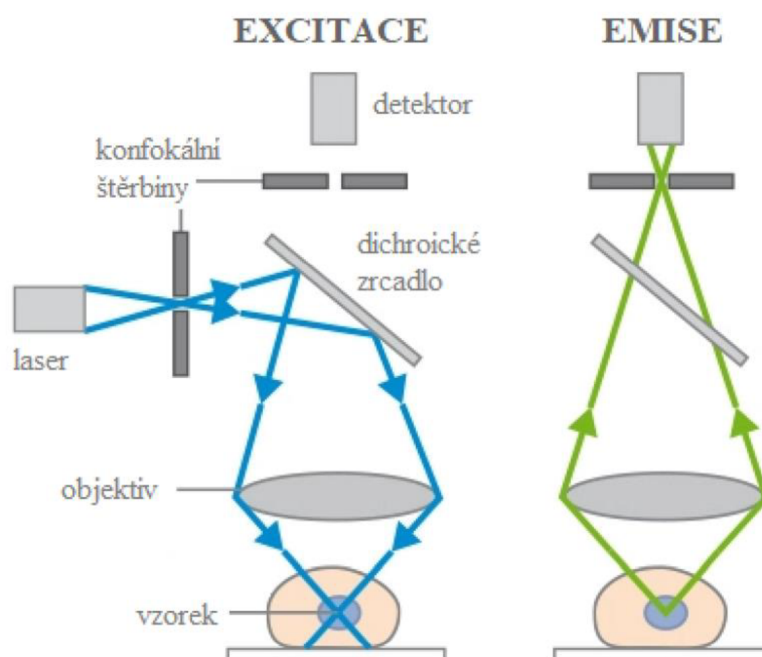
2.6.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie na rozdíl od té optické nepracuje na principu reflexním nebo transmisním, ale měří světlo emitované vzorkem po ozáření excitačním paprskem (čili neměří světlo z původního světelného zdroje). Excitační záření vzniká buď lampou (paprsek poté musí procházet filtrem propouštějícím požadovanou vlnovou délku), nebo laserem o konkrétních parametrech. Následně se odráží od dichroického zrcadla a dopadá na vzorek, který excituje. Vzorkem emitované záření pak dichroickým zrcadlem prochází směrem k detektoru. Zařízení musí být schopno oddělit velmi slabé emitované světlo od mnohem silnějšího excitačního, čehož se docílí použitím emisního filtru. Využívá se tedy rozdílné vlnové délky excitace a emise.

Oproti ostatním technikám umožňuje mikroskopie detailnější prozkoumání menšího vzorku díky poskytovanému dvojrozměrnému obrazu. Lze tak pozorovat jakékoliv variace v distribuci/emisi fluoroforu v rámci vzorku a sledovat podrobněji morfologii zkoumaných částic. Kromě studia membrán se používá i pro specifitější barvení např. fluoreskujícími protilátkami.

Při tradiční mikroskopii je celý vzorek osvětlen rovnoměrně a snímán najednou. To ovšem způsobuje, že je v jeden moment snímán celý objem vzorku, včetně rozmazaného pozadí nacházejícího se mimo ohniskovou rovinu. Ostrý obraz je dostupný pouze snímáním světla procházejícího fokálním bodem čočky. U konfokálního mikroskopu je zdrojem emise vzorku vždy pouze jeden konkrétní bod. Emitované světlo pak prochází přes clonu (obvykle

označováno štěrbinou, angl. pinhole), díky čemuž se odstraní prakticky veškeré světlo nepocházející z ohniskové roviny. Dojde tak k významnému zvýšení ostroty [51].



Obrázek 5 – schéma konfokálního fluorescenčního mikroskopu [68]

2.7 Nežádoucí děje při fluorescenci

Při fluorescenčních měřeních často probíhají děje, které mohou měření v různé míře a různými způsoby ovlivnit, a které je potřeba umět při analýze spekter identifikovat. Dochází k nim především při práci s vysoce koncentrovanými vzorky o vysoké absorpci nebo u biologických systémů, kde velikost částic a přítomnost různých kontaminací často způsobuje rozptyl záření.

2.7.1 Rozptyl světla

Fluorescence je poměrně dlouhotrvající proces zahrnující relaxaci excitačního stavu elektronu nezářivými přechody, zatímco při rozptylu světla vzniká pouze „virtuální“ excitovaný stav, v důsledku čehož se jedná o děj s řádově nižší dobou života a často bez vlivu na frekvenci rozptýleného záření. Velmi často se ho dá zbavit změnou excitačního záření nebo prostým odečtením emisního spektra neobarveného vzorku.

Rayleighův rozptyl

Tento jev nastává při prostém rozptylu excitačního záření bez změny frekvence (elastický rozptyl) a v důsledku toho se projevuje jako peak vlnové délky excitačního záření [23]. Přístroje většinou ukazují peak Rayleighova rozptylu i na dvojnásobné vlnové délce, což bývá způsobeno technickými nedostatky monochromátoru [52]. Tento artefakt je někdy také nazýván pásem druhého řádu [53]. Prevence Rayleighova rozptylu spočívá v selekci vhodné vlnové délky excitačního světla, rozumně vzdálené od zkoumané části fluorescenčního emisního spektra.

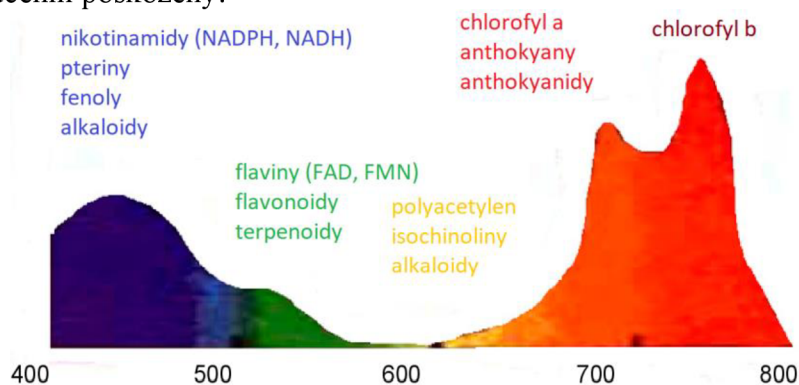
Při měření vzorků charakteru suspenze se intenzita rozptylovaného záření výrazně zvyšuje. To může v krajních případech vést až k poškození přístroje. Je proto nutné volit rozsah snímání emise tak, aby nezahrnoval vlnovou délku excitačního paprsku.

Ramanův rozptyl

Při Ramanově rozptylu dochází k předání části energie při kontaktu fotonu s elektronem a vznikající záření má tak odlišnou energii (neelastický rozptyl). Podle toho, je-li výsledná energie fotonu nižší nebo vyšší než původní, rozlišujeme Stokesův a anti-Stokesův rozptyl. Podle toho se i mění energie ozařované molekuly. Podoba Ramanova spektra je charakteristická pro druh rozpouštědla i excitační záření [54]. Měřením Ramanova rozptylu lze získat spektra vypovídající o vibračních a rotačních vlastnostech molekuly, při fluorescenční spektroskopii se ale může jednat o rušivý prvek. Korekce lze provést jednoduše odečtením spektra pozadí nebo zvolením odlišné excitační vlnové délky [55].

2.7.2 Vnitřní fluorescence organismů

Většina buněk obsahuje látky, které disponují fluorescenčními vlastnostmi. Koncentrace těchto látek často nebývá vysoká – jedná se například o fotosyntetické pigmenty, ale také kofaktory, proteiny a nukleové kyseliny (nejčastější látky ukazuje *Obrázek 6*). Těmito látkami způsobená fluorescence obvykle bývá slabší, při studiu samotné vnitřní fluorescence tak mohou výsledky zkreslovat i drobné kontaminace nebo fluorescence samotného média [56]. Dalším problémem bývá široká škála přírodních fluoroforů, kvůli čemuž je prakticky nemožné identifikovat jednu konkrétní molekulu. Může být ale vhodná pro pozorování jednotlivých struktur v rámci eukaryotických organismů [57] nebo při studiu organismů, které by mohly být introdukcí cizorodých sloučenin poškozeny.



Obrázek 6 – nejčastější zdroje autofluorescence spolu s jejich emisními délkami (na příkladu autofluorescence zeleného listu) [53]

Tato práce se ovšem studiem autofluorescence nezabývá, proto je třeba ji z výsledných měření odstranit volbou vhodné excitační délky a případně odečtením spektra naměřeného bez fluorescenční sondy.

2.7.3 Snahy o ujasnění později používaných pojmů – pozadí a autofluorescence

Fluorescenční vlastnosti často vykazuje i rozpouštědlo, což ve spojení s předchozími fenomény ústí v nežádoucí efekty. Principiálně se jedná jen o několik málo mechanismů, k nežádoucím artefaktům ale přispívá velký počet látek. Často tak dochází k problémům při užívání pojmů.

V mikroskopii se setkáváme jednak s fluorescencí pocházející z jiných zdrojů než z buněk (**fluorescence pozadí**) a také s **vnitřní fluorescencí** samotných buněk. Oba jevy je třeba brát v potaz, každý se ale řeší jinými způsoby. Fluorescence pozadí je většinou homogenní, takže jde od celého snímku plošně odečíst, případně je možno provést korekci jasů [58]. Navíc se dá obejít změnou způsobu přípravy vzorku. Fluorescence samotných buněk je prakticky neřešitelný problém, protože ani v rámci jednotlivých organismů nebývá homogenní. Naštěstí ale bývá poměrně slabá.

Při steady-state je jako nežádoucí vjev vnímána fluorescence neobarveného vzorku. Přispívá k ní jednak vnitřní fluorescence bakterií, ale také vlastnosti média a rozptyl světla (ten sice technicky vzato fluorescence není, ale ovlivňuje tvar spektra). Dá se jednoduše zjistit změřením spekter vzorku čisté kultury. Takto získaná spektra lze pak odečíst od měření fluorescenčně značených vzorků. Zde bude jev označován jako **autofluorescence vzorku**. Při korekci je pochopitelně nutné, aby bylo pracováno se vzorky o stejné koncentraci. Podrobněji úpravy fluorescenčních spekter popisují např. P. Lasch [59] nebo řady internetových manuálů.

Problémem je, že celková fluorescence neobarveného vzorku bývá často (a zcela legitimně) označována jako pozadí a vnitřní fluorescence buněk jako autofluorescence. Rozhodl jsem se proto alespoň pro potřeby této práce jednotlivé pojmy pevně definovat, aby nedocházelo k nedorozumění.

2.7.4 Efekt vnitřního filtru (IFE)

Zásadním problémem pro praktické aplikace fluorescence je nelinearita intenzity fluorescence jako funkce koncentrace vzorku, vyplývající z tzv. efektů vnitřního filtru, rozptylu vzorku a absorpce různých komponent biologického vzorku.

Primární efekt

Primární efekt vnitřního filtru je způsoben právě onou vnitřní absorpcí vzorku a ovlivňuje podobu excitačního spektra. Vyšší absorpance totiž způsobuje neuniformní osvětlení celého jeho objemu (intenzita excitačního světla klesá při průniku vzorkem) [60]. Korekce na tento jev je potřeba provádět u řady experimentů, u kterých se požaduje vyšší koncentrace analytu, jež je příčinou deformace fluorescenčního spektra a znemožňuje jeho věrohodnou interpretaci. Obecně známým problémem při vysokých absorbancích jsou i rozdílné výsledky měření stejných vzorků pro různé přístroje, které vychází z rozdílných konfigurací monochromátorů. Proto bylo vyvinuto několik postupů pro korekci [61; 62].

Sekundární efekt

Zatímco primární efekt ovlivňuje spektrum excitační, sekundární efekt ovlivňuje podobu spektra emisního. Nastává v případě, kdy se excitační a emisní spektrum fluoroforu (případně několika fluoroforů) částečně překrývá, nebo v systémech, ve kterých dochází k FRET. V případě částečného překryvu excitačního a emisního spektra dochází ke snížení transmitance v nižších vlnových délkách emise [63]. Část fluorescenčního světla je tak absorbována více než zbytek a dochází ke snížení intenzity, červenému posunu spektra a obecně ztrátě detailu v modrých oblastech. Tento problém je řešen buď matematickou korekcí nebo tzv. *front-face konfigurací* [64].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité materiály, chemikálie, přístroje

3.1.1 Bakterie

Pro experiment byly použity dva kmeny bakterie *Cupriavidus necator*:

- **H16** (dále jen *Cn* H16) z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně
- **PHB-4** (dále jen *Cn* PHB-4) ze sbírky Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Suspenze byla před použitím vždy naředěna roztokem PBS tak, aby odpovídala přibližné optické hustotě OD_{600} 0,3 až 0,5. S takovou koncentrací bylo pracováno ve všech experimentech.

Samotná kultivace bakterií nebyla předmětem této práce, vzorky buněk byly připraveny a poskytnuty prof. Stanislavem Obručou z Ústavu chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické VUT.

3.1.2 Chemikálie

destilovaná voda	-	CAS: 7732-18-5	-
DMF	Sigma-Aldrich	CAS: 68-12-2	Lot # STBJ2718
toluen	PENTA	CAS: 108-88-3	č. šarže 071003
arganový olej	Nature-Store	-	č. šarže 4467807
laurdan	Sigma-Aldrich	CAS: 74515-25-6	Lot # BCCF8218
PBS tablety	Sigma-Aldrich	-	-

3.1.3 Přístroje a software

Spektrofluorimetr FS5 firmy Edinburgh

Jedná se o spektrofluorimetr určený pro měření steady-state fluorescence. Obsahuje zabudované polarizační filtry a výměnný modul pro umístění vzorku. Je vybaven systémem **Fluoracle® software**.

Všechny experimenty byly prováděny s modulem **SC-25 Temperature Controlled Holder** schopným měnit a udržovat teplotu vzorku. Modul je též vybaven magnetickou míchačkou. Pokud není uvedeno jinak, byl vždy temperován na 20 °C.

Konfokální fluorescenční mikroskop MicroTime 200 firmy PicoQuant

Tento mikroskop je vybavený dvěma detektory. Ke sledování emise byly použity filtry bandpass 440/40 nm a 520/35 nm (snímky přes ně získané budou označeny jako modrý, respektive zelený kanál). Pro excitaci byl použit laser o vlnové délce 405 nm. Tyto parametry byly v průběhu všech měření neměnné. Mikroskop je vybaven systémem **SymPhoTime 64**.

Mikroskop také umožňuje měření časově rozlišené fluorescence a určování anisotropie, toho ale v této práci nebylo využito.

Další laboratorní vybavení

UV lampa	UV240	A. KRÜSS Optronik GmbH
třepačka	Vibramax 100	Heidolph Instruments
míchačka	MR Hei-Standard	Heidolph Instruments
analytické váhy	S-603	DENVER INSTRUMENT
centrifuga	ROTOFIX 32	Hettich Instruments

3.2 Příprava zásobních roztoků

K barvení vzorků byly používány dva zásobní roztoky laurdanu v dimethylformamidu a jeden v acetonu. DMF byl jako hlavní rozpouštědlo zvolen proto, že relativně dobře rozpouští laurdan a je mísitelný s vodou i některými nepolárními rozpouštědly. Navíc je oproti např. acetonu prakticky netěkavý. Pro ředění buněčných suspenzí byl využíván roztok fosfátového pufru.

Laurdan 0,01 M v DMF (dále DMF-2)

Pro přípravu 0,01M roztoku bylo rozpuštěno 100 mg laurdanu ve 28,3 ml DMF. Roztok byl nejdříve skladován v chladničce, kde ale kvůli vysoké koncentraci krystalizoval a proto byl dále skladován při pokojové teplotě.

Laurdan 10^{-3} M v DMF (dále DMF-3)

Do 10 ml DMF bylo přidáno 1000 μ l 0,01M roztoku DMF-2. Roztok byl skladován v chladničce.

Laurdan 10^{-4} M v acetonu (dále AcO-4)

Nebyl připraven pro tuto práci; jedná se o starší, již dříve připravený zásobní roztok. Byl skladován v chladničce.

Fosfátový pufr pH 7,4 (dále jen PBS)

Jedna tableta PBS byla dle návodu rozpuštěna v 200 ml destilované vody.

3.3 Číslování vzorků

V této práci je využíváno velké množství vzorků. Většina z nich je diskutována v této i následující sekci, proto by mohlo docházet k záměnám, kdyby se některá čísla opakovala. Rozhodl jsem se proto vzorky číslovat tak, aby každý měl své unikátní číslo i napříč jednotlivými experimenty.

3.4 Výběr vhodné koncentrace laurdanu pro barvení bakterií

Princip

Důležitým krokem barvení bakterií je determinace potřebného množství barviva. Nedostatečná koncentrace může vyústit v příliš slabou fluorescenci a nespolehlivé výsledky. Příliš vysoké množství s sebou ale nese rovnou několik problémů. Jednak je spotřebováno velké množství barviva (a hlavně rozpouštědla zásobního roztoku), což může samo o sobě ovlivnit vlastnosti vzorku. Obzvláště některé mikroorganismy mohou být na vyšší dávky rozpouštědla citlivé. Navíc laurdan, byť nepříliš hydrofilní, ve vyšších koncentracích může ve vodě v určitém množství existovat a tvořit těžko oddělitelné pozadí.

V nižších koncentracích je fluorescence pozadí prakticky nulová díky lipofilnímu charakteru sondy a zhášecím vlastnostem vody, snižuje se ale také intenzita fluorescence samotných barvených objektů.

Postup

Pro sledování pronikání laurdanu do buněk bylo do suspenze *Cn* H16 (o objemu V_{H16}) přidáno vždy určité množství příslušného zásobního roztoku laurdanu (V_{laur}) pro dosažení výsledné koncentrace c_{laur} . Roztoky jsou blíže popsány v *Tabulce 1*.

Tabulka 1 – složení připravených vzorků

vzorek	zásobní roztok	V_{laur} (μl)	V_{H16} (μl)	c_{laur} (mol/l)
1.1	DMF-2	50	4950	10^{-4}
1.2	DMF-2	5	4995	10^{-5}
1.3	AcO-4	500	4500	10^{-5}
1.4	AcO-4	50	4950	10^{-6}
1.5	AcO-4	5	4995	10^{-7}

Po přípravě každého vzorku bylo na přístroji Edinburgh FS5 neprodleně změřeno jeho emisní spektrum. Parametry měření:

- $\lambda_{ex} = 380$ nm
- $\lambda_{em} = 400\text{--}650$ nm
- šířka štěrby excitační = 1 nm
- šířka štěrby emisní = 1 nm
- krok = 1 nm
- doba prodlevy = 0,5 s

Každý vzorek byl dále měřen po 30 minutách a po 90 minutách. Mezi měřeními byly vzorky umístěny na třepačku.

Bylo též změřena autofluorescence vzorku (emisní spektrum neobarvené buněčné suspenze) při stejných parametrech měření, aby mohla být vyloučena její interference s měřeným fluorescenčním spektrem.

Vzorek 1.2 byl následně vybrán na základě analýzy emisních spekter a pozorován na fluorescenčním mikroskopu.

3.5 Kalibrační křivka pro určování *GP* fluorescenčním mikroskopem

Princip

GP je nejčastěji měřena na vlnových délkách 440 a 500 nm. Proto se snadno určuje z emisního spektra při steady-state měření, použití mikroskopu ale určování *GP* komplikuje. Používané bandpass filtry odpovídají požadovanému rozsahu většinou pouze přibližně. Do výsledků navíc pravděpodobně vstupuje i spektrální odezva detektorů. Většinou se proto *GP* určuje pouze přibližně dosazením hodnot obdržných ze dvou barevných kanálů. Zde ale bylo rozhodnuto o vytvoření kalibrační křivky, která by každé zkreslené hodnotě získané mikroskopem přiřadila hodnotu reálnou.

Takový postup je možné spolehlivě aplikovat jen při měření homogenního prostředí. Proto byly pro kalibraci připraveny vzorky směsí rozpouštědel o různé polaritě a jejich *GP* bylo určeno při steady-state spektroskopii i na fluorescenčním mikroskopu. Při budoucím používání přepočtu u snímků bakterií pak budeme předpokládat, že každý jeden pixel představuje přibližně homogenní vzorek.

Postup

Byly namíchány vzorky o složení popsaném v *Tabulce 2*. Do nich bylo následně přidáno vždy 50 μl zásobního roztoku DMF-3.

Tabulka 2 – složení připravovaných vzorků

vzorek	$V_{\text{DMF}} (\mu\text{l})$	$V_{\text{voda}} (\mu\text{l})$	$V_{\text{toluen}} (\mu\text{l})$
2.1	2500	2500	0
2.2	4000	1000	0
2.3	4500	500	0
2.4	4750	250	0
2.5	4875	125	0
2.6	4000	0	1000
2.7	2500	0	2500
2.8	arganový olej 4950 μl		

Každý vzorek byl postupně přenesen do kyvety a na přístroji Edinburgh FS5 bylo změřeno jeho emisní spektrum. Parametry měření:

- $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$
- $\lambda_{\text{em}} = 400\text{--}650 \text{ nm}$
- šířka štěrbin excitační = 2 nm
- šířka štěrbin emisní = 2 nm
- krok = 2 nm
- doba prodlevy = 0,5 s

Poté byla emise pro každý vzorek změřena i pod fluorescenčním mikroskopem. Z něj byly pro tento účel převzaty pouze celkové intenzity naměřené dvěma detektory, protože distribuce laurdanu je v roztoku homogenní.

3.6 Zobrazování GP fluorescenčním mikroskopem

Princip

Steady-state techniky určování vlastností buněk mají své limitace. Nejčastějším problémem je znečištění média, které tak vykazuje neočekávané (např. i fluorescenční) vlastnosti, a také absence indikátorů fyziologického stavu buněk. Při mikroskopii je možné zkoumat každý organismus zvlášť a u každého zdroje fluorescence posoudit, jedná-li se o objekt zájmu. Oproti steady-state spektrofotometrii mikroskop také umožňuje zkoumat nerovnoměrnost distribuce barviva ve vzorku.

Postup

Byly připraveny dva vzorky *Cn* H16 a *Cn* PHB⁻4 (každý v objemu 3 ml, obarven na koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ M zásobním roztokem DMF-3). Malé množství každého vzorku bylo agarózou fixováno na sklíčku a jeho emise byla pozorována pod mikroskopem. Byla vytvořena série snímků, z nichž nejreprezentativnější byly ponechány.

3.7 Promývání vzorků

Princip

U obarvených vzorků se často provádí centrifugace a promytí fosfátovým pufrem. To vede k odstranění barviva nerozpuštěného v buňkách a dalších nechtěných látek. Obarvené buňky se obvykle přenesou do fosfátového pufru, který je nepoškozuje (na rozdíl od destilované vody) a zároveň nevykazuje vlastní fluorescenční vlastnosti (na rozdíl od některých původních médií). Tato praxe není nezbytná u mikroskopických měření, u kterých je pozadí viditelně odděleno od buněk, ale u steady-state fluorescence je prakticky zásadní pro jakákoliv přesnější měření. Rizikem je ovšem mechanické poškození buněk při centrifugaci.

Postup

5 ml suspenze *Cn* H16 bylo obarveno přidavkem 50 μ l zásobního roztoku DMF-2 na výslednou koncentraci 10^{-4} M. Koncentrace vyšší než pro běžná měření byla zvolena záměrně, aby byl patrný efekt odstranění nechtěných zdrojů fluorescence. Takto byly vytvořeny dva vzorky. Pro spolehlivé proniknutí barviva do buněk byly ponechány 90 minut na třepačce. Poté byl jeden vzorek odstředěn 15 minut při 4 000 RPM, supernatant slit a usazenina promyta a suspendována v 5 ml PBS. Druhý vzorek odstředěn ani promyt nebyl. Následně bylo změřeno emisní spektrum obou vzorků (spolu s autofluorescencí neobarvené suspenze) na přístroji Edinburgh FS5 při parametrech měření

- $\lambda_{ex} = 380$ nm
- $\lambda_{em} = 400\text{--}650$ nm
- šířka štěrbin excitační = 1 nm
- šířka štěrbin emisní = 1 nm
- krok = 1 nm
- doba prodlevy = 0,5 s.

Vzorky byly následně zběžně prozkoumány pod fluorescenčním mikroskopem.

3.8 Vliv teploty na fluiditu membrán

Princip

Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, teplota má zásadní vliv na fluiditu membrány, kterou reflektuje (prostřednictvím polarizace prostředí) např. sonda laurdan a její *GP*. Křivka závislosti *GP* na teplotě je klesající s jasně zřetelným bodem tání závislejícím na struktuře a složení buněčné membrány.

Postup

Byly připraveny čtyři 5ml vzorky suspenze bakterií (dva *Cn* H16 a dva *Cn* PHB⁻4). Každý byl obarven přidavkem 100 μ l roztoku DMF-3 na koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ M. Všechny byly ponechány 90 minut na třepačce. Poté byl vždy jeden vzorek *Cn* H16 a jeden *Cn* PHB⁻4 odstředěn 15 minut při 4 000 RPM, promyt a suspendován v PBS. U všech vzorků bylo změřeno emisní spektrum v závislosti na teplotě při parametrech měření

- $\lambda_{ex} = 380$ nm
- $\lambda_{em} = 400\text{--}650$ nm
- šířka štěrbin excitační = 2 nm
- šířka štěrbin emisní = 2 nm
- krok = 2 nm
- doba prodlevy = 0,5 s
- rozsah teplot = 10–70 °C
- inkrement teploty = 10 °C
- doba prodlevy po ustálení teploty = 300 s

Bylo postupováno od nižší teploty po nejvyšší, protože teploty nad 50–60 °C bývají pro organismy fatální. Po měření tak byly vzorky nepoužitelné.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

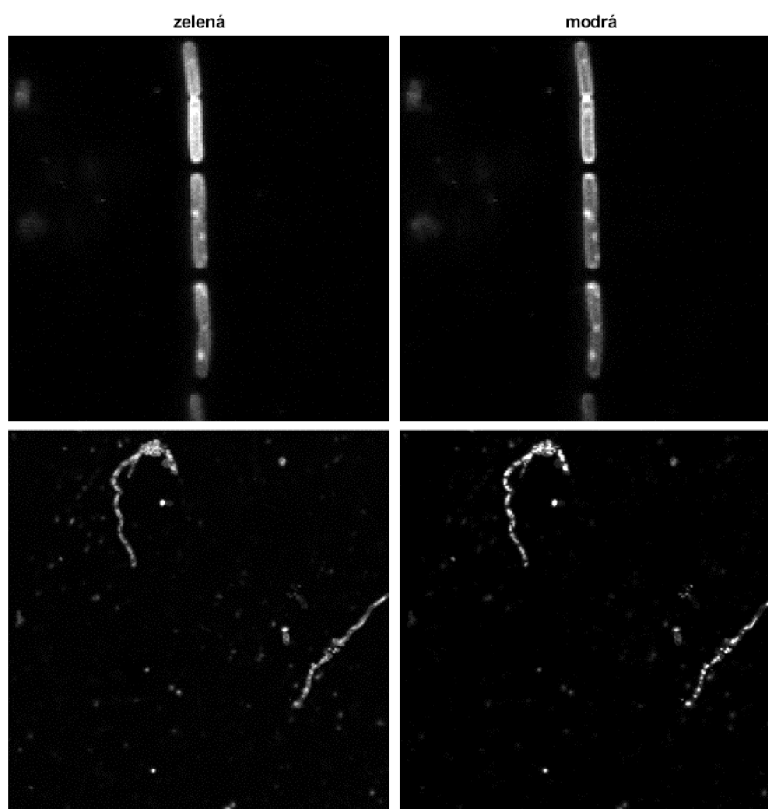
4.1 Výběr vhodné koncentrace laurdanu pro barvení bakterií

Výsledná spektra (již po odečtení autofluorescence) jsou uvedena v přílohách (*Obrázek 16*). Každé spektrum bylo normalizováno vzhledem k maximu v rámci vzorku. Výšky jednotlivých spekter v rámci jednoho vzorku jsou tak v původním poměru, ale různé vzorky ne.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo s koncentrací 10^{-5} M (vzorek 1.2 a 1.3) – méně obarvené vzorky (vzorek 1.4 a 1.5) vykazovaly vysoké množství šumu a byly příliš ovlivněny autofluorescencí.

Navíc se u nich podobně jako u vzorku 1.1 výrazně měnil tvar spektra v čase. Modrý posun spektra v řádu desítek minut od obarvení buňky je zcela pochopitelný, protože dochází k inkorporaci laurdanu do méně polárních oblastí. Takto výrazná změna intenzity je ale těžko vysvětlitelná a pravděpodobně ne příliš žádoucí.

Byly vybrány dva snímky vzorku 1.2 z fluorescenčního mikroskopu, u každého je ukázán modrý i zelený kanál (viz *Obrázek 7*).



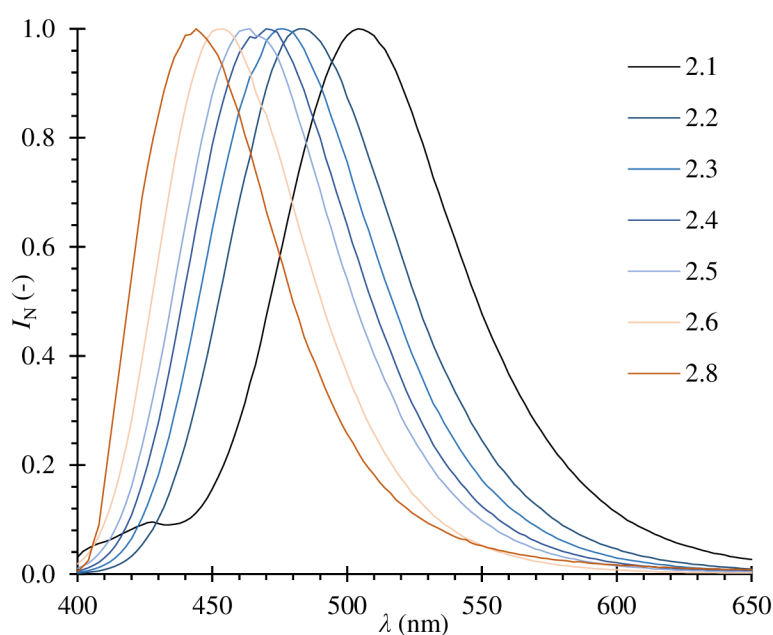
Obrázek 7 – porovnání modrého a zeleného kanálu.

Ze snímku je patrné, že v rámci buněk se intenzita i vlnová délka emise mění. Fluorescence pozadí je u obou snímků velmi nevýrazná, lehce silnější je ale v zeleném kanálu. To je předpokládané, protože se zde laurdan vyskytuje v polárnějším prostředí. Po technické stránce jsou snímky v pořádku, dochází jen k mírným přepalům. Můžeme tedy předpokládat koncentraci barviva 10^{-5} M za relativně vyhovující pro tento typ měření. Ve většině následujících měření byla koncentrace ještě mírně zvýšena na $2 \cdot 10^{-5}$ M.

4.2 Kalibrační křivka pro určování GP fluorescenčním mikroskopem

Bylo získáno osm emisních spekter (viz *Obrázek 8*). Na nich je jasně vidět rozdíl tvaru spektra pro různě polární vzorky (polarita stoupá od nepolárního arganového oleje (vzorek 2.8) až ke směsi DMF s vodou (vzorek 2.1)).

Vzorek 2.7 (toluen s DMF) byl ale z dalšího zpracování vynechán, protože docházelo k příliš rychlému odpařování toluenu. Při mikroskopii je totiž vzorek delší dobu vystaven okolnímu prostředí, čímž je umožněno odpařování těkavějších látek a také pohlcování vzdušné vlhkosti. Docházelo tak k významnému zvýšení polarity, které nemohlo být postiženo při steady-state fluorescenci.



Obrázek 8 – normalizovaná emisní spektra vzorků o stoupající polaritě

Z každého spektra byla spočítána generalizovaná polarizace pomocí *Rovnice 3* (pro zmírnění dopadů šumu byl dosazen vždy průměr pěti hodnot intenzit okolo příslušné vlnové délky). Takto získané hodnoty byly označeny GP_{real} a pohybují se v rozsahu -0,8 až 0,6, což je dostačující pro většinu dalších námi prováděných měření. Extrémní hodnoty se nejčastěji vyskytují pouze ve formě šumu na pozadí, ne v samotných bakteriích nebo jiných zkoumaných objektech. Generalizovaná polarizace laurdanu v biologických membránách obvykle nepřesahuje hodnoty -0,6 a 0,8, tento rozsah je navíc výrazně menší při zachování laboratorní teploty [65].

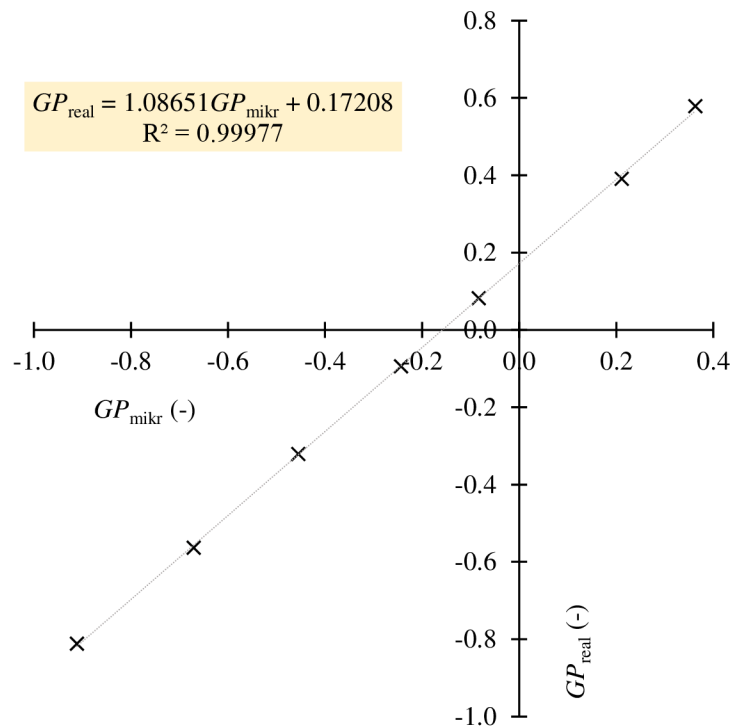
Hodnoty z fluorescenčního mikroskopu (GP_{mikr}) byly získány stejným způsobem, jen byla za intenzitu při 440 nm dosazena intenzita získaná přes emisní filtr 440/40 a za intenzitu při 500 nm intenzita získaná přes emisní filtr 520/35 (tedy zelený a modrý kanál). Intenzity byly dosazeny ve formě sumy všech událostí zachycených příslušným detektorem. Vzorek je totiž možné považovat za homogenní a není třeba ho zpracovávat jako dvojrozměrný obrázek.

Takto získané hodnoty jsou uvedeny v *Tabulce 3*.

Tabulka 3 – vypočítané GP jednotlivých vzorků

vzorek	$GP_{\text{real}} (-)$	$GP_{\text{mikr}} (-)$
2.1	-0,81	-0,91
2.2	-0,56	-0,67
2.3	-0,32	-0,45
2.4	-0,09	-0,24
2.5	0,08	-0,08
2.6	0,39	0,21
2.8	0,58	0,36

Hodnoty byly vyneseny do grafu (*Obrázek 9*) jako závislost GP_{real} na GP_{mikr} a proloženy přímkou. Jak je vidět, závislost naměřených hodnot je prakticky lineární. Rovnice získaná lineární regresí hodnot byla využita pro přepočítání GP_{mikr} na GP_{real} v následující kapitole.



Obrázek 9 – kalibrační křivka závislosti GP_{real} na GP_{mikr}

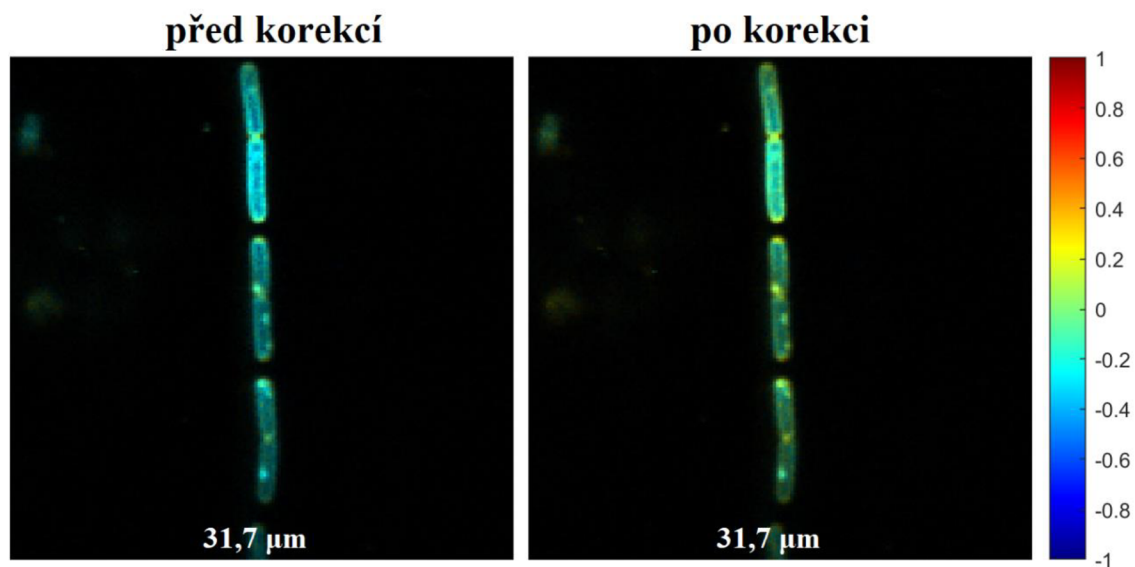
Je důležité zmínit, že tato kalibrační přímka platí pouze pro konkrétní přístroj s konkrétní sadou filtrů. Pro každé nastavení experimentu je třeba vytvořit novou. Pro většinu běžných aplikací navíc není tvorba kalibrační křivky nutností, je tedy potřeba posoudit její důležitost v konkrétní situaci.

4.3 Zobrazování GP fluorescenčním mikroskopem

4.3.1 Zpracování hodnot, korekce

Z mikroskopu byly pro každé měření získány dva snímky (modrý a zelený kanál) ve formátu datového souboru obsahujícího dvojrozměrné pole intenzit. Z nich byla podle *Rovnice 3* skriptem v MATLABu (viz *Příloha č. 2*) spočítána GP, která byla následně korigována podle získané kalibrační závislosti a vyexportována jako obrázek.

Dále bylo vytvořeno i několik snímků samotné intenzity fluorescence pro srovnání distribuce laurdanu v rámci dvou kmenů bakterie.



Obrázek 10 – snímky zachycující rozložení GP v rámci bakterií před a po korekci. V dolní části každého obrázku je uvedena reálná šířka zorného pole.

Jak je patrné z *Obrázek 10*, korekce způsobila změnu úměrnou kalibrační rovnici. Posun hodnot je mírný, ale zdaleka ne zanedbatelný.

Dále ukazované korigované snímky jsou ovšem zobrazeny lehce odlišně. Jejich GP se totiž kvůli korekci pohybuje v oblasti od -0,8 do 1,2. *Obrázek 10* využívá jednu společnou škálu (od -1 do 1) pro snazší srovnání dvou výsledků, takže technicky vzato část korigovaných hodnot neobsahuje (byť se jedná o extrémní hodnoty, které se vyskytují jen v rámci šumu pozadí). V následujících vyobrazeních bude ale používána škála od -0,8 do 1,2.

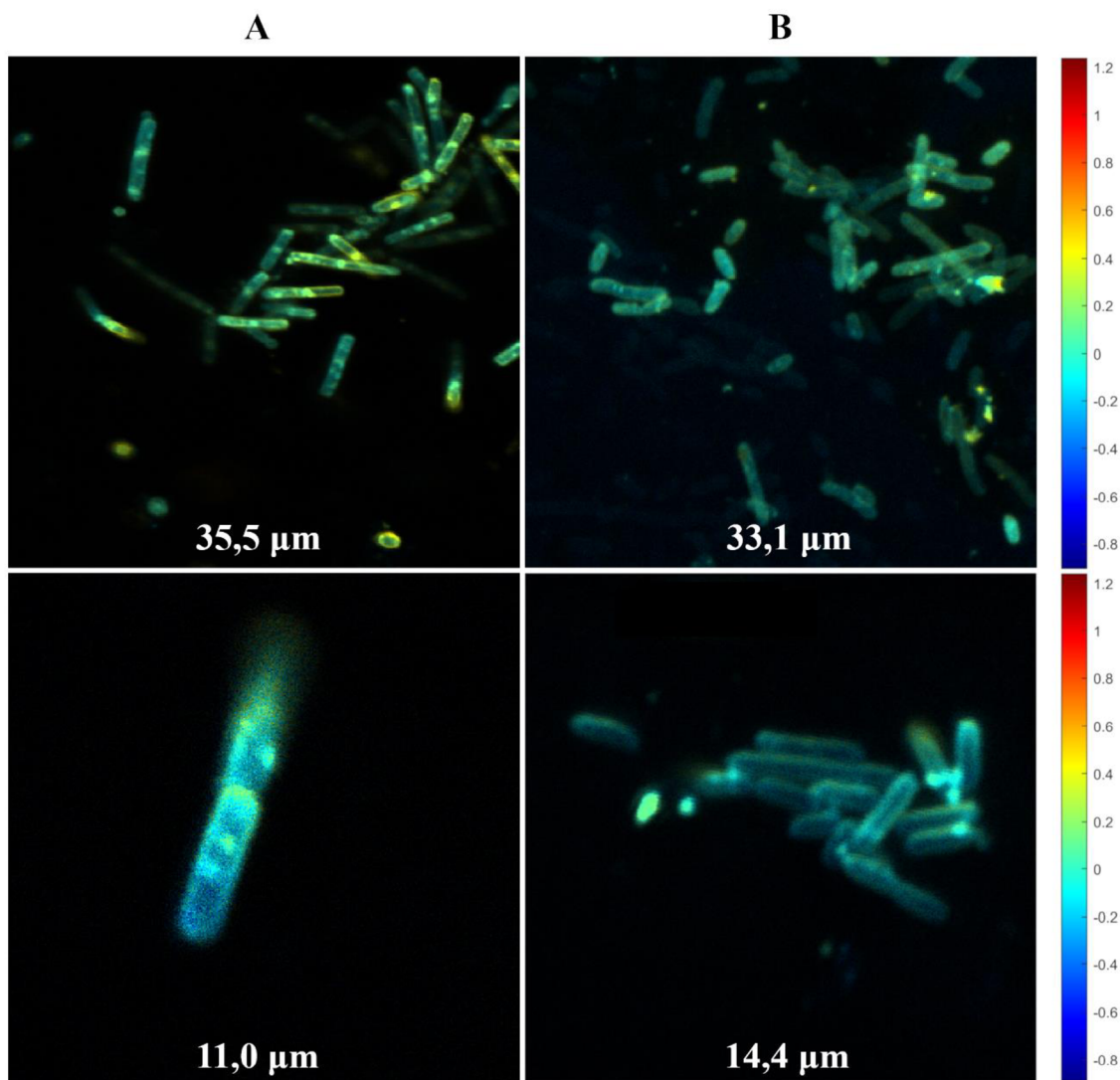
Řada studií určuje GP jednoduše jako poměr intenzit získaných přes zelený a modrý filtr, přičemž korekci neprovádí. Takto získané výsledky bývají spíše orientační, ale mnohdy plně dostačující pro příslušné účely. Korekce by mohla nacházet uplatnění při experimentech spojujících mikroskopii s dalšími fluorescenčními technikami, např. steady-state fluorescencí nebo průtokovou cytometrií.

V dalších kapitolách jsou ukazovány již jen korigované snímky. Jakkoliv může být korekce GP pro většinu experimentů nadbytečná, není důvod ji nepoužít, pokud se naskytne možnost. Tato praxe také zvyšuje případnou replikovatelnost výsledků v odlišných laboratorních podmínkách.

4.3.2 Snímky distribuce GP vzorků

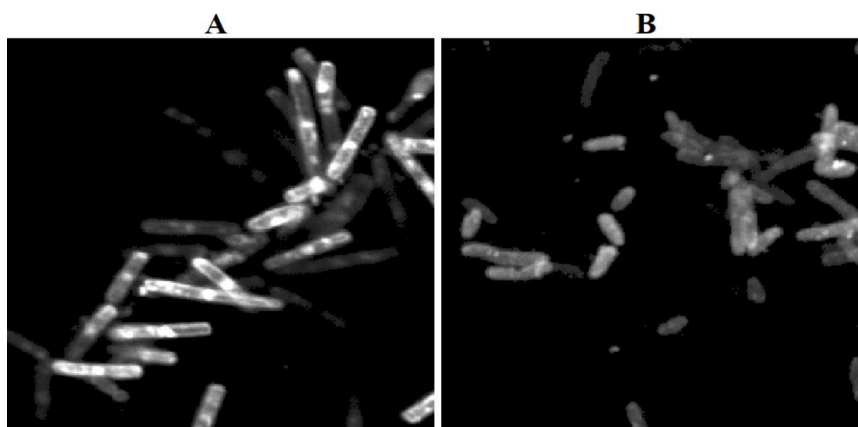
Jak ukazuje *Obrázek 11*, rozložení GP se liší i v rámci jednoho vzorku. Bakterie mají navíc tendenci vytvářet shluky, což v některých případech vede k příliš vysokým intenzitám fluorescence a tedy k přepalům.

Nepatrně vyšší variabilitu v rozložení GP lze pozorovat u snímků *Cn H16*. Bakterie jsou ale samy o sobě značně malé a vyskytují se ve shlucích, navíc narážíme i na limitace samotného přístroje. Většina pozorovaných detailů tak neumožňuje jednoznačnou interpretaci. Určité morfologické znaky jako membrána lze ale místy rozlišit u obou kmenů.



Obrázek 11 – snímky zachycující rozložení GP v rámci Cupriavidu necator H16 (A) a PHB4 (B). Pod sebou jsou vždy dva snímky stejného kmenu. V dolní části každého obrázku je uvedena reálná šířka zorného pole.

Více rozdílů mezi dvěma kmeny lze pozorovat na snímcích zobrazujících pouze intenzitu fluorescence (získanou sumarizací modrého a zeleného kanálu) bez výpočtu generalizované polarizace (*Obrázek 12*). Na nich lze pozorovat nezanedbatelně více fluorescence ve vnitřních oblastech *Cn H16* oproti PHB4. To může naznačovat přítomnost PHB granulí, ve kterých se nepolární laurdan ochotně rozpouští, nebo jiných intracelulárních útvarů. Také to ale může být způsobeno pouhým překryvem několika bakterií vedoucím k vyšší celkové emisi.



Obrázek 12 – srovnání intenzit fluorescence vzorku (A) H16 a (B) PHB-4

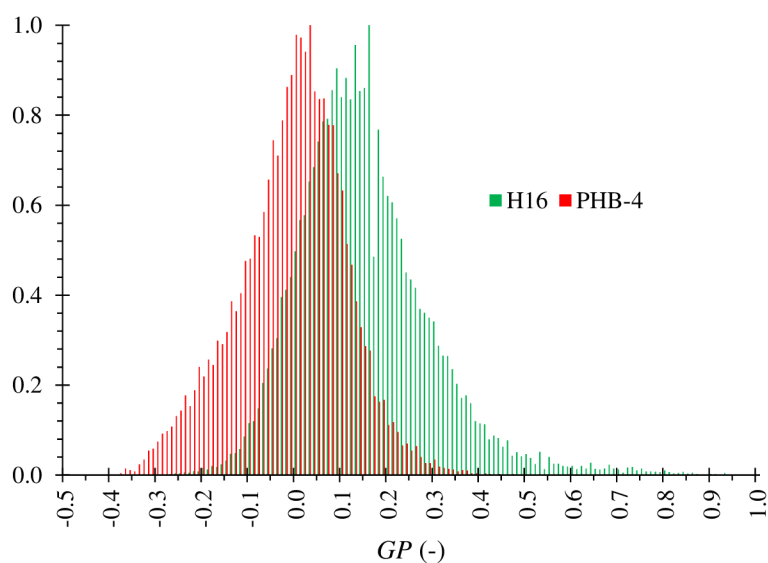
4.3.3 Alternativní metoda korekce GP

Fluorescenční mikroskop sám disponuje softwarem SymPhoTime 64, který je schopen vypočítat distribuci anisotropie ve vzorku podle vztahu

$$r = \frac{fI_0 - I_{90}}{(2 - 3L_1)fI_0 + (1 - 3L_2)I_{90}}. \quad (5)$$

Zde f , L_1 a L_2 představují (uživatelé dosaditelné) empirické faktory a I_0 , resp. I_{90} mohou také představovat libovolnou hodnotu. Proto lze místo intenzit polarizovaného světla dosadit hodnoty z modrého a zeleného kanálu a faktory poté iteračně určit tak, aby se r co nejvíce blížila hodnotám GP ze steady-state měření. Takto získaná hodnota má tu výhodu, že s ní lze pracovat přímo ve firemním software. Plně sice neodpovídá reálným hodnotám, ale tyto odchylky jsou prakticky zanedbatelné (v tomto případě řádově setiny procent).

Co se snímků týče, tato metoda poskytuje výsledky prakticky identické s metodou předchozí, jejich formální srovnání proto nemá význam. S její pomocí byl ale vytvořen histogram ukazující srovnání zastoupení GP na dvou snímcích různých kmenů (Obrázek 13).



Obrázek 13 – histogram zastoupení hodnot GP u dvou snímků

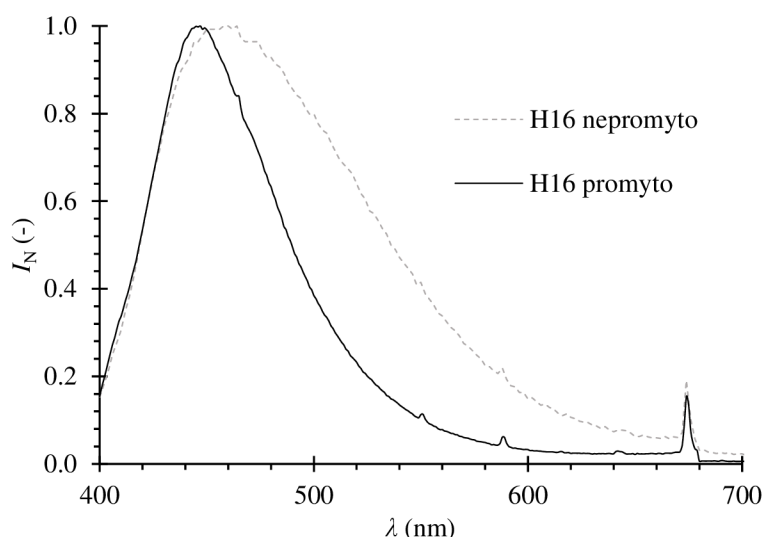
Je zřejmé, že se dva snímky nezanedbatelně liší svým zastoupením jednotlivých hodnot GP . U Cn H16 jsou hodnoty vyšší, což by mohlo značit rigidnější membrány nebo pronikání laurdanu do PHB granulí. Přítomnost PHB granulí je přitom naznačována i předchozími snímky.

Také se ale může jednat o výsledek čistě náhodný – porovnáním pouze dvou snímků nelze vyvodit jednoznačné závěry. Pozorování GP ani intenzity fluorescence tedy v našem případě nevede k nezpochybnitelným poznatkům o morfologii buněk.

To ovšem ani není předmětem této práce, popisované metody jsou spíše zkušeny pro budoucí použití. Vzorek lze obarvit a pozorovat dostatečně spolehlivě, aby byly patrné jednotlivé buňky. Je možné pozorovat rozdíly mezi jednotlivými jedinci i některé výraznější rysy v rámci jedné buňky. To lze považovat za pozitivní výsledek.

4.4 Promývání vzorků

Srovnání změřeného emisního spektra promytého a nepromytého vzorku ukazuje *Obrázek 14*. Autofluorescence byla odečtena pouze u nepromytého vzorku; u promývaného to prakticky není možné.



Obrázek 14 – srovnání emise promytého a nepromytého vzorku

Jak je patrné, promytí vzorku napomáhá zúžit emisní spektrum, což může indikovat méně nečistot. Po zběžném prozkoumání vzorku pod fluorescenčním mikroskopem se v něm ale vyskytovalo větší množství poškozených buněk. Tento fakt by mohl být problém při zkoumání metabolismu a morfologie buněk, ale pravděpodobně nebude příliš komplikovat měření fluidity membrán v závislosti na teplotě.

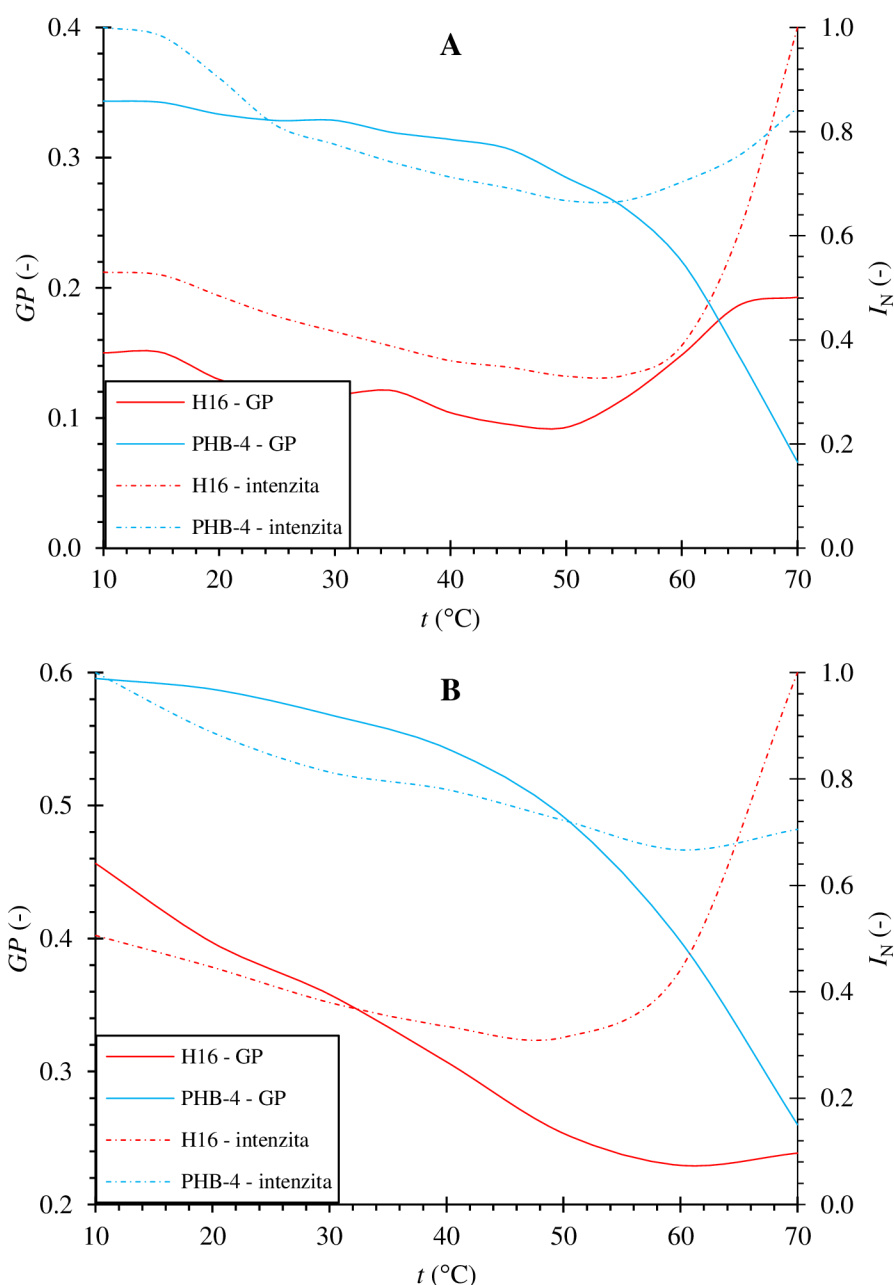
V této práci tedy byly buňky promývány jen příležitostně, protože při mikroskopii k promývání není zásadní důvod. Obdržené výsledky lze považovat za přibližný indikátor toho, jaký vliv může promývání na měření mít; práce se mu ale nevěnuje do takové hloubky, aby bylo možné vyvodit jednoznačné závěry.

Jeden experiment, ve kterém se promývání jeví jako výhodný krok, popisuje následující kapitola.

4.5 Vliv teploty na fluiditu membrán

Z obdržených sad spekter byly vypočítány hodnoty GP podle Rovnice 3. Samotná spektra nejsou pro přehlednost uvedena.

Jak ukazuje *Obrázek 15*, s teplotou se měnil nejen tvar spektra, ale i intenzita fluorescence, a to poměrně nezanedbatelným způsobem. Byly tedy vytvořeny dva grafy (jeden pro nepromyté vzorky a druhý pro promyté), z nichž každý ukazuje závislost GP i normalizované intenzity na teplotě pro oba kmeny bakterie.



Obrázek 15 – grafy závislosti GP a intenzity fluorescence na teplotě pro vzorky Cn H16 a PHB-4 nepromyté (A) a promyté (B)

Vývoj intenzity se prakticky neliší u promytého a nepromytého vzorku. Nejdříve s teplotou mírně klesá (což je chování pozorovatelné např. i při zahřívání CTAB micel s laurdanem), kolem 60 °C ale začne stoupat. Jedním možným vysvětlením je, že dojde k rozpadu buněk,

čímž se roztok vyčeří a umožní tak průchod většího množství světla. Vyčeření je zřetelné i při vizuální inspekci vzorku po ukončení měření. U *Cn* H16 je ale vzestup mnohem výraznější. Je tedy možné, že se rozpadem *Cn* H16 tvoří specifické struktury, které umožňují lepší rozpustnost laurdanu (například uvolnění intracelulárního PHB).

Změna *GP* není zdaleka tak výrazná, jak bylo očekáváno. U nepromytých vzorků je prakticky bezvýznamná (až na rozpad buněk spojený s nejvyššími teplotami). Promyté vzorky ale jakýsi klesající trend vykazují. To by bylo další indikací vyšší čistoty (a obecně použitelnosti pro steady-state) promytých vzorků. Změna ovšem pořád neodpovídá očekávání, co se týče tvaru křivky. Prudké snížení *GP* u *Cn* PHB-4 při vyšších teplotách navíc nelze jednoduše vysvětlit – může znamenat např. rozpad buněk a tedy pronikání více vody do prostředí. Tomu by lae naopak odporoval mírný nárůst intenzity fluorescence.

Obecně je třeba téma změn spojených s teplotou a promýváním buněk podrobněji prozkoumat. Současné výsledky nemají příliš vysokou vypovídající hodnotu, co se týče chování samotných organismů, ale přispívají k vytvoření celkového obrazu fluorescenčního barvení buněk.

5 ZÁVĚR

Práce se zabývá možnostmi studia biologických membrán běžnými technikami fluorescenční spektroskopie a mikroskopie. Konkrétně je zde využívána membránová sonda laurdan pro barvení bakterií *Cupriavidus necator* H16 a PHB⁻⁴.

Nejdříve **byla určena vhodná koncentrace laurdanu** pro barvení bakterií. Pro většinu aplikací je zřejmě nejvýhodnější volit koncentraci 10^{-5} M a její nižší násobky. Tato hodnota bude závislá na koncentraci buněčné kultury a prováděném experimentu, je tak spíše orientační a záleží na uvážení a potřebách jedince. Drobné variace v koncentraci barviva by neměly způsobovat problémy, pokud se nejedná o kvantitativní měření (které v této práci prováděno není). Emisní spektra barvených vzorků se přestala měnit až po devadesáti minutách od obarvení, toto číslo lze tedy považovat za přibližnou **dobu potřebnou k inkorporaci laurdanu do buněk**.

Autofluorescence vzorků nebyla podrobně zkoumána, proto v této práci ani není explicitně uvedena. Spektra autofluorescence byla vždy jen odečtena od emisních spekter obarvených vzorků. Intenzita autofluorescence se obvykle pohybovala okolo desetiny fluorescence vzorku obarveného. Také nebyl popsán **vliv koncentrace samotné buněčné kultury**. Byla zvolena jedna fixní koncentrace, která se jevila jako nejuniverzálnější, a s ní byla provedena všechna měření.

Byly ovšem prozkoumány a popsány možnosti **zobrazování bakterií obarvených laurdanem pod fluorescenčním mikroskopem**. Vznikly dvě metody **korekce GP** – jedna provádí korekci přímo, zatímco druhá metoda využívá iterační úpravu parametrů vzorce anisotropie pro aproximaci hodnot přímo v software mikroskopu. Tyto dvě metody nebyly podrobně srovnávány, ale výsledky jimi obdržené se jeví jako prakticky shodné.

Korigovaná data byla využita k vytvoření několika snímků, na kterých je možno pozorovat variace v GP v rámci buňky. Výsledky naznačují některé rozdíly v generalizované polarizaci mezi *Cn* H16 a PHB⁻⁴. Ta se jeví jako vyšší u kmenu H16. Její rozložení je také méně homogenní. Zároveň i intenzita fluorescence byla u *Cn* H16 pozorována vyšší. Obě tato zjištění mohou být vysvětlena přítomností PHB granulí, které *Cn* PHB⁻⁴ na rozdíl od *Cn* H16 neprodukuje. Dalším možným vysvětlením jsou ale i prosté překryvy několika buněk ve snímcích, nebo jiné náhodné faktory. Bylo získáno příliš málo dat, aby mohly být vyvozeny jednoznačné závěry, navíc jsou výsledky rozporovány steady-state měřeními GP při sledování teplotních změn. Bylo by vhodné prozkoumat i změny v GP buněk různého stáří a stavu.

V této práci bylo také zcela vynecháno **měření anisotropie**, která by mohla poskytovat zajímavé výsledky při srovnání s naměřenými hodnotami GP, obzvláště pak při studiu teplotních změn.

Dále byl studován **vliv promývání vzorku** na další měření. Výsledky vypadají nadějně – spektra získaná po promytí jsou užší, což naznačuje vyšší čistotu vzorku. Také naměřené teplotní závislosti více odpovídají očekávání u promytých vzorků. Je ale třeba podrobněji prozkoumat vliv tohoto mechanického procesu na integritu buněk, například i pod fluorescenčním mikroskopem.

Nejčastějším důvodem změny membránového pořádku (resp. fluidity), který GP reflektuje, je **změna teploty**. Se stoupající teplotou by se měla zvyšovat rychlost pronikání vody mezi lipidové konce membránových fosfolipidů a způsobovat tak spektrální změny v emisi laurdanu. V této práci nebyl pozorován zásadní vliv teploty na tvar emisního spektra. Určité klesající

trendy lze pozorovat u promytých vzorků, ale ani tyto změny nejsou tak výrazné, aby je bylo možno považovat za úspěch.

Zajímavé chování bylo pozorováno při teplotách přesahujících 50 °C, kde dochází k prudkému nárůstu intenzity fluorescence a zároveň změně *GP*. Nárůst intenzity lze vysvětlit snížením optické hustoty vzorku v důsledku rozkladu bakterií. *GP* se ale u *Cn* H16 a PHB-4 mění různým směrem. Tento směr je konzistentní pro promyté i nepromyté vzorky, tudíž ho nelze považovat za náhodu. Jedním důvodem by mohlo být uvolnění PHB granulí kmenu H16 do prostředí, v nichž by se pak mohl rozpouštět volný laurdan. To jsou ovšem čisté spekulace a bude třeba provést další výzkum v této oblasti.

Obecně cílem práce nebylo popsat vlastnosti buněk, ale vyzkoušet metody k tomuto účelu použitelné. Byla vyzkoušena řada metod, které všechny poskytují poměrně konzistentní výsledky, a mohou tak být použity pro další podrobnější studium. V případě některých postupů (promývání buněk) je třeba dalšího zkoumání.

6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] KOTYK, Arnošt. *Struktura a funkce biomembrán*. 1. Brno: MU, 1996.
- [2] CUEVAS, Javier. Structure and Function of Membranes. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007, 1-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008055232-3.60052-2
- [3] HOOGEVEST, Peter, Harry TIEMESSEN, Josbert METSELAAR, Simon DRESCHER a Alfred FAHR. The Use of Phospholipids to Make Pharmaceutical Form Line Extensions. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2021, **123**(4). Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.202000297
- [4] STILLWELL, William. *An Introduction to Biological Membranes: Composition, Structure and Function*. 2. Elsevier B.V., 2016.
- [5] KLUGER, Ronald a Raymond CLAYTON. "steroid". In: *Encyclopedia Britannica* [online]. 2021 [cit. 2022]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/steroid>
- [6] SINGER, S.J. a G.L. NICHOLSON. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972, (1754023720-31). Dostupné z: doi:10.1126/science.175.4023.720
- [7] HIANIK, Tibor. Structure and physical properties of biomembranes and model membranes. *Acta Physica Slovaca*. 2007, **87**(56). Dostupné z: doi:10.2478/v10155-010-0082-z
- [8] WENZEL, Michaela, Norbert VISCHER, Henrik STRAHL a Leendert HAMOEN. Assessing Membrane Fluidity and Visualizing Fluid Membrane Domains in. *Bio-Protocol*. 2018, **20**(8). Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.3063
- [9] JOHNSON, Iain a Michelle SPENCE, ed. *The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11. Life Technologies Corporation, 2010.
- [10] GUPTA, Ankur, Mamata KALLIANPUR, Debsankar ROY, Oskar ENGBERG, Hirak CHAKRABARTY, Daniel HUSTER a Sudipta MAITI. Different membrane order measurement techniques are not mutually consistent. *Biophysical Journal*. Cell Press, 2023, **122**(3), 964-972. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2022.08.029
- [11] HARRIS, F., K. BEST a J. BELL. Use of laurdan fluorescence intensity and polarisation to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier, 2002, **1565**(1), 123-128. Dostupné z: doi:10.1016/s0005-2736(02)00514-x
- [12] SCHOCH, CL. Taxonomy Browser (Cupriavidus necator). *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools* [online]. 2020 [cit. 2023]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=106590>
- [13] CRAMM, Rainer. *Genomic view of energy metabolism in Ralstonia eutropha H16*. 2009, , s. 38-52.
- [14] CRÉPIN, Lucie, Eric LOMBARD a Stéphane GUILLOUET. *Metabolic engineering of Cupriavidus necator for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production*. 2016, . Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2016.05.002
- [15] PANICH, Justin, Bonnie FONG a Steven SINGER. Metabolic Engineering of Cupriavidus necator H16 for Sustainable Biofuels from CO₂. *Trends in Biotechnology*. CellPress, 2021, **39**(4), 412-424. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2021.01.001

- [16] MÜLLEROVÁ, Lucie, Kateřina MARKOVÁ, Stanislav OBRUČA a Filip MRAVEC. Use of Flavin-Related Cellular Autofluorescence to Monitor Processes in Microbial Biotechnology. *Microorganisms*. MDPI, 2022, **10**(6). Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10061179
- [17] SCHLEGEL, H. a G. GOTTSCHALK. Poly- β -hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Biosynthese. *Angewandte Chemie*. Verlag Chemie, 1962, **74**(10), 342-347. Dostupné z: doi:10.1002/ange.19620741003
- [18] KIM, Soyoun, Yong JANG, Sun-Mi GYEONGTAEK GONG, Youngsoon UM, Kyoung KIM a Ja KO. *Engineering Cupriavidus necator H16 for enhanced lithoautotrophic poly(3-hydroxybutyrate) production from CO₂*. 2022, . Dostupné z: doi:10.1186/s12934-022-01962-7
- [19] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Ota SAMEK a Ivana MAROVA. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Applied microbiology and biotechnology*. Springer International, 2016, **100**(3), 1365-1376. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-7162-4
- [20] MRAVEC, Filip, Stanislav OBRUCA, Vladislav KRZYZANEK et al. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University Press, 2016, **363**(10). Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fnw094
- [21] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*. Nature Portfolio, 2016, **6**. Dostupné z: doi:10.1038/srep26612
- [22] SCHLEGEL, H., R. LAFFERTY a I. KRAUSS. The isolation of mutants not accumulating poly- β -hydroxybutyric acid. *Archiv für Mikrobiologie*. Springer-Verlag, 1970, **71**(3), 283-294. Dostupné z: doi:10.1007/BF00410161
- [23] LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. New York: Springer, 2006.
- [24] ATKINS, Peter a Julio PAULA. *Physical Chemistry*. 8. New York: Oxford University Press, 2006.
- [25] VALEUR, B. a M. BERBERAN-SANTOS. A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. *Journal of Chemical Education*. The American Chemical Society and Division of Chemical Education, Inc., 2011, **886**(731–738). Dostupné z: doi:10.1021/ed100182h
- [26] VALEUR, B. a M. BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- [27] YUSHCHENKO, Oleksandr, Giuseppe LICARI, Sandra MOSQUERA-VAZQUEZ, Naomi SAKAI, Stefan MATILE a Eric VAUTHEY. Ultrafast Intersystem-Crossing Dynamics and Breakdown of the Kasha–Vavilov’s Rule of Naphthalenediimides. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2015, **611**(2096-2100). Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcelett.5b00882
- [28] MAZI, Wafa. *NEAR-INFRARED FLUORESCENT PROBES FOR SENSITIVE DETERMINATION OF LYSOSOMAL & MITOCHONDRIAL pH IN LIVE CELLS*. Michigan: Michigan Technological University, 2019. Dostupné z: doi:10.37099/mtu.dc.etr/899

- [29] HAMILTON, George a Hugo SANABRIA, Carey JOHNSON, ed. Chapter 6 - Multiparameter fluorescence spectroscopy of single molecules. In: *Spectroscopy and Dynamics of Single Molecules*. Elsevier Inc., 2019, s. 269-333. Dostupné z: doi:10.1016/C2017-0-01742-1
- [30] THERMO FISHER SCIENTIFIC. Fluorescent Probes. *ThermoFisher Scientific* [online]. 2014 [cit. 2022]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>
- [31] DEMCHENKO, Alexander. Introduction to fluorescence probing of biological membranes. *Methods in Molecular Biology*. 2015, (1232), 19–43. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-1752-5_3
- [32] CHATTOPADHYAY, Arun. Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1990, **1**(53), 1-15. Dostupné z: doi:10.1016/0009-3084(90)90128-e
- [33] MAZERES, Serge, Etienne JOLY, Andre LOPEZ a Catherine TARDIN. Characterization of M-laurdan, a versatile probe to explore order in lipid membranes. *F1000Research*. Toulouse, 2014, **172**(3). Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.4805.2
- [34] SANCHEZ, Susana, Maria TRICERRI a Enrico GRATTON. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(19), 7314-7319. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1118288109
- [35] PARASASSI, Tiziana, Gelsomina STASIO, Giampietro RAVAGNAN, Ruth RUSCH a Enrico GRATTON. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*. 1991, (60), 179-189. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(91)82041-0
- [36] SCHEINPFLUG, Kathi, Oxana KRYLOVA a Henrik STRAHL, Peter SASS, ed. Measurement of Cell Membrane Fluidity by Laurdan GP: Fluorescence Spectroscopy and Microscopy. In: *Antibiotics: Methods and Protocols*. New York: Springer Science+Business Media, 2017, s. 159-174. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6634-9_10
- [37] MATHIAS VIARD, *, Michel VINCENT, Olivier MEYER, Bruno ROBERT a Maite PATERNOSTRE. Laurdan Solvatochromism: Solvent Dielectric Relaxation and Intramolecular Excited-State Reaction. *Biophysical Journal*. 1997, (73), 2221-2234. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(97)78253-5
- [38] WATANABE, Nozomi, Keishi SUGA, J. SLOTTE, Thomas NYHOLM a Hiroshi UMAKOSHI. Lipid-Surrounding Water Molecules Probed by Time-Resolved Emission Spectra of Laurdan. *Langmuir*. American Chemical Society, 2019, **35**(20), 6762-6770. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.9b00303
- [39] GOLFETTO, Ottavia, Elizabeth HINDE a Enrico GRATTON. Laurdan Fluorescence Lifetime Discriminates Cholesterol Content from Changes in Fluidity in Living Cell Membranes. *Biophysical Journal*. Cell Press, 2013, **104**(6), 1238-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2012.12.057
- [40] POKORNA, Sarka, Ana VENTURA, Tânia SANTOS, Martin HOF, Manuel PRIETO, Anthony FUTERMAN a Liana SILVA. Laurdan in live cell imaging: Effect of acquisition settings, cell culture conditions and data analysis on generalized

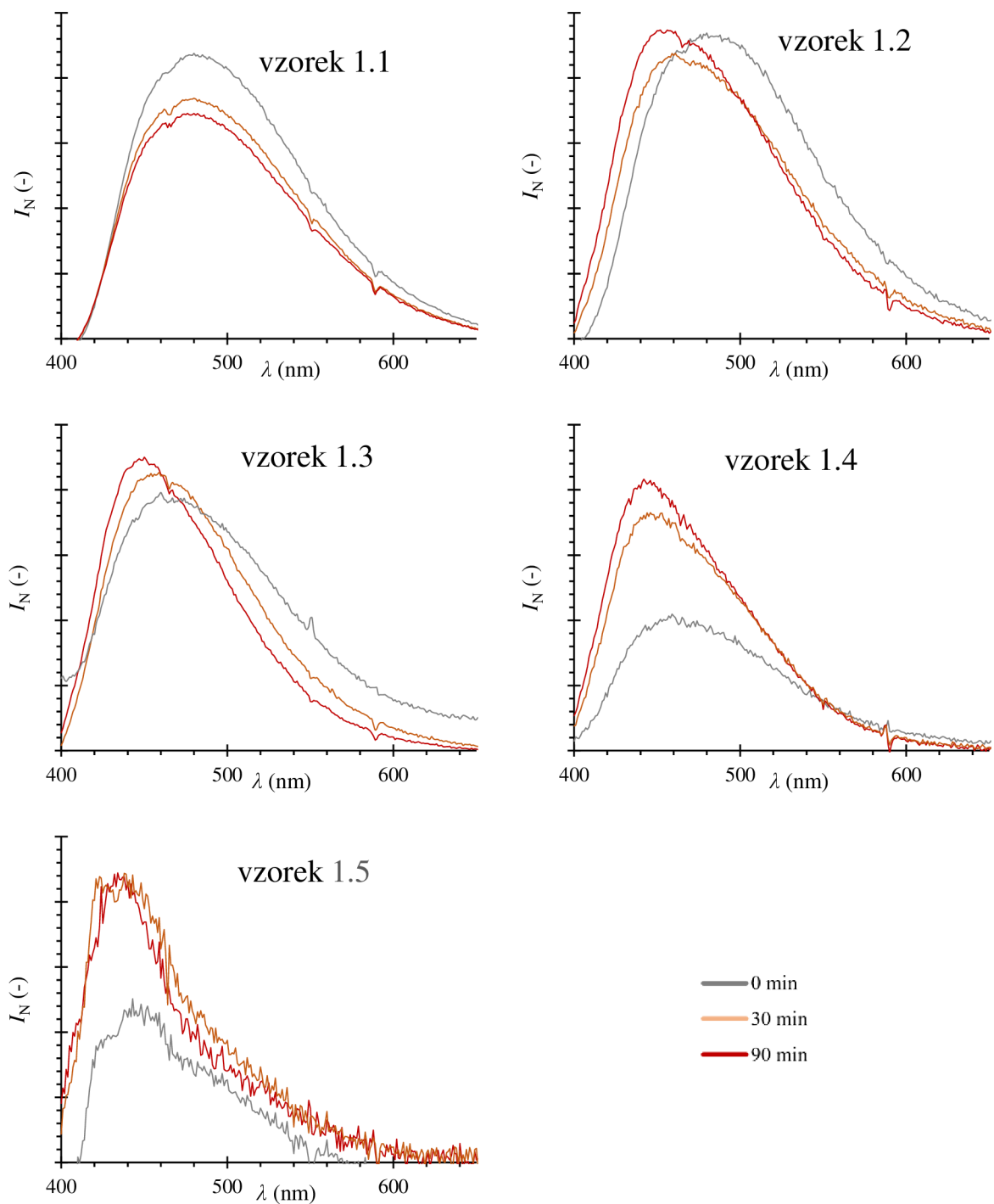
- polarization measurements. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2022, **228**. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2022.112404
- [41] HARRIS, Faith, Katrina BEST a John BELL. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier, 2002, **1565**(1), 123-128. Dostupné z: doi:0.1016/s0005-2736(02)00514-x
- [42] BONDAR, Olga a Elizabeth ROWE. Preferential Interactions of Fluorescent Probe Prodan with Cholesterol. *Biophysical Journal*. 1999, (76), 956–962. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(99)77259-0
- [43] KUBINA, M., J. KUHRÝ, G. DUPORTAIL, G. COUPIN, C. BRONNER a P. LAUSTRIAT. TMA-DPH as Specific Plasma Membrane Fluidity Probe for Intact Cells and its Limitation. In: *Enzymes of Lipid Metabolism II*. Boston: Springer, 1986. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4684-5212-9_52
- [44] MASON, R., Robert F.JACOB, Sandeep SHRIVASTAVA, Samuel C.R.SHERRATT a Amitabha CHATTOPADHYAY. Eicosapentaenoic acid reduces membrane fluidity, inhibits cholesterol domain formation, and normalizes bilayer width in atherosclerotic-like model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016, **12**(1858), 3131-3140. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2016.10.002
- [45] KULIG, Waldemar. Cholesterol under oxidative stress—How lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015, (84), 30-41. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.006
- [46] POOJARI, Chetan, Natalia WILKOSZ, Rafael B.LIRA, Rumiana DIMOVA, Piotr JURKIEWICZ, Rafał PETKA, Mariusz KEPCZYNSKI a Tomasz RÓG. Behavior of the DPH fluorescence probe in membranes perturbed by drugs. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2019, (223). Dostupné z: doi:doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.104784
- [47] NELSON, Steven, Steven NEELEY, Eric MELONAKOS, John BELL a David BUSATH. Fluorescence anisotropy of diphenylhexatriene and its cationic Trimethylamino derivative in liquid dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: opposing responses to isoflurane. *BMC Biophysics*. 2012, **5**(5). Dostupné z: doi:10.1186/2046-1682-5-5
- [48] PACKARD, Beverly a David WOLF. Fluorescence lifetimes of carbocyanine lipid analogs in phospholipid bilayers. *Biochemistry*. 1985, **19**(24), 5176–5181. Dostupné z: doi:10.1021/bi00340a033
- [49] HORIBA SCIENTIFIC. Fluorescence Lifetime Techniques: TCSPC, FRET, TRES, and SST. *HORIBA Scientific* [online]. [cit. 2023]. Dostupné z: <https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/fluorescence-spectroscopy/fluorescence-lifetime-techniques/>
- [50] WAHL, Michael. *Time-Correlated Single Photon Counting*. PicoQuant GmbH, 2014.
- [51] YU, Lan, Yunze LEI, Ying MA, Min LIU, Juanjuan ZHENG, Dan DAN a Peng GAO. A Comprehensive Review of Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Frontiers in Physics*. Frontiers Media, 2021, **9**. Dostupné z: doi:10.3389/fphy.2021.644450
- [52] BLUST, Brittni. *Fluorescence studies of gram-positive and gram-negative bacteria*. Boston: American Physical Society, 2012.
- [53] TALAMOND, Pascale, Jean-Luc VERDEIL a Geneviève CONÉJÉRO. Secondary Metabolite Localization by Autofluorescence in Living Plant Cells. *Molecules*. MDPI, 2015, **20**, 5024-5037. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20035024

- [54] CLARKE, Ronald a Anna OPRYSA. Fluorescence and Light Scattering. *Journal of Chemical Education*. 2004, **5**(81), 705-707. Dostupné z: doi:10.1021/ed081p705
- [55] JASCO. *Tips & Tricks for Fluorescence Measurement - Getting the Best out of Your Fluorescence Spectrophotometer* [online]. 2022 [cit. 2022]. Dostupné z: <https://jascoinc.com/learning-center/best-practices/fluorescence-tips-tricks/>
- [56] GARDINER, Derek, Pierre GRAVES, J. LOUDEN, Heather BOWLEY a George TURRELL, Derek GARDINER, Pierre GRAVES. *Practical Raman Spectroscopy*. 1. Berlin: Springer Berlin, Heidelberg, 1989.
- [57] EDINBURGH INSTRUMENTS. Raman Scattering in Fluorescence Emission Spectra - Common Errors in Fluorescence Spectroscopy. *Edinburgh Instruments - Blog* [online]. [cit. 2023]. Dostupné z: <https://www.edinst.com/blog/raman-scattering-blog/>
- [58] MOLECULAR DEVICES. How to use shading correction and background subtraction. *Molecular Devices - Spectranet* [online]. 2020 [cit. 2023]. Dostupné z: <https://support.moleculardevices.com/s/article/How-to-use-shading-correction-and-background-subtraction?>
- [59] LASCH, Robert. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier, 2012, **117**, 100-114. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemolab.2012.03.011
- [60] KIMBALL, Joseph, Jose CHAVEZ, Luca CERESA, Emma KITCHNER, Zhangatay NUREKEYEV a Hung DOAN. On the origin and correction for inner filter effects in fluorescence Part I: primary inner filter effect-the proper approach for sample absorbance correction. *Methods and Applications in Fluorescence*. 2020, **8**(3).
- [61] FONIN, Alexander, Anna SULATSKAYA, Irina KUZNETSOVA a Konstantin TUROVEROV. Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction. *PLoS ONE*. 2014, **9**(7). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0103878
- [62] PANIGRAHI, Suraj a Ashok MISHRA. Study on the dependence of fluorescence intensity on optical density of solutions: the use of fluorescence observation field for inner filter effect corrections. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2019, (18), 583-591. Dostupné z: doi:10.1039/c8pp00498f
- [63] KUBISTA, Mikael, Robert SJÖBACK, Svante ERIKSSON a Bo ALBINSSON. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra. *Analyst*. 1994, **119**, 417-419. Dostupné z: doi:10.1039/AN9941900417
- [64] CERESA, Luca, Joseph KIMBALL, Jose CHAVEZ et al. On the origin and correction for inner filter effects in fluorescence. Part II: secondary inner filter effect -the proper use of front-face configuration for highly absorbing and scattering samples. *Methods and Applications in Fluorescence*. 2021, **9**(3). Dostupné z: doi:10.1088/2050-6120/ac0243
- [65] BAGATOLLI, Luis a Yves MELLY, ed., Guy DUPORTAIL, ed.. LAURDAN Fluorescence Properties in Membranes: A Journey from the Fluorometer to the Microscope. In: *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*. 1. Berlin: Springer-Verlag, 2013, s. 3-35. Dostupné z: doi:10.1007/4243_2012_42
- [66] LASSAILLY, Francois, Emmanuel GRIESSINGER a Dominique BONNET. "Microenvironmental contaminations" induced by fluorescent lipophilic dyes used for noninvasive in vitro and in vivo cell tracking. *Blood*. 2010, **115**(26), 5347-5354. Dostupné z: doi:doi.org/10.1182/blood-2009-05-224030

- [67] BACALUM, Mihaela, Bogdan ZORILA, Mihai RADU a Aurel POPESCU. Laurdan solvatochromism: Influence of solvent polarity and hydrogen bonds. *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications*. 2013, **5-6**(7), 456-460.
- [68] MARKOVÁ, Kateřina. Vnitřní fluorescence bakterií *Cupriavidus necator* [online]. Brno, 2018 [cit. 2023-05-21]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/80655>.
Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.
- [69] IBIDI GMBH. Ibidi Application Guide: Microscopy With ibidi. In: *Ibidi* [online]. 2021 [cit. 2023]. Dostupné z: https://ibidi.com/img/cms/resources/AG/FL_AG_031_Microscopy_with_ibidi_Chamb ers_150dpi.pdf

7 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: porovnání změny emisních spekter v čase pro vzorky s různou koncentrací barviva



Obrázek 16 – porovnání změny emisních spekter v čase pro vzorky s různou koncentrací barviva

Příloha č. 2: MATLAB skript využitý k vypočítání, korekci a zobrazení GP

```
hthresh=0.6; %threshold intenzity pro úpravu jasu

bl = readmatrix(strcat("channel_blue.dat")); %import dat
gr = readmatrix(strcat("channel_green.dat"));

GP=(bl-gr)./(bl+gr); %výpočet GP
GP(isnan(GP))=0; %nahradí všechny chyby (NaN) nulou
GP=1.08651*GP+0.17208; %korekční rce

GPmin = -1.07177+0.16696;
GPmax = 1.07177+0.16696;
fitGP=-1+(2/(GPmax-GPmin))*(GP-GPmin);
%fitování na interval <-1;1> (kvůli fci ind2rgb)
%fitGP je rovno původnímu GP bez korekce, tento řádek je tak
redundantní, ale názorný

intensity=gr+bl; %intenzita spočítaná ze součtu events
intensity=intensity/max(intensity,[],'all'); %normalizace
intensity(intensity>hthresh)=hthresh; %aplikace thresholdu
intensity=(intensity/max(intensity,[],'all')); %znovu normalizace

%plot=subplot(1,1,1); %dva řádky pro zobrazení intenzity
%imshow(intensity,'InitialMagnification', 200);

colormap(jet()); %barevné schéma
GP_color = ind2rgb(round((fitGP+1)*128),jet()).*intensity; %převod
GP na RGB mapu
plot=subplot(1,1,1);
imshow(GP_color,'InitialMagnification', 200); %zobrazení GP
caxis([GPmin GPmax]); %osa
colorbar; %barevná škála
exportgraphics(plot,strcat("GP.png"),'BackgroundColor','white');
%export obrázku
```

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Výčet použitých zkratek, symbolů a veličin v pořadí podle místa výskytu.

Zkratky

PHB	polyhydroxybutanoát (resp. polyhydroxybutyrát)
PG	fosfatidylglycerol
PE	fosfatidylethanolamin
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
UV/VIS	ultrafialové/viditelné spektrum
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
DPH	1,6-difenylhexatrien
TMA-DPH	N,N,N-trimethyl-4-(6-fenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl) fenylamonium p-toluensulfonát
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
ICT	intramolekulární přenos náboje
LE	lokálně excitovaný stav
TCSPC	time-correlated sigle photon counting
IFE	efekt vnitřního filtru
<i>Cn</i>	<i>Cupriavidus necator</i>
DMF	dimethylformamid
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
DMF-2, DMF-3, AcO-4	zásobní roztoky laurdanu (viz 3.2)
RPM	otáček za minutu
CTAB	cetrimonium bromid

Symboly, veličiny

<i>GP</i>	generalizovaná polarizace
OD_{600}	optická hustota při 600 nm
<i>M</i>	mol/l (jednotka koncentrace)
$\lambda_{(ex/em)}$	(excitační/emisní) vlnová délka
I_{λ}	intenzita záření o vlnové délce λ
$I_{0/90}$	intenzita polarizovaného světla v dané rovině
I_N	normalizovaná intenzita záření
<i>r</i>	anisotropie
<i>f, L_i</i>	korekční faktory anisotropie
<i>V</i>	objem
<i>c</i>	koncentrace