

**Západočeská univerzita v Plzni**  
**Fakulta aplikovaných věd**  
**Katedra kybernetiky**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**PLZEŇ, 2013**

**MARTIN LEBA**

## PROHLÁŠENÍ

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě bakalářskou práci zpracovanou na závěr studia na Fakultě aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím odborné literatury a pramenů, jejichž úplný seznam je její součástí.

V Plzni dne:

.....

*vlastnoruční podpis*

## **Anotace**

Práce se zabývá neinvazivní *in-vivo* kvantitativní analýzou rozložení proteinu MinD v bakteriích *Escherichia coli*, využitím reportér fluorescenčního proteinu GFP v komplexu GFP::MinD. Podklady pro návrh a validaci matematického modelu jsou získávány pomocí časosběrných studií na fluorescenčním mikroskopu, kdy se k rozboru získaných snímků využije obrazová analýza v programu ImageJ. Matematický model je realizován prostřednictvím programu Matlab.

## **Klíčová slova**

matematický model, kvantitativní analýza, *Escherichia coli*, Min proteiny, fluorescenční mikroskopie, GFP, obrazová analýza

## **Abstract**

A purpose of this work is in-vivo quantitative analysis of the distribution of MinD protein in *Escherichia coli*, using a fluorescent reporter GFP protein in the complex GFP::MinD.

Data for creation of the design and validation of a mathematical model are obtained using time-lapse fluorescence microscopy studies. Acquired images are analyzed with program ImageJ. The mathematical model is implemented via Matlab.

## **Keywords**

mathematical model, quantitative analysis, *Escherichia Coli*, Min proteins, fluorescent microscopy, GFP, image analysis

# OBSAH

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | ÚVOD.....  | 1  |
| 2     | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....                                   | 1  |
| 2.1   | Popis bakterie <i>Esherichia coli</i> .....                              | 1  |
| 2.2   | Popis funkce skupiny Min proteinů.....                                   | 2  |
| 2.3   | Fluorescenční mikroskopie.....   | 5  |
| 2.3.1 | Fyzikální princip fluorescence.....                                      | 5  |
| 2.3.2 | Fluorofory používané v mikroskopii.....                                  | 7  |
| 2.3.3 | Princip Imunofluorescence.....   | 9  |
| 2.3.4 | Photobleaching.....  | 10 |
| 2.4   | Fluorescenční mikroskop.....   | 10 |
| 2.4.1 | Epifluorescenční mikroskop.....  | 11 |
| 2.4.2 | Transmisní fluorescenční mikroskop.....                                  | 12 |
| 2.4.3 | Konfokální fluorescenční mikroskop.....                                  | 12 |
| 3     | METODIKA.....  | 13 |
| 3.1   | Volba metody pro <i>in-vivo</i> pozorování.....                          | 13 |
| 3.2   | In-vivo pozorování pohybu proteinu MinD.....                             | 13 |
| 3.3   | Kultivace a příprava bakterií <i>E. coli</i> pro účely fluorescence..... | 13 |
| 3.3.1 | Minimalizace autofluorescence.....                                       | 14 |
| 3.3.2 | Nastavení podmínek pozorování na fluorescenčním mikroskopu.....          | 16 |
| 3.4   | Sběr a zpracování získaných dat z měření.....                            | 18 |
| 4     | VÝSLEDKY.....  | 19 |
| 4.1   | Optimalizace získaných dat a jejich vyhodnocení.....                     | 19 |
| 4.2   | Matematický model pohybu reportér proteinu v bakterii.....               | 24 |
| 4.3   | Vztah mezi množstvím proteinu a fluorescencí.....                        | 26 |
| 4.4   | Porovnání naměřených hodnot s matematickým modelem.....                  | 33 |
| 5     | ZÁVĚR.....   | 33 |
| 6     | LITERATURA.....  | 34 |
| 7     | PŘÍLOHY.....   | 36 |

# 1 ÚVOD

Matematické modelování se používalo již dříve v technických odvětvích k různým návrhům strojů a zařízení před jejich vlastní realizací. V současné době se stává součástí i dalších disciplín včetně biologie. V této oblasti se používají matematické metody k popisu různých pochodů u živých organismů, např. u dělení buněk [1]. Také v medicíně našlo matematické modelování své uplatnění. Byly vytvořeny modely mnoha fyziologických a patologických procesů např. pro dynamický model růstu nádoru a jeho metastáz [2]. Vytvoření správného modelu může pomoci k přesnější předpovědi chování sledovaného organismu či vývoje nemoci.

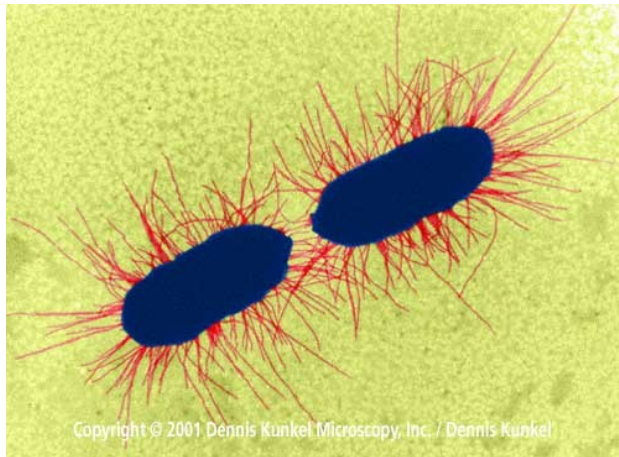
Cílem této práce je získat, za pomoci biologických a technických vědních oborů, algoritmus, k určení kinetiky a množství MinD proteinů v bakterii *E. coli* s použitím neinvazivních metod.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 POPIS BAKTERIE *ESHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* (Obr.1) je tyčinkovitá bakterie (prokaryotický organismus), patří ke střevní mikroflóře lidí a jiných teplokrevných živočichů, což napovídá i název čeledi, do které spadá - Enterobacteriaceae (řecky enteron = střevo). Dosahuje délky 2-3 $\mu$ m a šířky 0,6 $\mu$ m. Množí se binárně tzv. přehrádečným dělením [3]. Bakterie je schopna existovat za anaerobních (bez přítomnosti vzdušného kyslíku) i aerobních (za přítomnosti vzdušného kyslíku) podmínek. Při optimálních podmínkách se bakterie *E. coli* rozdělí do 20 minut. Vytváří vitamín K a zabraňuje v rozšíření patogenních bakterií ve střevě [4].

Skládá se z tuhé ochranné pláště zvaného buněčná stěna, cytoplasmatické membrány (zajišťuje syntézu ATP - zdroj energie a dýchací řetězec), cytoplasmu, ribozomů (asi 40% hmotnosti celé bakterie, slouží k syntéze bílkovin), plazmidu (kruhová DNA – obsahuje 1-5% množství DNA ve srovnání s bakteriálním chromosomem, kóduje doplňující vlastnosti, např. resistenci na antibiotikum), chromosomu (DNA) [4]. Na povrchu má bičíky, pomocí kterých se pohybuje i tzv. fimbrie (dá se přirovnat podobou ke chloupkům) a to dva typy. První jí pomáhá přichytit se na epitel střev hostitele, druhý typ je určen ke konjugaci (výměna genetické informace pomocí fimbrie ve tvaru trubičky zakončené háčkem a přenosu plazmidu), je označován slovem „pilus“ [4].



**Obr. 1**

Fotografie bakterie *E. coli* pomocí transmisní elektronové mikroskopie.  
(Dennis Kunkel Microscopy, Inc. )

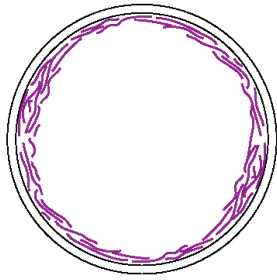
### **Fáze růstu *E. coli***

Při statické kultivaci bakterií (bakterie jsou dány do živného média a do omezeného prostoru), se fáze růstu dělí na: klidovou (lag fáze – aklimatizování bakterií na nové prostředí), exponenciální (log fáze – nejrychlejší fáze růstu), stacionární (akumulace odpadních produktů a vyčerpání živného média), fáze odumírání (postupně buňky umírají díky nedostatku živin, případně probíhá sporulace – přechod do klidového stádia při nepříznivých podmínkách pro život) [4].

### **2.2 POPIS FUNKCE SKUPINY MIN PROTEINŮ**

Jak jsem již zmínil výše v oddílu výše, bakterie *E. coli* se množí přehrádečným dělením. Toto dělení probíhá tak, že se bakterie nejprve prodlouží na dvojnásobnou délku, replikuje svoji DNA, pak se začne uprostřed bakterie vytvářet septum (zacelující se membránový prstenec postupně oddělující obě poloviny), které se po čase spojí a buňka se rozdělí na dvě dceřiné. O mechanismus volby umístění a vytvoření dělicího septa se stará právě skupina Min proteinů [5].

Do skupiny Min proteinů spadají tři: MinC, MinD a MinE. Systém proteinů Min zabraňuje polymerizaci dělicího septa jinde, než v polovině bakterie. Dělicí septum je tvořeno z proteinu FtsZ (Filamenting Temperature-Sensitive mutant Z) a je označováno slovem Z-ring (Obr. 2). Při dělení se postupně zužuje „hrdlo“ Z-ringu (kontrakce), jako důsledek vzájemného prolínání/zasouvání vláken proteinu FtsZ mezi sebe do té míry, až se hrdlo zcela uzavře a buňka se rozdělí. Vznik Z-ringu však inicializuje až určitý signál, který značí, že je buňka připravena se dělit.



**Obr. 2**

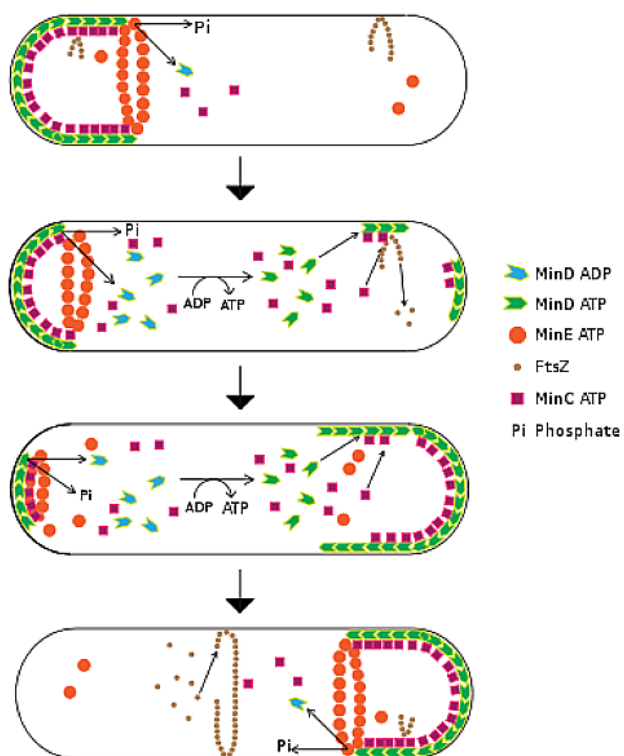
Vlákná proteinu FtsZ, podél plasmatické membrány bakterie, tvořící Z-ring.  
(<http://en.wikipedia.org>)

V tomto mechanismu hraje každý z proteinů Min svoji úlohu (Obr.3).

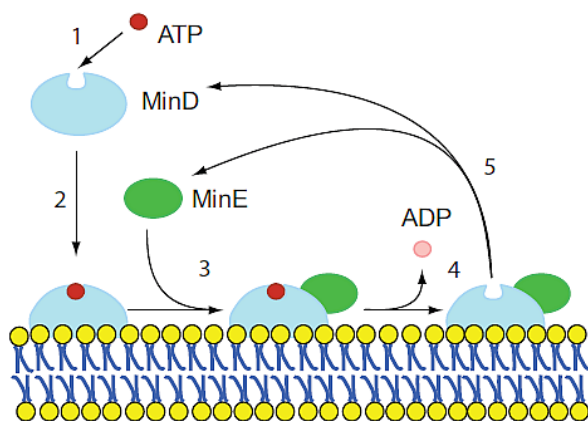
**MinD**, pokud je spojen s ATP, se váže na plasmatickou membránu a vytváří shluky MinD, střídavě na obou pólech bakterie. Navázané MinD-ATP (Obr.4) na membránu aktivuje proteiny **MinC**, které se s MinD spojí a začnou působit jako inhibitory, zabraňující polymerizaci FtsZ. Čímž zabraňují vytvoření Z-ringu na pólech buňky.

**MinE** zabraňuje formování komplexů MinD-MinC blízko středu buňky tím, že vytváří prstence v oblasti působení MinD-MinC komplexů (blíže středu buňky), katalyzuje uvolnění MinD z membrány aktivací MinD-ATPázy, která hydrolyzuje ATP připojené k MinD na ADP a MinD, se od membrány odpojí (pokud by se vyčerpala MinE, MinD by se homogenně rozprostřel po celé cytoplasmatické membráně [5]). Tím zanikne i komplex MinD-MinC a protein MinD-ADP musí znova projít fosforylací, aby z ADP vzniklo ATP a mohl se tak navázat zpět na membránu [4].

Těmito vzájemnými interakcemi systému proteinů Min vzniká oscilace MinD proteinů z jednoho pólu na druhý a tím zabraňují vytvoření Z-ringu jinde, než v polovině buňky. Jak se začíná hrdlo Z-ringu uzavírat, oscilace v obou polovinách bakterie se začnou pomalu oddělovat a v poměru k velikosti polovin i zrychlovat. Perioda oscilace před vytvořením Z-ringu se pohybuje od 40 do 120s podle velikosti buňky, poměrech MinD k MinE a okolní teplotě [5, 6, 7]. Zajímavostí je, že se tento mechanismus nevyskytuje u všech bakterií, např. u *Bacillus subtilis* je koncentrace komplexů MinD-MinC statická na pólech buňky [4]. Dělení je inicializováno vytvořením Z-ringu.



**Obr. 3**  
 Cyklus systému Min proteinů při určování umístění Z-ring. (<http://en.wikipedia.org>)



**Obr. 4**  
 Cyklus vazby MinD a MinE proteinů na cytoplasmatickou membránu a následné odpojení MinD od membrány. [10]

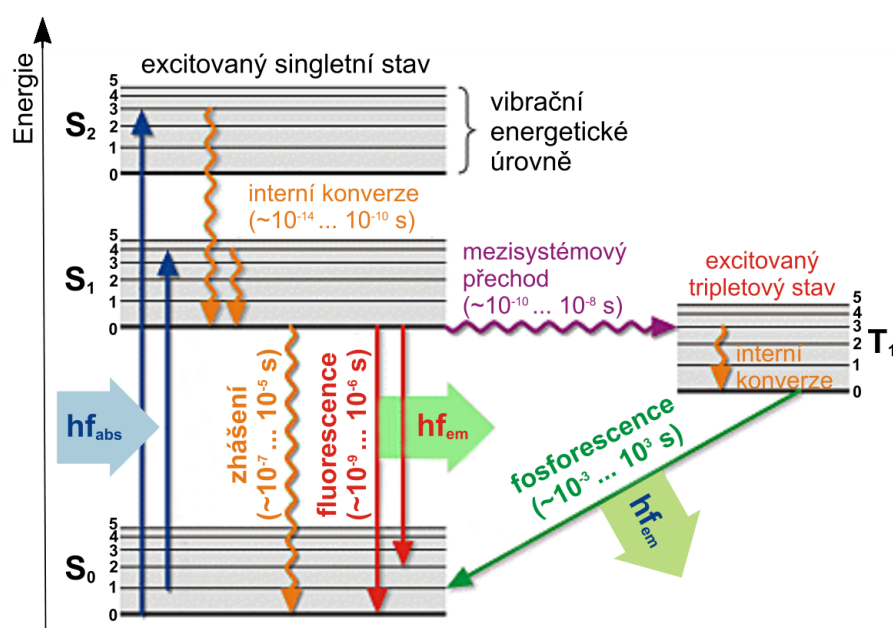


## 2.3 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

### 2.3.1 FYZIKÁLNÍ PRINCIP FLUORESCENCE

Fluorescence je druh luminiscence, která je definována jako emise světla pocházejícího z látky, jehož vznik nesouvisí s jeho teplotou, také se označuje jako záření studeného tělesa [8]. Příčinou luminiscence může být chemická reakce, elektrická energie, subatomární přesuny, mechanický stres v krystalu a další [8].

Při fluorescenci dochází k excitaci elektronu vyvolané přijetím fotonu elektromagnetického záření o kratší vlnové délce (vyšší frekvence, energii) na vyšší energetickou hladinu, kde setrvává krátkou dobu a přesune se zpět do rovnovážné polohy při vyzáření fotonu o větší vlnové délce (nižší frekvenci, energii). Tento děj popisuje následující Jablonského energetický diagram.

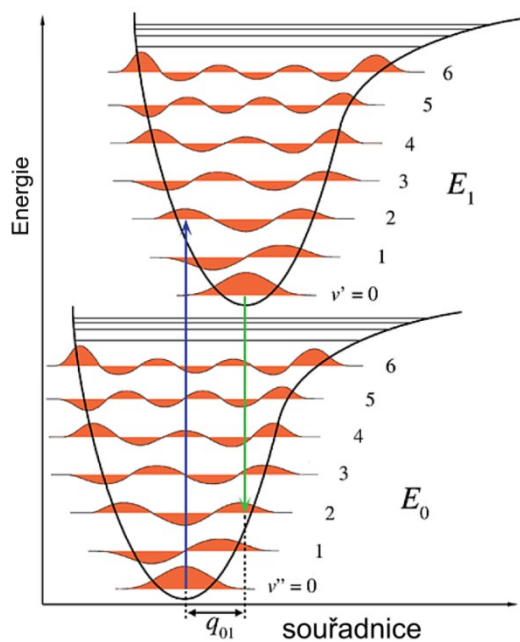


Obr. 5 Jablonského energetický diagram. (<http://www.uni-leipzig.de>)

Na Obr. 5 je znázorněn rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí. Hlavní rozdíl mezi těmito jevy je v tzv. délce zhášení (čas mezi excitací a emisí). U fluorescence je tato hodnota průměrně  $10^{-8}$  s, kdežto u fosforescence je řádově delší [8].

Podrobněji popisuje jednotlivé přechody **Frank-Condonův princip**.

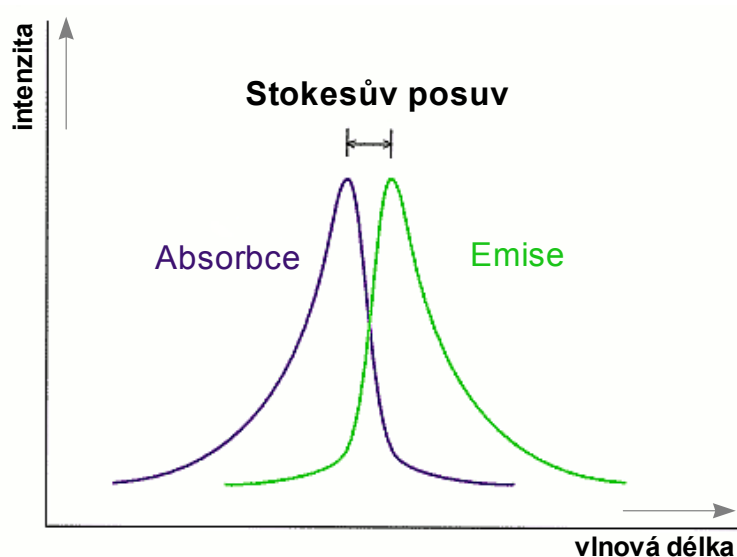
Po absorpci fotonu elektronem, řádově  $10^{-15}$ s se molekula ocitne v nestabilním stavu a začne vibrovat, aby se zbavila „přebytečné“ energie. Přesuny elektronů jsou popisovány jako vibrační přechody v elektronových a vibračních energetických hladinách molekuly v důsledku absorpce nebo emise fotonu o odpovídající energii. Tento princip stanoví, že během elektronového přechodu, změna z jedné energetické vibrační hladiny na jinou nastane s větší pravděpodobností/šancí, pokud se významně překrývají dvě vibrační vlnové funkce (Obr. 6).



**Obr. 6** Energetický diagram vysvětlující Frank-Condonův princip. V diagramu je zeleně vyznačena preferovaný skok z hladiny  $v''=2$  na hladinu  $v'=0$  v důsledku stejné fáze vlny. (<http://en.wikipedia.org>)

Rozdíl mezi absorpčním a emisním spektrem při fluorescenci popisuje **Stokesův posuv**, který popisuje, že vlnová délka emitovaného světla je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla. Tento úbytek energie je dán vnitřními přechody z vyšších excitovaných stavů do metastabilního nejnižšího excitovaného stavu, před přechodem na původní stabilní energetickou hladinu a emisí [9].

Na následujícím (Obr. 7) je znázorněn Stokesův posuv, včetně zrcadlové podobnosti mezi jednotlivými spektrálními charakteristikami.



**Obr. 7** Stokesův posuv. (<http://en.wikipedia.org>)

### 2.3.2 FLUOROFORY POUŽÍVANE V MIKROSKOPII

Látky, které jsou schopny fluorescence, se nazývají **fluorofory**.

Dělíme je na primární (autofluorescence) a sekundární (fluorescenční barvení).

#### 2.3.2.1 Autofluorescence

Auto fluorescenci vykazují látky přirozeně bez nutnosti barvení. Několik nejčastějších molekul s autofluorescencí uvádím v následující tabulce (Tab. 1).

| Molekula    | Excitace [nm] | Fluorescence [nm] | Organismus  |
|-------------|---------------|-------------------|-------------|
| dityrosine  | 325           | 400               | živočichové |
| fenylalanin | 260           | 282               | všichni     |
| chlorofyl   | 465, 665      | 673, 726          | rostliny    |
| kolagen     | 270-370       | 305-450           | živočichové |
| lipofuscin  | 410-470       | 500-695           | Eukaryoty   |
| melanin     | 340-400       | 360-560           | živočichové |
| NAD(P)H     | 340           | 450               | všichni     |
| tryptofan   | 280           | 300-350           | všichni     |
| tyrosin     | 270           | 305               | všichni     |

**Tab. 1** Nejčastěji pozorované látky vykazující autofluorescenci. (<http://en.wikipedia.org>)

#### 2.3.2.2 Fluorescenční barviva

Používají se ke zviditelnění struktur, které nevykazují přirozenou fluorescenci (autofluorescenci). Fluorescenci vykazují zejména aromatické sloučeniny (polyaromatické sloučeniny a heterocykly) [9].

Dělí se podle **způsobu vazby** na cílovou skupinu molekul:

- **přímá** (fluorofory se přímo vážou na sledované buněčné struktury, např. DAPI, ethidium bromid, Hoechst, propidium jodid),
- **nepřímá**, sekundární (využívá se kovalentní spojení s protilátkou, která se specificky váže na cílovou strukturu - imunofluorescence)

Podle **způsobu značení** se dělí fluorofory na:

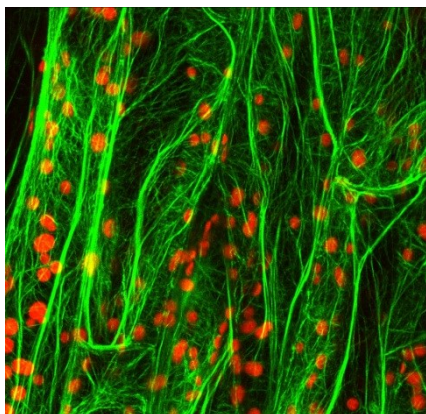
- **monoklonální** jsou více specifické, nasedají pouze na určitý epitof protilátky (vysvětleno níže),
- **polyklonální** umožňují vazbu s více epitofy, tedy mají větší šanci se navázat, ale pak může vzniknout nechtěný efekt, kdy místo sledovaných molekul svítí i pozadí, na které se fluorofor také navázal.

Příklady fluorescenčních barviv (Tab. 2) a autofluorescence (Obr. 8) jsou uvedeny níže.

| Molekula         | Excitace [nm] | Emise [nm] | použití   |
|------------------|---------------|------------|---|
| Akridinová oranž | 455-600       | 560-680    | DNA(zeleně), RNA(tmavě červeně)                   |
| DAPI             | 358           | 461        | DNA a RNA (modře)                                 |
| Ethidium bromid  | 510           | 595        | DNA a RNA (oranžově)                              |
| Fluorescein      | 494           | 521        | FITC(fluorescein isothiokyanát)-imunofluorescence |
| GFP              | 395, 475      | 509        | širokospektrální fluorescenční barvivo            |
| Propidium Jodid  | 536           | 617        | DNA (červeně)                                     |
| Rhodamin B       | 540           | 625        | průtoková cytometrie, ELISA testy                 |

**Tab. 2**

Vybrané fluorescenční značky. (<http://dbc.bio.uci.edu/OBCresources/fluorophores.pdf>)



**Obr. 8**

Autofluorescence **chlorofylu** (červeně) doplněna o značenou fluorescenci aktinových vláken proteinem **GFP** – zeleně (<http://www.noble.org>).

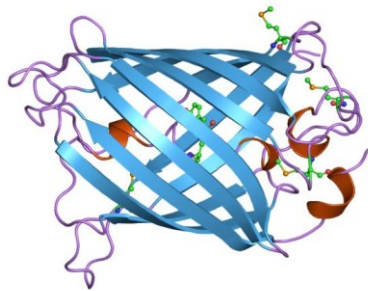
### 2.3.2.3 Podrobný popis fluoroforu GFP

Fluorescenční protein GFP je převážně používán na záznam exprese sledovaného proteinu a to např. tím způsobem, že se GFP přímo integruje do genetické informace kódující sledovaný protein, čímž se s každou syntézou (výrobou) tohoto proteinu vytvoří i fluorescenční marker s ním spojený. Tento případ jsme použili i my při sledování minD proteinu v bakteriích *E. coli*, kdy byl spojený s fluorescenčním markerem eGFP, což je vylepšená forma přírodní formy proteinu GFP.

V roce 2008 za objevení a vývoj GFP obdrželi Osamu Shimomura (objev proteinu u medúzy), Martin Chalfie (detekce genu, genové manipulace, využití proteinu jako markeru v genetických výzkumech) a Roger Y. Tsien (vylepšení proteinu a rozšíření škály - drobnými úpravami vytvořil celou barevnou škálu značkovacích fluorescenčních proteinů) Nobelovu cenu za chemii [10]. Tento protein byl izolován z medúzy *Aequorea victoria* a později jeho modifikací (mutací) vzniklo několik typů značených podle emitované barvy:

**EGFP** (Enchanted Green Fluorescent Protein) objeven v roce 1995 s výraznější fluorescencí a čistotou, **EBFP** (Enchanted Blue Fluorescent Protein), **ECFP** (Enchanted Cyan Fluorescent Protein), **YFP** (Yellow Fluorescent Protein), **RFP** (Red Fluorescent Protein) a další.

Díky takové variabilitě v barvách fluorescenčního proteinu lze na jednom preparátu označit více struktur a zobrazit je současně. Samotný GFP má soudkovitou strukturu, uvnitř které se nalézá chromofor (Obr. 9).



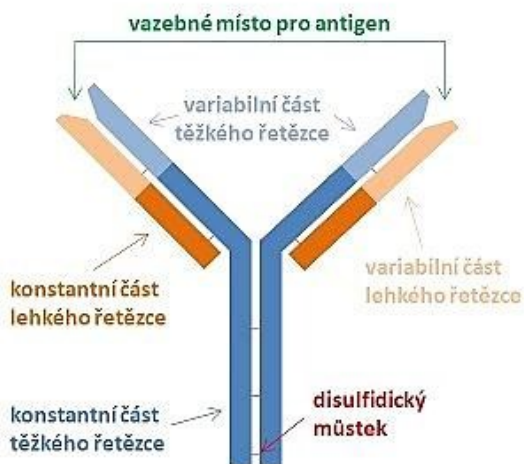
**Obr. 9**  
Struktura GFP. (<http://en.wikipedia.org>)

### 2.3.3 PRINCIP IMUNOFLUORESCENCE

Každá biologická struktura má na svém povrchu určité specifické značení nazývané **antigeny** (respektive antigeny se nazývají látky, které jsou schopny vyvolat imunitní reakci).

Oproti těmto antigenům si organismus vytváří molekuly, které s antigeny reagují, zapadají do nich jako klíč do zámku, těmto strukturám se říká **protilátky** (imunoglobulin, antibody) a jsou nepostradatelnou součástí imunitního systému organismu.

Struktura protilátky je vyobrazena na následujícím Obr. 5.



**Obr. 10**  
Struktura protilátky. (<http://www.biomach.cz>)

**Variabilní část** má ohromné množství možností tvarů a slouží ke specifickému navázání na rozličné antigeny, **konstantní část**, tzv. FC fragment, má pouze několik podob (IgA, IgG, IgD, IgE, a IgM) a běžně se váže na FC receptory imunitních buněk [11].

Při fluorescenčním značení se využívá právě této specifické vazby protilátek na antigeny cílových struktur, kdy se na konstantní část těžkého řetězce naváže fluorescenční marker (značka) a celý tento komplex protilátka+marker se naváže na cílový antigen sledované struktury. Tomuto značení se říká **přímé značení**.

Ne vždy však daný fluorescenční marker specificky nasedá na cílovou strukturu a proto, pokud chceme takovou strukturu označit, musíme si vytvořit protilátku proti sledované struktuře (antigenu). Na vytvoření specifické protilátky se využívá reakce imunitního systému jiného živočišného druhu na sledovaný protein, kdy imunitní systém proti němu vytvoří specifické protilátky, na které pak přichytíme fluorofor a společně s nově vytvořenou protilátkou nasednou na cílovou strukturu, čímž ji zviditelníme. Takovému postupu, kdy využíváme již více stupňů mezi fluoroforem a antigenem říkáme **nepřímé značení**.

#### **2.3.4 PHOTBLEACHING**

Photobleaching (tzv. vybělování) je fotochemický proces, při kterém se fluorofor nevratně degraduje do stavu proteinu neschopného vykazovat fluorescenci. Rychlost fotobleachingu je závislý na několika faktorech: na typu fluoroforu, na intenzitě excitačního světla a na okolním prostředí fluoroforu. K photobleachingu může stačit emise několika málo fotonů fluoroforu nebo může nastat až po několika miliónech cyklech. Rychlost photobleachingu lze ovlivnit přidáním speciálních anti-photobleaching reagentů do média k fluoroforu [12].

Photobleaching ztěžuje získávání dat o pohybech proteinů v časosběrných studiích, kdy jsou sledovány právě pomocí fluorescenčních markerů.

A právě tato závislost - vytvoření matematického modelu, je tématem této práce.

#### **2.4 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP**

Fluorescenční mikroskop je prakticky nástroj ke sledování mikroskopických struktur vykazujících fluorescenci. Jedná se o klasický mikroskop obohacený o optiku nezbytnou pro fluorescenční pozorování.

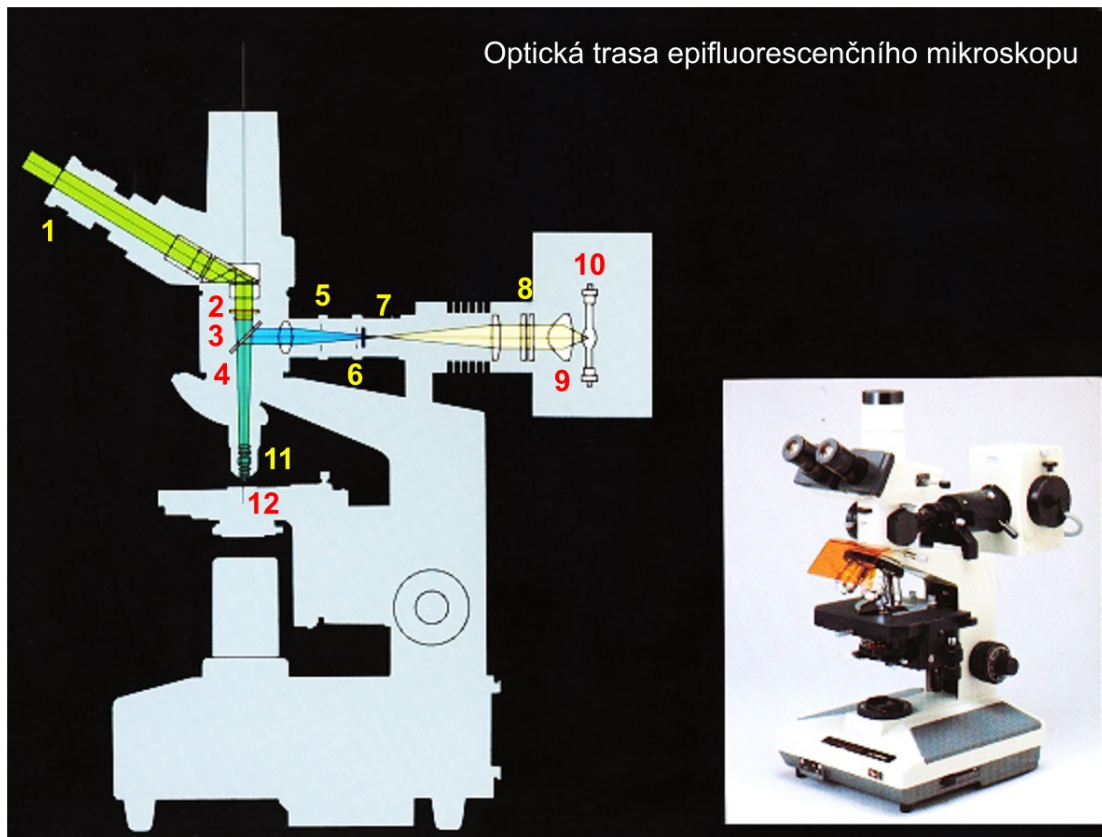
Součástí tedy musí být zdroj excitačního osvětlení spolu s filtry vymezujícími rozsah excitačního spektra a filtry propouštějící sledované emisní spektrum. Nezbytnou součástí pro profesionální sledování fluorescence je i CCD kamera (nejlépe chlazená z důvodu snížení šumu).

Přímo sada filtrů excitačních a emisních, spolu s polopropustným zrcadlem se nazývá „kostka“, která se podle používaných fluoroforů mění jako kompaktní součást.

Fluorescenční mikroskopy dělíme **podle polohy osvětlení** vůči sledovanému vzorku na epifluorescenční a transmisní. Podle **použité techniky sledování** je dělíme na klasické a konfokální.

### 2.4.1 EPIFLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

U epifluorescenční mikroskopu (Obr. 11) dopadá excitační světlo ze stejné strany jako je i snímáno světlo emisní.



**Obr. 11**

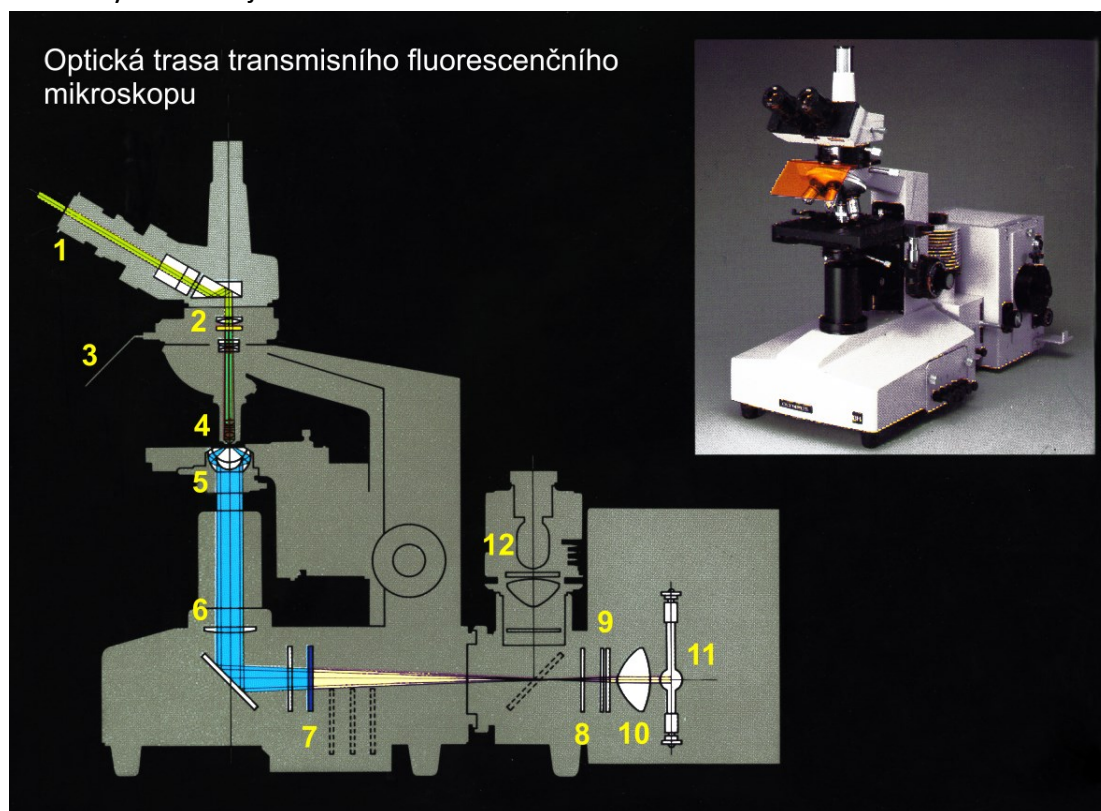
Schéma epifluorescenčního mikroskopu.

1 – objektiv, 2 – výběrový bariérový filtr, 3 – interní bariérový filtr, 4 – dichronické zrcadlo (excitační: 90% odráží, 10% propouští, emisní: 10% odráží, 90% propouští), 5 – membrána pole, 6 – membrána clony, 7 – excitační filtr, 8 – tepelný filtr, 9 – kolektor, 10 – vysokotlaková rtuťová výbojka, 11 – objektiv, 12 – vzorek (<http://web.natur.cuni.cz>)



### 2.4.2 TRANSMISNÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

U transmisního fluorescenčního mikroskopu (Obr. 12) excitační světlo prochází skrze sledovaný vzorek a je detekováno na druhé straně vzorku.



Obr. 12

Schéma transmisního fluorescenčního mikroskopu.

1 – objektiv, 2 – emisní filtr, 3 – UV ochranný plast, 4 – objektiv, 5 – širokospektrální filtr na tmavé pole, 6 – UV ochranný tubus, 7 – excitační filtr, 8 – závěrka, 9 – tepelný filtr, 10 – kolektor, 11 – vysokotlaková rtuťová výbojka, 12 – wolframová žárovka (<http://web.natur.cuni.cz>)

### 2.4.3 KONFOKÁLNÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

Výhodou konfokálního fluorescenčního mikroskopu je vyšší rozlišovací schopnost získaná díky získávání obrazu ze vzorku přímo z hladiny pozorování, ohniskové roviny mikroskopu. Výsledný snímek je tak oproštěn o pozadí z jiných rovin vzorku jak tomu je u klasických optických mikroskopů.



## 3 METODIKA

### 3.1 VOLBA METODY PRO *IN-VIVO* POZOROVÁNÍ

Abychom určili sledované množství proteinů v buňce, můžeme si vybrat z mnoha rozličných metod doposud aplikovaných v biologických oborech. Ve většině z nich však musíme nejprve buňku „rozbít“, abychom se dostali k proteinům uvnitř a mohli použít vhodné chemické sloučeniny na jejich specifickou detekci (tzv. *in-vitro* metody).

My však potřebujeme sledovat procesy uvnitř živé buňky, pokud možno bez zásahu do jejího přirozeného prostředí, životního cyklu. Pouhým pozorováním buňky pod mikroskopem v jasném poli (z ang. „bright field“), tedy použitím průchozího bílého světla, sice můžeme odlišit struktury uvnitř ní (jelikož jsou buněčné organely převážně bezbarvé, používají se k tomu kontrastní techniky – fázový kontrast, diferenční interferenční mikroskopie), ale na pozorování specifických proteinů, které rozhodně nedosahují velikostí běžných buněčných organel, je tato metoda nedostatečná. Potřebujeme si proto cílovou skupinu proteinů nějak označit, zvýraznit, abychom je byli schopni s jistotou identifikovat. K tomuto účelu se začala používat fluorescenční „barviva“, které nejen že lze specificky navázat na konkrétní typ proteinu, ale také jsou mnohem lépe pozorovatelné pod mikroskopem, fluorescenčním mikroskopem (popis výše).

### 3.2 *IN-VIVO* POZOROVÁNÍ POHYBU PROTEINU MIND

Pro pozorování bakterií *E. coli* jsme použili inverzní fluorescenční mikroskop Olympus IX70 s obslužným programem Cell<sup>^</sup>R s možností volby vlnových délek filtrů jak pro excitaci, tak pro zachycení emise ze vzorků.

Pro náš případ pozorování GFP s excitačním peakem 475nm a emisním peakem 509nm jsme použili excitační světlo na vlnové délce 475nm a emisní cut-off (propouštějící světlo jen od/do určité vlnové délky) filtr pro 510nm a více.

### 3.3 KULTIVACE A PŘÍPRAVA BAKTERIÍ *E. COLI* PRO ÚČELY FLUORESCENCE

Mikroskopické vzorky jsme připravovali s cílem znehybnění bakterií, protože jsou bakterie bez vhodné imobilizace poměrně mobilní díky jejich bičíkům. Přípravou média vhodné konzistence právě takový požadavek na znehybnění splníme. K přípravě vzorku byla použita již publikovaná metoda [13]. Níže uvádím její stručný popis:

„Na očištěné laboratorní sklíčko se nalepí čtvercová komůrka, která se vyplní roztokem agarózy a kultivačního média, přikryje se druhým laboratorním sklíčkem a vloží do ledničky k ochlazení. Po ochlazení se z roztoku agarózy stane gel. V gelu vyřízneme postranní obdélníkové otvory, čímž se zajistí anaerobní podmínky pro bakterie. Na vytvořený „gelový ostrůvek“ se napipetuje asi 2,5 $\mu$ l živného roztoku s bakteriemi a přiklopí krycím sklíčkem. Díky takto připravenému vzorku jsou bakterie nehybné a připravené k časosběrné studii.“

### **3.3.1 MINIMALIZACE AUTOFLUORESCENCE**

Abychom dosáhli maximálního informačního zisku, je nutné nejen správného nastavení jednotlivých komponent mikroskopu přímo na sledovaný fluorofor, ale i zajištění podmínek kultivace bakterií s ohledem na minimalizaci autofluorescence, která je bohužel často součástí při pozorování biologických agens. Což se i potvrdilo při provedených pokusech s použitím standardního kultivačního média „LB“ (Lysogeny Broth medium od jeho tvůrce Giuseppe Bertani [4]) běžně používaného při kultivaci těchto bakterií.

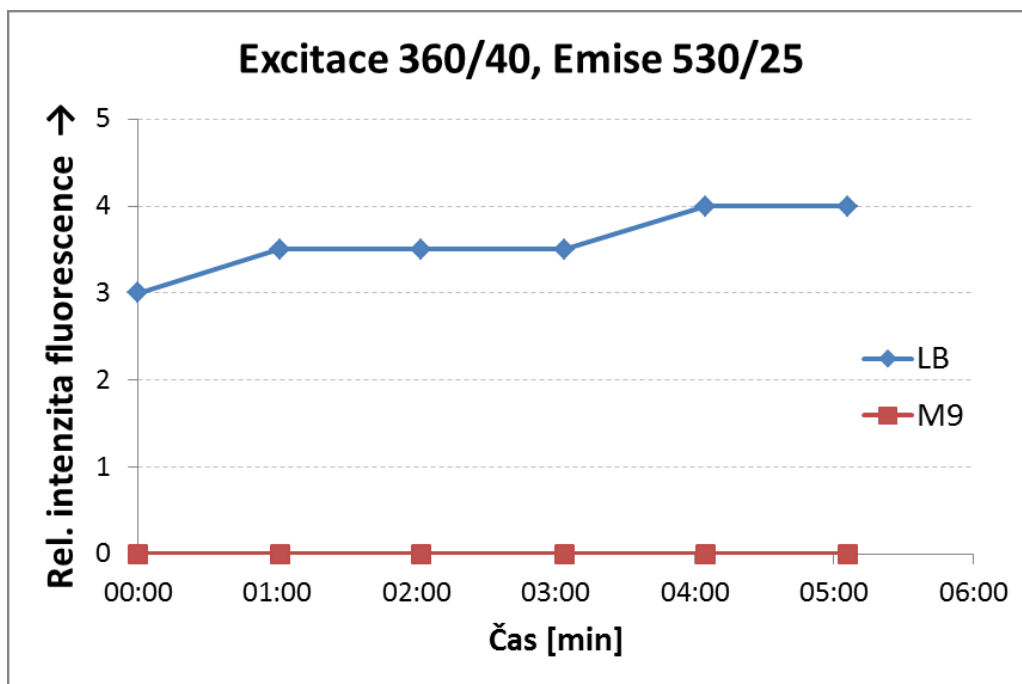
Abychom si přesněji specifikovali rozsah excitačních vlnových délek, na kterých je „LB“ médium vysoce autofluorescenční, využili jsme měřicí přístroj k podobným věcem určený - „CytoFluor® Series 4000“ (Fluorescence Multi-Well Plate Reader). Tento přístroj slouží k vyhodnocování biologických vzorků převážně v 96 jamkových destičkách pomocí buzení excitačním paprskem zvolené vlnové délky a detekcí emitujícího světla na určené vlnové délce.

K porovnání s „LB“ médiem jsme zvolili médium s označením „M9“ jako jeho náhradu, vyznačujícím se nezbytným minimem živin ke kultivaci *E. coli* a současně vykazující minimální autofluorescenci [14]. Jako kontrolu k oběma médiím jsme použili destilovanou vodu (hlavní komponenta zmíněných médií).

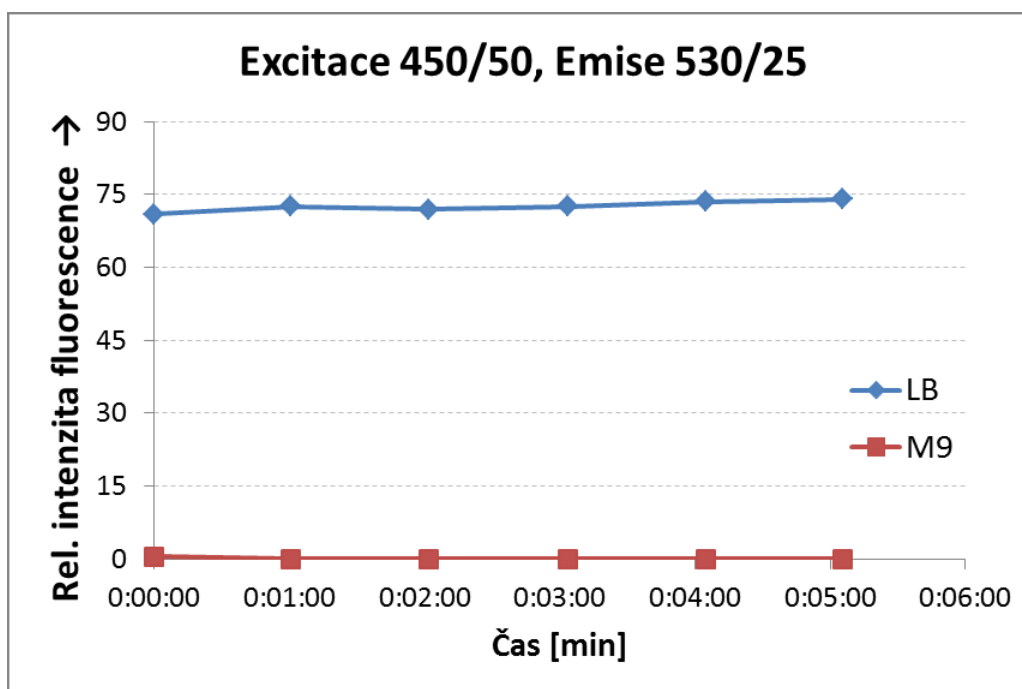
Vzhledem k možnostem přístroje a námi používaného spektra ke sledování GFP (excitace 475nm, emise 509) jsme vybrali 3 oblasti:

- 1) Excitace 360/40 vs Emise 530/25 (excitační maximum, tzv. peak/ šířka pásma),
- 2) Excitace 450/50 vs Emise 530/25,
- 3) Excitace 485/50 vs Emise 530/25.

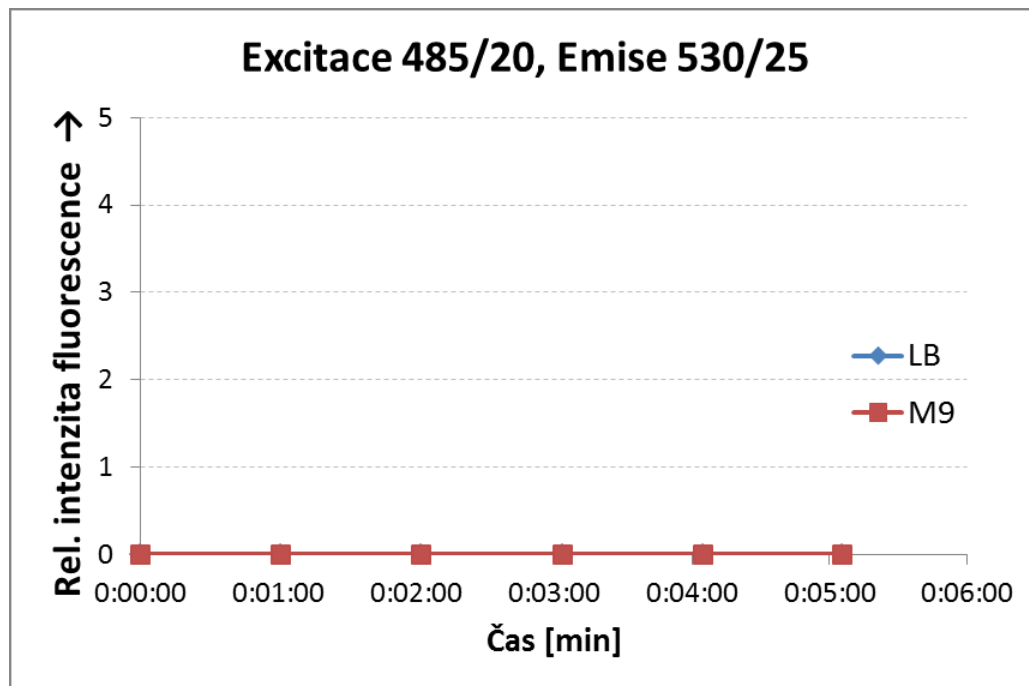
Optimální excitační vlnová délka byla určena na základě vyhodnocení následujících grafů (Obr. 13, 14, 15).



**Obr. 13**  
Porovnání autofluorescence LB a M9 kultivačního média.



**Obr. 14**  
Porovnání autofluorescence LB a M9 kultivačního média.



**Obr. 15**  
Porovnání autofluorescence LB a M9 kultivačního média.

Z uvedených grafů vyplynulo, že pro pozorování GFP je nevhodné používat excitační vlnovou délku blízkou 450nm (Obr. 14), protože bychom dosáhli vysokého rušení (autofluorescenčního šumu) při pozorování fluorescence komplexu GFP::MinD. Tudíž jsme byli nuceni buď si zvolit užší excitační pásmo nezasahující do oblasti 450nm nebo použít médium M9, které v žádném uvedeném rozsahu nevykazovalo rušivou autofluorescenci. Rozhodli jsme se pro kombinaci obou alternativ.

Jelikož M9 minimální médium je charakterizováno minimálním obsahem výživných látek pro bakterie a tedy bakteriím sice dostačuje, ale s obtížemi, byly bakterie na počátku kultivovány v médiu LB, bohatém na živiny, s následným přesunem bakterií na agarózu se základem z média M9. Tím byla zajištěna jak dostatečná podpora bakteriím ve fázi kultivace, tak i minimalizace autofluorescence u vzorků určených pro fluorescenční mikroskop.

Podrobný popis složení obou médií je uvedeno v oddílu „Přílohy“ na konci práce.

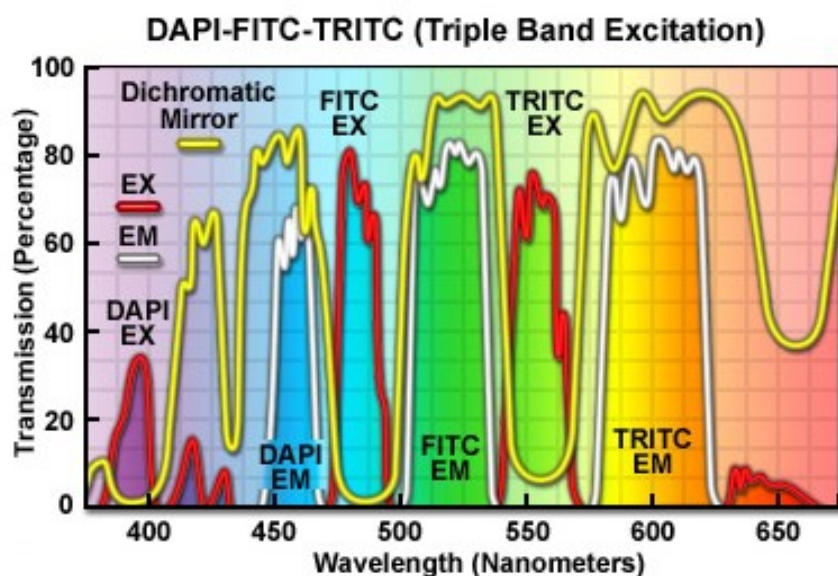
### **3.3.2 NASTAVENÍ PODMÍNEK POZOROVÁNÍ NA FLUORESCENČNÍM MIKROSKOPU**

Na pozorování biologických vzorků jsme měli k dispozici **mikroskop** Olympus IX70 v provedení Cell^R (Olympus Corporation, Japan), který je přímo specializovaný na časoběrné studie. Jedná se o invertovaný (objektiv je umístěn pod mikroskopický vzorek) epifluorescenční mikroskop (Obr. 11), používaný převážně ke sledování živých buněčných kultur v Petriho miskách (běžně užívané laboratorní misky).

Mikroskop obsahuje otočnou revolverovou hlavu se sadou excitačních/emisních **filtrů** (tzv. kostek), které se volí dle potřeby. Vzhledem k použitému barvivu GFP, jsme vybrali kostku vhodnou pro excitační vlnovou délku v okolí 485nm a emisní vlnovou délku v oblasti kolem 510nm. Tomu nejlépe vyhovovala kostka s označením **U-M3DAFITR**, tedy třípásmová kostka se zaměřením na barviva **DAPI-FITC-TRITC** (Obr. 16).

K objasnění značení barviv zde přikládám krátký rozbor:

- **DAPI** = **4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole** ( emise **modrá** )  
- fluorescenční řetězec s vysokou afinitou k DNA, hlavně se tedy používá k označení jader buněk, excitace: 380 - 400 nm, 415 - 430 nm, emise: 445 - 465 nm
- **FITC** = **Fluorescein IsoThioCyanate** ( emise **zelená** )  
- vyhovuje našemu pozorování GFP, excitace: 475 - 495 nm, emise: 500 - 535 nm
- **TRITC** = **TetramethylRhodamine IsoThioCyanate** ( emise **oranžová** )  
- další z řady barviv používaný ve fluorescenčních metodách, excitace: 545 - 570 nm, emise: 580 - 630 nm



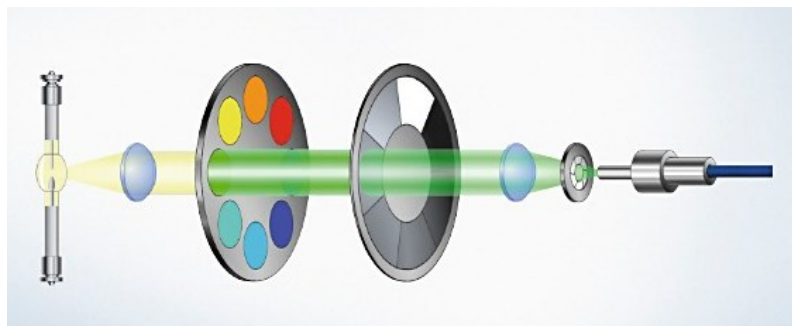
**Obr. 16**

Přehled podporovaných excitačních a emisních spekter vybrané kostky.  
( <http://www.microscopyu.com/> )

Použili jsme na excitaci FITC filtr 485/20nm (maximum/šířka pásma) a sledovali emisi v rozsahu 500-535nm.

Pro obsluhu je mikroskop vybaven programem **program „Cell^R”**, který v sobě má zabudované funkce pro přesné nadefinování parametrů časosběrné studie. Mezi hlavními parametry jsou délka a intenzita excitace, perioda snímání a celkový čas pozorování. Díky těmto funkcím a možnosti uložení nastavení pokusů, jsme schopni zachovat jak stejné podmínky časosběrného snímání, tak získat parametry potřebné k určení časově závislé funkce photobleachingu.

Jako **zdroj excitačního světla** byl použit systém Olympus MT20 (Olympus Corporation, Japan), vybavený 8-mi pozicemi pro excitační filtry (Obr. 17), rychlou korekcí intenzity (14 stupňů), závěrkou s rychlostí uzávěru/otevření 1ms a dva spolehlivé zdroje světla: 150W xenonovou výbojku a kombinovanou rtuťovou-xenonovou výbojku. Při osvětlení vzorku je aplikována zpětná vazba zajišťující minimální fluktuaci intenzity. Světlo je přenášeno optickým vláknem a kontrolováno real-time.



**Obr. 17**

Volba excitační vlnové délky v systému Olympus MT20. (<http://www.olympus-europa.com/>)

Snímky jsme pořizovali CCD **kamerou** s označením „ORCA-ER“ (Hamamatsu, Japan) mající vyšší citlivost v oblasti VIS-NIR (VISible light, Near InfraRed). Její efektivní rozlišení je 1344 x 1024 pixelů. Redukce šumu temného pozadí je zajištěna chlazením až na  $-20^{\circ}\text{C}$  Peltierovým článkem. A/D převodník je 12bitový.

### **3.4 SBĚR A ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT Z MĚŘENÍ**

Při dodržení všech výše popsaných postupů přípravy mikroskopických vzorků, nastavení snímání na mikroskopu a nadefinování ideálních parametrů pokusů, jsme získali soubor fotografií, které bylo nutno zanalyzovat ve smyslu intenzity fluorescence přítomných komplexů GFP::MinD.

K obrazové analýze byl použit software „**ImageJ**“ (National Institutes of Health, USA), který spadá do skupiny open source programů, založených na programovacím jazyce Java a je užitečným nástrojem nejen pro biologické vědy, ale i pro astronomii, lékařství a jiné odvětví využívající jako výstup analýzu obrazu.

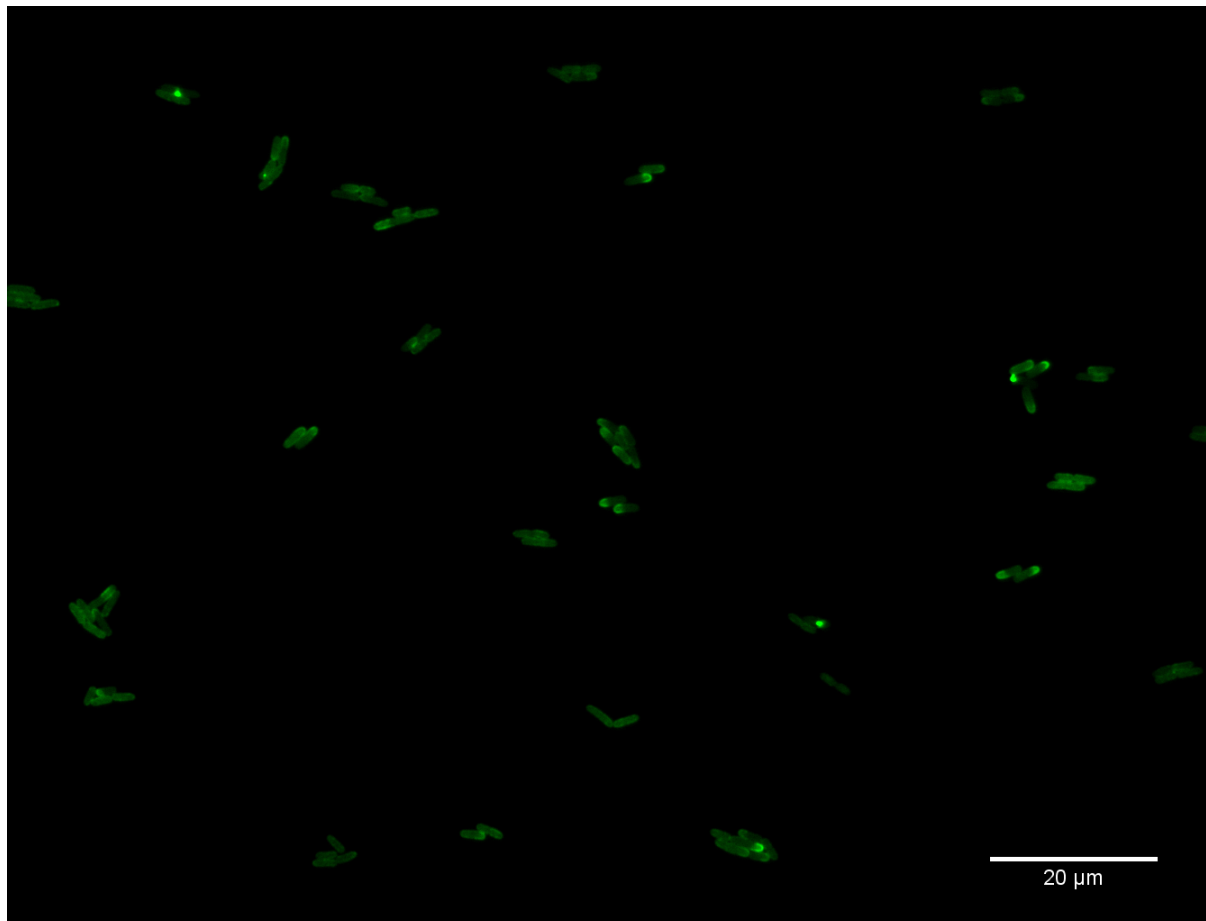
Hlavním z požadavků správné analýzy je nejen dostatečné zvětšení a tím i potřebné rozlišení v  $\text{pix}/\mu\text{m}$ , ale i zmiňovaná časová definice snímků a tím i spojitost s probíhajícím photobleachingem.

Snímky jsme pořizovali při celkovém zvětšení 600x. Ze zvoleného zvětšení a nastavení kamery bylo rozlišení na snímku určeno na hodnotu  $9,3\text{pix}/\mu\text{m}$  (snímky byly získávány s rozlišením  $1344 \times 1024\text{pix}$ , tj. 1,38MPixels, měřítko bylo vkládáno do obrazu). Snímky v dále popisovaném pokusu byly pořizovány v intervalech 1500ms s expozičním časem 800ms a nastavenou intenzitou světla 88,79.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 OPTIMALIZACE ZÍSKANÝCH DAT A JEJICH VYHODNOCENÍ

Uvedeným mikroskopem jsme pořídili sérii snímků sledovaných bakterií (Obr.18).

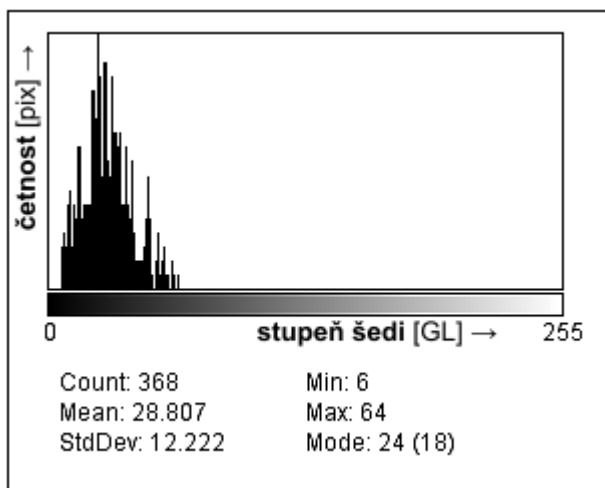


**Obr. 18**

Snímek bakterií *E. coli* získaný mikroskopem Olympus IX 70 při 600-ti násobném zvětšení.

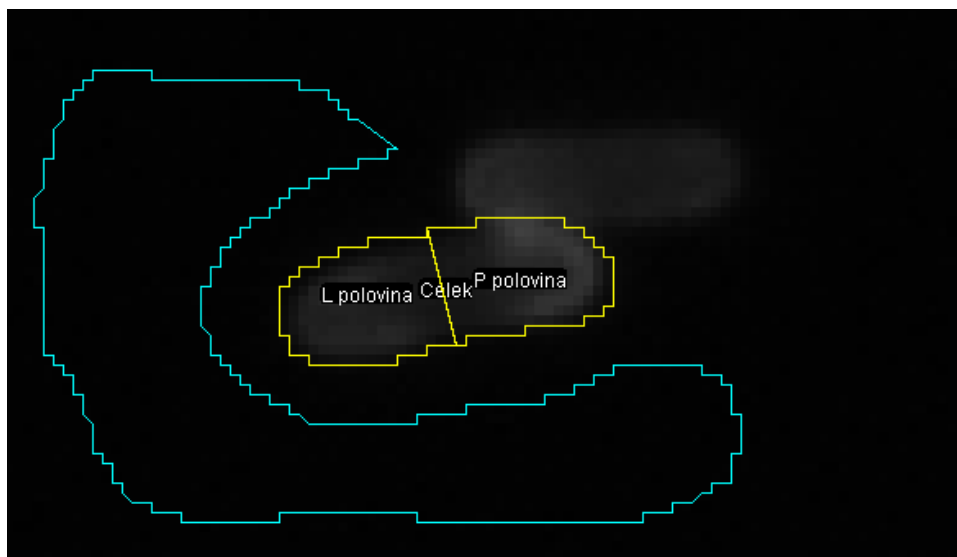
Fotky byly analyzovány ve stupních šedi s výstupem funkce intenzity, tzv. Integrated density. Tato veličina je daná součinem střední hodnoty stupně šedi (Mean Gray Value) a analyzované plochy v jednotkách GL.  $\mu\text{m}^2$  (GL = Gray Level).

Střední hodnota stupně šedi odpovídá průměrnému zastoupení stupně šedi vzhledem k četnosti výskytu (v pixelech) v analyzované oblasti obrazu. Na Obr. 19 je uveden příklad takového histogramu (histogram z oblasti „Celek“ z Obr. 20). Jak je zřejmé z grafu, rozlišovací schopnost je omezena hodnotou 256 různých odstínů šedi, kde hodnota 0 odpovídá černé a hodnota 255 bílé. V popisu pod histogramem je jeho rozbor v celkovém počtu pixelů (Count), střední hodnoty (Mean), minima a maxima GL v analyzované oblasti.



**Obr. 19**  
Histogram z analyzovaného sektoru obrazu.

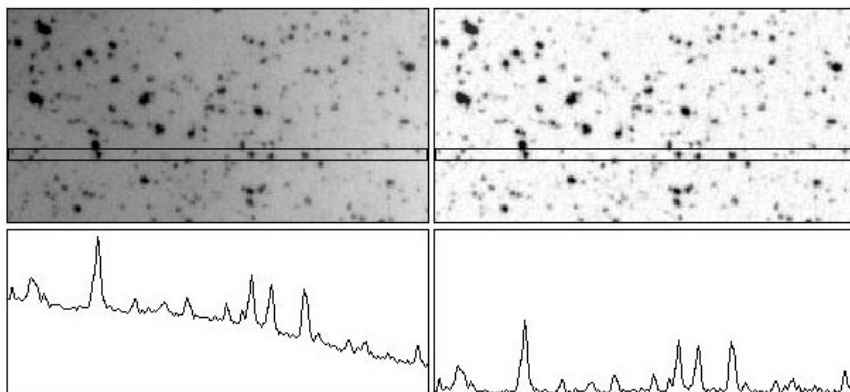
Na Obr. 20 je uvedeno označení oblastí bakterie určených k analýze. V programech podobných ImageJ se tyto oblasti značí výrazem ROI (Range Of Interest). Na obrázku je označena jak bakterie (žlutě), tak i oblast sloužící k definici pozadí, šumu (modře). Šum se bohužel vyskytuje u fotek tohoto typu vždy. Je funkcí jak nerovnoměrného osvětlení, tak i citlivostí kamery a existencí různých artefaktů v optické soustavě. Proto se musela při analýze vždy určit míra pozadí a od naměřených hodnot odečítat.



**Obr. 20**  
Výběr sektorů pro měření. Žlutě jsou označeny sektory bakterie, modře pozadí určené k odečtení.

V programu ImageJ se k odečtu pozadí (ke korekci na pozadí) běžně používá tzv. „rolling ball“ algoritmus, kdy se hodnota intenzity pozadí získává zprůměrováním intenzity v odpovídajícím kruhovém sektoru kolem každého zkoumaného pixelu. Poloměr sektoru se volí minimálně tak velký, jako je velikost největšího objektu na zkoumaném snímku. Výsledky tohoto algoritmu jsou zobrazeny na Obr. 21 .





**Obr. 21**

Znázornění funkce odečítání pozadí v ImageJ. Před procesem (vlevo), po korekci (vpravo).

<http://imagej.nih.gov/>

Měli jsme dvě možnosti jak provést extrakci pozadí. Buď použít algoritmus „rolling ball“ pro odečtení pozadí na obraz před analýzou, nebo provést nejprve obrazovou analýzu snímků se šumem a až poté od zjištěných hodnot odečíst změřené pozadí.

Před vlastní aplikací algoritmu si ověříme ještě účinnost na konkrétní snímky, které budou analyzované.



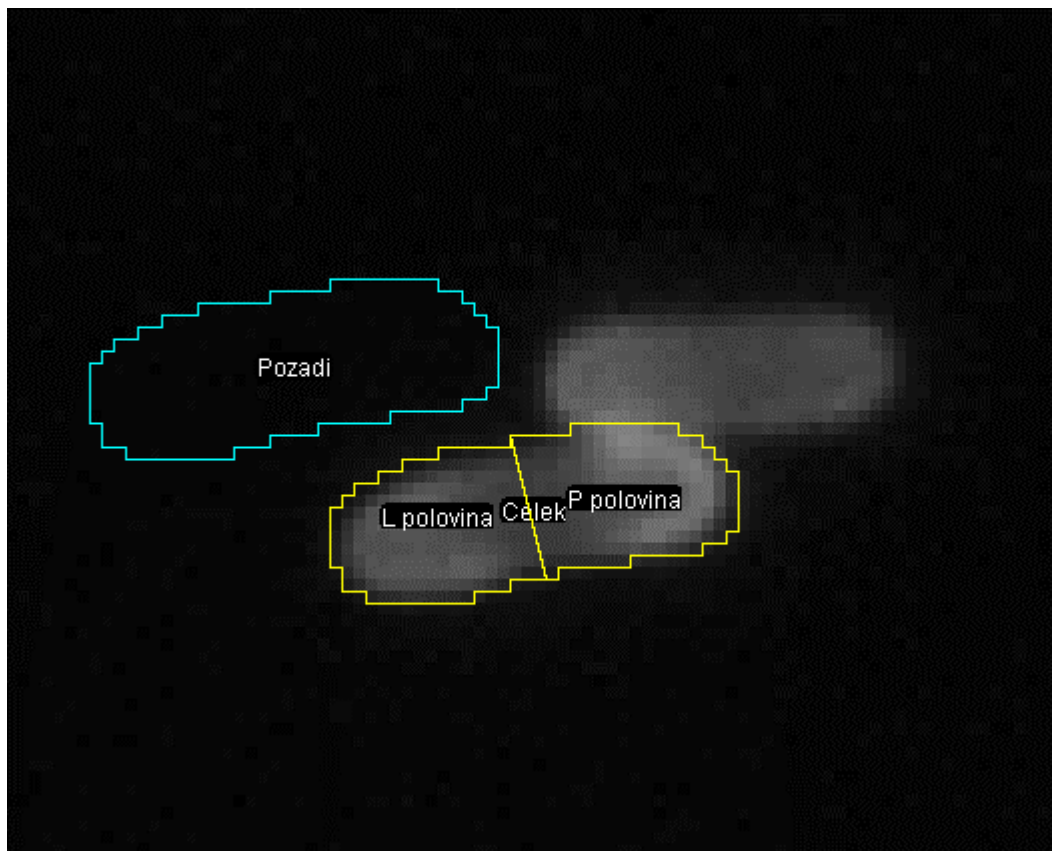
**Obr. 22**

Před (vlevo) a po aplikaci (vpravo) extrakce pozadí pomocí algoritmu „rolling ball“.

Při ověření funkčnosti algoritmu na přsvíceném snímku bakterie (Obr. 22 - vlevo), jsou patrné artefakty po aplikaci (Obr. 22 - vpravo). Nicméně artefakt v podobě přsvícení v blízkém okolí bakterie zmizel.

Proto volím kombinaci obou možností extrakce pozadí a to prvotní aplikace „rolling ball“ algoritmu, analýza a pak při výpočtu odečtení změřeného pozadí s tím, že velikost oblasti pozadí zvolím v blízkosti měřené bakterie a o velikosti oblasti bakterie. Volba velikosti a polohy oblasti pro výpočet intenzity pozadí je zapříčiněna větším množstvím artefaktů právě

v blízkosti bakterie a vzhledem k průměrování stupně šedi na plochu, bude přesnější vzít právě oblast shodné velikosti nebo podobné velikosti, jako je oblast bakterie (Obr. 23).

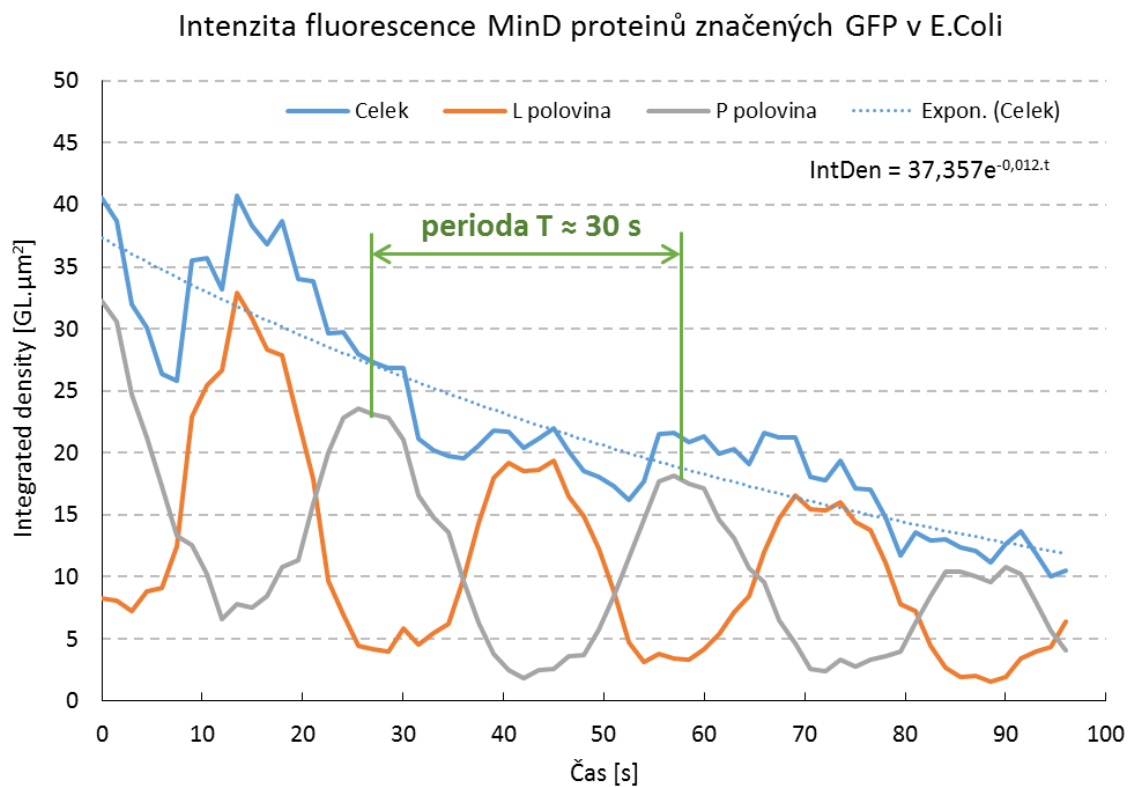


**Obr. 23**  
Specifikace vhodnějšího sektoru pozadí pro analýzu.

V pozadí výše uvedených pravidel bylo tedy dále zanalyzováno 65 snímků snímaných po 1,5s a pro náhled do zpracování jsou v následující tabulce (Tab. 3) uvedeny změřené a spočítané hodnoty pro prvních 15 sekund pozorování. Celý soubor hodnot je pak zdrojem k dalšímu kroku - grafickému zobrazení (Obr. 24) a posléze k ověření matematického modelu.

| Plocha [ $\mu\text{m}$ ] | 4,255          | 4,255 | 2,151      | 2,104      | Integrated Intenzity [ $\text{GL}\cdot\mu\text{m}^2$ ]<br>(odečteno pozadí) |            |            |
|--------------------------|----------------|-------|------------|------------|---|------------|------------|
|                          | Intenzita [GL] |       |            |            |   |            |            |
| Čas [s]                  | Pozadí         | Celek | L polovina | P polovina | Celek   | L polovina | P polovina |
| 0                        | 0,236          | 9,758 | 4,07       | 15,571     | 40,516  | 8,247      | 32,265     |
| 1,5                      | 0,332          | 9,416 | 4,081      | 14,868     | 38,652  | 8,064      | 30,584     |
| 3                        | 0,538          | 8,06  | 3,914      | 12,297     | 32,006  | 7,262      | 24,741     |
| 4,5                      | 0,399          | 7,478 | 4,511      | 10,511     | 30,121  | 8,845      | 21,276     |
| 6                        | 0,562          | 6,764 | 4,796      | 8,775      | 26,390  | 9,107      | 17,280     |
| 7,5                      | 0,679          | 6,753 | 6,489      | 7,022      | 25,845  | 12,497     | 13,346     |
| 9                        | 0,315          | 8,668 | 10,978     | 6,308      | 35,542  | 22,936     | 12,609     |
| 10,5                     | 0,163          | 8,557 | 12,005     | 5,033      | 35,716  | 25,472     | 10,246     |
| 12                       | 0,63           | 8,44  | 13,016     | 3,764      | 33,232  | 26,642     | 6,594      |
| 13,5                     | 0,274          | 9,859 | 15,591     | 4          | 40,784  | 32,947     | 7,840      |
| 15                       | 0,307          | 9,321 | 14,645     | 3,879      | 38,355  | 30,841     | 7,515      |
| ...                      | ...            | ...   | ...        | ...        | ...   | ...        | ...        |

Tab. 3 Příklad výsledných dat z programu ImageJ

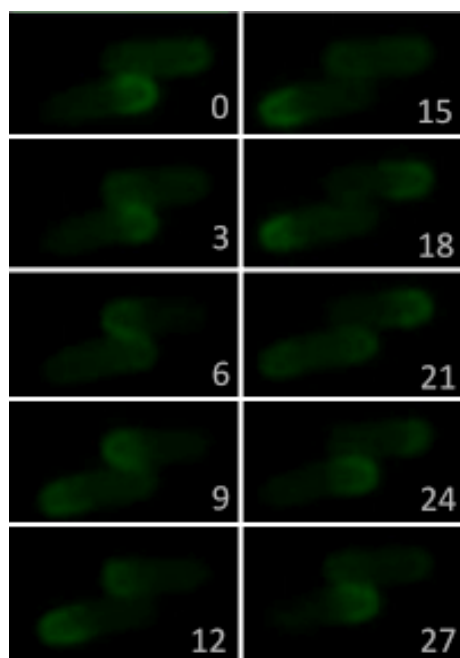


Obr. 24

Graf závislosti intenzity fluorescence GFP::MinD na čase získaný měřením.

## 4.2 MATEMATICKÝ MODEL POHYBU REPORTÉR PROTEINU V BAKTERII

Při navrhování matematického modelu množství a oscilací reportér proteinu MinD (komplexu GFP::MinD) v bakterii *E. coli*, je potřeba vyjít z dat získaných pozorováním (viz. předchozí kapitola) a teoretických znalostí získaných z literatury [5, 6].



**Obr. 25**

Zaznamenaná oscilace reportér proteinu MinD v bakterii *E. coli*

Množství reportér proteinu v čase na levé straně ( $p_L$ ) se periodicky mění z minima (pozorované nuly – žádná fluorescence) na maximum.

**Počáteční podmínky** v čase  $t=0 \rightarrow$  nulové množství proteinu na levé ( $p_L = 0$ ), **okrajové podmínky**  $\rightarrow$  výstupní rozsah se pohybuje v kladných číslech od nuly do celkového množství proteinu ( $p_0$ ). K těmto vstupním parametrům, požadavku periodicity a počátečním podmínkám, se jeví nejideálnější goniometrická funkce *cosinus*.

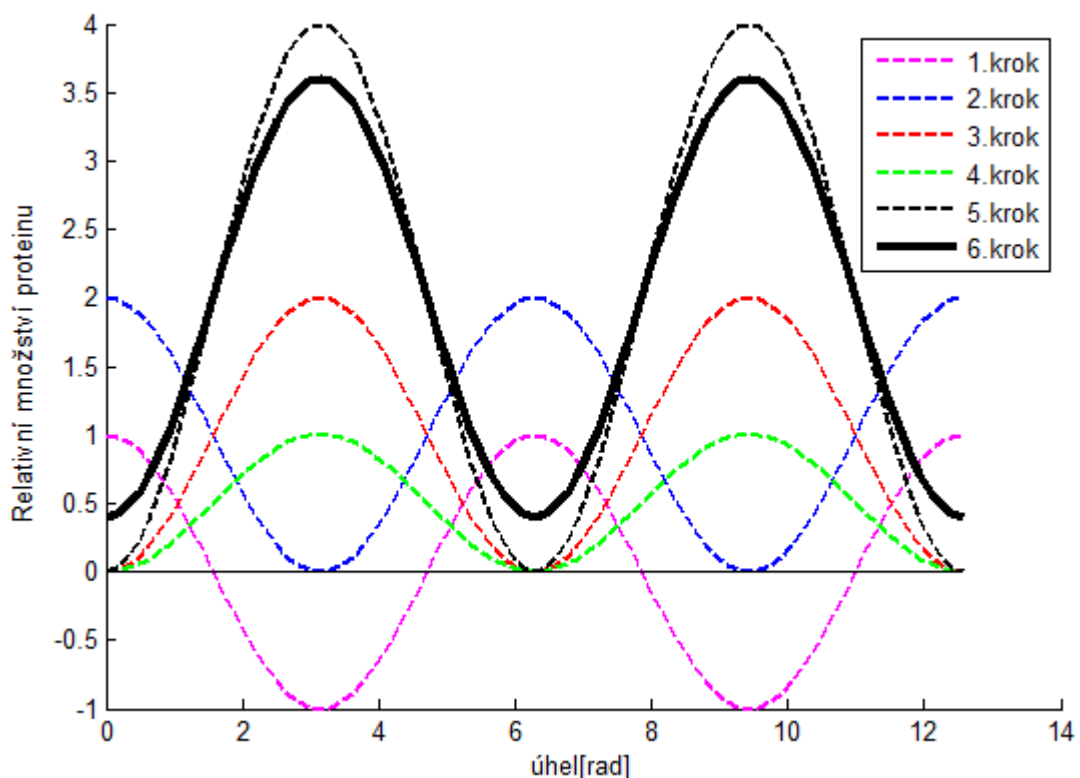
Funkci si postupně upravíme podle zadaných vstupních podmínek:

| Krok | Funkce                                     | Výstupní interval        |
|------|--|--------------------------|
| 1.   | $\cos(\omega t)$                           | $\langle 1, -1 \rangle$  |
| 2.   | $\cos(\omega t) + 1$                       | $\langle 2, 0 \rangle$   |
| 3.   | $-\cos(\omega t) + 1$                      | $\langle 0, 2 \rangle$   |
| 4.   | $\frac{1}{2} * [1 - \cos(\omega t)]$       | $\langle 0, 1 \rangle$   |
| 5.   | $\frac{1}{2} * [1 - \cos(\omega t)] * p_0$ | $\langle 0, p_0 \rangle$ |

Jelikož na pólech bakterie při fázi minima/maxima zůstává určité residuální množství reportér proteinu, nemusíme tuto skutečnost opomenout i o do navrhované funkce modelu.

| Krok | Funkce   | Výstupní interval        |
|------|--|--------------------------|
| 6.   | $1/10 \cdot p_0 + 8/10 \cdot \frac{1}{2} [1 - \cos(\omega t)] \cdot p_0$ | $\langle 0, p_0 \rangle$ |

Tímto 6. krokem zajistíme zachování odhadovaných 10% z celkového množství reporter proteinu jak na levém (část funkce „ $1/10 \cdot p_0$ “) tak na pravém pólu bakterie (k residuálnímu množství na levé straně bakterie periodicky nabývá funkce jen  $8/10 = 80\%$  z celkového množství proteinu). Jednotlivé kroky v návrhu funkce modelu jsou uvedeny na Obr. 26 včetně její reprezentace v soustavě souřadnic.



**Obr. 26**

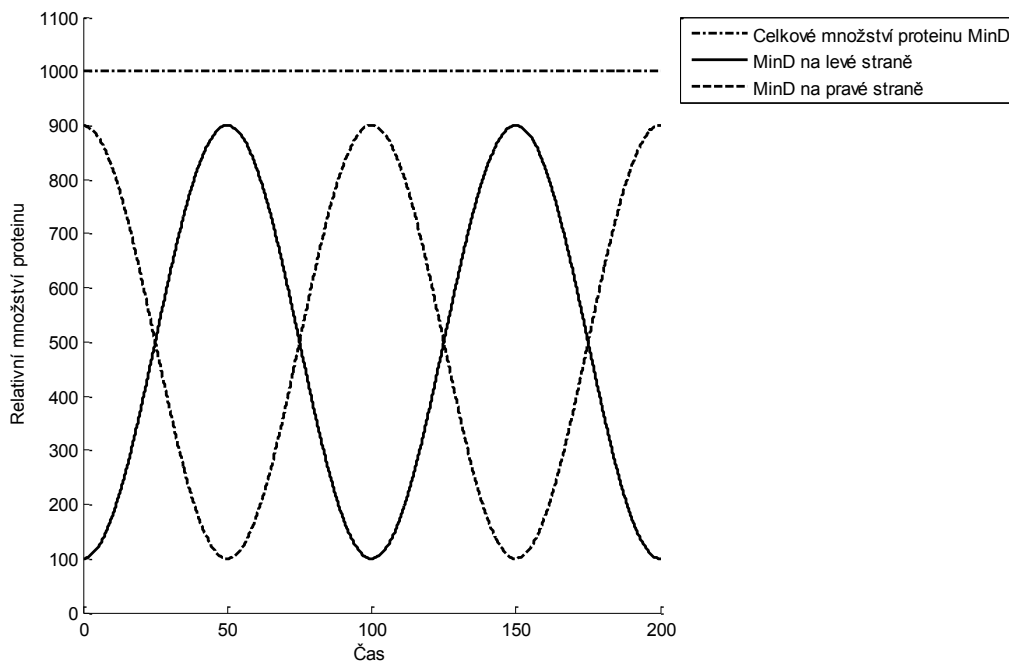
Postup získání modelu oscilace reportér proteinu MinD v bakterii *E. coli*

Finální model oscilace proteinu má tedy podobu:

$$p_L = \frac{1}{10} p_0 + \frac{8}{20} [1 - \cos(\omega t)] p_0, \quad (1)$$

kde  $p_L$  ... množství proteinu na levé straně,  
 $p_0$  ... celkové množství proteinu,  
 $t$  ... čas,  
 $\omega$  ... úhlová rychlost.

Na následujícím Obr. 27 je zobrazen průběh oscilace proteinu MinD podle modelu pro hodnoty  $p_0=1000$ ,  $T = 100$ .



**Obr. 27**  
Model oscilace celkového minD proteinu v bakterii *E. coli*

### 4.3 VZTAH MEZI MNOŽSTVÍM PROTEINU A FLUORESCENCÍ

Vytvoření modelu oscilace MinD byl jedním z předpokladů k navržení dalšího modelu – modelu photobleachingu, tj. časové degradace proteinu GFP (spojeného s MinD) působením absorbovaného excitačního světla (případně dalšími ovlivňujícími činiteli). Znát tento model je klíčové k určení množství proteinu MinD v pozorované bakterii, neboť je to právě fluorescence, která nám dává informaci o existenci sledovaného proteinu. A tím se dostáváme k problému neurčitosti při delším vystavení sledované bakterie excitačnímu světlu, kdy ztrácíme přehled o rozmístění sledovaného proteinu v buňce. Tuto informaci musíme respektovat a snažit se i přes získání modelu photobleachingu dobu excitace zmenšit na minimum a tím zabránit vysokému stupni neurčitosti. K tomu je zapotřebí plně optimalizovat metodiku pozorování.

Nyní přistupme k vytvoření modelu popisující jev photobleachingu.

Jako počáteční podmínku před vystavení bakterie excitačnímu světlu, budeme uvažovat, že množství proteinů MinD v bakterii je stejné jako množství aktivních GFP vázaných na MinD (nedegradovaných, schopných fluorescence). Při každém osvětlení se proteiny GFP, při zachování stejných podmínek, budou degradovat s rychlostí  $\gamma$  (proteinů GFP za jednotku času). Celkové množství ( $p_0$ ) proteinu MinD si tudíž můžeme rozdělit na skupinu proteinů s aktivním GFP ( $p_a$  - active) a s degradovaným GFP ( $p_b$  - broken).

Tedy můžeme psát:

$$p_0(t) = p_a(t) + p_b(t), \text{ kde } t \dots \text{čas.} \quad (2)$$

Jelikož se u photobleachingu nejedná o deterministickou úlohu, musíme do rovnice degradace vložit **stochastický člunek**. Ke stochastickému modelování tohoto druhu děje je nejvhodnější použít **Poissonovo rozdělení** [15]. Proto vztah vyjadřující photobleaching:

$$p_b(t) = \gamma * p_a(t), \quad (3)$$

kde  $\gamma$ ... koeficient degradace aktivních proteinů (získaný z měření),

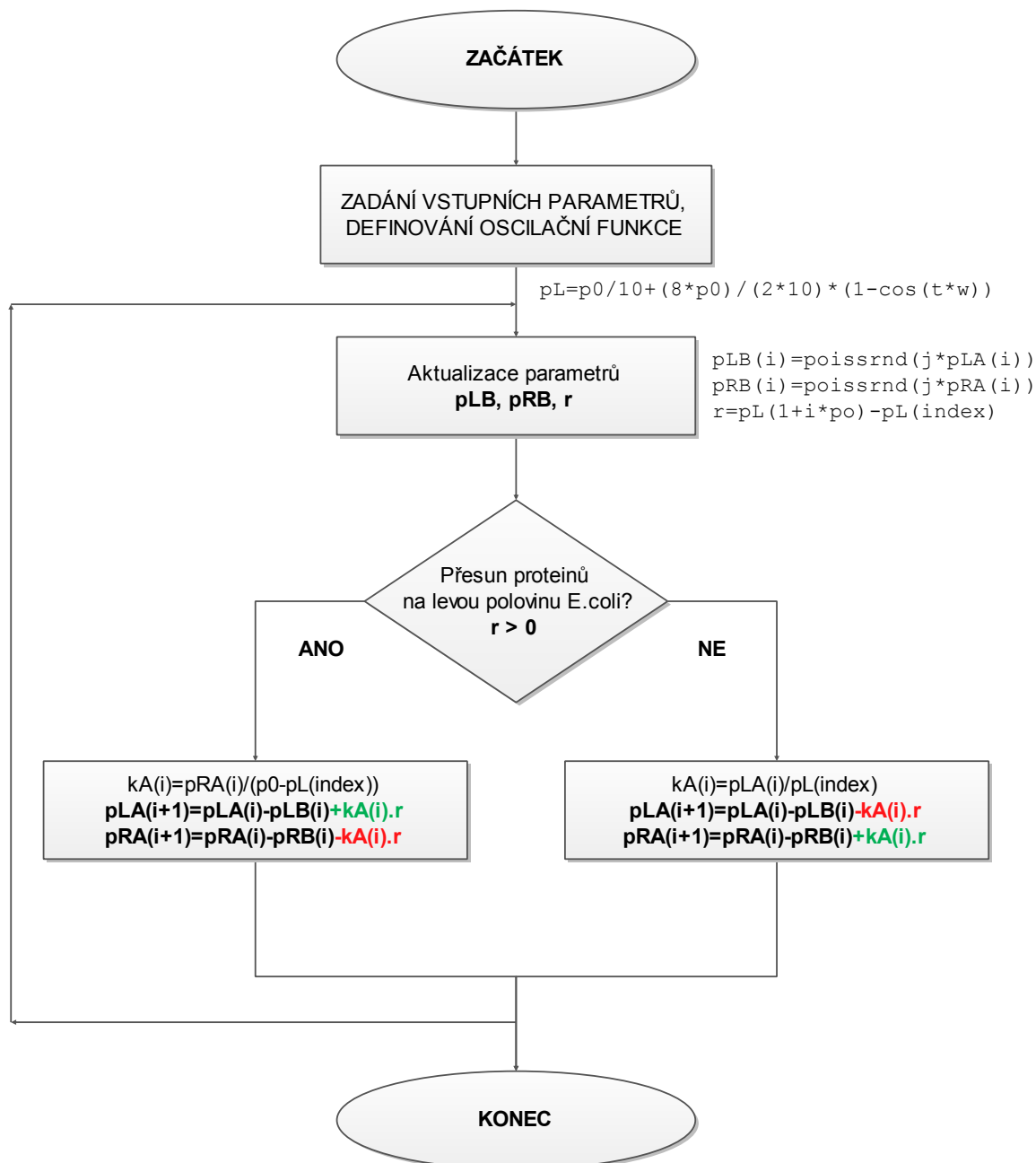
vložíme do funkce programu Matlab „poissrnd()“, realizující právě takové stochastické rozdělení:

$$p_b(t) = \text{poissrnd}(\gamma * p_a(t)). \quad (4)$$

Tím získáme vztah pro výpočet degradovaných GFP proteinů, kde rychlost degradace  $\gamma$  v sobě zahrnuje nejen **intenzitu excitačního světla**, ale i vliv **prostředí**, ve kterém je bakterie umístěna (kultivační médium, teplota aj.) [16].

Propojením doposud navržených modelů a vztahů související se sledovanými oscilacemi vytvoříme **algoritmus**, prostřednictvím kterého, pak můžeme vytvořit simulační program chování komplexu GFP::MinD v bakterii *E. coli*.

Celkový algoritmus pohybu proteinů a jejich degradaci je na následujícím diagramu (Obr.28):



**Obr. 28**

Algoritmus výpočtu aktuálního množství proteinů minD v bakterii *E. coli* .

*pL* ... počet minD proteinů na levé straně bakterie *E. coli* ,

*pLB* ... množství degradovaného komplexu GFP::*minD* na levé straně bakterie *E. coli* ,

*pRB* ... množství degradovaného komplexu GFP::*minD* na pravé straně bakterie *E. coli* ,

*r* ... rozdíl proteinů na levé straně v čase *i+1* vs čase *i* ,

*kA* ... poměrné rozložení aktivního komplexu GFP::*minD* vzhledem k celkovému počtu minD na pravé/levé straně, vzorec viz níže – výpis z programu v Matlabu

*pLA* ... množství aktivního komplexu GFP::*minD* na levé straně bakterie *E. coli* ,

*pRA* ... množství aktivního komplexu GFP::*minD* na pravé straně bakterie *E. coli* .



## VSTUPNÍ DATA DO MODELOVÁNÍ:

Z měření jsme získali

- periodu  $T = 30$  [s];
- celkové množství proteinu  $p_0 = 37.4$  [GL.  $\mu\text{m}^2$ ]; (z interpolace funkce)
- čas trvání simulace = 96 [s];
- perioda ozařováním emitačním světlem (acquire time) = 1,5[s];
- rychlost degradace = 0,018;

Odečtení rychlosti degradace z naměřených hodnot:

**1)** Z naměřených hodnot odečtením úbytku po periodě v maximech.

Musíme si uvědomit, jak je sestaven model degradace proteinu GFP. Následující hodnota aktivního proteinu GFP je dána jako **procentuální úbytek** současného aktivního proteinu.

Takže platí rekurentní vzorce:

$$p(t_0) = p(t_0);$$

$$p(t_1) = p(t_0) - j \cdot p(t_0);$$

$$p(t_1) = p(t_0)(1 - j);$$

$$p(t_2) = p(t_1)(1 - j) = p(t_0)(1 - j)^2;$$

...

$$p(t_n) = p(t_{(n-1)})(1 - j) = p(t_0)(1 - j)^n \rightarrow$$

$$j = 1 - e^{\frac{1}{n} \ln\left(\frac{p(t_n)}{p(t_0)}\right)}.$$

|       | Změřená IntDen<br>[GL. $\mu\text{m}^2$ ]<br>v periodách $T = 30$ s | rychlost<br>degradace za 1,5s<br>(acquire time) | Změřená IntDen<br>[GL. $\mu\text{m}^2$ ]<br>v periodách $T = 30$ s | rychlost<br>degradace za 1,5s<br>(acquire time) |
|-------|--|---|--|---|
| čas   | L polovina   | j   | P polovina   | j   |
| $t_0$ | 33   |   | 23,1   |   |
| $t_1$ | 19,4   | 0,0262  | 17,5   | 0,0137  |
| $t_2$ | 16,6   | 0,0077  | 10,8   | 0,0238  |

Odhad rychlosti degradace GFP z měření za 1,5s tedy bude **průměrem** z vypočítaných hodnot  $j$  uvedené v tabulce:

$$\overline{j_{1,5}} = 0,018$$

**2)** Z dosazení času periody ozařování 1,5s do interpolační exponenciální funkce celkového množství proteinu (viz. modrá tečkovaná funkce na Obr. 24):

$$IntDen = 37,357e^{-0,012 \cdot t};$$

$$IntDen = 37,357e^{-0,012 \cdot 1,5} = 36,69059;$$

$$j_{1,5} = 1 - \frac{IntDen}{37,357} \cong 0,018.$$

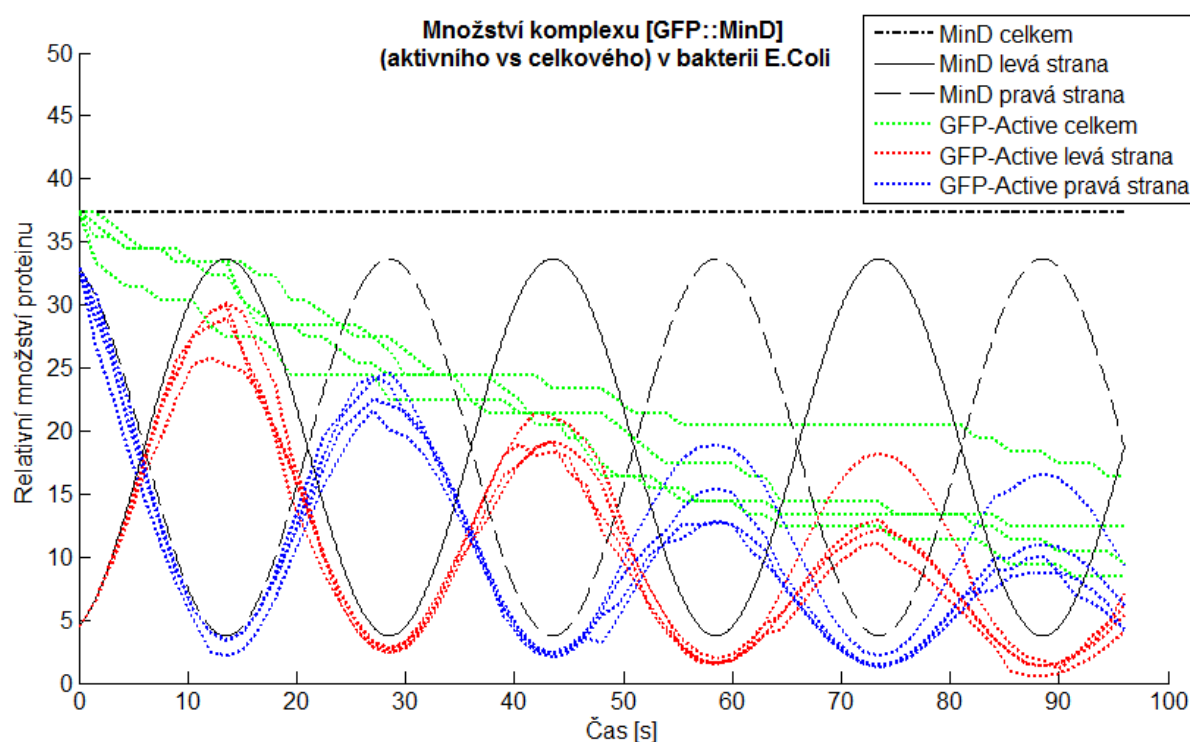
## REALIZACE ALGORITMU V PROGRAMOVÉM PROSTŘEDÍ MATLAB:

| #  | Příkazy  | Popis funkce příkazů  |
|--|--|---|
| <b>ZADÁNÍ VSTUPNÍCH PARAMETRŮ</b>  |  |   |
| 1  | <code>T=30;</code>                                     | naměřená perioda v sekundách  |
| 2  | <code>tD=1.5;</code>                                   | časový posun periody vůči začátku   |
| 3  | <code>p0=41;</code>                                    | celkové množství proteinu   |
| 4  | <code>tF=96;</code>                                    | délka trvání simulace   |
| 5  | <code>step=0.1;</code>                                 | krok vykreslení funkce oscilace proteinu  |
| 6  | <code>w=2*pi/T;</code>                                 | uhlová frekvence oscilací   |
| 7  | <code>FLperiod=1.5;</code>                             | perioda ozařování emitačním světlem -> photobleaching                               |
| 8  | <code>j=0.018;</code>                                  | rychlost degradace proteinu GFP   |
| <b>URČENÍ MNOŽSTVÍ PROTEINŮ PRO DANÝ ČASOVÝ INTERVAL</b>   |  |   |
| 10   | <code>t=0:step:tF;</code>                              | rozdělení času pro funkci oscilace  |
| 11   | <code>pL=p0/10+(8*p0)/(2*10)*(1-cos(w*(t+tD)));</code> | funkce určující oscilaci proteinu na levé straně                                    |
| <b>NADEFINOVÁNÍ PROMĚNNÝCH PRO REKURZIVNÍHO CYKLUS VÝPOČTU MNOŽSTVÍ PROTEINŮ S MODELEM PHOTOBLEACHINGU</b> |  |   |
| 12   | <code>t2=0:FLperiod:tF;</code>                         | rozdělení času pro funkci ozařování   |
| 13   | <code>po=FLperiod/step;</code>                         |   |
| 14   | <code>n=length(t2);</code>                             | počet nutných proměnných pro funkci ozařování                                       |
| 15   | <code>pLA=zeros(n,1);</code>                           | počet aktivních proteinu na levé straně <i>E. coli</i>                              |
| 16   | <code>pRA=zeros(n,1);</code>                           | počet aktivních proteinu na pravé straně <i>E. coli</i>                             |
| 17   | <code>pLB=zeros(n,1);</code>                           | počet broken proteinu na levé straně <i>E. coli</i>                                 |
| 18   | <code>pRB=zeros(n,1);</code>                           | počet broken proteinu na pravé straně <i>E. coli</i>                                |
| 19   | <code>pLA(1)=pL(1);</code>                             | podmínka na začátku pokusu viditelné (aktivní) GFP proteiny = všechny proteinu MinD |
| 20   | <code>pRA(1)=p0-pL(1);</code>                          |   |
| <b>APLIKACE MODELU PHOTOBLEACHINGU NA MODEL OSCILACE</b>   |  |   |
| 21   | <code>for i=1:n-1</code>                               |   |
| 22   | <code>pLB(i)=poissrnd(j*pLA(i));</code>                | funkce pro broken proteiny na levé straně   |
| 23   | <code>pRB(i)=poissrnd(j*pRA(i));</code>                | funkce pro broken proteiny na pravé straně  |

|  |  |  |
|--|--|--|
| 24                                     | <code>index=1+(i-1)*po;</code>   | propojení indexu označování s indexem vzorkování modelu oscilace                             |
| 25                                     | <code>r=pL(1+i*po)-pL(index);</code>   | rozdíl následujícího od současného množství minD proteinu na levé straně                     |
| 26                                     | <code>if r &gt; 0</code>   | podmínka určující, zda se proteiny přesouvají zleva doprava nebo naopak                      |
| 27                                     | <code>kA(i)=pRA(i)/(p0-pL(index));</code>  | poměrné množství aktivních proteinů na pravé straně vůči všem proteinům MinD na pravé straně |
| 28                                     | <code>else</code>  |  |
| 29                                     | <code>kA(i)=pLA(i)/pL(index);</code>   | poměrné množství aktivních proteinů na levé straně vůči všem proteinům MinD na levé straně   |
| 30                                     | <code>end</code>   |  |
| 31                                     | <code>pLA(i+1)=pLA(i)-pLB(i)+kA(i)*r;</code>   | počet aktivních proteinů na levé straně v case i+1   |
| 32                                     | <code>pRA(i+1)=pRA(i)-pRB(i)-kA(i)*r;</code>   | počet aktivních proteinů na pravé straně v case i+1  |
| 33                                     | <code>i=i+1;</code>  |  |
| 34                                     | <code>if (tF/step)&lt;(1+i*po)</code>  | ošetření před přetečením   |
| 35                                     | <code>i=n-1;</code>  |  |
| 36                                     | <code>end</code>   |  |
| 37                                     | <code>end</code>   |  |
| <b>VÝSTUP VYPOČTENÝCH DAT DO GRAFU</b> |  |  |
| 38                                     | <code>hold on;</code>  |  |
| 39                                     | <code>plot(t,pL+p0-pL,'- .k','LineWidth',2);</code>  | GRAF celkového množství proteinu   |
| 40                                     | <code>plot(t,pL,'-k','LineWidth',1);</code>  | GRAF celkového množství proteinu na levé straně  |
| 41                                     | <code>plot(t,p0-pL,'--k','LineWidth',1);</code>  | GRAF celkového množství proteinu na pravé straně   |
| 42                                     | <code>plot(t2,pLA+pRA,':g','LineWidth',2);</code>  | GRAF aktivního proteinu na pravé a levé straně   |
| 43                                     | <code>plot(t2,pLA,':r','LineWidth',2);</code>  | GRAF aktivního proteinu na levé straně   |
| 44                                     | <code>plot(t2,pRA,':b','LineWidth',2);</code>  | GRAF aktivního proteinu na pravé straně  |
| 45                                     | <code>set(gcf,'Color','white');</code>   |  |
| 46                                     | <code>title('Množství komplexu [GFP::MinD] (aktivního vs celkového) v bakterii E. coli');</code> |  |
| 47                                     | <code>xlabel('Čas [s]');</code>  |  |
| 48                                     | <code>ylabel('Relativní množství proteinu');</code>  |  |
| 49                                     | <code>AXIS([0 100 0 50]);</code>   |  |

|    |   |  |
|----|---|--|
| 50 | <code>legend('MinD celkem', 'MinD levá strana', 'MinD pravá strana', 'GFP-Active celkem', 'GFP-Active levá strana', 'GFP-Active pravá strana', 'Location', 'NorthEast');</code> |  |
| 51 | <code>clear;</code>   |  |

Po dosažení vhodných hodnot do programu vytvořeného dle algoritmu na obr. 28, dostaneme následující graf:



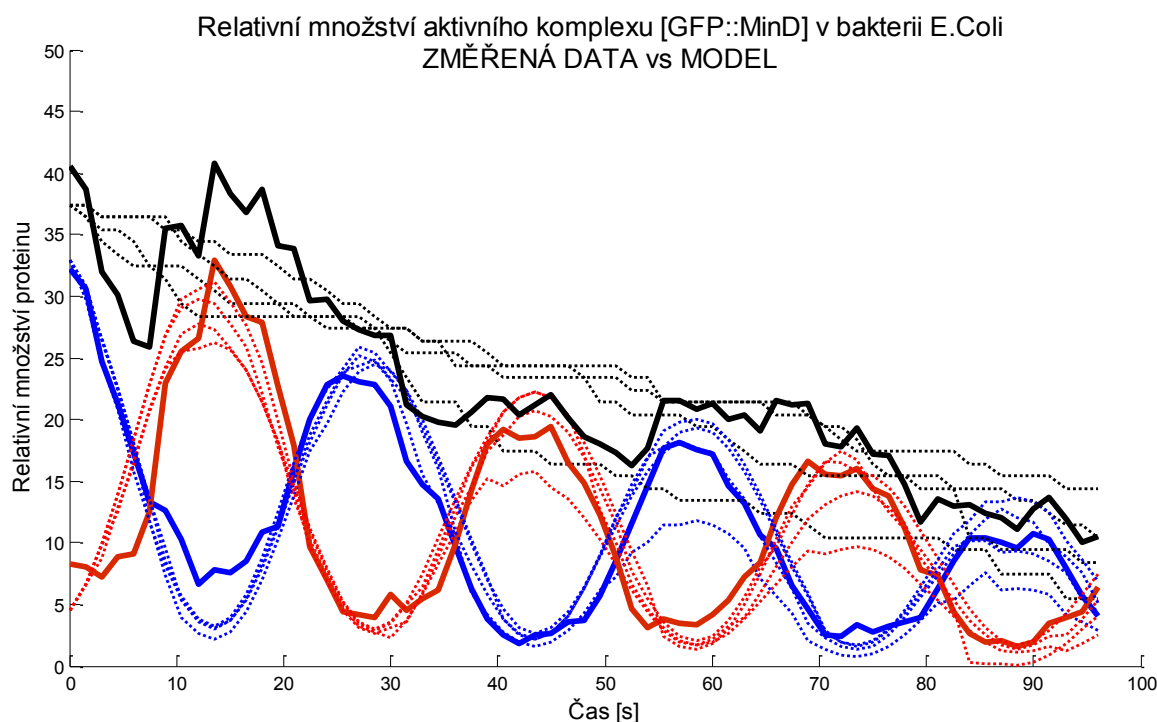
**Obr. 29**

Výstup modelu oscilace minD proteinu vs aktivního komplexu [GFP::minD] v bakterii *E. coli*.

Na Obr. 29 jsou zobrazeny 4 možné průběhy množství komplexu GFP::MinD celkového i aktivního v bakterii *E. coli* v závislosti na čase. Různé průběhy jsou zapříčiněny stochastickou složkou modelu při určování množství degradace proteinu GFP během ozáření emitačním světlem.

#### 4.4 POROVNÁNÍ NAMĚŘENÝCH HODNOT S MATEMATICKÝM MODELEM

Z následujícího Obr.30 je zřejmá podobnost naměřených dat s matematickým modelem procesu a tedy můžeme mluvit o úspěšném vytvoření modelu.



**Obr. 30**

Srovnání naměřených hodnot (plné čára) množství aktivního komplexu GFP::MinD v bakterii *E. coli* vs množství určeného z matematického modelu (tečkovaná čára).

## 5 ZÁVĚR

Tato práce nastínila, že matematické modely mohou do jisté míry zastoupit modelované děje a tím umožnit simulaci pokusů s cílem, zjistit pravděpodobné výsledky dříve než děje realizují. Mohou tak pomoci naznačit správný směr jakým má výzkum pokračovat a ušetřit tak čas i peníze na provádění slepých cest pokusů. Dříve než je takový model použitelný, musí projít mnohými validacemi pro různá nastavení.

Stejně tak i u výše vytvořeného matematického modelu, bude třeba další ověření na mnohých měřeních a až možná aplikace u složitějších pokusů, rozvíjející problematiku stanovení množství proteinů na základě množství aktivního reportér proteinu GFP.

## 6 LITERATURA

1. **Banks HT, Sutton KL, Thompson WC, Bocharov G, Doumic M, Schenkel T et al.** . A new model for the estimation of cell proliferation dynamics using CFSE data. *J Immunol Methods*. 373(1-2):143-160. 2011
2. **Haustein V, Schumacher U.** A dynamic model for tumour growth and metastasis formation. *J Clin Bioinforma*.2(1):11. 2012
3. **B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter,** *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky.* Espero Publishing. Ústí nad Labem 1998. ISBN 80-902906-0-4.
4. **Wikipedia.** Dostupný z WWW: < <http://en.wikipedia.org>>
5. **Elisabeth Fischer-Friedrich.** Pattern formation by the Min system of Escherichia coli. Dissertation Universität des Saarlandes. 2008
6. **Benjamin P. B. Downing, Andrew D. Rutenberg, Ahmed Touhami, Manfred Jericho.** Subcellular Min Oscillations as a Single-Cell Reporter of the Action of Polycations, Protamine, and Gentamicin on Escherichia coli. *PLoS One*. 2009; 4(9): e7285, Sep. 2009
7. **Jennifer R. Juarez and William Margolin.** Changes in the Min Oscillation Pattern before and after Cell Birth. *Journal of bacteriology*, p. 4134–4142, Aug. 2010
8. **David Halliday, Robert Resnick, Kenneth S. Krane.** *Physics, Extended Version, Volume 2 Extended, 4th Edition, Hardcover, 688 Pages, Published 1992 by Wiley, ISBN 0-471-54804-9*
9. **Hofr C.,** *Barevné principy absorpce a fluorescence. Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii, MU PŘF Brno, 2007.*
10. **Sehadová H.,** *Fluorescenční a konfokální mikroskopie. Biologické centrum AVČR, České Budějovice, 2011*
11. **Hořejší V., Bartůňková J.** *Základy imunologie. 4.vyd. Praha, TRITON, 2009*
12. **Jennifer C. Waters.** *Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. Harvard Medical School, Department of Cell Biology, Boston, MA 02115, June 29, 2009*
13. **de Jong, I. G., Beilharz, K., Kuipers, O. P., Veening, J. W.** Live Cell Imaging of Bacillus subtilis and Streptococcus pneumoniae using Automated Time-lapse Microscopy. *J. Vis. Exp.* (53), e3145, doi:10.3791/3145 (2011).

**14. Jonathan W. Young, James C. W. Locke, Alphan Altinok, et al.** Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy *Nature Protocols*, Vol. 7, No. 1. (15 December 2011), pp. 80-88,

**15. Gerald Peter Quinn, Michael J. Keough.** *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge University Press, ISBN 0 521 00976 6, 2003

**16. Thereza Christina Vessoni Penna, Marina Ishii, Luciana Cambricoli de Souza, Olivia Cholewa.** Expression of green fluorescent protein (GFPuv) in *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , under different growth conditions. *African Journal of Biotechnology* Vol.3(1) 2004: 105-111

## 7 PŘÍLOHY

protokoly pro přípravu kultivačních médií:

### **LB-Miller/Lennox (1000ml)** (Invitrogen, USA)

- 10g tryptone
- 5g yeast extract
- 10g (Miller) or 5g (Lennox) sodium chloride - NaCl
- sodium hydroxide - NaOH
- laboratory bottle

1. Add all the ingredients into 800ml of dH<sub>2</sub>O, mix it
2. Measure pH, which must be 7 (if it's below this level, add NaOH with a pipette)
3. Add dH<sub>2</sub>O to 1000ml
4. Put the cap on (half-close the bottle) and add the autoclave tape
5. Autoclave 121°C, 25min, no drying time
6. Store at room temperature

### **M9 Minimal Salts, 5X** (Sigma-Aldrich, USA)

- 33.9g/L      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O
- 15g/L        KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 5g/L         NH<sub>4</sub>Cl
- 2.5g/L       NaCl

Make a 5x concentrated stock solution by stirring to suspend 56.4g powder in 1L water. Autoclave for 15 minutes at 121°C to sterilize. Allow to cool before making additions, such as antibiotics (if desired).

Dilute the 5x M9 concentrated stock to a 1x working solution by adding 200mL 5x M9 stock to 800mL sterile water. If needed, allow to cool before making additions, such as antibiotics (if desired).