

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

# DIPLOMOVÁ PRÁCE



Šárka Gregorová

## **Ramanova mikrospektroskopie a mapování jednotlivých buněk**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2013

Chtěla bych především poděkovat doc. RNDr. Peteru Mojzešovi, CSc., za trpělivost, ochotu a všestrannou pomoc při měření, zpracování výsledků i psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce RNDr. Lucii Bednárové, CSc., za důkladnou korekturu textu a Mgr. Václavě Bauerové za kultivaci kvasinek, střídání při měření spekter a kontrolu kapitoly o kvasinkách. Také bych chtěla poděkovat Olze Hruškové-Heidingsfeldové, Ph.D., za zapůjčení literatury. V neposlední řadě děkuji své rodině a Pepovi za pomoc nejen při korekturách textu a za neutuchající podporu.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 11. 4. 2013

Šárka Gregorová

Název práce: Ramanova mikrospektroskopie a mapování jednotlivých buněk

Autor: Šárka Gregorová

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Ramanova mikrospektroskopie umožňuje měřit spektra Ramanova rozptylu s prostorovým rozlišením v řádu  $\mu\text{m}^3$  a studovat tak neinvazivním způsobem přirozené složení biologických objektů jako jsou tkáně, jednotlivé buňky a buněčné organely. V předkládané práci byly pomocí Ramanovy mikrospektroskopie studovány vakuoly oportunisticky patogenní kvasinky druhu *Candida albicans*. Byly naměřeny rozsáhlé série Ramanových spekter vakuol při různých způsobech kultivace buněk. K vyhodnocení souborů Ramanových spekter byla využita vícerozměrná statistická metoda rozkladu do singulárních hodnot (*singular value decomposition*). Spektrální analýza umožnila charakterizaci chemického složení vakuol. Bylo zjištěno, že vakuoly buněk kultivovaných různým způsobem či v různých kultivačních médiích se mezi sebou liší zejména obsahem polyfosfátu, reprezentovaného ve spektru úzkým pásem s maximem okolo  $1155\text{ cm}^{-1}$ . Až o několik  $\text{cm}^{-1}$  se může překvapivě lišit též poloha maxima tohoto pásu na vlnočtové škále. Na základě experimentů provedených *in vitro* s hexametafosfátem sodným coby modelem vakuolárního polyfosfátu bylo navrženo, že poloha maxima tohoto pásu je významně ovlivněna koncentrací dvojmocných kationtů.

Klíčová slova: Ramanova mikrospektroskopie, *Candida albicans*, kvasinková vakuola, chemické složení, polyfosfát

Title: Raman Microspectroscopy and Mapping of Single Cells

Author: Šárka Gregorová

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc., Institute of Physics of Charles University

Abstract: Raman microspectroscopy enables one to acquire spectra of Raman scattering with a spatial resolution in the order of a few  $\mu\text{m}^3$  and thus to study the natural composition of biological objects such as tissues, single cells and cellular organelles in a non-invasive way. In this work, we used Raman microspectroscopy to investigate vacuoles of the opportunistic human yeast pathogen *Candida albicans*. Large sets of Raman spectra of vacuoles were collected based on different cultivation protocols. The sets of the spectra were evaluated using the multivariate statistical method of singular value decomposition. Based on the spectral analysis, we characterized the chemical composition of the vacuoles. We found out that the vacuoles of cells cultured differently or in different media vary particularly in the concentration of polyphosphate, represented in the spectra by the peak near  $1155\text{ cm}^{-1}$ . Interestingly, the wavenumber position of the polyphosphate peak may also be shifted by several  $\text{cm}^{-1}$ . We studied these shifts *in vitro* with sodium hexametaphosphate as a model of vacuolar polyphosphate. Based on these experiments, we suggest that the peak position is significantly influenced by the concentration of divalent cations.

Keywords: Raman microspectroscopy, *Candida albicans*, yeast vacuole, chemical composition, polyphosphate

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretický úvod.....</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Candida albicans</i> .....	3
2.1.1	Kvasinky a kvasinkové mikroorganismy.....	3
2.1.2	Kvasinkové infekce.....	4
2.1.3	<i>Candida albicans</i> .....	7
2.1.4	Polymorfismus <i>C. albicans</i> .....	9
2.1.5	Kvasinková vakuola.....	12
2.2	Polyfosfát.....	15
2.3	Ramanova spektroskopie.....	18
2.3.1	Interakce optického záření s látkou.....	18
2.3.2	Ramanův rozptyl.....	22
2.3.3	Ramanova mikrospektroskopie.....	25
2.3.4	Výhody a nevýhody Ramanovy mikrospektroskopie.....	28
2.3.5	Ramanova mikrospektroskopie kvasinek.....	29
2.4	Faktorová analýza.....	34
2.4.1	Základní myšlenky a pojmy faktorové analýzy.....	34
2.4.2	Rozklad do singulárních hodnot ( <i>singular value decomposition</i> ).....	36
<b>3</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>39</b>
3.1	Použité spektrometry.....	39
3.1.1	Konfokální Ramanův mikrospektrometr.....	39
3.1.2	Ramanův spektrometr.....	40
3.2	Vzorky <i>C. albicans</i> .....	41
3.3	Použité chemikálie.....	43
3.4	Úprava naměřených spekter.....	43
3.5	Porovnání spekter měřených v různé dny.....	48
3.6	Soubory buněk.....	50
3.7	Statistická významnost odlišností ve spektrech.....	50
3.8	Určování polohy maxima pásu polyfosfátu.....	50
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>53</b>
4.1	Obsah vakuol buněk v různé fázi růstu kultury.....	53
4.2	Obsah vakuol buněk pěstovaných na různých médiích.....	62
4.2.1	Výsledky faktorové analýzy souboru 2.....	63
4.2.2	Výsledky faktorové analýzy souboru 3.....	72
4.3	Studium posuvu pásu polyfosfátu <i>in vitro</i> .....	83
4.3.1	Závislost polohy pásu HMP na pH.....	85
4.3.2	Závislost polohy pásu HMP na koncentraci.....	87
4.3.3	Závislost polohy pásu HMP a TMP na koncentraci Mg <sup>2+</sup> .....	89
4.3.4	Závislost polohy pásu HMP na koncentraci kationtů.....	91
4.3.5	Kinetika reakce HMP s dvojmocnými kationty.....	92
<b>5</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>95</b>
5.1	Identifikace pásů ve spektrech vakuol.....	95
5.1.1	Pás na 621 cm <sup>-1</sup> .....	95

5.1.2	Pásky v oblasti 640 až 770 $\text{cm}^{-1}$ .....	96
5.1.3	Pásky na 780 $\text{cm}^{-1}$ .....	97
5.1.4	Pásky v oblasti 800 až 975 $\text{cm}^{-1}$ .....	97
5.1.5	Pásky na 980 až 981 $\text{cm}^{-1}$ .....	98
5.1.6	Pásky na 1003 $\text{cm}^{-1}$ .....	98
5.1.7	Pásky v oblasti 1020 až 1180 $\text{cm}^{-1}$ .....	99
5.1.8	Pásky v oblasti 1200 až 1530 $\text{cm}^{-1}$ .....	100
5.1.9	Pásky v oblasti 1520 až 1740 $\text{cm}^{-1}$ .....	102
5.1.10	Pásky v oblasti 2800 až 3100 $\text{cm}^{-1}$ .....	103
5.2	Možné zdroje chyb v experimentech.....	104
5.3	Rozdíly v obsahu vakuol buněk .....	106
5.4	Experimenty s fosfátovými sloučeninami .....	108
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>112</b>
	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>113</b>
	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>122</b>
	<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>123</b>
	<b>Příloha .....</b>	<b>124</b>
	A. Pokrytí skel poly-L-lysinem.....	124
	B. Přiřazení pásků Ramanova spektra.....	125
	Tabulka B1: Pásky vibračních skupin atomů .....	127
	Tabulka B2: Vybrané pásky aminokyselin .....	128
	Tabulka B3: Vybrané pásky proteinů .....	129
	Tabulka B4: Vybrané pásky nukleových kyselin a nukleotidů .....	129
	Tabulka B5: Vybrané pásky lipidů a jejich složek .....	130
	Tabulka B6: Vybrané pásky sacharidů .....	130
	Tabulka B7: Vybrané pásky dalších biomolekul .....	131
	Tabulka B8: Pásky fosfátových sloučenin .....	131

# 1 Úvod

Ramanova mikrospektroskopie je spektroskopická metoda, umožňující díky kombinaci Ramanovy spektroskopie a konfokální mikroskopie měřit spektra Ramanova rozptylu ze zvoleného místa vzorku s prostorovým rozlišením v řádu  $\mu\text{m}^3$ . V posledních letech nachází uplatnění při studiu biologických objektů – tkání, jednotlivých buněk a buněčných organel. Buňky lze studovat *in vivo* ve vodném prostředí, naměřená spektra poskytují informaci o přirozeném chemickém složení buňky a o distribuci látek v rámci buňky i mezi jednotlivými buňkami.

Kvasinka *Candida albicans* je nejčastějším původcem kvasinkových onemocnění člověka (Kalvodová a Manych, 1996; Kim a Sudbery, 2011; Pfaller et al., 2012). Jakožto oportunistický patogen se přirozeně vyskytuje u velkého procenta zdravých jedinců na sliznicích a v gastrointestinálním traktu (Kim a Sudbery, 2011), aniž by způsobovala onemocnění. V případě oslabení hostitele však může dojít k rozvoji nemoci v rozsahu od relativně četných a málo nebezpečných povrchových mykóz až po život ohrožující systémovou kandidózu (Kalvodová a Manych, 1996).

Jednou z důležitých organel *C. albicans* je její vakuola, podílející se na zpracování potravy, uchování zásob, detoxifikaci buňky a adaptaci na některé stresové podmínky (Li a Kane, 2009). Vakuolární mutanty mají sníženou schopnost přežít za nepříznivých podmínek a jsou často méně virulentní než nemutované buňky (Palmer et al., 2003; Lee et al., 2009).

V této práci byly studovány vakuoly kvasinky *C. albicans* pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Práce navazuje na již publikované pilotní experimenty (Bednárová et al., 2012). V rámci této práce byly studovány vakuoly kvasinek v lag fázi růstu buněčné kultury a v pozdní exponenciální fázi, též byly studovány vakuoly kvasinek kultivovaných v bohatém médiu a vakuoly kvasinek kultivovaných v médiu chudém na zdroj dusíku. Bylo naměřeno velké množství spekter a tato spektra byla zpracována jednou z metod faktorové analýzy, metodou rozkladu do singularních hodnot (*singular value decomposition*). Naměřená spektra byla interpretována a obsah vakuol buněk rostlých za různých podmínek byl porovnán.



Interpretace Ramanových spekter biologických objektů je často nesnadná, neboť pásy pocházející od různých molekul se ve spektru překrývají a neexistuje univerzálně použitelný postup, který by dovoloval jejich jednoznačné přiřazení chemickým komponentám. Aby mohla být spektra interpretována, byly na základě údajů v literatuře sestaveny tabulky nejdůležitějších pásů biomolekul. Tyto tabulky, uvedené v příloze B této práce, lze obecně využít pro studium biologických objektů pomocí Ramanovy mikrospektroskopie.

Jednou z nejvýraznějších spektrálních črt vakuoly *C. albicans* je pás polyfosfátu, jehož maximum leží okolo  $1155\text{ cm}^{-1}$ . Tento pás vykazuje velkou variabilitu v intenzitě mezi jednotlivými buňkami. Překvapivě se u jednotlivých buněk liší též jeho poloha na vlnočtové škále, a to až o více než  $8\text{ cm}^{-1}$ . Na modelu hexametafosfátu sodného byl *in vitro* studován vliv nejrůznějších fyzikálních podmínek na polohu a intenzitu tohoto pásu.

Tato práce je rozčleněna do šesti kapitol. V kapitole Teoretický úvod (kapitola 2) je nejprve představena kvasinka *Candida albicans* spolu s nemocemi, které způsobuje a jsou popsány funkce její vakuoly. Následuje krátká podkapitola věnována polyfosfátu a jeho významu pro kvasinky a živé organismy obecně. Třetí podkapitola se věnuje teorii Ramanova rozptylu a Ramanově mikrospektroskopii, součástí je i přehled literatury zabývající se Ramanovou mikrospektroskopií kvasinek. Poslední podkapitola Teoretického úvodu se věnuje základům faktorové analýzy a metodě rozkladu do singulárních hodnot.

V kapitole Experimentální část jsou představeny použité spektrometry, kultivační podmínky *C. albicans*, použité chemikálie a je zde popsán postup úpravy spekter pomocí faktorové analýzy.

Kapitola Výsledky je rozdělena do tří podkapitol. První dvě se věnují Ramanově mikrospektroskopii kvasinek, třetí shrnuje výsledky experimentů *in vitro* s fosfátovými sloučeninami. V kapitole Diskuse jsou spektra vakuol kvasinek interpretována. Dále jsou zde porovnány studované vlivy na polohu pásu polyfosfátu. Poslední kapitolou je Závěr, který shrnuje nejdůležitější výsledky.

# 2 Teoretický úvod

## 2.1 *Candida albicans*

### 2.1.1 Kvasinky a kvasinkové mikroorganismy

Kvasinky jsou eukaryotní organismy, které se za obvyklých podmínek nebo alespoň v části svého životního cyklu vyskytují v jednobuněčné podobě. Kvasinky tvoří jednotnou taxonomickou skupinu, jsou součástí říše *Fungi* (houby) kmenů *Ascomycota* (vřeckovýtrusé houby) a *Basidiomycota* (stopkovýtrusé houby), lišících se různými způsoby pohlavního rozmnožování. U některých kvasinek nebylo pohlavní rozmnožování dosud pozorováno a nemohly tak být zařazeny do taxonomického systému, ty se pak označují jako *Deuteromycota* neboli anamorfní houby (Janderová a Bendová, 1999, str. 7). Kvasinky se vyznačují několika typickými znaky, kterými jsou

- převážně nepohlavní rozmnožování pučením,
- získávání energie kvašením (fermentací),
- jednobuněčnost.

Kvasinky jsou však kategorie umělá a všechny organismy označované jako kvasinky nevykazují všechny výše uvedené znaky. Některé druhy za jistých okolností vytvářejí vláknité kolonie – pseudomycelia a mycelia – a stávají se tak mnohobuněčnými organismy. Některé druhy kvasinek se za určitých podmínek mohou množit pohlavně. Buňky v myceliích a kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* se množí přehrádečným dělením. Některé druhy kvasinek nejsou schopné fermentace a energii získávají obligátně aerobním způsobem.

Již dlouho provázejí kvasinky lidstvo coby pomocníci v pekařství, pivovarnictví a při výrobě vína. Výroba piva je stará minimálně 5000 let (Boulton a Quain, 2008, str. 7), možná až 8000 let (Janderová a Bendová, 1999, str. 7) a ve starověké Mezopotámii bylo až 40% obilovin využito na výrobu piva (Boulton a Quain, 2008, str. 7). Poprvé byly kvasinky pozorovány coby malé kuličky v pivu Antoni van Leeuwenhoekem, který svoje pozorování zveřejnil roku 1680 (Janderová a Bendová, 1999, str. 7).

Nejznámější kvasinkou je bezpochyby *Saccharomyces cerevisiae*, pojmenovaná roku 1837 Theodorem Schwannem *Zuckerpilz*, tedy cukerná houba (Janderová a Bendová, 1999, str. 7). Kromě použití při výrobě piva, vína, etanolu a pekařského droždí slouží *S. cerevisiae* též jako významný eukaryotní modelový organismus.

V potravinářském průmyslu jsou využívány i další druhy kvasinek, například *Candida utilis*, *Candida kefyr* nebo *Kluyveromyces lactis*. Kromě člověku užitečných existují však i patogenní kvasinky, způsobující kvasinková onemocnění. Většinou se jedná o oportunisticky patogenní organismy, které se za běžných podmínek živí saprofytický a pouze v případě oslabení hostitelského organismu se stávají virulentními (Kalvodová a Manych, 1996). Klasicky jsou jako patogenní označovány kvasinky patnácti druhů ze čtyř rodů – *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon* (Janderová a Bendová 1999, str. 80), ovšem stále častěji se lze setkat s infekcemi běžně nepatogenními druhy kvasinek těchto rodů i příslušníků rodů *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Hansenula* či *Saccharomyces* (Miceli et al., 2011).

### **2.1.2 Kvasinkové infekce**

Infekční onemocnění vyvolané mikroskopickými houbami se označuje jako mykóza. Mykózy lze dělit na primární, postihující zdravé jedince, a sekundární, tedy doprovázející jiné onemocnění, mezi ty patří též tzv. nosokomiální mykózy, tedy mykózy získané v souvislosti s pobytem v nemocnici. Mykózy lze dále rozdělit na povrchové, postihující kůži a sliznice, a hluboké – orgánové a systémové (Kalvodová a Manych, 1996). Nejvýznamnějším původcem obou typů jsou kvasinky rodu *Candida*, a to zejména druhu *Candida albicans* (Kalvodová a Manych, 1996; Kim a Sudbery, 2011, Pfaller et al., 2012), následovaná druhy *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, a *C. krusei* (Pfaller et al., 2012). *C. albicans* se řadí mezi oportunní patogeny. Vyskytuje se u přibližně 30 – 45% zdravých dospělých v dutině ústní aniž by vyvolávala onemocnění (Akpan a Morgan, 2002) a dále ve sputu, stolici nebo moči (Janderová a Bendová, 1999) a v gastrointestinálním traktu (Kim a Sudbery, 2011) jako komensál žijící se saprofytický. *C. albicans* se dlouhodobě evolučně vyvíjela spolu s člověkem (Kalvodová a Manych, 1996; Odds, 2010) a je dobře přizpůsobena komensálnímu způsobu života. Za jistých podmínek, daných stavem hostitele, vnějšími okolnostmi jako je například pH a kmenem

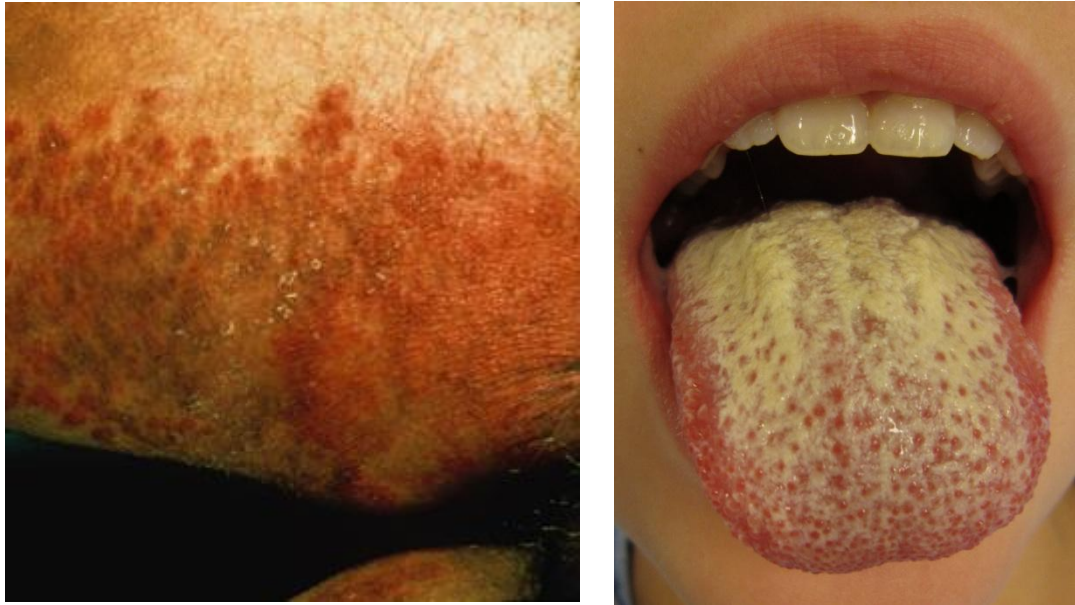
kvasinky, však může dojít k nárůstu virulence nebo poklesu odolnosti hostitele a vzniku infekce – kandidózy.

Vlastnosti významné pro virulenci *C. albicans* jsou zejména schopnost adherence k různým povrchům (kůže, endotel cév, ale i nemocniční a zdravotnické zařízení jako jsou zubní protézy, kanyly, katetry apod.), schopnost tvorby biofilmu a produkce proteáz, fosfolipáz a lipáz, usnadňujících penetraci do tkáně (Kalvodová a Manych, 1996; Janderová a Bendová, 1999; Schaller et al., 2005). Virulence se liší u jednotlivých kmenů *C. albicans* (Kalvodová a Manych, 1996).

Onemocnění kandidózou lze rozdělit podle závažnosti do tří stupňů na superficiální kandidózu, mukokutánní kandidózu a orgánovou až systémovou kandidózu (Kalvodová a Manych, 1996). Nejlehčí formou onemocnění je tzv. superficiální kandidóza, tedy povrchové postižení zejména kůže, nehtů a sliznic, viz obrázek 1. Nejčastěji jsou postiženy sliznice ústní dutiny (tzv. soor neboli moučnivka, vyskytující se hlavně u oslabených dětí a nemocných AIDS) a sliznice pohlavních orgánů (Kalvodová a Manych, 1996). Povrchová kandidóza je hojně rozšířená a mohou jí onemocnět i jinak zcela zdraví jedinci v případě napadení vysoce virulentním kmenem *C. albicans* (Kalvodová a Manych, 1996).

Příkladem velmi časté povrchové infekce je genitální kandidóza, již v průběhu svého života onemocní až 75% žen. Rizikovými faktory jsou hormonální léčba, léčba antibiotiky, diabetes a používání hormonální antikoncepce (Kim a Sudbery, 2011). Kandidózou ústní dutiny onemocní až 65% osob používajících horní zubní protézu (Akpan a Morgan, 2002). Kandidóza ústní dutiny se také vyvine u 80 – 90% nemocných AIDS někdy v průběhu onemocnění (Fidel et al., 1999). Dalším příkladem infekce, řazené mezi povrchové, je kandidurie, kvasinková infekce močových cest. Ta se vyskytuje zejména jako nosokomiální infekce a u diabetiků (Lundstrom a Sobel, 2001).

Druhým stupněm závažnosti kvasinkové infekce je tzv. mukokutánní kandidóza, již trpí pacienti s oslabeným systémem T-lymfocytů. Postiženy jsou nejen rozsáhlé části kůže a sliznic, ale kvasinky prorůstají též hlouběji do tkáně (Kalvodová a Manych, 1996).



**Obrázek 1:** Povrchová kandidóza pokožky (vlevo) a jazyka (vpravo). Zdroj obrázku: (Candidiasis, 2001. In: Wikipedia: the free encyclopedia)

Nejtěžší formou kvasinkové infekce je orgánová a systémová (též diseminovaná) kandidóza. Kvasinky se dostávají prorůstáním tkání nebo krví do důležitých orgánů, jako jsou plíce, ledviny, srdce apod. (Kalvodová a Manych, 1996; Kim a Sudbery, 2011). Úmrtnost orgánové kandidózy je vysoká – mezi třiceti a padesáti procenty (Kim a Sudbery, 2011). Nejvýznamnějším rizikovým faktorem orgánové infekce je snížená obranyschopnost. Ta může vzniknout vlivem jiné infekce, v takovém případě vzniká kandidóza jako sekundární onemocnění. Ke snížení obranyschopnosti dochází též například po chirurgickém zákroku a podávání širokospektrálních antibiotik. Dalšími rizikovými faktory jsou závažná onemocnění jako rakovina, AIDS, diabetes, dále například dětský nebo naopak vysoký věk pacienta, těhotenství a vrozené poruchy imunity (Janderová a Bendová, 1999; Kalvodová a Manych, 1996). Orgánová kandidóza je nejvýznamnější příčinou úmrtí předčasně narozených dětí a i v případě přežití takového dítěte může vážně poškodit vývoj jeho nervové soustavy (Tripathi et al., 2012).

Nedostatečné dodržování hygienických standardů v nemocnicích zvyšuje riziko vzniku kvasinkového onemocnění a přenosu nákazy mezi pacienty. Kandidy mohou růst například na katetrech, implantátech, v infúzních roztocích a jejich virulence je zvyšována pasáží jednotlivých kmenů mezi oslabenými pacienty v nemocnici (Kalvodová a Manych, 1996). Kandidémie, tedy přítomnost kandid v krvi, je čtvrtou nejčastější nosokomiální infekcí v USA (Falagas et al., 2010) a třetí

nejčastější nosokomiální infekcí na jednotkách intenzivní péče v USA (Pfaller et al., 2012). Výskyt kandidémie a orgánové kandidózy celosvětově stále roste, nejvíce pacientů je napadeno druhem *C. albicans*, ale stále častější je i přítomnost dalších druhů kandid (Pfaller et al., 2012). Při arteficiálním zavlečení do organismu zdravotnickými pomůckami se infekčně projevují i jinak nepatogenní druhy kandid (Kalvodová a Manych, 1996).

Imunitní odpověď na kandidózu je buněčného typu, zprostředkovaná T lymfocyty (Kalvodová a Manych, 1996). Léčbu mykóz ztěžuje fakt, že patogenní organismy jsou na rozdíl od obvyklejších bakteriálních infekcí eukaryotní, nelze tedy použít obvyklá antibiotika. Mezi používaná léčiva patří amfotericin B, nystatin, flucytosin, azolové deriváty jako flukonazol nebo ketokonazol a echinocandiny (Odds et al., 2003).

### 2.1.3 *Candida albicans*

*Candida albicans* je 3 až 10 µm velká oválná kvasinka z kmene *Ascomycota* (vřeckovýtrusé houby), příbuzná známé kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Její taxonomické zařazení podle *Taxonomy Browseru* amerického Národního centra pro biotechnologické informace (*National Center for Biotechnology Information*) (*Candida albicans*, 2009) je uvedeno v tabulce 1. *Candida albicans* je diploidní heterozygotní organismus s osmi chromosomy, který ztratil schopnost meiotického dělení, přestože párovací (*mating*) mechanismus je zachován a může tedy dojít ke vzniku tetraploidních organismů (Kim a Sudbery, 2011; Odds, 2010). *C. albicans* je i přes ztrátu schopnosti meiotického dělení geneticky vysoce variabilní, dochází ke ztrátám chromozomů v tetraploidech i diploidech, k duplikaci chromozomů, rekombinaci a translokaci, duplikaci i ztrátě genů. Tato genetická variabilita přispívá ke schopnosti kandidy přizpůsobit se různorodým prostředím, ve kterých žije (Odds, 2010). Zvláštností genetického kódu *C. albicans* je kodon CUG, který kóduje serin místo leucinu (Kim a Sudbery, 2011).

Některé kmeny *C. albicans* jsou schopné reversibilního, epigeneticky dědičného přepínání mezi dvěma nebo několika fenotypy (*phenotypic switching*), z nichž nejznámější je přepínání mezi *white* a *opaque* formou.

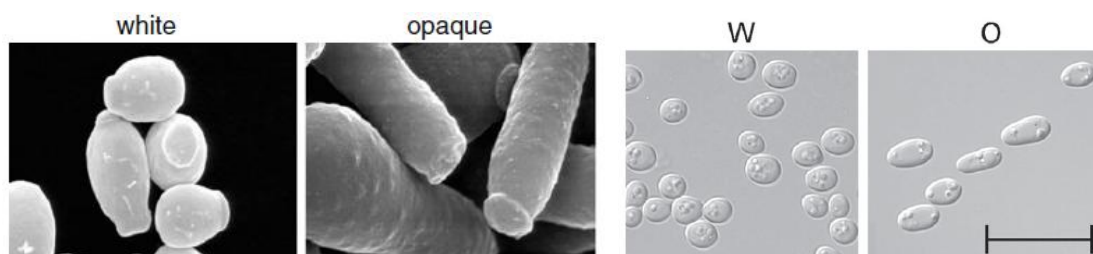
*White* kvasinky jsou kulaté až oválné a tvoří bílé vypouklé kolonie, *opaque* kvasinky jsou protáhlejší a tvoří šedavé ploché kolonie, viz obrázek 2. *White* a *opaque* kvasinky se liší expresí genů, schopností metabolizovat různé látky

i virulencí. *Opaque* forma je na rozdíl od *white* formy schopná párování, je však náchylnější vůči oxidativnímu stresu a nemůže metabolizovat některé cukry. Mnohé fyziologické podmínky, které u *white* formy vyvolávají přechod k vláknité morfologii, nemají v tomto smyslu na *opaque* kvasinky vliv, přestože jsou tyto schopny mycelium tvořit. Zdá se, že *white* kvasinky jsou virulentnější, ovšem *opaque* kvasinky například lépe kolonizují kůži (Morschhäuser, 2010).

Ke spontánní změně fenotypu *white/opaque* dochází přibližně jednou za  $10^3$  až  $10^4$  generací, ovšem různé faktory, jako je UV záření, teplota či přítomnost oxidantů, mohou tuto frekvenci zvyšovat (Morschhäuser, 2010). Fenotypové přepínání zřejmě pomáhá adaptaci na rozdílné podmínky, v nichž kandidy žijí. Bazální hladina přepínání zajišťuje, že v kolonii jsou kromě převládajících buněk též buňky opačného fenotypu, které mohou být při náhlé změně okolních podmínek lépe adaptované a zajistit tak přežití celé kolonie (Morschhäuser, 2010).

Doména	<b>Eukaryota</b>
Říše	<b>Fungi</b>
Podříše	<b>Dikarya</b>
Kmen	<b>Ascomycota</b>
Podkmen	<u>Saccharomycotina</u>
Třída	<u>Saccharomycetes</u>
Řád	<u>Saccharomycetales</u>
Rod	<b><i>Candida</i></b>
Druh	<b><i>C. albicans</i></b>

**Tabulka 1:** Taxonomické zařazení kvasinky *C. albicans*



**Obrázek 2:** White a opaque (*W* a *O*) buňky. Skenovací elektronová mikrografie (vlevo) a mikrofotografie (vpravo, měřítko = 20 µm) Zdroj obrázků: vlevo (Morschhäuser, 2010), vpravo (Huang et al., 2006)

### 2.1.4 Polymorfismus *C. albicans*

*C. albicans* se kromě kvasinkové formy vyskytuje ve dvou odlišných filamentárních morfologiích – pseudohyfální a hyfální, viz obrázek 3. Mnohobuněčné útvary, které takto vznikají, se nazývají pseudomycelia resp. mycelia. Jednotlivé morfologické formy vykazují odlišnosti v průběhu buněčného cyklu (obrázek 4).

Buněčný cyklus kvasinkové formy *C. albicans* odpovídá obvyklému buněčnému cyklu kvasinek (obrázek 4A). Startovním okamžikem je přechod mezi G<sub>1</sub> fází a S fází. Dochází k duplikaci polárního tělíska, vzniká pupen, replikuje se DNA, jádro je pomocí polárních tělísek nasměrováno do úžiny mezi mateřskou buňkou a pupenem, dochází ke karyokinezi a následně k tvorbě septa a cytokinezi. Dceřiná buňka se odděluje od mateřské, aniž by dosáhla její velikosti a její následující buněčný cyklus je oproti mateřské buňce opožděný. Pučení je asymetrické.

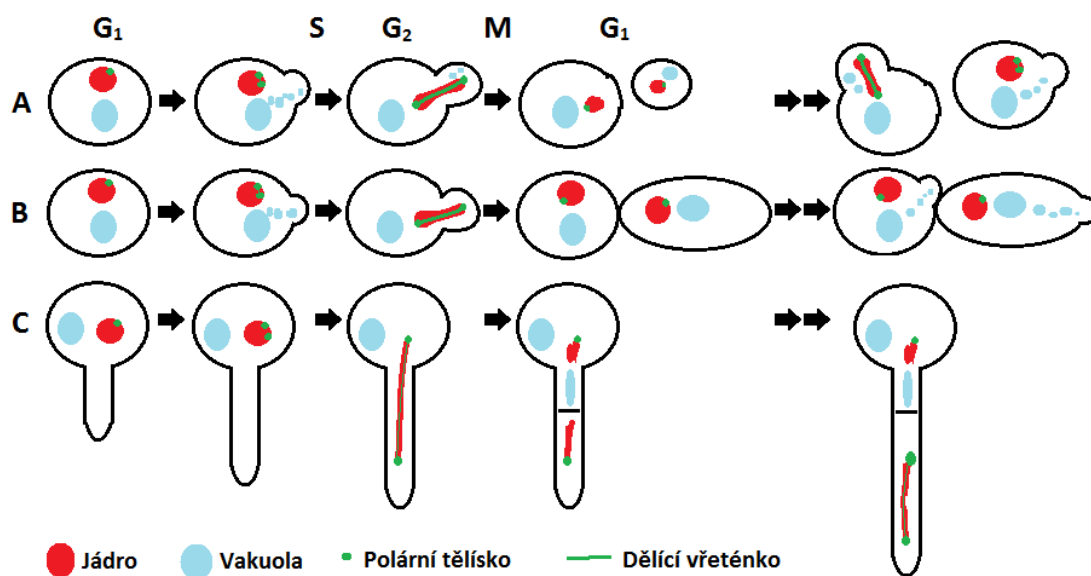
Pseudohyfální buňky pučí unipolárně a po vypučení se neoddělují (obrázek 4B). Tvoří tak rozvětvené řetízkovité kolonie (obrázek 3 uprostřed). Oproti kvasinkové formě mají prodlouženou G<sub>2</sub> fází. Dceřiná buňka tak po vypučení dosahuje velikosti mateřské buňky a další buněčné cykly jsou synchronizované (Berman, 2006).

Hyfa vzniká z tzv. zárodečného klíčku (*germ tube*, obrázek 4C), vzniklého z kvasinkové buňky před startem nového buněčného cyklu, tedy před duplikací polárního tělíska. Septum se tvoří uvnitř prodlužujícího se vlákna zárodečného klíčku. Jádro putuje do vlákna a tam dochází ke karyokinezi. Vrcholová buňka se nyní protahuje a dochází k dalšímu buněčnému cyklu (Sudbery et al., 2004). Rostoucí vrcholová buňka je vyplněná převážně cytoplasmou, buňky pod ní převážně vakuolou a setrvávají v G<sub>1</sub> fází, dokud nedojde k dostatečné syntéze cytoplasmy a poměr cytoplasmy a vakuoly není zvýšen. Teprve pak může dojít k dalšímu pučení a tedy ke větvení hyfy (Barelle, 2003). Hyfy jsou tedy oproti pseudohyfám méně větvené. Drobné vakuoly ve vrcholové buňce rostou a putují směrem k septu, kde se spojují do velké vakuoly ještě před tím, než dojde k další cytokinezi vrcholové buňky. Tato velká vakuola může být rostoucím septem i rozdělena (Veses a Gow, 2008).





**Obrázek 3:** Kvasinkové buňky (vlevo), pseudohyfy (uprostřed), hyfy (vpravo). Zdroj obrázku: (Berman, 2006), upraveno



**Obrázek 4:** Schéma buněčného cyklu kvasinkové formy (A), pseudohyfy (B) a hyfy (C) kvasinky *C. albicans*. Buněčné cykly pseudohyf jsou na rozdíl od kvasinkových buněk synchronizované (vpravo). Zárodečný klíček hyfy vzniká již před startem buněčného cyklu

*C. albicans* tvoří kvasinky, pseudohyfy a hyfy za odlišných fyziologických podmínek, jako jsou pH, teplota, složení živného média a hustota buněk (Sudbery et al., 2004). Přechod mezi kvasinkovou a filamentární formou je regulován pomocí autoregulačních látek, jako je kandidami produkovaný farnesol. Morfologické přechody ovlivňují též například 2-fenyletanol, některé mastné kyseliny, peptidy a bakteriální metabolity (Shareck a Belhumeur, 2011). Přechod mezi pseudohyfální a hyfální formou je mnohem méně častý než mezi kvasinkovou a jednou z filamentárních forem (Berman, 2006).

Vizuální rozlišení pseudohyf a hyf není vždy jednoduché. Mezi charakteristické rozdíly, díky nimž lze obě formy rozlišit jednoduchým pozorováním, patří větší tloušťka vlákna u pseudohyf (~3  $\mu\text{m}$  oproti ~2  $\mu\text{m}$  u hyf) a paralelní stěny

vlákna u hyf oproti zúženým místům septa mezi jednotlivými buňkami pseudohyf (Sudbery et al., 2004).

Kmeny *C. albicans*, které nejsou schopné přechodů mezi kvasinkovou a filamentární formou, vykazují nižší virulenci (Janderová a Bendová, 1999). Nakolik přechody mezi morfologickými formami napomáhají vzniku a rozvoji infekce, je dosud předmětem diskuse (Gow et al., 2002; Berman, 2006). Zdá se, že při vzniku onemocnění mají některé výhody kvasinkové buňky a jiné vláknité kolonie. Filamentární formy *C. albicans* jsou schopné prorůst do agarového podloží kolonie a šířit se horizontálně za její hranici (Berman, 2006). V agarovém podloží vytvářejí díry, čehož kvasinkové buňky nejsou schopny (Gow et al., 2002). Hyfální vrcholek je také místem sekrece enzymů schopných štěpit proteiny, lipidy a další buněčné komponenty a usnadňuje tak penetraci do tkáně. Další možnou výhodou filamentární formy je vyšší rezistence proti buněčné imunitní reakci hostitele (Gow et al., 2002). Zdá se, že filamentární forma *C. albicans* zvyšuje schopnost pronikání do tkáně v časně fázi infekce a kolonizaci napadených orgánů (Sudbery et al., 2004).

Naopak kvasinková forma *C. albicans* se lépe šíří krví hostitele (Berman, 2006) a je schopná produkovat aspartátové proteázy, které štěpí proteiny jako keratin, kolagen, imunoglobulin A nebo mucin, což slouží jednak pro získávání dusíku jakožto živiny a jednak k penetraci do tkáně hostitele a omezení jeho imunitních bariér (Naglik et al., 2003). *C. glabrata*, druhý nejčastější původce diseminované kandidózy, se vyskytuje převážně v kvasinkové formě a schopnost této kvasinky tvořit pseudohyfy je omezená. To podporuje hypotézu, že k virulenci kandid není třeba schopnost přechodů do filamentární morfologie (Gow et al., 2002). Většina patogenních dimorfních mikroskopických hub se v přirozeném prostředí vyskytuje ve filamentární formě, v lidské tkáni ve formě kvasinkové, na rozdíl od druhů rodu *Candida* (Sudbery et al., 2004).

Nelze tedy říci obecně, že s virulencí je spojena pouze jedna z morfologických forem mikroskopických hub. Schopnost morfologických přechodů podle všeho virulenci *C. albicans* zvyšuje, k infekci hostitele ale není nezbytně nutná (Shareck a Belhumeur, 2011). Nakolik je správná intuitivní představa, že filamentární forma *C. albicans* je vhodná zejména k penetraci do tkání a jejich kolonizaci, kvasinková forma pak k šíření krví, ukáže další výzkum.

### 2.1.5 Kvasinková vakuola

Kvasinková vakuola je organela podobná rostlinným vakuolám a savčím lysozomům (Veses et al., 2008). Přestože tomu název příliš nenapovídá, je vakuola důležitou organelou buňky s mnoha funkcemi nezbytnými pro buňku za normálních podmínek, výraznou měrou také pomáhá buňce vyrovnat se s řadou stresů.

Vakuola je nejkyselější organelou buňky, hodnota pH závisí na druhu kvasinky, jejím stavu a fázi buněčného cyklu a je obvykle nižší než 6,5, může však být nižší než 5 (Li a Kane, 2005). Nízké pH je zajišťováno vakuolární ATPázou, která za spotřeby ATP pumpuje protony z cytoplasmy do vakuoly. Vakuolární ATPáza, tzv. V-ATPáza, je příbuzná mitochondriální ATP syntáze. Delece genů pro vakuolární ATPázu není letální, na rozdíl delece genů pro ATPázu v lysozomu savců. Mutanty jsou však citlivé na pH okolí vyšší než 7,5, přítomnost těžkých kovů, nedostatek železa a mědi v médiu a na různá léčiva (Li a Kane, 2009). Gradient pH na vakuolární membráně je využíván k antiportnímu transportu některých aminokyselin a kationtů (Veses et al., 2008).

Vakuola je, spolu s proteasomy, hlavní degradační organelou buňky. Obsahuje proteázy a další hydrolázy, které jsou dovnitř transportovány ve formě zymogenů a aktivovány jsou až ve vakuole v kaskádě procesů, které optimálně běží za nízkého pH. Jejich substrát je typicky nespecifický a dokáže degradovat širokou škálu proteinů (Li a Kane, 2009).

Vakuola slouží jako zásobní organela pro některé aminokyseliny, fosfát, vápník a kovy jako je zinek, měď a železo. V případě nedostatku těchto kovů v médiu je buňka schopná uvolnit potřebné množství z vakuolárních zásob, které vydrží až po několik generací (Li a Kane, 2009; Simm et al., 2007; Li et al., 2001). Naopak přebytek železa nebo mědi v cytosolu způsobuje oxidativní poškození buněčného aparátu superoxidovými a hydroxylovými radikály, které vznikají při reakci  $\text{Cu}^+$  nebo  $\text{Fe}^{2+}$  s kyslíkem či peroxidem vodíku. V případě přebytku jsou tyto kovové ionty pumpovány do vakuoly, ta tak udržuje homeostázi těchto kovů v cytosolu. Vakuola je též schopná skladovat jedovaté těžké kovy, jako je arzén nebo kadmium a hraje tak zásadní úlohu pro detoxifikaci cytosolu (Li a Kane, 2009).

Kromě volného fosfátu se ve vakuole vyskytuje polyfosfát – lineární polymer, obsahující desítky až stovky fosfátových jednotek (viz obrázek 5).

Polyfosfát má zásobní funkci, jeho další rolí je chelatace dvojmocných kationtů a udržování pH homeostáze (Veses et al., 2008).

Kvasinky jsou schopny nějakou dobu přežít bez příjmu potravy. Rozkládají přitom nepotřebné proteiny a případně i celé organely za vzniku potřebných stavebních látek a energie. Degradace probíhá ve vakuole, materiál je do vakuoly dopravován typicky tzv. makroautofagií v dvojmembránových organelách zvaných autofagosomy. Mikroautofagie, tj. uzavření části cytosolu přímo vakuolární membránou, je dalším způsobem dopravy materiálu určeného k degradaci do vakuoly. Autofagie je u kvasinek indukována nedostatkem dobrého zdroje dusíku a uhlíku v médiu (Li a Kane, 2009).

Důležitou roli hrají vakuoly v rychlé odpovědi buňky na osmotický stres. V normálním médiu mají kvasinky typicky několik málo středně velkých vakuol. V hypotonickém médiu mají buňky jednu velkou vakuolu, která zpravidla vyplňuje větší část buňky. V hypertonickém médiu naopak vzniká množství malých vakuol, které mají velký poměr povrch/objem, mohou tedy rychle pumpovat ionty do vakuol. Při hyperosmotickém šoku se dále z vakuoly do cytosolu uvolňují vápenaté ionty, které slouží zřejmě jako signál pro aktivaci dalších buněčných mechanismů obrany proti hyperosmotickému šoku (Li a Kane, 2009).

Tvorba vakuolárního lumenu *de novo* je energeticky a materiálově méně náročná než tvorba cytosolu. Rychle rostoucí hyfální vlákno je zpočátku vyplněno převážně vakuolami, kromě rostoucí vrcholové buňky, která je vyplněna cytoplasmou (Barelle et al., 2003).

Mutanty *C. albicans*, které mají poškozené geny související s funkcí vakuol, byly studovány z hlediska schopnosti přežití za různých stresových podmínek, tvorby mycelia a pseudomycelia, tvorby aspartátových proteáz a virulence. Nepřekvapí, že tyto mutanty jsou často méně schopné odolávat nepříznivým vnějším podmínkám, mají omezenou tvorbu mycelia a jsou méně virulentní nebo dokonce zcela avirulentní. Několik takových mutantů s deletovanými geny souvisejícími s vakuolou je představeno níže.

Mutanty s deletovaným genem *VPS11* (*vacuolar protein sorting*), zodpovědným za dopravu proteinů do vakuoly a prevakuolárního kompartmentu (*prevacuolar compartment*), zcela postrádají vakuoly, jsou citlivé vůči oxidativnímu stresu, nedostatku dusíku v médiu, osmotickému a teplotnímu stresu. Kromě toho sekretují méně aspartátových proteáz a mají potíže v tvorbě mycelia, které, je-li

vytvořeno, zůstává krátké a roste pomalu (Palmer et al., 2003). Jsou-li takové mutanty požřeny makrofágem, mají omezenou schopnost přežít a nejsou schopny makrofága zabít. Mutanty, které mají gen *VPS11* pouze poškozený, nikoliv deletovaný, sice dokážou v makrofágu přežít, ale jejich schopnost ho zabít je omezená oproti nemutovaným kandidám (Palmer et al., 2005).

Dalšími geny, souvisejícími s dopravou do vakuoly, jsou *VPS1* a *VPS4*. Delece genu *VPS1* má za následek změny ve vakuolární morfologii a citlivost vůči teplotnímu stresu (Bernardo et al., 2008). Na myších modelech byly mutanty s poškozeným *VPS4* genem mnohem méně virulentní než kvasinky (Lee et al., 2009).

Produkt genu *VPS21* se podílí na dopravě z Golgiho aparátu přes endosom do vakuoly a produkt genu *AP-3* se podílí na dopravě z Golgiho aparátu vesikuly přímo do vakuoly. Mutanty s deletovanými jednotlivými geny mají defektní morfologii vakuoly, mutant s deletovanými oběma těmito geny není schopen tvořit hyfy a je avirulentní (Palmer, 2010). Podobně je tomu u genu *YPT72*, který se také podílí na dopravě látek do vakuoly. Současná delece genů *YPT72* a *VPS21* zapříčiní ztrátu odolnosti kvasinek vůči celé řadě stresových faktorů, schopnosti tvořit hyfy a virulence (Johnston et al., 2009).

Dalším genem, jehož delece vede k defektní morfologii vakuoly, je *PEP12*. Virulence takto poškozených kandid je na myších modelech a *in vitro* v makrofágu snižená (Palanisamy et al., 2010).

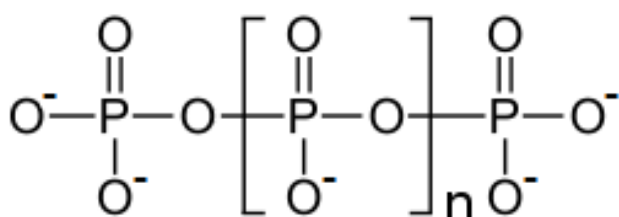
Delece genu *VAC1* pro periferní protein vakuolární membrány má za následek citlivost vůči kovovým iontům, snížení schopnosti adherence k vaginální tkáni, snížení produkce sekretovaných aspartátových proteáz a ztrátu virulence při systémové kandidóze u myši (Franke et al., 2006).

Delece genu *VMA7* pro podjednotku vakuolární ATPázy má za následek zvýšení pH vakuoly a citlivosti buňky vůči zásaditým hodnotám pH a menší odolnost vůči kovovým iontům v médiu. Kovové ionty jsou do vakuoly dopravovány často  $H^+$  symportem, jehož funkce závisí na acidifikaci vakuoly. Mutanty jsou avirulentní na myších modelech (Poltermann et al., 2005).

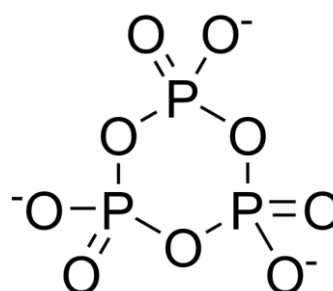
Ne všechny vakuolární mutanty jsou méně virulentní. Delece genu *ATG9*, podílejícího se na autofagii, nemá vliv na morfologii vakuoly, přechody mezi kvasinkovou a hyfální formou, schopnost zabít makrofága a virulenci u myši. V souladu s očekáváním jsou však takové mutanty citlivé na nedostatek dusíku v médiu (Palmer et al., 2007).

## 2.2 Polyfosfát

Polyfosfát je lineární polymer složený z jednotek až stovek fosfátových monomerů, zbytků kyseliny trihydrogenfosforečné, spojených vysokoenergetickou fosfoanhydridovou vazbou. Složení polyfosfátu (ve zcela dehydrogenované formě) lze zapsat pomocí sumárního vzorce  $P_nO_{3n+1}^{(n+2)-}$ . Struktura polyfosfátu je zobrazena na obrázku 5. Cyklický polyfosfát, v němž jsou fosfátové jednotky spojeny do kruhu, se nazývá metafosfát, jeho sumární vzorec je  $P_nO_{3n}^{n-}$ . Struktura trimetafosfátu je zobrazena na obrázku 6.



**Obrázek 5:** Polyfosfát



**Obrázek 6:** Trimetafosfát

Polyfosfát se nachází ve všech typech organismů – v archeích, bakteriích, houbách, rostlinách i zvířatech včetně člověka (Kornberg et al., 1999). Podle Achbergerové a Nahálky (2011) byl poprvé v buňce pozorován v roce 1904 A. Meyerem coby tělísko barvící se růžově pomocí toluidinové modři (*toluidine blue*) v bakterii *Spirillum volutans* a podle této bakterie bylo toto tělísko nazváno „volutin“. Jeho chemická podstata však byla odhalena až roku 1947 J. M. Wiameem (Achbergerová a Nahálka, 2011). V současné době se polyfosfátová tělíska nazývají acidokalcisomy, jedná se o membránou ohraničené organely o velikosti 200 až 500 nm, vyskytující se v prokaryotech i eukaryotech a obsahující kromě velkého množství polyfosfátu a  $Ca^{2+}$  také další kationty, pyrofosfát ( $PP_i$ ) a několik druhů membránových pump (Docampo et al., 2010).

Kromě acidokalcisomů se polyfosfát vyskytuje v eukaryotech i v dalších organelách – v jádře, mitochondriích, buněčné stěně a v pouzdře, v lysozomech, v případě kvasinek a řas ve vakuole (Kornberg et al., 1999; Kulaev et al., 2005). Polyfosfát v kvasinkové vakuole může tvořit až 20% celkové suché váhy buňky (Kornberg, 1995; Kornberg et al., 1999). Podle Kornberga a kolegů (1999) tvoří vakuolární polyfosfát až 99% polyfosfátu v kvasinkové buňce, jinak je tomu podle

Kulaeva a jeho spoluautorů (Kulaev et al., 2005), podle nichž obsah polyfosfátu ve vakuole je závislý na druhu kvasinky a růstových podmínkách a ve vakuole se může nacházet pouze zhruba 15% z celkového buněčného polyfosfátu.

Polyfosfát v buňkách zastává několik funkcí (Kornberg et al., 1999). Na první pohled zřejmá je funkce polyfosfátu coby zásobní látky pro fosfát. Skladovat volný anorganický fosfát ( $P_i$ ) je v porovnání s polyfosfátem osmoticky mnohem méně výhodné. Stabilní hladina  $P_i$  je však potřebná pro biochemické pochody v buňce i za jeho nedostatku v médiu. Enzymy exopolyfosfatázy (PPX) katalyzují reakci koncové fosfoanhydridové vazby s vodou, zkracují tak polyfosfátový řetězec a uvolňují  $P_i$ . Jednotlivé buněčné organely obsahují několik typů PPX, volný fosfát je tak možno vyrobit přímo na místě potřeby (Lichko et al., 2006).

Enzym polyfosfát kináza (PPK), správněji polyfosfát: ADP fosfotransferáza, katalyzuje přenos jednoho fosfátu z polyfosfátového řetězce na adenosin difosfát (ADP), z něhož tímto vzniká adenosin trifosfát (ATP). PPK katalyzuje též zpětnou reakci, tedy prodloužení řetězce polyfosfátu za vzniku ADP z ATP. Existuje více druhů PPK z nichž jako první byla v roce 1956 Arturem Kornbergem objevena PPK1 v *Escherichii coli*. PPK byly dosud nalezeny v bakteriích, archeích, kvasinkách, a dalších houbách, řasách a toxoplasmě. Zatím nebyly prokázány v savčích a rostlinných buňkách (Achbergerová a Nahálka, 2011).

S PPK a dalšími enzymy, schopnými přenést fosfát z polyfosfátu na substrát, souvisí funkce polyfosfátu coby zdroje a úložiště energie. Zatímco koncentrace ATP v buňce se pohybuje mezi 5 a 10 mM, koncentrace polyfosfátu, udávaná v koncentraci fosfátových jednotek, může dosáhnout i jednotek M (Kornberg et al., 1999). Při poklesu koncentrace ATP v buňce může PPK využít polyfosfát k fosforylaci ADP za vzniku ATP, univerzální buněčné energetické měny. Tento zdroj ATP by však buňce stačil pouze na několik málo sekund (Kornberg et al., 1999). Je tedy otázkou, nakolik, je role polyfosfátu coby zdroje energie fyziologicky významná.

Polyfosfát coby polyanion slouží také jako chelatační činidlo pro dvojmocné kationty (Kornberg et al., 1999). Kvasinková vakuola a acidokalcisomy slouží jako zásobárna významného signálního kationtu,  $Ca^{2+}$ , který je navázán právě na polyfosfát. Chelatace je dále využito při detoxifikaci buňky při přebytku kationtů kovů jako je zinek, železo, měď, kadmium nebo rtuť. Bakterie *Lactobacillus*

*plantaris* neobsahuje superoxid dismutázu, místo toho se toxických superoxidových radikálů zbavuje pomocí komplexu polyfosfátu s  $Mn^{2+}$  (Archibald a Fridovich, 1982).

Polyfosfát vyskytující se ve vakuole halotolerantní řasy *Dunaliella salina* se účastní udržování pH homeostáze. Při průniku amoniaku nebo aminů do buňky dochází k alkalizaci cytosolického pH. Tomu se buňka brání transportem aminů do vakuoly, kde dochází k hydrolýze polyfosfátu na trifosfáty, přičemž jsou uvolňovány protony, pH vakuoly se tedy zvýší jen mírně. Vakuolární polyfosfát tak slouží jako pufovací systém buňky (Pick a Weiss, 1991).

Polyfosfát je schopen interagovat s bazickými proteiny, například s histony, a je přítomen v jádře. Spekuluje se tedy, že by mohl přímo ovlivňovat expresi genů (Kornberg, 1995; Kornberg et al., 1999). Polyfosfát je také součástí regulačního mechanismu buněčné odpovědi při nedostatku různých živin (Achbergerová a Nahálka, 2011).

Polyfosfát je nezbytný pro virulenci, přežívání ve stacionární fázi, mobilitu a tvorbu biofilmu u bakterií. Mutanty *E. coli* s deletovanou PPK, které nejsou schopny tvořit dlouhé řetězce polyfosfátu, jsou ve stacionární fázi růstu náchylné vůči teplotnímu, oxidativnímu a osmotickému stresu a dlouhodobě jich přežívá mnohem méně než příslušníků divokého kmene (Rao a Kornberg, 1996). Oportunisticky patogenní gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* s deletovanou PPK vykazuje potíže s nasedáním na abiotické povrchy a s tvorbou biofilmu, produkci *quorum-sensing* molekul a molekul souvisejících s virulencí a je výrazně méně virulentní na myším modelu (Rashid et al., 2000). Schopnost pohybu mutanta je též omezená: přestože jeho bičík nejeví známky poškození, hůře plave na agarósové destičce, poškozen je i pohyb pomocí brv (*twitching*) a koordinovaný pohyb více jedinců (*swarming*) (Rashid a Kornberg, 2000).

V současné době je převážná většina polyfosfátu na Zemi biogenního původu (Achbergerová a Nahálka, 2011). Polyfosfát však vzniká za bezvodých podmínek a teplot přes 200°C z většiny anorganických fosfátů, z některých fosfátů i za teplot nižších (Osterberg a Orgel, 1972), může vznikat při vulkanické činnosti a byl nalezen ve fumarolech na ostrově Hokkaido v Japonsku (Yamagata et al., 1991). Předpokládá se, že na prebiotické Zemi byl polyfosfát přítomen a hrál důležitou roli v biogenezi a evoluci života (Brown a Kornberg, 2004; Orgel, 2004). Tuto hypotézu nepřímo podporuje zejména nápadné rozšíření polyfosfátu.



Acidokalcisomy nebo příbuzné orgány jsou přítomny v jedincích všech třech domén života a spolu s nimi i enzym vakuolární proton přenášející pyrofosfatáza ( $V-H^+ PPáza$ ), která přenáší proton do acidokalcisomu za současného rozpadu pyrofosfátu (Seufferheld et al., 2011). Polyfosfát mimo acidokalcisomy je též rozšířen ve všech doménách života (Kornberg et al., 1999). Je tedy pravděpodobné, že acidokalcisomy a obecně polyfosfát byly součástí posledního společného předka všech současných živých organismů.

## 2.3 Ramanova spektroskopie

### 2.3.1 Interakce optického záření s látkou

Optické záření může různým způsobem interagovat s látkou, kterou prochází. Kromě jevů, které vznikají na rozhraní dvou látek, jako je odraz či lom světla, interaguje záření s látkou v jejím objemu.

Optické záření popisuje kvantová teorie pomocí fotonů, kvant elektromagnetického pole s nulovou hmotností, jednotkovým spinem a energií  $E$  danou frekvencí záření  $f$

$$E = hf, \quad (1)$$

kde  $h$  je Planckova konstanta. Frekvence je s dalšími veličinami popisujícími záření – úhlovou frekvencí  $\omega$ , vakuovou vlnovou délkou  $\lambda$  a vlnočtem  $\nu$  – svázána známými vztahy

$$f = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{c}{\lambda} = c\nu, \quad (2)$$

kde  $c$  je rychlost světla ve vakuu.

Látka je tvořená atomy a molekulami. Ty mohou část energie elektromagnetického záření odebírat nebo naopak samy energii ztrácet ve prospěch elektromagnetického pole. Tyto energetické změny odpovídají přeskokům mezi energetickými hladinami elektronového obalu a v případě molekul i změnám jejich vibrační a rotační energie. Elektronové, vibrační i rotační stavy jsou podle kvantové teorie kvantované, tedy mohou nabývat pouze určitých hodnot. Ze zákona zachování energie pak plyne rezonanční charakter výměny energie mezi elektromagnetickým

polem a látkou – pohlcený nebo naopak nově vzniklý foton musí mít energii stejnou, jako má některý energetický přechod v molekule.

Pro každý elektronový stav molekuly mají atomy v molekule, svázané mezi sebou vazbami, dohromady  $3N$  stupňů volnosti, kde  $N$  je počet atomů. Tři stupně volnosti odpovídající translačnímu pohybu molekuly jako celku můžeme odseparovat přechodem k tzv. těžišťové soustavě souřadné, pohybující se spolu s těžištěm molekuly. Zbývají tři rotační pohyby molekuly jako celku, resp. dva pro dvouatomovou molekulu, a  $3N - 6$  resp.  $3N - 5$  vibračních stupňů volnosti. Rotační stavy lze separovat v aproximaci fixní vzájemné polohy jader, kdy zanedbáme vliv vibrací na rotaci. Rotační stavy molekuly jsou kvantované a mohou si vyměňovat energii s elektromagnetickým polem. Energie rotačních přechodů je nízká a odpovídá záření o vlnové délce v řádu milimetrů.

Pro vibrační stavy molekul lze zavést tzv. normální souřadnice, v nichž se řešení stacionární Schrödingerovy rovnice v aproximaci malých výchylek jader od rovnovážné polohy a v harmonické aproximaci rozpadá na řešení  $3N - 6$  resp.  $3N - 5$  harmonických oscilátorů, které si mohou vyměňovat energii s elektromagnetickým polem v souladu s výběrovými pravidly. Vlnové délky pohlceného světla typicky odpovídají infračervenému záření. Vibrační stavy molekuly se obecně liší pro její jednotlivé elektronové stavy.

V molekule může docházet i ke kombinovaným přechodům, kdy se současně mění elektronový, vibrační i rotační stav molekuly, případně některé dva z těchto uvedených.

Jednotlivé interakce molekuly a optického záření mohou být znázorněny v tzv. Jabloňského diagramu, pojmenovaného podle polského fyzika Aleksandra Jabloňského. Jabloňského diagram pro absorpci, fluorescenci a rozptyl je zobrazen na obrázku 7. Základní elektronová hladina je označena  $S_0$ , excitovaná elektronová hladina  $S_1$ . Každé elektronové hladině odpovídá série vibračních hladin (slabší čáry) a rotačních hladin (nejsou znázorněny).

Při absorpci fotonu dojde k excitaci molekuly; na obrázku je znázorněn elektronově-vibrační přechod. Do základního stavu se molekula může dostat nezářivým přechodem tepelnými ztrátami nebo emisí fotonu – fluorescencí. K fluorescenci typicky dochází z nejnižší vibrační hladiny elektronového excitovaného stavu, na niž molekula po absorpci zrelaxuje. Emitovaný foton má tedy stejnou nebo nižší energii oproti fotonu absorbovanému. Tento energetický posuv se

nazývá Stokesův podle George G. Stokese, který jej poprvé popsal roku 1852 (Lakowicz, 2006, str. 5).

Rozptyl je dvoufotonový proces, při němž dochází ke dvěma interakcím mezi elektromagnetickým polem a molekulou – jeden foton zaniká a jiný v téměř okamžiku vzniká. Foton rozptýleného záření může mít stejnou vlnovou délku jako foton dopadajícího záření, pak se jedná o pružný neboli Rayleighův rozptyl, nebo odlišnou vlnovou délku, lišící se o vlnovou délku odpovídající energetickému rozdílu dvou vibračních hladin, pak se jedná o nepružný neboli Ramanův rozptyl. Je-li rozptýlené záření méně energetické než záření dopadající, byla část energie odevzdána molekule a jedná se o tzv. Stokesovu větev Ramanova rozptylu. V opačném případě molekula část své energie odevzdala, byla tedy v některém excitovaném vibračním stavu. Pak hovoříme o anti-Stokesově Ramanově rozptylu.

Aby došlo k rozptylu, nemusí být excitační záření v resonanci s žádnou energetickou hladinou molekuly. Energetická hladina excitačního záření v Jablonského diagramu se pak nazývá virtuální. Na obrázku 7 jsou tyto virtuální hladiny naznačeny krátkou šedou úsečkou.

Obsazení vyšších energetických hladin se řídí Boltzmannovým rozdělením. Pro  $i$ -tou hladinu je obsazení  $N_i$

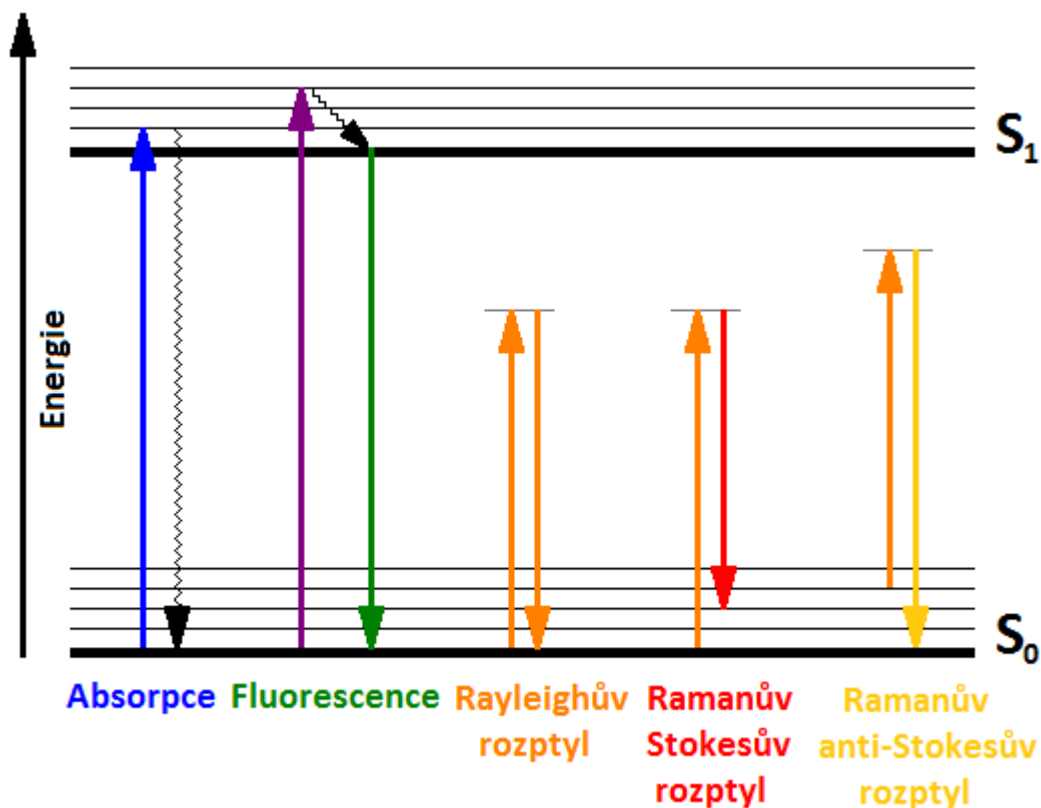
$$N_i \propto \exp\left(-\frac{\Delta E_i}{k_B T}\right) \quad (3)$$

kde  $\Delta E_i$  je rozdíl energie základní a  $i$ -té hladiny,  $k_B$  je Boltzmannova konstanta a  $T$  je termodynamická teplota. Vyšší excitované vibrační hladiny jsou tedy méně obsazené než hladiny nižší a anti-Stokesův rozptyl je obecně slabší než rozptyl Stokesův.

Z obrázku 7 je patrné, že chceme-li spektroskopicky zkoumat vibrační stavy základního elektronového stavu molekuly, můžeme využít buď absorpci nebo nepružný rozptyl. V případě absorpce excitujeme molekulu do vyššího vibračního stavu optickým zářením o nízké energii, typicky infračerveným zářením o vlnových délkách mezi 700 nm a 1 mm, tato metoda se nazývá infračervená (IČ) absorpční spektroskopie. IČ absorpčním spektrem pak rozumíme závislost intenzity absorbovaného záření na jeho vlnové délce  $\lambda$ , vlnočtu  $\nu$  či frekvenci  $\omega$ .

V případě nepružného rozptylu můžeme excitovat zářením o libovolné vlnové délce a frekvenci vibrace určíme jako rozdíl frekvencí excitačního

a rozptýleného záření. Ramanovým spektrem pak rozumíme závislost intenzity nepružně rozptýleného záření na této rozdílové frekvenci, udávané obvykle ve vlnočtech  $\nu$  v jednotkách  $\text{cm}^{-1}$ .



**Obrázek 7:** Jablůnskiho diagram absorpce, fluorescence a rozptylu. Zářivé přechody jsou naznačeny barevnými šipkami, nezářivé přechody zvlněnými černými šipkami. Zobrazena je základní ( $S_0$ ) a excitovaná ( $S_1$ ) elektronová energetická hladina molekuly se systémem vibračních hladin (tenké čáry). Virtuální hladiny jsou zobrazeny šedými úsečkami

Je-li excitační záření v rezonanci s některým s elektronově-vibračních přechodů molekuly, hovoříme o rezonančním Ramanově rozptylu. Ten je o několik řádů silnější než nerezonanční Ramanův rozptyl, na druhou stranu dochází též ke fluorescenci vzorku, která je obvykle o několik řádů silnější než Ramanův rozptyl.

Nerovný povrch kovů jako je stříbro nebo zlato může Ramanův rozptyl na tento povrch naadsorbovaných molekul zesilovat až o několik řádů, hovoříme pak o povrchem zesíleném Ramanově rozptylu (*surface enhanced Raman scattering, SERS*). Nevýhodou *SERS* je často obtížná adsorpce některých biomolekul na kovový

povrch a nízká reprodukovatelnost experimentů daná závislostí na konkrétním lokálním uspořádání povrchu a studované molekuly.

### 2.3.2 Ramanův rozptyl

Ramanův rozptyl poprvé pozoroval a popsal Chandrasekhara Venkata Raman v roce 1928 v časopise *Indian Journal of Physics* (Raman, 1928) a v *Nature* spolu s Kariamanickamem Srinivasou Krishnanem (Raman a Krishnan, 1928).

Klasické vysvětlení Ramanova rozptylu (podle (Dietzek et al., 2010)) vychází ze vztahu pro indukovaný dipólový moment  $\vec{p}$  molekuly, na kterou dopadá elektromagnetické záření o intenzitě  $\vec{E}$  a úhlové frekvenci  $\omega_{opp}$

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \cos(\omega_{opp} t), \quad (4)$$

$$\vec{p}(t) = \vec{\alpha}(t) \cdot \vec{E}(t) \quad (5)$$

Veličina  $\vec{\alpha}$  ve vztahu (5) se nazývá polarizovatelnost a má tenzorový charakter. Jádra atomů v molekule vykonávají vibrační pohyby, které lze v harmonické aproximaci v normálních souřadnicích  $q_i$  vyjádřit jako

$$q_i = q_{i0} \cos(\omega_i t + \delta_i), \quad i = 1 \dots 3N - 6 \quad (6)$$

kde  $q_{i0}$  je rovnovážná poloha jader, tedy poloha v konfiguraci molekuly s nejnižší energií,  $\omega_i$  je frekvence  $i$ -té vibrace,  $\delta_i$  je fázový posun vibrace oproti dopadajícímu záření,  $N$  je počet atomů v molekule a  $3N - 6$  je počet vibračních stupňů volnosti molekuly. V případě lineární molekuly je počet vibračních stupňů volnosti a počet normálních souřadnic  $3N - 5$ , tato skutečnost nebude dále zdůrazňována.

Vibrační pohyby jader ovlivňují tenzor polarizovatelnosti. Ten můžeme pomocí Taylorova rozvoje okolo rovnovážných poloh jader rozepsat do řady

$$\vec{\alpha} = \vec{\alpha}_0 + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial^2 \vec{\alpha}}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j + \dots \quad (7)$$

kde polarizovatelnost a její derivace v rovnovážné poloze jader jsou označeny indexem 0.

Omezíme-li se pouze na první dva členy rozvoje a dosadíme výrazy (4), (6) a (7) do rovnice (5), pro indukovaný dipólový moment pak dostaneme

$$\vec{p}(t) = \vec{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_{dop} t) + \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q_i} \right)_0 \vec{E}_0 q_{i0} \cos(\omega_{dop} t) \cos(\omega_i t + \delta_i) \quad (8)$$

Po úpravě druhého sčítance podle goniometrického vzorce

$$\cos(x)\cos(y) = \frac{1}{2}(\cos(x+y) + \cos(x-y)) \quad (9)$$

dostaneme pro indukovaný dipólový moment výraz

$$\begin{aligned} \vec{p}(t) = \vec{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_{dop} t) + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q_i} \right)_0 \vec{E}_0 q_{i0} \cos([\omega_{dop} + \omega_i]t + \delta_i) \\ + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \left( \frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q_i} \right)_0 \vec{E}_0 q_{i0} \cos([\omega_{dop} - \omega_i]t - \delta_i) \end{aligned} \quad (10)$$

Indukovaný dipól je zdrojem elektromagnetického záření o stejné frekvenci, na jaké sám kmitá. První člen rovnice (10) odpovídá emisi světla o stejné frekvenci, jakou má dopadající záření, tedy pružnému Rayleighovu rozptylu. Druhé dva členy odpovídají nepružnému Ramanovu rozptylu, a to Stokesovu rozptylu v případě rozdílu úhlových frekvencí,  $\omega_{Stokes} = \omega_{dop} - \omega_i$ , a anti-Stokesovu rozptylu pro  $\omega_{anti-Stokes} = \omega_{dop} + \omega_i$ . Členy popisující nepružný rozptyl ve vztahu (10) obsahují fázový posun  $\delta_i$ . Ten je zpravidla pro každou molekulu ve vzorku jiný, neboť vibrace molekul ve vzorku nejsou synchronizované. Záření rozptýlené nepružně je tedy vzájemně nekoherentní, na rozdíl od pružně rozptýleného záření.

Z rovnice (10) je patrné, že nenulový Rayleighův rozptyl je podmíněn nenulovostí polarizovatelnosti. Elektronový obal je však ovlivněn elektrickým polem u všech molekul, a tedy všechny molekuly mají polarizovatelnost nenulovou a vykazují Rayleighův rozptyl.

Jinak je tomu u Ramanova rozptylu. Ramanův tenzor  $i$ -té vibrace  $\vec{\alpha}_i^{Raman}$ , definovaný vztahem

$$\vec{\alpha}_i^{Raman} = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial \vec{\alpha}}{\partial q_i} \right)_0 q_{i0} \quad (11)$$

závisí na derivaci polarizovatelnosti podle  $i$ -té normální souřadnice v rovnovážné poloze. Ta může být nulová, takové vibrace pak nejsou ramanovsky aktivní a ve spektru je neuvídíme.

Úhlová frekvence  $i$ -té vibrace  $\omega_i$  je závislá na síle vazeb, které se jí účastní a na hmotnosti vibrujících atomů. Proto jsou vibrace každé molekuly, a tedy i její vibrační spektrum, do jisté míry unikátní, molekula má svůj vibrační „*fingerprint*“ neboli „otisk prstu“, závislý na jejím složení, konformaci, vlivu okolí a podobně. Na druhou stranu vibrace některých skupin atomů jsou dostatečně nezávislé na zbytku molekuly a jsou prakticky stejné u všech molekul.

Celková intenzita záření vyzařovaného kmitajícím dipólem je rovna

$$I(t) = \frac{|\ddot{p}|^2}{6\pi\epsilon_0 c^3} \quad (12)$$

kde  $\ddot{p}$  značí druhou časovou derivaci dipólového momentu a  $\epsilon_0$  je permeabilita vakua. Dosadíme-li do rovnice (12) dipólový moment zodpovědný za Stokesův nepružný rozptyl, tedy třetí člen rovnice (10), vztah (11) pro Ramanův tenzor a uvažujeme-li pouze jedinou vibraci, dostaneme

$$I_{Stokes}(t) = \frac{|\bar{E}_0|^2}{12\pi\epsilon_0 c^3} (\tilde{\alpha}_i^{Raman})^2 [\cos((\omega_{dop} - \omega_i)t - \delta_i)]^2 (\omega_{dop} - \omega_i)^4 \quad (13)$$

Po časovém vystředování rovnice (13) získáme výraz pro celkovou intenzitu Stokesova rozptylu

$$I_{Stokes} = \frac{1}{24\pi\epsilon_0 c^3} (\tilde{\alpha}_i^{Raman})^2 |\bar{E}_0|^2 (\omega_{dop} - \omega_i)^4 \quad (14)$$

Podobný výraz získáme i pro intenzitu anti-Stokesova rozptylu, pouze  $\omega_{dop} - \omega_i$  je nahrazeno  $\omega_{dop} + \omega_i$ . Intenzita Ramanova rozptylu tedy závisí kromě druhé mocniny tenzoru Ramanova rozptylu také na intenzitě dopadajícího záření a je úměrné čtvrté mocnině frekvence rozptýleného záření.

### 2.3.3 Ramanova mikrospektroskopie

Konfokální Ramanova mikrospektroskopie, nebo také Ramanova mikroskopie, kombinuje Ramanovu spektroskopii s konfokální optickou mikroskopií. Schéma konfokálního mikrospektrometru je zobrazeno na obrázku 8, princip Ramanovy mikrospektroskopie je představen na obrázku 9. Excitační záření z laseru je objektivem zaostřeno na vzorek, který je umístěn v ohniskové rovině objektivu na stolku mikroskopu. Rozptýlené záření je sbíráno tímtež objektivem a prochází přes tzv. konfokální clonu (viz obrázek 9), umístěnou tak, aby záření z bodu, do něž bylo soustředěno záření excitačního laseru, bylo zaostřeno na otvor clony. Toto záření prochází dál do spektrografu. Jinak je tomu u záření z bodů mimo ohnisko objektivu. Záření vycházející z bodů nad nebo pod ohniskovou rovinou objektivu dopadá na konfokální clonu rozostřené. Do spektrografu ho tedy prochází pouze malá část, viz obrázek 9. Záření vycházející z bodu posunutého oproti ohnisku objektivu laterálně sice dopadá zaostřené na rovinu konfokální clony, ovšem nikoliv na otvor clony.

Mezi objektiv a konfokální clonu je umístěno dichroitické zrcadlo, které odráží excitační záření, ale propouští rozptýlené záření, a hranový nebo notch filtr, který odstíní pružně rozptýlené světlo, viz obrázek 8. Odklopíme-li sklopné zrcadlo, je záření vedeno nikoliv do spektrografu, ale na zobrazovací kameru. Vzorek osvětlený seshora nebo zespoda bílým světlem pak můžeme pozorovat na monitoru počítače. Spektrograf tvoří mřížka, na níž je rozptýlené světlo rozloženo podle vlnových délek, ze spektrografu pak světlo dopadá na CCD detektor, který nám poskytne informaci o spektru studovaného vzorku.

Princip konfokality je v optické mikroskopii využíván ke zvýšení rozlišení a kontrastu mikroskopu (Hollricher a Ibach, 2010). V obrazové rovině mikroskopu je obrazem bodu v předmětové rovině nikoliv bod, ale soustava soustředných disků, jejichž intenzita je dána Airyho funkcí, viz obrázek 10. Rozlišení mikroskopu je definováno jako nejmenší vzdálenost dvou bodových zdrojů světla, při které je lze v mikroskopu rozlišit. Rayleighovo kritérium říká, že dva body rozlišíme, pokud je hlavní maximum Airyho funkce jednoho z nich zobrazeno v prvním minimu druhého. V závislosti na vlnové délce světla těchto bodů a numerické apertuře  $NA$  objektivu, definované vztahem

$$NA = n \cdot \sin\theta \quad (15)$$



kde  $n$  je index lomu prostředí okolo čočky objektivu a  $\theta$  je polovina vrcholového úhlu, pod nímž může dopadat světlo ze vzorku do objektivu, dostaneme pro laterální rozlišení (tj. v rovině vzorku) výraz

$$\Delta_{\text{laterální}} = \frac{0,61 \lambda}{NA} \quad (16)$$

Konfokální mikroskop může mít laterální rozlišení až  $\sqrt{2} \times$  lepší (Hollricher a Ibach, 2010).

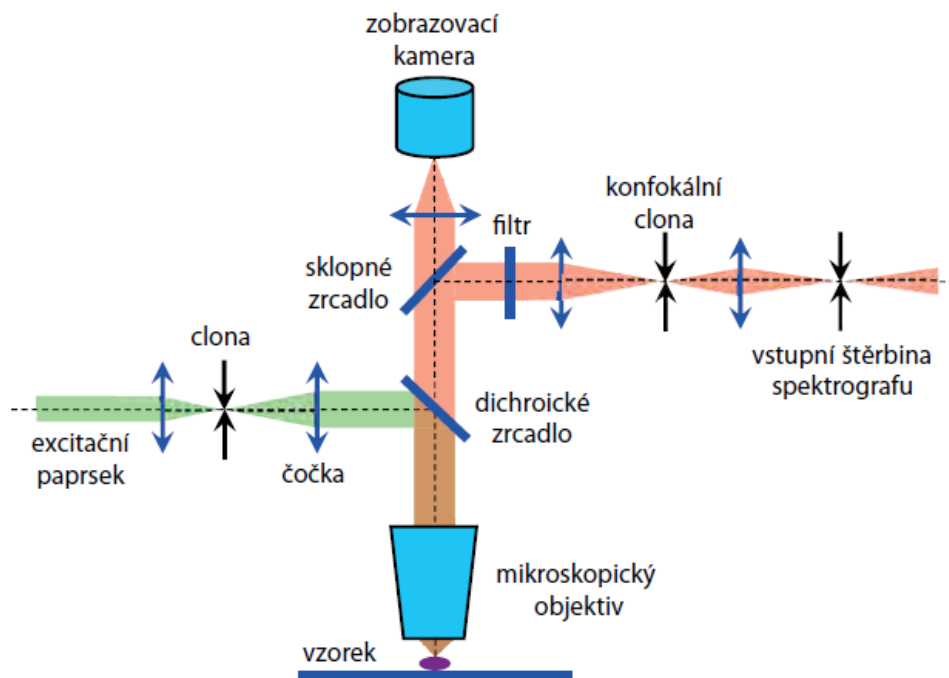
Ani obrazem bodu v rovině kolmé na obrazovou rovinu není bod. Průběh intenzity světla bodového zdroje v obrazovém prostoru je dán takzvanou 3D funkcí bodové odezvy (*point spread function*). Průběh intenzity světla kolmo na obrazovou rovinu je zobrazen v obrázku 10. Axiální rozlišení mikroskopu (tedy ve směru optické osy) je dáno podle Rayleighova kritéria jako

$$\Delta_{\text{axiální}} = \frac{1,4 \lambda}{NA^2} n \quad (17)$$

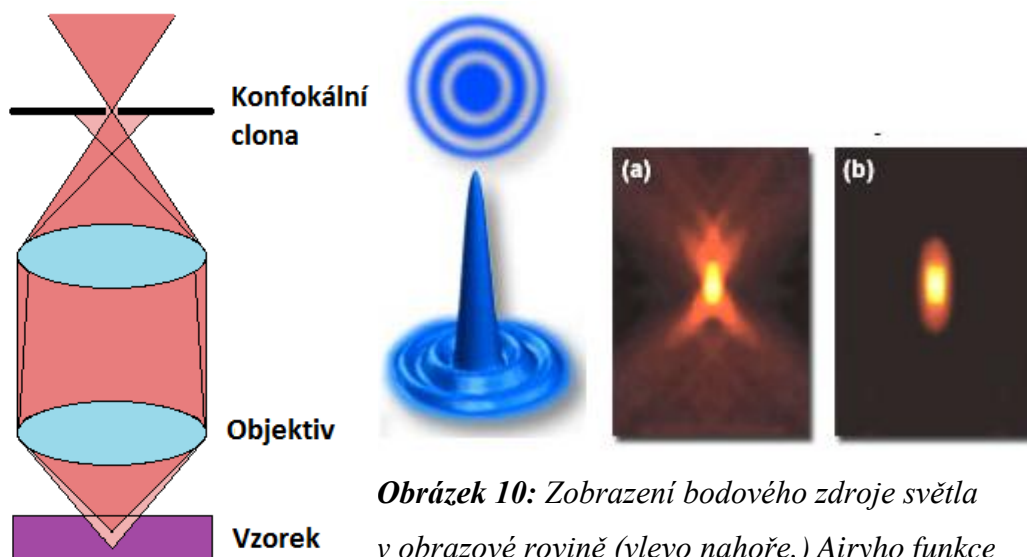
V případě Ramanovy mikrospektrometrie se problém axiálního rozlišení daného difrakcí mění v otázku, jak záření rozptýlené nebo emitované vzorkem umístěným mimo ohniskovou rovinu objektivu přispívá do spektra vzorku nacházejícího se v jeho ohnisku. Pro praktické účely je proto vhodnější používat ke stanovení axiálního rozlišení míru „konfokality“. Ta je definována jako pološířka křivky závislosti intenzity vybraného Ramanova pásu na axiální vzdálenosti objektivu od neprůhledného vzorku (Horiba Jobin-Yvon: HR800 User Manual, 2005). Stanovení míry „konfokality“ pro daný objektiv a konfokální clonu lze provést například na pásu křemíku na  $520,7 \text{ cm}^{-1}$  s použitím křemíkové destičky. „Konfokality“ závisí na velikosti konfokální clony.

Obraz vzorku můžeme rozdělit pomyslnou čtvercovou sítí a Ramanova spektra naměřit v jednotlivých bodech této sítě. Takovému procesu se říká mapování. Výsledkem bude mapa ramanovských spekter zaostřené roviny vzorku, která odpovídá mapě chemického složení. Výsledky mapování lze zobrazit různými způsoby. Můžeme barevně zobrazit intenzitu části spektra, například určitého pásu, v jednotlivých bodech mapy, a získat tak rozložení látky, jíž tento pás odpovídá. Druhou možností je analyzovat podobnost spekter z jednotlivých bodů a rozdělit je

podle podobnosti do skupin například pomocí hierarchické klastrové analýzy (*hierarchical cluster analysis, HCA*) (Pully a Otto, 2009). Příklad použití obou těchto metod je zobrazen na obrázku 11.

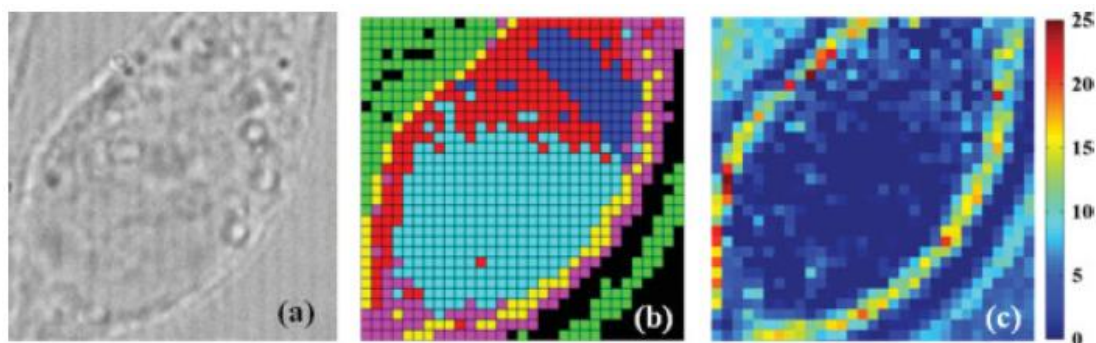


**Obrázek 8:** Schéma Ramanova mikrospektrometru. Zdroj obrázku: Mojžeš et al., 2011



**Obrázek 9:** K principu konfokální Ramanovy mikrospektroskopie

**Obrázek 10:** Zobrazení bodového zdroje světla v obrazové rovině (vlevo nahoře,) Airyho funkce (vlevo dole). Rozložení intenzity bodového zdroje světla kolmo na obrazovou rovinu (vpravo, (a) pro klasický mikroskop, (b) pro konfokální mikroskop). Zdroj obrázků: Abramowitz a Davidson, 2012; Spring et al. 2012



**Obrázek 11:** (a) Mikrofotografie HeLa buňky v bílém světle, velikost obrázku  $20 \times 20 \mu\text{m}$ , (b) klastrová analýza téže buňky získaná z ramanovské mapy pomocí HCA, (c) táž buňka, intenzita pásu na  $1602 \text{ cm}^{-1}$  v jednotlivých bodech mřížky je zobrazena pomocí barevné stupnice. Zdroj obrázku: Pully a Otto, 2009

### 2.3.4 Výhody a nevýhody Ramanovy mikrospektroskopie

Porovnáme-li obě metody vibrační spektroskopie, infračervenou a Ramanovu spektroskopii, z hlediska vhodnosti ke studiu biomolekul, je hlavní výhodou Ramanovy spektroskopie slabá intenzita pásů Ramanova rozptylu vody v oblasti charakteristických vibrací biomolekul. Naopak IČ záření voda v oblasti charakteristických vibrací biomolekul silně absorbuje.

Oproti klasické Ramanově spektroskopii je výhodou Ramanovy mikrospektroskopie prostorové rozlišení. Měření nám poskytne spektrum pouze zvolené malé oblasti vzorku, toto spektrum charakterizuje chemické složení vzorku. Axiálním a laterálním skenováním vzorku tak lze v principu získat třírozměrný obraz jeho chemického složení. Zahrnutím času jakožto další proměnné v našem experimentu získáme též vývoj chemického složení vzorku v čase. Měření je nedestruktivní a za vhodně zvolených podmínek jej lze provádět na živých buňkách. Získáváme tak informace o složení buňky a o přirozeně probíhajících buněčných procesech.

Pro fluorescenční spektroskopii a mikroskopii je zpravidla nutné buňky předem upravit, například je genetickou manipulací přinutit syntetizovat fluorescenční proteiny. Nabízí se však otázka, zda tyto cizorodé látky neovlivňují chování studovaného objektu v buňce. V případě Ramanovy mikrospektroskopie toto riziko odpadá, stejně jako nutnost úpravy buněk před měřením.

Měřením více buněk jedné kultury získáme informace o individuálních rozdílech ve složení jednotlivých buněk a o distribuci různých látek v kultuře, informace obtížně získatelné makroskopickými metodami, které analyzují složení extraktu získaného z organel mnoha buněk. Klasická makroskopická spektroskopie nebo chemická izolace nám prozradí pouze celkové množství studované látky v kultuře, nikoliv její rozložení mezi různými jedinci.

Ramanova mikrospektroskopie má ovšem také nevýhody. Ramanův rozptyl je obecně slabý jev, o několik řádů slabší než fluorescence i Rayleighův rozptyl, navíc v konfokálním uspořádání měříme spektrum pouze z malého rozptylového objemu řádu  $\mu\text{m}^3$ . Zesílit naměřený signál na detektoru můžeme zvýšením intenzity laseru, zvýšením frekvence dopadajícího záření (viz vzorec (14)) nebo prodloužením času sběru spektra. Příliš intenzivní záření laseru však buňky ničí, stejně jako záření o vysoké frekvenci. Zbývá možnost prodloužit akviziční čas, což s sebou nese časovou náročnost experimentu a omezuje časové rozlišení, s nímž jsme schopni měřit. Při volbě frekvence laseru je třeba dbát na to, aby na vlnové délce excitačního záření buňka záření příliš neabsorbovala. Energie absorbovaného záření je pak buď vyzářena ve formě fluorescence, která je silnější než Ramanův rozptyl a maří tedy náš experiment, nebo je uvolněna ve formě tepla, které buňku „upeče“.

Hovořili jsme o tom, že jednou z výhod Ramanovy mikrospektroskopie je přirozený stav buňky v průběhu měření. Je třeba si uvědomit, že tomu tak není zcela – v přirozeném stavu do buňky nesvítí laser, byť by byl málo intenzivní a s vhodnou vlnovou délkou. Kvůli potlačení signálu z média a elektrostatické fixaci buněk navíc měříme buňky v destilované vodě, tedy v osmoticky nepříznivém prostředí.

Nevýhodou Ramanovy mikrospektroskopie je také obtížná analýza naměřených spekter. Buňka obsahuje velké množství látek, jejichž spektra se vzájemně překrývají. Je tedy obtížné a někdy nemožné pásy ve spektru jednoznačně ztotožnit s některou biomolekulou a naměřené výsledky interpretovat v pojmech chemického složení.

### **2.3.5 Ramanova mikrospektroskopie kvasinek**

Experimenty prováděné pomocí Ramanovy mikrospektroskopie na kvasinkách lze v zásadě rozdělit do dvou skupin podle cíle, který sledují. Prvním cílem je charakterizace buněčného složení a biologických dějů probíhajících v buňce za různých podmínek. Naměřená spektra jsou interpretována z hlediska chemického

složení. Změny chemického složení v prostoru a čase umožňují zkoumat biologii buňky.

Druhým cílem je vyvinout metodiku snadné, rychlé a spolehlivé identifikace příslušníků jednotlivých druhů kvasinek. V takovém případě není primárním cílem interpretovat naměřená spektra. Stačí, že se tato spektra od sebe pro jednotlivé druhy dostatečně liší a v rámci jednoho druhu jsou si naopak dostatečně podobná.

Podle Kaliaperumala a Hamaguchiho (2012) byly poprvé Ramanovou mikrospektroskopií zkoumány jednotlivé buňky v roce 1990, kdy G. J. Puppels s kolegy prováděli experimenty na lidských lymfocytech. První měření na buňkách, které byly bez pochyb živé, však provedl až Yu-San Huang se svými spolupracovníky v roce 2003, a to na kvasinkových buňkách druhu *Schizosaccharomyces pombe*. Huang a kolegové měřili spektra z centrální části kvasinkové buňky, ta v průběhu měření procházela buněčným cyklem. *S. pombe* se, na rozdíl od ostatních druhů kvasinek, množí přehrádečným dělením. V průběhu buněčného cyklu se tak ve středu buňky objevilo nejprve jádro, poté cytoplasma a mitochondrie, a nakonec septum a buněčná stěna. Buňky byly po měření schopny dokončit další dva buněčné cykly. Ve spektru, které bylo identifikováno jako spektrum mitochondrií, byl objeven výrazný úzký pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$ , který se autorům nepodařilo přiřadit žádné biomolekule (Huang et al., 2003). Bylo pozorováno, že tento pás mírně klesá s dobou od začátku měření. Po přidání kyanidu draselného jakožto inhibitoru buněčného dýchání klesá tento pás v řádu minut, následovaný změnami pásu okolo  $1446\text{ cm}^{-1}$ , interpretovaného jako pás fosfolipidů (Huang et al., 2004). Pro pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$  bylo navrženo označení „*Raman spectroscopic signature of life*“, tedy „Ramanův spektroskopický znak života“.

Výsledky rozšířených experimentů, navazujících na předchozí, byly publikovány v roce 2005 (Huang et al., 2005). Spektra z různých míst *S. pombe* byla sbírána v průběhu buněčného cyklu a bylo provedeno mapování buňky. Ukázalo se, že spektrum cytoplasmy a jádra jsou si podobné. Intenzivní pásy proteinů ukázaly desetkrát vyšší koncentraci proteinů než nukleových kyselin v jádře. Spektrum septa odpovídá spektru  $\beta$ -glukanu. Spektru mitochondrií dominují pásy fosfolipidů a pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$ , který po přidání KCN klesá. Ukázalo se, že buňka udržuje své uspořádání symetrické vzhledem k příčné ose již v  $G_2$  fázi a je tedy připravena k mitóze již před M fází.

Ramanovou mikrospektroskopií byla dále pozorována spontánní smrt buňky *Saccharomyces cerevisiae*, způsobená nedostatkem živin (Naito et al., 2005). Ve vakuole se nejprve objeví tzv. „*dancing body*“, neboli „tančící tělísko“, tvořené polyfosfátem. Zároveň klesá a postupně mizí pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$ . Vakuola se rozpadá, zbytek tančícího tělíska je však možné pozorovat na jejím původním místě. Po přibližně čtrnácti hodinách je distribuce molekul v buňce zcela náhodná a buňka je tak s největší pravděpodobností mrtvá.

Pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$  se vyskytuje i v mitochondriích izolovaných z buněk *S. cerevisiae*, a chová se stejně jako v celých buňkách. Po přidání inhibitoru buněčného dýchání azidu sodného ( $\text{NaN}_3$ ), který, podobně jako KCN, blokuje komplex IV dýchacího řetězce, intenzita pásu klesá (Chiu et al., 2010). Pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$  byl dále objeven v HeLa buňkách, lidských lymfocytech, mezenchymálních kmenových buňkách a hovězích chondrocytech (Pully a Otto, 2009), kde po přidání  $\text{Ca}^{2+}$  klesá.

Gen *HEMI* kóduje  $\delta$ -aminolevulinát syntázu, nezbytnou k výrobě hemu. Buňky *S. cerevisiae*, které mají tento gen deletovaný, potřebují k životu přítomnost  $\delta$ -aminolevulinové kyseliny a nenasycených mastných kyselin v médiu. Tyto buňky postrádají pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$  (Chiu a Hamaguchi, 2011). Chemická podstata pásu na  $1602\text{ cm}^{-1}$  byla zřejmě odhalena v roce 2012, kdy byl za původce pásu označen ergosterol, steroid vyskytující se v membránách hub (Chiu et al., 2012).

Při měření Ramanova spektra živé buňky je nutné, aby byla buňka v průběhu měření fixována. Toho lze docílit použitím malého množství vzorku a přitlakem krycího sklíčka na podložní (Huang et al., 2005), pomocí elektrostatického přitahování mezi záporně nabitou buněčnou stěnou a kladně nabitým povrchem sklíčka, pokrytým například poly-L-lysinem (Naito et al., 2005; Bednářová et al., 2012), nebo pomocí tzv. optické, nebo také laserové pinzety (*optical (laser) tweezers*). Je-li laserové záření zaostřeno objektivem, jsou drobné dielektrické částice vtahovány do místa ležícího na ose laserového svazku, které je o trochu posunuté ve směru záření od místa nejužšího průměru laserového svazku. Zaostřený laser tak lze použít jako optickou past pro částice nanometrových rozměrů, ale i pro celé buňky (Jess et al., 2007). Buňka se v optické pasti v průběhu měření hýbe, naměřené spektrum tedy odpovídá celé buňce (Singh et al., 2006). Optickou past tedy nelze použít pro měření jednotlivých buněčných organel *in vivo*.

Pro zvýšení rychlosti měření při současném zachování dobrého poměru signál/šum lze v optické pasti uvěznit několik buněk ve sloupci nad sebou. Jess a kolegové (2007) takto měřili spektra tří uvězněných buněk *S. cerevisiae*.

Optické pinzety spolu s Ramanovou mikrospektroskopií lze využít též k třídění buněk, Huang a kolegové (2009) třídili buňky *S. cerevisiae* a bakterie *Pseudomonas fluorescens* podle toho, zda metabolizovaly uhlík  $^{13}\text{C}$ . Jednotlivé vytříděné buňky se jim pak ve zhruba polovině případů povedlo po převedení do média úspěšně namnožit.

Po přeočkování do nového média buňkám nějakou dobu trvá, než se adaptují na nové prostředí a začnou se množit. Této fázi růstové křivky buněčné kultury se říká lag-fáze, následovaná je fází exponenciálního množení, neboli log-fází. Singh a kolegové (2006) zachytili v optické pasti buňky v lag fázi a v  $G_1$  fázi buněčného cyklu na tři hodiny, buňky poté byly schopny vypučet. Pásky proteinů byly v průběhu měření stabilní, pás odpovídající nukleovým kyselinám na  $782\text{ cm}^{-1}$  brzy po začátku lag-fáze poklesl. Při pučení buněk roste pás na  $1450\text{ cm}^{-1}$ , odpovídající proteinům a lipidům, a objevuje se výše zmiňovaný pás na  $1602\text{ cm}^{-1}$ .

Başar a Kim (2008) uvěznili v optické pasti buňky *Schizosaccharomyces pombe* na dvě hodiny a pozorovali drobné změny spektra, které identifikovali jako změny v hydrataci buněčných proteinů.

Další aplikace optické pinzety spolu s Ramanovou mikrospektroskopií při studiu kvasinek zahrnují studium akumulace etanolu buňkami *S. cerevisiae* při tzv. Crabtreeho efektu, tedy za aerobních podmínek a nadbytku glukózy v médiu (Peng et al., 2010), studium akumulace karotenoidů kvasinkami druhu *Rhodotorula glutinis*, výhodnější než studium klasickou technikou, tedy pomocí extrakce karotenoidů a jejich analýzy na HPLC (Tao et al., 2011), nebo studium oxidativního poškození buněk druhu *Pichia pastoris* (Chang et al., 2009). Chang a kolegové (2009) přidávali buňkám při měření hydroxylové radikály a pozorovali pokles pásů odpovídajících dvojným vazbám mezi uhlíky a růst pásu odpovídající vibraci  $\text{C}=\text{O}$  na  $1740\text{ cm}^{-1}$ . Stejný efekt měly hydroxylové radikály na liposomy tvořené nenasycenými lipidy. Po přidání kyseliny askorbové byly pozorované degradační změny menší (Chang et al., 2009).

Ke studiu kvasinkových buněk pomocí Ramanovy mikrospektroskopie byly využity i techniky povrchem zesíleného Ramanova rozptylu a rezonančního Ramanova rozptylu. Sujith a kolegové (2009) pozorovali povrchem zesílený

Ramanův rozptyl buněčné stěny kvasinek *S. cerevisiae*, kterým byly do média přidány koloidní stříbrné nanočástice. Ty se v průběhu kultivace naadsorbovaly na buněčnou stěnu kvasinek. Spektra z různých nanočástic na téže buňce se lišila, což odpovídá různé interakci nanočástic s jednotlivými komponentami buněčné stěny.

Redoxní změny cytochromu *b* a *c* v buňkách *S. cerevisiae* a v izolovaných kvasinkových mitochondriích byly pozorovány pomocí rezonančního Ramanova rozptylu (Kakita et al., 2012), výsledky získané na izolovaných mitochondriích se podobaly výsledkům z živých buněk.

Druhou motivací výzkumu kvasinek pomocí Ramanovy mikrospektroskopie je vyvinutí metody rychlé, spolehlivé a levné identifikace jednotlivých druhů kvasinek, kterou by bylo možné použít v klinické praxi. Klasicky jsou jednotlivé druhy patogenních kvasinek izolované z pacientů identifikovány na základě fyziologických a nutričních znaků, k čemuž je ovšem potřeba dostatečně velké inokulum a tedy i dlouhá doba kultivace. Ta u druhů rodu *Candida* trvá až 5 dní (Maquelin et al., 2003). Z toho důvodu jsou léky pacientovi často podávány již před identifikací patogenního druhu, léčivo se tedy může ukázat jako nesprávné a léčba neúčinná. Zrychlení procesu identifikace patogenních druhů kvasinek je tedy vysoce žádoucí.

Průkopníky identifikace druhů rodu *Candida* pomocí konfokální Ramanovy mikrospektroskopie byli Maquelin a kolegové (2002a a 2003). Kvasinky byly kultivovány pouze po dobu šesti hodin a byly vytvořeny databáze spekter různých kmenů jednotlivých druhů rodu *Candida*. Pomocí statistických metod bylo možné spektra kvasinek přiřadit k jednotlivým druhům, přiřazení spektra jednoho kmenu do databáze ostatních kmenů bylo úspěšné v 92 až 100%. Pro správnou identifikaci je nutné udržet všechny vnější podmínky jako je doba kultivace, složení média apod. stejné pro všechna měření. Krátká doba kultivace je žádoucí, neboť malé kolonie jsou homogenní, na rozdíl od velkých, dlouho rostoucích kolonií, jejichž heterogenita by mohla výsledky analýzy ovlivnit (Maquelin et al., 2003).

Použití Ramanovy mikrospektroskopie pro identifikaci kvasinek bylo testováno pro použití v praxi na pacientech se zánětem pobříšnice (Ibelings et al., 2005). Nejprve byla vytvořena databáze spekter 93 kmenů deseti druhů rodu *Candida* a naměřená spektra byla zpracována pomocí statistických metod. Byla



provedena *PCA* (*principal component analysis*) prvních derivací spekter, výsledky byly použity pro *HCA* a výsledné klastry získané pomocí *HCA* byly použity pro šest po sobě jdoucích lineárních diskriminačních analýz (*linear discrimination analysis, LDA*), které každé vzorové spektrum přiřadily k jednomu z druhů rodu *Candida*. Bylo izolováno 88 vzorků od 45 pacientů se zánětem pobříšnice, z nichž 31 obsahovalo kandidy. Vzorky byly kultivovány v médiu za stejných podmínek jako vzorky databáze po dobu 12 až 14 hodin a bylo naměřeno deset Ramanových spekter z každého vzorku. Průměrná spektra byla zařazena k jednomu z druhů postupem popsaným výše. Úspěšnost diagnózy pomocí Ramanovy mikrospektroskopie byla zjištěna porovnáním s výsledkem klasické mikrobiologické identifikace a byla rovna 90%.

Vzhledem k tomu, že vnitřní obsah buněk je heterogenní, je pro identifikaci dobré naměřit více spekter z různých oblastí buňky, pokud je naše měřená oblast menší než podstatná část buňky (Rösch et al., 2005).

Identifikovat jednotlivé druhy kvasinek lze zřejmě i pomocí povrchem zesíleného Ramanova rozptylu buněčné stěny, na niž byly naadsorbovány stříbrné nanočástice (Culha et al., 2010).

## 2.4 Faktorová analýza

### 2.4.1 Základní myšlenky a pojmy faktorové analýzy

Pojmem faktorová analýza se rozumí vícerozměrná statistická metoda, která v soustavě dat umožní nalézt nejmenší počet proměnných, takzvaných faktorů, kterými lze data charakterizovat, a tyto faktory transformovat do experimentálně nebo teoreticky smysluplných veličin. Do této obecné definice spadá celá škála metod, mezi něž patří například *principal component analysis (PCA)*, *principal factor analysis (PFA)*, *singular value decomposition (SVD)* nebo *nonlinear iterative partial least squares (NIPALS)* pro určení počtu faktorů a *target transformation*, *varimax* nebo *quartimax* pro jejich transformaci (Malinowski, 2002).

Faktorová analýza vznikla a původní uplatnění nalezla v psychologii, podle Harmana (1976) v jejím počátku stál článek Karla Pearsona *On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space* z roku 1901 (Pearson, 1901), spolu s prací Charlese Spearmana "*General Intelligence, Objectively Determined and*

*Measured* z roku 1904 (Spearman, 1904). V přírodních vědách se faktorová analýza začala využívat v 70. letech po vzniku chemometrie (Malinowski, 2002).

Spektroskopickým příkladem úlohy pro faktorovou analýzu je měření spekter  $n$  směsí  $f$  látek v různých poměrech na  $m$  vlnových délkách. Naměřené spektrální charakteristiky, například hodnoty absorbance nebo intenzity Ramanova rozptylu, seřadíme do matice  $D$  velikosti  $m \times n$ , jejíž sloupce odpovídají jednotlivým naměřeným spektrům a řádky vlnočtům, na nichž byla tato spektra měřena. Na počátku měření zpravidla hodnotu  $f$  neznáme, prvním úkolem faktorové analýzy je tedy nalézt hodnotu  $f$  a data transformovat do  $f$  tzv. abstraktních faktorů, které jsou vzájemně ortogonální, data jimi lze jednoznačně popsat, a které sestupně co nejlépe postihují variabilitu v datech ve smyslu nejmenších čtverců (Malinowski, 2002). Abstraktní faktory zpravidla neodpovídají „smysluplným“ faktorům, zmíněným v prvním odstavci této kapitoly, v našem případě spektrům čistých látek, druhým úkolem faktorové analýzy je proto transformovat abstraktní faktory do „smysluplných“ faktorů. V této diplomové práci byla využita pouze první část faktorové analýzy, druhé se zde tedy již dále nebudeme věnovat a místo pojmu „abstraktní faktor“ budeme používat pouze pojem „faktor“.

Výše uvedený problém odpovídá rozkladu matice dat  $D$  do součinu

$$D = RC \tag{18}$$

kde  $R$  je matice velikosti  $m \times f$ , jejíž sloupce tvoří faktory, a  $C$  je matice velikosti  $f \times n$  lineárních koeficientů mezi spektry a faktory. Geometricky si lze hledání faktorů představit jako hledání nových, vzájemně ortogonálních os v prostoru, jehož původní osy tvoří naměřená spektra. Body v prostoru odpovídají měřeným vlnovým délkám. Polohu bodu v prostoru pak určuje hodnota spektrální charakteristiky naměřená na dané vlnové délce v jednotlivých spektrech.

Matematicky lze výše popsany proces hledání faktorů vyjádřit jako vlastní problém (Malinowski, 2002). Hledáme vlastní čísla  $\lambda_i$  a vlastní vektory  $\vec{q}_i$  tzv. kovarianční matice  $Z$ ,

$$Z = D^T D \tag{19}$$

kde horní index  $T$  značí transpozici matice, tedy řešíme rovnici

$$Z\vec{q}_i = \lambda_i \vec{q}_i \tag{20}$$

kde vlastní čísla  $\lambda_i$  řadíme sestupně od největšího k nejmenšímu. Kovarianční matice  $Z$  je reálná a symetrická,  $\bar{q}_i$  jsou tedy ortogonální. Vlastní vektory  $\bar{q}_i$  uvažujeme normalizované. Matice  $Q$ , jejíž sloupce tvoří ortonormální vlastní vektory  $\bar{q}_i$ , je rovna transponované matici  $C$  a matici  $R$  lze spočítat jako součin  $D$  a  $C^T$  (Malinowski, 2002, str. 30 až 31), neboli

$$C = Q^T, R = DC^T \quad (21)$$

V důkazu tvrzení (21) je důležitá normalizace vlastních vektorů, matice  $Q$  a  $C$  jsou pak unitární. Nové osy v našem prostoru pak tvoří sloupce matice  $R$ . Lze ukázat, že seřadíme-li vlastní čísla sestupně, odpovídá tento postup minimalizaci sumy čtverců vzdáleností bodů od nových os (Malinowski, 2002, str. 43 až 45).

Nikdy nemůžeme odhalit faktorů více, než je menší z čísel  $m, n$ . Doporučuje se, aby menší z čísel  $m, n$  bylo alespoň dvojnásobné, než je určený počet faktorů  $f$  (Malinowski, 2002).

V případě ideálního přístroje nám faktorová analýza přesně prozradí počet faktorů, které ovlivňují spektra, a tedy i počet čistých látek, z nichž se směsi skládají. V reálném světě jsou však spektra zatížena chybou danou přesností použitého spektrometru. Faktorová analýza pak najde stejný počet faktorů, jako je menší z čísel  $m$  a  $n$  a skutečný počet faktorů  $f$  je třeba odhadnout.

#### 2.4.2 Rozklad do singulárních hodnot (*singular value decomposition*)

Rozklad do singulárních hodnot, neboli *singular value decomposition* (SVD), je jednou z metod faktorové analýzy. Mějme matici  $D$ , jejíž sloupce odpovídají naměřeným spektrům a řádky vlnovým délkám, na nichž byla spektra měřena. Bez újmy na obecnosti mějme počet spekter  $n$  menší než počet měřených vlnových délek  $m$  a uvažujme reálné měření zatížené chybou. Matici  $D$  vyjádříme jako součin tří matic  $U, W$  a  $V$

$$D = U W V^T \quad (22)$$

kde  $U$  je matice  $m \times n$ ,  $W$  a  $V^T$  jsou matice  $n \times n$ . S veličinami definovanými v předchozí kapitole souvisí tyto matice vztahy

$$\begin{aligned}
UW &= R \\
W &= \text{diag}(\sqrt{\lambda_1}, \dots, \sqrt{\lambda_n}) \\
V^T &= C
\end{aligned} \tag{23}$$

Matice  $W$  je tedy diagonální matice, jejíž prvky  $w_{ii}$  se nazývají singulární hodnoty a jsou rovny odmocninám z vlastních čísel kovarianční matice  $Z$ , seřazených podle velikosti. Matice  $U$  je unitární a její sloupce, tvořící novou bázi, budeme nazývat subspektra,  $i$ -té subspektrum budeme značit  $S_i$ . Vztah (22) můžeme přepsat do tvaru

$$D_{ij} = \sum_{k=1}^n U_{ik} w_{kk} V_{kj}^T = \sum_{k=1}^n V_{jk} w_{kk} U_{ik} \tag{24}$$

Označíme-li  $j$ -té spektrum, tedy  $j$ -tý sloupec matice  $D$ , jako  $Y_j$ , můžeme pomocí rovnice (24) vyjádřit vztah mezi spektry a subspektry jako

$$Y_j(v_i) = \sum_{k=1}^n V_{kj} w_{kk} S_k(v_i) \tag{25}$$

kde  $v_i$  je vlnočet na  $i$ -tém řádku, matice  $V$  je tedy maticí lineárních koeficientů mezi spektry a subspektry.

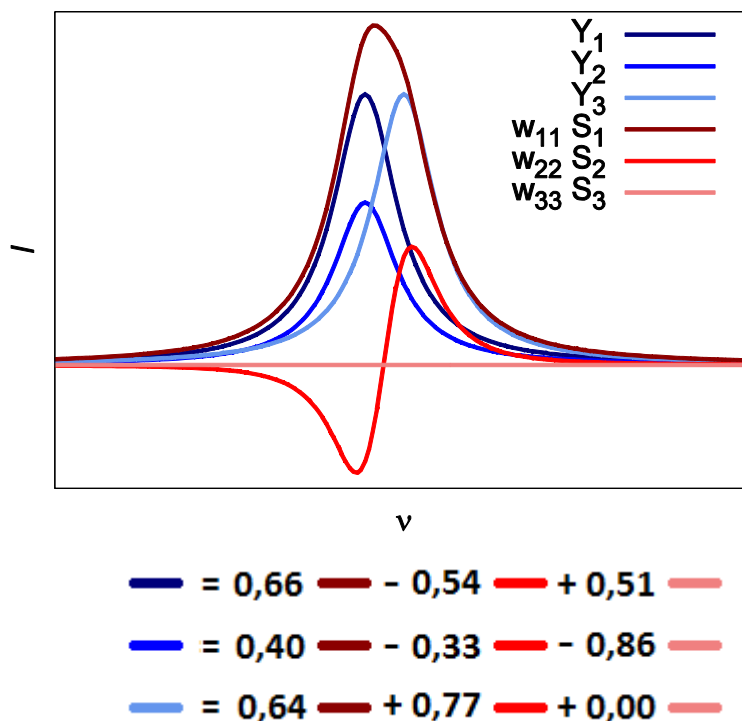
Reziduální chyba  $RE(r)$  udává, nakolik dobře jsou naměřená data modelována prvními  $r$  subspektry, a je definována jako

$$RE(r) = \sqrt{\frac{\sum_{k=r+1}^n w_{kk}^2}{m(n-r)}} \tag{26}$$

Reziduální chyba s rostoucím  $r$  klesá. Pro nezašuměná data bude nulová pro  $r = f$ . V případě zašuměných dat je dobrým odhadem hodnoty  $f$  takové  $r$ , od něhož singulární hodnota a reziduální chyba klesá lineárně.

Na obrázku 12 jsou zobrazeny výsledky faktorové analýzy tří modelových spekter, znázorněných křivkami v odstínech modré. Každé z těchto spekter má jeden pás. Druhé spektrum je oproti prvnímu méně intenzivní, třetí je proti prvnímu posunuté. Subspektra násobená příslušnou singulární hodnotou (viz rovnici (25)) jsou znázorněna křivkami v odstínech červené, seřazena jsou od nejtmavšího po nejsvětější. Vidíme, že první subspektrum vyjadřuje „průměr“ všech tří spekter, druhé subspektrum pak zvýrazňuje jejich rozdíl. Třetí singulární hodnota je nulová, což je v souladu s očekáváním. Spektra 1 a 2 jsou lineárně závislá, odpovídají téže

látce, pouze měřené v různé koncentraci, počet faktorů je tedy roven dvěma. V dolní části obrázku je graficky znázorněna matice  $V$ .



**Obrázek 12:** Model tří spekter (modře) a jejich rozklad pomocí SVD (červeně).  $Y_i$  jsou spektra,  $w_{ii}S_i$  subspektra násobená příslušnou singulární hodnotou. Ve spodní části obrázku je graficky znázorněna matice  $V$ .

# 3 Experimentální část

## 3.1 Použité spektrometry

### 3.1.1 Konfokální Ramanův mikrospektrometr

Spektra kvasinek byla měřena na konfokálním Ramanově mikrospektrometru LabRAM HR800 (Horiba Jobin-Yvon). Jako excitační zdroj jsme použili helium-neonový laser o vlnové délce 632,8 nm, tato vlnová délka se z nabízených možností (448, 514,5, 632,8 a 785 nm) ukázala jako nejvhodnější. Výkon na vzorku byl 3 až 8 mW.

Spektrometr je vybaven konfokálním mikroskopem Olympus BX40. Pro měření spekter vakuol kvasinek byl použit objektiv s olejovou imerzí (Olympus) o stonásobném zvětšení a s numerickou aperturou  $NA = 1,3$ . Index lomu imerzního oleje byl 1,58. Při měření byla volena velikost konfokální clony 200  $\mu\text{m}$  a šířka vstupní štěrbinu spektrografu 100  $\mu\text{m}$ . Spektrograf konfigurace Czerny-Turner dává rovnoměrné rozložení intenzity na výstupu, jeho ohnisková vzdálenost je 800 mm. Spektrograf je vybaven otočným držákem, do kterého lze najednou umístit dvě difrakční mřížky. Spektra zahrnutá do této práce byla měřena s mřížkou o 600 vrypoch/mm a s mřížkou o 300 vrypoch/mm.

Spektra byla standardně měřena v rozsahu 600 až 3900  $\text{cm}^{-1}$ . Celý tento rozsah se při použitých mřížkách a excitační vlnové délce nevejde na detektor. Řídící program spektrometru *LabSpec* (Horiba Jobin-Yvon) však umožňuje měření v režimu *Extended range*, v němž je spektrum měřeno po několika částech, které se překrývají. Při použití mřížky o 600 vrypoch/mm bylo spektrum v tomto rozsahu měřeno na čtyři části, při použití mřížky o 300 vrypoch/mm bylo spektrum měřeno na dvě části.

Ke spektrometru jsou připojeny dva různé CCD detektory, Synapse (back-illuminated, deep depletion) a Symphony (front-illuminated) od firmy Horiba o 1024×256 pixelech. Oba detektory jsou chlazené kapalným dusíkem na teplotu  $-129^\circ\text{C}$ . Detektor Synapse má v červené oblasti spektra vyšší kvantovou účinnost, je proto při excitaci laserem o vlnové délce 632,8 nm vhodnější. Byl však ke spektrometru instalován až lednu roku 2013. Pro velkou část měření byl proto

používán méně citlivý detektor Symphony. Specifikace použité mřížky a detektoru je pro jednotlivé experimenty uvedena v kapitole 3.6.

Mikroskop je vybaven barevnou kamerou pro vizuální pozorování vzorku osvětleného bílým světlem zespoda či shora. Vzorek se umísťuje na mikroskopický stolek s možností počítačem řízeného posuvu v  $x$  a  $y$  směru. Pro naše účely byl stolek ovládán ručně, neboť pro řízení polohy kvasinek nebyl automatický posuv dost přesný a spolehlivý

Doba expozice při měření spekter byla  $5 \times 10$  s, tedy každý úsek spektra byl měřen pětkrát. Celkově měření jednoho spektra trvalo přibližně 3 minuty 45 sekund (mřížka o 600 vrypech/mm) resp. 1 minutu 50 sekund (mřížka o 300 vrypech/mm).

Pro účely kalibrace vlnočtové škály byla měřena spektra neonové výbojky a křemíkové destičky, při kalibračních měřeních byla volena šířka konfokální clony  $100 \mu\text{m}$  a doba expozice  $10 \times 1$  s.

Rozlišení v laterálním směru odhadujeme podle vzorce (16) jako  $210 \text{ nm}$ . Rozlišení v axiálním směru, dané „konfokality“ definovanou v kapitole 2.3.3, odhadujeme na základě námi použitého nastavení spektrometru, manuálu ke spektrometru (Horiba Jobin-Yvon, HR800 User Manual, 2005) a článku (Huang et al., 2005) jako  $2 \mu\text{m}$ .

### **3.1.2 Ramanův spektrometr**

Spektra fosfátových sloučenin byla měřena pomocí modulárního Ramanova spektrografu Jobin-Yvon-Spex 270M. Excitačním zdrojem byl diodami čerpaný pevnolátkový Nd:VO<sub>4</sub> laser s emisí na vlnové délce  $532 \text{ nm}$ . Používaný výkon laseru na výstupu byl  $200 \text{ mW}$ . Excitační paprsek procházel vertikálně leštěným dnem kyvety a rozptýlené záření bylo sbíráno pod úhlem  $90^\circ$ . Po průchodu přes holografický zářezový filtr pro eliminaci Rayleighova rozptylu (Kaiser Optics) bylo rozptýlené záření objektivem zaostřeno na vstupní štěrbinu spektrografu o šířce  $60 \mu\text{m}$ . Ohnisková vzdálenost spektrografu je  $270 \text{ mm}$ . Záření bylo rozkládáno mřížkou o 1200 vrypech/mm a snímáno CCD detektorem (Princeton Instruments) o  $1340 \times 100$  pixelech. Spektrum bylo měřeno v rozsahu  $312$  až  $2517 \text{ cm}^{-1}$ . Doba měření byla  $6 \times 5$  s, každé spektrum bylo navíc měřeno šestkrát, celková doba měření jednoho vzorku tedy byla přibližně 3 minuty.

Za účelem kalibrace vlnočtové škály bylo měřeno spektrum neonové výbojky s akvizičním časem  $100 \times 1$  s. Kalibrace osy u těchto měření byla prováděna

pomocí programu NeokalSpex2, jehož autorem je doc. RNDr. Jiří Bok, CSc., z Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy.

### 3.2 Vzorky *C. albicans*

Kvasinky *C. albicans* byly kultivovány na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky v Praze Mgr. Václavou Bauerovou. Na Fyzikální ústav Univerzity Karlovy byly převezeny vždy před měřením. Použit byl klinicky izolovaný kmen HE 169 z mykologické sbírky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Kvasinky rostly za teploty 37°C a za aerobních podmínek a byly kultivovány třemi různými způsoby. V prvním případě rostly 18 hodin v plném YPD médiu (z anglického *yeast extract*, *peptone*, *dextrose*), které obsahuje pepton (2%), glukózu (2%) a kvasinkový extrakt (*yeast extract*, 1%). Po kultivaci byly v pozdní exponenciální fázi růstové křivky (Václava Bauerová, osobní sdělení, 2012). Takto rostlé buňky budeme nazývat „log buňky“.

Ve druhém případě rostly buňky v médiu YPD 14 hodin do střední exponenciální fáze, poté byly dvakrát promyty vodou a převedeny do čerstvého YPD média, kde rostly další 4 hodiny tak, že na konci kultivace byly v lag fázi růstové křivky (Václava Bauerová, osobní sdělení, 2012). Tyto buňky budeme nazývat „lag buňky“ nebo také „YPD buňky“.

Ve třetím případě rostly buňky opět 14 hodin v YPD médiu do střední exponenciální fáze a po promytí byly převedeny do YNB média (*Yeast nitrogen base* bez síranu amonného a aminokyselin), které obsahuje glukózu (2%) a zdroje potřebných anorganických prvků, neobsahuje však zdroj dusíku. Do tohoto média byl přidán prolin (výsledná koncentrace 100 µM) jakožto jediný zdroj dusíku. V YNB rostly buňky další čtyři hodiny opět do lag fáze (Václava Bauerová, osobní sdělení, 2012). Takto kultivované buňky budeme nazývat „YNB buňky“. Prolin je pro kvasinky špatným zdrojem dusíku (Oliver et al., 2008), YNB buňky jsou tedy vystaveny metabolickému stresu.

Na konci kultivace byly zkumavky s buněčnou suspenzí uloženy do ledu a převezeny na Fyzikální ústav Univerzity Karlovy, kde byly okamžitě zahájeny experimenty.

Při přípravě vzorku pro Ramanovu mikrospektroskopii bylo 100 µl buněčné suspenze centrifugováno (1000×g, 2 minuty), supernatant odstraněn, peleta byla



rozpuštěna ve 100  $\mu\text{l}$  destilované vody a znovu centrifugována a poté rozpuštěna ve 20  $\mu\text{l}$  vody. Na podložní sklíčko bylo přeneseno 2,6  $\mu\text{l}$  resp. 0,6  $\mu\text{l}$  suspenze, kapka byla překryta krycím sklíčkem, poklepem roztažena po celé ploše krycího sklíčka, to bylo přitlačeno na podložní sklíčko a okraje byly natřeny bezbarvým lakem na nehty.

Sklíčko s fixovanými buňkami bylo používáno pro měření ne déle než 1,5 hodiny, poté byl připraven nový vzorek. Celkově měření s ohledem na stárnutí buněk netrvalo déle než 5 hodin.

Byly použity dva druhy podložních a krycích skel – nízkofluorescenční podložní sklíčka Borofloat (Schott Nexterion) spolu s klasickými skleněnými krycími sklíčky a křemenná podložní sklíčka (UQG Optics) spolu s křemennými krycími sklíčky, vyrobenými na Oddělení optických technologií MFF UK. Tyto typy sklíček byly voleny s ohledem na co nejnižší fluorescenci a vysokou optickou propustnost pro rozptýlené záření.

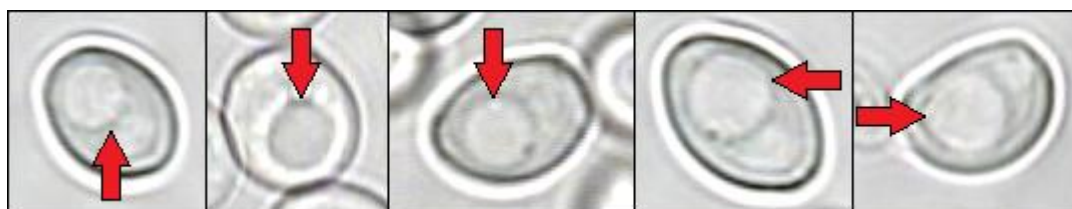
V obou případech byla sklíčka pokryta poly-L-lysinem. Poly-L-lysin jakožto polykation elektrostaticky přitahuje záporně nabitou buněčnou stěnu kvasinek a pomáhá tak udržovat buňky v průběhu měření v nehybnosti. Použití poly-L-lysinem pokrytých skel v kombinaci s přitlakem krycího skla a s objemem suspenze voleným tak, aby se kvasinky nacházely právě v jedné vrstvě, se osvědčilo pro udržení nehybnosti kvasinek. Při objemu 2,6  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze a rozměrech krycího skla 18×18 mm je tloušťka vrstvy mezi sklíčky přibližně 8  $\mu\text{m}$ , do této vrstvy se dvě kvasinky nad sebe nevejdou. Analogicky byl volen objem 0,6  $\mu\text{l}$  pro menší křemenná skla. Postup přípravy roztoku poly-L-lysinu a pokrývání sklíček je popsán v příloze A.

Vakuola byla v buňce rozeznána pohledem coby velká okrouhlá organela, laser byl zaostřen do jejího středu. Několik buněk se šipkou vyznačenými vakuolami je zobrazeno na obrázku 13.

Nehybnost buňky v průběhu měření byla kontrolována porovnáním pozice buňky po měření s fotografií buňky před měřením. V případě, že se buňka v průběhu měření pohnula, bylo naměřené spektrum vyřazeno z dalšího zpracování.

Ostření doprostřed vakuoly bylo kontrolováno na základě poměru intenzit pásu vibrací CH skupin okolo 2940  $\text{cm}^{-1}$  a pásu vibrací vody na 3400  $\text{cm}^{-1}$  (Socrates, 2001). Vibrace skupin CH pocházejí velkou měrou od lipidů vakuolární membrány.

V případě, že byl pás vibrací CH skupin vyšší než pás vody, bylo naměřené spektrum z dalšího zpracování vyřazeno.



**Obrázek 13:** Mikrofotografie buněk. Vakuoly jsou vyznačeny červenými šipkami.

### 3.3 Použité chemikálie

Použité chemikálie včetně výrobce a čistoty jsou uvedeny v tabulce 2.

Poly-L-lysin hydrobromid ( $M_r = 30\ 000 - 70\ 000$ )	Sigma-Aldrich	Premium
Hexametafosfát sodný	Fluka	Purum, 65–70% $P_2O_5$
Trimetafosfát trisodný	Sigma-Aldrich	≥ 95%
Trifosfát sodný pentabasický	Sigma-Aldrich	Purum p. a., ≥ 98%
Dekahydrát tetrabasického pyrofosfátu sodného	Sigma-Aldrich	Puriss. p. a., ≥ 99%
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	Fluka	≥ 99%
$FeCl_2 \cdot 4 H_2O$	Sigma-Aldrich	≥ 99%
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Fluka	≥ 99%
NaCl	Fluka	≥ 99,5%
KCl	Fluka	≥ 99,5%
$ZnCl_2$	Sigma-Aldrich	≥ 98%

**Tabulka 2:** Použité chemikálie, jejich výrobce a čistota

### 3.4 Úprava naměřených spekter

Naměřená spektra bylo třeba před jejich vyhodnocováním upravit – odečíst fluorescenční pozadí, intenzitně je normalizovat a odečíst spektrum vody. Všechny tyto kroky byly prováděny v programu *Background* napsaném v prostředí *Matlab*, jehož autorem je Mgr. Jan Palacký, PhD., z Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy v Praze.

Fluorescenční pozadí je výraznou, avšak nezajímavou spektrální črtou a jeho průběh se u jednotlivých buněk může lišit. V případě, že ho neodečteme, promítne se jeho variabilita do faktorové analýzy Ramanových spekter a získaná subspektra jím budou významně ovlivněna.

Fluorescenční pozadí bylo v programu *Background* odečítáno pro jednotlivá subspektra, nikoliv pro spektra. Korekce v subspektrech je pak zpětně promítnuta do jednotlivých spekter na základě koeficientů  $V_{ij}$ , díky tomu je pozadí ode všech spekter odečteno ekvivalentním způsobem. Další výhodou tohoto postupu je, že se snižuje počet korekcí, které je nutné provést. Oproti korekcím desítek či stovek spekter stačí provést korekci pozadí několika prvních subspekter, zpravidla mezi deseti a dvaceti.

Pozadí bylo v programu *Background* odečítáno manuálně. V programu je možné vyznačit body, jimiž je prokládána polynomiální funkce určeného stupně anebo jimiž prochází křivka kubických splinů (tj. funkcí derivovatelných až do třetí derivace). Tyto křivky pak definují pozadí. Ukázka korekce pozadí prvního a druhého subspektra je zobrazena na obrázcích 14 a 15, v obrázcích je pro přehlednost vyznačena i nulová hladina na vertikální ose. Singulární hodnoty a residuální chyby prvních dvaceti pěti subspekter bez korekce pozadí a po korekci pozadí jsou zobrazeny na obrázcích 16 a 17. Z obrázku 17 je patrné, že po korekci se snižují residuální chyby vyšších subspekter. Jak již bylo řečeno v kapitole 2.4.2, lze předpokládat, že subspektra, jejichž singulární hodnoty a residuální chyby vykazují lineární závislost, odpovídají již pouze experimentální chybě, nikoliv spektrálním charakteristikám vzorku. Singulárními hodnotami osmého až dvacátého pátého subspektra po korekci pozadí v obrázku 16 a residuálními chybami subspekter 15 až 25 po korekci pozadí v obrázku 17 byla proložena přímka. Z obrázku 16 je patrné, že singulární hodnoty bez korekce pozadí se od této přímky odchylují minimálně pro subspektra 8 až 11, možná též pro dvě další. Podobně v obrázku 17 se residuální hodnoty nekorigovaných subspekter odchylují od přímky regrese pro více subspekter než v situaci po korekci pozadí. Korekce pozadí nás tak zbaví nadbytečné a nezajímavé variability v datech.

Dalším krokem v úpravě spekter je jejich intenzitní normalizace. Lze předpokládat, že relativní rozdíly v koncentraci vody v jednotlivých vakuolách jsou minimální. Spektra byla proto normalizována na pás valenčních vibrací vody v oblasti  $3100$  až  $3900\text{ cm}^{-1}$ . Normalizace byla provedena v programu *Background*

pomocí prvních koeficientů  $V_{1i}$  faktorové analýzy výřezu spekter s korigovaným pozadím ve výše uvedené oblasti.

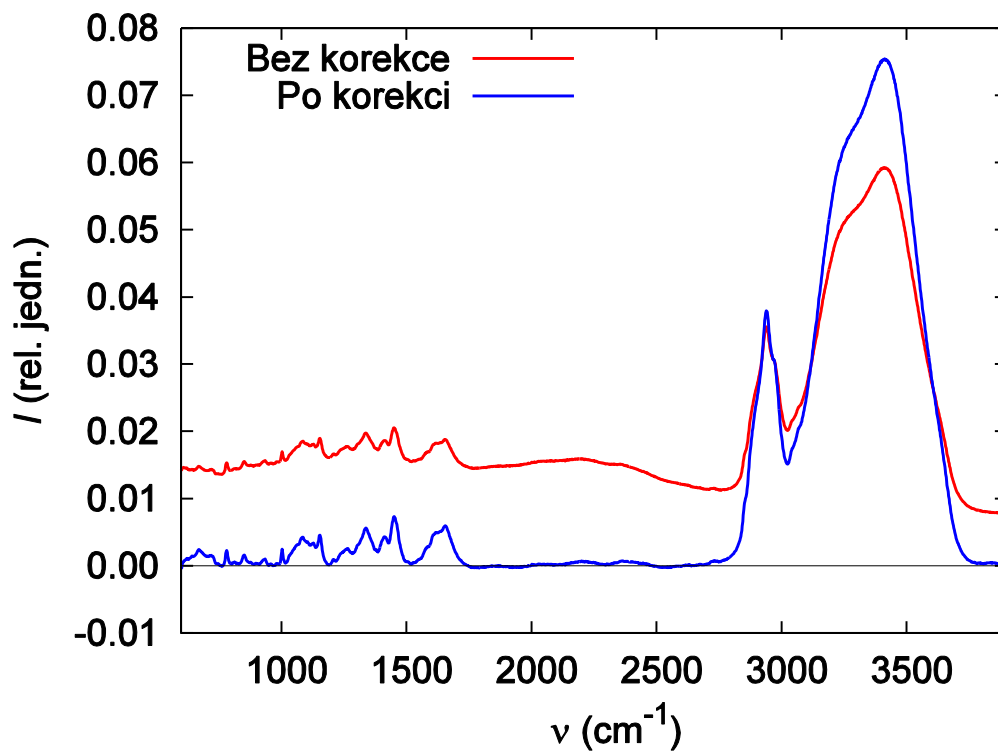
Posledním krokem úpravy byl odečet spektra média. Médium – tedy okolní prostředí buněk – tvořila destilovaná voda. Médium bylo měřeno s třikrát až čtyřikrát delšími akvizičními časy, aby se zlepšil poměr signál/šum. Bylo měřeno vícekrát a byla provedena faktorová analýza těchto měření. Výsledné první subspektrum bylo přenásobeno polovinou první singulární hodnoty a bylo vyhlazeno gaussovským filtrem podle vzorce

$$\tilde{d}(x_j) = \frac{1}{2^{N-1}} \sum_{i=0}^{N-1} \binom{N-1}{i} \cdot d(x_{j+i-(N-1)/2}) \quad (27)$$

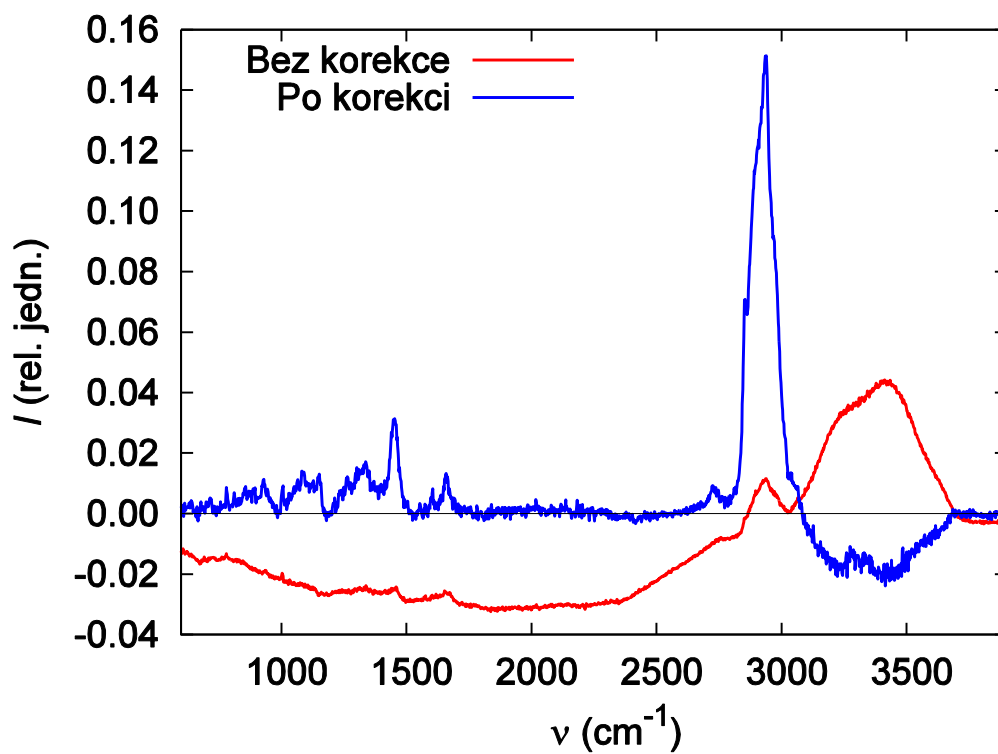
kde  $\tilde{d}(x_j)$  je nová hodnota spektra v bodě  $x_j$ ,  $N$  je liché číslo a  $d(x_{j+i-(N-1)/2})$  je spektrum v bodě  $x_{j+i-(N-1)/2}$ . Bylo voleno  $N = 31$ , bylo-li to třeba, bylo spektrum vyhlazeno dvakrát po sobě. Příklad vyhlazeného a nevyhlazeného spektra média je zobrazen na obrázku 18. Vzhledem k tomu, že nebyly zjištěny rozdíly ve spektrech média pro *YPD* a *YNB* buňky ani pro *lag* a *log* buňky, bylo odečítáno pro všechna spektra v rámci jednoho souboru (viz kapitolu 3.6) stejné spektrum média.

Odečet fluorescenčního pozadí výsledného vyhlazeného spektra média a jeho normalizace byla prováděna současně se spektry buněk. Kromě pásů vody se odečtem média zbavíme též případných pásů pocházejících z podložního a krycího sklíčka.

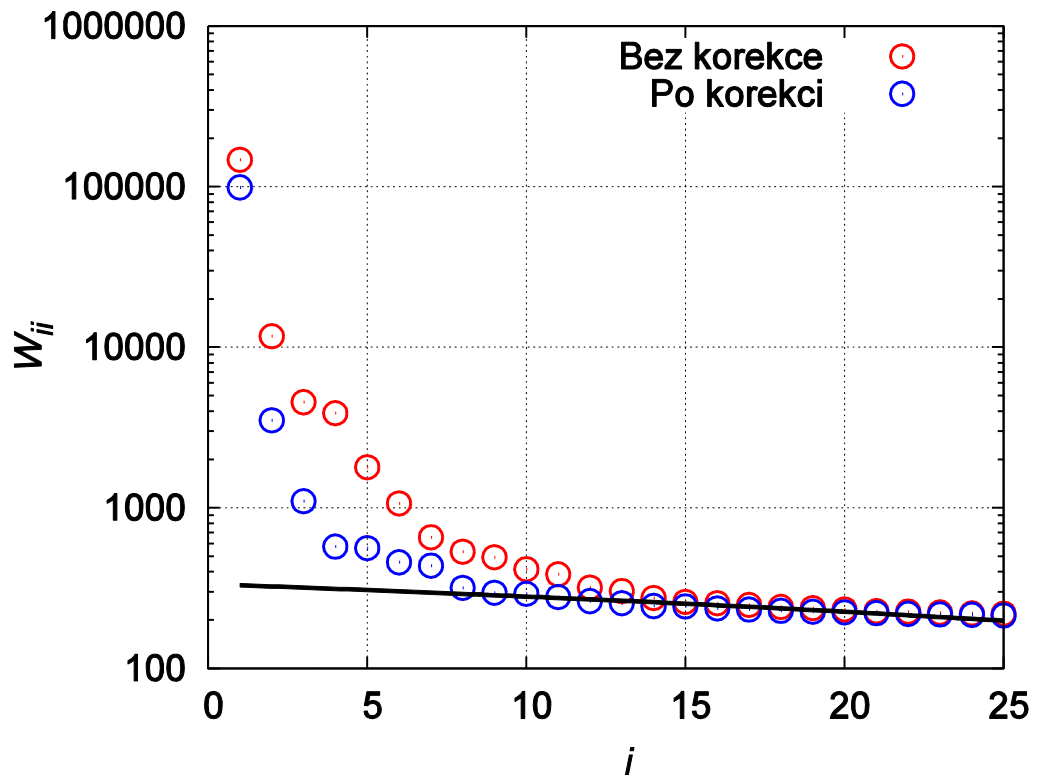
Takto upravená spektra je možné použít pro další analýzu. V případě, že byla dále zpracovávána pouze určitá oblast spekter, byla zpravidla provedena ještě jedna přesnější korekce pozadí pouze této oblasti.



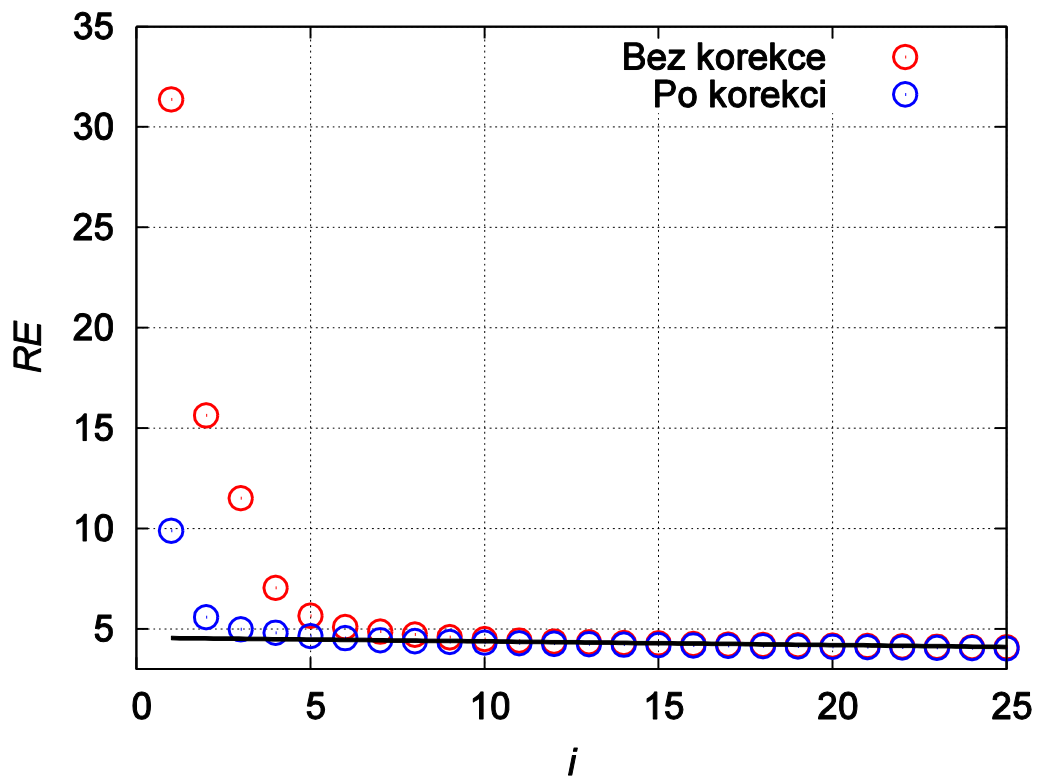
Obrázek 14: Příklad korekce fluorescenčního pozadí prvního subspektra



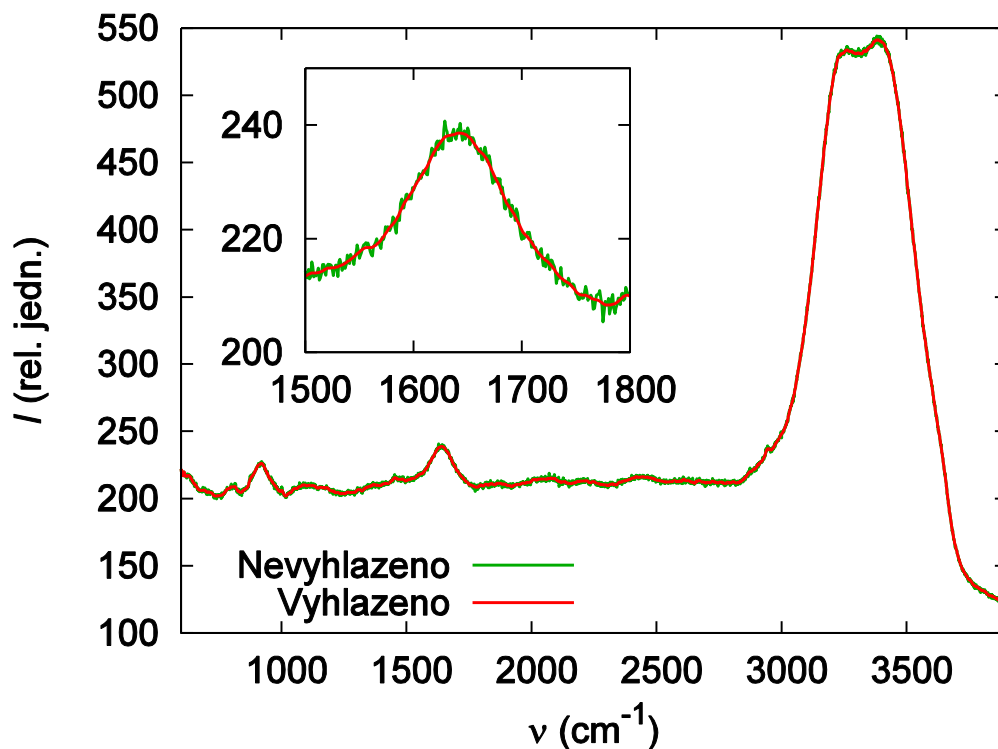
Obrázek 15: Příklad korekce fluorescenčního pozadí druhého subspektra



Obrázek 16: Singulární hodnoty subspekter bez korekce a po korekci. Přímkou je vyznačena lineární regrese bodů 8 až 25 po korekci. Vertikální škála je logaritmická



Obrázek 17: Residuální chyby subspekter bez korekce a po korekci. Přímkou je vyznačena lineární regrese bodů 15 až 25 po korekci



**Obrázek 18:** Výsledné spektrum média před vyhlazením (zeleně) a po dvakrát za sebou provedeném vyhlazení podle vzorce (27) (červeně)

### 3.5 Porovnání spekter měřených v různé dny

V případě, že chceme vzájemně porovnávat série spekter naměřené v různé dny na Ramanově mikrospektrometru v režimu *Extended range*, je třeba před samotnou úpravou spekter dát vlnočtové škály spekter jednotlivých sérií do vzájemného souladu. Při měření v režimu *Extended range* se totiž mřížka spektrografu v průběhu měření hýbe a existuje riziko, že při návratu nebude její poloha zcela stejná jako před měřením. Tato odchylka se pak projeví jako drobný spektrální posuv celého spektra, který faktorová analýza vyhodnotí jako spektrální rozdíl.

Kalibrace a zesouladění vlnočtové škály spekter probíhalo třemi různými způsoby: pomocí spekter neonové výbojky měřených v režimu *Extended range* před experimentem a po experimentu, pomocí spekter křemíku měřených před experimentem a po experimentu (v tomto případě nebyl použit režim *Extended range*) a pomocí pásu dýchací vibrace fenylalaninu na  $1003\text{ cm}^{-1}$  v samotných spektrech buněk, o kterém se předpokládalo, že jeho poloha je invariantní vůči chemickým rozdílům ve složení vakuol. V prvních dvou případech byla vždy provedena faktorová analýza kalibračních spekter naměřených před

a po experimentu. Ve třetím případě byla provedena faktorová analýza oblasti  $994\text{ cm}^{-1}$  až  $1014\text{ cm}^{-1}$  všech spekter buněk naměřených v jednom dni a porovnávána byla první subspektra po korekci pozadí.

Ve všech třech případech byla výsledná kalibrační spektra pro jednotlivé dny porovnávána v programu *xshift*, napsaném v prostředí *Matlab*, jehož autorem je Mgr. Jan Palacký, PhD. Tento program porovnává mezi sebou testované a referenční spektrum a hledá takový posun vlnočtové škály testovaného spektra, aby rozdíl referenčního a intenzitně přeškálovaného testovaného spektra byl co nejmenší ve smyslu nejmenších čtverců. Vlnočtové škály spekter buněk pak byly opraveny o stejnou hodnotu, jakou program *xshift* našel pro posun vlnočtových škál kalibračních spekter. Stejným způsobem byla korigována vlnočtová škála spekter médií.

Porovnali jsme mezi sebou všechny tři způsoby kalibrace vlnočtové škály. Vzhledem k pohybům mřížky v režimu *Extended range* se mohou mezi sebou mírně lišit vlnočtové škály i u spekter měřených v tentýž den a průměrný posun vlnočtové škály nemusí odpovídat průměru posunu před a po experimentu. Jako nejvhodnější se nám tedy jeví kalibrace vlnočtové škály spekter na základě faktorové analýzy oblasti  $994$  až  $1014\text{ cm}^{-1}$ .

Koeficienty matice  $V_{2i}$  pro druhá subspektra úzkých pásů na  $780\text{ cm}^{-1}$  a na  $1003\text{ cm}^{-1}$  odpovídají posuvům těchto pásů na vlnočtové škále, viz obrázek 12. Při sesazení vlnočtové škály na základě faktorové analýzy oblasti  $994$  až  $1014\text{ cm}^{-1}$  se rozdíl středních hodnot koeficientů  $V_{2i}$  pro různé dny jeví ve většině případů jako statisticky nevýznamné podle Studentova t-testu, viz kapitulu 3.7.

V počátku této práce jsme spektra měřili v rozsahu  $500$  až  $3900\text{ cm}^{-1}$ , poté jsme přešli k rozsahu  $600$  až  $3900\text{ cm}^{-1}$ , neboť pak se oblast  $600$  až  $1740\text{ cm}^{-1}$  měří v režimu *Extended range* najednou. Na různých rozsazích neodpovídají středy pixelů detektoru stejné hodnotě vlnočtu, což je ovšem podmínkou použití faktorové analýzy. Abychom mohli mezi sebou porovnat spektra měřená na obou rozsazích, provedli jsme pomocí programu *Octave* lineární interpolaci spekter tak, aby hodnoty na vlnočtové škále spekter byly totožné. Spektrální difference sousedních pixelů po interpolaci byla  $1\text{ cm}^{-1}$ . V případě měření s mřížkou o  $300$  vrypech/mm jsme měřili vždy od  $600\text{ cm}^{-1}$ , provádět interpolaci tedy nebylo nutné. Spektrální difference je v tomto případě  $1,92\text{ cm}^{-1}$ .



### 3.6 Soubory buněk

V této práci budeme používat označení soubor 1 pro porovnání *log* a *lag* buněk a soubor 2 a 3 pro porovnání *YPD* buněk (rostlých do *lag* fáze) a *YNB* buněk. Tyto parametry měření a úpravy spekter, které se pro jednotlivé soubory liší, jsou zaznamenány v tabulce 3.

S.	Porovnávané buňky	Sklička		Mřížka (vrypů/mm)	Detektor	Interp.	$\Delta\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
		Podložní	Krycí				
1	<i>Lag</i> a <i>log</i>	Nexterion	Běžné	600	Symphony	Ano	1
2	<i>YPD</i> a <i>YNB</i>	Nexterion	Běžné	600	Symphony	Ano	1
3	<i>YPD</i> a <i>YNB</i>	Křemenné	Křemenné	300	Synapse	Ne	1,92

**Tabulka 3:** Parametry měření a úpravy spekter pro všechny tři soubory (S.): porovnávané buňky, použitá sklička, mřížka a detektor, provedení interpolace (Interp.) a výsledná spektrální diference ( $\Delta\nu$ )

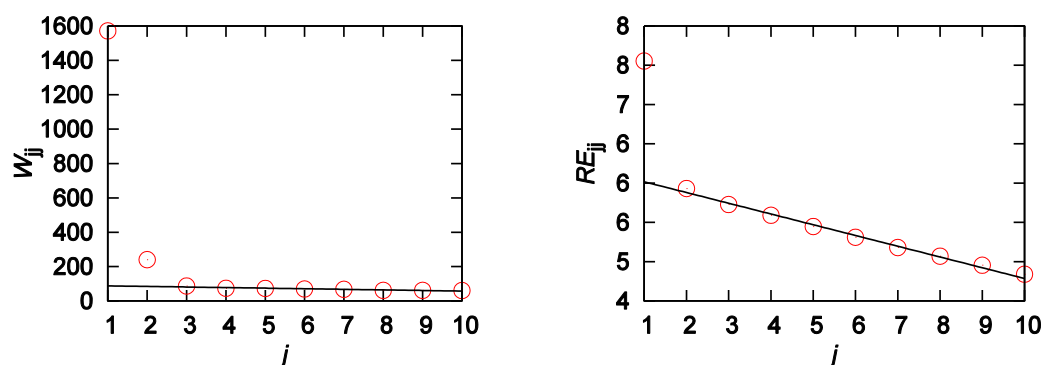
### 3.7 Statistická významnost odlišností ve spektrech

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami buněk byly porovnávány na základě koeficientů  $V_{ij}$  matice  $V$  příslušného subspektra. V kapitole 4 uvádíme vždy střední hodnotu tohoto koeficientu pro *lag* resp. *log* buňky nebo pro *YPD* a *YNB* buňky, tyto skupiny označujeme dolním indexem. Uváděná chyba je výběrová směrodatná odchylka. Ke zhodnocení statistické významnosti rozdílů pozorovaných mezi *lag* a *log* resp. *YPD* a *YNB* buňkami používáme Studentův t-test (viz například Meloun a Militký, 2004), uvažujeme hladinu významnosti  $q = 99\%$ . V kapitole 4 udáváme vždy hodnotu  $p = 1 - q$ , tedy pravděpodobnost, že skutečná střední hodnota daného koeficientu dvou skupin buněk je i přes naměřený rozdíl shodná. Výsledky t-testu byly získány pomocí funkce *ttest* v programu *Microsoft Excell*.

### 3.8 Určování polohy maxima pásu polyfosfátu

Pro účely přesnějšího určení polohy pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrační polyfosfátu okolo  $1155 \text{ cm}^{-1}$  (Bednářová et al., 2012) byl tento pás modelován v jednotlivých spektrech prvními dvěma subspektry faktorové analýzy oblasti  $1130$  až  $1180 \text{ cm}^{-1}$  po korekci pozadí – spektrum bylo vypočteno podle vzorce (25) pro  $n = 2$ . Vyšší subspektra představují

v případě tohoto pásu již jen experimentální chybu, jak naznačují grafy singulárních hodnot a residuálních chyb na obrázku 19 pro příklad souboru 1.



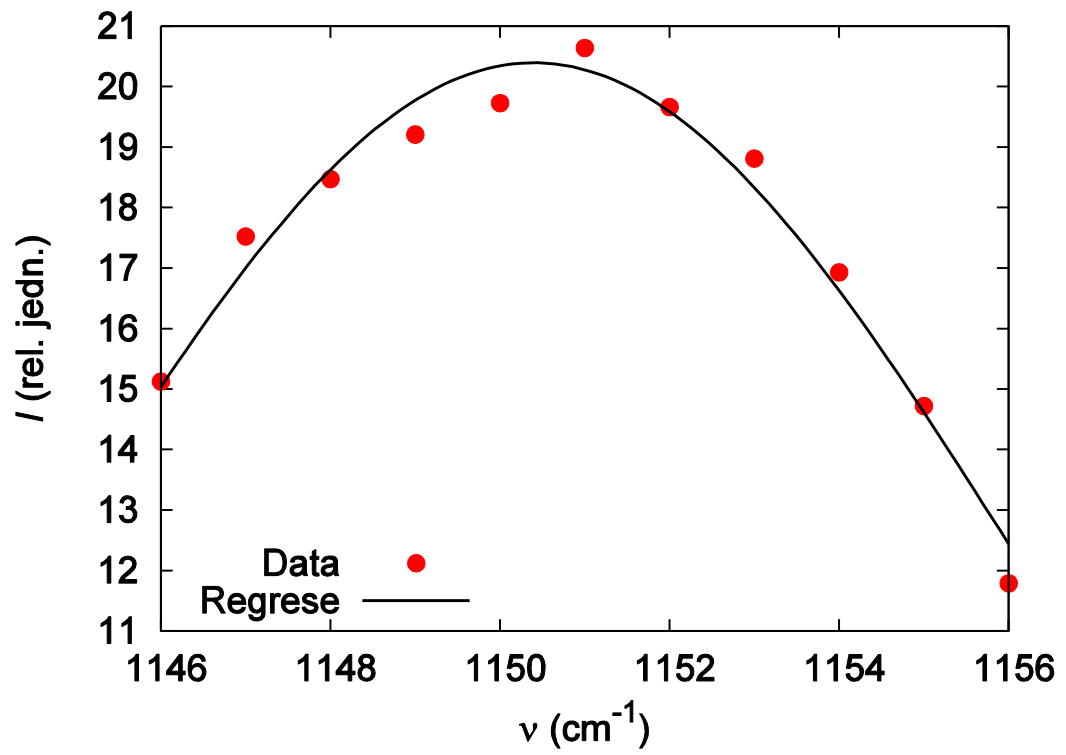
**Obrázek 19:** Singulární hodnota (vlevo) a residuální chyba (vpravo) faktorové analýzy oblasti 1130 až 1180  $\text{cm}^{-1}$  souboru 1. Zobrazené jsou hodnoty pouze pro prvních deset subspekter a přímka lineární regrese pro  $j = 3$  až 10

V takto upravených spektrech bylo nalezeno maximum pásu a jedenáct bodů okolo tohoto maxima bylo v programu Gnuplot proloženo Gaussovou funkcí

$$f(x) = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (28)$$

kde  $\mu$  je poloha maxima na vlnočtové škále,  $A$  má vztah k výšce křivky a  $\sigma$  má vztah k pološířce křivky. Příklad tohoto prokládání je zobrazen na obrázku 21. Takto získaná hodnota  $\mu$  pro nás představuje polohu pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrační polyfosfátu.

V případě určování maxima hexametafosfátu a trimetafosfátu (kapitola 4.3) bylo maximum a jedenáct bodů okolo něho nalezeno přímo v naměřených spektrech po korekci fluorescenčního pozadí, těchto jedenáct bodů bylo opět proloženo Gaussovou funkcí (28) a poloha pásu byla získána coby výsledná hodnota  $\mu$  regrese.



*Obrázek 20: Příklad prokládání Gaussovy funkce jedenácti body okolo maxima pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu*

## 4 Výsledky

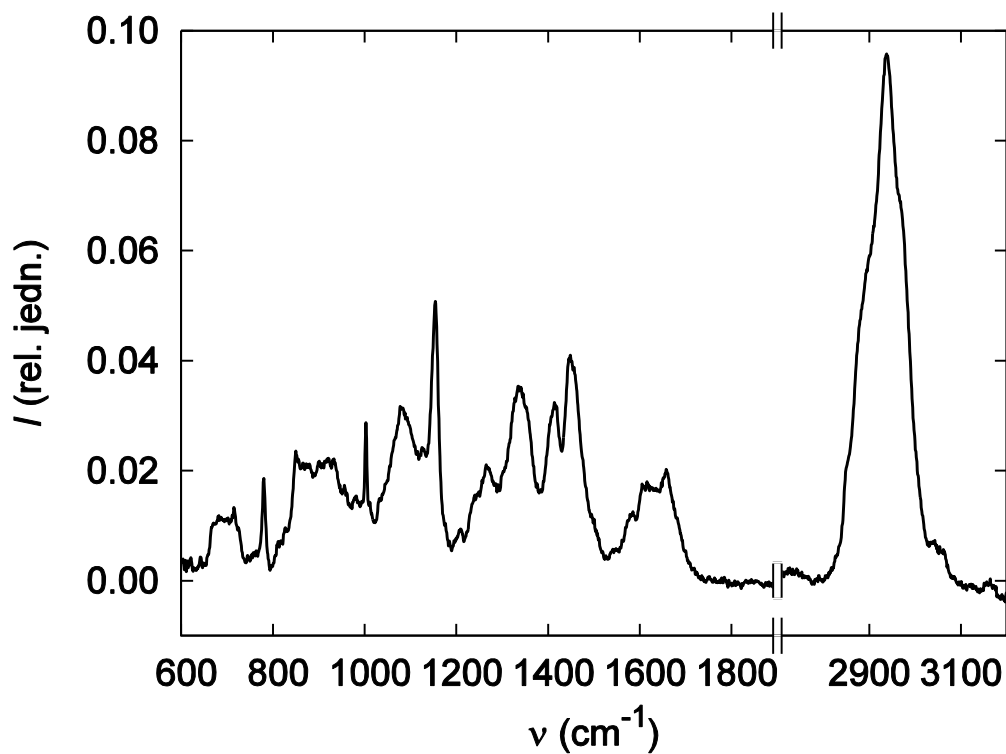
### 4.1 Obsah vakuol buněk v různé fázi růstu kultury

Prvním úkolem této diplomové práce bylo porovnat mezi sebou spektra vakuol buněk v různých fázích růstu buněčné kultury – v lag fázi a v exponenciální, neboli log fázi. Buňky označujeme, ve shodě s kapitolou 3.2 a 3.6, jako *lag* resp. *log* buňky. Podmínky kultivace, nastavení Ramanova mikrospektrometru, úprava a vyhodnocení spekter jsou popsány v kapitolách 3.1.1, 3.2 a 3.4 až 3.7. Celkově jsme porovnávali 80 spekter *lag* buněk ze čtyř měřících dnů s 56 spektry *log* buněk, naměřených před začátkem této práce, a s pěti dalšími spektry *log* buněk z jednoho měřícího dne, celkově tedy s 61 spektry *log* buněk. Těchto 141 spekter tvoří soubor 1 z kapitoly 3.6.

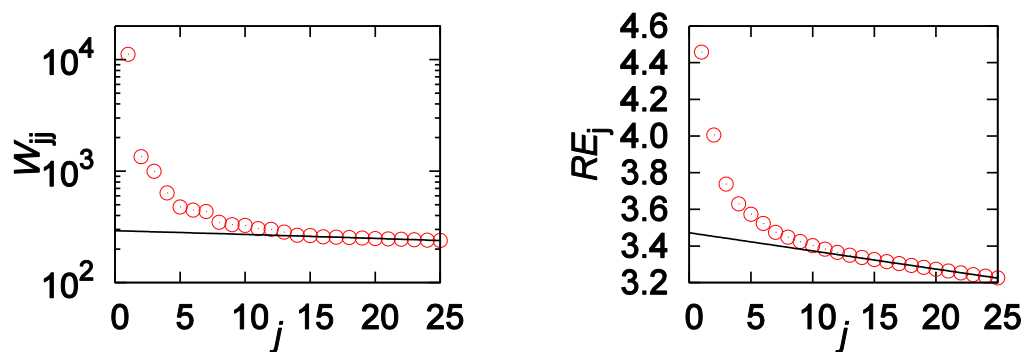
První subspektrum faktorové analýzy souboru 1, představující „průměrné“ spektrum celého souboru, je zobrazeno v grafu na obrázku 21. Grafy prvních 25 singulárních hodnot a residuálních chyb jsou uvedeny na obrázku 22. Dále byla provedena faktorová analýza oblasti  $600\text{ cm}^{-1}$  až  $1800\text{ cm}^{-1}$  („*fingerprint region*“) a bylo znovu odečteno pozadí, první subspektrum s popsányi nejdůležitějšími pásy je zobrazeno na obrázku 23. První subspektra zvlášť provedené faktorové analýzy *lag* a *log* buněk v oblasti  $600$  až  $1800\text{ cm}^{-1}$  po korekci pozadí jsou zobrazena na obrázku 24.

Dále byly zpracovávány zvlášť jednotlivé oblasti spekter. Výsledky faktorové analýzy těchto oblastí jsou uvedeny na obrázcích 25 až 30, uvádíme vždy nejdůležitější subspektra a k nim příslušné koeficienty matice  $V$ . *Lag* buňky jsou v těchto grafech znázorněny v hnědočervené, červené, vínové a růžové barvě v závislosti na měřícím dni, *log* buňky pak v tmavě a světle modré. Polohy pásů v subspektrech jednotlivých oblastí, pravděpodobnost  $p$ , že střední hodnoty koeficientů matice  $V$  pro *lag* a *log* buňky jsou stejné (viz kapitolu 3.7) a v případě  $p < 1\%$  i tyto střední hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4. Výsledky faktorové analýzy všech oblastí uvedených v tabulce 4 neuvádíme graficky, tvar pásů v prvním subspekttru lze případně nalézt v grafu na obrázku 23.

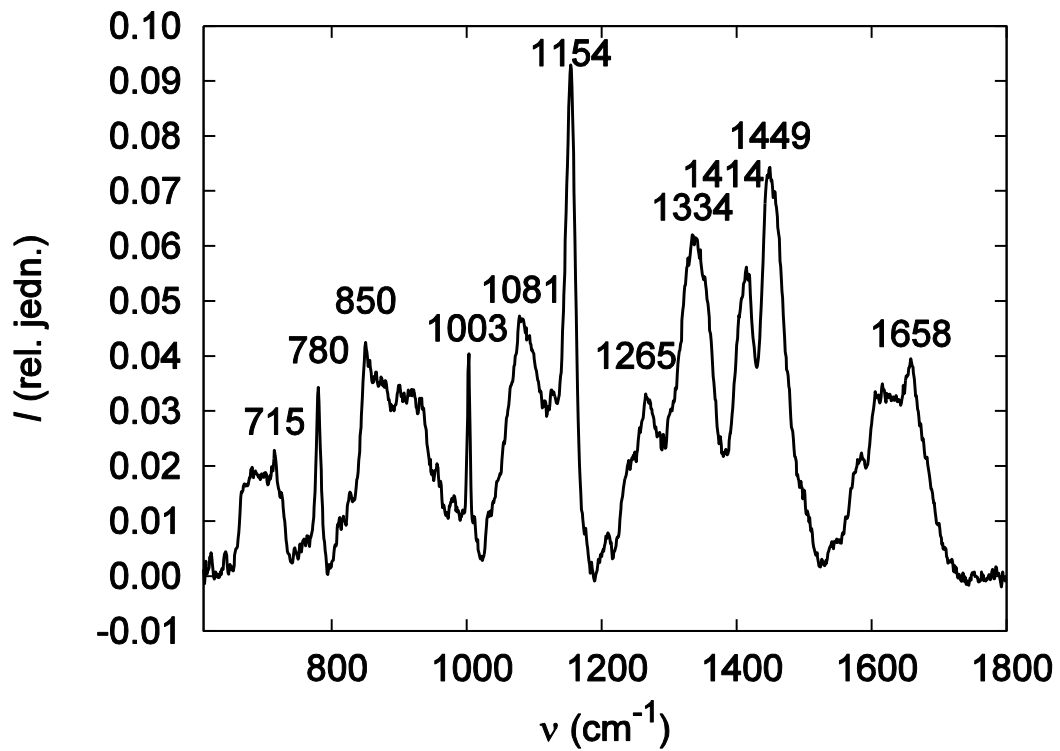
Histogram poloh maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu, získaných postupem popsáním v kapitole 3.8, je zobrazen na obrázku 31.



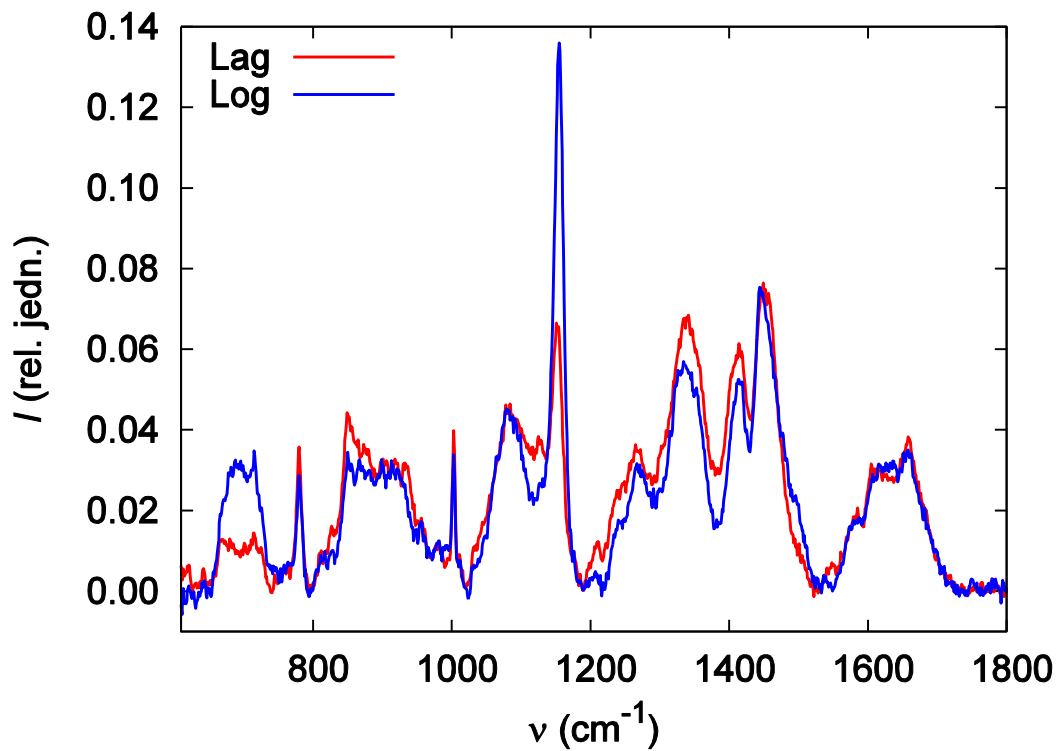
*Obrázek 21: První subspektrum společné faktorové analýzy log a lag buněk*



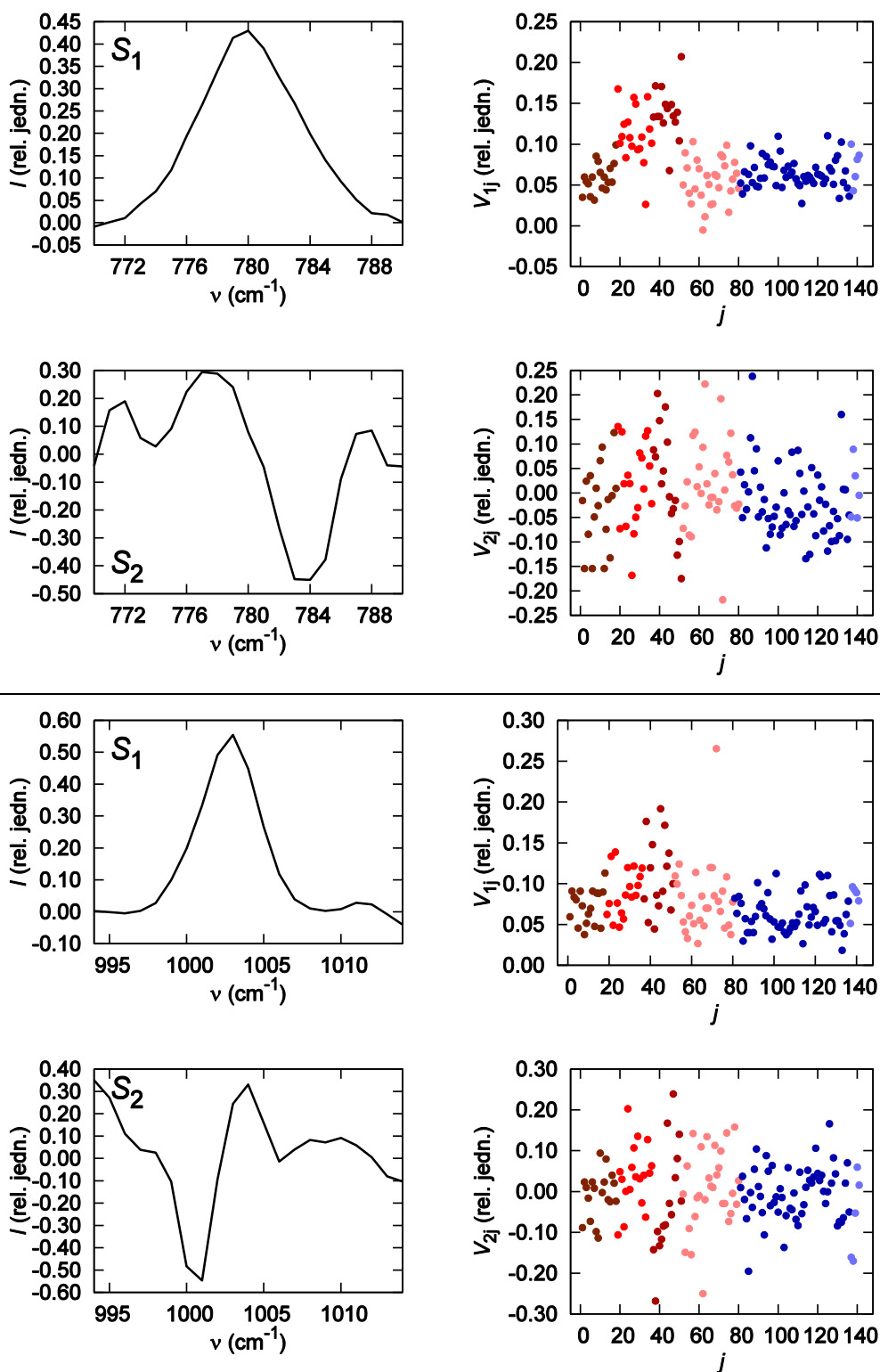
*Obrázek 22: Graf prvních 25 singulárních hodnot (vlevo) a residuálních chyb (vpravo). Hodnoty pro  $j = 16$  až 25 byly proloženy přímkou*



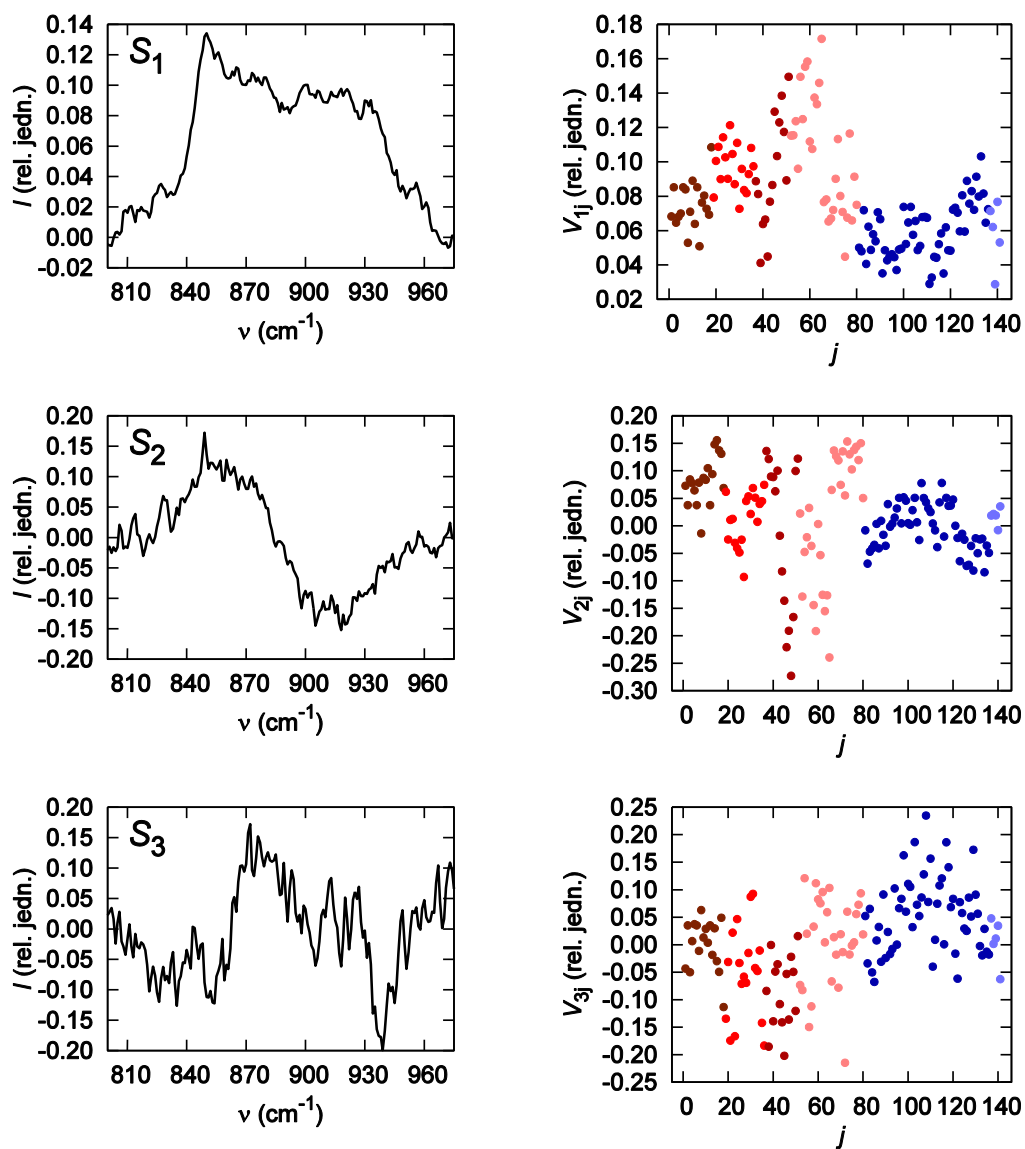
Obrázek 23: První subspektrum společné faktorové analýzy log a lag buněk v oblasti 600 až 1800  $\text{cm}^{-1}$



Obrázek 24: První subspektra faktorové analýzy provedené zvlášť pro lag a log buňky

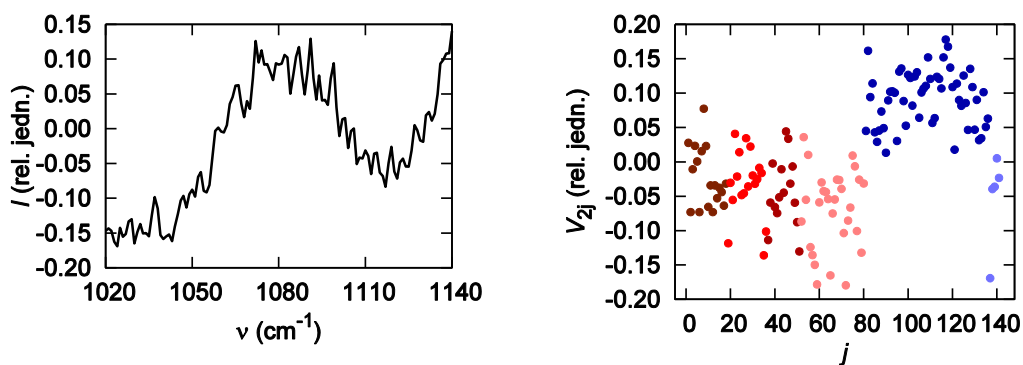


**Obrázek 25:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 770 až 790  $\text{cm}^{-1}$  (nahore) a oblasti 994 až 1014  $\text{cm}^{-1}$  (dole). První dvě subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). Lag buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, log buňky v odstínech modré

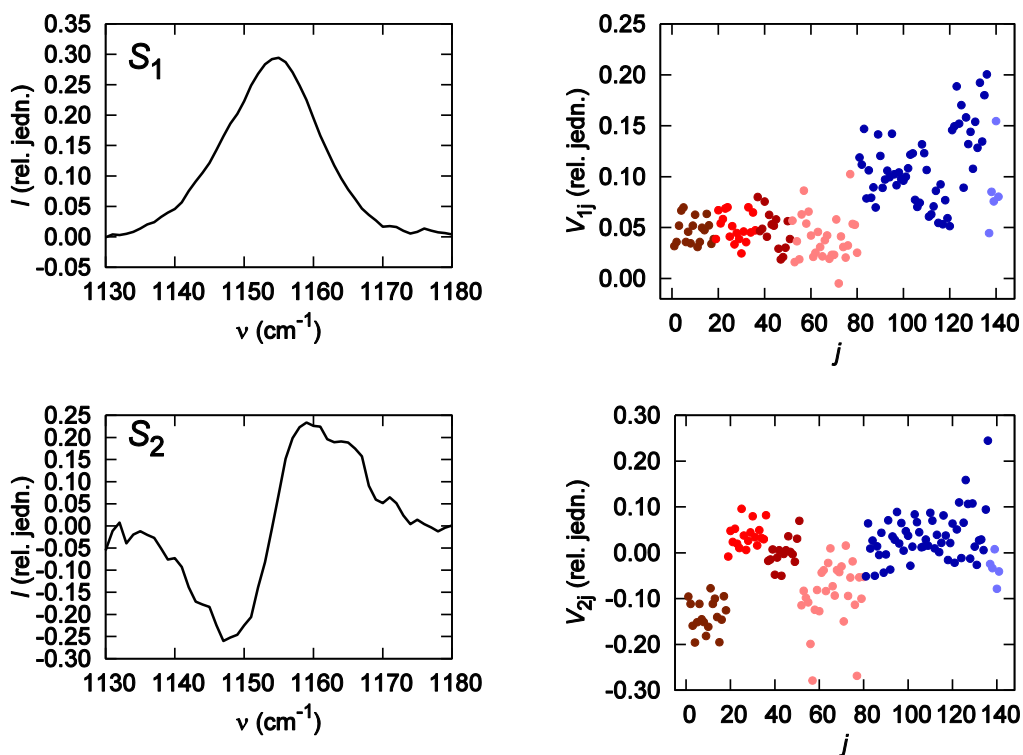


**Obrázek 26:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 800 až 975 cm<sup>-1</sup>. První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). Lag buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, log buňky v odstínech modré

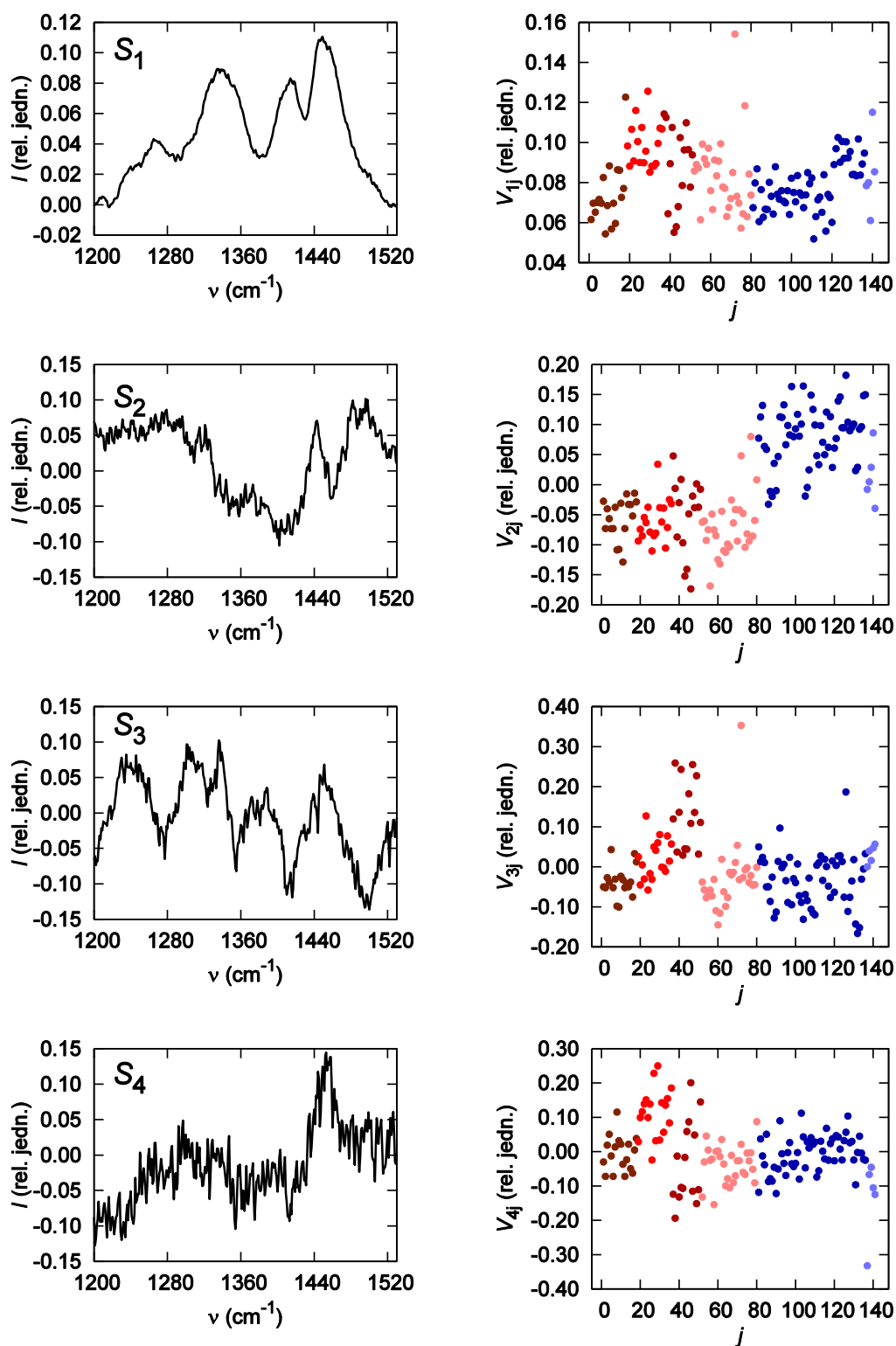




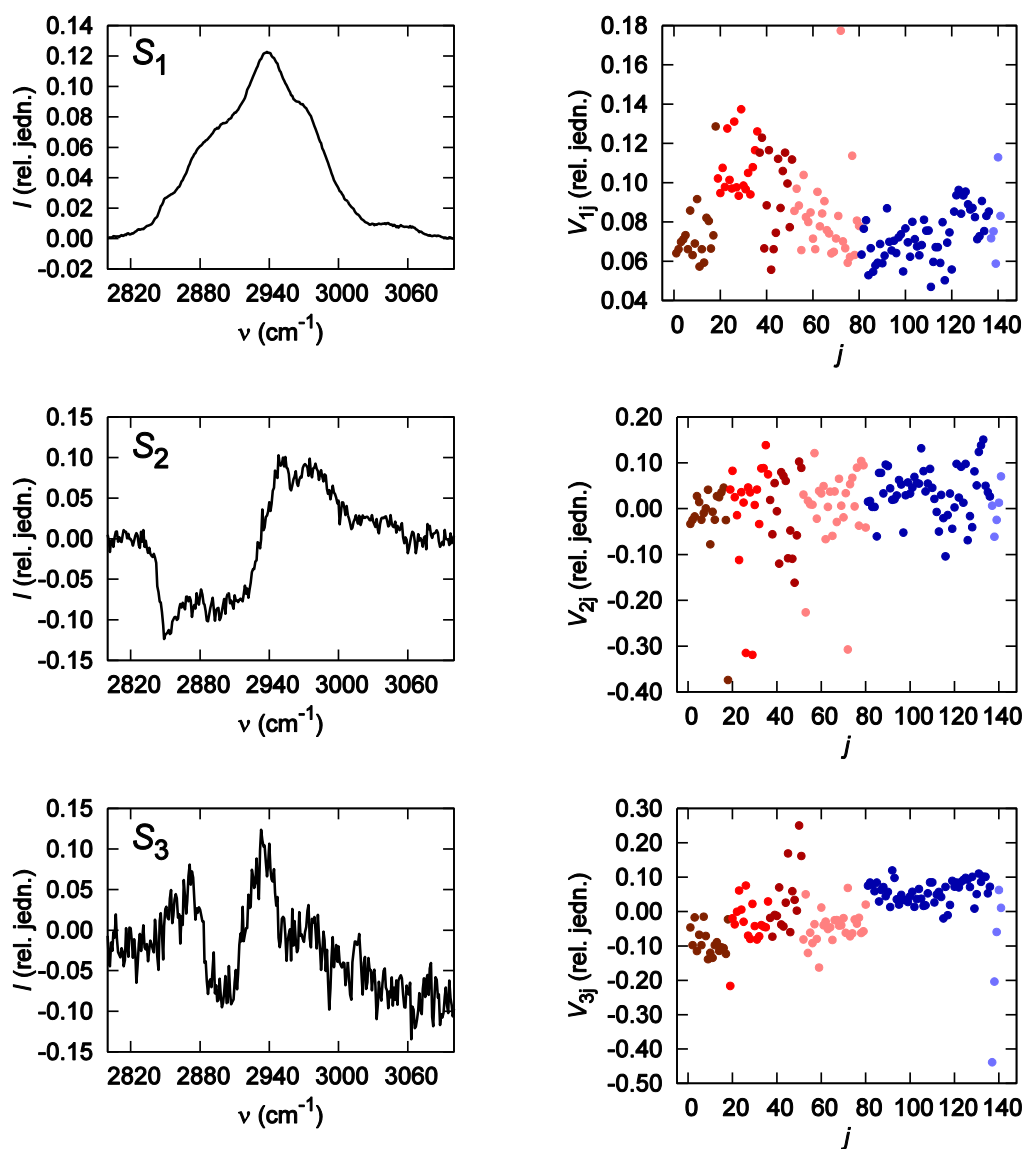
**Obrázek 27:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1020 až 1139  $\text{cm}^{-1}$ . Druhé subspektrum (vlevo) a koeficienty  $V_{2j}$  (vpravo). Lag buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, log buňky v odstínech modré



**Obrázek 28:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1130 až 1180  $\text{cm}^{-1}$ . První dvě subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). Lag buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, log buňky v odstínech modré



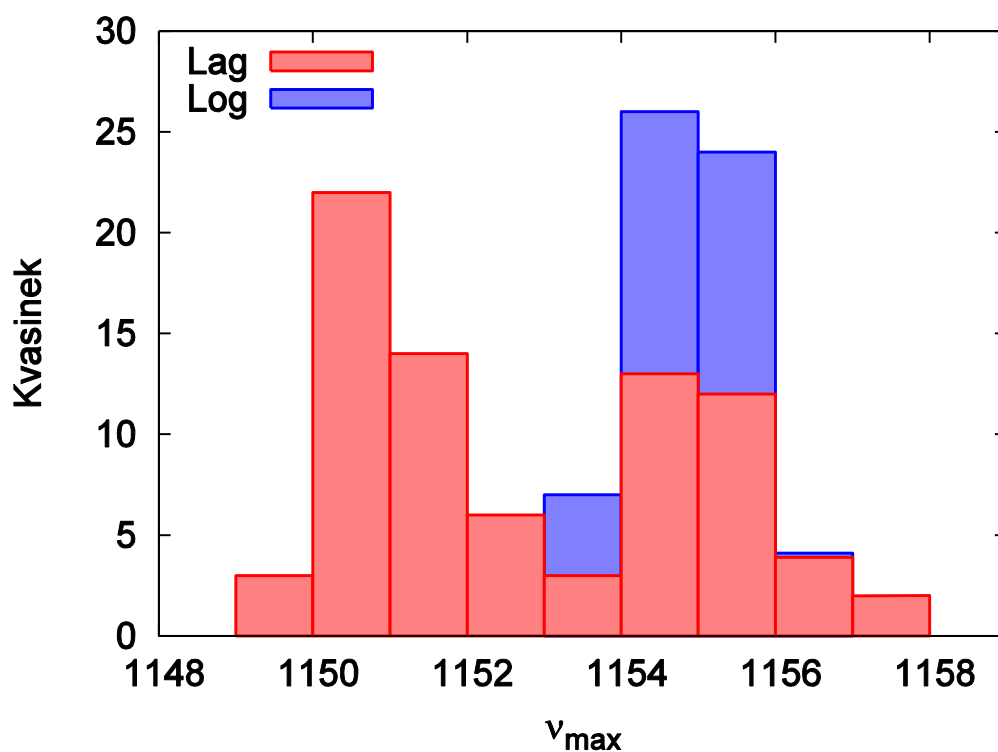
**Obrázek 29:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1200 až 1520  $\text{cm}^{-1}$ . První čtyři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). Lag buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, log buňky v odstínech modré



**Obrázek 30:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 2800 až 3100  $\text{cm}^{-1}$ . První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). Lag buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, log buňky v odstínech modré

Oblast (cm <sup>-1</sup> )	Subsp.	Polohy pásů (cm <sup>-1</sup> )	p (%)	V <sub>·i,lag</sub> · 10 <sup>-2</sup> (rel. jedn.)	V <sub>·i,log</sub> · 10 <sup>-2</sup> (rel. jedn.)
616 – 627	1	621	46,2	–	–
640 – 770	1	642, ~682, 715	< 0,01	4,1 ± 3,2	10,9 ± 3,0
770 – 790	1	780	0,05	8,5 ± 4,4	6,5 ± 1,8
	2	778 (-), 783 (-)	4,7	–	–
800 – 975	1	812 (r), 817 (r), 827 (r), 850, 933, 956 (r)	< 0,01	9,4 ± 2,9	5,6 ± 1,6
	2	849, ~857, ~918 (-)	4,4	–	–
	3	~853 (-), 872, ~939 (-)	< 0,01	-2,5 ± 8,1	4,8 ± 6,8
972 – 994	1	981	14,9	–	–
994 – 1014	1	1003	< 0,01	8,7 ± 3,9	6,3 ± 2,3
	2	1001 (-), 1004	36,1	–	–
1020 – 1139	1	1078, 1126	< 0,01	8,7 ± 2,1	7,6 ± 1,3
	2	1072	< 0,01	-4,6 ± 5,4	8,1 ± 5,9
1130 – 1180	1	1156	< 0,01	4,5 ± 1,8	10,2 ± 3,8
	2	1151, 1162 (-)	< 0,01	-5,4 ± 8,2	2,8 ± 5,4
1200 – 1530	1	1209, 1265, 1334 – 1339, 1414, 1449	1,1	–	–
	2	~1400 (-), 1443	< 0,01	-6,1 ± 4,7	7,6 ± 5,3
	3	1235, ~1277 (-), 1302, 1336, 1355 (-), 1388, 1416 (-), 1451, 1500 (-)	0,40	1,0 ± 9,3	-2,9 ± 6,6
	4	1245 (-), 1323 (-), 1387, ~1457	11,7	–	–
1520 – 1740	1	1550 (r), 1585, 1605 – 1640, 1658	< 0,01	8,7 ± 2,7	5,6 ± 1,3
	2	~1616 (-), ~1659	1,3	–	–
2800 – 3100	1	2938	0,05	8,8 ± 2,3	7,4 ± 1,3
	2	2849, 2897, 2948 (-), 2975 (-)	0,11	-0,8 ± 8,7	3,5 ± 5,4
	3	~2871 (-), 2899, ~2933(-)	< 0,01	-5,0 ± 6,7	6,0 ± 5,0

**Tabulka 4:** Polohy pásů v jednotlivých subspektrech (Subsp.) faktorové analýzy uvedené oblasti. Záporné pásy jsou značeny (-), rameno (r), široké pásy ~. Pravděpodobnost p (viz kapitulu 3.7) a střední hodnoty koeficientů V<sub>·i,lag</sub> pro lag a V<sub>·i,log</sub> pro log buňky pro p < 1%



*Obrázek 31: Histogram poloh pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu pro lag (červeně) a log buňky (modře). Menší sloupec je vždy zobrazen před větším*

## 4.2 Obsah vakuol buněk pěstovaných na různých médiích

Předchozí experimenty ukázaly, že je možné pomocí Ramanovy mikrospektroskopie studovat chemické složení vakuol kvasinek *C. albicans*. V další fázi experimentů jsme chtěli zjistit, zda je možné detekovat rozdíly v obsahu vakuol buněk pěstovaných v médiu YPD a YNB a nakolik jsou tyto změny reprodukovatelné. Buňky byly kultivovány postupem popsaným v kapitole 3.2 do lag fáze, ve shodě s kapitolou 3.2 a 3.6 je budeme označovat *YPD* a *YNB* buňky. Nastavení Ramanova mikrospektrometru, úprava a vyhodnocení spekter jsou popsány v kapitolách 3.1.1 a 3.4 až 3.7.

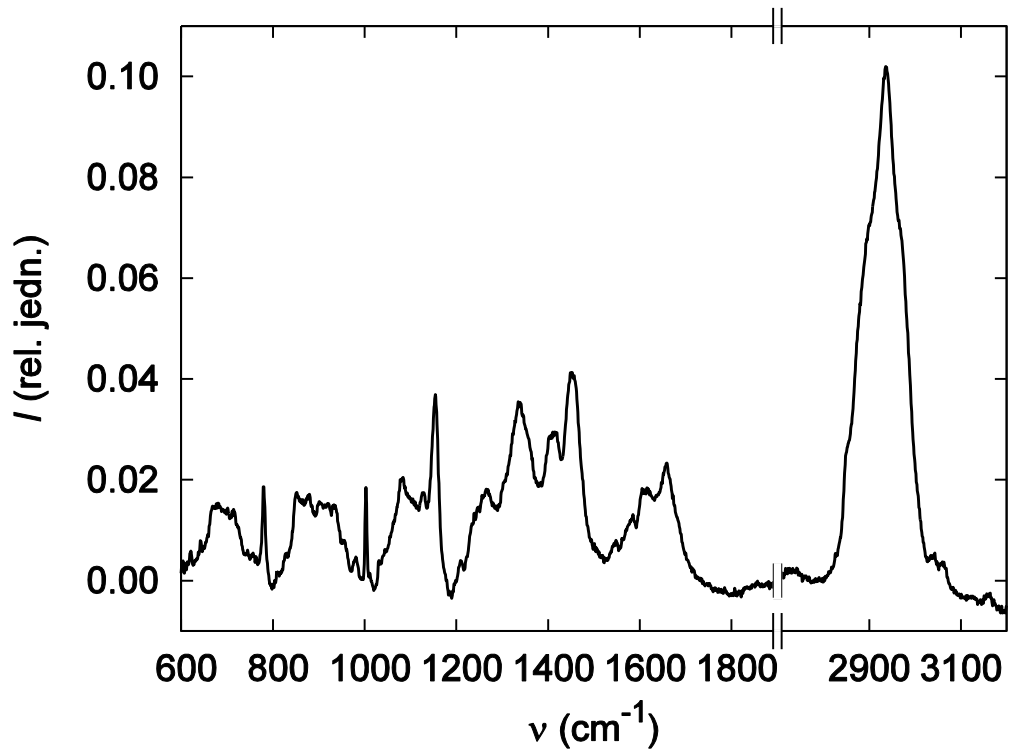
Proběhly dva zcela nezávislé experimenty. V prvním bylo porovnáno 80 spekter vakuol *YPD* buněk, totožných se spektry *lag* buněk z předchozí kapitoly, s 85 spektry vakuol *YNB* buněk ze čtyř měřících dnů. Těchto 165 spekter tvoří soubor 2 z kapitoly 3.6.

Ve druhém experimentu bylo porovnáno 109 spekter vakuol *YPD* buněk ze tří měřících dnů se 109 spektry vakuol *YNB* buněk též ze tří měřících dnů. Vznikl tak soubor 218 spekter, ten budeme nazývat ve shodě s tabulkou 3 v kapitole 3.6 soubor 3.

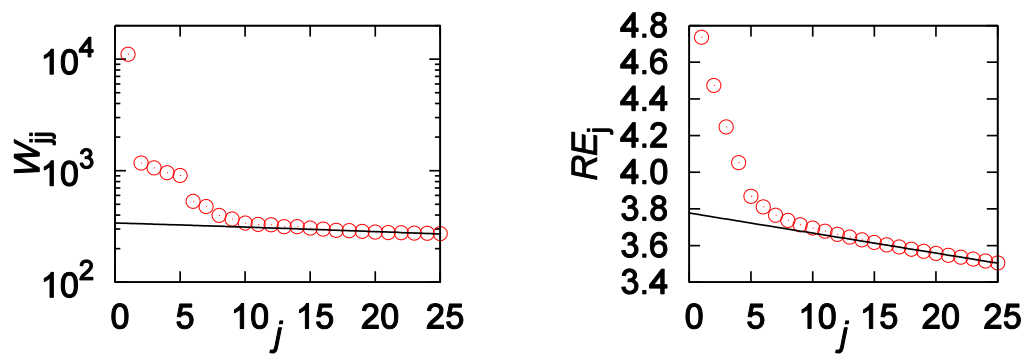
#### 4.2.1 Výsledky faktorové analýzy souboru 2

Byla provedena společná faktorová analýza všech 165 spekter souboru 2 a úpravy popsané v kapitole 3.4 a 3.5, výsledné první subspektrum je zobrazeno na obrázku 32, graf singulárních hodnot a residuálních chyb je zobrazen na obrázku 33. První subspektrum faktorové analýzy oblasti 600 až 1800  $\text{cm}^{-1}$  je zobrazeno na obrázku 34, první subspektra faktorové analýzy téže oblasti provedené zvlášť pro *YPD* a *YNB* buňky jsou zobrazena na obrázku 35.

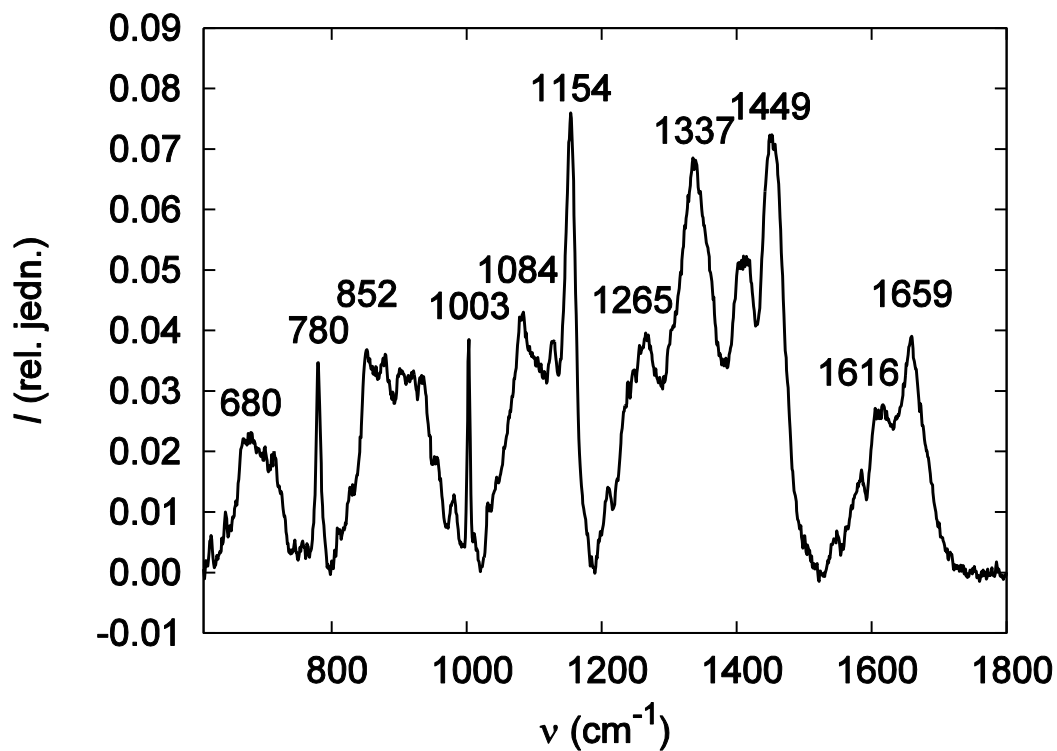
Na obrázcích 36 až 40 jsou uvedeny výsledky faktorové analýzy jednotlivých oblastí spektra, polohy pásů v subspektrech jednotlivých oblastí lze nalézt v tabulce 5. V této tabulce dále uvádíme stejné veličiny jako v tabulce 4 v předcházející kapitole. Koeficienty  $V_{ij}$  jsou pro *YPD* buňky znázorněny v hnědočervené, červené, vínové a růžové, pro *YNB* buňky pak v tmavě a světle modré, modrofialové a azurové. Histogram poloh maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu, získaných postupem popsaným v kapitole 3.8, je zobrazen na obrázku 41.



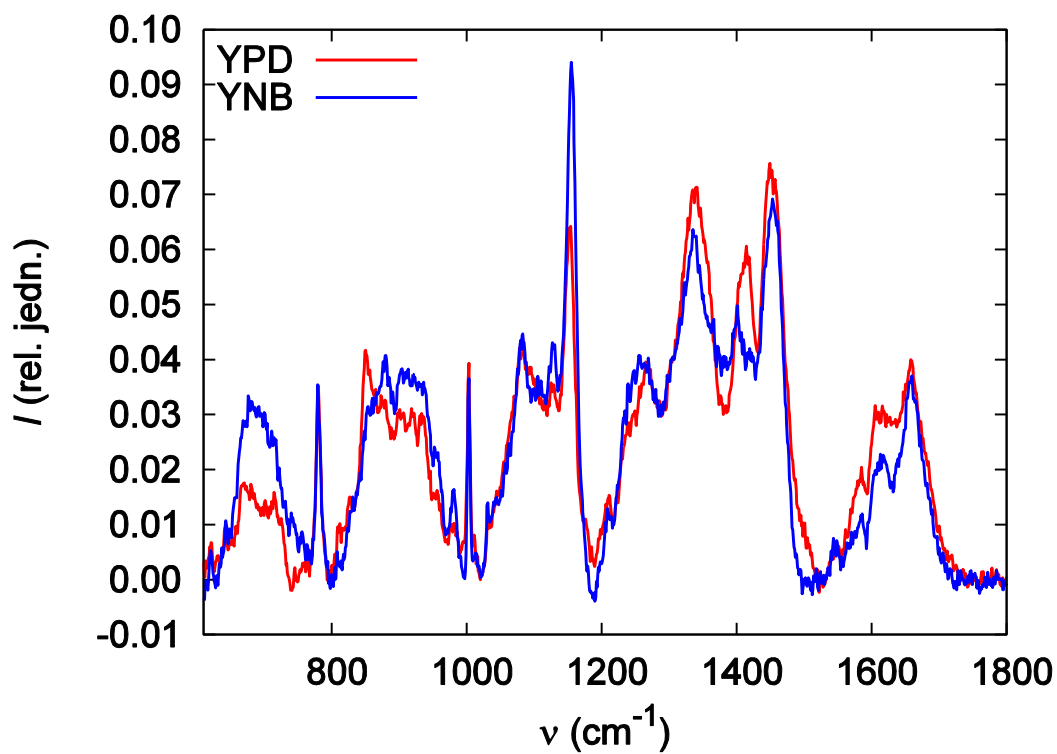
*Obrázek 32: První subspektrum faktorové analýzy spekter YPD a YNB buněk, soubor 2*



*Obrázek 33: Graf prvních 25 singulárních hodnot (vlevo) a residuálních chyb (vpravo). Hodnoty pro  $j = 16$  až  $25$  byly proloženy přímkou. Soubor 2*

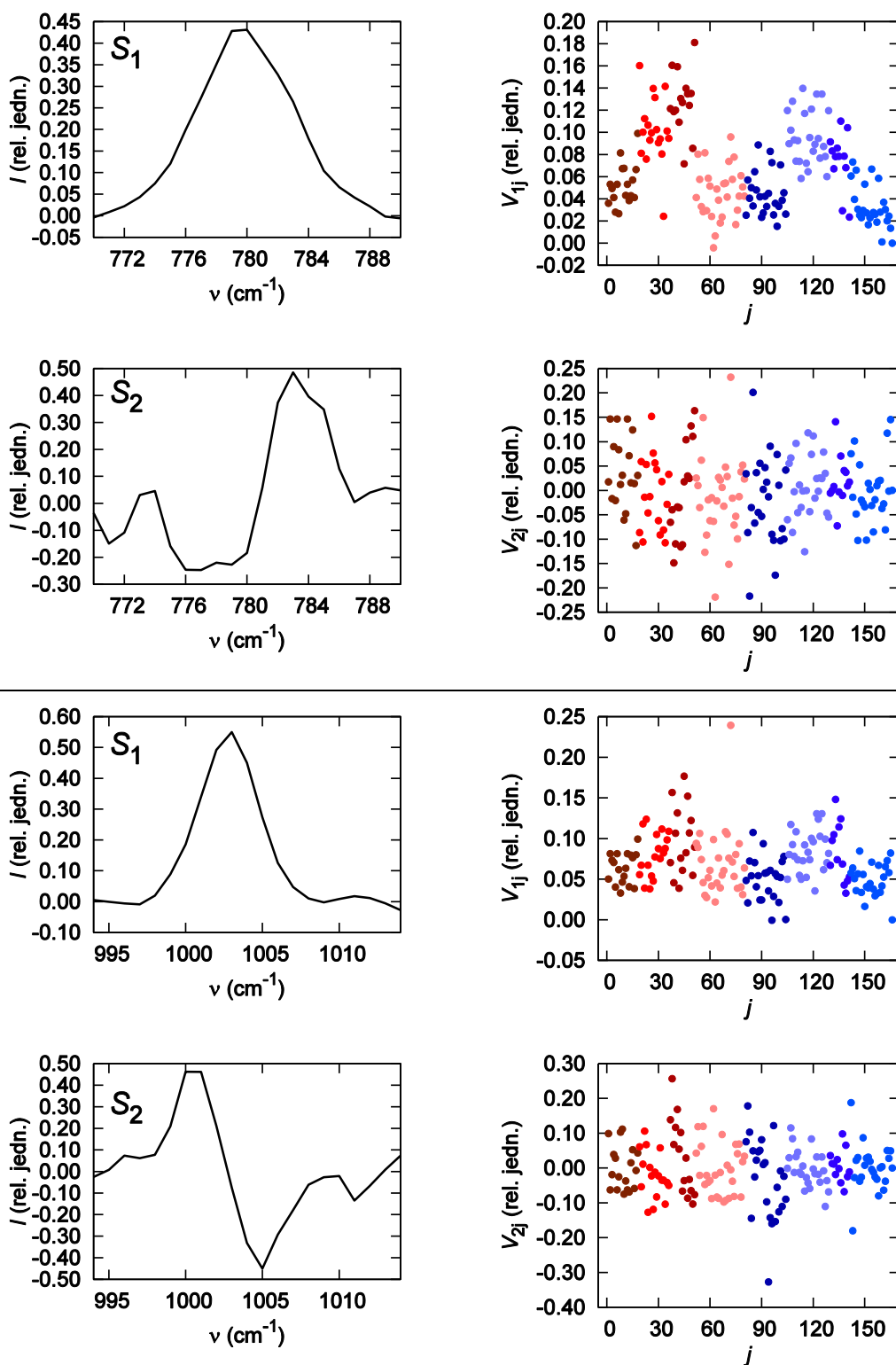


*Obrázek 34: První subspektrum společné faktorové analýzy YPD a YNB buněk v oblasti 600 až 1800 cm<sup>-1</sup>, soubor 2*

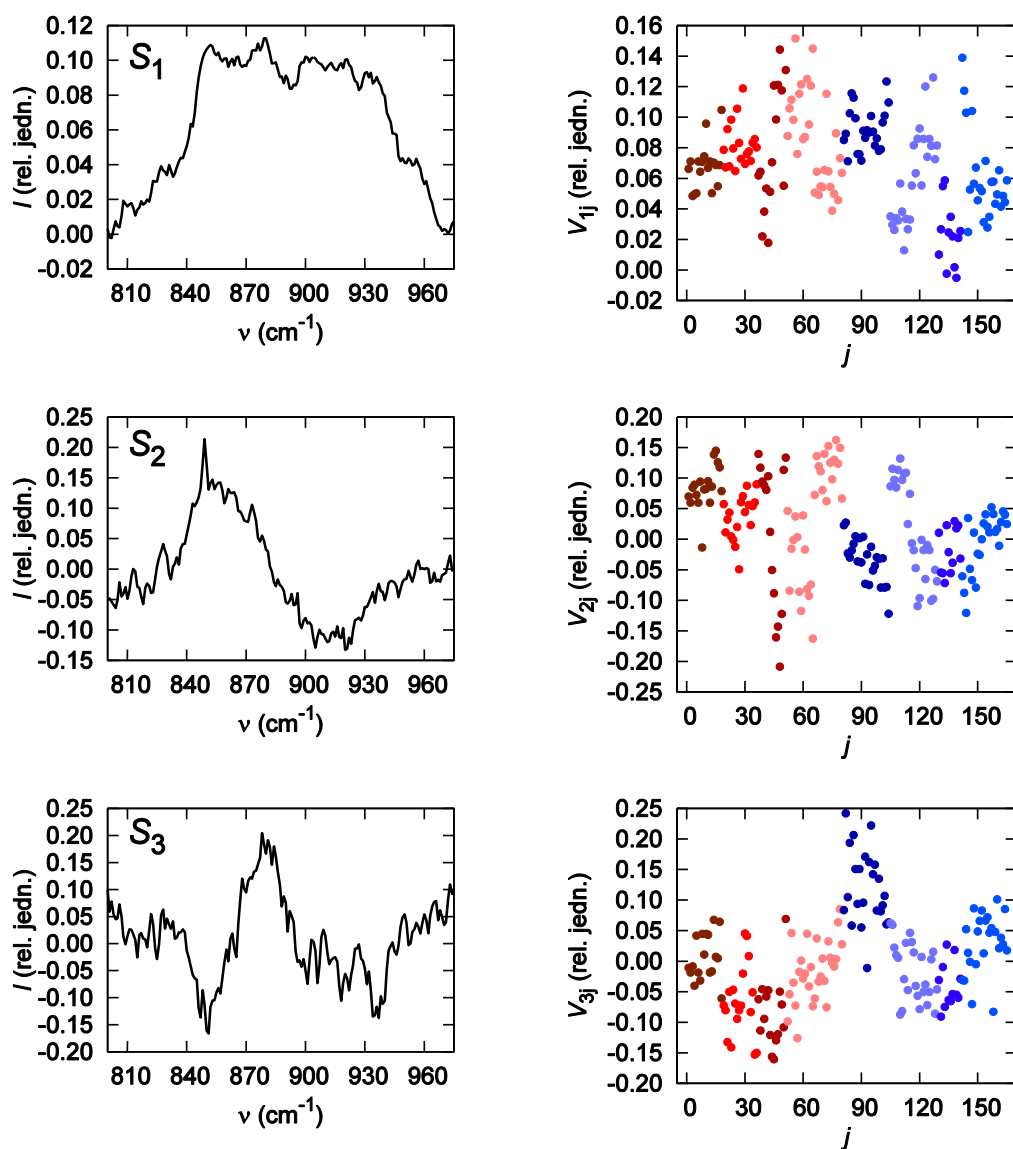


*Obrázek 35: První subspektra faktorové analýzy provedené zvlášť pro YPD a pro YNB buňky, soubor 2*

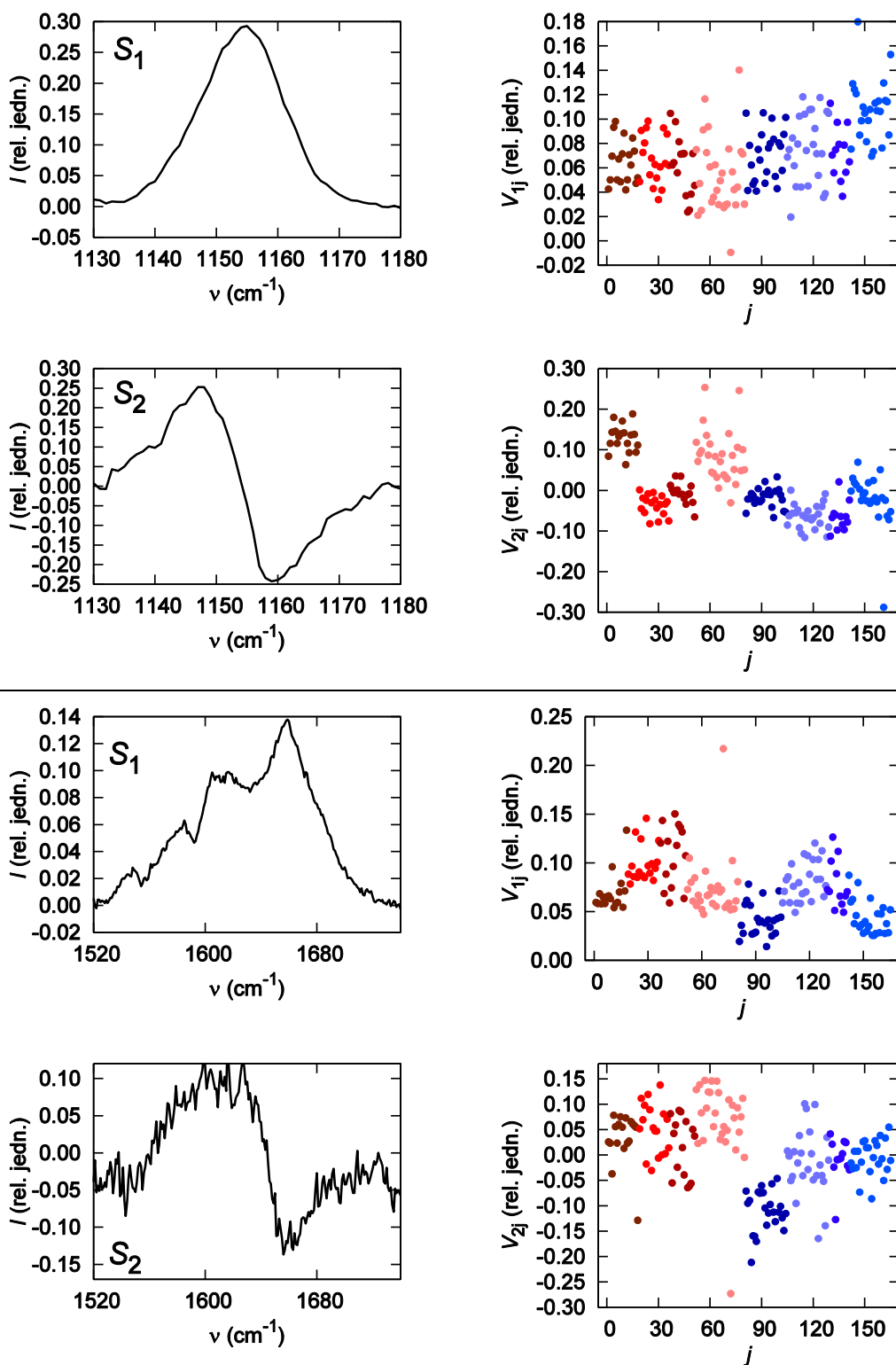




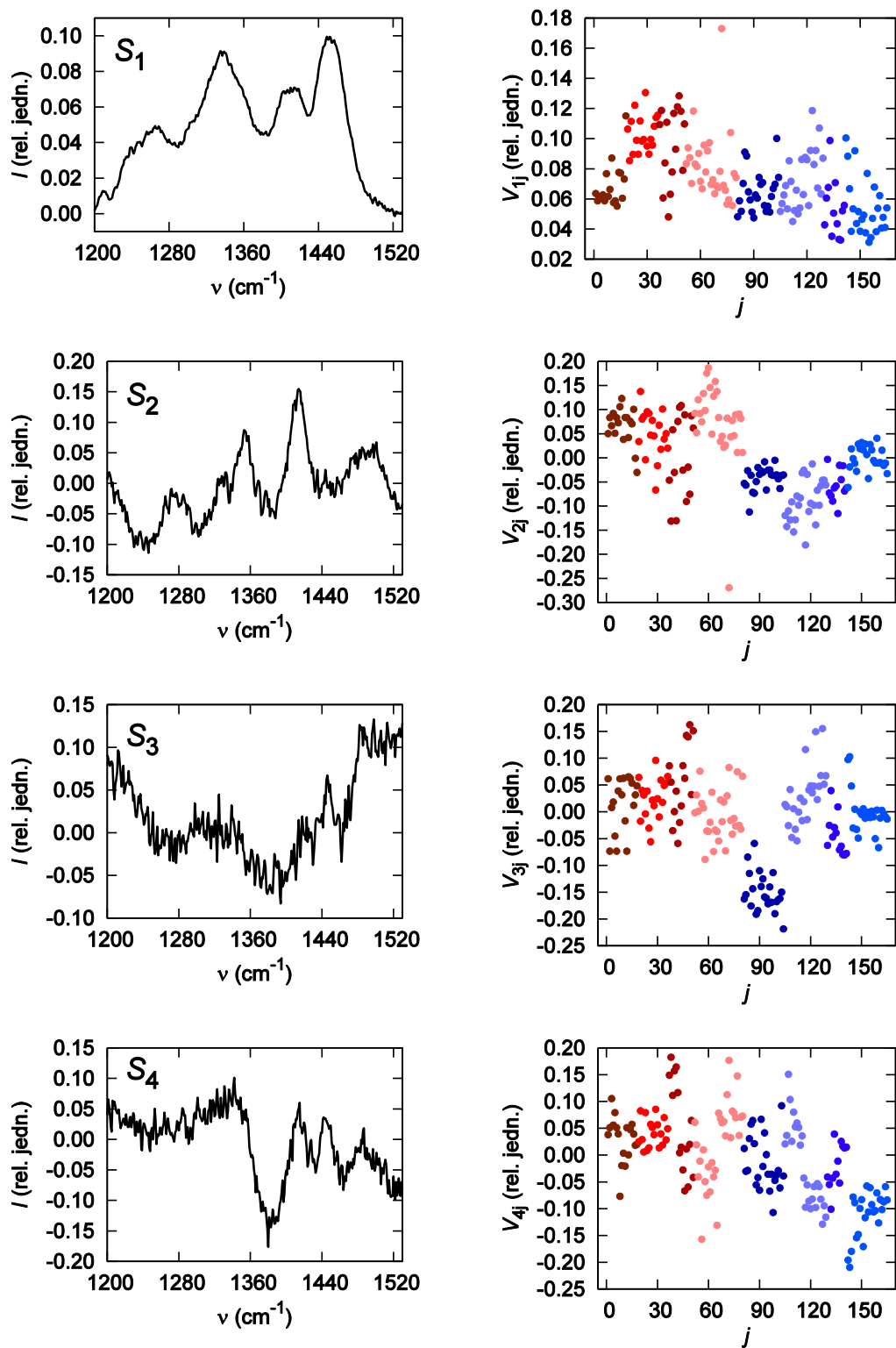
**Obrázek 36:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 770 až 790  $\text{cm}^{-1}$  (nahore) a oblasti 994 až 1014  $\text{cm}^{-1}$  (dole). První dvě subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 2



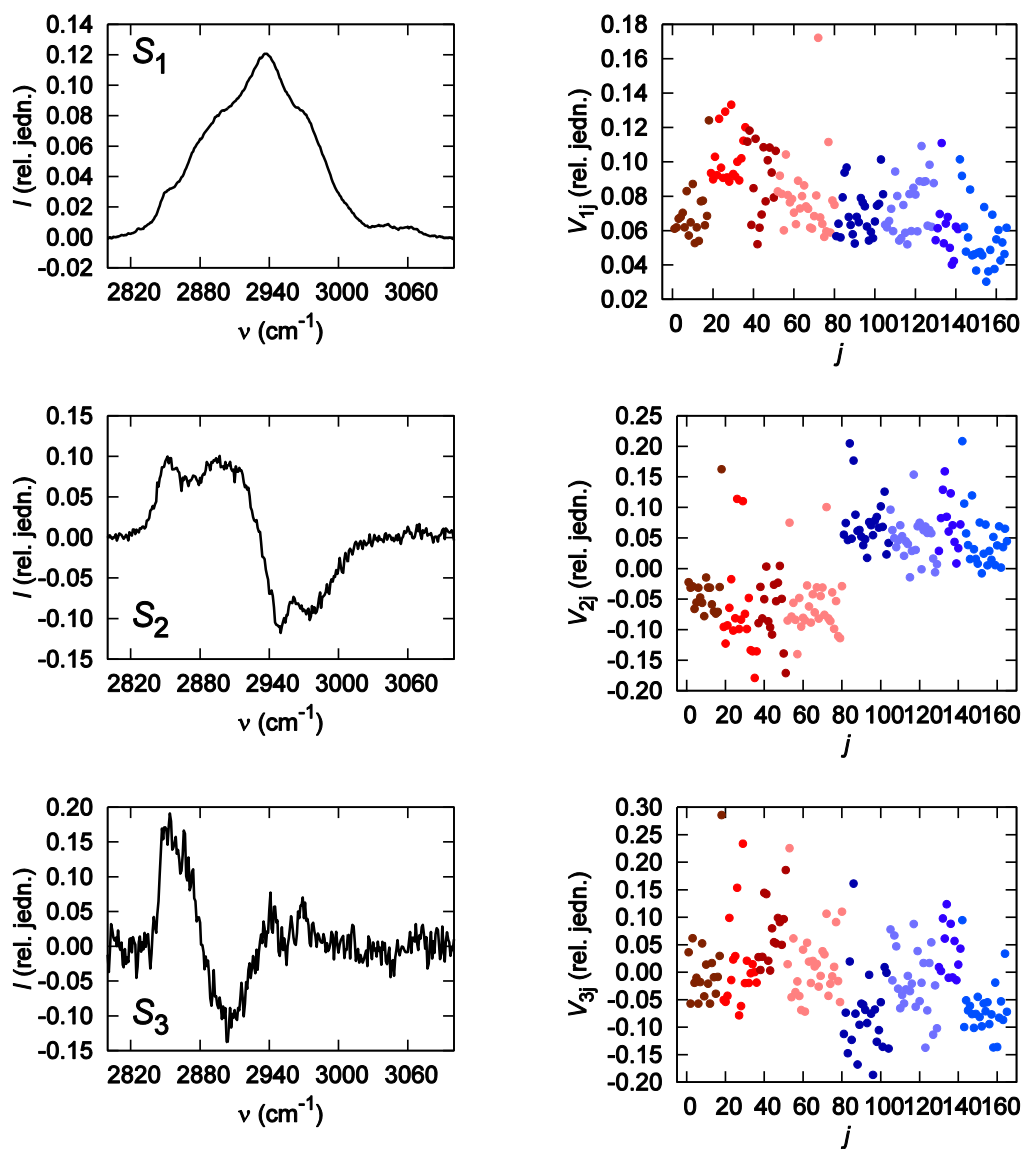
**Obrázek 37:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 800 až 975 $\text{cm}^{-1}$ . První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 2



**Obrázek 38:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1130 až 1180  $\text{cm}^{-1}$  (nahore) a oblasti 1520 až 1740  $\text{cm}^{-1}$  (dole). První dvě subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 2



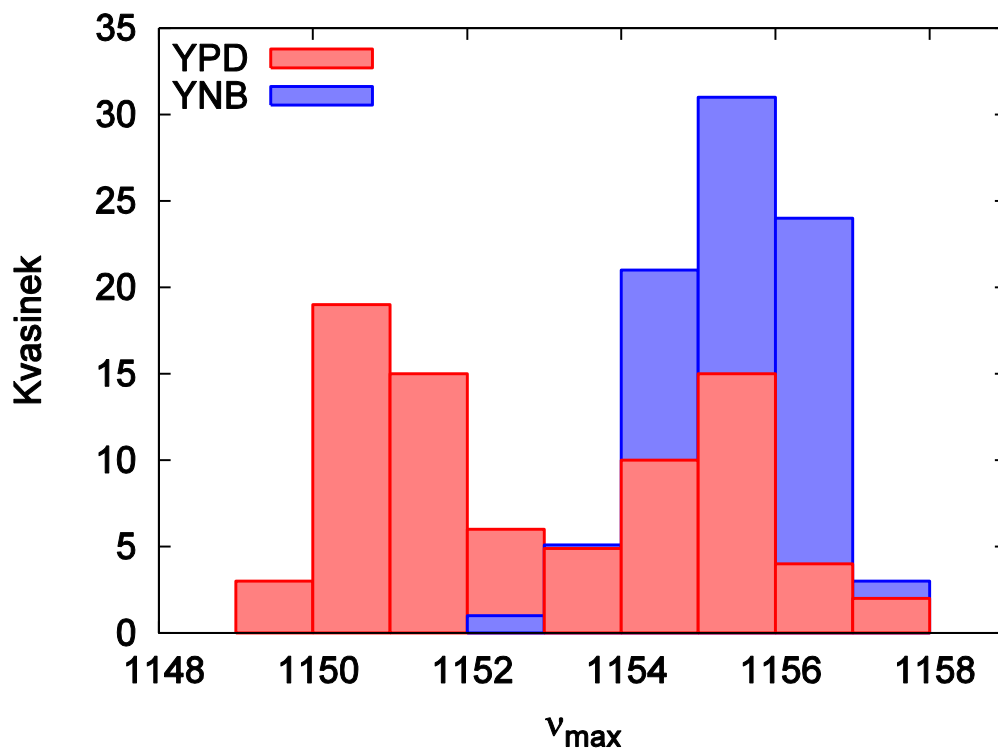
**Obrázek 39:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1200 až 1530  $\text{cm}^{-1}$ . První čtyři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 2



**Obrázek 40:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 2800 až 3100  $\text{cm}^{-1}$  (dole). První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 2

Oblast (cm <sup>-1</sup> )	Subsp.	Polohy pásů (cm <sup>-1</sup> )	<i>p</i> (%)	$V_{\cdot,i,YPD} \cdot 10^{-2}$ (rel. jedn.)	$V_{\cdot,i,YNB} \cdot 10^{-2}$ (rel. jedn.)
616 – 627	1	621	47,6	–	–
636 – 770	1	642, 682 – 687, ~715	< 0,01	5,1 ± 3,8	8,5 ± 2,8
770 – 790	1	780	1,8	7,5 ± 4,2	6,1 ± 3,4
	2	~779 (-), 783	79,3	–	–
800 – 975	1	812 (r), 831 (r), 852, 880, 903 – 921, 933, 952 (r)	1,9	–	–
	2	849, ~856, ~918 (-)	< 0,01	4,3 ± 8,4	-1,0 ± 5,8
	3	851 (-), 879, 935 (-)	< 0,01	-3,5 ± 6,1	3,2 ± 7,9
972 – 994	1	981	< 0,01	2,7 ± 5,3	7,4 ± 5,4
	2	977 (-), 985	24,5	–	–
994 – 1014	1	1003	3,1	–	–
	2	1001, 1005 (-)	51,7	–	–
1020 – 1139	1	1084, 1127	< 0,01	6,2 ± 2,4	6,7 ± 2,3
1130 – 1180	1	1155	< 0,01	6,1 ± 2,5	8,3 ± 2,9
	2	1147, 1159 (-)	< 0,01	5,0 ± 7,7	-4,0 ± 4,8
1200 – 1530	1	1210, 1265, 1335, 1415, 1449	< 0,01	8,6 ± 2,3	6,3 ± 2,9
	2	1246 (-), 1272, 1302 (-), 1353, 1388 (-), 1414, ~1454 (-), ~1501	< 0,01	5,3 ± 7,2	-4,6 ± 4,7
	3	~1320, ~1385 (-), 1446	< 0,01	1,8 ± 5,5	-4,0 ± 8,5
	4	1415 (-), 1444 (-), 1487 (-)	< 0,01	3,4 ± 6,4	-4,4 ± 7,0
1520 – 1740	1	1548, 1585, 1605 – 1619, 1659, 1672	< 0,01	8,5 ± 3,0	5,9 ± 2,7
	2	~1611, ~1656 (-)	< 0,01	4,7 ± 6,6	-3,8 ± 6,5
2800 – 3100	1	2938	< 0,01	8,4 ± 2,2	6,6 ± 1,8
	2	2852, 2897, 2950 (-), 2975 (-)	< 0,01	-5,9 ± 5,8	5,9 ± 4,4
	3	~2857 (-), ~2903, ~2958 (-)	< 0,01	2,3 ± 7,2	-4,0 ± 7,0

**Tabulka 5:** Polohy pásů v jednotlivých subspektrech (Subsp.) faktorové analýzy uvedené oblasti. Záporné pásy jsou značeny (-), rameno (r), široké pásy ~. Pravděpodobnost *p* (viz kapitolu 3.7) a střední hodnoty koeficientů  $V_{\cdot,i,YPD}$  pro YPD a  $V_{\cdot,i,YNB}$  pro YNB buňky pro *p* < 1%



*Obrázek 41: Histogram poloh pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu pro YPD (červeně) a YNB buňky (modře). Menší sloupec je vždy zobrazen před větším. Soubor 2*

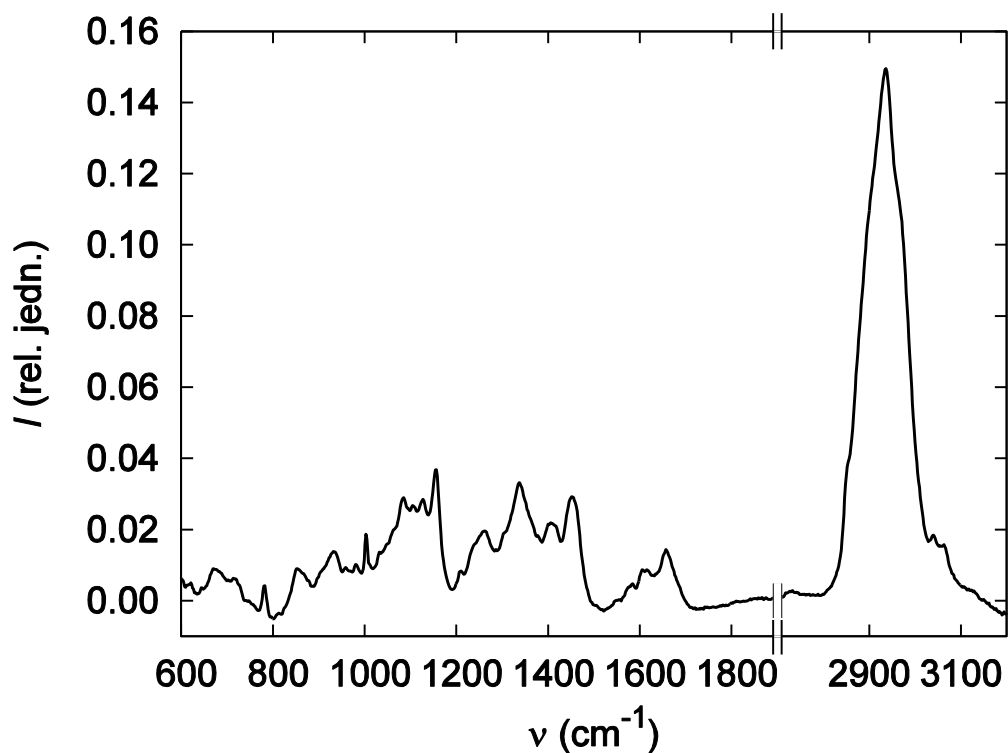
#### 4.2.2 Výsledky faktorové analýzy souboru 3

Byla provedena společná faktorová analýza všech 218 spekter souboru 3 a úpravy popsané v kapitole 3.4 a 3.5, výsledné první subspektrum je zobrazeno na obrázku 42, graf singulárních hodnot a residuálních chyb je zobrazen na obrázku 43. První subspektrum faktorové analýzy oblasti 600 až 1800  $cm^{-1}$  je zobrazeno na obrázku 44, první subspektra faktorové analýzy téže oblasti provedené zvlášť pro YPD a YNB buňky jsou zobrazena na obrázku 45.

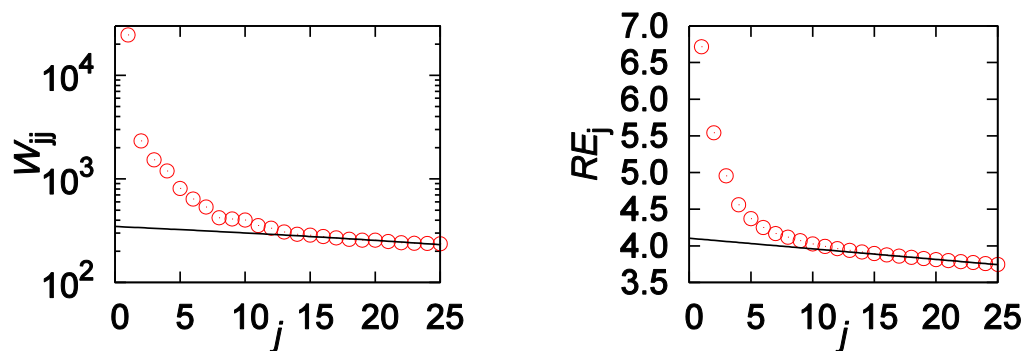
Při tomto měření jsme použili citlivější detektor Synapse a mřížku s menším počtem vrypů/mm než v předcházejících kapitolách (viz tabulku 3 v kapitole 3.6). Díky tomu vzrostl poměr signál/šum a v subspektrech je vidět více detailů. Zlepšení poměru signál/šum má vliv i na zpracování souborů spekter pomocí faktorové analýzy. Střední spektra naměřená s detektorem Symphony a s detektorem Synapse se tak můžou v detailech lišit, v obou případech však ve spektrech pozorujeme stejné pásy.

Na obrázcích 46 až 53 jsou uvedeny výsledky faktorové analýzy jednotlivých oblastí spektra, polohy pásů v subspektrech jednotlivých oblastí lze

nalézt v tabulce 6. V této tabulce dále uvádíme stejné veličiny jako v tabulce 4 v kapitole 4.1. Koeficienty  $V_{ij}$  jsou pro *YPD* buňky znázorněny ve vínové, červené a růžové, pro *YNB* buňky pak v tmavě a světle modré a azurové. Histogram poloh maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu, získaných postupem popsáním v kapitole 3.8, je zobrazen na obrázku 54.

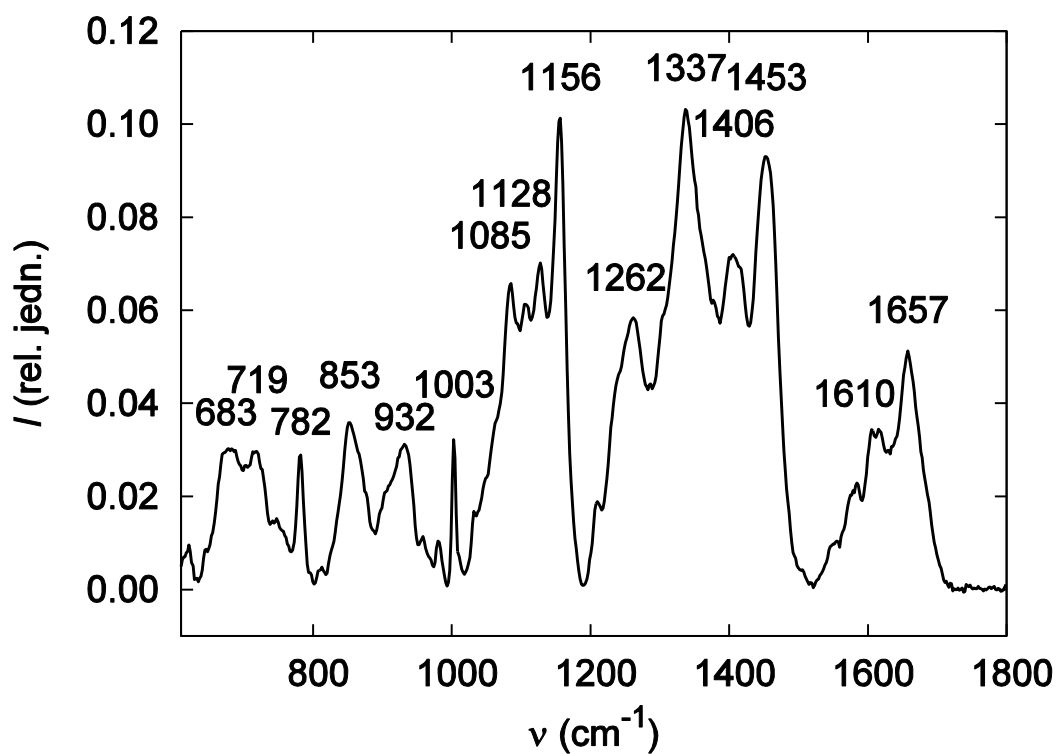


**Obrázek 42:** První subspektrum faktorové analýzy spekter *YPD* a *YNB* buněk, soubor 3

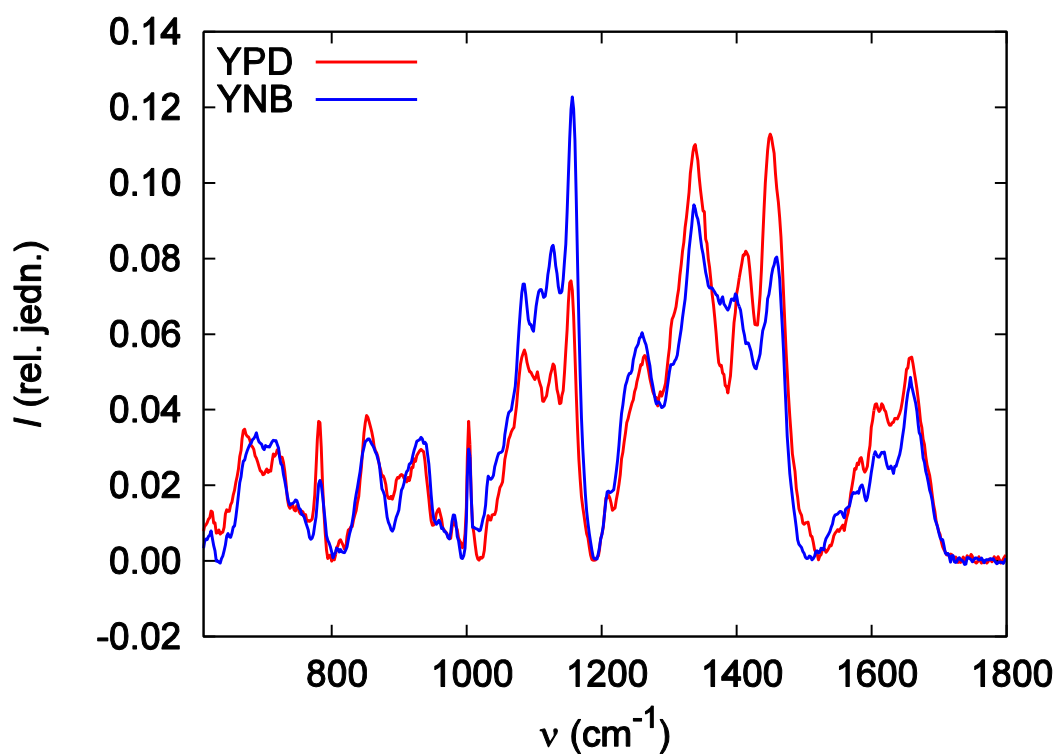


**Obrázek 43:** Graf prvních 25 singulárních hodnot (vlevo) a residuálních chyb (vpravo). Hodnoty pro  $j = 16$  až 25 byly proloženy přímkou. Soubor 3

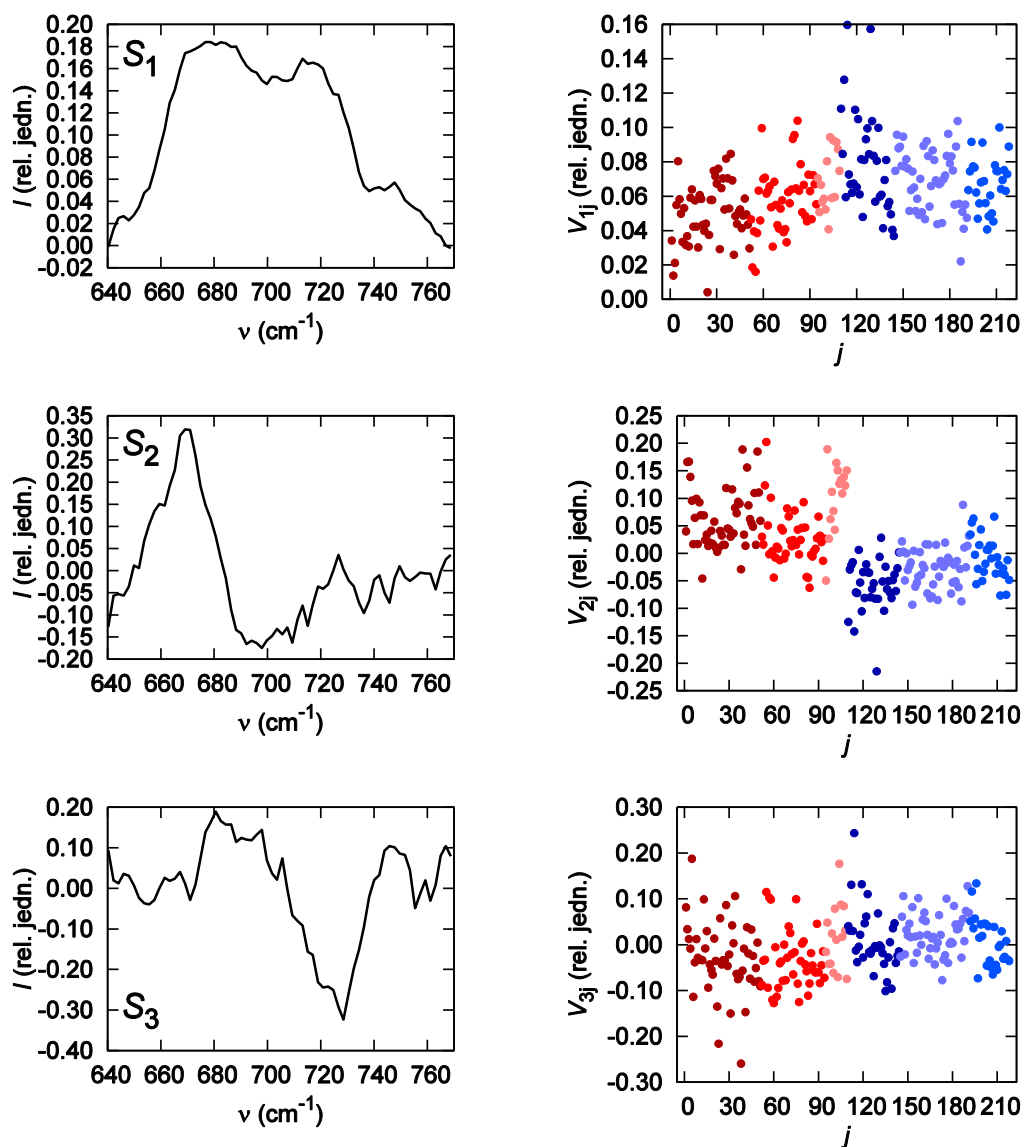




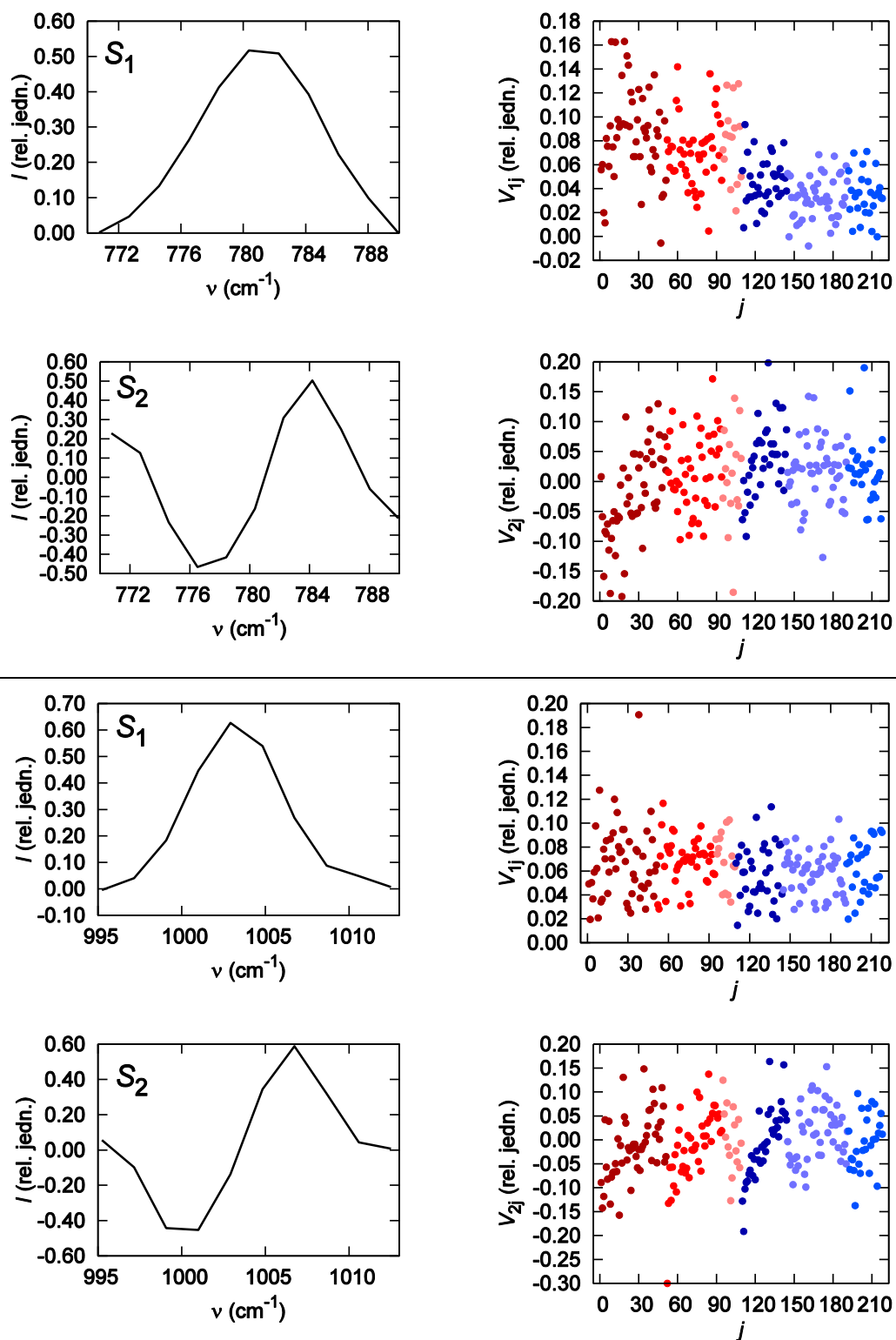
*Obrázek 44: První subspektrum společné faktorové analýzy YPD a YNB buněk v oblasti 600 až 1800  $\text{cm}^{-1}$ , soubor 3*



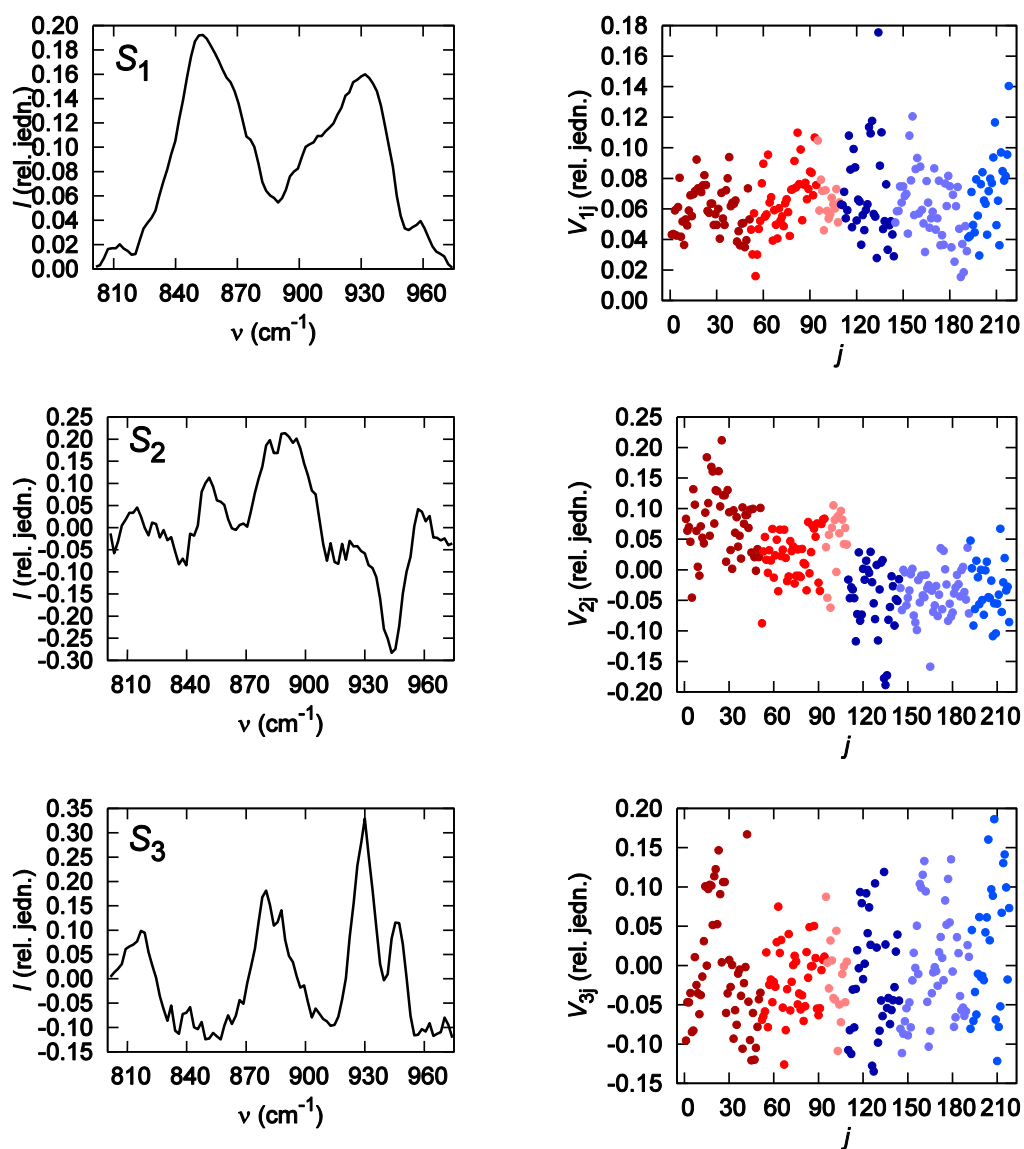
*Obrázek 45: První subspektra faktorové analýzy provedené zvlášť pro YPD a pro YNB buňky, soubor 3*



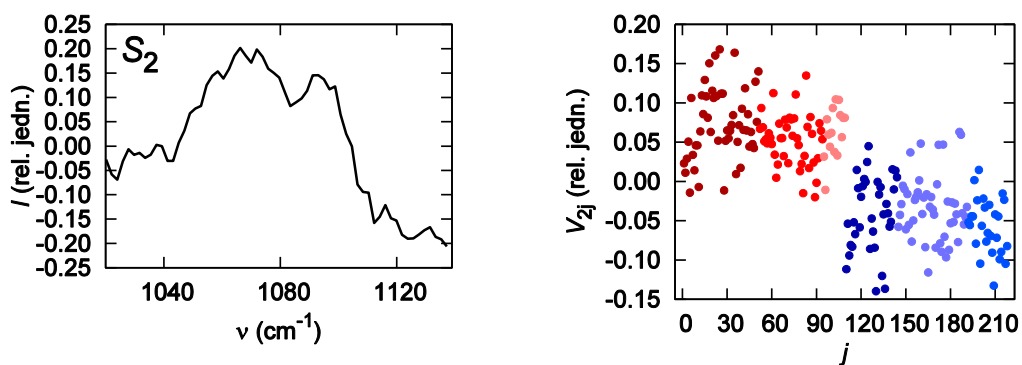
**Obrázek 46:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 640 až 770  $\text{cm}^{-1}$ . První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3



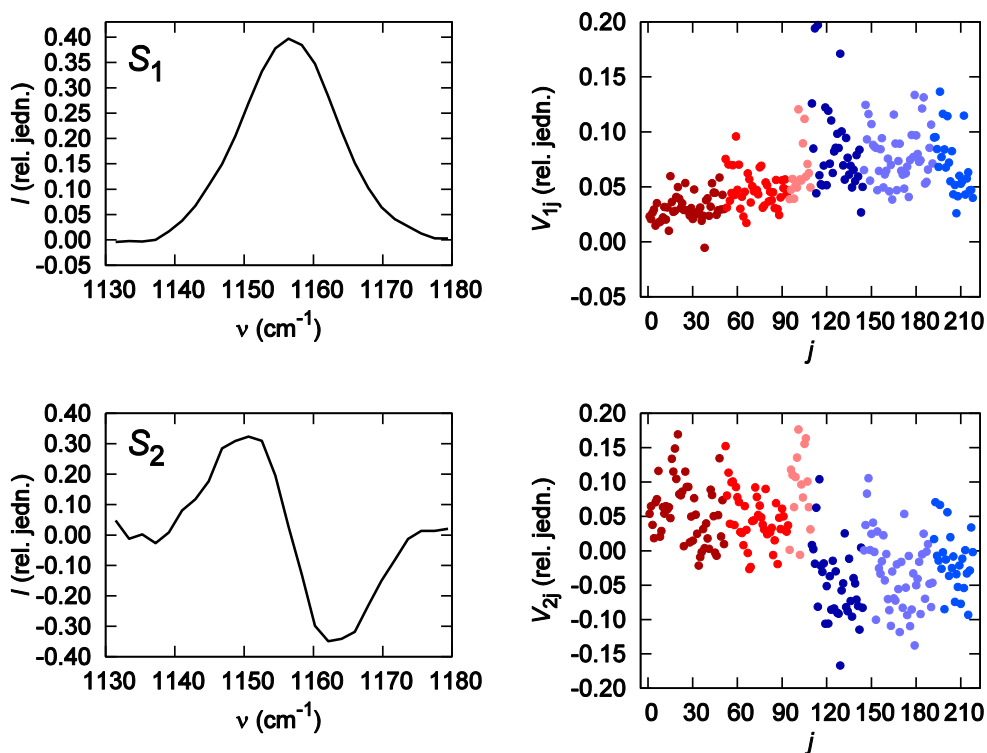
**Obrázek 47:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 770 až 790  $\text{cm}^{-1}$  (nahore) a oblasti 994 až 1014  $\text{cm}^{-1}$  (dole). První dvě subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3



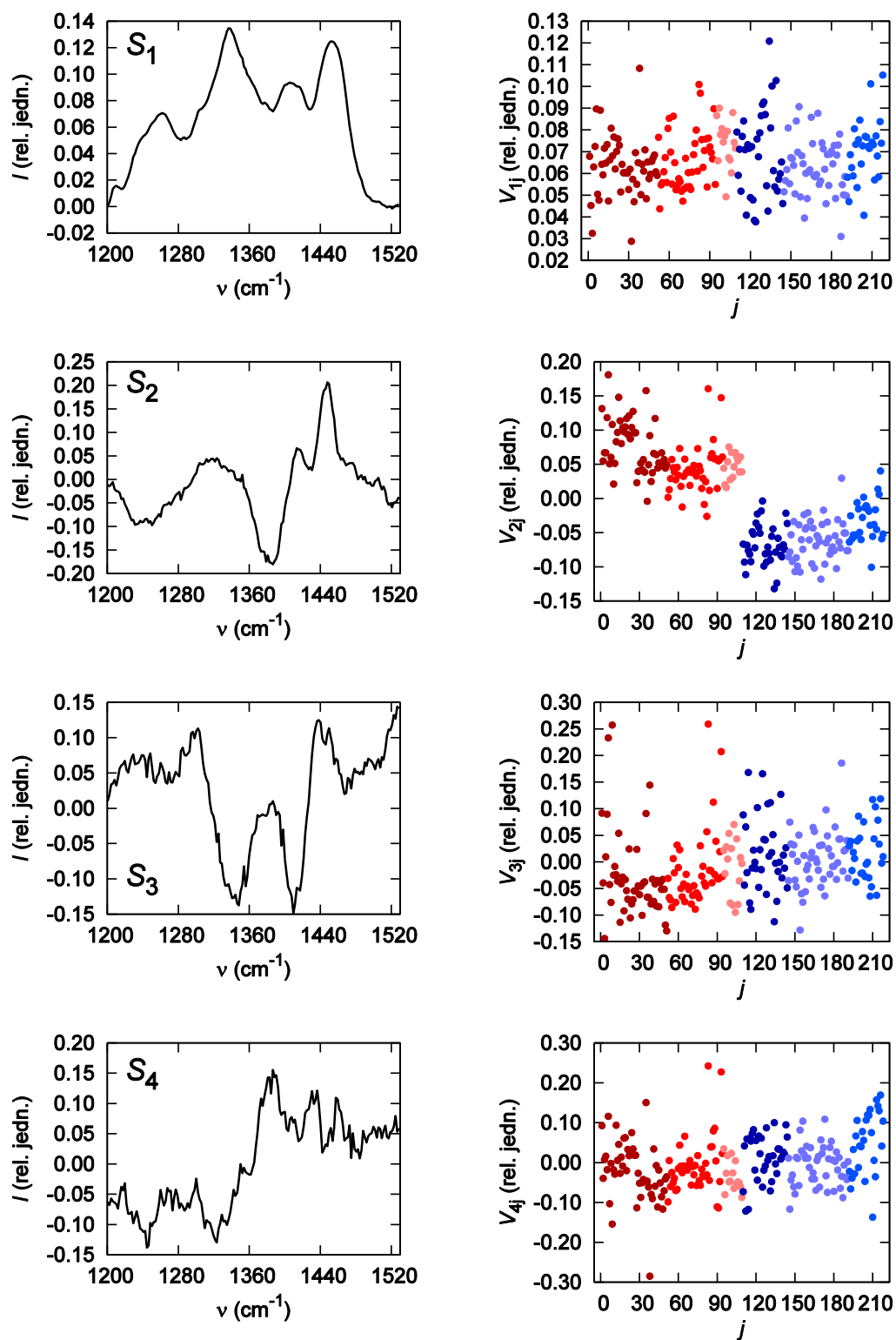
**Obrázek 48:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 800 až 975 $\text{cm}^{-1}$ . První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3



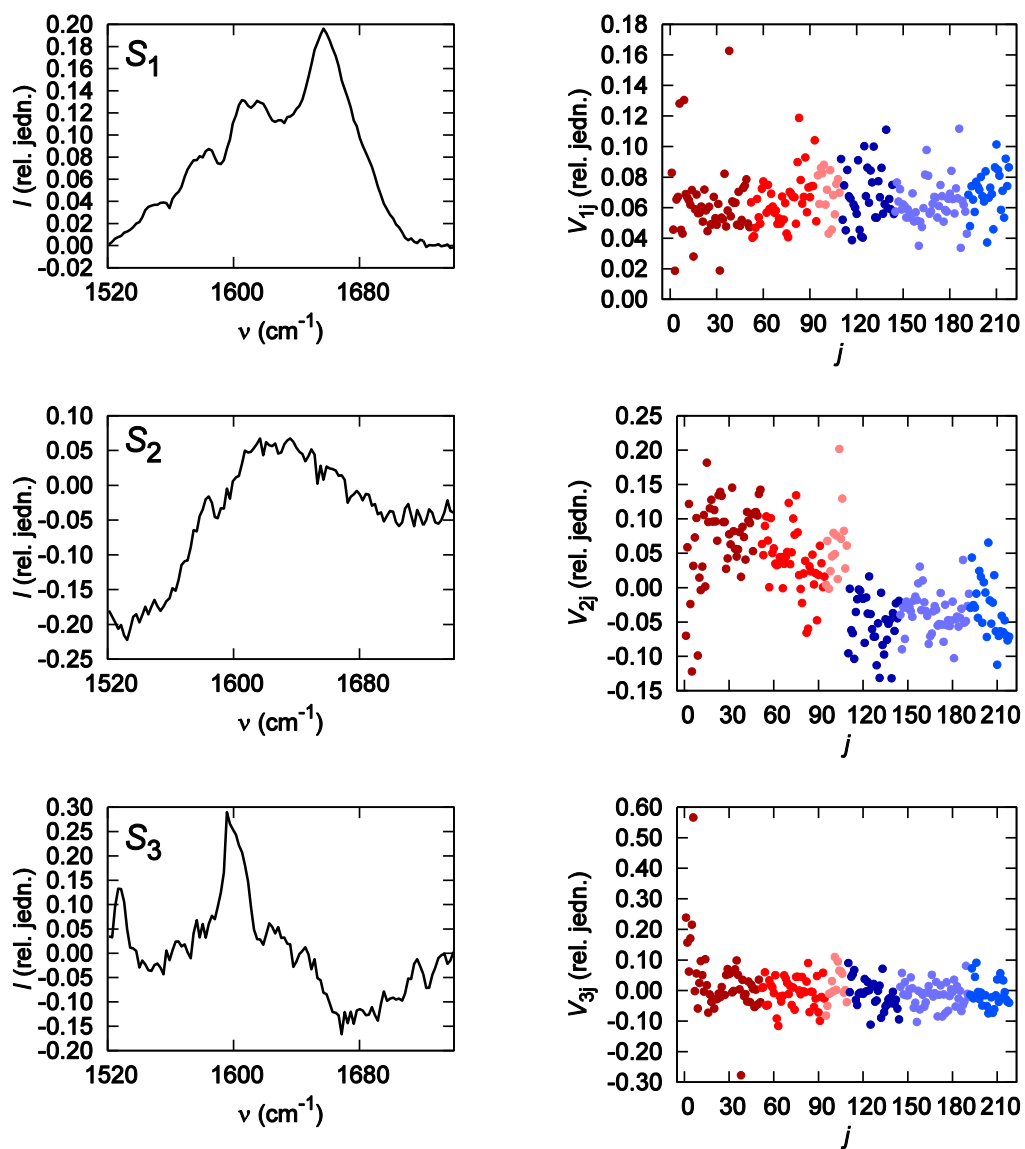
**Obrázek 49:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1020 až 1139  $\text{cm}^{-1}$ . Druhé subspektrum (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3



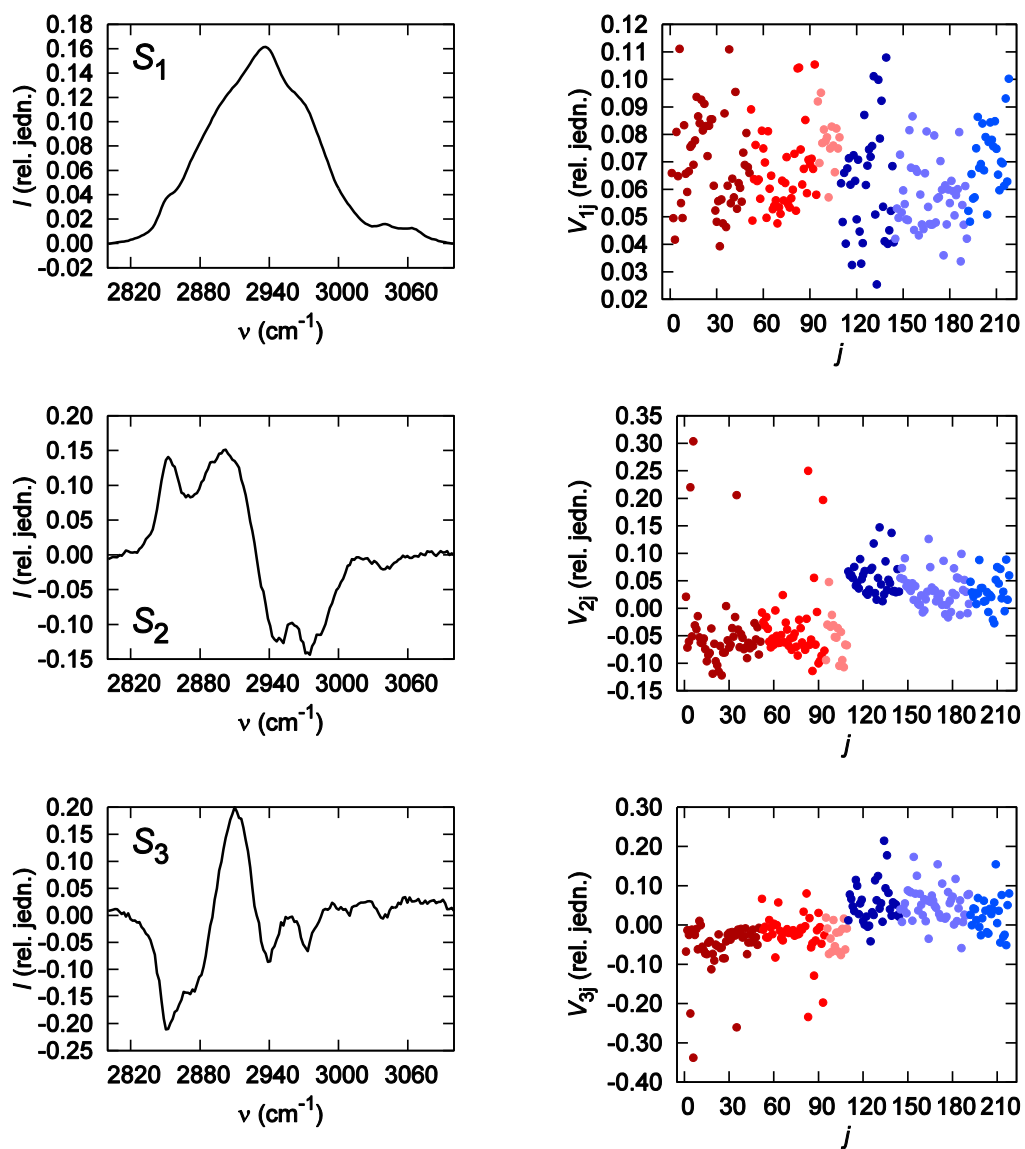
**Obrázek 50:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1130 až 1180  $\text{cm}^{-1}$ . První dvě subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3



**Obrázek 51:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1200 až 1530  $\text{cm}^{-1}$ . První čtyři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3



**Obrázek 52:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 1520 až 1740  $\text{cm}^{-1}$ . První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3



**Obrázek 53:** Výsledky faktorové analýzy oblasti 2800 až 3100  $\text{cm}^{-1}$ . První tři subspektra (vlevo) a odpovídající koeficienty matice  $V$  (vpravo). YPD buňky jsou zobrazeny v odstínech červené, YNB buňky v odstínech modré. Soubor 3

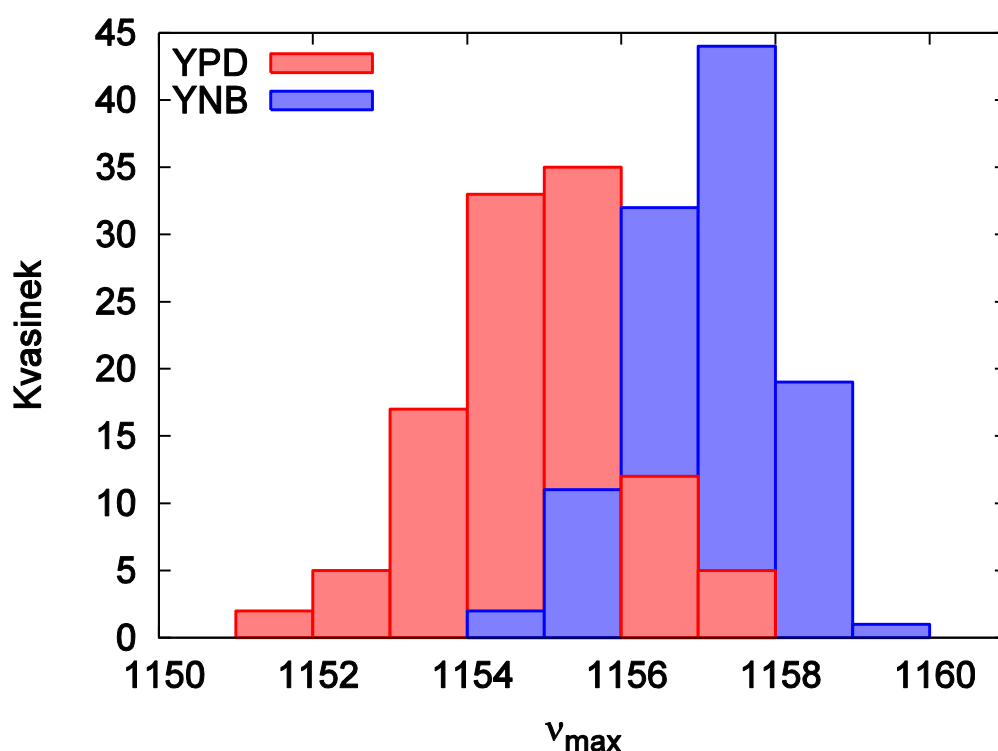


Oblast (cm <sup>-1</sup> )	Subsp.	Polohy pásů (cm <sup>-1</sup> )	p (%)	V <sub>·,i,YPD</sub> · 10 <sup>-2</sup> (rel. jedn.)	V <sub>·,i,YNB</sub> · 10 <sup>-2</sup> (rel. jedn.)
607 – 636	1	621	89,4	–	–
640 – 770	1	646, 683, 713, 719, 748	< 0,01	5,6 ± 1,9	7,2 ± 2,2
	2	670	< 0,01	5,4 ± 5,8	-3,2 ± 4,5
	3	681, 729 (-)	< 0,01	-2,6 ± 7,3	1,5 ± 5,6
770 – 790	1	780	< 0,01	7,9 ± 3,4	3,7 ± 1,9
	2	776 (-), 784	0,2	-3,2 ± 7,4	2,4 ± 5,7
800 – 975	1	813, 853, 932, 959 (r)	24,7	–	–
	2	~815, ~851, ~890, 943 (-)	< 0,01	5,2 ± 5,4	-4,0 ± 4,6
	3	817, 880, 888, 930, 950	12,5	–	–
972 – 994	1	980	< 0,01	3,6 ± 4,2	6,1 ± 4,9
994 – 1014	1	1003	0,5	6,8 ± 2,6	5,9 ± 2,1
	2	1001 (-), 1007	14,9	–	–
1020 – 1139	1	1085, 1107, 1128	< 0,01	5,5 ± 1,2	7,6 ± 1,8
	2	1070, 1083 (-), 1093	< 0,01	6,4 ± 4,0	-4,2 ± 4,3
1130 – 1180	1	1156	< 0,01	4,2 ± 2,0	7,8 ± 3,1
	2	1151, 1162 (-)	< 0,01	5,8 ± 4,6	-3,3 ± 5,2
1200 – 1530	1	1210, 1262, 1339, 1406, 1454	59	–	–
	2	~1241 (-), ~1318, 1387 (-), 1448	< 0,01	5,9 ± 3,8	-5,7 ± 3,2
	3	~1302, ~1348 (-), 1387, 1410 (-), 1438, 1369 (-)	0,02	-2,2 ± 7,2	1,2 ± 5,8
	4	1245 (-), 1323 (-), 1387, 1437, 1458	0,06	-1,8 ± 6,9	1,4 ± 6,4
1520 – 1740	1	1548 – 1555, 1584, 1605, 1615, 1657	38,6	–	–
	2	~1634	< 0,01	5,7 ± 5,5	-4,1 ± 3,6
	3	1527, 1596	0,36	1,3 ± 8,4	-1,3 ± 4,3

**Tabulka 6:** Polohy pásů v jednotlivých subspektrech (Subsp.) faktorové analýzy uvedené oblasti. Záporné pásy jsou značeny (-), rameno (r), široké pásy ~. Pravděpodobnost p (viz kapitulu 3.7) a střední hodnoty koeficientů V<sub>·,i,YPD</sub> pro YPD a V<sub>·,i,YNB</sub> pro YNB buňky pro p < 1%. **Tabulka pokračuje na další stránce**

Oblast ( $\text{cm}^{-1}$ )	Subsp.	Polohy pásů ( $\text{cm}^{-1}$ )	$p$ (%)	$V_{\cdot,i,YPD} \cdot 10^{-2}$ (rel. jedn.)	$V_{\cdot,i,YNB} \cdot 10^{-2}$ (rel. jedn.)
2800 – 3100	1	2937	0,05	$7,0 \pm 1,6$	$6,2 \pm 1,6$
	2	2852, 2902, 2948 (-), 2975 (-), 3040 (-)	< 0,01	$-4,3 \pm 6,9$	$3,9 \pm 3,3$
	3	2852 (-), 2910, 2939 (-), 2973(-)	< 0,01	$-3,8 \pm 5,8$	$4,6 \pm 4,8$

*Tabulka 6 – pokračování*

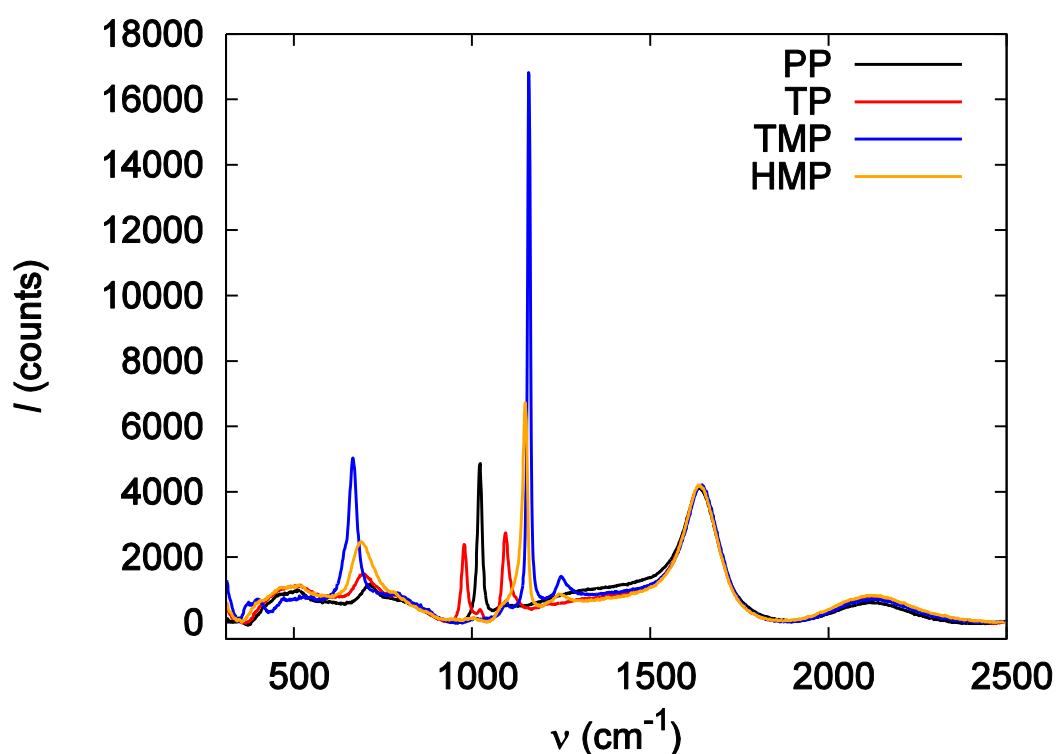


*Obrázek 54: Histogram poloh pásů  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrační polyfosfátu pro YPD (červeně) a YNB (modře) buňky. Menší sloupec je vždy zobrazen před větším*

### 4.3 Studium posuvu pásu polyfosfátu *in vitro*

Vzhledem k tomu, že k nejvýraznějším spektrálním rozdílům ve spektrech kvasinek patřila poloha pásu polyfosfátu okolo  $1155 \text{ cm}^{-1}$ , byly navrženy experimenty *in vitro* s anorganickými fosfátovými sloučeninami, jejichž účelem bylo odhalit příčinu tohoto jevu. Experimenty probíhaly na Ramanově spektrometru Jobin-Yvon-Spex, nastavení spektrometru je popsáno v kapitole 3.1.2.

Na obrázku 55 jsou zobrazena spektra roztoků fosfátových sloučenin: pyrofosfátu sodného (PP,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), trifosfátu sodného (TP,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ), trimetafosfátu sodného (TMP,  $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ ) a hexametafosfátu (HMP). Tato spektra byla v programu *Background* normována na pás deformačních vibrací vody na  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Polohy maxim pásů fosfátů jsou shrnuty v tabulce 7. Tyto pásy podle literatury (Majed et al., 2009) identifikujeme jako pás P–O–P vibrací (mezi  $660$  a  $730\text{ cm}^{-1}$ ) a pás  $(\text{PO}_3)^{2-}$  valenčních (*stretching*) vibrací (mezi  $970\text{ cm}^{-1}$  a  $1160\text{ cm}^{-1}$ ). Pás  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací je u trifosfátu rozštěpen na dva pásy.



**Obrázek 55:** Spektra fosfátových sloučenin:  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (pyrofosfát, PP),  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  (trifosfát, TP),  $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$  (trimetafosfát, TMP), hexametafosfát sodný (HMP)

Pro další experimenty byl využit zejména hexametafosfát, jehož pásy odpovídají pásům polyfosfátu pozorovaným ve spektrech vakuol kvasinek. Byla měřena závislost polohy pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací na pH vzorku, koncentraci HMP ve vzorku a na koncentraci různých kationtů ve vzorku. Poloha pásu byla vždy určována ze spekter po společné korekci fluorescenčního pozadí. Maximum pásu

bylo určeno postupem popsaným v kapitole 3.8. Jsou-li v grafu vyneseny chybové úsečky, zobrazují pouze chybu regrese, nikoliv celkovou experimentální chybu.

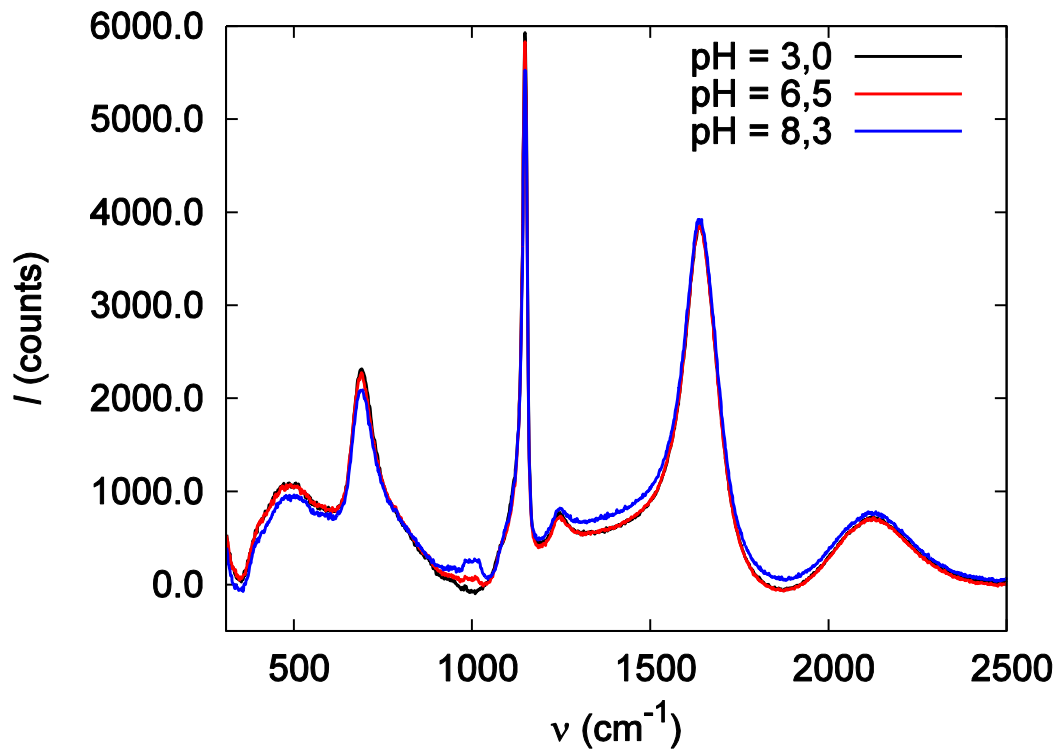
Molární koncentrace hexametafosfátu je v této kapitole udávána jako koncentrace  $\text{PO}_3^-$  skupiny za předpokladu, že se všechny hexametafosfát skládá z šesti fosfátových jednotek spojených do kruhu, stejně tak byla určena jeho molární hmotnost, která není výrobcem uváděna. Tento předpoklad není naplněn, protože použitý hexametafosfát je směsí různých cyklických oligofosfátů (výrobce udává vzorec  $(\text{NaPO}_3)_n$  a obsah  $\text{P}_2\text{O}_5$  65% až 70%, viz tabulku 2 v kapitole 3.3).

Látka	Naměřené hodnoty		Majed et al., 2009	
	P–O–P vibrace	$(\text{PO}_3)^{2-}$ vibrace	P–O–P vibrace	$(\text{PO}_3)^{2-}$ vibrace
PP	712 $\text{cm}^{-1}$ , široký pás	1023 $\text{cm}^{-1}$	738 $\text{cm}^{-1}$	1022 $\text{cm}^{-1}$
TP	686 $\text{cm}^{-1}$	978 $\text{cm}^{-1}$ , 1094 $\text{cm}^{-1}$	–	–
TMP	666 $\text{cm}^{-1}$	1159 $\text{cm}^{-1}$	–	–
HMP	690 $\text{cm}^{-1}$	1150 $\text{cm}^{-1}$	690 $\text{cm}^{-1}$	1157 $\text{cm}^{-1}$

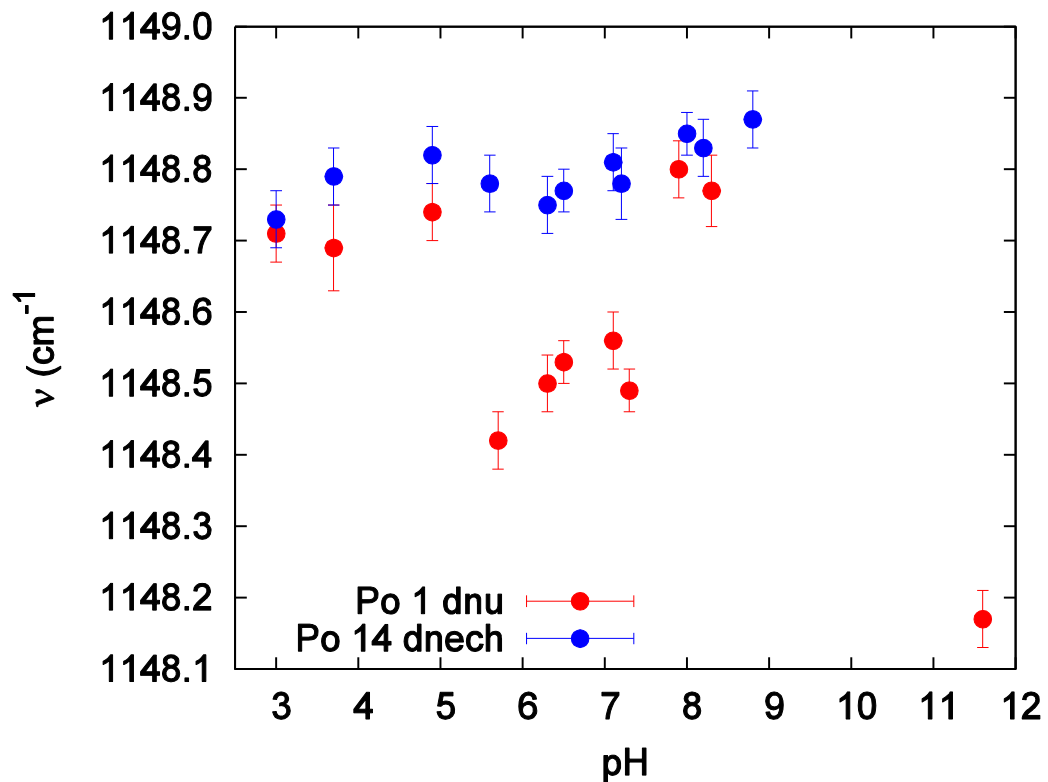
*Tabulka 7: Polohy pásů fosfátových sloučenin*

#### 4.3.1 Závislost polohy pásu HMP na pH

Přirozené pH HMP rozpuštěného v deionizované vodě na koncentraci 0,3 M je 6,5. Toto pH bylo ve vzorcích o stejné koncentraci upravováno na výslednou hodnotu přidáním HCl nebo NaOH. Bylo připraveno 11 vzorků HMP o pH 3,0 až 11,6. Spektra těchto vzorků byla měřena po jednom dni od přípravy, po čtrnácti dnech od přípravy bylo přeměřeno pH vzorků a znovu byla měřena spektra. Vzorku o pH 11,6 kleslo po čtrnácti dnech pH na 8,8, ostatní hodnoty pH se lišily maximálně o 0,1. Spektra vzorků o různých pH se prakticky neliší, viz obrázek 56 (uvádíme pouze pro vybrané hodnoty pH). Polohy maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrace jsou vyneseny do grafu na obrázku 57 v závislosti na pH.



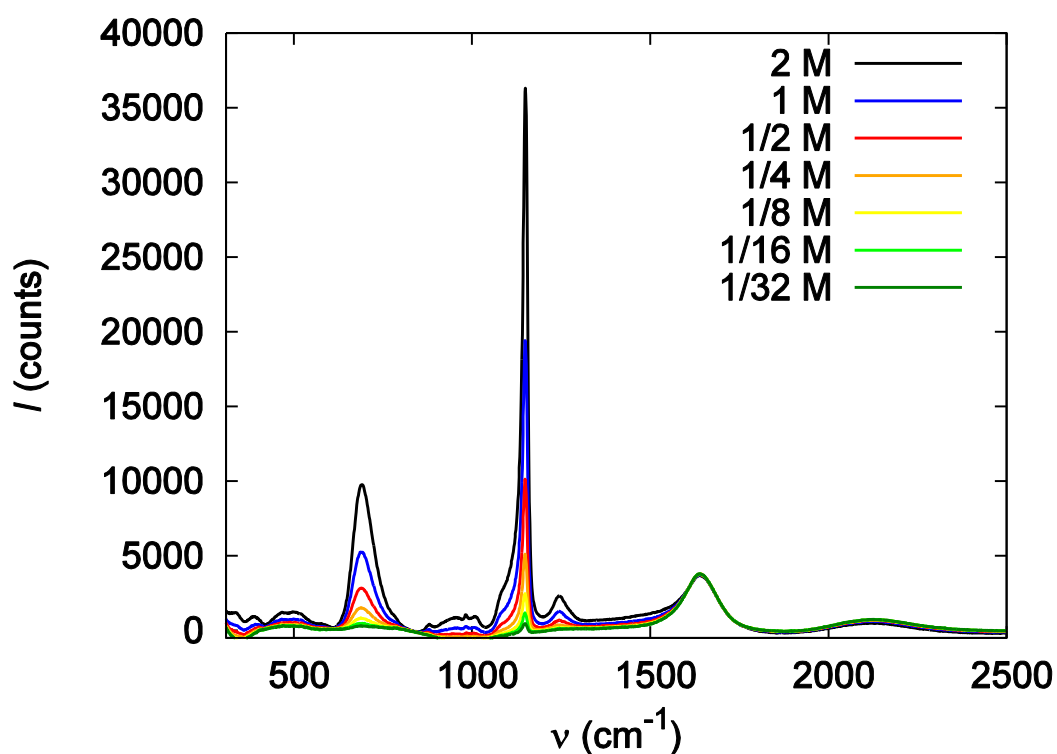
Obrázek 56: Spektra hexametafosfátu v prostředí o různém pH



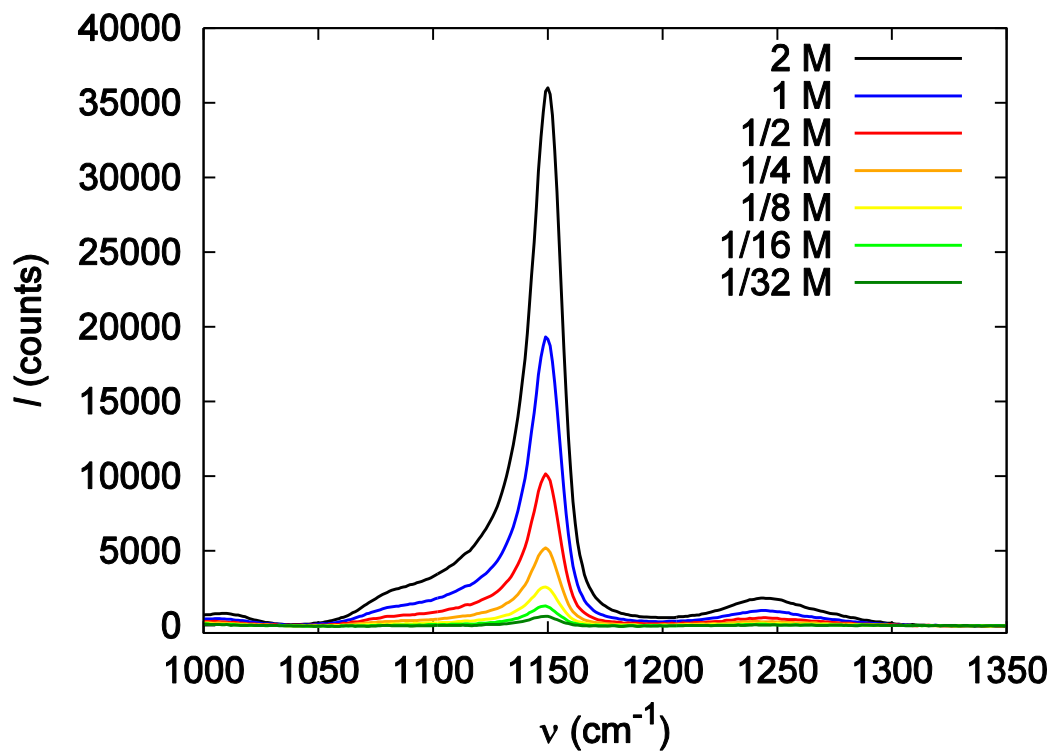
Obrázek 57: Poloha maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací v závislosti na pH vzorku měřená po jednom dnu od přípravy a po čtrnácti dnech od přípravy

### 4.3.2 Závislost polohy pásu HMP na koncentraci

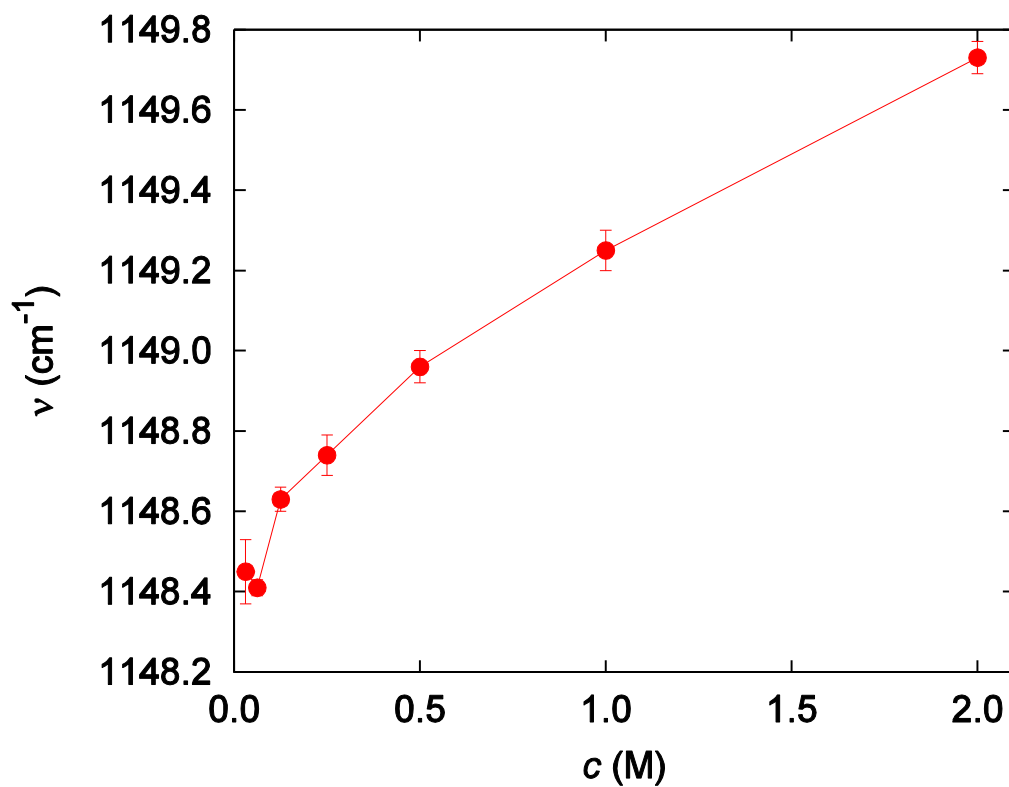
Bylo připraveno sedm vzorků o různé koncentraci hexametafosfátu od 2 M do 1/32 M. Spektra těchto vzorků po korekci fluorescenčního pozadí a normalizaci na pás deformačních vibrací vody na  $1640\text{ cm}^{-1}$  jsou zobrazena v obrázku 58. Oblast od  $1000\text{ cm}^{-1}$  do  $1350\text{ cm}^{-1}$  po dodatečné korekci pozadí je zobrazena na obrázku 59. Maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrace jsou v závislosti na koncentraci vynesena do grafu na obrázku 60.



*Obrázek 58: Spektra hexametafosfátu v závislosti na jeho koncentraci*



Obrázek 59: Spektra hexametafosfátu v závislosti na jeho koncentraci, výřez

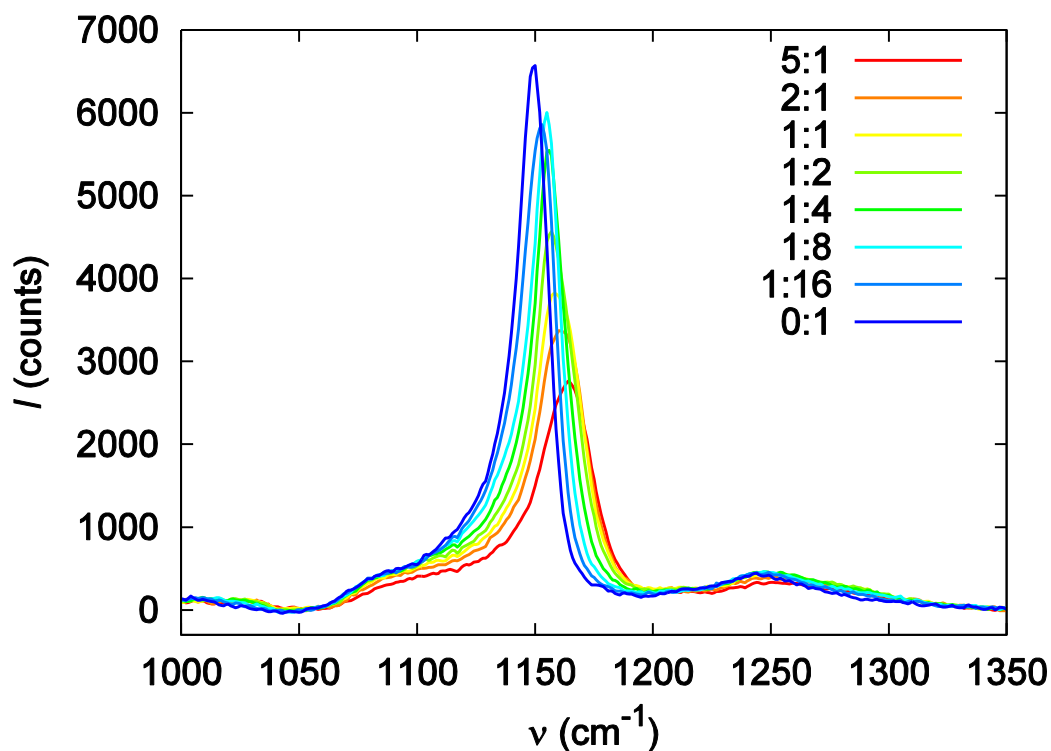


Obrázek 60: Závislost polohy maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací HMP na jeho koncentraci

### 4.3.3 Závislost polohy pásu HMP a TMP na koncentraci $Mg^{2+}$

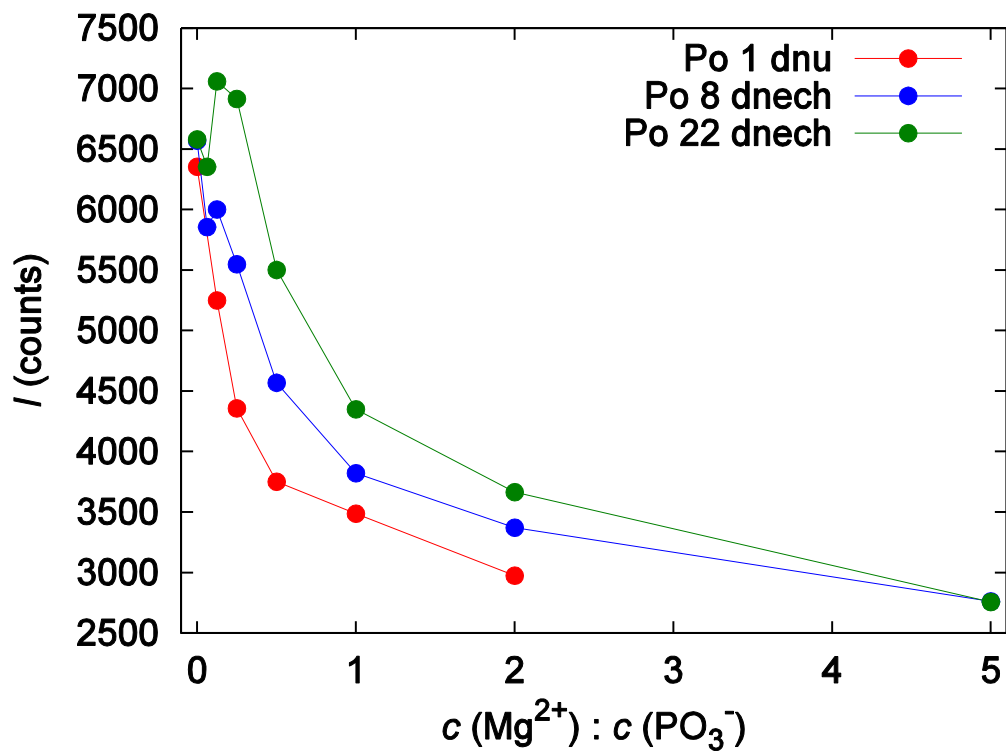
Byly připraveny vzorky HMP o koncentraci 0,3 M a o různé koncentraci  $MgCl_2$  od 0 M až do 1,5 M a po jednom dnu od přípravy byla naměřena spektra. Nové vzorky o koncentraci HMP 0,3 M a koncentraci  $MgCl_2$  od 0 M do 1,5 M byly měřeny po osmi dnech od přípravy a po 22 dnech od přípravy. Spektra v oblasti 1000 až  $1350\text{ cm}^{-1}$  po korekci fluorescenčního pozadí a normalizaci na pásy vody nad  $1500\text{ cm}^{-1}$  pro měření po osmi dnech od přípravy jsou zobrazena na obrázku 61. Z obrázku je patrné, že pás  $(PO_3)^{2-}$  vibrací se s rostoucím poměrem koncentrací snižuje a posouvá k vyšším hodnotám vlnočtů. Intenzity tohoto pásu jsou pro všechna tři měření vyneseny do grafu na obrázku 62. Polohy maxima tohoto pásu jsou vyneseny do grafu na obrázku 63.

Byly připraveny vzorky trimetafosfátu o koncentraci  $PO_3^-$  0,3 M a o koncentraci  $MgCl_2$  od 0 M do 1,5 M a po osmi dnech od přípravy byla naměřena jejich spektra. Polohy maxima pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací jsou vyneseny do grafu na obrázku 64 spolu s polohami maxima tohoto pásu HMP při měření po osmi dnech od přípravy vzorku.

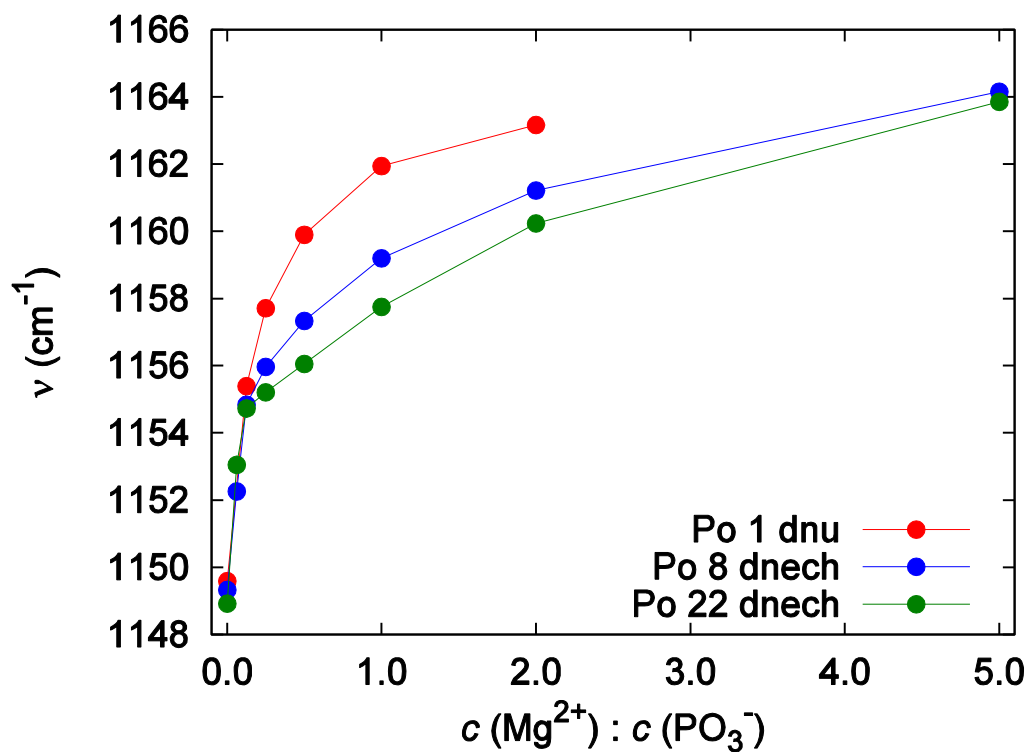


**Obrázek 61:** Spektra HMP v závislosti na koncentraci  $Mg^{2+}$ . Poměr koncentrace  $Mg^{2+}$  a  $PO_3^-$  je zaznamenán v legendě grafu

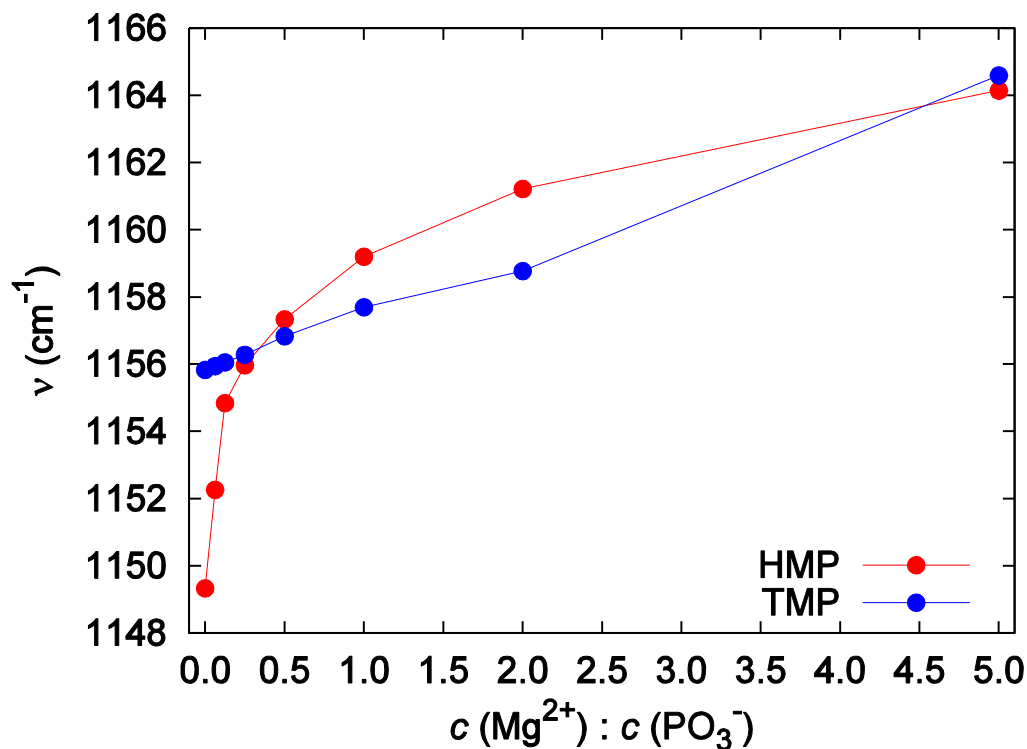




Obrázek 62: Intenzita pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací HMP okolo  $1150\text{ cm}^{-1}$  v závislosti na poměru koncentrací  $Mg^{2+}$  a  $PO_3^-$



Obrázek 63: Poloha maxima pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací HMP v závislosti na poměru koncentrací  $Mg^{2+}$  a  $PO_3^-$

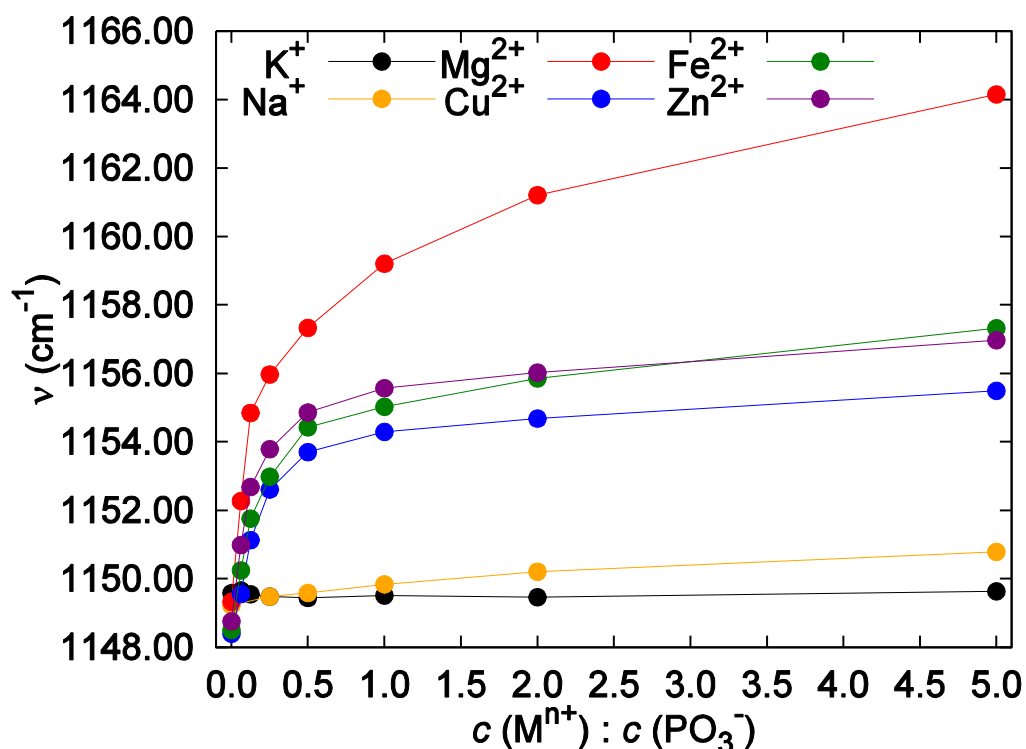


**Obrázek 64:** Poloha maxima pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací v závislosti na poměru koncentrací  $Mg^{2+}$  a  $PO_3^-$  pro hexametafosfát a trimetafosfát

#### 4.3.4 Závislost polohy pásu HMP na koncentraci kationtů

Dále byly připraveny vzorky HMP o koncentraci 0,3 M a koncentraci 0 M až 1,5 M chloridů dalších kationtů, které se mohou v buňkách vyskytovat: NaCl, KCl, CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub> a ZnCl<sub>2</sub>. Vzorky s KCl byly měřeny osm dní po přípravě, vzorky s NaCl jeden den po přípravě, vzorky s CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> a FeCl<sub>2</sub> se při delším stání srážely, byly proto měřeny ihned po přípravě. Polohy maxima pásu  $(PO_3)^{2-}$  vibrací HMP v závislosti na poměru koncentrace kationtů a  $PO_3^-$  skupin jsou vyneseny do grafu na obrázku 65. V grafu je též vynesena závislost polohy maxima pásu na poměru koncentrace  $Mg^{2+}$  a  $PO_3^-$  měřená osm dní po přípravě. Vzorek se ZnCl<sub>2</sub> o koncentraci 0,15 M se v průběhu měření kalil, přestože byl připraven těsně před měřením, stejně jako vzorky s FeCl<sub>2</sub> o koncentraci 0,15 až 1,5 M.

Byly připraveny též vzorky s CaCl<sub>2</sub> a FeCl<sub>3</sub>, ty se však i při relativně nízkých koncentracích kationtů a ihned po přípravě srážely a nebylo tedy možné měřit spektra roztoku.



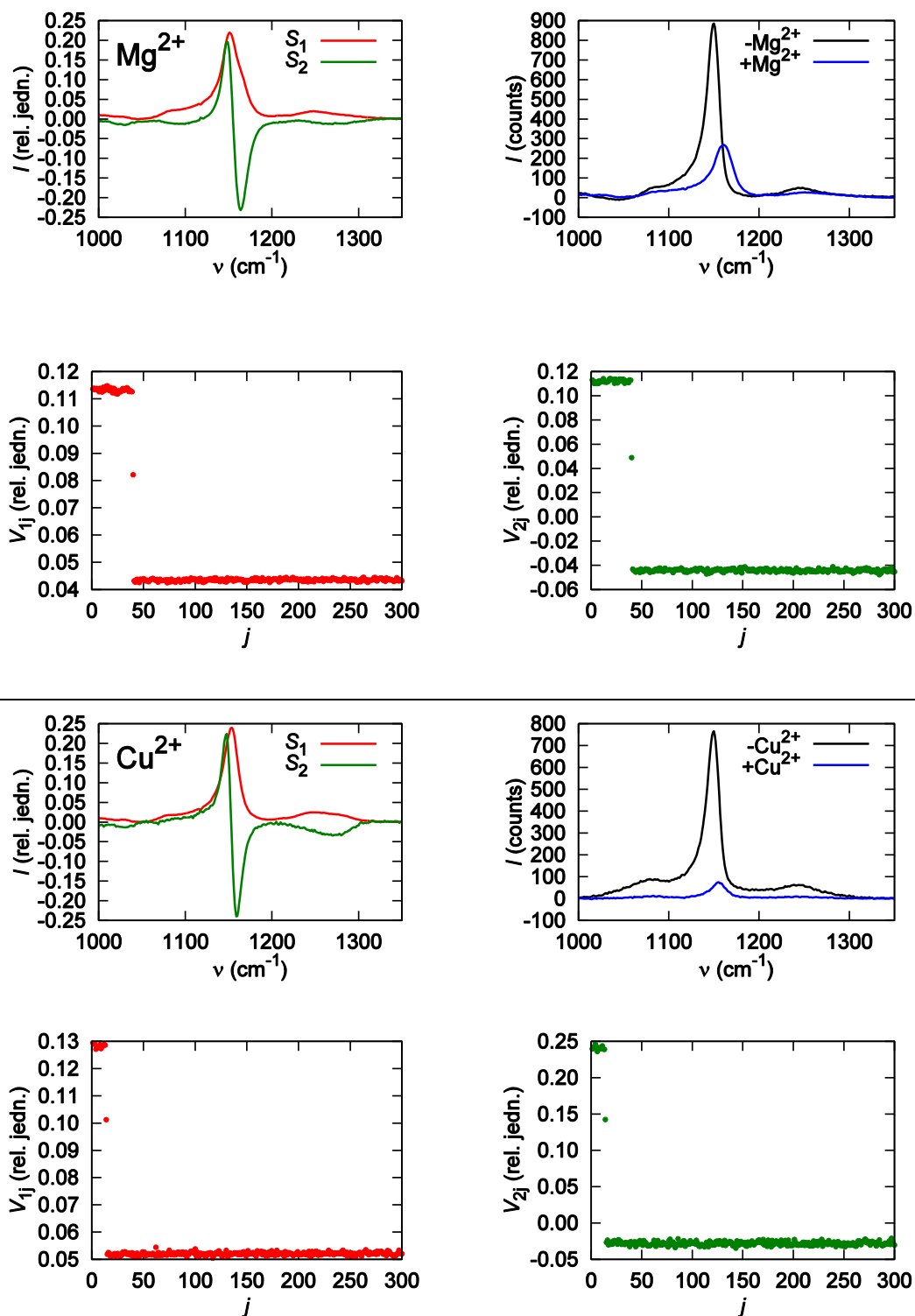
*Obrázek 65: Poloha maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací HMP v závislosti na poměru koncentrací různých kationtů a  $\text{PO}_3^-$*

#### 4.3.5 Kinetika reakce HMP s dvojmocnými kationty

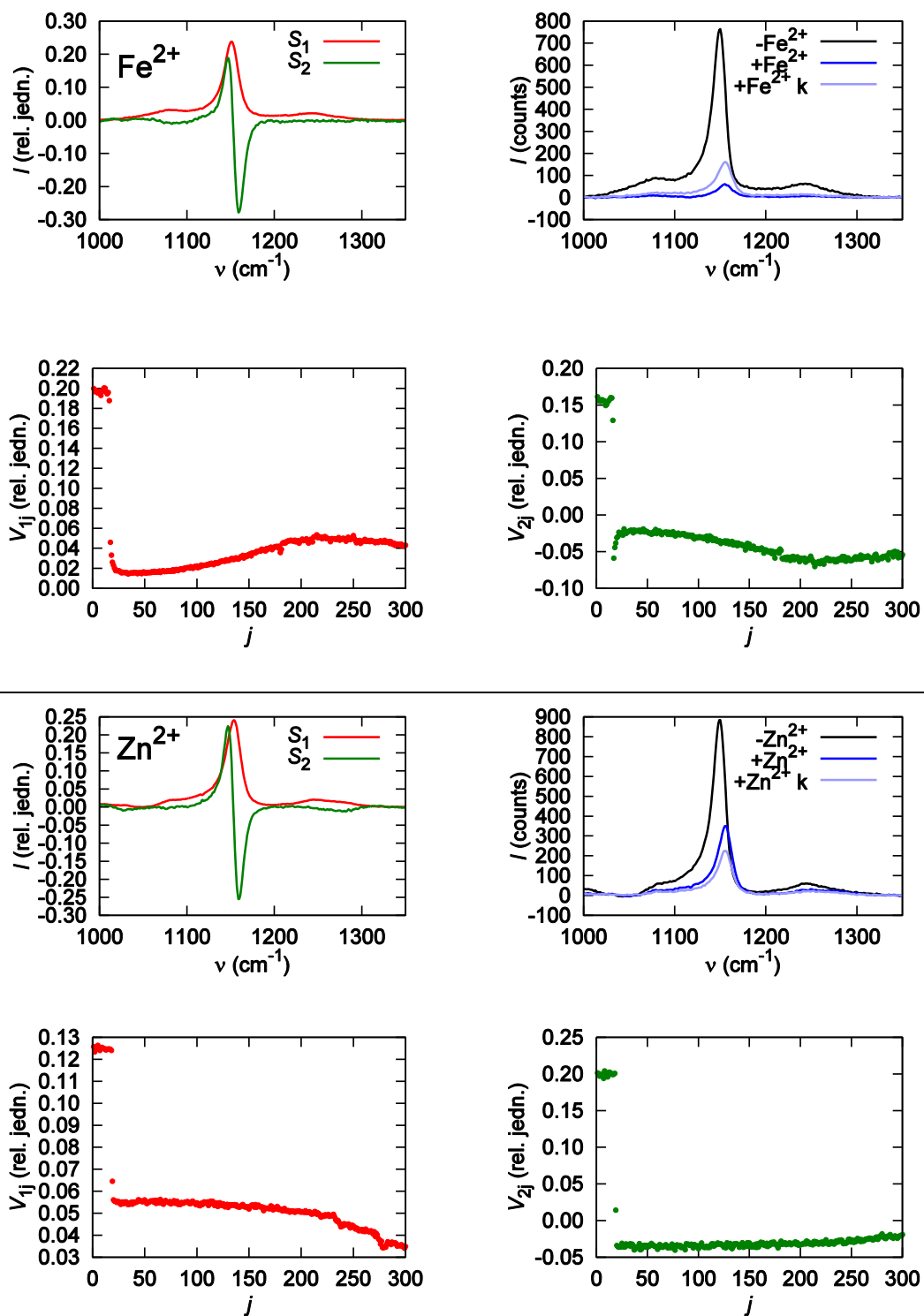
Protože jsme po přidání některých kationtů do roztoku HMP pozorovali s časem narůstající tvorbu zákalu až sraženiny, pokusili jsme se objasnit kinetiku tvorby komplexů HMP s kationty a jejich souvislost s posuvem pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$ . Byla měřena spektra při reakci HMP s  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$  a  $\text{ZnCl}_2$ . Roztok HMP o koncentraci 0,6 M byl umístěn v kyvetě ve spektrometru a míchán magnetickým míchadlem tak, aby toto míchadlo nekřížilo dráhu laserového svazku. Spektra byla vzorkována po jedné vteřině, čas mezi jednotlivými měřeními lze zanedbat. Nejprve bylo několik jednotek až desítek vteřin měřeno spektrum roztoku čistého hexametafosfátu, poté byl pipetou do kyvety rychle vstříknut 0,6 M roztok příslušného chloridu, aniž by bylo přerušeno měření spekter. Tímto způsobem byla získána časová řada spekter zachycující tvorbu komplexu.

Spektra byla zpracovávána zvláště pro jednotlivé chloridy. Bylo odečteno fluorescenční pozadí v oblasti  $1000\text{ cm}^{-1}$  až  $1350\text{ cm}^{-1}$  a v této oblasti byla provedena faktorová analýza. Její výsledky jsou shrnuty v obrázku 66 pro  $\text{MgCl}_2$  a  $\text{CuCl}_2$  a v obrázku 67 pro  $\text{FeCl}_2$  a  $\text{ZnCl}_2$ . Pro každý chlorid je zobrazeno první a druhé

subspektrum, jim příslušné koeficienty matice  $V$  a průměrné spektrum z několika spekter před přidáním chloridů a po přidání chloridů a pro vzorky s  $\text{FeCl}_2$  a  $\text{ZnCl}_2$  ještě z několika posledních naměřených spekter.



**Obrázek 66:** Kinetika reakce HMP s  $\text{Mg}^{2+}$  (horní část) a  $\text{Cu}^{2+}$  (spodní část). První a druhé subspektrum ( $S_1$  a  $S_2$ ), průměrné spektrum několika spekter před (-) a po (+) přidání  $\text{Mg}^{2+}$  resp.  $\text{Cu}^{2+}$ , koeficienty  $V_{1j}$  a  $V_{2j}$



**Obrázek 67:** Kinetika reakce HMP s  $\text{Fe}^{2+}$  (horní část) a  $\text{Zn}^{2+}$  (spodní část). První a druhé subspektrum ( $S_1$  a  $S_2$ ), průměrné spektrum několika spekter před (-) a těsně po (+) přidání  $\text{Fe}^{2+}$  resp.  $\text{Zn}^{2+}$  a na konci měření (+k), koeficienty  $V_{1j}$  a  $V_{2j}$

# 5 Diskuse

## 5.1 Identifikace pásů ve spektrech vakuol

Počet relevantních subspekter faktorové analýzy celé oblasti 600 až 3900  $\text{cm}^{-1}$  odhadujeme na základě obrázků 22, 33 a 43 v kapitole 4 jako 12 až 14, ostatní subspektra podle těchto obrázků odpovídají již jen experimentální chybě. První subspektra, odpovídající „průměrnému“ spektru daného souburu, jsou zobrazena na obrázcích 21, 32 a 42. Ve vyšších subspektrech se projevuje vždy mnoho vlivů a je tedy obtížné analyzovat celou měřenou spektrální oblast najednou. Proto byla oblast měření po všech úpravách popsanych v kapitolách 3.4 a 3.5 rozdělena na několik menších oblastí. V nich pak byla provedena faktorová analýza a korekce pozadí, výsledky jsou uvedeny v kapitolách 4.1 a 4.2. Polohy pásů v subspektrech jednotlivých oblastí, střední hodnoty koeficientů matice  $V$  pro jednotlivé skupiny buněk a pravděpodobnost  $p$ , že jsou skutečné střední hodnoty shodné, lze nalézt v tabulkách 4, 5 a 6 v kapitole 4.

V této kapitole používáme ve shodě s kapitolami 3.2, 3.6 a 4 následující označení: soubor 1 – soubor *lag* a *log* buněk z kapitoly 4.1, soubor 2 – soubor *YPD* a *YNB* buněk z kapitoly 4.2.1, soubor 3 – soubor *YPD* a *YNB* buněk z kapitoly 4.2.2.

Pásky ramanovských spekter jsou v této kapitole interpretovány na základě tabulek v příloze B, předpokládané polohy pásů podle těchto tabulek jsou uváděny v závorce. Příslušnou citaci literatury lze nalézt v tabulkách v příloze B, zde je uváděna pouze v případě, že identifikujeme vibraci, která není v těchto tabulkách uvedena.

### 5.1.1 Pás na 621 $\text{cm}^{-1}$

Tento pás je málo intenzivní, ale objevuje se u všech tří souborů buněk. Nepodařilo se jej jednoznačně přiřadit konkrétní biomolekule, mohlo by jít o pás amidu IV proteinů (625  $\text{cm}^{-1}$ ), vibrace kruhu thyminu (617  $\text{cm}^{-1}$ ) nebo vibrace fruktózy (626  $\text{cm}^{-1}$ ). Dále by se mohlo jednat o pás adeninu (623  $\text{cm}^{-1}$  (De Gelder et al., 2007)) nebo aminokyseliny fenylalaninu (622  $\text{cm}^{-1}$  (De Gelder et al., 2007), resp. 618  $\text{cm}^{-1}$  (Tomáš Pazderka, naměřená spektra roztoků aminokyselin, osobní sdělení dne 25. 2. 2013)).

### 5.1.2 Pásky v oblasti 640 až 770 $\text{cm}^{-1}$

Malý pás na 642  $\text{cm}^{-1}$  se ve třetím souboru objevuje coby rameno na 646  $\text{cm}^{-1}$ , což může být způsobeno odlišným způsobem odečtu pozadí v oblasti charakteristických vibrací biomolekul. Tento pás by mohl patřit tyrosinu (641  $\text{cm}^{-1}$  (De Gelder et al., 2007) resp. 640  $\text{cm}^{-1}$  (Maquelin et al., 2002b)), prolinu (642  $\text{cm}^{-1}$  (De Gelder et al., 2007)), ani jeden z těchto pásků však nenaměřil Tomáš Pazderka ve spektrech roztoků těchto aminokyselin (Tomáš Pazderka, osobní sdělení dne 25. 2. 2013). Dále by se mohlo jednat o pás acetoacetátu (640  $\text{cm}^{-1}$ , *strong* (De Gelder et al., 2007)) nebo guaninu (650  $\text{cm}^{-1}$ , *strong*).

Kromě pásu na 642  $\text{cm}^{-1}$  se v této oblasti nachází široký pás s maximy na 682 až 687  $\text{cm}^{-1}$  a 713 až 719  $\text{cm}^{-1}$ , v případě souboru 3 s ramenem na 748  $\text{cm}^{-1}$ . Nejvýznamnějším pásem v této oblasti je široký pás O–P–O vibrace polyfosfátu s maximem okolo 690  $\text{cm}^{-1}$ . Šířka v polovině výšky ekvivalentního pásu hexametafosfátu je podle našich měření přibližně 70  $\text{cm}^{-1}$ , pás polyfosfátu tedy pokrývá značnou část celé této oblasti. Dále se v této oblasti vyskytují pásy vibrací fosfátové hlavičky fosfolipidů (708 – 718  $\text{cm}^{-1}$ ), pocházející zřejmě od vakuolární membrány, tyto vibrace přiřazujeme druhému maximu tohoto pásu. Pás na 748  $\text{cm}^{-1}$  v souboru 3 odpovídá též vibracím hlavičky fosfolipidů a obecně O–P–O vibracím. Tento pás v ostatních dvou souborech nepozorujeme, ovšem šum v těchto dvou souborech je vyšší, tento pás jím tak může být překryt.

V této oblasti by se dále měly vyskytovat pás amidu V (725  $\text{cm}^{-1}$ ), pásy thyminu, guaninu a cytosinu (660 až 670  $\text{cm}^{-1}$ ), adeninu (720 až 730  $\text{cm}^{-1}$ ), thyminu (740  $\text{cm}^{-1}$  a 751  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_2$  *rocking* vibrace (715 až 730  $\text{cm}^{-1}$ ), vibrace pyranózy (730 až 790  $\text{cm}^{-1}$ ) a případně vibrace acetylkoenzymu A a koenzymu A (722 až 724  $\text{cm}^{-1}$ ). Alespoň některé tyto pásy se s výše uvedenými nejspíše překrývají.

Ve druhém subspektru v souboru 3 se vyskytuje pás na 670  $\text{cm}^{-1}$ , jehož intenzita je vyšší u *YPD* buněk. Tento pás by mohl odpovídat vibracím thyminu, guaninu a cytosinu. Ve třetím subspektru pozorujeme záporný pás na 728  $\text{cm}^{-1}$ , který by mohl odpovídat vibracím adeninu. Jeho intenzita je mírně nižší (jedná se o záporný pás) pro *YPD* buňky. Zdá se tedy, že *YPD* buňky obsahují více bází nukleových kyselin nebo nukleotidů.

### 5.1.3 Pás na 780 cm<sup>-1</sup>

Tento pás přísluší vibracím O–P–O kostry nukleových kyselin a vibracím bází uracilu, thyminu a cytosinu. Ve vakuolách neočekáváme výskyt nukleových kyselin, spíše tedy tento pás způsobují vibrace jednotlivých nukleotidů a bází.

Intenzita tohoto pásu se liší pro *YPD* a *YNB* buňky statisticky významně pouze pro soubor 3 ( $p < 0,01\%$  pro soubor 3,  $p = 1,8\%$  pro soubor 2). Soudě podle koeficientů matice *V* akumulují *YPD* buňky souboru 3 nukleotidy přibližně 2× více než *YNB* buňky. Ve druhém souboru je situace komplikovanější, neboť druhá a třetí skupina *YPD* a *YNB* buněk má tento pás intenzivnější než první a čtvrtá.

Druhé subspektrum oblasti tohoto pásu, odpovídající posunům pásu na vlnočtové škále, jsme spolu s příslušnými koeficienty matice *V* využívali k ověření, že bylo sesazení vlnočtové škály jednotlivých měřících dnů (viz kapitolu 3.5) provedeno dobře. Kromě souboru 3 se rozdílily mezi jednotlivými skupinami buněk skutečně jeví jako statisticky nevýznamné. Dalším pásem, který jsme k tomuto účelu používali, je pás fenylalaninu na 1003 cm<sup>-1</sup>, zde jsou pro všechny tři soubory rozdílily v poloze pásu statisticky nevýznamné. Vlnočtová škála tedy byla sesazena dobře.

### 5.1.4 Pásky v oblasti 800 až 975 cm<sup>-1</sup>

V této oblasti pozorujeme v souboru 1 a 2 jeden široký pás s maximy v intervalu 850 až 880 cm<sup>-1</sup>, 903 až 933 cm<sup>-1</sup> a s postranními maximy na 812 až 817 cm<sup>-1</sup>, 826 – 831 cm<sup>-1</sup> a 952 až 956 cm<sup>-1</sup>. V souboru 3 jsou pozorována dvě maxima na 853 a 932 cm<sup>-1</sup>, postranní pásky leží na 813 a 959 cm<sup>-1</sup>.

K intenzitě pásu resp. pásů může přispívat velké množství vibrací: různé vibrace sacharidů (818 až 985 cm<sup>-1</sup>), vibrace skupiny C–N–C (800 až 900 cm<sup>-1</sup>), vibrace C–C kostry proteinů (okolo 900 cm<sup>-1</sup>), vibrace C–O–S skupiny (820 až 830 cm<sup>-1</sup>), CH<sub>2</sub> *rocking* vibrace (881 až 940 cm<sup>-1</sup>), C–N valenční vibrace terciárních aminů, vibrace kyseliny trihydrogenfosforečné v kyselém prostředí (891 cm<sup>-1</sup>), vibrace kostry DNA (838 a 891 – 898 cm<sup>-1</sup>, DNA ovšem ve vakuolách neočekáváme), vibrace glycerolu (820, 851 cm<sup>-1</sup>), vibrace vodíkových můstků nízkomolekulárních kyselin (936 – 964 cm<sup>-1</sup>) a vibrace příslušející některým aminokyselinám: prolinu (834 – 842 cm<sup>-1</sup>, 899 cm<sup>-1</sup> a 916 cm<sup>-1</sup>), glycinu (894 cm<sup>-1</sup>), alaninu (851 cm<sup>-1</sup>), glutamátu (857 cm<sup>-1</sup>), serinu (897 cm<sup>-1</sup>) nebo tyrosinu (825 až



834  $\text{cm}^{-1}$ , jedná-li se o volnou aminokyselinu nebo je-li na povrchu proteinů v hydrofilním prostředí, 853  $\text{cm}^{-1}$  uvnitř proteinu v hydrofobním prostředí).

Pás na 812 až 813  $\text{cm}^{-1}$  přiřazujeme vibracím O–P–O skupiny fosfolipidů vakuolární membrány (811  $\text{cm}^{-1}$ ). Za maxima okolo 850  $\text{cm}^{-1}$  budou zodpovědné pravděpodobně hlavně aminokyseliny, zejména tyrosin, za maxima okolo 880 a 930  $\text{cm}^{-1}$  pak pravděpodobně mohou zejména  $\text{CH}_2$  *rocking* vibrace a vibrace kostry proteinů. Toto přiřazení je však vzhledem k velkému množství překrývajících se pásů biomolekul v této oblasti značně nejisté. Pás na 952 až 959  $\text{cm}^{-1}$  se nepodařilo jednoznačně identifikovat, mohlo by se jednat o pás příslušející sacharidům.

Ve druhém subspektru v případě souboru 1 a 2 pozorujeme plynulý přechod mezi maximem na 856 až 857  $\text{cm}^{-1}$  a minimem na 918  $\text{cm}^{-1}$ , ve třetím subspektru pak dvě minima na 851 až 853  $\text{cm}^{-1}$  a 935 až 939  $\text{cm}^{-1}$  a maximum uprostřed mezi nimi na 871 až 872  $\text{cm}^{-1}$ . V případě souboru 3 jsou vyšší subspektra zajímavější – ve druhém subspektru vidíme pásy na 815, 851 a 890  $\text{cm}^{-1}$  a negativní pás na 943  $\text{cm}^{-1}$ . Ve třetím subspektru jsou tři pásy, z nichž poslední dva jsou rozdvojené, maxima jsou na 817, 880, 888, 930 a 950  $\text{cm}^{-1}$ . Všechny tyto pásy se alespoň přibližně vyskytují na vlnočtech, na nichž jsou pásy i v prvních subspektrech souborů a odpovídají patrně vibracím určitých látek. Některé z nich též ukazují na rozdíly mezi *lag* a *log* resp. *YPD* a *YNB* buňkami. Bohužel jejich přesnější identifikace se nezdařila.

### 5.1.5 Pás na 980 až 981 $\text{cm}^{-1}$

Tento pás přiřazujeme vibracím argininu (982  $\text{cm}^{-1}$ ). *YNB* buňky zřejmě ve vakuolách akumulují více této aminokyseliny než *YPD* buňky ( $p < 0,01$  pro soubor 2 i soubor 3), soudě podle koeficientů matice *V* přibližně 1,7 až 2,7-krát. Kvasinky ve vakuolách mohou akumulovat bazické a neutrální aminokyseliny (Li a Kane, 2009), přesto je toto zjištění je překvapivé – arginin obsahuje dusík, který je pro *YNB* buňky nedostatkovým prvkem. Fáze růstu buněčné kultury nemá na tento pás statisticky významný vliv.

### 5.1.6 Pás na 1003 $\text{cm}^{-1}$

Tento pás přísluší dýchací vibraci fenylalaninu. Rozdíl v intenzitě tohoto pásu mezi *YPD* a *YNB* buňkami je statisticky významný pouze v případě souboru 3, v němž mají *YPD* buňky tento pás průměrně zhruba o 15% intenzivnější. Existuje též rozdíl

mezi *lag* a *log* buňkami, *lag* buňky mají tento pás přibližně o 40% intenzivnější než *log* buňky.

### 5.1.7 Pásky v oblasti 1020 až 1180 $\text{cm}^{-1}$

Nejvýznamnější a nejvíce proměnlivou spektrální črtou je v této oblasti pás valenčních vibrací  $(\text{PO}_3)^{2-}$  skupiny polyfosfátu (1151 až 1177  $\text{cm}^{-1}$ ). Vzhledem k tomu, že rozdíly v intenzitě a poloze tohoto pásu se významně projevovaly i ve vyšších subspektech, byla faktorová analýza prováděna zvlášť pro tento pás a zvlášť pro zbytek oblasti od 1020 do 1139  $\text{cm}^{-1}$ .

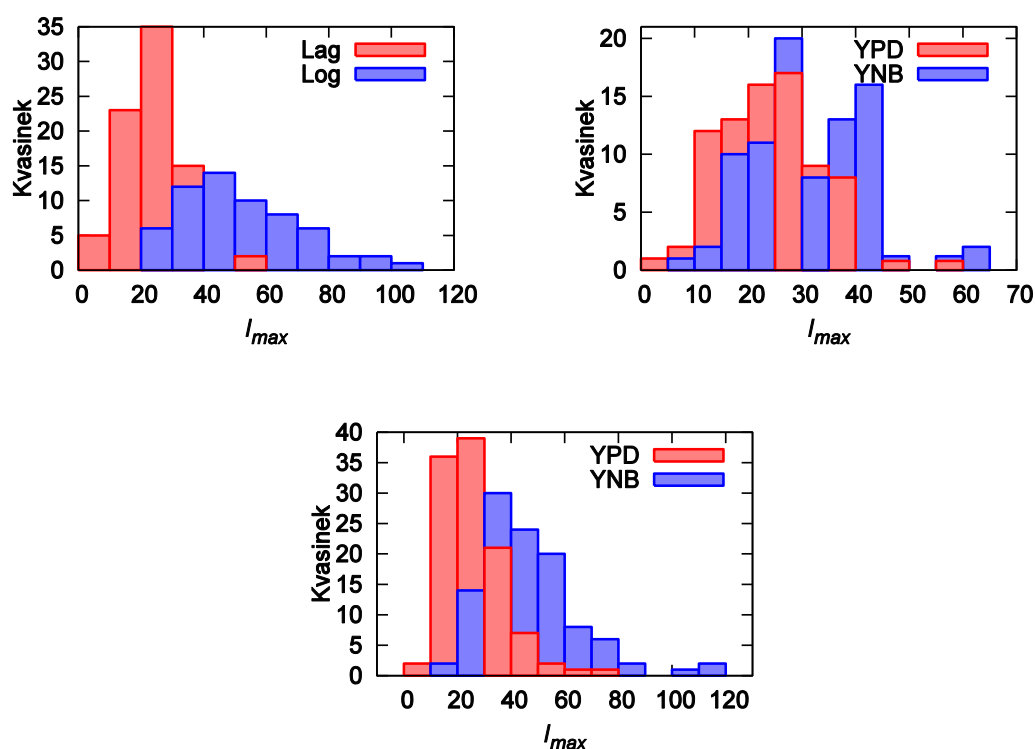
Maximální intenzity pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu po korekci pozadí jsou pro všechny tři soubory vyneseny v histogramech na obrázku 68. Pás polyfosfátu je významně vyšší pro *YNB* buňky než pro *YPD* buňky v souboru 2 i v souboru 3, a to v průměru 1,4 resp. 1,9-krát. Pro *YNB* buňky je též posunutý k vyšším frekvencím. Polohy maxima tohoto pásu, modelovaného pro jednotlivé buňky prvními dvěma subspektry, jsou vyneseny v histogramech na obrázcích 41 a 54 v kapitole 4. V případě souboru 2 se *YPD* buňky rozdělily na dvě skupiny podle polohy tohoto pásu, jak je vidět na obrázku 41, z nichž jedna dobře odpovídá *YNB* buňkám, rozdíl mezi touto skupinou *YPD* buněk a *YNB* buňkami je statisticky nevýznamný ( $p = 1,8\%$ ).

Největší rozdíl je pak v intenzitě tohoto pásu mezi *lag* a *log* buňkami – průměrná intenzita tohoto pásu u *log* buněk je přibližně 2,3-násobná oproti *lag* buňkám. *Lag* buňky se opět rozdělily na dvě skupiny podle polohy tohoto pásu, vzhledem k tomu, že se jedná o stejné buňky jako v případě souboru 2, není to nic překvapivého.

Kromě pásu polyfosfátu pozorujeme ve všech třech souborech ještě další dvě maxima na 1078 až 1085  $\text{cm}^{-1}$  a 1126 až 1128  $\text{cm}^{-1}$  a rameno na 1031 až 1032  $\text{cm}^{-1}$ . V případě souboru 3 pozorujeme též maximum na 1107  $\text{cm}^{-1}$ . Pás okolo 1127  $\text{cm}^{-1}$  identifikujeme coby pás C–C a C–N valenčních vibrací a případně O–P–O vibrací nukleotidů či nukleových kyselin, rameno na 1032  $\text{cm}^{-1}$  by mohlo pocházet od fenylalaninu (1028  $\text{cm}^{-1}$ ). Pás okolo 1080  $\text{cm}^{-1}$  by mohl patřit C–C, C–O, CO–O–C valenčním a C–O–H deformačním vibracím lipidů (1061 až 1084  $\text{cm}^{-1}$ ), pás na 1107  $\text{cm}^{-1}$  by opět mohl příslušet lipidům. Lipidy očekáváme zejména ve vakuolární membráně.

V této oblasti očekáváme též pásy dalších vibrací: CH *bending* vibrace ( $1050 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ ), další C–C, C–O, CO–O–C a C–O–H vibrace ( $1000 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ ), C–N a C–C vibrace (široký pás okolo  $1150 \text{ cm}^{-1}$ ), vibrace fosfátové skupiny ( $1050 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ ), pyrofosfátu ( $1022 \text{ cm}^{-1}$ ), sacharidů, glycerolu ( $1055, 1100$  pyrofosfátu ( $1022 \text{ cm}^{-1}$ ), skupiny C–O–P ( $1045 \text{ cm}^{-1}$ ) a RNH<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub><sup>+</sup> skupiny ( $1020$  ž  $1295 \text{ cm}^{-1}$ ).

Ve druhém subspektru souboru 1 a 3 se vyskytuje široký pás s maximem přibližně na  $1072 \text{ cm}^{-1}$ , hodnota koeficientů se významně liší ( $p < 0,01\%$ ). Tento pás nejspíše naznačuje rozdíly v koncentraci různých skupin látek, lepší identifikace se však vzhledem ke značné složitosti této části spektra nepodařila.



**Obrázek 68:** Histogram intenzit pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací polyfosfátu pro soubor 1 (vlevo nahoře), soubor 2 (vpravo nahoře) a soubor 3 (dole). Menší sloupec je vždy zobrazen před větším

### 5.1.8 Pásky v oblasti $1200$ až $1530 \text{ cm}^{-1}$

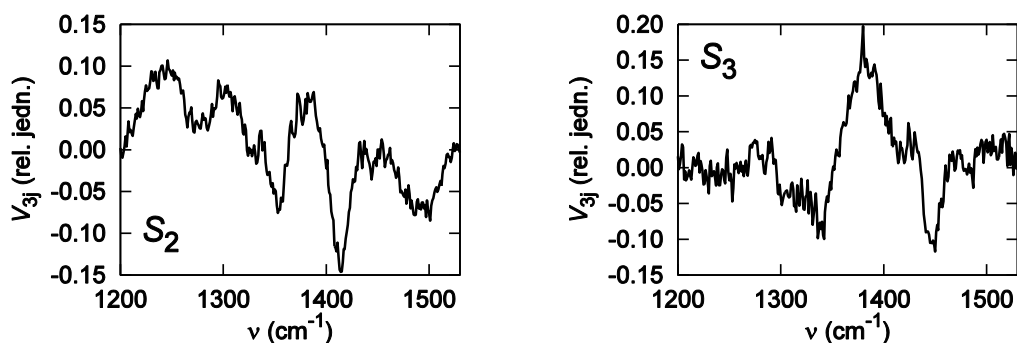
V této oblasti pozorujeme následující pásy: pás malé intenzity na  $1209$  až  $1210 \text{ cm}^{-1}$ , který přisuzujeme aminokyselinám fenylalaninu a tyrosinu (okolo  $1209 \text{ cm}^{-1}$ ), pás na  $1262$  až  $1265 \text{ cm}^{-1}$  přiřazujeme amidu III (okolo  $1250 \text{ cm}^{-1}$  v závislosti na

strukturu proteinu), C=C–H *bendingu* (1266 až 1267  $\text{cm}^{-1}$ ) a CH<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>OH deformačním vibracím. Pás na 1334 až 1339  $\text{cm}^{-1}$  pochází nejvíce od CH, CH<sub>2</sub> a CH<sub>3</sub> deformačních vibrací a CH *bendingu*. Pás na 1406 až 1414  $\text{cm}^{-1}$  se nedaří jednoznačně přiřadit, nejspíše však z většiny pochází opět od různých vibrací CH skupin, přispívat může též vibrace karboxylu (1410 až 1425  $\text{cm}^{-1}$ ). Pás na 1449 až 1454  $\text{cm}^{-1}$  pochází od různých CH, CH<sub>2</sub> a CH<sub>3</sub> vibrací (*bending*, *scissoring*, *wagging* a deformační vibrace). Obecně se v této oblasti vyskytují zejména vibrace různých CH skupin, dále očekáváme též příspěvky vibrací karboxylové skupiny (1210 až 1444  $\text{cm}^{-1}$ ), C–O–S vibrací (okolo 1240  $\text{cm}^{-1}$ ), různých aminů (po celé oblasti), PO<sub>2</sub><sup>-</sup> vibrací (1200 až 1260  $\text{cm}^{-1}$ ), CH<sub>2</sub>OH vibrací (1256 až 1462  $\text{cm}^{-1}$ ), přispívat by měly též aminokyseliny histidin (1317  $\text{cm}^{-1}$ ), tryptofan (1338 až 1358  $\text{cm}^{-1}$ ) a báze nukleových kyselin.

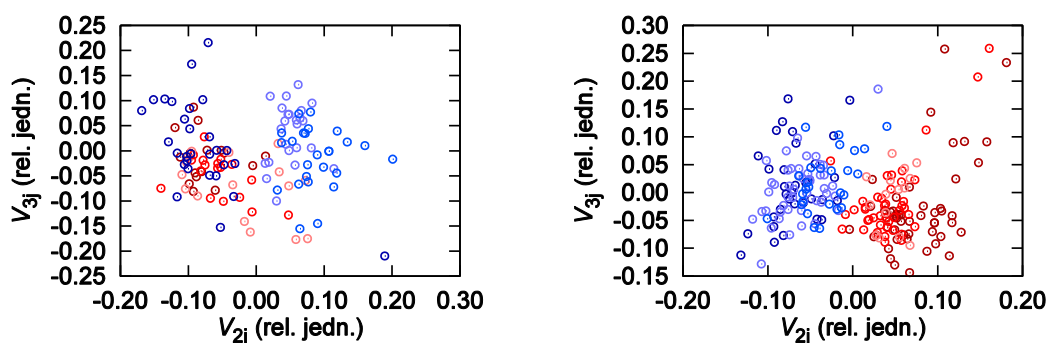
Ve druhém subspektru souboru 1 a ve třetím subspektru souboru 2 pozorujeme široký záporný pás, příslušné koeficienty matice *V* se liší pro *lag* a *log* buňky resp. jednu skupiny *YNB* buněk a ostatní. Domníváme se, že tento pokles je způsoben odečtem pozadí. V případě, že tento pokles ve třetím subspektru souboru 2 „odečteme“ jako pozadí, dostaneme nové druhé a třetí subspektrum (viz obrázek 69), nové třetí subspektrum se podobá tomuto subspektru v souboru 3.

Vyneseme-li proti sobě koeficienty  $V_{2i}$  a  $V_{3i}$  pro soubor 2 a 3 (viz obrázek 70), oddělí se od sebe alespoň částečně, v souboru 3 pak téměř zcela, *YNB* a *YPD* buňky.

Vyšší subspektra naznačují, kde všude leží pásy biomolekul ve spektru. Je-li pravda, jak tvrdíme dále, že *YPD* buňky mají vyšší poměr CH<sub>3</sub> skupin ku CH<sub>2</sub> skupinám, měli bychom to v této oblasti též pozorovat. Analýza je však obtížná, neboť většina autorů vibrace v této oblasti pro různé CH skupiny nerozlišuje. Můžeme však říci, že spektra *YPD* a *YNB* buněk se v této oblasti liší.



**Obrázek 69:** Subspektra 2 a 3 faktorové analýzy oblasti 1200 až 1530  $\text{cm}^{-1}$  souboru 2 po nové korekci pozadí



**Obrázek 70:** Koeficienty  $V_{2i}$  a  $V_{3i}$  vynesené proti sobě pro soubor 2 (vlevo) a soubor 3 (vpravo)

### 5.1.9 Pásky v oblasti 1520 až 1740 $\text{cm}^{-1}$

Maximum intenzity v této oblasti se nachází na 1657 až 1659  $\text{cm}^{-1}$ . V této oblasti rozptylují zejména C=C valenční vibrace (1600 až 1680  $\text{cm}^{-1}$ ), vibrace proteinové kostry amid I (1645 až 1681  $\text{cm}^{-1}$ ), a slabý amid II (1550 až 1573  $\text{cm}^{-1}$ ), vibrace  $\text{RNH}_3^+$ ,  $\text{RNH}_2$  a  $\text{RNH}$  skupin (1520 až 1660  $\text{cm}^{-1}$ ) a skupin  $\text{RCOO}^-$  (1550 až 1630  $\text{cm}^{-1}$  a okolo 1700  $\text{cm}^{-1}$ ). V této oblasti se také nachází široký pás deformačních vibrací vody okolo 1640  $\text{cm}^{-1}$ , který by však měl být odečten spolu se spektrem média.

Kromě hlavního maxima pozorujeme maxima na 1548 až 1555  $\text{cm}^{-1}$ , které přiřazujeme vibracím tryptofanu (1548 až 1556  $\text{cm}^{-1}$ ), na 1584 až 1585  $\text{cm}^{-1}$  a na 1605  $\text{cm}^{-1}$ , což odpovídá fenylalaninu (1583 až 1586  $\text{cm}^{-1}$  a 1602 až 1607  $\text{cm}^{-1}$ ) a pás tyrosinu a tryptofanu na 1615 až 1619  $\text{cm}^{-1}$  (1614 až 1618  $\text{cm}^{-1}$ ).

Střední hodnoty koeficientů  $V_{1i}$  v souboru 1 a souboru 2 se liší statisticky významně pro *lag* a pro *log* buňky resp. pro *YPD* a *YNB* buňky. Tento pás však

výrazně zvyšoval svou intenzitu při přeastřování v axiálním směru, minimálně za jeho část jsou tedy zodpovědné molekuly membrány. Domníváme se, že intenzita tohoto pásu tak ukazuje spíše na to, jak dobře jsme v rámci dané skupiny buněk ostřili v axiálním směru doprostřed vakuoly, případně jak byly měřené vakuoly v dané skupině velké. Podobně se chová i pás vibrací CH skupin na  $2938\text{ cm}^{-1}$ , viz dále.

Ve druhém subspektru souboru 2 pozorujeme široký pás s maximem na  $1611\text{ cm}^{-1}$ , který se překlápí do minima na  $1656\text{ cm}^{-1}$ , viz obrázek 38. Pro soubor 1 vypadá toto subspektrum analogicky. Příslušné koeficienty mají vyšší YPD buňky. Pro soubor 3 pozorujeme ve druhém subspektru široký pás s maximem na  $1634\text{ cm}^{-1}$ , který je opět intenzivnější pro YPD buňky. Interpretace těchto pásů je nesnadná. Vzhledem k tomu, že se jedná o široké pásy, mohly rozdíly vzniknout jako artefakt odečítání pozadí. V této oblasti by se také projevil rozdíl v koncentraci vody ve vakuole.

Výrazný úzký pás ve třetím subspektru souboru 3 odpovídá zřejmě průletu kosmickému záření. Takové pásy (*spiky*) by program *LabSpec* měl eliminovat, soudě podle koeficientů  $V_{3j}$  souboru 3, z nichž jeden je výrazně vyšší než ostatní, se tak v tomto případě nestalo.

### 5.1.10 Pás v oblasti $2800$ až $3100\text{ cm}^{-1}$

V této oblasti se nachází pás s maximem na  $2937$  až  $2938\text{ cm}^{-1}$ , který pochází od vibrací různých skupin uhlíku a vodíku. Vzhledem k tomu, že CH, CH<sub>2</sub> a CH<sub>3</sub> skupiny se vyskytují zejména v mastných kyselinách lipidů ve vakuolární membráně, pochází zřejmě značná část intenzity tohoto pásu právě od membrány, přestože se tato nachází mimo zaostřenou rovinu vzorku. Intenzita tohoto pásu posloužila jako kritérium, zda bylo snímáno spektrum vnitřku vakuoly nebo velká část spektra přísluší membráně, viz kapitolu 3.2. Z důvodu uvedeného výše nemá smysl porovnávat celkovou intenzitu tohoto pásu jednotlivých skupin. Též pozorovaná druhá a vyšší subspektra minimálně z části odpovídají spíše složení vakuolární membrány, než samotnému obsahu vakuoly.

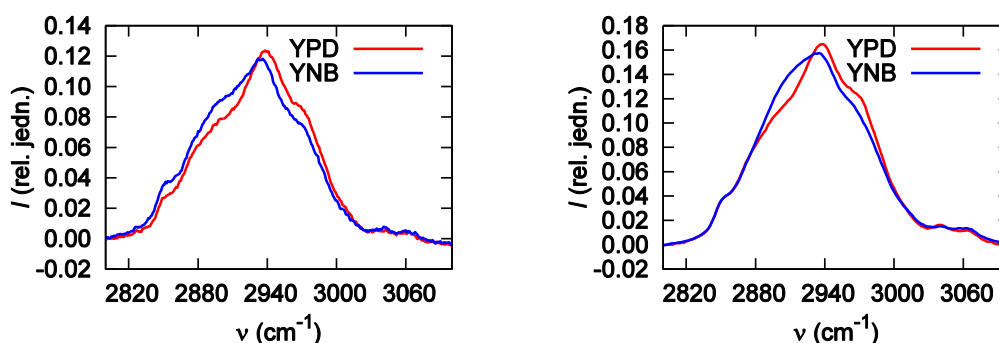
Ve druhém subspektru pozorujeme kladný a záporný pás, z nichž každý má dvě maxima a dvě minima na  $2849$  až  $2852\text{ cm}^{-1}$ ,  $2897$  až  $2902\text{ cm}^{-1}$ ,  $2948$  až  $2950\text{ cm}^{-1}$  a  $2975\text{ cm}^{-1}$ . V případě souboru 3 pozorujeme ještě mírné minimum na  $3040\text{ cm}^{-1}$ , které by mohlo příslušet vibracím skupiny C=C–H ( $3015$  až

3059  $\text{cm}^{-1}$ ). V případě souboru 2 a 3 pozorujeme statisticky významné rozdíly mezi *YPD* a *YNB* buňkami.

Podle tabulek v příloze B se pásy CH valenčních vibrací nacházejí na 2850 až 3100  $\text{cm}^{-1}$ . Pásy  $\text{CH}_3$  vibrací by se měly nacházet na 2880  $\text{cm}^{-1}$ , 2955  $\text{cm}^{-1}$  a 2975  $\text{cm}^{-1}$ , pásy  $\text{CH}_2$  vibrací na 2925 – 2930  $\text{cm}^{-1}$ . Podle (Snyder et al., 1978) se pásy  $\text{CH}_3$  vibrací nacházejí na 2871  $\text{cm}^{-1}$ , 2952  $\text{cm}^{-1}$  a 2964  $\text{cm}^{-1}$ , pásy  $\text{CH}_2$  vibrací pak na 2850  $\text{cm}^{-1}$  a 2880  $\text{cm}^{-1}$ . Jestliže tedy platí, jak z těchto poněkud rozporuplných informací vyplývá, že pásy nad 2930  $\text{cm}^{-1}$  přísluší  $\text{CH}_3$  vibracím a pásy pod 2930  $\text{cm}^{-1}$   $\text{CH}_3$  i  $\text{CH}_2$  vibracím, mohly by námi pozorované rozdíly ve druhých subspektrech znamenat, že *YPD* buňky mají vyšší poměr  $\text{CH}_3$  skupin ku  $\text{CH}_2$  skupinám, mají tedy obecně kratší nebo více rozvětvené alifatické řetězce molekul. Tuto hypotézu by však bylo třeba potvrdit dalšími experimenty.

Zdá se, že *log* a *lag* buňky se též statisticky významně liší v druhém subspekttru, nicméně průměrnou hodnotu koeficientu  $V_{2i}$  pro *lag* buňky výrazně snižuje několik odlehlých hodnot, viz obrázek 30. Pokud šest nejodlehlejších hodnot v této skupině odstraníme, stane se rozdíl výrazně menším a navíc neprojde používaným statistickým kritériem významnosti ( $p = 3,2\%$ ).

Porovnání pásu na 2937  $\text{cm}^{-1}$  *YPD* a *YNB* buněk pro soubor 2 a soubor 3 je zobrazeno na obrázku 71.



**Obrázek 71:** Porovnání tvaru pásu vibrací CH skupin na 2937  $\text{cm}^{-1}$  u *YNB* a *YPD* buněk. Soubor 2 (vlevo) a soubor 3 (vpravo)

## 5.2 Možné zdroje chyb v experimentech

Jedním ze zdrojů chyb může být již samotný výběr měřených buněk. V mikroskopu byly pro měření vždy vybírány ty buňky, které měly jasně viditelnou a dostatečně

velkou vakuolu. Buňky, u nichž byla vakuola špatně rozeznatelná, měřeny být nemohly. Buňky, jejichž vakuola byla příliš malá, měřeny nebyly z toho důvodu, že by se do spektra velkou měrou promítla vakuolární membrána a případně i okolní cytoplazma. Lze si ovšem představit, že obsah malých vakuol se liší oproti velkým vakuolám například v celkové koncentraci látek.

Buňky se při měření nacházely v destilované vodě. Odpověď buňky na hypoosmotické prostředí spočívá právě ve zvětšení objemu vakuoly (Li a Kane, 2009), tedy se sníží celková koncentrace látek ve vakuole. V osmoticky příznivém prostředí by měření pravděpodobně minimálně z hlediska celkové koncentrace látek ve vakuole dávalo odlišné průměrné výsledky.

Zdrojem nepřesností může být i odečet pozadí pomocí faktorové analýzy. Ten je v programu *Background* prováděn manuálně, výsledky tedy mohou být zatíženy subjektivní chybou. Ve spektrech lze, koneckonců, nevhodným odečtem pozadí vyrobit i zcela nový pás, lze si ovšem jen těžko představit, že by k tomu došlo neúmyslně.

Spektra pozadí jsme zkoušeli odečítat pro jednotlivé skupiny spekter vždy několikrát a přesvědčili jsme se tak, že odečet provádíme dostatečně konzistentně, pouze s mírnými odchylkami u širokých pásů. Při porovnávání jednotlivých pásů či úzkých spektrálních oblastí bylo pozadí odečítáno vždy ještě jednou tak, aby paty pásu ležely na nulové hladině. Tím by měl být problém odečtu pozadí zejména u úzkých pásů potlačen. Jsme tedy přesvědčeni, že ačkoliv je detailní interpretace získaných dat obtížná, kvalitativně jsou rozdíly pozorované ve spektrech různých skupin buněk reálné.

Jedním ze zdrojů experimentálních obtíží byl posun polohy mřížky při měření v režimu *Extended range* a s tím související posun vlnočtové škály. Rozdíl na začátku a na konci měření, určený pomocí spekter neonové výbojky, mohl činit i více než jeden pixel detektoru, tedy pro měření s mřížkou o 600 vrypech/mm přibližně  $1,2 \text{ cm}^{-1}$ , pro měření s mřížkou o 300 vrypech/mm až  $2,5 \text{ cm}^{-1}$ .

Postup, jímž jsme se s tímto problémem vyrovnali, tedy sesazení spekter měřených v různých dnech na základě polohy pásu fenylalaninu v prvním subspektru faktorové analýzy, neodstraní rozdíly vzniklé v průběhu jednoho měřicího dne. V rámci jednoho dne nelze tento postup použít, protože jednotlivá spektra jsou zatížena značným šumem a spolehlivě lze pás fenylalaninu rozeznat až při zpracování více spekter najednou. Řešením není ani měření spekter neonové výbojky



po každém měření spektra vakuoly. I mezi těmito dvěma měřeními se totiž mřížka pohne a může tak vznikat nepřesnost v řádu desetin  $\text{cm}^{-1}$ .

Nicméně pozorované rozdíly v poloze pásu polyfosfátu jsou větší než pozorované rozdíly v poloze horizontální osy – až více než  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Kromě toho se vyskytují přesvědčivé rozdíly mezi jednotlivými skupinami buněk, na rozdíl od pásů fenylalaninu na  $1003 \text{ cm}^{-1}$  a pásu nukleotidů na  $780 \text{ cm}^{-1}$ . Všechny tyto tři pásy se při měření v režimu *Extended range* nacházejí ve stejném úseku spektra, nemůže tak mezi nimi vzniknout relativní posuv vlnočtu.

Řešením problémů s posunem vlnočtové škály by bylo měřit spektra pouze v rozsahu  $600$  až  $1740 \text{ cm}^{-1}$ , nevyužívat tedy režim *Extended range*. Při takovém měření by byla v rámci jednoho měřicího dne mřížka nehybná, případně by tak mohly vznikat drobné odchylky pouze vlivem měnící se teploty zařízení. Při měření v tomto užším rozsahu bychom se však připravili o možnost spektra normalizovat a o možnost korektního odečtu spektra média, které má v oblasti  $600$  až  $1740 \text{ cm}^{-1}$  pásy na  $920$  a  $1640 \text{ cm}^{-1}$ . Tyto pásy by přispívaly do spekter vakuol. Dále bychom se připravili o zajímavý pás vibrací CH skupin okolo  $2940 \text{ cm}^{-1}$ .

Uvědomujeme si také, že t-test potřebuje ke svému správnému fungování normální rozložení dat, čemuž naše výsledky zřejmě ne vždy odpovídají. Pro spolehlivější charakterizaci obsahů vakuol různých skupin buněk by bylo vhodné naměřit ještě rozsáhlejší série spekter, než jaké byly naměřeny v této práci. Vzhledem k časové náročnosti měření by bylo vhodné nahradit současné řízení mikroskopického stolku krokovými motory přesnějším piezoelektrickým posuvem, což by umožnilo částečnou automatizaci měření. S rozsáhlejším souborem spekter by se rozložení koeficientů matice  $V$  pro jednotlivá subspektra pravděpodobně lépe blížilo normálnímu rozdělení a výsledky t-testu by byly spolehlivější.

### 5.3 Rozdíly v obsahu vakuol buněk

V této kapitole jsou shrnuty nejdůležitější rozdíly mezi jednotlivými skupinami buněk na základě výsledků prezentovaných v kapitolách 4.1 a 4.2 a identifikace pásů v kapitole 5.1.

*Lag a log* buňky se signifikantně neliší v celkovém obsahu látek ve vakuole, poměřovaném pomocí střední hodnoty koeficientu  $V_{1i}$  faktorové analýzy celé oblasti charakteristických vibrací biomolekul, tedy  $600$  až  $1800 \text{ cm}^{-1}$  ( $p = 15\%$ ).

V některých oblastech se statisticky významně dělí *lag* buňky na dvě skupiny. Stejný jev pozorujeme v případě souboru 2, neboť *YPD* buňky souboru 2 jsou totožné s *lag* buňkami souboru 1. Jednotlivé skupiny buněk jsou seřazeny podle data, kdy byly měřeny, ale měření vždy dělí alespoň několik dní, druhou a třetí skupinu *lag* buněk dokonce několik měsíců. Pozorované rozdíly jsou tedy zvláštní. Médium, ve kterém byly buňky kultivovány, pochází stále ze stejného zdroje, jeho vliv lze tedy nejspíš vyloučit. Kultivace probíhala u všech buněk stejně. Zdá se tedy, že se zde projevují velmi subtilní rozdíly v zacházení s buňkami před měřením nebo v průběhu měření.

Společné rozdíly všech skupin *lag* buněk oproti *log* buňkám pozorujeme pouze u pásů souvisejících s polyfosfátem – *log* buňky mají této látky výrazně více, soudě podle výsledků faktorové analýzy průměrně zhruba 2,3-krát tolik. Buňky tedy v průběhu exponenciální fáze akumulují polyfosfát. První a čtvrtá skupina *lag* buněk má pás polyfosfátu posunutý doleva na vlnočtové škále oproti *log* buňkám, průměrně o  $1,4 \text{ cm}^{-1}$ . Tyto buňky tedy obsahují pravděpodobně méně dvojmocných kationtů (viz kapitolu 5.4).

Naše měření ukazují, že je třeba s velkou pečlivostí dodržovat přesnost kultivace buněk, neboť nepřesnosti mohou mít na obsah vakuoly významný vliv.

*YNB* buňky mají v obou experimentech o něco vyšší celkový obsah látek ve vakuole, poměřovaný pomocí střední hodnoty koeficientu  $V_{1i}$  faktorové analýzy oblasti  $600 \text{ až } 1800 \text{ cm}^{-1}$  ( $p < 0,01\%$ ), a to o 13% v případě souboru 2 a o 4% v případě souboru 3. Vzhledem k tomu, že u faktorové analýzy oblasti  $2800 \text{ až } 3100 \text{ cm}^{-1}$ , která byla nejvíce ovlivněna nepřesnostmi v ostření, vykazují naopak *YPD* buňky o něco vyšší průměrnou intenzitu, domníváme se, že obsah vakuol *YNB* buněk je skutečně o něco koncentrovanější než obsah vakuol *YPD* buněk a nejedná se o artefakt. U *YNB* buněk, stresovaných nedostatkem dusíku, očekáváme vyšší míru autofagie (Li a Kane, 2009), díky níž by mohl vzniknout tento koncentrační rozdíl.

Nejvýznamněji se u *YPD* a *YNB* buněk liší průměrná intenzita pásu polyfosfátu. Podle výsledků faktorové analýzy mají *YPD* buňky průměrně pouze 54 až 73 % polyfosfátu *YNB* buněk. Průměrná poloha tohoto pásu se v případě souboru 2 liší o  $4,2 \text{ cm}^{-1}$ , v případě souboru 3 pak o  $2,3 \text{ cm}^{-1}$ . Porovnáváme-li však v souboru 2 pouze první a čtvrtou skupinu *YPD* buněk s *YNB* buňkami, liší se průměrná poloha

pásu dokonce o  $7,3 \text{ cm}^{-1}$ . Obecně se zdá, že akumulace polyfosfátu a posun pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací k vyšším vlnočtům je znakem horších podmínek buněk, ať už jde o postupně se vyčerpávající plné médium *YPD* nebo médium *YNB* se špatným zdrojem dusíku. Tento výsledek je v souladu s prací Raa a Kornberga, podle nichž je polyfosfát důležitý pro přežití kolonií bakterií *E. coli* ve stacionární fázi růstu (Rao a Kornberg, 1996) a s prací (Biryukova et al., 2011), podle níž u kvasinek druhu *Yarrowia lipolytica* při přechodu do stacionární fáze vznikají polyfosfátové granule.

Dále jsme pozorovali, že *YPD* buňky v souboru 3 akumulují více nukleotidů a bází nukleových kyselin než *YNB* buňky, což pozorujeme na pásu okolo  $780 \text{ cm}^{-1}$ , spolu s vyššími subspektry oblasti  $640$  až  $770 \text{ cm}^{-1}$ . V případě souboru 2 se v oblasti pásu nukleotidů okolo  $780 \text{ cm}^{-1}$  od sebe liší druhá a třetí skupina *YPD* buněk od první a čtvrté a stejně tak druhá a třetí skupina *YNB* buněk od první a čtvrté a rozdíl v intenzitě pásu není statisticky významný.

*YNB* buňky akumulují více argininu než *YPD* buňky, a to 1,7 až 2,7-krát. To je překvapivé, neboť arginin obsahuje dusík, což je v případě *YNB* buněk nedostatkový prvek. Mohlo by to opět ukazovat na vyšší míru autofagie u těchto buněk, případně na opatrné zacházení těchto buněk s nedostatkovou živinou.

Soubor 3 vykazuje o 15% více fenylyalaninu u *YPD* buněk, *YPD* a *YNB* buňky souboru 2 se však obsahem této látky statisticky významně neliší. Též rozdíl v celkovém obsahu proteinů se nepodařilo prokázat, zejména proto, že pásy amidů, typických vibrací proteinů, se ve spektrech překrývají s pásy dalších vibrací.

Velmi výrazně se od sebe liší *YPD* a *YNB* buňky v oblasti  $1200$  až  $1530 \text{ cm}^{-1}$ . Předpokládáme, že tyto odlišnosti mají na svědomí alespoň z části vibrace různých skupin uhlíku a vodíku, přesně charakterizovat se nám je však nepodařilo.

Soudě podle odlišností v druhém subspektru faktorové analýzy oblasti  $2800$  až  $3100 \text{ cm}^{-1}$  mohou mít *YPD* buňky vyšší poměr  $\text{CH}_3$  skupin ku  $\text{CH}_2$  skupinám. Tento rozdíl se však pravděpodobně týká zejména vakuolární membrány.

## 5.4 Experimenty s fosfátovými sloučeninami

Byla testována poloha maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací hexametafosfátu sodného (HMP) ve vodném roztoku v závislosti na jeho koncentraci, pH vzorku a koncentraci jednomocných a dvojmocných kationtů ve vzorku (kapitola 4.3). Hexametafosfát byl jakožto nejdelší komerčně dostupný fosfátový oligomer zvolen coby model polyfosfátu. Délka řetězce hexametafosfátu není výrobcem specifikovaná, vzorky

obsahují směs různě dlouhých cyklických fosfátových oligomerů – výrobce udává vzorec  $(\text{NaPO}_3)_n$  – spolu s 65 až 70 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

Z obrázků 56 a 57 je patrné, že pH roztoku nemá na polohu maxima pásu  $(\text{PO}_3)^{2-}$  vibrací HMP žádný vliv. Naměřené polohy se pohybují v rámci rozlišení spektrometru pro všechny vzorky od pH 3,0 až po 11,6 po jednom dni od přípravy vzorků i po čtrnácti dnech od přípravy. Zajímavý však je fakt že HMP při stárnutí snížil pH nejvíce bazického roztoku o 2,8 jednotek. Došlo zřejmě k hydrolyze části HMP a uvolnění protonů, jako se tomu děje u halotolerantních řas (Kornberg et al., 1999).

Obrázek 60 naznačuje, že s rostoucí koncentrací HMP roste i vlnočet maxima studovaného pásu, na vyšetřovaném rozsahu koncentrací (0,03 M až 2 M) přibližně lineárně. Nicméně rozdíl polohy pásu pro nejnižší a nejvyšší koncentraci (přibližně  $1,3 \text{ cm}^{-1}$ ) je příliš malý na to, aby vysvětlil pozorované rozdíly v poloze pásu polyfosfátu ve vakuolách kvasinek (až  $> 8 \text{ cm}^{-1}$ ).

Jednomocné kationty ve studovaném rozsahu koncentrací do 1,5 M maximum studovaného pásu posouvají pouze málo. Poloha pásu při různých koncentracích  $\text{K}^+$  se pohybuje v rámci  $0,2 \text{ cm}^{-1}$ , v případě  $\text{Na}^+$  se poloha maxima mezi nejvyšší a nulovou koncentrací liší o  $1,6 \text{ cm}^{-1}$ . Byla měřena i poloha tohoto pásu pro koncentraci 3 M, ta se od polohy při nulové koncentraci liší o  $2,4 \text{ cm}^{-1}$ .

Studované dvojmocné kationty mají na posun maxima tohoto pásu mnohem větší vliv, jak ukazuje obrázek 65. Hořečnaté kationty posouvají na studovaném rozsahu koncentrací maximum přibližně o  $14,8 \text{ cm}^{-1}$ , ostatní dvojmocné kationty o  $7,1 \text{ cm}^{-1}$  až  $8,8 \text{ cm}^{-1}$ , tyto posuny jsou již přibližně stejné nebo dokonce vyšší než pozorované rozdíly polohy maxima pásu polyfosfátu v kvasinkových vakuolách.

Posun pásu zřejmě způsobuje interakce mezi kationtem a  $\text{PO}_3^-$  skupinou, která ovlivňuje vibrace této skupiny. Závislost polohy maxima pásu na koncentraci se pro dvojmocné ionty začíná nasycovat přibližně při poměru koncentrací kationtu a  $\text{PO}_3^-$  skupiny 1:2 až 2:1, a to zejména pro vzorky s  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ . Odlišný tvar má tato závislost pro trimetafosfát (TMP) – na studovaném rozsahu koncentrací  $\text{Mg}^{2+}$  je prakticky lineární, jak ukazuje obrázek 64. Rozdíl v poloze maxima pásu představuje v případě TMP jen asi  $8,8 \text{ cm}^{-1}$  oproti  $14,8 \text{ cm}^{-1}$  u HMP, což ovšem opět pokrývá rozsah rozdílů poloh pásu ve vakuolách.

Článek (Koda et al., 1994) popisuje vliv  $\text{NaCl}$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CsCl}$  a tetramethylamonium chloridu –  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  – na polohu studovaného pásu

polyfosfátu. Podle autorů tohoto článku  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  na polohu pásu nemá téměř žádný vliv,  $\text{NaCl}$  posouvá polohu pásu o přibližně  $4 \text{ cm}^{-1}$  k vyšším vlnočtům při pětinasobné koncentraci  $\text{Na}^+$  oproti koncentraci fosfátových jednotek, tedy více, než jsme pozorovali u hexametafosfátu. Pás se posouvá o přibližně  $4 \text{ cm}^{-1}$  pro  $\text{CaCl}_2$  resp. o  $2 \text{ cm}^{-1}$  pro  $\text{BaCl}_2$  a zcela zanedbatelně pro  $\text{NaCl}$  při koncentraci kationtu desetinové oproti koncentraci fosfátových jednotek. My jsme pozorovali posun pásu o  $2,7$  až  $5,5 \text{ cm}^{-1}$  při poměru koncentrací 1:8. Autoři článku pozorovali též pokles intenzity tohoto pásu při rostoucí koncentraci dvojmocných kationtů. Námi pozorované efekty vlivu kationtů tedy platí nejen pro hexametafosfát, ale i pro polyfosfát.

Na příkladu  $\text{Mg}^{2+}$  jsme dále studovali vliv stárnutí vzorku na polohu a intenzitu studovaného pásu, výsledky ukazují obrázky 62 a 63. Zdá se, že stárnutí vzorky ovlivňuje, přestože analýza stárnutí by vyžadovala podrobnější měření. V případě pozorovaného nárůstu intenzity na obrázku 62 mohlo dojít k odpařování vzorku, a tedy k jeho zakoncentrování. Tím pádem se mohl projevit též vliv koncentrace vzorku na polohu studovaného pásu.

V posledním experimentu byly studovány kinetiky reakce HMP s dvojmocnými kationty. Z obrázku 66 je patrné, že reakce s  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  probíhá okamžitě – po přidání pozorujeme pokles koeficientů  $V_{1i}$  a  $V_{2i}$  s pouhým jedním „mezispektrém“, což odpovídá délce času potřebného na přidání roztoku příslušného kationtu do kyvety s HMP a jeho rozmíchání. V rámci studovaných pěti minut jsou pak vzorky zcela stabilní.

Reakce s  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  probíhá také prakticky okamžitě, jak je patrné z obrázku 67. V průběhu těchto měření vznikal v kyvetě zákal, vzorky se tedy zřejmě srážely. Z grafů závislosti velikosti koeficientu  $V_{1i}$  na čase se zdá, že zatímco v případě  $\text{Zn}^{2+}$  zákal v průběhu měření roste, v průběhu měření  $\text{Fe}^{2+}$  se naopak sraženina rozpouští. Při vzniku zákalu je laserový svazek i nepružně rozptýlené záření pohlcováno a pružně rozptylováno. Na vstupní štěrbinu spektrografu ho tedy dopadá menší množství a pás se pak jeví jako méně intenzivní.

V druhém subspektru zejména vzorku s  $\text{Fe}^{2+}$  pozorujeme při rozpouštění zákalu změnu též v poloze maxima pásu HMP, jak naznačují koeficienty  $V_{2i}$ . Mohlo by to znamenat, že na polohu studovaného pásu má vliv skupenství, v jakém se HMP spolu s kationty nachází – v pevném skupenství by mohla být interakce silnější a vliv na posun pásu tedy vyšší.

Naše experimenty naznačují, že rozdíly v poloze maxima pásu polyfosfátu ve vakuolách kvasinek jsou způsobeny zejména rozdíly v koncentraci dvojmocných kationtů, z testovaných měly na polohu maxima největší vliv hořečnaté kationty. Pozorované posuvy maxima pásu jsou dostatečně přesvědčivé. Aby bylo však možné vliv dvojmocných kationtů s jistotou potvrdit i ve vakuole, bylo by třeba experimenty provést na realističtějším modelu vakuolárního polyfosfátu – nejlépe na směsi polyfosfátů o různé délce řetězce od jednotek až po stovky monomerních jednotek. Vhodné by též bylo potvrdit rozdíly v koncentraci kationtů ve vakuolách jejich přímou extrakcí z vakuol.

## 6 Závěr

V této práci byla využita metoda Ramanovy mikrospektroskopie ke studiu vakuol buněk kvasinky druhu *Candida albicans*. Byly porovnány buňky v log fázi a pozdní exponenciální fázi růstu kultury. Ve dvou nezávislých experimentech byly dále porovnány buňky, které rostly na bohatém médiu, s buňkami, které rostly na médiu chudém na zdroje dusíku. Ukázalo se, že fáze růstu kultury má na obsah vakuol buněk vliv, i když méně významný než použité kultivační médium, a že pro získání relevantních výsledků je třeba důsledně dodržovat postup kultivace buněčných kultur i podmínky, v nichž se buňky nacházejí.

Nejvýznamnější variabilitu v intenzitě mezi buněčnými kulturami vykazuje pás polyfosfátu okolo  $1155\text{ cm}^{-1}$ . Pro jednotlivé buňky v rámci kultury a ve střední hodnotě i pro různé kultury byly pozorovány statisticky významné rozdíly nejen v intenzitě, ale i v poloze tohoto pásu. Na modelu hexametafosfátu sodného byla *in vitro* studována poloha tohoto pásu v závislosti na pH, koncentraci a přítomnosti kationtů. Bylo ukázáno, že významný vliv na polohu tohoto pásu má přítomnost dvojmocných kationtů v roztoku.

# Použitá literatura

- Candida albicans*, [2009]. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Taxonomy Browser* [online, cit. 2013-04-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5476&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Candidiasis, 2001-. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, [cit. 2013-04-09]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Candidiasis>
- ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael W. DAVIDSON, 2012. Numerical Aperture and Resolution. OLYMPUS AMERICA INC. *Olympus Microscopy Resource Center* [online, cit. 2013-04-10]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/numaperture.html>
- ACHBERGEROVÁ, Lucia a Jozef NAHÁLKA, 2011. Polyphosphate - an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microbial Cell Factories* [online]. **10**(1), 63-76 [cit. 2012-10-16]. ISSN 1475-2859. DOI: 10.1186/1475-2859-10-63. Dostupné z: <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/63>
- AKPAN, A. a R. MORGAN, 2002. Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*. **78**(922), 455-459. ISSN 00325473. DOI: 10.1136/pmj.78.922.455. Dostupné z: <http://pmj.bmj.com/cgi/doi/10.1136/pmj.78.922.455>
- ARCHIBALD, Frederick S. a Irwin FRIDOVICH, 1982. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **215**(2), 589-596. ISSN 00039861. DOI: 10.1016/0003-9861(82)90120-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986182901205>
- BARELLE, Caroline J. et al., 2003. Asynchronous Cell Cycle and Asymmetric Vacuolar Inheritance in True Hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. **2**(3), 398-410. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC161449/>
- BAŞAR, G. a S. KIN, 2008. Monitoring of spectroscopic changes of a single trapped fission yeast cell by using a Raman tweezers set-up. *Optics Communications*. **281**(19), 4998-5003. ISSN 00304018. DOI: 10.1016/j.optcom.2008.06.074. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0030401808006238>
- BAUEROVÁ, Václava, Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. Ústní sdělení v prosinci 2012
- BEDNÁROVÁ, Lucie, Jan PALACKÝ, Václava BAUEROVÁ, Olga HRUŠKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, Iva PICHOVÁ a Peter MOJZEŠ, 2012. Raman Microspectroscopy of the Yeast Vacuoles. *Spectroscopy: An International Journal* [online]. **27**(5-6), 503-507 [cit. 2012-10-16]. ISSN 0712-4813. DOI: 10.1155/2012/746597. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/spectroscopy/2012/746597/>
- BERMAN, Judith, 2006. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*. **9**(6), 595-601. ISSN 13695274. DOI: 10.1016/j.mib.2006.10.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527406001597>
- BERNARDO, Stella M., et al., 2008. *Candida albicans* VPS1 contributes to protease secretion, filamentation, and biofilm formation. *Fungal Genetics and Biology*. **45**(6), 861-877. ISSN 10871845. DOI: 10.1016/j.fgb.2008.01.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184508000030>
- BOULTON, Chris a David QUAIN, 2008. *Brewing yeast and fermentation*. Oxford: Blackwell Publishing [online, cit. 2013-04-06]. ISBN 0-632-05475-1. Dostupné z: [http://books.google.cz/books/about/Brewing\\_Yeast\\_and\\_Fermentation.html?id=L3SU4ahY-m4C&redir\\_esc=y](http://books.google.cz/books/about/Brewing_Yeast_and_Fermentation.html?id=L3SU4ahY-m4C&redir_esc=y)



- BROWN, M. R. W. a A. KORNBERG, 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**(46),16085-16087. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0406909101. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406909101>
- BIRYUKOVA, E. N., A. Yu. ARINBASAROVA, N. E. SUZINA, V. V. SOROKIN a A. G. MEDENTSEV, 2011. Ultrastructural changes in *Yarrowia lipolytica* cells under stress conditions. *Microbiology*. **80**(3),350-354. ISSN 0026-2617. DOI: 10.1134/S0026261711030040. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261711030040>
- CULHA, Mustafa, Mehmet KAHRAMAN, Dilek ÇAM, Ismail SAYIN a Kemal KESEROLU, 2010. Rapid identification of bacteria and yeast using surface-enhanced Raman scattering. *Surface and Interface Analysis*. **42**(6-7), 462-465. ISSN 01422421. DOI: 10.1002/sia.3256. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sia.3256>
- DE GELDER, Joke, Kris DE GUSSEM, Peter VANDENABEELE a Luc MOENS, 2007. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*. **38**(9), 1133-1147. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.1734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1734>
- DIETZEK, Benjamin et al., 2010. Introduction to the Fundamentals of Raman Spectroscopy. In *Confocal Raman Microscopy*. DIEING, Thomas, Olaf HOLLRICHTER a Jan TOPORSKI. Berlin: Springer. Kapitola 2, s. 21-42. ISBN 978-364-2125-225.
- DOCAMPO, R., P. ULRICH a S. N. J. MORENO, 2010. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **365**(1541), 775-784. ISSN 0962-8436. DOI: 10.1098/rstb.2009.0179. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2009.0179>
- FALAGAS, Matthew E., Nikos ROUSSOS a Konstantinos Z. VARDAKAS, 2010. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*. **14**(11), e954-e966. ISSN 12019712. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971210024331>
- FIDEL, Paul L. Jr., Jose A. VAZQUEZ a Jack D. SOBEL, 1999. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**(1), 80-96. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/12/1/80>
- FRANKE, K. et al., 2006. The vesicle transport protein Vac1p is required for virulence of *Candida albicans*. *Microbiology*. **152**(10), 3111-3121. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.29115-0. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.29115-0>
- GOW, Neil A. R., Alistair J. P. BROWN a Frank C. ODDS, 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*. **5**(4), 366-371. Dostupné z: <http://lib.jncasr.ac.in:6060/jspui/bitstream/123456789/683/1/JNCASR111.pdf>
- HARMAN, Harry Horace, 1976. *Modern factor analysis*. 3rd. ed. Chicago: University of Chicago Press. ISBN 02-263-1652-1. Dostupné z: [http://books.google.cz/books?id=e-vMN68C3M4C&dq=modern+factor+analysis&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.cz/books?id=e-vMN68C3M4C&dq=modern+factor+analysis&source=gbs_navlinks_s)
- HOLLRICHTER, Olaf a Wolfram IBACH, 2010. High Resolution Optical and Confocal Microscopy. In *Confocal Raman Microscopy*. DIEING, Thomas, Olaf HOLLRICHTER a Jan TOPORSKI. 1st ed. New York: Springer. Kapitola 2, s. 1-20. ISBN 978-3-642-12521-8.
- Horiba Jobin-Yvon, 2005. *HR800 User Manual*. Lille
- HUANG, G. et al., 2006. Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PNAS*. **103**(34), 12813-12818. DOI: 10.1073/pnas.0605270103 Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605270103>

- HUANG, Wei E., Mark J. BAILEY, Ian P. THOMPSON, Andrew S. WHITELEY a Andrew J. SPIERS, 2007. Single-Cell Raman Spectral Profiles of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 Reflects in vitro and in planta Metabolic History. *Microbial Ecology*. **53**(3), 414-425. ISSN 0095-3628. DOI: 10.1007/s00248-006-9138-5. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00248-006-9138-5>
- HUANG, Wei E., Andrew D. WARD a Andrew S. WHITELEY, 2009. Raman tweezers sorting of single microbial cells. *Environmental Microbiology Reports*. **1**(1), 44-49. ISSN 17582229. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2008.00002.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1758-2229.2008.00002.x>
- HUANG, Yu-San, Takeshi KARASHIMA, Masayuki YAMAMOTO a Hiro-o HAMAGUCHI, 2003. Molecular-level pursuit of yeast mitosis by time- and space-resolved Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. **34**(1), 1-3. ISSN 0377-0486. DOI: 10.1002/jrs.960. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.960>
- HUANG, Yu-San, Takeshi KARASHIMA, Masayuki YAMAMOTO, Takashi OGURA a Hiro-o HAMAGUCHI, 2004. Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell. *Journal of Raman Spectroscopy*. **53**(7), 525-526. ISSN 0377-0486. DOI: 10.1002/jrs.1219. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1219>
- HUANG, Yu-San, Takeshi KARASHIMA, Masayuki YAMAMOTO a Hiro-o HAMAGUCHI, 2005. Molecular-Level Investigation of the Structure, Transformation, and Bioactivity of Single Living Fission Yeast Cells by Time- and Space-Resolved Raman Spectroscopy. *Biochemistry*. **44**(30), 10009-10019. ISSN 0006-2960. DOI: 10.1021/bi050179w. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi050179w>
- CHANG, Wei-Tien, Hung-Lung LIN, Hung-Che CHEN, Yao-Ming WU, Wen-Jone CHEN, Yuan-Teh LEE a Ian LIAU, 2009. Real-time molecular assessment on oxidative injury of single cells using Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. **40**(9), 1194-1199. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.2261. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2261>
- CHIU, Liang-da, Masahiro ANDO a Hiro-o HAMAGUCHI, 2010. Study of the „Raman spectroscopic signature of life“ in mitochondria isolated from budding yeast. *Journal of Raman Spectroscopy*. **41**(1), 2-3. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.2425. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2425>
- CHIU, Liang-da a Hiro-o HAMAGUCHI, 2011. The "Raman spectroscopic signature of life" is closely related to haem function in budding yeasts. *Journal of Biophotonics*. **4**(1-2), 30-33. ISSN 1864063x. DOI: 10.1002/jbio.201000029. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201000029>
- CHIU, Liang-da, Françoise HULLIN-MATSUDA, Toshihide KOBAYASHI, Hajime TORII a Hiro-o HAMAGUCHI, 2012. On the origin of the 1602 cm<sup>-1</sup> Raman band of yeasts; contribution of ergosterol. *Journal of Biophotonics*. **5**(10), 724-728. ISSN 1864063x. DOI: 10.1002/jbio.201200020. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201200020>
- IBELINGS, M. S., K. MAQUELIN, H. Ph. ENDTZ, H. A. BRUINING a G. J. PUPPELS, 2005. Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy. *Clinical Microbiology and Infection*. **11**(5), 353-358. ISSN 1198-743x. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01103.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-0691.2005.01103.x>
- JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDO VÁ, 1999. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-718-4990-1.
- JESS, P. R. T., V. GARCÉS-CHÁVEZ, A. C. RICHES, C. S. HERRINGTON a K. DHOLAKIA, 2007. Simultaneous Raman micro-spectroscopy of optically trapped and stacked cells. *Journal of Raman Spectroscopy*. **38**(9), 1082-1088. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.1712. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1712>

- JOHNSTON, D. A. et al., 2009. Role for Endosomal and Vacuolar GTPases in *Candida albicans* Pathogenesis. *Infection and Immunity*. **77**(6), 2343-2355. ISSN 0019-9567. DOI: 10.1128/IAI.01458-08. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01458-08>
- KAKITA, Minoru, Venkatesh KALIAPERUMAL a Hiro-o HAMAGUCHI, 2012. Resonance Raman quantification of the redox state of cytochromes b and *in-vivo* and *in-vitro*. *Journal of Biophotonics*. **5**(1), 20-24. ISSN 1864063x. DOI: 10.1002/jbio.201100087. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201100087>
- KALIAPERUMAL, Venkatesh a Hiro-o HAMAGUCHI, 2012. Casting New Physicochemical Light on the Fundamental Biological Processes in Single Living Cells by Using Raman Microspectroscopy. *The Chemical Record*. **12**(6), 567-580. ISSN 15278999. DOI: 10.1002/tcr.201200008. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.201200008>
- KALVODOVÁ, Dagmar a Jiří MANYCH, 1996. Fungi. In *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. BEDNÁŘ, Marek et al. Praha: Marvil. Kapitola 26, s. 344-360. ISBN 80-238-0297-6.
- KIM, Joon a Peter SUDBERY, 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*. **49**(2), 171-177. ISSN 1225-8873. DOI: 10.1007/s12275-011-1064-7. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12275-011-1064-7>
- KODA, Shinobu, Teruyuki KAWAKAMI a Hiroyasu NOMURA, 1994. Polymer Journal. *Raman Spectroscopic Studies on the Interaction between Counterions and Polyphosphate Ion*. **26**(4), 473-477. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0301462283800490>
- KORNBERG, A. et al., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 89-125. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872445>
- KORNBERG, A., 1995. Inorganic Polyphosphate: Toward Making a Forgotten Polymer Unforgettable. *Journal of Bacteriology*. **177**(3), 491-496. Dostupné z: <http://jb.asm.org/content/177/3/491.abstract>
- KRŮŠEK, Jan, Fyziologický ústav Akademie věd České republiky. Ústní sdělení roku 2012
- KULAEV, I. S., V. M. VAGABOV, T. V. KULAKOVSKAYA, N. A. ANDREEVA, L. P. LICHKO a L. V. TRILISENKO, 2005. Specific Features of Metabolism and Functions of High-Molecular Inorganic Polyphosphates in Yeasts as Representatives of Lower Eukaryotes. *Molecular Biology*. **39**(4), 482-494. ISSN 0026-8933. DOI: 10.1007/s11008-005-0065-1. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11008-005-0065-1>
- LAKOWICZ, Joseph R., 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.
- LEE, Samuel A. et al., 2009. *Candida albicans* VPS4 is Required for Secretion of Aspartyl Proteases and *In Vivo* Virulence. *Mycopathologia*. **167**(2), 55-63. ISSN 0301-486x. DOI: 10.1007/s11046-008-9155-7. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11046-008-9155-7>
- LI, L. et al., 2001. CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(31), 29515-29519. ISSN 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M103944200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M103944200>
- LI, Sheena Claire a Patricia M. KANE, 2009. The yeast lysosome-like vacuole: Endpoint and crossroads. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. **1793**(4), 650-663. ISSN 01674889. DOI: 10.1016/j.bbamer.2008.08.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488908002814>

- LICHKO, L. P., T. V. KULAKOVSKAYA a I. S. KULAEV, 2006. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in different cell compartments of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Moscow)*. **71**(11), 1171-1175. ISSN 0006-2979. DOI: 10.1134/S0006297906110010. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1134/S0006297906110010>
- LUNDSTROM, T a J SOBEL, 2001. Nosocomial candiduria: A review. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001, **32**(11), 1602-1607. ISSN 1058-4838.
- MAJED, Nehreen, Christian MATTHÄUS, Max DIEM a April Z. GU, 2009. Evaluation of Intracellular Polyphosphate Dynamics in Enhanced Biological Phosphorus Removal Process using Raman Microscopy. *Environmental Science*. **43**(14), 5436-5442. ISSN 0013-936x. DOI: 10.1021/es900251n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es900251n>
- MAJED, Nehreen a April Z. GU, 2010. Application of Raman Microscopy for Simultaneous and Quantitative Evaluation of Multiple Intracellular Polymers Dynamics Functionally Relevant to Enhanced Biological Phosphorus Removal Processes. *Environ. Sci. Technol.* **44**(22), 8601–8608. DOI: 10.1021/es1016526. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es1016526>
- MALINOWSKI, Edmund R, 2002. *Factor analysis in chemistry*. 3rd. ed. New York: Wiley. ISBN 04-711-3479-1.
- MAQUELIN, K., L.-P. CHOO-SMITH, H. P. ENDTZ, H. A. BRUINING a G. J. PUPPELS, 2002a. Rapid Identification of Candida Species by Confocal Raman Microspectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**(2), 594-600. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.40.2.594-600.2002. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.40.2.594-600.2002>
- MAQUELIN, K., C. KIRSCHNER, L.-P. CHOO-SMITH, N. VAN DEN BRAAK, H. P. ENDTZ, D. NAUMANN a G.J PUPPELS, 2002b. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*. **51**(13), 255-271. ISSN 01677012. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00127-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202001276>
- MAQUELIN, K. et al., 2003. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**(1), 324-329. DOI: 10.1128/JCM.41.1.324–329.2003.
- MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ, 2004. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vydání druhé. Praha: Academia. ISBN 80-200-1254-0.
- MICELI, Marisa H., José DÍAZ a Samuel A. LEE, 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*. **11**(2), 142-151. ISSN 14733099. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70218-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309910702188>
- MOJZEŠ, Peter, Václava BAUEROVÁ a Lucie BEDNÁROVÁ, 2011. Ramanova mikrospektroskopie a mapování buněk a tkání. *Čs. čas. fyz.* **61**(3-4), 178-184.
- MORSCHHÄUSER, Joachim, 2010. Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Medical Microbiology and Immunology*. **199**(3), 165-172. ISSN 0300-8584. DOI: 10.1007/s00430-010-0147-0. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00430-010-0147-0>
- NAGLIK, Julian R., Stephen J. CHALLACOMBE a Bernhard HUBE, 2003. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. **67**(3), 400-428. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193873/pdf/0020.pdf>
- NAITO, Yasuaki, Akio TOH-E a Hiro-o HAMAGUCHI, 2005. In vivo time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell. *Journal of Raman Spectroscopy*. **36**(9), 837-839. ISSN 0377-0486. DOI: 10.1002/jrs.1397. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1397>

- ODDS, Frank C., 2010. Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiology*. **5**(1), 67-79. ISSN 1746-0913. DOI: 10.2217/FMB.09.113. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.09.113>
- ODDS, Frank C., Alistair J.P. BROWN a Neil A.R. GOW, 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*. **11**(6), 272-279. ISSN 0966842x. DOI: 10.1016/S0966-842X(03)00117-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X03001173>
- OLIVER, B. G., P. M. SILVER a T. C. WHITE, 2008. Polyene susceptibility is dependent on nitrogen source in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **61**(6), 1302-1308. ISSN 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/dkn101. Dostupné z: <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkn101>
- OSTERBERG, R. a L. E. ORGEL, 1972. Polyphosphate and trimetaphosphate formation under potentially prebiotic conditions. *Journal of Molecular Evolution*. **1**(3), 241-248. ISSN 0022-2844. DOI: 10.1007/BF01660243. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01660243>
- ORGEL, Leslie E., 2004. Prebiotic Chemistry and the Origin of the RNA World. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **39**(2), 99-123. ISSN 1040-9238. DOI: 10.1080/10409230490460765. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10409230490460765>
- PALANISAMY, S. K. A. et al., 2010. *Candida albicans* PEP12 Is Required for Biofilm Integrity and In Vivo Virulence. *Eukaryotic Cell*. **9**(2), 266-277. ISSN 1535-9778. DOI: 10.1128/EC.00295-09. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00295-09>
- PALMER, G. E., 2010. Endosomal and AP-3-Dependent Vacuolar Trafficking Routes Make Additive Contributions to *Candida albicans* Hyphal Growth and Pathogenesis. *Eukaryotic Cell*. **9**(11), 1755-1765. ISSN 1535-9778. DOI: 10.1128/EC.00029-10. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00029-10>
- PALMER, G. E., A. CASHMORE a J. STURTEVANT, 2003. *Candida albicans* VPS11 Is Required for Vacuole Biogenesis and Germ Tube Formation. *Eukaryotic Cell*. **2**(3), 411-421. ISSN 1535-9778. DOI: 10.1128/EC.2.3.411-421.2003. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.2.3.411-421.2003>
- PALMER, G. E., M. N. KELLY a J. E. STURTEVANT, 2005. The *Candida albicans* Vacuole Is Required for Differentiation and Efficient Macrophage Killing. *Eukaryotic Cell*. **4**(10), 1677-1686. ISSN 1535-9778. DOI: 10.1128/EC.4.10.1677-1686.2005. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.4.10.1677-1686.2005>
- PALMER, G. E. et al., 2007. Autophagy in the pathogen *Candida albicans*. *Microbiology*. **153** (1), 51-58. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.2006/001610-0. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.2006/001610-0>
- PAZDERKA, Tomáš. Fyzikální ústav Univerzity Karlovy, student doktorského studia. Osobní sdělení dne 25. 2. 2013
- PEARSON, Karl, 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*. 1901, **2**(11), 559-572. ISSN 1941-5982. DOI: 10.1080/14786440109462720. Dostupné z: <http://stat.smmu.edu.cn/history/pearson1901.pdf>
- PENG, L., G. WANG, W. LIAO, H. YAO, S. HUANG a Y.-Q. LI, 2010. Intracellular ethanol accumulation in yeast cells during aerobic fermentation: a Raman spectroscopic exploration. *Letters in Applied Microbiology*. **51**(6), 632-638. ISSN 02668254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02941.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2010.02941.x>
- PFALLER, Michael et al., 2012. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **74**(4), 323-331. ISSN 07328893. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889312004063>

- PICK, Uri a Meira WEISS, 1991. Polyphosphate Hydrolysis within Acidic Vacuoles in Response to Amine-Induced Alkaline Stress in the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **97**(3), 1234–1240. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1081147/>
- POLTERMANN, S. et al., 2005. The putative vacuolar ATPase subunit Vma7p of *Candida albicans* is involved in vacuole acidification, hyphal development and virulence. *Microbiology.* **151**(5), 1645-1655. ISSN 1350-0872. DOI: 10.1099/mic.0.27505-0. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.27505-0>
- PULLY, Vishnu Vardhan a Cees OTTO, 2009. The intensity of the 1602 cm<sup>-1</sup> band in human cells is related to mitochondrial activity. *Journal of Raman Spectroscopy.* **40**(5), 473-475. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.2269. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2269>
- RAMAN, C. V., 1928. A New Radiation. *Indian Journal of Physics.* **2**, 368-376. Dostupné z: <http://repository.ias.ac.in/70648/1/36-PUB.pdf>
- RAMAN, C. V. a K. S. KRISHNAN, 1928. A New Type of Secondary Radiation. *Nature.* **121**(3048), 501-502. Dostupné z: <http://www.nature.com/physics/looking-back/raman/index.html>
- RAO, N. N. a A. KORNBURG, 1996. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**(5), 1394–1400.
- RASHID, M. H. a A. KORNBURG, 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **97**(9), 4885-4890. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.060030097. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.060030097>
- RASHID, M. H. et al., 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **97**(17), 9636-9641. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.170283397. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.170283397>
- RÖSCH, Petra, Michaela HARZ, Michael SCHMITT a Jürgen POPP, 2005. Raman spectroscopic identification of single yeast cells. *Journal of Raman Spectroscopy.* **36**(5), 377-379. ISSN 0377-0486. DOI: 10.1002/jrs.1312. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1312>
- SEUFFERHELD, Manfredo J. et al., 2011. Evolution of vacuolar proton pyrophosphatase domains and volutin granules: clues into the early evolutionary origin of the acidocalcisome. *Biology Direct.* **6**(1), 50-65. ISSN 1745-6150. DOI: 10.1186/1745-6150-6-50. Dostupné z: <http://www.biology-direct.com/content/6/1/50>
- SHARECK, J. a P. BELHUMEUR, 2011. Modulation of Morphogenesis in *Candida albicans* by Various Small Molecules. *Eukaryotic Cell.* **10**(8), 1004-1012. ISSN 1535-9778. DOI: 10.1128/EC.05030-11. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.05030-11>
- SCHALLER, Martin, Claudia BORELLI, Hans C. KORTING a Bernhard HUBE, 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* **48**(6), 365-377. ISSN 0933-7407. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>
- SIMM, C. et al., 2007. *Saccharomyces cerevisiae* Vacuole in Zinc Storage and Intracellular Zinc Distribution. *Eukaryotic Cell.* **6**(7), 1166-1177. ISSN 1535-9778. DOI: 10.1128/EC.00077-07. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.00077-07>
- SINGH, Gajendra Pratap, Giovanni VOLPE, Caitriona M. CREELY, Helga GRÖTSCH, Isabel M. GELI a Dmitri PETROV, 2006. The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy.* **37** (8), 858-864. ISSN 0377-0486. DOI: 10.1002/jrs.1520. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1520>

- SPRING, Kenneth R., Thomas J. FELLERS a Michael W. DAVIDSON, 2012. Resolution and Contrast in Confocal Microscopy. OLYMPUS AMERICA INC. *Olympus Microscopy Resource Center* [online, cit. 2013-04-10]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/resolutionintro.html>
- SNYDER, R. G., S. L. HSU a S. KRIMM, 1978. Vibrational spectra in the C-H stretching region and the structure of the polymethylene chain. *Spectrochimica Acta*. **34A**, 395-406. Dostupné z: <http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/22743/0000298.pdf?sequence=1>
- SOCRATES, George, 2001. *Infrared and raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 3rd ed. West Sussex: John Wiley, 2001. ISBN 04-700-9307-2.
- SPEARMAN, C, 1904. "General Intelligence," Objectively Determined and Measured. *The American Journal of Psychology*. **15**(2), 201-293. ISSN 00029556. DOI: 10.2307/1412107. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/1412107?origin=crossref>
- SUDBERY, Peter, Neil GOW a Judith BERMAN, 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. **12**(7), 317-324. ISSN 0966842x. DOI: 10.1016/j.tim.2004.05.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X04001180>
- SUJITH, Athiyathil, Tamitake ITOH, Hiroko ABE, Ken-ichi YOSHIDA, Manikantan S. KIRAN, Vasudevanpillai BIJU a Misturu ISHIKAWA, 2009. Imaging the cell wall of living single yeast cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **394**(7), 1803-1809. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-009-2883-9. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00216-009-2883-9>
- TALEB, Ahcene, James DIAMOND, John J. MCGARVEY, J. Renwick BEATTIE, Carla TOLAND a Peter W. HAMILTON, 2006. Raman Microscopy for the Chemometric Analysis of Tumor Cells. *The Journal of Physical Chemistry B*. **110**(39), 19625-19631. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp061981q. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp061981q>
- TAO, Zhanhua, Guiwen WANG, Xiaodong XU, Yufeng YUAN, Xue WANG a Yongqing LI, 2011. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*. **314**(1), 42-48. ISSN 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02139.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6968.2010.02139.x>
- TIWARI, Shraeddha, Masahiro ANDO a Hiro-o HAMAGUCHI, 2013. Investigation of organelle-specific intracellular water structures with Raman microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. **44**(2), 167-169. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.4165. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.4165>
- TRIPATHI, Nidhi, Kevin WATT a Daniel K. BENJAMIN, 2012. Treatment and Prophylaxis of Invasive Candidiasis. *Seminars in Perinatology*. **36** (6), 416-423. ISSN 01460005. DOI: 10.1053/j.semperi.2012.06.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146000512000717>
- UZUNBAJAKAVA, N., A. LENFERINK, Y. KRAAN, B. WILLEKENS, G. VRENSSEN, J. GREVE a C. OTTO, 2003. Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells. *Biopolymers*. **72**(1), 1-9. ISSN 0006-3525. DOI: 10.1002/bip.10246. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.10246>
- VAN MANEN, H.-J., 2005. Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**(29), 10159-10164. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0502746102. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502746102>
- VESES, Veronica, Andrea RICHARDS a Neil AR GOW, 2008. Vacuoles and fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*. **11**(6), 503-510. ISSN 13695274. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527408001318>

- XIE, C., J. MACE, M. A. DINNO, Y. Q. LI, W. TANG, R. J. NEWTON a P. J. GEMPERLINE, 2005. Identification of Single Bacterial Cells in Aqueous Solution Using Confocal Laser Tweezers Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. **77**(14), 4390-4397. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac0504971. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0504971>
- YAMAGATA, Y. et al., 1991. Volcanic Production of Polyphosphates and Its Relevance to Prebiotic Evolution. *Nature*. London: Nature Publishing Group. **352**(6335), 516-519. ISSN 0028-0836.



# Seznam tabulek

Tabulka 1	Taxonomické zařazení kvasinky <i>C. albicans</i>	str. 8
Tabulka 2	Použité chemikálie, jejich výrobce a čistota	str. 43
Tabulka 3	Parametry měření a úpravy spekter pro všechny tři soubory buněk	str. 50
Tabulka 4	Polohy pásů v jednotlivých subspektrech, soubor 1	str. 61
Tabulka 5	Polohy pásů v jednotlivých subspektrech, soubor 2	str. 71
Tabulka 6	Polohy pásů v jednotlivých subspektrech, soubor 3	str. 82
Tabulka 7	Polohy pásů fosfátových sloučenin	str. 85

# Seznam použitých zkratek

ADP	Adenosin difosfát
ATP	Adenosin trifosfát
HCA	Hierarchická klastrová analýza ( <i>hierarchical cluster analysis</i> )
HMP	Hexametafosfát sodný
IČ	Infračervený
Lag buňky	Buňky pěstované v médiu YPD po dobu 14 hodin a poté promyté a převedené do čerstvého média YPD, viz kapitolu 3.2 a 4.1
LDA	Lineární diskriminační analýza
Log buňky	Buňky pěstované 18 hodin v médiu YPD, viz kapitolu 3.2 a 4.1
PCA	Analýza hlavních komponent ( <i>principal component analysis</i> )
P <sub>i</sub>	Anorganický fosfát
PP	Pyrofosfát sodný
PPK	Polyfosfát kináza
PPX	Exopolyfosfatáza
SERS	Povrchem zesílený Ramanův rozptyl ( <i>surface enhanced Raman scattering</i> )
Soubor 1	Soubor <i>lag</i> a <i>log</i> buněk z kapitoly 4.1, viz též kapitolu 3.6
Soubor 2	Soubor <i>YPD</i> a <i>YNB</i> buněk z kapitoly 4.2.1, viz též kapitolu 3.6
Soubor 3	Soubor <i>YPD</i> a <i>YNB</i> buněk z kapitoly 4.2.2, viz též kapitolu 3.6
SVD	Rozklad do singulárních hodnot ( <i>singular value decomposition</i> )
TMP	Trimetafosfát sodný
TP	Trifosfát sodný
YNB	Z anglického <i>yeast nitrogen base</i> , kultivační médium bez zdroje dusíku, viz kapitolu 3.2
YNB buňky	Buňky po promytí převedené do YNB média s přidaným prolinem, viz kapitolu 3.2 a 4.2
YPD	Plné kultivační médium, z anglického <i>yeast extract</i> , <i>peptone</i> , <i>dextrose</i> , viz kapitolu 3.2
YPD buňky	Buňky po promytí převedené do YPD média, viz kapitolu 3.2 a 4.2

# Příloha

## A. Pokrytí skel poly-L-lysinem

Tento postup vychází z doporučení RNDr. Jana Krůška, CSc., z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (Jan Krůšek, osobní sdělení, 2012).

### **0,15 M pufr kyseliny borité**

4,64 g kyseliny borité se rozpustí ve 400 ml destilované vody. Pomocí NaOH se upraví pH na 8,4. Obsah se doplní do 500 ml a pufr se přefiltruje přes 0,22 µm filtr. Pufr se skladuje za teploty 4°C.

### **Roztok poly-L-lysinu**

5 mg poly-L-lysinu se rozpustí v 50 ml 0,15 M pufru kyseliny borité. Roztok se skladuje za teploty 4°C.

### **Pokrývání skel**

Krycí a podložní sklička se důkladně odmastí pomocí etanolu okyseleného HCl, omyjí se deionizovanou vodou a usuší. Krycí skla byla pokrývána pouze z jedné strany, označené vrypem. Krycí sklo se pipetou celé pokryje roztokem poly-L-lysinu (přibližně 2,5 až 3 ml), po 15 minutách se roztok odstraní, sklo se důkladně omyje deionizovanou vodou a suší se při 55°C přibližně hodinu. Krycí skla byla pokrývána z obou stran. Několik krycích skel se umístí do plastové Petriho misky a zalije roztokem poly-L-lysinu. Je třeba zajistit pohyb skel, aby se neslepila k sobě a neležela na dně a důkladně se pokryla z obou stran. Po přibližně hodině se skla důkladně omyjí deionizovanou vodou a suší se za teploty 55°C přibližně hodinu. Skla byla skladována za pokojové teploty v uzavřené krabici.

## B. Přiřazení pásů Ramanova spektra

Následujících tabulky obsahují možné přiřazení pásů Ramanových spekter biomolekulám nebo přímo vibracím jednotlivých funkčních skupin podle literatury. Tabulka B1 obsahuje pásy vibrací skupin atomů. Nejdůležitějším zdrojem byla v tomto případě kapitola Biological Molecules – Macromolecules knihy Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts (Socrates, 2001). Tabulky B2 až B6 obsahují vybrané pásy aminokyselin, proteinů, nukleových kyselin a nukleotidů, lipidů a sacharidů. Pásy lipidů (tabulka B5) se z velké části shodují s pásy různých vibrací CH skupin uvedených v tabulce B1. Tyto pásy nejsou v tabulce B5 znovu opakovány. Tabulka B7 obsahuje vybrané pásy dalších biomolekul nebo molekul vyskytujících se v organismech. Tabulka B8 obsahuje pásy anorganických fosfátů a polyfosfátu.

V tabulkách je použito následující číslování zdrojů: 1 – Basar a Kin, 2008; 2 – Bednárová et al., 2012; 3 – De Gelder et al., 2007; 4 – Huang et al., 2003; 5 – Huang et al., 2004; 6 – Huang et al., 2005; 7 – Huang et al., 2007; 8 – Huang et al., 2009; 9 – Chang et al., 2009; 10 – Jess et al., 2007; 11 – Majed a Gu, 2010; 12 – Majed et al., 2009; 13 – Maquelin et al., 2002b; 14 – Naito et al., 2005; 15 – Tomáš Pazderka, osobní sdělení dne 25. 2. 2013; 16 – Peng et al., 2010; 17 – Pully et al., 2009; 18 – Rösch et al., 2005; 19 – Singh et al., 2006; 20 – Socrates, 2001; 21 – Taleb et al., 2006; 22 – Tao et al., 2010; 24 – Tiwari et al., 2013; 25 – Uzunbajakava et al., 2003; 26 – Van Manen, 2005; 27 – Xie et al., 2005.

Zdroje 1, 2, 4–14, 16–19, 21–27 jsou články zabývající se Ramanovou mikrospektroskopií buněk. Zdroj 20 (Socrates, 2001) je atlas Ramanových a IČ spekter, z něho byla využita poslední kapitola, zabývající se spektry biomolekul a biologických objektů. De Gelder a kolegové (2007, zdroj 3) naměřili spektra 61 biologicky důležitých látek. Ve svém článku uvádějí tato spektra včetně poloh pásů a jejich relativních intenzit. Mgr. Tomáš Pazderka z Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy poskytl spektra vodných roztoků biogenních aminokyselin (s výjimkou tyrosinu), která jsou normovaná na koncentraci aminokyseliny v roztoku (zdroj 15).

V prvním sloupci tabulek B1 až B8 je uvedena poloha pásu. V případě různých možných poloh pásu je v tabulkách uveden rozsah od – do podle hodnot v literatuře (zvláště odlehlé hodnoty nebyly uvažovány), v závorce může být uvedena nejčastěji se vyskytující poloha nebo polohy pásu.

Ve druhém sloupci jsou uvedeny relativní intenzity pásů, použity jsou následující zkratky: vw – *very weak* – velmi slabý pás; w – *weak* – slabý pás; mw – *medium weak* – střední až slabý pás; m – *medium* – středně silný pás; ms – *medium strong* – střední až silný pás; s – *strong* – silný pás; vs – *very strong* – velmi silný pás. Relativní intenzita pásů je uvedena podle literatury s výjimkou zdroje 15, zde byla intenzita pásů určena na základě poskytnutých spekter. Jako *very strong* byly označeny dva nejsilnější pásy fenylalaninu a šest nejsilnějších pásů tryptofanu, které měly za daných podmínek měření intenzitu nad  $2 \times 10^6$  countů, ta byla uvažována jako hranice mezi *very strong* a *strong* pásy. Hranice mezi *strong* a *medium strong*, *medium strong* a *medium*, *medium* a *medium weak*, *medium weak* a *weak*, *weak* a *very weak* pásy byla stanovena postupně na  $1 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  countů.

Tabulky zdaleka neobsahují všechny pásy dané skupiny látek. Zpravidla jsou v tabulkách B2 až B8 uvedeny pouze silné a velmi silné pásy nebo takové pásy, které ve spektrech identifikovalo větší množství autorů.

Všechny zdroje uvedené v poslední buňce jednotlivých řádků tabulky nemusely identifikovat konkrétní uvedenou vibraci, ale pouze její „nadmnožinu“. Jako příklad uveďme pás okolo  $783 \text{ cm}^{-1}$ . Ten některé zdroje přiřazují vibracím nukleotidů cytosinu, thyminu nebo uracilu, jiné vibraci O–P–O skupiny kostry nukleových kyselin, některé zdroje uvádějí pouze, že se jedná o pás nukleových kyselin. Stejně tak všechny zdroje nemusely uvést v tabulkách uvedenou intenzitu pásu.

Zkratky A, C, G, T a U označují báze nukleových kyselin adenin, cytosin, guanin, thymin a uracil, případně celé příslušné nukleotidy. V tabulkách byly dále použity standardní třípísmenné zkratky biogenních aminokyselin. Vibrace byly zkracovány následujícím způsobem: sym – symetrická vibrace, asym – antisymetrická vibrace, str – *stretching* (valenční vibrace), def – deformační vibrace, rock – *rocking*, bend – *bending*, twist – *twisting*, scissor – *scissoring*, wag – *wagging*.

Mezi charakteristické pásy proteinů (tabulka B3) patří pásy spojené s vibracemi proteinové kostry a peptidové vazby. Tyto pásy se označují jako pásy amid I až amid VI a zahrnují tyto vibrace (podle Socrates, 2001): Amid I – 80% CO str, 10% CN str, 10% NH bend; amid II – 60% NH bend, 40% CN str; amid III – 30% CN str, 30% NH bend, 10% CO str, 10% O=C–N bend, zbytek další vibrace; amid IV – 40% OCN bend; amid V – NH bend; amid VI – C=O bend.

**Tabulka B1: Pásky vibrační skupin atomů**

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Látka/vibrace	Zdroj
715 – 730	CH <sub>2</sub> rock	20
730 – 960	CH def	20
748 – 751	P–O–P sym str	7, 8
800 – 900	sym C–N–C	20
820 – 830	C–O–S str	20
881 – 893	CH <sub>2</sub> rock	3
897	C–O–C str	13
903 – 940	CH <sub>2</sub> rock	3
950 – 970	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> , NCH <sub>3</sub> asym def a CN str	20
1000 – 1155 (1062)	C–C str, C–O str, C–O–H def, CO–O–C sym str	3, 4, 6, 7, 8, 20, 24
1000 – 1290	C–O str	7, 13, 20, 21, 25
1000 – 1080	C–OH str	20
1020 – 1120	C–O–C	20
1020 – 1220	RNH <sub>2</sub> a CN str	20
1045	C–O–P str	20
1050 – 1150	CH bend	24
1050 – 1110	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym a sym str	3, 12, 13, 19, 20, 21, 25
1090 – 1295	Aminoskupina, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> rock	20
1122 – 1141	C–N a C–C str (zejména lipidy)	3, 7, 24
1127 – 1129	C–C str	3
1150 – 1156	C–C str, C–N str (proteiny), široký pás	6, 19, 22
1170	C–C str	3, 7
1170	CO–O–C asym str	20
1200 – 1400	CH <sub>2</sub> wagging; OH def	20
1200 – 1260	ROP(OR)O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym a sym str	20
1210 – 1320	RCOOH, OH bend	20
1240	C–O–S str	20
1266 – 1267	C=C–H in-plane bend	6, 9, 26
1295	CH <sub>2</sub> def	13
1296 – 1306 (1302)	CH <sub>2</sub> twist a def	3, 4, 6, 9, 17, 19, 20, 22
1300 – 1420	RCOO <sup>-</sup> sym str	20
1315 – 1340	CH def	8, 11, 20, 22, 27
1333 – 1383	CH <sub>3</sub> sym def	11
1340	CH <sub>2</sub> def, CH bend	6
1380	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> sym bend	20
1395 – 1405	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> , CH <sub>3</sub> sym bend, NCH <sub>3</sub> sym def	20
1408 – 1507 (1443, 1466)	CH <sub>2</sub> def, CH <sub>3</sub> def	3, 11
1410 – 1425	COO <sup>-</sup> asym str, CH <sub>2</sub> COOR, CH <sub>2</sub> def	20
1434 – 1461 (1442)	CH <sub>2</sub> def	7, 13, 26
1440 – 1446	CH bend, CH <sub>2</sub> scissor, CH <sub>3</sub> vibrace	4, 5, 6, 9, 14, 17, 21, 24
1449 – 1451	CH def	19, 22, 25, 27
1450 – 1462	CH bend	6, 24
1453	C–H wag a scissor	12
1460 – 1475	CH <sub>2</sub> scissor, dva pásy	20
1470 – 1490	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> , CH <sub>3</sub> asym bend, NCH <sub>3</sub> asym def	20
1470 – 1510	NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup> , NCH <sub>3</sub> asym def	20
1485 – 1550	aminokyseliny, RNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym def a sym bend	20
1520 – 1650	RNH <sub>2</sub> , NH <sub>2</sub> bend; R <sub>2</sub> NH, NH bend	20
1550	RCONHR, amid II	20
1550 – 1610	RCOO <sup>-</sup> asym str	20
1570 – 1660	RNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym bend a asym def	20

1600 – 1680 (1654 – 1660)	C=C str	3, 4, 5, 6, 7, 9, 20, 26
1605 – 1630	COO <sup>-</sup> asym str	20
1650	RCONHR	20
1700 – 1775 (1742)	Ester, karboxyl, acetyl, C=O str	3, 6, 9, 11, 13, 18, 20, 22, 24, 26
2010 – 2120	CH str	20
2050 – 2140	aminokyseliny, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym str, široký pás	20
2500 – 2700	RCOOH, OH str s vodíkovou vazbou	20
2500 – 2920 (2850)	CH <sub>2</sub> sym str	20, 13, 25
2530 – 2760	aminokyseliny, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym str, široký pás	20
2850 – 3000	CH str	18, 20
2880	CH <sub>3</sub> sym str	20
2925 – 2930	CH <sub>2</sub> asym str	20
2935	CH <sub>3</sub> a CH <sub>2</sub> str	13
2955	CH <sub>3</sub> asym str	20
2975	CH <sub>3</sub> str	13
3000 – 3200	aminokyseliny, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym str	20
3000 – 3500	RNH <sub>2</sub> , NH <sub>2</sub> str; NH str, ovlivněno H-můstky	20
3010	=C–H str	20
3010	cis-C=C–, CH <sub>2</sub> asym str	20
3015 – 3059	C=C–H str	13, 20
3020 – 3030	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> , CH <sub>3</sub> a NCH <sub>3</sub> str	20
3020	RNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym str	20
3080 – 3100	RCONHR, NH str	20
3100 – 3400	OH str s vodíkovou vazbou, široký pás	20
3520 – 3730	OH str bez vodíkové vazby	20

## Tabulka B2: Vybrané pásy aminokyselin

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Rel. int.	Látka	Zdroj
755 – 756	vs	Trp	3, 15
825 – 834	ms–vs	Tyr volný nebo exponovaný do vody, dýchací vibrace kruhu a out-of-plane bending overtone	3, 6, 13, 25
834 – 842	vs	Pro	3
851	vs	Ala, C–N–C sym str	3
852 – 863 (853)		Tyr schovaný v proteinu, dýchací vibrace kruhu a out-of-plane bending overtone	1, 6, 7, 13, 21, 22, 25, 27
857	vs	Glu	3
894	vs	Gly, C–N–C sym str	3
899, 916	vs	Pro	3
982	vs	Arg	3
1001 – 1006 (1003)	vs	Phe, dýchací vibrace kruhu	3, 6, 7, 13, 14, 15, 17, 19, 21, 22, 24, 25, 27
1009 – 1010	vs	Trp, vibrace kruhu	3, 15
1028	vs	Phe	15, 21, 25, 27
1204 – 1216 (1209)	s	Phe, Tyr, C–C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> str	3, 15, 21, 22, 25
1317	vs	His	3
1338 – 1358	s–vs	Trp, širší pás zřejmě z více pásů	3, 15
1432 – 1499	w–vs	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	3, 15
1548 – 1556	s–vs	Trp	3, 15
1583 – 1586	m–ms	Phe	3, 7, 15
1600 – 1620	m–s	Alfaaminokyseliny, amid C=O	20
1602 – 1607	m–s	Phe	3, 13, 15, 21, 27
1614 – 1618	m–ms	Tyr, Trp	3, 13, 15, 21
1620 – 1650	m–s	Jiné než alfaaminokyseliny, amid C=O	20
2850 – 3000	m–s	CH str	20

**Tabulka B3: Vybrané pásy proteinů**

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Rel. int.	Látka	Zdroj
600		Amid VI	20
625	m-s	Amid IV	20
625 – 679 (660)		C-S str, široký pás	3, 19
725	s-m	Amid V	20
800 – 900	s	sym C-N-C	20
898, 1004		C-C vibrace kostry	25
935 – 938		C-C vibrace kostry helixu	22, 25, 27
1032 – 1094		C-N str	22, 25
1126 – 1128		C-N str	22, 25, 27
1150 – 1156		C-C str, C-N str, široký pás	6, 19, 22
1209 – 1339 (1250)		Amid III	6, 7, 8, 10, 13, 17, 21, 22, 24, 25, 27
1225 – 1235	m-s	Amid III, beta-skládaný list	20
1240 – 1255	m	Amid III, náhodné klubko	20
1270 – 1300	w	Amid III, alfa-helix	20
1320 – 1338		CH def	8,11,22, 27
1340, 1450		CH bend	6
1550 – 1573	m-w	Amid II	8, 20
1629 – 1655	m-s	C=O str	3, 12, 20
1645 – 1681		Amid I	4, 6, 7, 13, 17, 19, 22, 24, 25, 27
1645 – 1656	m-s	Amid I, alfa-helix	20, 22
1660 – 1670	m-s	Amid I, náhodné klubko	20
1665 – 1675	m-s	Amid I, beta-skládaný list	20

**Tabulka B4: Vybrané pásy nukleových kyselin a nukleotidů**

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Rel. int.	Látka	Zdroj
617	s	T, vibrace kruhu	3
650	s	G, vibrace kruhu	3
660 – 670		T, G, C	19, 21, 23, 27
720 – 730	s	A, vibrace kruhu	3, 13, 21, 22, 24, 25, 27
740	s	T, vibrace kruhu	3
750 – 752		T, vibrace kruhu	24, 25
779 – 788 (783)		Kostra, O-P-O str; U, C, T, vibrace kruhu	6, 7, 13, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 27
790 – 792	s-vs	U, C, vibrace kruhu	3
809		RNA, C-O-P-O-C	7, 8, 19
838		DNA	8
891 – 898		DNA kostra	10, 25
1050 – 1100		PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> sym str	3, 12, 19, 20, 25
1093 – 1099		O-P-O str	22, 24, 26, 27
1129		O-P-O str	24
1230		PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym str	20
1235	s	U	3
1275	s	C	3
1369	vs	T	3
1371 – 1376	w	A, T, G	3, 24, 25
1482 – 1487	m	A, (G)	3, 8, 21, 25
1549 – 1550	m	G	3, 22
1575 – 1579		A, G, vibrace kruhu	6, 7, 13, 21, 22, 24, 25, 26, 27
1671 – 1674	vs	T	3, 22



**Tabulka B5: Vybrané pásy lipidů a jejich složek**

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Rel. int.	Látka	Zdroj
708 – 718		Fosfolipidy, hlavička	4, 6, 17
747 – 750		Fosfolipidy, hlavička, O–P–O	7
811		Fosfolipidy, O–P–O	27
820, 851, 1055, 1110	s-vs	Glycerol	3
1061 – 1084 (1062)	w-vs	C–C str, CO–O–C sym str, C–O str	3, 20, 24
1091 – 1104	m-vs		3

**Tabulka B6: Vybrané pásy sacharidů**

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Rel. int.	Látka	Zdroj
626	vs	D-(+)-Fruktóza	3
730 – 790	w-s	Pyranóza, vibrace kruhu	3, 20
818 – 838	s-vs	Některé sacharidy	3
840 – 860		Glykogen, C–C str kostry	11
841 – 958	mw-vs	COH, CCH a OCH def postranních řetězců	3
865 – 900		Pyranóza, ekvatoriální CH def	20
872	s-vs	D-(+)-Fruktóza, D-(+)-Galaktosamin	3
876 – 916	m-ms	COH, CCH a OCH def postranních řetězců	3
890		Glykosidová vazba, C=O str, široký pás	6, 24
900 – 935	m-s	Pyranóza, asym vibrace kruhu	20
903 – 912	vs	D-(+)-Xylóza, D-(+)-Trehalóza	3
937 – 944		Glykogen, dýchací vibrace kruhu	11
955 – 985	m-s	Pyranóza, sym vibrace kruhu a CH <sub>3</sub> def	20
973	s-vs	D-Fruktóza-6-fosfát POC str, N-Acetyl-D-glukosamin	3
1000 – 1160 (1100, 1125)	w-vs	C–O str, ring str, C–C str, C–O–C, C–O–H def, C–H bend	3, 4, 6, 7, 8, 11, 20, 24
1096 – 1107	s-vs	Glykosidová vazba, C–O–C str	3, 7, 13
1131		Glykogen, C=C=O str, pseudosym	11
1138 – 1143	mw-ms	C–C str, C–O str, C–O–H	3, 7
1149	vs	D-(+)-Trehalóza	3
1256 – 1462	w-vs	CH <sub>2</sub> def, CH <sub>2</sub> OH def	3, 11, 20
1267	vs	D-(+)-Galaktosamin, NH <sub>2</sub> rock a twist	3
1454		Redukující pyranóza, CH <sub>2</sub> OH, CH bend	6
1454 – 1462		Pyranóza, CH bend	6, 24
1626 – 1627	m	Chitin, N-Acetyl-D-glukosamin, C=O vibrace acetylamidu	3
1735 – 1775		C=O str acetylu	20

**Tabulka B7: Vybrané pásy dalších biomolekul**

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Rel. int.	Látka	Zdroj
722 – 724	vs	Koenzym A, acetylkoenzym A	3
784	vs	Kyselina citrónová, C <sub>3</sub> CO def	3
787	vs	Fosfoenolpyruvát, POC sym str	3
830	vs	Acetoacetát	3
881		Etanol	16
936 – 964	vs	Nízkomolekulární kyseliny, OH...O out-of-plane wag H-můstku	3
1130	vs	Kyselina askorbová	3
1156	vs	Beta-karoten, C–C a C–H str	3
1345	vs	Riboflavin	3
1399 – 1444 (1412)	vs	Nízkomolekulární kyseliny, CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> sym str	3
1567 – 1599		Fenylen, C=C	18
1602	vs	Ramanův spektroskopický znak života	4, 5, 6
1640		Voda, široký pás, OH bend	1
1653 – 1667	vs	Kyselina askorbová, C=O laktonu	3
1700 – 1703	vs	Nízkomolekulární kyseliny, CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> asym str	3

**Tabulka B8: Pásy fosfátových sloučenin**

Poloha pásu (cm <sup>-1</sup> )	Látka	Zdroj
668 – 700 (690)	Polyfosfát, P–O–P	2, 11, 12, 14
690	Hexametafosfát, P–O–P	12
738	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10 H <sub>2</sub> O, P–O–P	12
891	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O v roztoku za nízkého pH, P–O str	12
907	Pevný NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, sym P–O str	12
975	Pevný NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, asym P–O str	12
1022	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10 H <sub>2</sub> O, (PO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup> sym str	12
1151 – 1177	Polyfosfát, (PO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup> sym str	2, 11, 12, 14
1157	Hexametafosfát, (PO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup> sym str	12
1175	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, P=O str	12