



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM VLASTNOSTÍ MEMBRÁNOVÉHO NAPĚŤOVÉHO SENZORU ASAP1 EXPRIMOVANÉHO V BUNĚČNÉ LINII HEK 293

STUDY OF PROPERTIES OF VOLTAGE MEMBRANE SENSOR ASAP1 EXPRESSED IN HEK293 CELL LINE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Dominika Jablonská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ondřej Svoboda

BRNO 2017

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Dominika Jablonská

ID: 147481

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Studium vlastností membránového napěťového senzoru ASAP1 exprimovaného v buněčné linii HEK 293

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se obecně s napěťově citlivými sondami a barvivy používanými v buněčné biologii. Zaměřte se především na senzor ASAP1. 2) Prostudujte kultivaci buněčných linií a transfekci plasmidové DNA do buněk. 3) Seznamte se se systémem patch clamp a s možností jeho využití při studiu napěťově citlivých sond. 4) Navrhněte experiment umožňující charakterizaci fluorescenčních změn depolarizace senzoru ASAP1 transfekovaného do buněčné linie HEK293. 5) Navržený experiment zrealizujte. 6) Získané snímky kvantitativně vyhodnoťte pomocí vhodného programového prostředí. 7) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ST-PIERRE, F., et al. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nature Neuroscience*. 2014-4-22, 17(6): 884-889.

[2] Patch-clamp methods and protocols. Totowa, N. J.: Humana, 2007, 321 p. *Methods in molecular biology*. ISBN 9781597455299.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Svoboda

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo seznámit se s problematikou měření změny membránového napětí a monitorování šíření elektrické aktivity buněk. Za tímto účelem byly vyvinuty fluorescenční membránové napěťové senzory, které na změnu membránového napětí reagují změnou intenzity fluorescence. Praktická část práce je zaměřena na studium vlastností fluorescenční sondy ASAP1, která byla transfekována do buněčné linie HEK293, což jsou ledvinové buňky z lidského embrya. Membránové napětí buněk bylo měněno pomocí techniky patch-clamp.

KLÍČOVÁ SLOVA

ASAP1, fluorescenční senzor, GFP, HEK293, patch-clamp, transfekce, zelený fluorescenční protein

ABSTRACT

This thesis deals with the problematice of measuring membrane potential and monitoring the propagation of electrical activity of cells. For this purpose, fluorescence membrane voltage sensors have been developed to detect changes in the membrane potential by changing their fluorescence intensity. The practical part is focused on the study of the properties of the ASAP1 fluorescence probe, which was transfected into the HEK293 cell line, which are kidney cells from the human embryo. Cell membrane potential was changed using the patch-clamp technique.

KEYWORDS

ASAP1, fluorescent sensor, GFP, green fluorescent protein, HEK293 cell line, patch-clamp, transfection

JABLONSKÁ, D. *Studium vlastností membránového napětového senzoru ASAP1 exprimovaného v buněčné linii HEK293*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 63 s. Vedoucí práce: Ing. Ondřej Svoboda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Studium vlastností membránového napěťového senzoru ASAP1 exprimovaného v buněčné linii HEK293 jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne 19.5.2017

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Ondřeji Svobodovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji rodině a přátelům za podporu během studia.

V Brně dne 19.5.2017

.....

(podpis autora)

OBSAH

Seznam obrázků.....	viii
Seznam tabulek.....	x
Úvod.....	11
1 Senzory membránového napětí.....	12
1.1 Membránová barviva citlivá na napětí.....	13
1.2 Fluorescenční napěťové sondy.....	15
Accelerated Sensor of Action Potentials 1.....	19
2 Buněčné kultury.....	22
2.1 Kultivace buněk.....	22
2.2 Buněčná linie HEK293.....	23
3 Transfekce plazmidové dna.....	25
3.1 Používané transfekční metody.....	25
4 Patch-clamp.....	28
4.1 Pracovní módy patch-clamp.....	29
4.2 Skleněné mikroelektrody.....	31
4.3 Využití patch-clamp techniky při měření membránového napětí fluorescenčními senzory.....	31
5 Experimentální studium vlastností senzoru ASAP1.....	37
5.1 Kultivace a transfekce buněk HEK293.....	37
5.2 Patch-clamp.....	37
5.3 Analýza dat.....	39
6 Diskuze výsledků.....	43
Závěr.....	48
Literatura.....	50
Seznam symbolů, veličin a zkratk.....	55
Seznam příloh.....	56

SEZNAM OBRÁZKŮ

obr. 1: Stokesův posun [4].....	12
obr. 2: Schéma excitace a emise u fluorochromů [4]	13
obr. 3: Excitační a emisní spektra jednotlivých aminokyselin a jejich struktura [17]....	16
obr. 4: Excitační a emisní spektrum wtGFP [18].....	17
obr. 5: Chemická struktura GFP (vlevo) [18], 3D struktura GFP (vpravo) [21]	18
obr. 6: Spektrální profily běžně používaných fluorescenčních proteinů [5].....	19
obr. 7: Zobrazení napětově citlivého iontového kanálu (vlevo) a napětově citlivé fosfatázy (vpravo) ve fosfolipidové dvojvrstvě; SX znázorňuje jednotlivé VSD [23].....	20
obr. 8: ASAP1 umístěný ve fosfolipidové membráně [24]	20
obr. 9: Mapa vektoru ASAP1 [25].....	21
obr. 10: Buněčná linie HEK293 [33].....	24
obr. 11: Stabilní (vlevo) a přechodná transfekce [35]	25
obr. 12: Chemická transfekce s transfekčním činidlem PEI [41]	26
obr. 13: Schéma metody patch-clamp pro měření jedním iontovým kanálem [43]	28
obr. 14: Metody patch-clamp [43]	30
obr. 15: Odezva mikroelektrody na 5 mV testovací puls	32
obr. 16: GUI pro analýzu změny intenzity fluorescence	39
obr. 17: Vývojový diagram použitého programu.....	40
obr. 18 Vývojový diagram pro výpočet jednoduché masky	41
obr. 19: Vývojový diagram pro výpočet průměrované masky	41
obr. 20: Ukázka jednoduché masky	42
obr. 21: Vývojový diagram pro analýzu průměrného stupně šedi ve snímku	42
obr. 22: Ukázka snímku buňky při různých hodnotách napětí převedena do šedotónové stupnice (vlevo hodnota napětí -120 mV, uprostřed HP -80 mV, vpravo +40mV).....	43
obr. 23: Graf změny intenzity fluorescence pro 1 buňku	43

obr. 24: Graf pro buňku obsahující méně exprimovaného plazmidu	45
obr. 25: Jednoduchá maska (vlevo) a průměrovaná maska (vpravo) pro buňku obsahující méně exprimovaného plazmidu	46
obr. 26: Graf změny intenzity fluorescence v jednotlivých hodnotách membránového napětí (hodnoty získané aplikací jednoduché masky – červeně, průměrované – černě).....	46
obr. 27: GUI po spuštění s přednastavenými hodnotami	58
obr. 28: Část GUI ovládaná uživatelem	59
obr. 29: Příklad grafu při zadaném HP -80 mV a analýze na 3 buňkách.....	60
obr. 30: Příklad tabulek při zadaném HP -80 mV a analýze na 3 buňkách	60
obr. 31: Graf změny fluorescence podle membránového napětí buňky 1	61
obr. 32: Graf změny fluorescence podle membránového napětí buňky 2	62
obr. 33: Graf změny fluorescence podle membránového napětí buňky 3	63

SEZNAM TABULEK

tab. 1: Hodnoty změny intenzity pro jednu buňku.....	44
tab. 2: Hodnoty změny intenzity pro buňku obsahující méně exprimovaného plazmidu	45
tab. 3: Hodnoty procentuální změny intenzity při jednotlivých membránových napětích a směrodatná odchylka pro obě aplikované masky.....	47
tab. 4: Hodnoty procentuální změny fluorescence podle membránového napětí buňky 1	61
tab. 5: Hodnoty procentuální změny fluorescence podle membránového napětí buňky 2	62
tab. 6: Hodnoty procentuální změny fluorescence podle membránového napětí buňky 3	63

ÚVOD

Membránové napěťové senzory se využívají pro sledování změn membránového napětí buněk. Tyto změny jsou významné především v neurovědě, kde je dekodování elektrické komunikace u neuronových populací velmi aktuálním problémem.

Cílem této práce je problematika membránově napěťového senzoru Accelerated Sensor of Action Potentials 1 (ASAP1). První kapitola se obecně věnuje sensorům membránového napětí a jejich funkci. Kapitola také popisuje organická membránová barviva citlivá na změnu napětí s důrazem na jejich výhody a nevýhody, kde v návaznosti popisuje také nutnost vývoje potenciometrických sensorů s optickými vlastnostmi.

Druhá kapitola diskutuje teorii buněčných kultur a jejich kultivace. Práce je zvláště zaměřena na buněčnou linii HEK293 (ledvinné buňky z lidského embrya), která je využita při praktickém experimentu.

Aby bylo možné fluorescenční senzory využít, musí dojít k jejich expresi v modelových buňkách, u nichž se mají sledovat změny membránového napětí. Tato molekulárně biologická technika, nazývaná transfekce, je popsána ve třetí kapitole.

Praktický experiment je založen na elektrofyziologické metodě patch-clamp. Tato technika je popsána ve čtvrté kapitole společně s diskuzí doposud dosažených výsledků publikovaných v impaktovaných pracích.

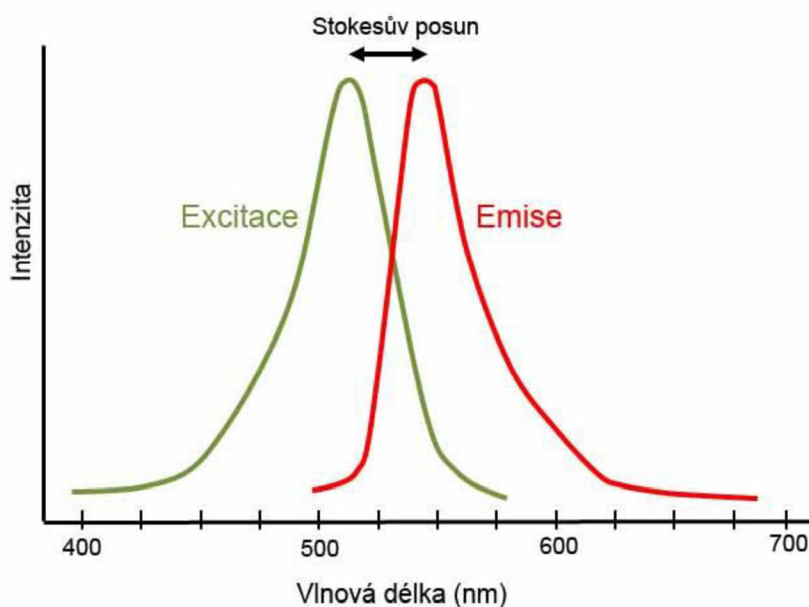
V následující kapitole je navržen a realizován praktický experiment s pomocí buněk HEK293. Plazmid ASAP1 byl vpraven transientní transfekcí pomocí polyethyleiminu (PEI). Dále jsou zde uvedeny podmínky a postup při získávání dat pomocí metody *patch-clamp* a zpracování těch to dat v programovacím prostředí MATLAB.

1 SENZORY MEMBRÁNOVÉHO NAPĚTÍ

Mezi vnitřní a vnější stranou buněčné membrány dochází vlivem nerovnoměrného rozložení iontů k rozdílu potenciálu, a tedy ke vzniku měřitelného napětí. Toto membránové napětí je měřitelné u většiny buněk. Klidové membránové napětí živých buněk se pohybuje mezi hodnotami -90 mV až -50 mV. Záporné znaménko bylo zavedeno konvenčně a vyjadřuje záporný potenciál vnitřního prostředí buňky vzhledem k jejímu okolí. [1]

Excitabilní (vzrušivé) buňky mají schopnost generovat elektrické impulzy (akční potenciál) jako odpověď na vnější podnět. Akční napětí vzniká je-li během depolarizace překročena určitá prahová hodnota. Následná depolarizace buňky probíhá spontánně. Akční napětí se může šířit z buňky na buňku po celé délce vlákna postupnou depolarizací, je-li vzruch dostatečně vysoký – tzv. nadprahový. Celý tento proces trvá v řádech desítek až stovek ms. [1]

Pro objasnění funkce mozku, reakce neuronů a myocytů na stimulaci a jejich komunikaci byly v posledních letech vyvinuty senzory pro měření biologických veličin, jako je koncentrace vápníku, pH a membránový potenciál. Tyto senzory mají ve své struktuře opticky aktivní oblast fluorochrom (fluorofor), která je schopná fluorescence, jedná se například o organické sloučeniny s aromatickým jádrem nebo i celé fluorescenční proteiny. [2][3][4]

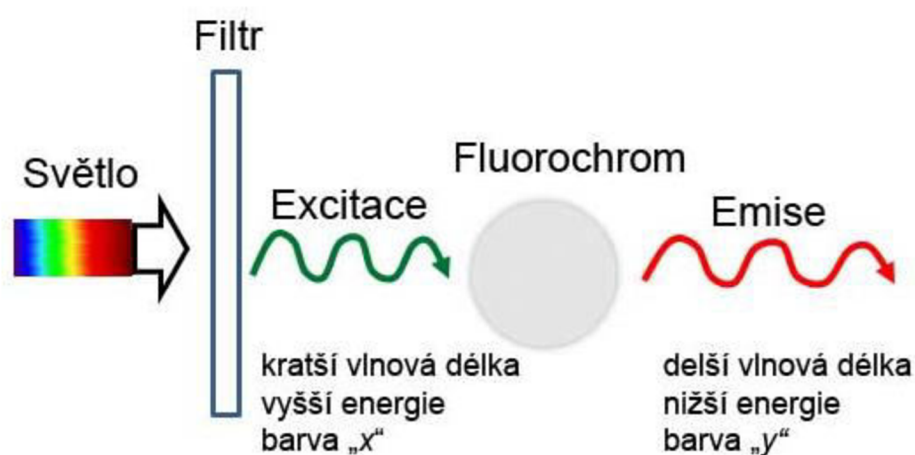


obr. 1: Stokesův posun [4]

Fluorescence je jev, kdy ozářená molekula absorbuje světelnou energii určité vlnové délky a emituje záření o jiné, delší vlnové délce s nižší energií. Během absorpce dochází

k excitaci elektronu čili přechodu ze základní (popř. nižší) energetické hladiny na vyšší hladinu. Excitovaný stav je vysoce nestabilní, proto dochází k přechodu zpět na hladinu nižší, čímž dojde k uvolnění energie v podobě fotonu. Rozdíl mezi vlnovou délkou excitovaného fotonu při maximální excitaci a vlnovou délkou emitovaného fotonu při maximální intenzitě fluorescence se nazývá Stokesův posun (obr. 1). Rozdíl energií se obvykle přemění na vibrační energii nebo teplo. Vyzáření fotonu je v řádu nanosekund a proto, je-li odstraněn zdroj záření, fluorescence ustává. [4][5]

Fluorescence fluorochromů je znázorněna na obr. 2. Aby bylo možné sledovat pouze fotony emitované fluoroforem, které mají určitou vlnovou délku, je třeba nežádoucí vlnové délky eliminovat pomocí sady filtrů a dichroických zrcadel. [4]



obr. 2: Schéma excitace a emise u fluorochromů [4]

Nejdříve pro studium membránového napětí sloužila organická barviva, která v závislosti na změně napětí na membráně mění své optické vlastnosti. Barviva patří k vlastním fluoroforům, jelikož opticky aktivní oblast je součástí jejich struktury. Tato barviva ovšem mají řadu nevýhod, což vedlo k rozvoji fluorescenčních snímačů citlivých na změny membránového napětí. [2][6][7]

1.1 Membránová barviva citlivá na napětí

Membránová barviva citlivá na napětí, označována také jako potenciometrická barviva, se používají k neinvazivnímu sledování akčních potenciálů. Barviva jsou organické molekuly nebo proteiny, které se váží svým hydrofobním koncem na fosfolipidovou dvojvrstvu membrány, zvenku nebo zevnitř. Reagují na změny membránového napětí změnou svých optických vlastností. V závislosti na rychlosti reakce při změně potenciálu se dělí na rychlá a pomalá barviva a od toho se také odvíjí jejich použití. Pomalá barviva reagují na změny potenciálu v řádech milisekund až sekund. Mají klíčovou roli především

pro měření klidového potenciálu velkých populací buněk. Rychlá potenciometrická barviva jsou schopna reagovat v řádech mikrosekund a jejich odpovědi jsou lineárně úměrné ke změně membránového napětí. Díky tak rychlým odpovědím jsou senzitivní na jednotlivé akční potenciály jednotlivých neuronů. Barviva se také využívají pro monitorování elektrické aktivity organel, do kterých není možné zavést elektrody; příkladem takových organel mohou být mitochondrie. Dalšími oblastmi využití barviv jsou také mozková kůra a srdce. [8][9][10]

Mezi velké výhody použití barviv patří již výše zmíněná rychlost odezvy srovnatelná s dobou vzniku akčního potenciálu a velikost signálu lineárně úměrná ke změně napětí. Důležitý je také fakt, že měření jsou v zásadě neinvazivní, takže mohou být použita ke sledování organel i buněčných procesů, aniž by došlo k jejich poškození. K dalším výhodám se řadí možnost sledování signálu z několika oblastí současně, protože do přípravku může být umístěno velké množství barviva. Díky tomu je možné přesně zaznamenat vznik akčního potenciálu, jeho směr i rychlost šíření po celé struktuře neuronu. V neposlední řadě použitím různě specifických barviv lze sledovat různé druhy fyziologických reakcí, které jsou spojené s neuronovou aktivitou. [8][10]

Na druhou stranu mají potenciometrická barviva řadu nevýhod. Mezi nejvýznamnější patří jejich farmakologické a fotodynamické vlivy na chování a funkce sledovaných buněk. Dalším problémem je podléhání *photobleaching*, tedy vyhasínání/vybělení barviva vedoucí až ke ztrátě optických vlastností, což způsobí poklesu signálu v závislosti na délce osvětlení. U některých barviv byly také zaznamenány rozdílné výsledky při použití jiných protokolů přípravy, takže musí být provedeno mnoho pokusů pro získání optimálního signálu. Velkou nevýhodou je i fakt, že fluorescenční signály mají nízké hodnoty. Změna intenzity fluorescence je pouze kolem 10 %, což snižuje variabilitu experimentů a zároveň vyžadují přesné snímací přístroje. Významnou nevýhodou organických barviv je jejich omezenost na nespecifické barvení buněk, což může být nevýhodou při určování funkce jednotlivých typů buněk, a také neschopnost barvit buňky uložené hlouběji pod povrchem. [6][7][8][10]

Vývoj barviv probíhal s ohledem na jejich fotostabilitu, odolnost vůči fotobleachingu. Dalším důležitým faktorem u barviv je vliv na chování a funkce sledovaných buněk, který by měl být minimální. Také doba, po kterou jsou barviva schopná být navázána na buněčnou membránu, by měla být co nejdelší. [8]

Mezi významná barviva patří ve vodě rozpustný hemikyanid ANNINE6-plus, modifikovaná forma barviva ANNINE-6, který je ve vodě nerozpustný. Obě formy patří k barvivům s rychlou odezvou, v řádu ns, a používají se k měření membránového potenciálu neuronů a srdečních i kostních myocytů. ANNINE-6plus je sůl s dvěma

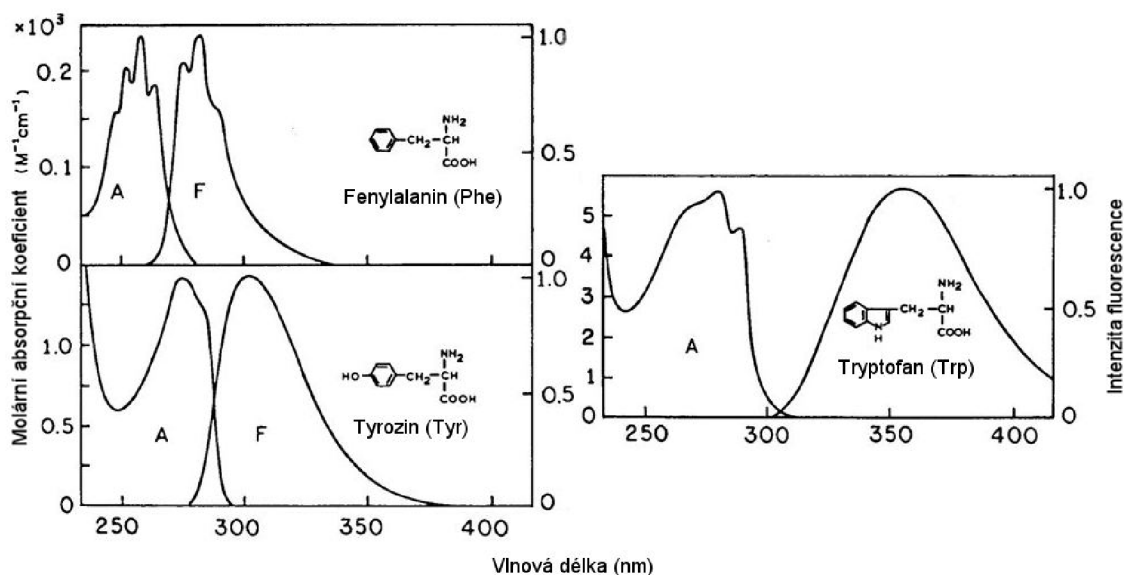
bromidovými protiionty a chromoforem, který má kladný náboj 2. Díky rozpustnosti ve vodě vykazuje vysokou schopnost navázat se na buněčné membrány, takže na rozdíl od ANNINE-6 ho lze používat bez pomoci povrchově aktivních látek nebo organických rozpouštědel. Této vlastnosti se využívá k sensitivním optickým záznamům neuronové aktivity, u kterých je přítomnost těchto pomocných látek nežádoucí, a pro intra a extracelulární barvení mozkové tkáně. Obě formy ANNINE vykazují velice vysokou citlivost na napětí, která je založena na Starkově efektu. Starkův efekt je způsoben posunem a změnou excitačního a emitovaného spektra v důsledku vnějšího elektrického pole. Spektra těchto barviv jsou v červené oblasti. [12][13][14]

Barviva, která jsou označována zkratkou ANEP (celým názvem aminonaphthylethenylpyridinium), patří do stejné třídy barviv jako ANNINE-6 a jsou to také barviva s rychlou odezvou. Vlastností těchto barviv je, že je vlivem vnějšího elektrického pole dochází ke změně elektronové struktury během excitace, kdy se kladný náboj z atomu dusíku v hydrofilní části molekuly přesouvá na hydrofobní část molekuly. Tak náboj přejde přes opticky aktivní část molekuly, čímž dochází ke změnám fluorescenčních vlastností. Rychlost takové změny je dostatečná pro zaznamenání změny membránového napětí u excitabilních buněk. Problémem je, že změny fluorescence jsou pouze 2–10 % na 100 mV. Barviva v podstatě nevykazují fluorescenční schopnosti, dokud nedojde k jejich navázání na buněčnou membránu. Fluorescence není ovlivněna pH a jsou vysoce fotostabilní. Rozdíly ve struktuře jednotlivých barviv ANEP se používají pro odlišné aplikace. Barviva ANEP se dělí do dvou hlavních skupin, amfolytická barviva (ANEPPS) a kationtová barviva (ANEPEQ). Všechna barviva mimo di-2-ANEPEQ jsou ve vodě nerozpustná. Spektrální vlastnosti jsou závislé na okolním prostředí. Maximum excitačního spektra se u amfolytických barviv pohybuje kolem hodnot 465–498 nm a u kationtových kolem 517 nm. Emisní spektrum je převážně v rámci oranžové oblasti (590–625 nm). Mezi nejznámější zástupce barviv ANEP patří di-4-ANEPPS a di-8-ANEPPS. Di-8-ANEPPS se od di-4-ANEPPS liší lepší fotostabilitou, silnější vazbou na membránu a nižší fototoxicitou. [8][13][15][16]

1.2 Fluorescenční napěťové sondy

Fluorescenční napěťové sondy pro monitorování elektrické aktivity buněk jsou plazmidy, jejichž struktura obsahuje fluorescenční protein. Sondy se nekovalentně váží ke sledovanému vzorku, který sám o sobě nemá vlastní nebo vhodné fluorescenční vlastnosti. Patří tedy do skupiny nevlastních fluoroforů. Pomocí těchto sond citlivých na změny membránového napětí lze studovat i specifické buňky hluboko v mozkové struktuře. [2][3][4]

Fluorescenční proteiny se označují jako vnitřní fluorofory, protože jsou samy o sobě schopny fluorescence. Způsobují ji aminokyseliny s aromatickými jádry – tryptofan (Try), tyrozin (Tyr) a fenylalanin (Phe). Excitační spektrum se pohybuje v oblasti ultrafialového záření (240–300 nm), stejně tak jako spektrum. Tato spektra a struktury jednotlivých aminokyselin jsou znázorněny na obr. 3. Tryptofan obsahuje indolovou skupinu a jeho molární absorpční koeficient je největší. Také emisní spektrum je mnohem širší než u zbývajících dvou aminokyselin. Na fluorescenci proteinu se tak podílí mnohem více než tyrozin a fenylalanin na ni nemá žádný výrazný vliv. Fluorescence tryptofanu je citlivá na změny v okolním prostředí a je vhodné ji využít pro sledování konformačních změn v proteinech. Mezi významné fluorescenční proteiny patří i zelený fluorescenční protein (GFP). [3]

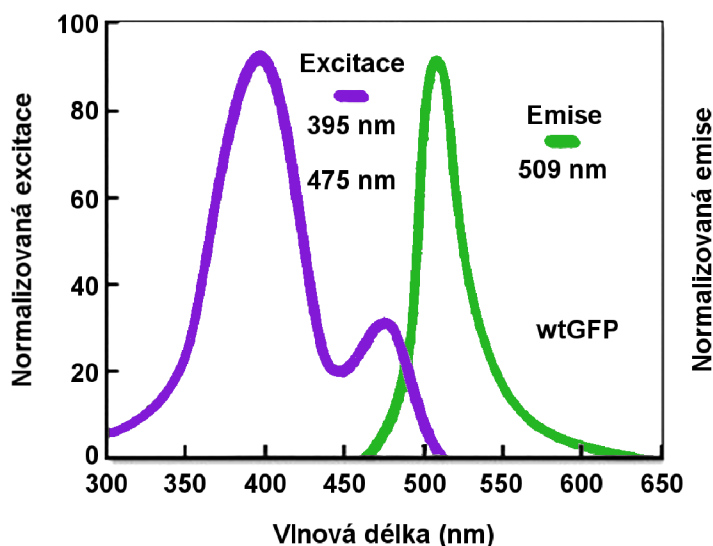


obr. 3: Excitační a emisní spektra jednotlivých aminokyselin a jejich struktura [17]

Objev zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) z mořské medúzy *Aequorea victoria* začátkem šedesátých let minulého století způsobil revoluci v buněčné biologii, protože umožnil aplikaci mnoha metod, kterými lze sledovat buněčné procesy v živých systémech za použití optické mikroskopie. Fluorescence GFP nastává při delších vlnových délkách, tedy je-li ozářen světlem s vlnovou délkou blízkou ultrafialovému až modrému viditelnému světlu je emitováno zelené světlo. Divoký gen GFP (wtGFP) má hlavní excitační maximum na vlnové délce 395 nm, vedlejší na 475 nm a jeho emisní maximum při 509 nm, což odpovídá zelenému světlu. Excitační a emisní spektrum wtGFP znázorňuje obr. 4. [5][18]

GFP nemá vliv na buněčné funkce nebo růst buňky, proto je vhodné ho použít i k monitorování v živých organismech. U transparentních živočichů je možné GFP

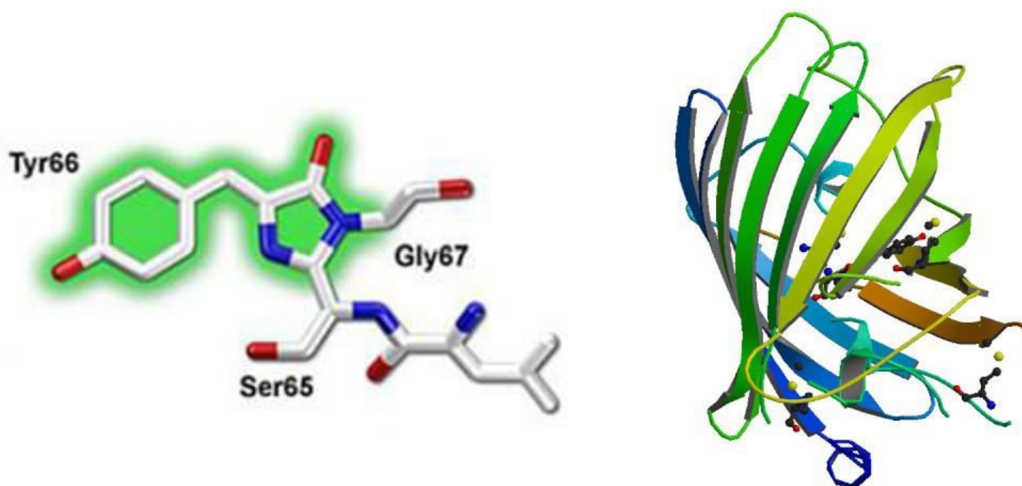
využit jako značku pro sledování buněčného růstu i zpracování nervových procesů. Používá se pro značení proteinů v buňkách při sledování protein-proteinových interakcí a jako ukazatel genové exprese. Vcelku malý rozměr proteinu usnadňuje její šíření cytoplazmou značně členitých buněk, jako jsou neurony nebo gliové buňky. [5][19]



obr. 4: Excitační a emisní spektrum wtGFP [18]

GFP se skládá z 238 aminokyselin, je velice stabilní a pro fluorescenci a její stabilitu je esenciální celá jeho přirozená peptidická struktura. V primární struktuře hlavní příčina fluorescenčních vlastností byla vypořádována v tripletu sousedních aminokyselin (obr. 5 vlevo) – serin (Ser65), tyrozin (Tyr66) a glycin (Gly67). Rozsáhlé studie ukazují, že pro správnou funkci fluorochromu je právě glycinový zbytek na pozici 67 esenciální, na což poukazuje i fakt, že je obsažen ve struktuře každého doposud objeveného fluorescenčního proteinu. Přesto že se tento vcelku jednoduchý motiv objevuje v organismech často, nemá běžně fluorescenční schopnosti. Ty se projevují až po sbalení do terciární struktury peptidu, která je velice unikátní. Polypeptidické řetězce se stáčí do β -soudku tvořeného 11 β -listy obklopující centrální šroubovici (3Dstruktura na obr. 5 vpravo). β -soudek zakončený krátkými spirálovitými segmenty na obou stranách izoluje vnitřní fluorochrom v rozpouštědle. Reálná struktura GFP vypadá jako téměř dokonalý váleček s průměrem 25 nm a 40 nm vysoký. Důležitý je také fakt, že samotné sbalení nemá na fluorescenci vliv, pokud probíhá za anaerobních podmínek. Kyslík způsobuje oxidaci tyrozinu, který fluorescenci vyvolává, i když pro další správnou funkci musí být kyslík vyloučen z další interakce s fluoroforem, aby nedocházelo ke kolizím a „zhašení“ fluorescence (*photobleaching*). [5][18][19][20]

Za využití fluorescenčních proteinů do senzorů jsou odpovědné dvě převládající vlastnosti fluoroforu. První je možnost molekulu modifikovat a tím zvyšovat její výtěžnost a také nezávadnost pro hostitelskou buňku. Mnoho studií se soustředí na zvyšování fluorescence, což přináší mnoho nových sond. Druhou významnou vlastností je, že fluorescenční schopnosti jsou závislé na molekulární struktuře, která obklopuje fluorofor. [5]



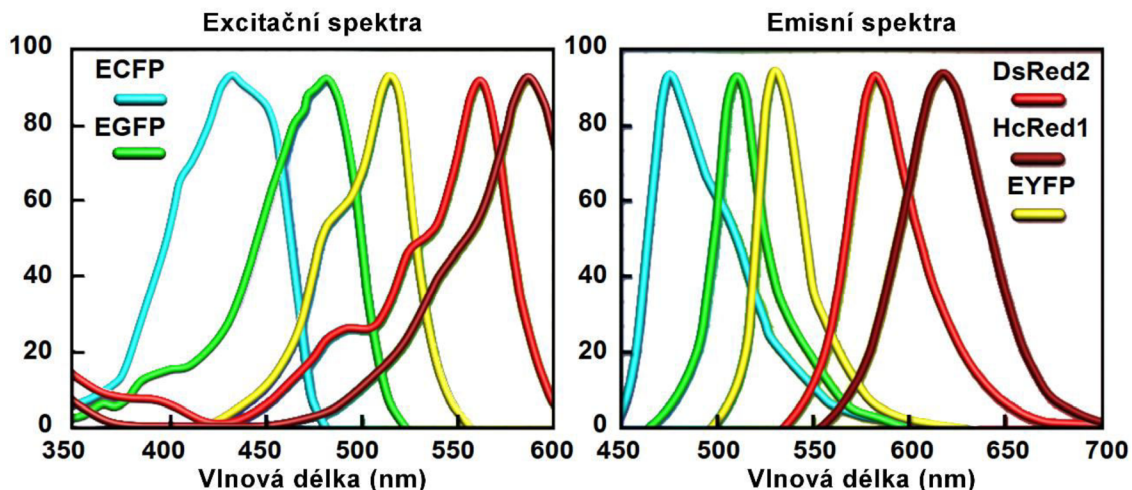
obr. 5: Chemická struktura GFP (vlevo) [18], 3D struktura GFP (vpravo) [21]

Substitucí threoninu za serin v místě 65 (označení S65T) vznikla varianta EGFP (enhanced green fluorescent protein). Tato modifikace změnila hlavně excitační spektrum s jediným maximem při 484 nm a emisní spektrum s maximem při 507 nm. Modifikovaný GFP je daleko jasnější než wtGFP a je více vhodný pro biologické metody. Dalšími modifikacemi aminokyselin Ser65, Tyr66 a Gly67 došlo ke změnám excitačního i emisního spektra a byla rozšířena paleta barev na modrou (způsobené modrým fluorescenčním proteinem – EBFPP), azurovou (ECFP) a žlutou (EYFP). Vývoj proteinů nebyl pouze směrem k zisku dalších barev, ale také směrem ke zlepšení fotostability, kvantového výtěžku a míry exprese v hostitelském organismu. [5][18]

Jinou modifikací, která vylepšila kvalitu GFP, ale neměla vliv na barvu, je cirkulující GFP (cpGFP). Tato varianta obsahuje kruhově permutovanou aminokyselinovou sekvenci. [11]

Červený fluorescenční protein (DsRed) patří mezi významné fluorofory, které byly získány z jiných organismů než GFP, ale také mají fluorescenční schopnosti při ozáření světlem s delší vlnovou délkou a jsou stejně užitečné. Excitační a emisní spektrum DsRed je znázorněno na obr. 6 spolu s dalšími výše uvedenými proteiny. Je zde také možno vidět

protein HcRed, což je také červený fluorescenční protein, ale získaný z jiného korálového organismu než DsRed. Červené fluorescenční proteiny se také používají spolu s GFP na vícebarevné značení. [5][22]

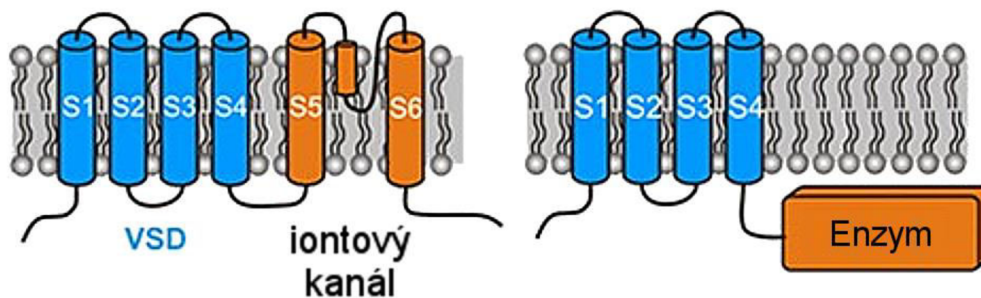


obr. 6: Spektrální profily běžně používaných fluorescenčních proteinů [5]

Pro efektivní monitorování elektrické aktivity buněk fluorescencí, a tím i pro usnadnění porozumění funkce buněk a jejich komunikace mezi sebou, by bylo zapotřebí ideálního geneticky kódovaného snímače. Takovýto snímač by měl produkovat dostatečné množství fluorescenčních odpovědí na detekované akční potenciály, které jsou výstupy neuronů, a také sledují amplitudu a časoprostorovou distribuci vstupních signálů, které jsou neurony přijaty a následně zpracovány. Další jeho důležitou vlastností by byla schopnost zaznamenávat směr a pohyb přenosů akčních potenciálů v řádech milisekund. Zejména možnost vizualizace vysokofrekvenčních elektrických přenosů by byla přínosná k porozumění, jakým způsobem dochází ke zpracování neurotransmiterů na postsynaptické membráně, nebo také jak 50–200 Hz frekvence akčních potenciálů z interneuronů ovlivňuje zpracování signálu a komunikaci buněk v celém mozku anebo jak je ovlivněna během nemoci. [2]

Accelerated Sensor of Action Potentials 1

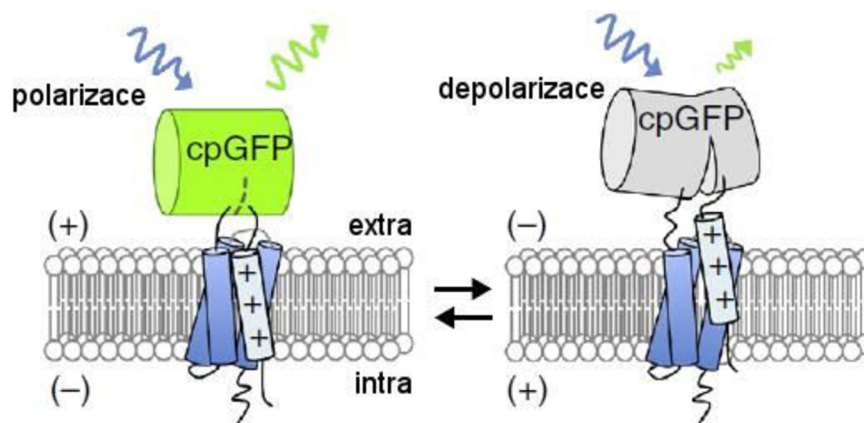
Senzory obsahují jeden ze dvou typů napětově citlivých proteinů: buďto – 7-helix mikrobiální rhodopsin nebo 3-4-helix napětově citlivá oblast (VSDs) z napětově citlivých fosfatáz nebo iontových kanálů (obr. 7). Sondy, které obsahují druhý typ uvedeného proteinu, jsou většinou jasnější než sondy obsahující rhodopsin, ale jejich nevýhodou je pomalá rychlost inaktivace pro sledování průběhu akčních potenciálů a/nebo vyžadují vlnové délky kratší než 450 nm, což může způsobit fototoxicitu. [2]



obr. 7: Zobrazení napětově citlivého iontového kanálu (vlevo) a napětově citlivé fosfatázy (vpravo) ve fosfolipidové dvojvrstvě; SX znázorňuje jednotlivé VSD [23]

Vývoj sond se snaží přiblížit k ideálnímu geneticky kódovanému senzoru, jehož vlastnosti byly popsány výše. Senzor *ArcLight* skutečně produkuje dostatečné množství fluorescenční odpovědi na elektrické impulzy při excitačním záření okolo 488 nm, ovšem má špatnou schopnost detekce za sebou rychle jdoucích akčních potenciálů. [2]

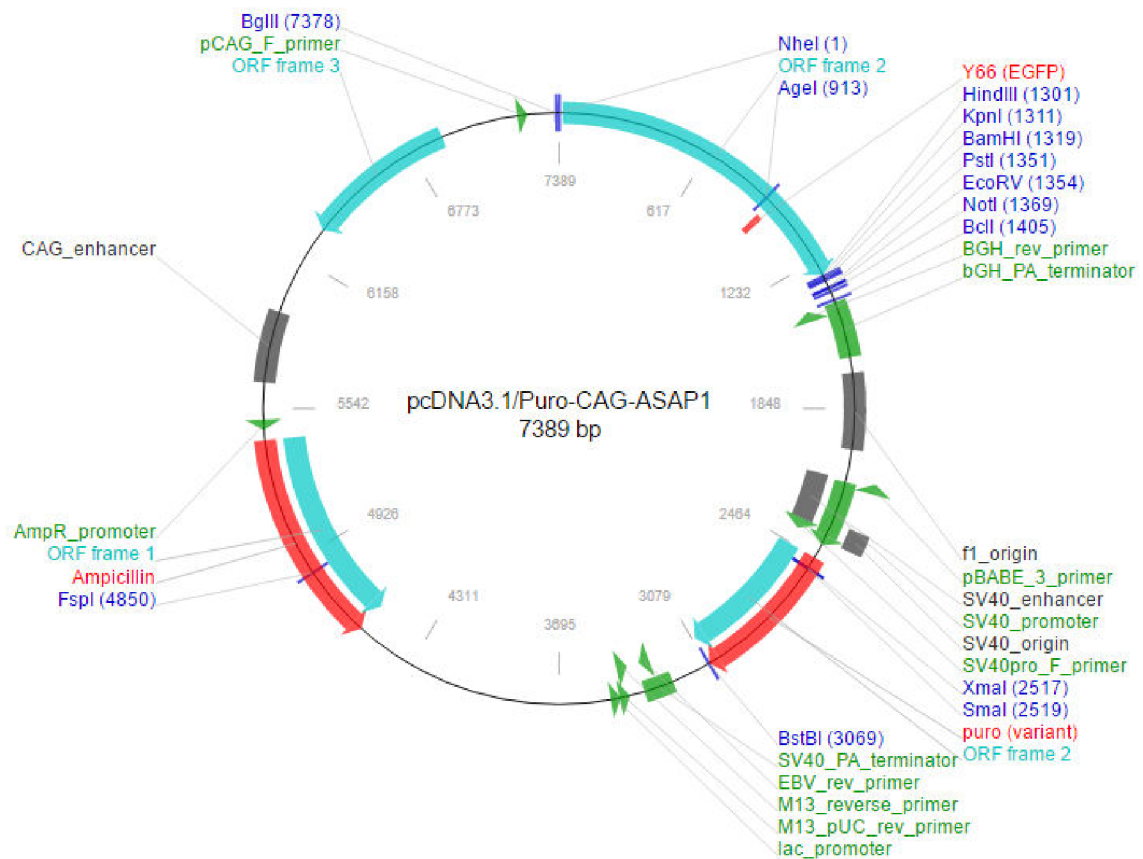
Modifikací GFP nacházejícího se mezi 3. a 4. VSD za cpGFP byl vyvinut senzor ASAP1 (Accelerated Sensor of Action Potentials 1). Schéma ASAP1 je zobrazeno na obr. 8, kde je také možné vidět, jak se cpGFP chová při polarizaci a depolarizaci membrány. I z obrázku je zřejmé, jak cpGFP reaguje na změnu napětí, tedy dojde k poklesu intenzity fluorescence vlivem změny konformace napětově citlivých oblastí, zatímco u nepodrážděné buňky s polarizovanou membránou je emitované světlo v zelené oblasti s vyšší intenzitou [2]



obr. 8: ASAP1 umístěný ve fosfolipidové membráně [24]

Na rozdíl od *ArcLight* byly pro ASAP1 vybrány VSD z kura bankivského (*Gallus gallus*), jelikož smyčka mezi S3 a S4 je kratší než u VSD použitých pro *ArcLight* a tím se zlepšilo propojení pohybů vyvolané napětím a strukturou β -soudku GFP, což se projeví vyšší rychlostí optického signálu. Také se zvýšila exprese ASAP1 na plazmatické membráně buněk HEK293 A. [2]

ASAP1 je schopný skvěle lokalizovat membrány živých disociovaných hipokampálních neuronů a fixních řezů mozku po celém těle neuronu i na jednotlivých dendritech a jeho exprese v buňkách nemá vliv na membránovou kapacitanci. ASAP1 umožňuje detekovat jednotlivé akční impulzy standardně trvající 2 milisekundy, podprahové změny potenciálu a sledovat průběhy těchto změn až do frekvence 200 Hz. Tento senzor dovoluje také souvislé monitorování membránových potenciálů pomocí standardního epifluorescenčního mikroskopu v rozsahu kilohertz díky kombinaci jasů, dynamického rozsahu a rychlosti detekce. Vektorová mapa ASAP1 je znázorněna na obr. 9. [2]



obr. 9: Mapa vektoru ASAP1 [25]

2 BUNĚČNÉ KULTURY

Buněčné kultury se v dnešní době využívají jako zdroj biologického materiálu jak pro výzkum, tak i ve výrobě. Pro pěstování a udržování buněk se používá termín *in vitro* („ve skle“) s kultivačními medii, která se složením přibližují k fyziologickému prostředí. Pro založení buněčné kultury se nejčastěji používají eukaryotické buňky z tkání laboratorních zvířat, lidské nebo embryonální buňky. [26][27]

Využití kultur v experimentální práci přináší nespočet výhod z nich jednou je, že pokus je prováděn na jednom specifickém typu buněk a není ovlivněn interakcemi s okolním prostředím. Buněčné linie je možné relativně snadno kultivovat a získat dostatečné množství materiálu pro experiment, u kterého dojde k poškození nebo dokonce zničení buněk. Využívání buněk pro experimenty významně přispívá k omezení pokusů na zvířatech. Výhody využití buněčných kultur jsou ale zároveň nevýhodami. Buňky jsou kultivovány v médiu, které se pouze přibližuje složením vnitřnímu prostředí organismu, a také nemají tkáňový kontext čili komunikaci s okolím prostředím, což má nenahraditelný vliv na vlastnost buněk *in vivo*. [26][27]

2.1 Kultivace buněk

Prvním krokem kultivace buněk je vybrání zdroje buněk pro kultivaci. Nejčastěji to je laboratorní zvíře nebo člověk, v méně typických případech hmyz či rostlina. Na typu zdroje závisí vlastnosti kultivovaných buněk. Odlišně se chovají buňky separované z dospělého člověka a z embrya, kde se embryonální buňky snáze kultivují a mají delší životnost, ale na druhou stranu také snáze podléhají fenotypovým změnám. Buňky z normální a nádorové tkáně se pak liší například svojí životností. [26]

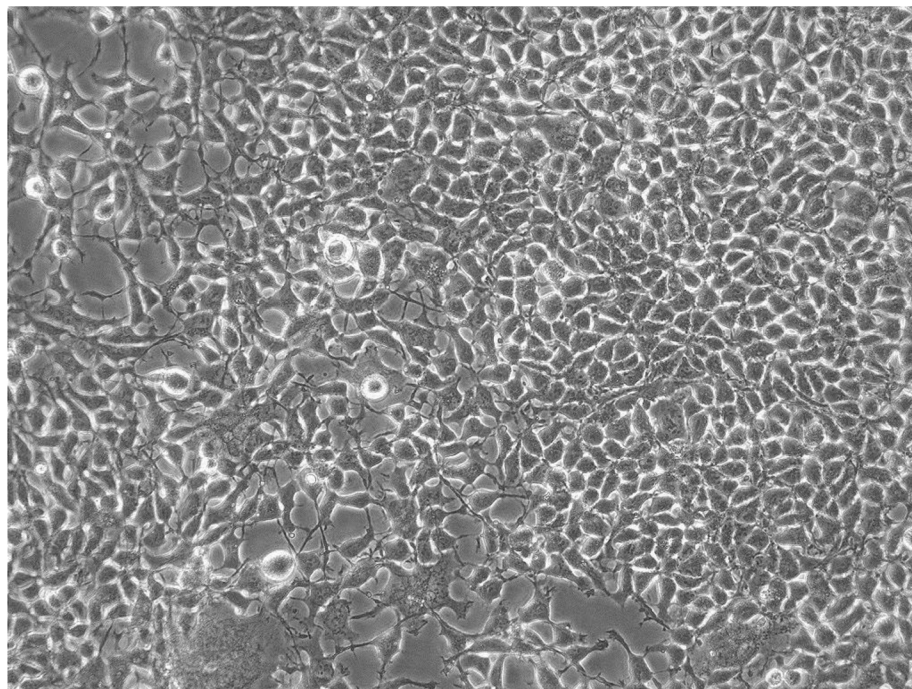
Pro získání primární kultury – první kultury pěstované *in vitro*, je potřeba buňky z daného typu tkáně organismu nejprve izolovat (ve výjimečných případech je možné nechat buňky růst přímo z kousku tkáně za vhodných podmínek, tzv. explantační kultura). Izolace probíhá zpravidla kombinací mechanického rozvolnění tkáně a enzymatického natrávení hmoty. Získaná směs obvykle obsahuje množství i dalších buněčných typů, které je potřeba odstranit. Existuje několik separačních technik. Nejjednodušší, i když méně spolehlivé, je použití kultivačních podmínek umožňující růst vybraného typu buněk. Další technika využívá odlišné rychlosti přilnavosti různých druhů buněk k určitým typům kultivačních povrchů anebo lze buňky separovat pomocí centrifugace dle rozlišných fyzikálních vlastností, jako je velikost částic či jejich hustota. [26]

Po přenesení do kultivačního média je zapotřebí zajistit několik kultivačních podmínek jako je teplota a složení prostředí (média) i okolní atmosféry. Mnoho podmínek pomáhají dodržet inkubátory, kde se buňky nechávají kultivovat, a kde je pro zabránění kontaminaci sterilní prostředí. Inkubátory dále pomáhají udržovat konstantní teplotu pro optimální růst, což je hodnota teploty tkáně, ze které buňky pocházejí, většinou tedy 37°C. Ve složení atmosféry uvnitř inkubátoru je kladen důraz na 5 % obsahu oxidu uhličitého, aby bylo zachováno pH roztoku. Udržování 90% vlhkosti atmosféry zabraňuje odpařování vody z kultivačního média. Složení kultivačního média by mělo být co nejpodobnější složení extracelulární tekutiny a být bohaté na živiny. Jelikož živiny jsou klíčové pro růst buněk, je třeba médium párkrát týdně vyměnit. Médium usnadňuje difúzi kyslíku a oxidu uhličitého tím, že nad vrstvou buněk uchycených k povrchu vytvoří tenkou vrstvu kapaliny. Koncentrace bílkovin ochraňuje buňky před mechanickým poškozením. Některé složky média, například růstové faktory, vitamíny a stopové prvky, lze dodávat v podobě séra. Podle potřeby přidání séra se média klasifikují na média s obsahem séra, s nízkým obsahem séra (kolem 2 %) a bez séra. [26][27][28]

Podle způsobu růstu buněk v médiu rozlišujeme dva typy kultur. Prvním skupinou jsou suspenzní kultury, jejichž buňky se volně vznášejí v médiu. U tohoto typu buněk je pro správný růst důležité, aby docházelo k promíchávání, čímž se napomáhá k přenosu plynu a zároveň se zabraňuje sedimentaci a shlukování buněk. Při výměně média nebo pasážování je nutné nejprve oddělit médium od buněk odstředěním. Druhým typem jsou jednovrstvé kultury (z angl. monolayer), jejichž buňky přilnou na dno kultivační nádoby, kde obvykle rostou v jedné vrstvě. Povrch by měl být hydrofilní, popřípadě se speciální úpravou pomocí polypeptidů z aminokyselin s polárním postranním řetězcem nebo kolagenů napomáhající rychlejšímu přichycení. Výměna média spočívá v opatrném slití starého a přidáním nového. Při pasážování se k uvolnění buněk používají proteázy. [27][29]

2.2 Buněčná linie HEK293

Buněčná linie HEK293 (obr. 10) pochází z ledvinných epitelových buněk lidského embrya. První kultivaci buněk roku 1970 provedl holandský molekulární biolog Alex van der Eb. Později v sedmdesátých letech vědec Frank Graham tyto buňky transformoval virovou DNA adenoviru 5. Virová DNA adenoviru se začlenila do chromozomu 19 a tím se tato linie stala imortalizovanou (kontinuální – neomezená možnost pasážování). Touto transformací také buňky HEK293 získávají vlastnosti jako nevyzrálé neuronové buňky. Číslo 293 znázorňuje první úspěšný pokus transformace. [30][31][32]



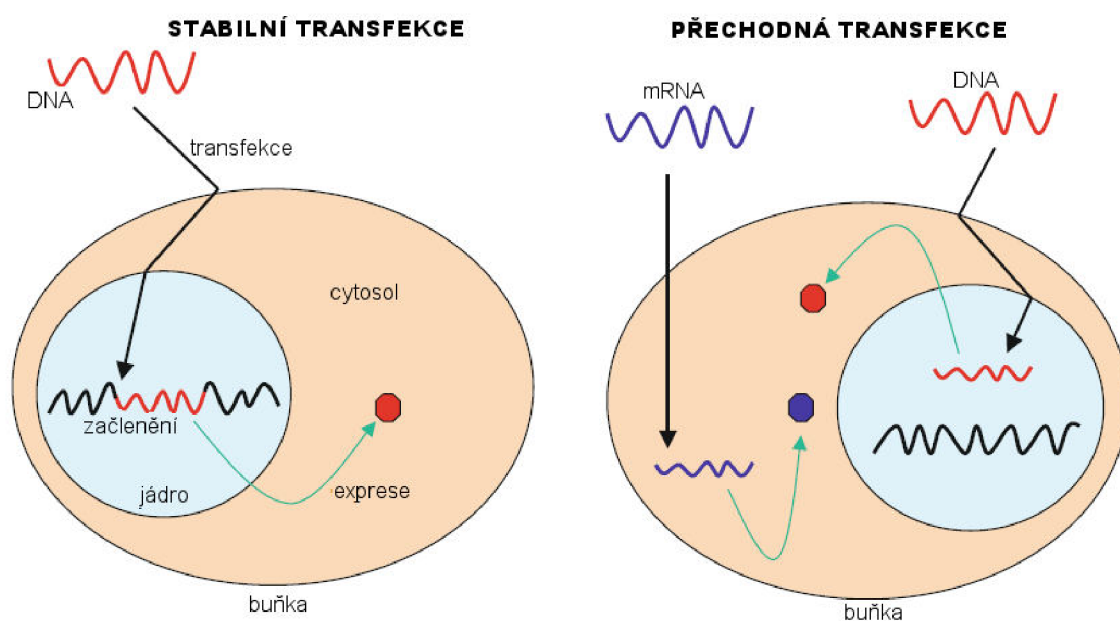
obr. 10: Buněčná linie HEK293 [33]

Linie HEK293 má široké využití v biomedicínském výzkumu. K jejich hojnému používání také přispívá jejich snadná kultivace, schopnost rychlého dělení a vysoké úspěšnosti transfekce. Používají se při výzkumech, u kterých není cílem sledovat chování samotné buňky, jako je studie účinků léků na sodíkové kanály, analýza interakcí mezi dvěma proteiny nebo výroba biologicky aktivních proteinů, které se špatně produkují v prokaryotických buňkách. Dále se také využívají k výrobě exogenních proteinů nebo virů pro farmaceutický a biomedicínský výzkum. Jejich nevýhodou ovšem je vcelku vysoká náchylnost k infekcím, takže je potřeba dražších kultivačních médií. [32][34]

3 TRANSFEKCE PLAZMIDOVÉ DNA

Transfekce je proces, který umožňuje vpravení nukleové kyseliny do savčích buněk. Tato metoda se používá k expresi rekombinantních proteinů a pomocí ní je také možné studovat funkci genů a genových produktů, protože je posílena nebo inhibována exprese specifického genu. Nukleová kyselina (DNA, plazmidová DNA nebo RNA) je do eukaryotní buňky nejčastěji zanesena v podobě vektorů. [35][36]

Podle druhu genetického materiálu existují dva druhy transfekce – stabilní a přechodná. Hlavní rozdíly mezi těmito druhy demonstruje obr. 11. Při stabilní transfekci je cizorodá nukleová kyselina vpravena do jádra eukaryotní buňky, kde se začlení do genomu hostitelské buňky a je předávána dceřiným buňkám. Na rozdíl od stabilní, u přechodné transfekce k začlenění DNA do genomu nedochází a vyskytuje se v buňce pouze po určitou dobu. Volba mezi typy transfekce závisí na potřebách daného experimentu. [35][37][38]



obr. 11: Stabilní (vlevo) a přechodná transfekce [35]

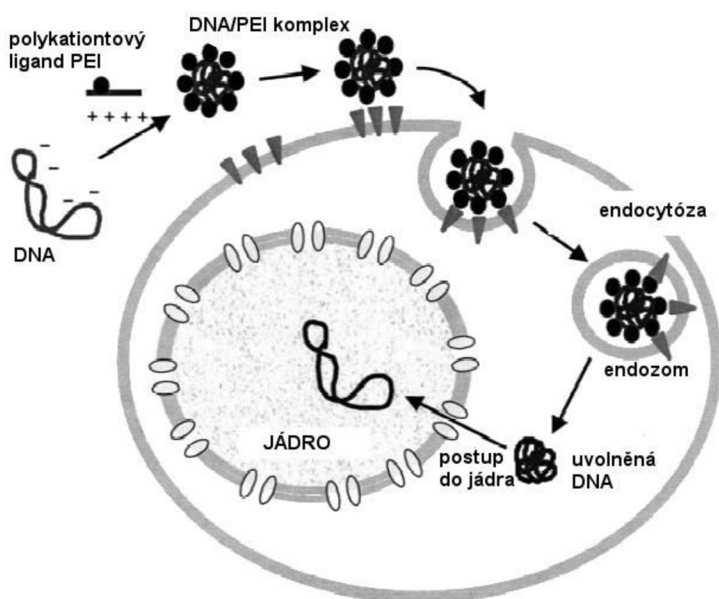
3.1 Používané transfekční metody

Transfekce do buněk může být uskutečněna několika metodami. Příslušná metoda se volí s ohledem na typ buněčné linie, účelu transfekce a účinnosti. Za ideální metodu je považována taková, která má vysokou účinnost transfekce, nízkou toxicitu a zároveň minimální účinky na fyziologii buňky. Také je potřeba, aby byla snadno použitelná a reprodukovatelná. Dělí se na biologické, chemické a fyzikální. [35]

Transfekce zprostředkovaná **biologickou metodou** se nazývá transdukce, kdy se do hostitelské buňky přenáší nejčastěji viry nebo fágové vektory. Tato metoda transfekce je nejužívanější pro svou vysokou efektivitu. Začlenění virové DNA do hostitelského genomu a jeho následná exprese je běžným jevem i bez lidského zásahu, takže je možné při této metodě využít přirozeného životního cyklu. Sjednocená DNA se replikuje do dceřiných buněk, čímž dochází ke stabilní transfekci transgenů. Nejčastěji se používají adenoviry a retroviry. [35]

Chemické metody transfekce se v současném výzkumu využívají nejvíce. Jejich podstatou je překonání záporného náboje lipofilní membrány buněk, následnému rozložení působením lysozomů a endozomů, uvolnění nukleové kyseliny do cytoplazmy a poté dopravení do jádra buňky, aby mohlo dojít k její expresi. Přesný postup překonání buněčné membrány není zcela objasněn, ale pravděpodobně probíhá za pomoci endocytózy a fagocytózy. Během transfekce se jako transfekční látky používají fosforečnan vápenatý, kationtové lipidy nebo kationtové polymery poly(L-lysin) a polyethylenimin (PEI). [35]

Zejména použití transfekčního činidla PEI je rychlé a má velmi vysokou účinnost transfekce, zároveň cena tohoto činidla je nízká. Tato metoda je výhodná pro adhezni buňky, a to obzvlášť při transfekci do buněčných linií HEK293 a CHO-S, kdy je úroveň exprimovaného proteinu nejvyšší s porovnáním s ostatními liniemi. PEI je stabilní kationtový polymer, který se naváže na přenášenou DNA. Tento celek má kladný náboj a váže se na aniontový povrch buněčné membrány, pak je endocytózou přenesen dovnitř buňky, kde v důsledku kladného náboje endozom zaniká, DNA se uvolňuje do cytoplazmy a dále postupuje do jádra buňky (obr. 12). [39][40][41]



obr. 12: Chemická transfekce s transfekčním činidlem PEI [41]

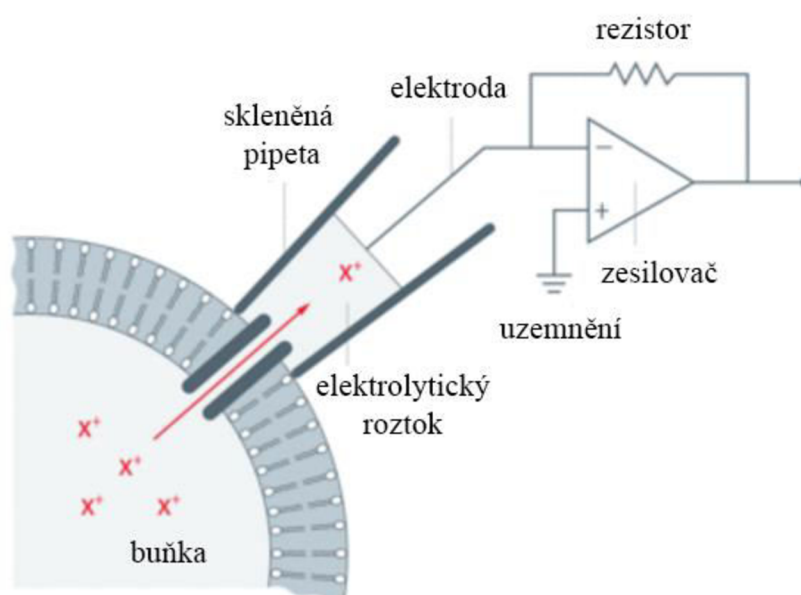
Efektivita chemických metod je závislá na několika faktorech jako je pH roztoku, stav buněčné membrány či chemický poměr přenášené nukleové kyseliny. Výhodou těchto metod je jejich nízká cytotoxicita a fakt, že nedochází k mutagenézím. [35]

Nejnovější **fyzikální metody** využívají k přenosu cizorodé nukleové kyseliny do buňky různé fyzikální nástroje. Těmito nástroji mohou být mikroinjekce, elektroporace, nástroje na bázi laseru či využívající magnetických částic, ultrazvuku nebo magnetického pole. Nejpoužívanější metodou je elektroporace, protože je relativně snadná, rychlá a za definovaných podmínek je schopna transfekovat velký počet buněk v krátké době.[35]

4 PATCH-CLAMP

Metoda *patch-clamp* umožňuje studovat vlastnosti buněk a změny napětí až na úrovni jednotlivých iontových kanálů. V české literatuře se může tato metoda vyskytovat pod pojmem metoda terčíkového zámku. Objev této techniky v druhé polovině sedmdesátých let přinesl posun především v neurovědě, kde je fyziologie iontových kanálů a měření změn membránového napětí jedním z hlavních předmětů výzkumu. Při měření metodou *patch-clamp* se využívají speciální skleněné mikroelektrody s velice úzkým průměrem, které se přisají k membráně buňky tak pevně, že nedochází téměř k žádnému úniku iontů. Takže jakákoliv změna, která je naměřena, musí projít přes měřenou část membrány. Materiál, přesný postup výroby a správné zacházení s mikroelektrodou je zásadní pro jakékoliv měření, protože při nesprávně provedené technice by mohlo dojít k popíchnutí buňky a tím k jejímu úmrtí. [1][42][43]

Princip metody (obr. 13) spočívá v izolaci úseku membrány. Pipeta obsahuje roztok, který je svým složením blízký intracelulárnímu roztoku. Při přiblížení mikroelektrody k povrchu membrány se mikromanipulátorem vyvine mírný přetlak, který pomůže vytvoření kontaktu pipety a membrány, ale zároveň tak, aby nedošlo k nežádoucímu porušení celkové struktury membrány, a tedy k narušení vnitřního prostředí buňky. Tento moment je zásadní pro úspěšné měření. Toto spojení se nazývá *seal* a vzniká vysoký odpor v řádech několika desítek $G\Omega$. Vytvoření takto vysokého odporu je klíčové, protože čím vyšší je odpor, tím větší je izolace membrány od mikroelektrody, a také protože odpor redukuje proudový šum při zaznamenávání kanálků, jejichž amplituda se pohybuje v řádu jednotek pA. [42]



obr. 13: Schéma metody patch-clamp pro měření jedním iontovým kanálem [43]

Odpor spojení je v porovnání s odporem membrány, který dosahuje hodnoty až 100 G Ω , nízký, a proto se podílí na tvorbě šumu pozadí a brání tak dobrému rozlišení malých proudů menších než 5 pA. Tento problém se vyskytoval u starších *patch-clamp* experimentů, kde odpor sealu byl menší než 100 M Ω . Později byla technika vytvoření spojení vylepšena. Při kontaktu špičky pipety s membránou dojde až k mírnému vchlípení membrány, která tak přilne ke sklu mikroelektrody, vznikne tím velmi těsné spojení *gigaseal*. Kvalita záznamu se několikanásobně zlepšila a umožnila studium kanálků nižší vodivosti. [1][42][43]

Gigaseal spojení lze dosáhnout za následujících podmínek:

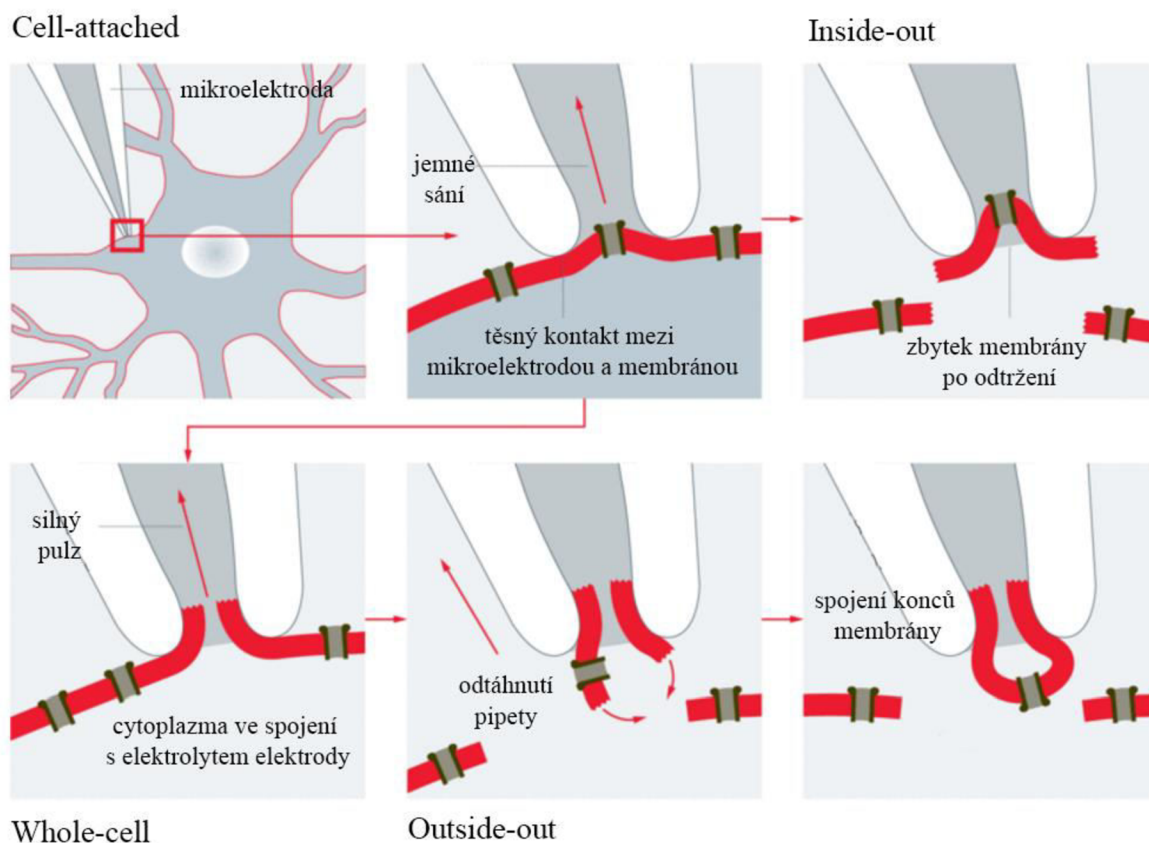
1. Povrch membrány je zcela čistý, neobsahuje mezibuněčnou hmotu či zbytky pojivové tkáně. Jsou preferovány buňky z tkáňové kultury, protože dospělé buňky je většinou potřeba očistit enzymy nebo mechanicky. [42]
2. Roztoky nesmí obsahovat prach a makromolekuly jakožto komponenty séra kultivačního média. Proto jsou roztoky filtrovány a buněčné kultury několikrát omyty, aby se odstranilo sérum. [42]
3. Hrot pipety je dokonale čistý, což zajišťuje očištění žářem při jejich výrobě. [42]
4. Před vyvinutím podtlaku pro vytvoření spojení se nejprve mírným přetlakem z mikroelektrody vypustí nepatrné množství roztoku, což odstraní případné nečistoty. [42]

4.1 Pracovní módy *patch-clamp*

Patch-clamp technika má pět pracovních módů – *cell attached* a z ní vycházející *inside-out* metoda, *whole-cell*, ze které vychází metody *outside-out* a *perforated patch*. U metod *inside-out* a *outside-out* dojde k odtržení membrány s měřeným úsekem od zbytku buňky, proto se označují jako *cell-free* techniky. [42][44]

V módu *cell-attached* (obr. 14 nahoře uprostřed) zůstává membrána neporušená a veškeré elektrické změny musí projít právě měřeným iontovým kanálem. Oproti tomu při metodě *whole-cell* (obr. 14 dole vlevo) dojde po kontaktu k protržení membrány krátkým silným pulzem a konce membrány jsou vtaženy dovnitř mikroelektrody, takže mikroelektroda je přímo propojena s cytoplazmou buňky. Slouží k měření membránových proudů z celé buňky jedním ze dvou režimů – *voltage-clamp* registrující proudové odezvy nebo *current-clamp* sloužící k záznamu změn membránového napětí. [1][42][43][44]

Při technice *inside-out* (obr. 14 nahoře vpravo) je po přilnutí k membráně mikroelektrodou jemně odtahováno, dokud nedojde k odtržení tohoto kousku membrány od zbytku buňky. Využívá se pro studium iontových kanálů řízených vnitrobuněčným ligandem. Výhodou je možnost snadno měnit koncentraci tohoto ligandu změnou externího roztoku. [42][44]



obr. 14: Metody patch-clamp [43]

Technika *outside-out* (obr. 14 dole vpravo) začíná jako technika *whole-cell*, tedy nejprve je porušena membrána, jejíž konce přilnou k elektrodě. Poté je tento kousek oddělen od zbytku membrány a jeho konce se spojí. Ve výsledku je vnější část membrány orientována vnějškem ven vůči vnitřku elektrody. Používá se ke studiu chování extracelulárních receptorů a opět s možností změny složení externího roztoku. [42][43]

Poslední používaná metoda *perforated-patch* se od metody *whole-cell* liší tím, že kontakt s vnitřním prostředím buňky není dosažen protržením membrány, ale tím, že roztok v pipetě obsahuje činidla vytvářející póry (obvykle antibiotika). Slouží k testování schopnosti difuze monovalentních kationtů. [43]

4.2 Skleněné mikroelektrody

Jak je uvedeno za začátku této kapitoly, pro správné měření technikou *patch-clamp* je důležité použití vhodných mikroelektrod. Existuje několik typů skleněných mikroelektrod lišící se svým průměrem a materiálem, z kterého jsou vyrobeny. Jsou to skleněné kapiláry s kuželovitě zúženým koncem z jedné strany a naplněné elektrolytem. [1][42]

Chemické složení skla použité k výrobě mikroelektrod má vliv na tvorbu *seal*. Problém může nastat s těžkými kovy, které se používají na snížení bodu tání. Kovy mohou uvolnit ionty do pipetového roztoku a ovlivnit chování měřené membrány. Nejčastěji používaným materiálem je borosilikátové sklo, které díky svým elektrickým vlastnostem snižuje šum pozadí. [42]

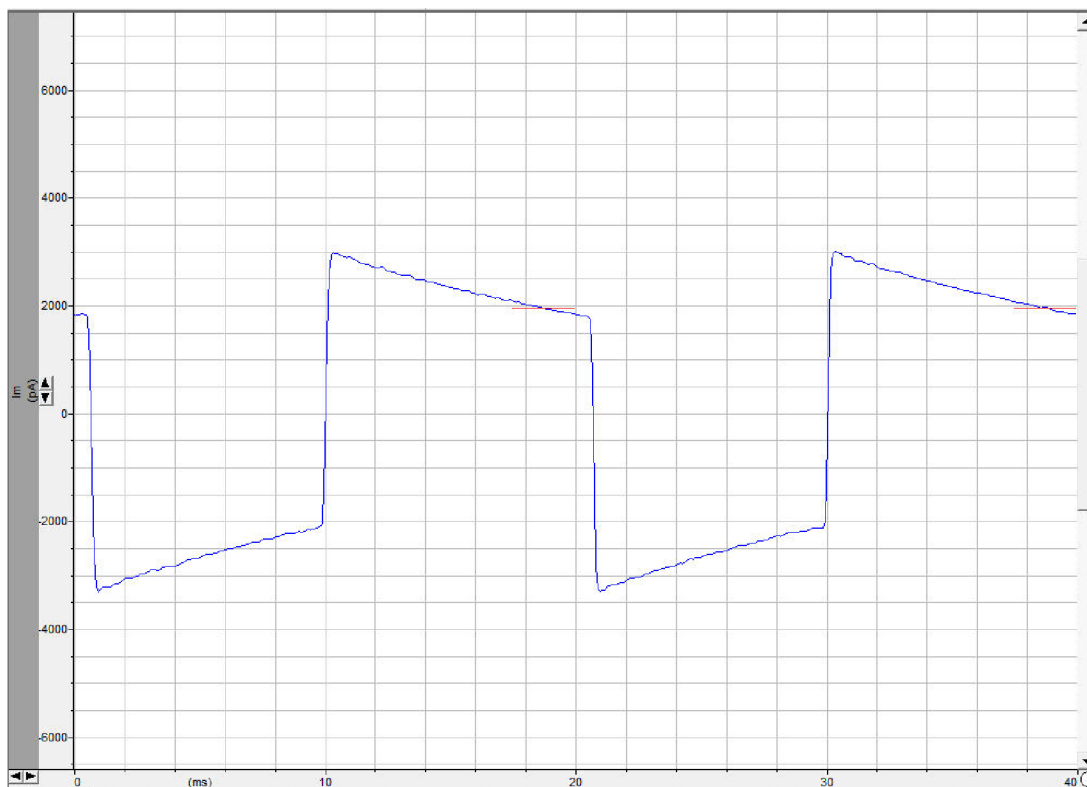
Do laboratoře, kde bude probíhat měření za pomoci techniky *patch-clamp*, se dodávají skleněné mikrokapiláry a samostatné zhotovení mikroelektrody probíhá až namísto, aby se tak předešlo případnému mechanickému poškození či znečištění špiček mikropipet. Výroba probíhá na tahači mikroelektrod s vyhřívaným platinovým drátkem. Skleněná trubička je zahřívána uprostřed až k bodu tání a poté jsou její konce tahány od sebe ve směru osy. Tento postup se opakuje alespoň dvakrát až dojde k přetržení. Tím vzniknou dvě identické mikrokapiláry. Kombinací doby a síly tahání s žhavicí teplotou se získávají kapiláry s různým průměrem. Po odtržení kapilár od sebe jsou zúžené konce zaleštěny žhavicím drátkem. [1][42]

Následně jsou mikroelektrody plněny elektrolytem, jehož složení závisí na cíli měření. Nejčastěji to bývají roztoky blízké svému složením k fyziologickému roztoku. Jako elektroda se používá nejčastěji tenký stříbrný drátek s povrchovou úpravou pomocí chloridu stříbrného, aby nedocházelo k polarizaci elektrody. [1]

Je-li mikropipeta poškozena, je zobrazovaný signál z výraznými hroty a vysokou amplitudou signálu. V takovém případě je potřeba vyměnit mikroelektrodu za novou. Signál z mikroelektrody, která je v pořádku, má přibližně obdélníkový průběh (obr. 15).

4.3 Využití *patch-clamp* techniky při měření membránového napětí fluorescenčními senzory

Patch-clamp technika se hojně využívá ke studiu fluorescenčních napěťových sond, kdy se jejich prostřednictvím mění membránový potenciál buňky a sleduje se změna fluorescenčních vlastností senzorů, které do nich byly přeneseny. [2]



obr. 15: Odezva mikroelektrody na 5 mV testovací puls

Ve studii St-Pierr a kol. [2] byl poprvé publikován senzor ASAP1. Pro studium vlastností této sondy exprimované buněčné linii HEK293A a disociovaných neuronech byl použit režim *whole-cell* s použitím *voltage-clamp* i *current-clamp*. V době měření byly buňky 2 dny po transfekci. Měření probíhalo za pokojové teploty 22 °C pomocí borosilikátových elektrod s odporem 2,5–5 MΩ napojených na zesilovač Axopatch 700B (Axon Instruments). Měření probíhalo při hodnotě výchozího *holding potential* (HP) -70 mV v rozmezí od -120 mV až po +50 mV po dobu 0,5 – 1 s. V každém kroku změny napětí buňky byl pořízen snímek, který byl následně zpracován v programovacím prostředí MATLAB. Bylo zjištěno, že s napětím jdoucím do kladných hodnot klesá intenzita fluorescence. Celková změna fluorescence z hodnoty napětí -120 mV na +50 mV byla o 44,4 % \pm 2,4 %. Změna z -100 mV na -70 mV byla -17,5 %. Rychlost odezvy na depolarizaci buněčné membrány byla $2,1 \pm 0,2$ ms a při opětovné repolarizaci $2,0 \pm 0,1$ ms. [2]

Studie Han a kol. [45] je zaměřena na membránovou napěťovou sondu ArcLight, ve které byl zkoumán vliv použitých VSD. Původně byly pro ArcLight navrženy VSD ze sumky trubičkovité (*Ciona intestinalis*). Ve studii byly testovány nové verze ArcLight s VSD z kura bankivského (*Gallus gallus*), drápatky vodní (*Xenopus laevis*), dánia

pruhovaného (*Danio rerio*), myši domácí (*Mus musculus*) a člověka (*Homo sapiens*). Všechny nové verze ArcLight byly transfekovány do buněčné linie HEK293 a do kultivovaných kortikálních neuronů myši. Pro experiment byla zvolena technika *patch-clamp* v módu *whole-cell*. Z HP -70 mV bylo membránové napětí buňky měněno pomocí *voltage-clamp* u buněk HEK293 a *current-clamp* u neuronů, kde byly akční potenciály vyvolané pomocí elektrických impulzů. Měření probíhalo při konstantní teplotě 33 °C mikroelektrodami s odporem 3–5 MΩ napojených na zesilovač Patch Clamp PC-505 B (Warner Instruments, CT). Snímky byly pořízeny při snímkové frekvenci 1000 snímků za sekundu. Bylo zjištěno, že ArcLight s VSD z kura a dánie má rychlejší odezvu na změnu napětí, ale změna intenzity fluorescenčních schopností není tak výrazná (8-9 %) jako u ArcLight s VSD ze sumky (~ 35 %). Vykazují ovšem lepší schopnost zaznamenávat akční potenciály o vyšších frekvencích u kultivovaných neuronů. Rychlost odezvy na depolarizaci buněčné membrány byla ~ 4 ms (kur) a ~ 6ms (dánie), při opětovné repolarizaci ~ 9 ms (kur) a ~ 8ms (dánie). Pro porovnání ArcLight s VSD ze sumky reaguje rychlostí ~ 10 ms na depolarizaci a ~ 20 ms na repolarizaci. Ostatní verze ArcLight měly odezvu pomalejší, než původní verze anebo jejich signály byly velmi malé. Sonda na bázi drápatky měla velkou změnu optických vlastností (-38 % ± 1 %), ale velmi pomalou (~ 11 ms a ~ 155 ms). Senzor s VSD z člověka měl nižší (-2 % ± 1 %) a pomalejší změnu fluorescence (oboje ~ 70 ms). Poslední zkoušená verze s VSD z myši neměla žádnou detekovatelnou změnu na 100mV depolarizaci. [45]

Studie Mishina a kol. [46] je zaměřena na nové verze senzoru s odlišnou strukturou, kdy VSD je sevřena mezi dva fluorescenční proteiny (nazývané *VSP-Butterflies*), byly použity modifikované – chimérické VSD ze sumky (*Ciona intestinalis*), protože vykazují rychlejší odezvu. Takto upravené sondy byly exprimovány do buněčných linií PC12 a HEK293. Experimenty byly realizovány 2 až 3 dny po transfekci. Byla použita technika *patch-clamp whole-cell* s použitím *voltage-clamp* v kombinaci s dvoj-emisní mikrofluorometrií. Měření probíhalo při teplotě 32–34 °C borosilikátovými mikroelektrodami s odporem 3–5 MΩ připojeným na zesilovač Axon 700 B Multiclamp (Molecular Devices). Pro testování napěťové závislosti jednotlivých struktur byly buňky z HP -70 mV drženy po dobu 500 ms pod napětím od -140 mV do +120 mV s krokem 20 mV. Změna fluorescenčních vlastností se pohybovala mezi 12,7 a 15,2 % ± 0,7 %. Ve studii se také zabývali měřením modifikovanou sondou v kortexu žijících myši. [46][47][48]

Fluorescenční napěťový senzor na bázi mikrobiálního rhodopsinu Archaerhodopsin 3 (Arch) byl publikován ve studii Maclauri a kol. [49]. Hlavním předmětem této studie bylo zjistit jaké stavy rhodopsinu jsou fluorescenční, akceptovatelné proteinem a jaká je jeho fotostabilita. Nejprve byl senzor amplifikován v buňkách *E. coli* a následně transfekován do buněčné linie HEK293. Režim *patch-clamp whole-cell voltage-clamp* byl použit v kombinaci s fluorescenční spektroskopií. Byla zkoumána nejlepší odezva sondy na různé vlnové délky, jiné intenzity osvětlení a s odlišným počátečním HP. Všechny výsledky jsou průměrem 80 měření. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Osvětlení oranžovým nebo červeným světlem vyvolá u sondy fluorescenci s emisním spektrem blízké infračervenému spektru, s maximem 710 nm. Změna intenzity fluorescence při změně napětí z -150 mV na +150 mV měla nejvýraznější odezvu na osvětlení vlnovou délkou 640 nm s rychlostí ~ 0,6 ms. [49]

Nové variace sondy na bázi mikrobiálního rhodopsinu Archaerhodopsin 3 (Arch) publikuje studie Flytzanis a kol. [50]. Nové variace reagují tři až pětkrát vyšší změnou intenzity fluorescence na světlo o vlnové délce 655nm. Nejvíce fluorescenční varianta Archer1 má změnu intenzity o 25–40 % při odpovědi na změnu membránového napětí při použití devětkrát nižší intenzity světla v porovnání s ostatními sondami Arch. Studie je zaměřena na měření buněk hipokampu krysy *in vitro*, kde využívají metodu *patch-clamp*, a také na buňkách hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*) *in vivo*. Měření neurálních buněk krysy bylo realizováno 2 a více dní po transfekci za použití režimu *whole-cell* při pokojové teplotě mikroelektrodami z borosilikátového skla s odporem 2–5 MΩ. Pro experiment byl použit zesilovač Multiclamp 700B (Molecular Devices), Digidata převodník (Molecular Devices) a počítačový software pro generaci elektrických impulzů a nahrávání pClamp verze 10.4 (Molecular Devices). Při *voltage-clamp* režimu byl HP -70 mV a napětí měřeno s krokem 10 mV od -100 mV do +50mV. Pomocí *current-clamp* režimu byly generovány dlouhé (10-200 pA po 0,8 s) a krátké (100-500 pA po 2-10 ms) akční potenciály. [50]

Technika *patch-clamp* se také využívá ke studiu kardiomyocytů diferenciovaných z lidských pluripotentních kmenových buněk, kde fluorescenční napěťové sondy pomáhají k jejich rychlejší fenotypizaci. U kardiomyocytů je záznam elektrické aktivity velice náročný. Také spousta senzorů membránového napětí má vysokou fototoxicitu, která poškozuje buňky a zhoršuje kvalitu signálu. Touto problematikou se zabývá studie Herron a kol. [52], která jako senzor používá napěťová barviva ANEPPS. Oproti tomu studie Leyton-Mange a kol. [53] používá fluorescenční sondu ArcLight, která

zaznamenává přesněji změny membránového potenciálu. Díky tomu je tato aplikace výkonnější, vhodnější pro neinvazivní, nedestruktivní sériovou fenotypizaci populací kardiomyocytů i pro screening kardiotoxicity vyvolané léky. V práci byla použita metoda *patch-clamp whole-cell* s teplotou lázně 37 °C za pomoci elektrod s odporem 2-5 MΩ. Nahrávání bylo filtrováno nízko pásmovou zádrží na 5 kHz zesilovačem Axopatch 200B (Axon Instruments) a digitalizováno při 10 kHz pomocí převodníku Digidata 1440A (Axon Instruments). Z výchozího potenciálu -90 mV byly záznamy depolarizovány po 1 s na 60, 40, 20, 0, -20, -40, -60 a -80 mV s jedním mezikrokem na -90 mV mezi jednotlivými kroky. Tento způsob měření byl založen na dříve získaných záznamech doby trvání akčního potenciálu v lidských buňkách z komor srdce v práci Lou a kol. [54]. Následující zpracování získaných snímků bylo provedeno pomocí softwaru NeuroPlex (RedShirtImaging) k prohlížení sekvencí obrazů a k získání průměrné fluorescence. Data o dynamice sondy byla získána pomocí softwaru Clampfit (Axon Instruments). Pro statistické zhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový t-test a Mann-Whitneyho U test. [52][53][54]

Ze studie vyplývá, že barviva ANEPPS jsou vhodná pro krátkodobé testy (kvůli vysoké fototoxicitě), kde je vyžadována rychlá odezva na změnu membránového potenciálu. Při měření ArcLight senzorem se objevila určitá omezení pro použití. Zprvée fluorescence signály vykazují relativní, ne absolutní, membránové potenciály. Také časová odezva vede ke ztrátě vysokofrekvenčních prvků, což způsobuje malé, ale systematické nadhodnocení doby trvání akčního potenciálu. Dalším limitujícím faktorem je manipulace se samotnou sondou a její zavedení do buněk. Na druhou stranu tento fakt přináší i velkou výhodu použití ArcLight. Je-li sonda jednou zavedena nevyžaduje další manipulaci, a proto je vhodné ji použít pro choulostivé vzorky. Vzhledem k její vyšší fotostabilitě je vhodná pro dlouhodobé i sériové záznamy. [53]

Ve studii Lioa et al. [55] byl publikován experiment monitorující elektrickou aktivitu jak izolovaných srdečních myocytů, tak celého srdce a také funkčnost a zralost kardiomyocytů z pluripotentních kmenových buněk. Pro studii byl využit fluorescenční protein 2.3 (VSFP2.3) a buňky ze srdce myši *in vitro* i *in vivo*. Použití geneticky kódovaných napěťových senzorů má obrovskou výhodu pro tyto experimenty kvůli své neinvazivnosti a nízké toxicitě. *Patch-clamp* technika byla aplikována na izolované kardiomyocyty v režimu *whole-cell*. Bylo zachycováno tyrkysové a žluté fluorescenční záření pomocí 2 fotozesilovacích trubic napojených na Optoscan systém (Cairn Research). Při *voltage-clamp* režimu byl nastaven HP na -70 mV a 100 ms kroky

po 10 mV v rozsahu od -100 mV do +50 mV. V *current-clamp* režimu byly modelovány 2 nA/2 ms elektrické impulzy při 1 Hz. Také byly na izolovaných myších kardiomyocytech simulovány předem nahrané akční potenciály získané z kardiomyocytů kmenových buněk lidského embrya (hESC) a ze svalových buněk lidské levé srdeční komory. Experiment probíhal ve *voltage-clamp* režimu pro vyhodnocení odpovědi fluorescenčního proteinu 2.3 na lidské akční potenciály. Bylo prokázáno, že fluorescenční vlastnosti VSFP2.3 exprimovaného v izolovaných vyzrálých kardiomyocytech jsou podobné, jako byly naměřeny na PC12 buňkách a kortikálních neuronech obsahujících stejný fluorescenční protein. Tedy intenzita fluorescence CFP klesá, a naopak u YFP se zvyšuje při depolarizaci membrány. [55][56][57]

5 EXPERIMENTÁLNÍ STUDIUM VLASTNOSTÍ SENZORU ASAP1

Praktická část práce se věnuje vybranému senzoru ASAP1, který byl exprimován v buněčné linii HEK293. Byla zvolena transientní chemická transfekce pomocí polyethyleneiminu, zejména pro svoji vysokou účinnost. Transfekční efektivita byla ověřena pomocí fluorescenční mikroskopie.

Poté se pomocí využití techniky *patch-clamp* v režimu *whole-cell* snímala buňka, která pod různým napětím vykazovala odlišnou intenzitu fluorescence. *Holding potential* byl -80 mV. Měření probíhalo pro hodnoty membránového napětí v rozmezí od -120 mV po +40 mV s krokem 10 mV. Následně byly získané snímky analyzovány v programovacím prostředí MATLAB. Podrobnější postup experimentu je rozepsán v následujících podkapitolách.

5.1 Kultivace a transfekce buněk HEK293

Buňky HEK293 byly 24-48 hodin před transfekcí nasazeny na petriho misky s povrchem 9,2 cm² v hustotě 5×10⁴/ml. Bylo přidáno 2 ml kultivačního média DMEM s 10% FBS, 1% penicilinu/streptomycinu a 1% L-Glutamine. Kultivační médium bylo po 24 hodinách vyměněno za čerstvé. Kultivace probíhala za standartních podmínek při 37°C a atmosféře obsahující 5 % CO₂ pro dosažení optimální konfluencie a morfologie.

Pro přípravu transfekčního mixu bylo použito 110 µl 150 mM NaCl, ve kterém byla rozpuštěna DNA s výslednou koncentrací 1,27 µg/ml. Následně byl přidán transfekční reagent PEI s výslednou koncentrací 4 µl/ml. Směs byla poté inkubována 10 min při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo původní kultivační médium nahrazeno čerstvým, obsahujícím transfekční mix. Buňky byly poté inkubovány 48 hodin při 37°C a 5% CO₂ v atmosféře, kultivační médium bylo opět obnoveno po 24 hodinách.

5.2 Patch-clamp

Pro experiment byly zvoleny mikroelektrody z borosilikátového skla, které byly zhotoveny z dodávaných mikrokapilár (World Precision Instruments, Inc.) na tahači mikroelektrod (DMZ Universal Puller). Tahací program byl zvolen P(A)50 s druhou teplotou 675 °C. Následně byly hroty mikroelektrod *polishovány* žhavicím drátkem. Mikroelektrody měly odpor 1,8–2,4 MΩ. Mikroelektroda byla naplněna

pipetovým roztokem ze sloučenin s následujícími koncentracemi (v mmol): 4 NaCl, 120 KCl, 4 MgCl₂, 4 CaCl₂, 5 HEPES, 10 EGTA a 3 Na₂ATP. Osmolarita tohoto roztoku byla 280 mOsm a pH 7,2.

Elektrody byly plněny pomocí injekční stříkačky s mikrofilamentem, tak aby nevznikla bublina, která snižuje amplitudu přijímaného signálu. Tím vznikají chyby v měření. Bublin se lze zbavit jemným pohybem mikrofilamenta, opatrným přejetím na stěně mikroelektrody vroubky pinzety. Další možností je mírný přetlak po připojení na mikromanipulátor.

Po vyjmutí buněk z inkubátoru bylo odstraněno médium a přidány přibližně 2 ml koupelového roztoku s osmolaritou 304 mOsm, pH 7,4 a se složením ze sloučenin s koncentracemi (v mmol): 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES a 10 D-Glucose. Oba roztoky byly vyhřátý na 37 °C.

Mikroelektroda byla připojena na hlavici HEADSTAGE CV 203BV (Axon Instruments) mikromanipulátoru MP-225 (Sutter Instruments), zesilovač Axopatch 200B (Axon Instruments) a převodník Digidata 1440A (Axon Instruments). Následně byl signál v počítači zobrazen v softwarovém prostředí Clampex 10.4 (Axon Instruments). Poté byla mikroelektroda ponořena do vodní lázně s adherovanými buňkami.

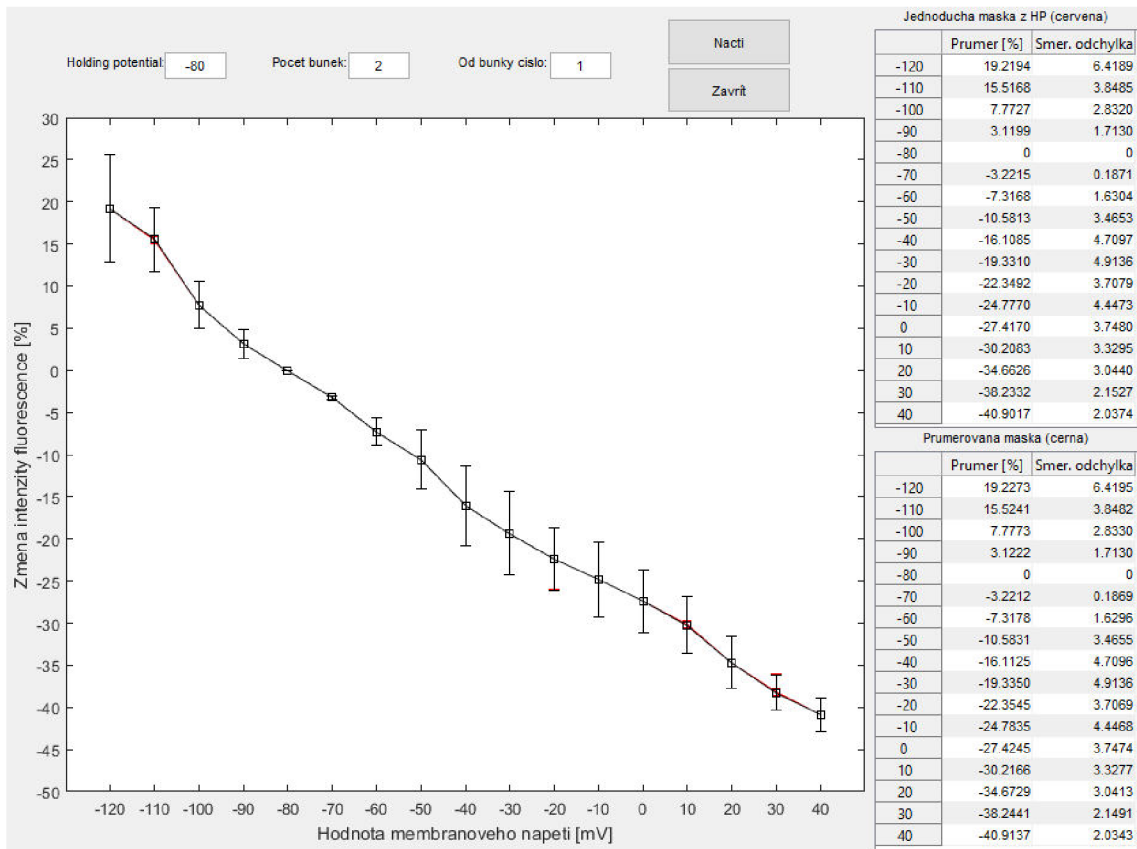
Před měřením byla nejdříve vyhledaná buňka s fluorescenčními vlastnostmi pomocí přepínání mezi světlym a fluorescenčním polem mikroskopu Olympus IX73. Měřená buňka by neměla být součástí shluku buněk, což by mohlo ovlivnit vytvoření *gigaseal*. V softwaru byl nastaven režim *Bath* a pomocí manipulátoru pohybem ve všech třech osách byla mikroelektroda posunuta do středu buňky. Poté pohybem ve směru osy z byla buňka mírně stlačena, dokud se amplituda signálu nezmensila přibližně o jednu třetinu a vyvinutím podtlaku byl vytvořen *gigaseal*. Při vytvoření *gigaseal* byl software Clampex přepnut do režimu *Patch* a amplituda signálu byla nulová.

Nastavil se požadovaný výchozí HP postupnými kroky po 10 mV na -80 mV. Pro dosažení pracovního módu *whole-cell* byl dále vyvíjen podtlak, až došlo k otevření buněčné membrány. Signál měl opět amplitudu, tentokrát s rychlým nástupem a pozvolným sestupem. Na zesilovači se při správném otevření buňky a *seal* v řádu GΩ objevila hodnota -40 mV, což odpovídalo vnitřnímu napětí buněk HEK293 [58].

Software se přepnul do režimu *Cell*. Fotoaparátem Nikon D3100 byla pořízena fotka při nastavením HP -80 mV. Doba expozice jedné fotografie byla 2 s, ISO 100, zvětšení mikroskopu 40x. Nejdříve byly pořízeny snímky při hyperpolarizaci do -120 mV s krokem 10 mV a poté snímky při depolarizaci membrány z výchozího HP až po +40 mV se stejným krokem.

5.3 Analýza dat

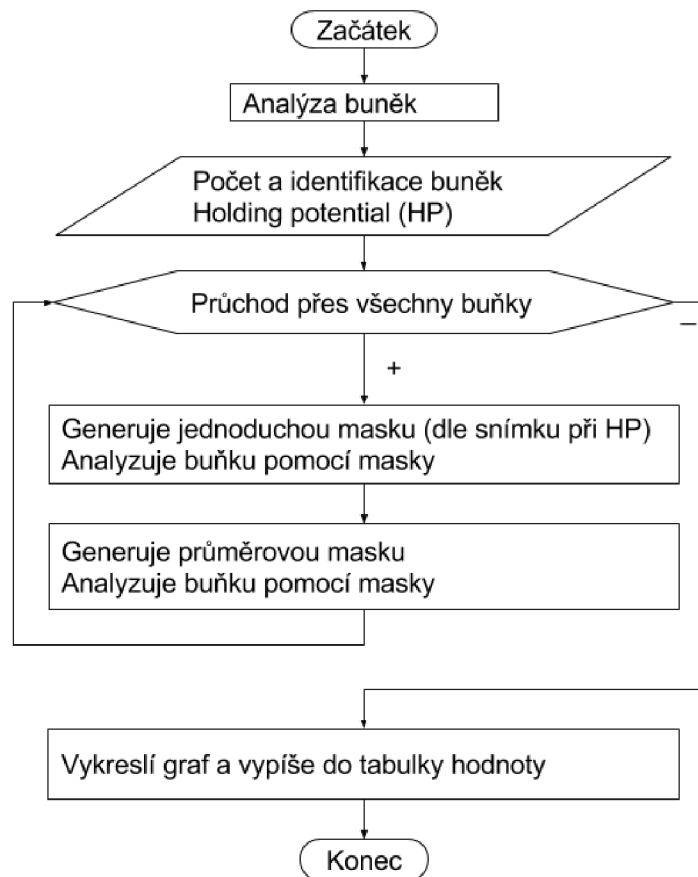
Analýza dat byla zrealizována pomocí programovacího prostředí MATLAB. Pro snadnou a rychlou analýzu bylo vytvořeno grafické uživatelské rozhraní (GUI). Na obr. 16 je zobrazeno GUI po spuštění.



obr. 16: GUI pro analýzu změny intenzity fluorescence

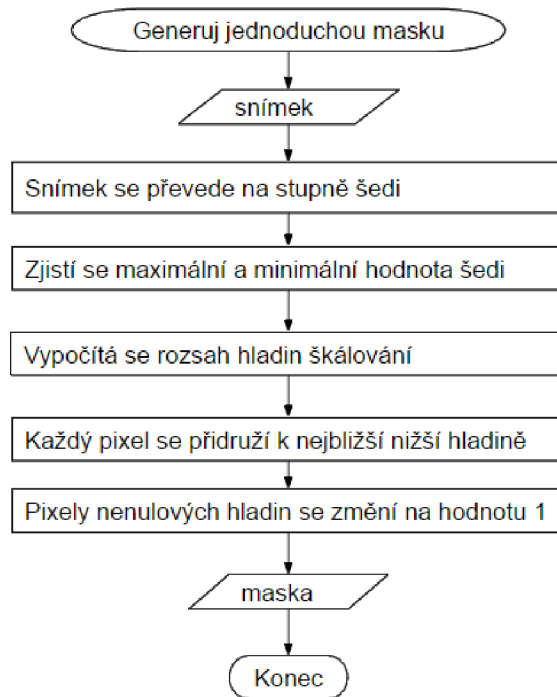
Pro správné načtení byly snímky přejmenovány. Předpona X- (01-, 02-, 03-, ...) označuje číslo buňky. Následuje označení hodnoty membránového napětí, při kterém byl snímek pořízen (-120, -110, ... 0, 10, 20, 30, 40) a koncovka *.jpg*. Pro správnou funkci programu musí být všechny snímky všech buněk, které mají být analyzovány ve stejné složce jako program.

V programu lze nastavit výchozí HP měřených buněk, počet buněk, které mají být analyzovány, a číslo buňky, od které mají být buňky analyzovány. Tlačítkem *Nacti* se provede analýza všech zadaných snímků. Program pracuje s obrázky převedených do šedotónové stupnice. Výstupem je graf a tabulky zobrazující procentuální změnu intenzity fluorescence vzhledem k intenzitě při HP. V obou případech je zobrazena i směrodatná odchylka. Hodnoty v tabulkách jsou uvedeny v % s přesností na 4 desetinná místa. Vývojový diagram pro celý program je uveden na obr. 17.

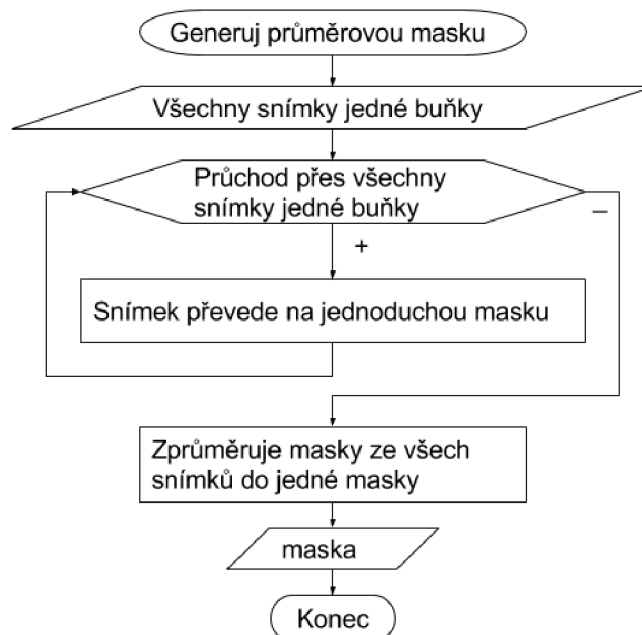


obr. 17: Vývojový diagram použitého programu

Pozadí bylo odstraněno pomocí aplikace masky. Nejdříve byla zjištěna maximální a minimální hodnota šedi. Snímek byl rozdělen na hladiny a hodnota každého pixelu byla přiřazena do nejbližší nejnižší hladiny. V nulové hladině se nacházely pixely pozadí a tím pádem neovlivnily následující analýzu. Byly zvoleny 2 typy masky – jednoduchá a průměrovaná. Jednoduchá maska byla vytvářena ze snímku s HP a pak aplikovaná na všechny snímky jedné buňky. Průměrovaná maska byla vytvořena pro každý snímek jedné buňky zvlášť a následně zprůměrována. Tato zprůměrovaná maska aplikována na všechny snímky jedné buňky. Vývojový diagram pro generování jednoduché masky znázorňuje obr. 18, obr. 19 pro masku průměrovanou.



obr. 18 Vývojový diagram pro výpočet jednoduché masky



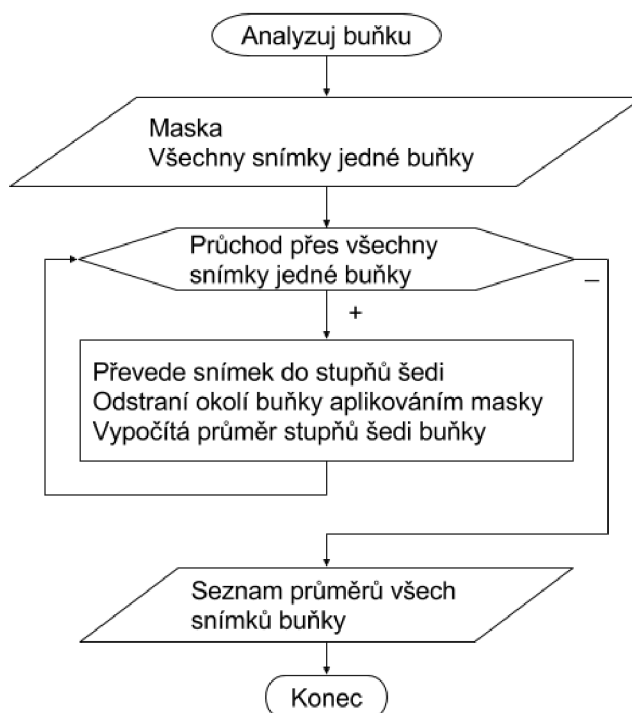
obr. 19: Vývojový diagram pro výpočet průměrované masky

Na obr. 20 je ukázka jedné jednoduché masky, která je aplikovaná na buňku. Masky vždy obsahovala jen nulové hodnoty pro pozadí a všechny nenulové hodnoty mají hodnotu 1. Pro snadnější viditelnost masky, byly v tom to obrázku hodnoty 1 převedeny na stupeň šedi 255.



obr. 20: Ukázka jednoduché masky

Další analýza proběhla podle průměrného stupně šedi ze snímku (obr. 21). Průměry ze všech buněk pro jednotlivé hodnoty membránového napětí se zprůměrovaly. Hodnoty byly standardizovány vzhledem k hodnotě ze snímku s HP. Změna intenzity fluorescence ve snímku s HP je nulová.

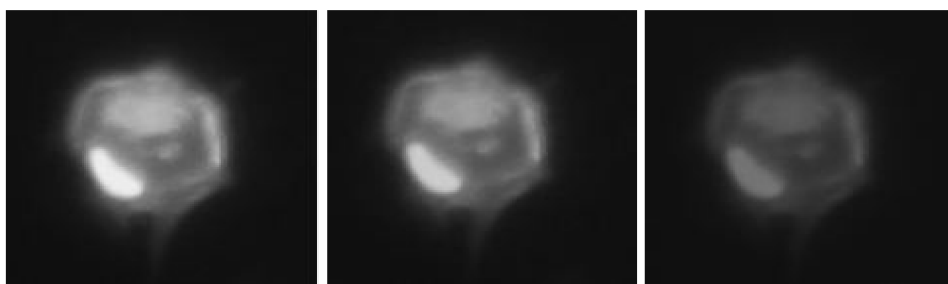


obr. 21: Vývojový diagram pro analýzu průměrného stupně šedi ve snímku

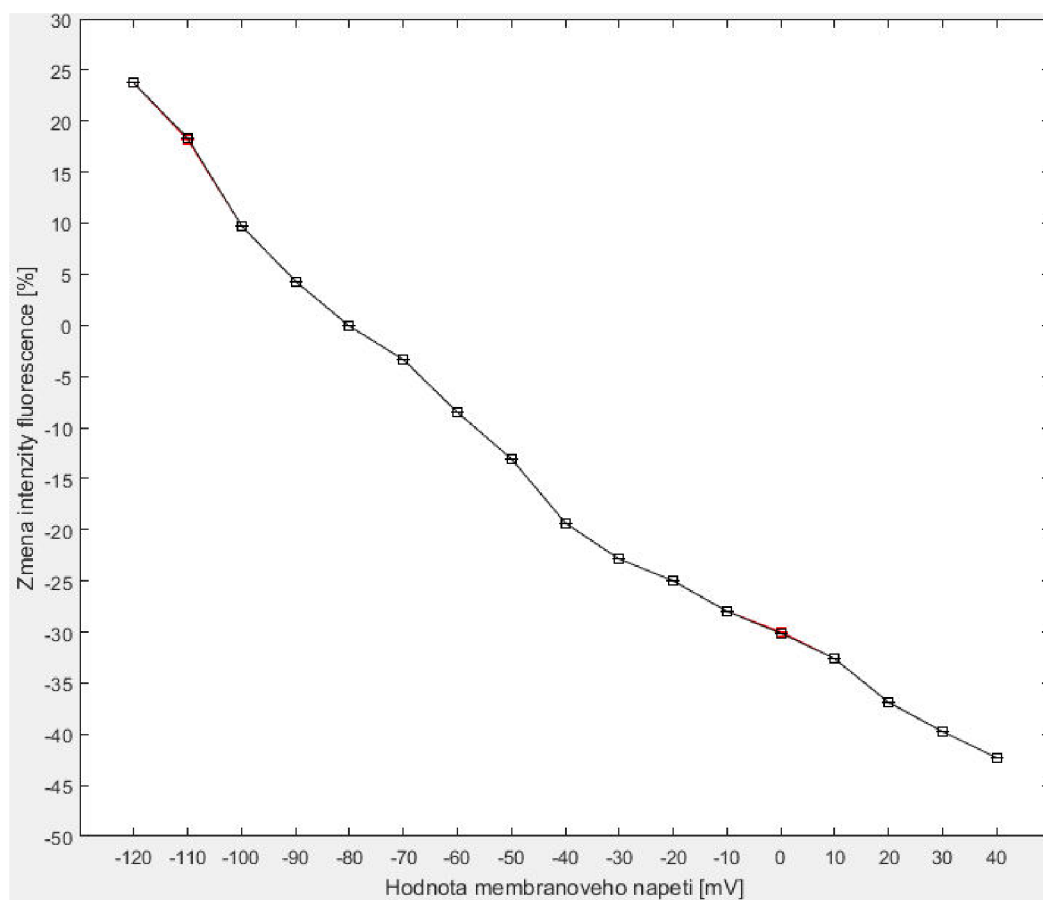
Následně byla vypočítána směrodatná odchylka pro hodnoty při jednotlivých membránových napětí. Do grafu byla vynesena „zprůměrovaná“ průměrná hodnota jasu i směrodatná odchylka. Hodnoty získané z jednoduché masky byly vykresleny červeně, hodnoty z průměrované masky černě.

6 DISKUZE VÝSLEDKŮ

Snímky jedné buňky převedené do šedotónové stupnice znázorňuje obr. 23. Na obrázku je vidět, že buňka je při hyperpolarizaci (membránový potenciál -120 mV) zářivější než buňka držená na HP. Naopak při depolarizaci (membránový potenciál +40 mV) vykazuje buňka fluorescence ve srovnání s buňkou při HP nižší úroveň fluorescence.



obr. 22: Ukázka snímku buňky při různých hodnotách napětí převedena do šedotónové stupnice (vlevo hodnota napětí -120 mV, uprostřed HP -80 mV, vpravo +40mV)

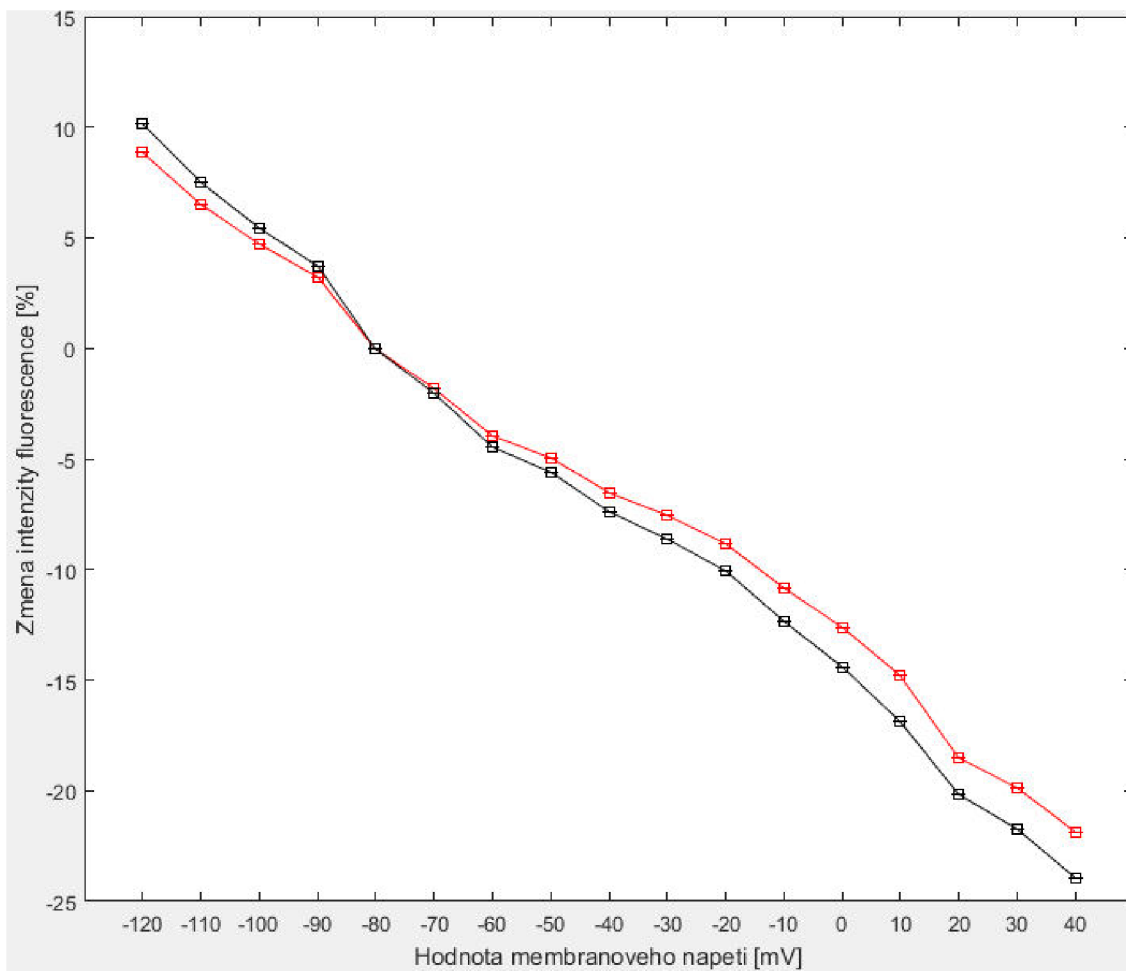


obr. 23: Graf změny intenzity fluorescence pro 1 buňku

tab. 1: Hodnoty změny intenzity pro jednu buňku

Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]		Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]	
	Jednoduchá maska	Průměrovaná maska		Jednoduchá maska	Průměrovaná maska
-120	23,7582	23,7666	-30	-22,8054	-22,8095
-110	18,2381	18,2452	-20	-24,9711	-24,9756
-100	9,7752	9,7805	-10	-27,9217	-27,9279
-90	4,3311	4,3335	0	-30,0673	-30,0743
-80	0	0	10	-32,5626	-32,5697
-70	-3,3537	-3,3534	20	-36,8151	-36,8234
-60	-8,4696	-8,4701	30	-39,7554	-39,7637
-50	-13,0316	-13,0336	40	-42,3423	-42,3522
-40	-19,4388	-19,4427			

Z grafu a tabulek udávajících naměřené hodnoty změny fluorescence jednotlivých buněk je vidět, že buňky, které mají vyšší intenzitu fluorescence, tzn. mají více exprimovaného plazmidu ASAP1, tedy jejich nestandardizovaný průměr jasů v obrázku je vyšší, se výpočty změny intenzity jednoduchou a průměrovanou maskou téměř neliší, maximálně o pár setin procenta. To je znázorněno v tab. 1, kde jsou zvýrazněny hodnoty, u kterých lze odlišnost pozorovat i na grafu (obr. 23). Intenzivněji zářící buňky mají ostřejší přechod mezi buňkou a pozadím, což má vliv na vytvoření masky. Pro buňky, které mají méně exprimovaného plazmidu ASAP1, dochází k rozdílu mezi maskami v řádu jednotek procent (obr. 24, tab. 2). Největší rozdíl je při napětí +40 mV 2,13 %, při hodnotě napětí +10 mV je rozdíl ve výpočtu o 2,1 %. Je to dáno tím, že jednoduchá maska je ovlivněna více šumem pozadí (obr. 25).



obr. 24: Graf pro buňku obsahující méně exprimovaného plazmidu

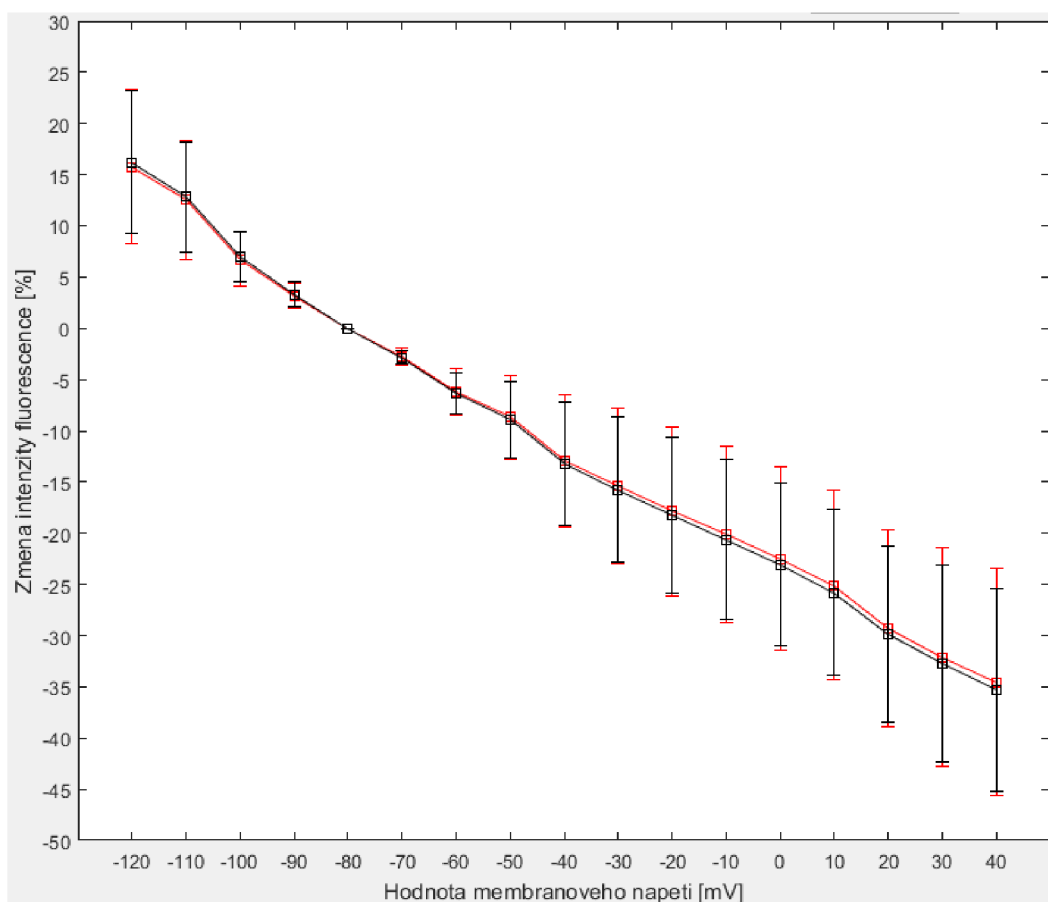
tab. 2: Hodnoty změny intenzity pro buňku obsahující méně exprimovaného plazmidu

Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]		Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]	
	Jednoduchá maska	Průměrovaná maska		Jednoduchá maska	Průměrovaná maska
-120	8,8656	10,1922	-30	-7,5676	-8,6023
-110	6,4937	7,4756	-20	-8,8058	-10,0220
-100	4,7238	5,4449	-10	-10,8282	-12,3409
-90	3,2274	3,7309	0	-12,6385	-14,4151
-80	0	0	10	-14,7893	-16,8800
-70	-1,7927	-2,0523	20	-18,5419	-20,1867
-60	-3,9739	-4,4856	30	-19,8924	-21,7338
-50	-4,9494	-5,6032	40	-21,8589	-23,9886
-40	-6,5356	-7,4207			



obr. 25: Jednoduchá maska (vlevo) a průměrovaná maska (vpravo) pro buňku obsahující méně exprimovaného plazmidu

Procentuální změna intenzity fluorescence všech buněk i se směrodatnou odchylkou je znázorněna na obr. 26. Červeně jsou vykresleny hodnoty získané aplikací jednoduché masky a černě hodnoty získané aplikací průměrované masky. Získané hodnoty jsou uvedeny v tab. 3.



obr. 26: Graf změny intenzity fluorescence v jednotlivých hodnotách membránového napětí (hodnoty získané aplikací jednoduché masky – červeně, průměrované – černě)

tab. 3: Hodnoty procentuální změny intenzity při jednotlivých membránových napětích a směrodatná odchylka pro obě aplikované masky

Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]		Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]	
	Jednoduchá maska	σ		Průměrovaná maska	σ
-120	15,7681	7,5056	-120	16,2156	6,9149
-110	12,5091	5,8774	-110	12,8413	5,3849
-100	6,7564	2,6662	-100	6,9998	2,4138
-90	3,1557	1,2129	-90	3,3251	1,2612
-80	0	0	-80	0	0
-70	-2,7452	0,8354	-70	-2,8316	0,6877
-60	-6,2025	2,2481	-60	-6,3738	2,0004
-50	-8,7040	4,0714	-50	-8,9231	3,7777
-40	-12,9175	6,4527	-40	-13,2152	6,0227
-30	-15,4099	7,6287	-30	-15,7575	7,1041
-20	-17,8347	8,2471	-20	-18,2437	7,5873
-10	-20,1274	8,6456	-10	-20,6360	7,8418
0	-22,4909	8,9345	0	-23,0880	7,9647
10	-25,0686	9,2082	10	-25,7711	8,0514
20	-29,2890	9,5530	20	-29,8441	8,6356
30	-32,1196	10,6979	30	-32,7406	9,6526
40	-34,5541	11,0883	40	-35,2720	9,8771

Ze získaných výsledků vyplývá, že při hyperpolarizaci buněčné membrány intenzita fluorescence roste. Při napětí -120 mV je změna intenzity o 16,22 % \pm 6,9 % oproti zářivosti při HP. Při depolarizaci membrány intenzita fluorescence téměř lineárně klesá. Při napětí +40 mV je pokles záření o -35,27 % \pm 9,88 %. Celková změna intenzity z -120 mV na +40 mV je 51,49 %. Uvedená procentuální změna je brána z analýzy s aplikací průměrované masky, protože jak bylo řečeno výše, je přesnější pro všechny buňky.

Analýza dat pomocí obou masek se liší v řádu desetin procent. Největší odlišnost je při hodnotě napětí +40 mV o 0,72 %. Výpočet průměrované masky je \sim 30x delší, ale výpočet se stále pohybuje v řádech desetin s.

ZÁVĚR

Tato práce se zabývá problematikou membránových napěťových senzorů, které pomáhají pochopení chování a funkce buněčných populací monitorováním vzniku a šíření akčních potenciálů. Práce se zaměřuje na fluorescenční sondu ASAP1, která je považována za jednu z nejvíce efektivních sond. U senzoru ASAP1 byly sledovány vlastnosti při změně membránového napětí buňky z buněčné linie HEK293.

Jelikož fluorescenční sondy jsou plazmidy, musejí být transfekovány do buněk, kde mohou být exprimovány. První část této práce se proto věnuje kultivaci buněk se zaměřením na buněčnou linii HEK293. Dále je zde popsána teorie transfekce plazmidů. Blíže je diskutována transienční chemická transfekce s pomocí polymeru polyethyleniminu, která byla zvolena v daném experimentu především pro svoji vysokou účinnost. Je zde také popsána elektrofyziologická metoda patch-clamp, na které je založena experimentální část práce.

Praktická část práce upřesňuje okolnosti pro dosažení optimální konfluencie a morfologie během kultivace a také dodržené podmínky při transfekci buněk. Pracovním módem pro techniku *patch-clamp* byl zvolen *whole-cell s holding potential* -80 mV. Experiment probíhal při změnách membránového napětí v rozmezí od -120 mV po +40 mV s krokem 10 mV. V jednotlivých změnách membránového napětí byl pořízen snímek pro vyhodnocení. Pro analýzu byl vytvořen program v programovacím prostředí MATLAB. Program je založen na vyhodnocení průměrného stupně jasu v obrázku s aplikací dvou masek.

Navržený experiment byl reálně otestován při 20 měřeních, přičemž z nich byly kvůli problémům s kontaminací plísněmi, kompletně změřeny pouze tři buňky. Analýza získaných buněk prokázala, že při hyperpolarizaci buněčné membrány intenzita fluorescence roste, při napětí -120 mV je to o $16,22 \% \pm 6,9 \%$. Při depolarizaci membrány intenzita fluorescence téměř lineárně klesá. Při napětí +40 mV je pokles záření o $-35,27 \% \pm 9,88 \%$ oproti intenzitě záření při napětí -80 mV.

Experiment provedený v této práci by se dal s drobnými úpravami modifikovat pro různá měření, obdobně jako je popsáno v kapitole 4.3. Bylo by možné použít neuronové buňky, kardiomyocyty nebo zkoumat vlastnosti jiných membránových napěťových senzorů, případně barviv. Pro následnou analýzu by bylo možné využít vytvořený program. Program umožňuje volit výchozí potenciál a také počet buněk, které

mají být zpracovány. Nyní v něm lze analyzovat experimenty s maximálním rozsahem membránového napětí od -120 mV až po +40 mV, který byl dostačující v této práci. Po drobné úpravě kódu by bylo možné analyzovat i experimenty, které by potřebovaly testovat buňky ve větším rozsahu membránového napětí. Snímky mohou být vkládány v barevné i šedotónové stupnici.

LITERATURA

- [1] ŠIMURDA, Jiří. *Bioelektrické jevy*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno, 2007. 72 s.
- [2] ST-PIERRE, François et al. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nature neuroscience* [online]. 2014, roč. 17, č. 6, s. 884–9. doi: 10.1038/nn.3709 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24755780>
- [3] 1. LF UNIVERZITY KARLOVY. *Fluorofory v biomedicině* [online]. [cit. 2016-12-15] Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [4] LABGUIDE. *Fluorochromy* [online]. Dostupné z: <http://labguide.cz/fluorochromy/>
- [5] *Introduction to Fluorescent Proteins* [online]. Nikon Instruments, 2016 [cit. 2016-12-28]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescent-proteins>
- [6] BAKER, Brandley J. et al., 2012. Genetically-encoded fluorescent voltage sensors using the voltage-sensing domain of *Nematostella* and *Danio* phosphatases exhibit fast kinetics. *Journal of Neuroscience Methods*, [online]. 208(2), 190–196. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398169/>
- [7] SUNG, Uhna, Masoud SEPEHRI-RAD, Hong Hua PIAO, et al., 2015. Developing fast fluorescent protein voltage sensors by optimizing FRET interactions. *PLoS ONE* [online]. 10(11), 1–22. ISSN 19326203. Dostupné z: 10.1371/journal.pone.0141585
- [8] KOLB, J. et al., 2005. Measurements of the Transmembrane Voltage in Biological Cells for Nanosecond Pulsed Electric Field Exposures. *2005 IEEE Pulsed Power Conference* [online]. 2005, č. JULY, s. 1286–1289. doi: 10.1109/PPC.2005.300607 Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=4084461>
- [9] LOEW, Leslie M., 2011. Membrane Potential Imaging in the Nervous System: Methods and Applications [online]. [cit. 2016-12-27]. 13–23. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-6558-5
- [10] JIN, L. et al. Fluorescent Sensors of Membrane Potential that Are Genetically Encoded. In: ROE, Anna W. *Imaging the brain with optical methods*. 2010. New York: Springer, Dostupné z: doi: 10.1007/978-1-4419-0452-2_2
- [11] NAGAI, T et al. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001, roč. 98, č. 6, s. 3197–3202. doi: 10.1073/pnas.051636098
- [12] BU, Guixue, Heather ADAMS, Edward J. BERBARI a Michael RUBART, 2009. Uniform action potential repolarization within the sarcolemma of in situ ventricular cardiomyocytes.

- Biophysical Journal* [online]. B.m.: biophysical society, **96**(6), 2532–2546. ISSN 00063495.
Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2008.12.3896
- [13] FROMHERZ, Peter, Gerd HÜBENER, Bernd KUHN a Marlon J. HINNER, 2008. ANNINE-6plus, a voltage-sensitive dye with good solubility, strong membrane binding and high sensitivity. *European Biophysics Journal* [online]. **37**(4), 509–514. ISSN 01757571.
Dostupné z: doi:10.1007/s00249-007-0210-y
- [14] *Stark effect* [online]. Encyclopædia Britannica, Inc, ©2017 [cit. 2017-1-21].
Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Stark-effect>
- [15] *Di-4-ANEPPS* [online]. Thermo Fisher Scientific Inc, 2017 [cit. 2017-1-23].
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1199>
- [16] *Potential-Sensitive ANEP Dyes* [online]. Invitrogen, 2006 [cit. 2017-1-23].
Dostupné z: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01199.pdf>
- [17] Emission spectroscopy. *SlidePlayer* [online]. Marion George, 2017 [cit. 2016-12-22].
Dostupné z: <http://slideplayer.com/slide/4702131/>
- [18] PISTON, DW et al. *Introduction to Fluorescent Proteins* [online]. [cit. 2016-12-28].
Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>
- [19] REMINGTON, S. James. Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science*. 2011, roč. 20, č. 9, s. 1509–1519. Dostupné z: doi: 10.1002/pro.684.
- [20] ČERNÝ, Jan. Zelený fluorescenční protein. *Vesmír* [online]. 2009, roč. 88, s. 228–231.
Dostupné z: <http://casopis.vesmír.cz/clanek/zeleny-fluorescencni-protein>
- [21] RCSB PDB. *GREEN FLUORESCENT PROTEIN FROM AEQUOREA VICTORIA* [online].
Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EMA>
[cit. 2016-05-18].
- [22] DIETRICH, Christof, MAISS, Edgar. Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *BioTechniques* [online]. 2002, roč. 32. Dostupné z: http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00010/02322st02_10599a.pdf
- [23] New fluorescent proteins report electrical signals of brain cells. *Riken* [online]. Japan: Riken, 2009 [cit. 2016-12-29].
Dostupné z: <http://www.riken.jp/en/pr/press/2009/20091225/>
- [24] ST-PIERRE, François, CHAVARHA, Mariya a Michael Z LIN, 2015. ScienceDirect Designs and sensing mechanisms of genetically encoded fluorescent voltage indicators [online]. 31–38. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2015.05.003
- [25] *pcDNA3.1/Puro-CAG-ASAP1* [online]. Addgene, 2014. [cit. 2017-1-23].
Dostupné z: <https://www.addgene.org/52519/>

- [26] VEJRAŽKA, Martin. Buněčné kultury. In Praha: Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
- [27] BÁRTOVÁ, Eva. *Buněčné a tkáňové kultury* [online]. [cit. 2016-12-01]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne_a_tkanove_kultury&lang=cz
- [28] Biologie v kostce [online]. [cit. 2017-01-01]. 2011, Dostupné z: <http://biologie-v-kostce.blogspot.cz/>
- [29] UNIVERSITY OF KENT. *Study Guide – Biotechnology and Cell Culture* [online]. Dostupné z: <https://moodle.kent.ac.uk/external/mod/book/view.php?id=2604&chapterid=160>
- [30] F.L. GRAHAM, J. Smiley, 1977. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J.gen.Virol.* **36**(2977), 59–72.
- [31] LIN, Yao-Cheng, Morgane BOONE, Leander MEURIS, et al., 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications* [online]. **5**(11), 4767. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms5767
- [32] *HEK293 Cell Line* [online]. [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.hek293.com/>
- [33] *Cell Search System* [online]. [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www2.brc.riken.jp/cache/cell/RCB1637>
- [34] SHAW, Gerry, Silas MORSE, Miguel ARARAT a Frank L. GRAHAM, 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. **16**(8), 869–871. ISSN 15306860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01-0995fje
- [35] KIM, Tae Kyung, EBERWINE, James H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, roč. 397, č. 8, s. 3173–3178. Dostupné z: doi: 10.1007/s00216-010-3821-6
- [36] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Transfection* [online]. [cit. 2016-12-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-culture/transfection.html>
- [37] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Stable Transfection* [online]. [cit. 2016-12-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/stable-transfection.html>
- [38] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Transient Transfection* [online]. [cit. 2016-12-06]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/transient-transfection.html>
- [39] LONGO, Patti a, Jennifer M KAVRAN, Min-sung KIM a Daniel J LEAHY, 2014. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine. *Methods Enzymology* [online]. **529**, 227–240. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5. Transient

- [40] GODBEY, W T, K K WU, G J HIRASAKI a a G MIKOS, 1999. Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene therapy* [online]. 6(8), 1380–1388. ISSN 09697128. Dostupné z: doi:10.1038/sj.gt.3300976
- [41] KIRCHEIS, Ralf et al. Tumor targeting with surface-shielded ligand–polycation DNA complexes. *Journal of Controlled Release* [online]. 2001, roč. 72, č. 1, s. 165–170. Dostupné z: doi: 10.1016/S0168-3659(01)00272-3
- [42] OGDEN, David, STANFIELD, Peter. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. *Currents* [online]. 1981, roč. 2, č. 7, s. 53–78. Dostupné z: doi:10.1.1.530.9713
- [43] VEITINGER, Sophie. *The Patch-Clamp Technique* [online]. [cit. 2016-12-30]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>
- [44] BIOELECTROMAGNETISM PORTAL. *BIOELECTROMAGNETISM* [online]. Dostupné z: <http://www.bem.fi/book/index.htm> [cit. 2016-12-30].
- [45] HAN, Zhou, Lei JIN, Jelena PLATISA, et al., 2013. Fluorescent protein voltage probes derived from ArcLight that respond to membrane voltage changes with fast kinetics. *PLoS ONE* [online]. 8(11), 1–9. ISSN 19326203. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0081295
- [46] MISHINA, Yukiko, Hiroki MUTOH, Chenchen SONG a Thomas KNÖPFEL, 2014. Exploration of genetically encoded voltage indicators based on a chimeric voltage sensing domain. *Frontiers in molecular neuroscience* [online]. 7(September), 78. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2014.00078
- [47] AKEMANN, W, et al., 2012. Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. *J Neurophysiol* [online]. 108(8), 2323–2337. ISSN 0022-3077. Dostupné z: doi:10.1152/jn.00452.2012
- [48] MISHINA, Yukiko, Hiroki MUTOH a Thomas KNÖPFEL, 2012. Transfer of Kv3.1 voltage sensor features to the isolated Ci-VSP voltage-sensing domain. *Biophysical Journal* [online]. 103(4), 669–676. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2012.07.031
- [49] MACLAURIN, Dougal, Veena VENKATACHALAM, Hohjai LEE a Adam E COHEN, 2013. Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 110(15), 5939–44. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1215595110
- [50] FLYTZANIS, Nicholas C, Claire N BEDBROOK, Hui CHIU, et al., 2015. Archaerhodopsin Variants with Enhanced Voltage Sensitive Fluorescence in Mammalian and *Caenorhabditis elegans* Neurons [online]. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms5894.Archaeorhodopsin
- [51] ABDELFATTAH, Ahmed S., Samouil L. FARHI, Yongxin ZHAO, et al., 2016. A Bright and Fast Red Fluorescent Protein Voltage Indicator That Reports Neuronal Activity in Organotypic Brain Slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* [online]. 36(8), 2458–72. ISSN 1529-2401. Dostupné

- z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3484-15.2016
- [52] HERRON, T.J., LEE, P., and JALIFE, J., 2012. Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells & tissues. *Circ. Res.* 110, 609–623. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247494
- [53] LEYTON-MANGE, Jordan S., Robert W. MILLS, Vincenzo S. MACRI, et al., 2014. Rapid cellular phenotyping of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes using a genetically encoded fluorescent voltage sensor. *Stem Cell Reports* [online]. B.m.: The Authors, 2(2), 163–170. ISSN 22136711. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2014.01.003
- [54] LOU, Q., JANKS, D.L., HOLZEM, K.M., et al., 2012. Right ventricular arrhythmogenesis in failing human heart : the role of conduction and repolarization remodeling [online]. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, 1426–1434. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00457.2012
- [55] LIAO, Mei-ling Chang, De BOER, Teun P, MUTOH, Hiroki et al., 2015. New Methods in Cardiovascular Biology Sensing Cardiac Electrical Activity With a Cardiac Myocyte – Targeted Optogenetic Voltage Indicator [online]. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.306143
- [56] MUTOH, Hiroki, Walther AKEMANN, Yuka IWAMOTO a Thomas KN, 2011. Optogenetic monitoring of membrane potentials [online]. 13–18. Dostupné z: doi:10.1113/expphysiol.2010.053942
- [57] PERRON, Amelie, Hiroki MUTOH, Walther AKEMANN, et al., 2009. Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential [online]. 2(June), 1–8. Dostupné z: doi:10.3389/neuro.02.005.2009
- [58] THOMAS, Philip a Trevor G. SMART, 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 51(3 SPEC. ISS.), 187–200. ISSN 10568719. Dostupné z: doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

- Arch* – sondy na bázi mikrobiálního rhodopsinu Archaelhodopsin 3
- ASAP1* – Accelerated Sensor of Action Potentials 1
- cpGFP* – Circularly Permuted GFP; cirkulární zelený fluorescenční protein
- DsRed* – *Discosoma striata* Red, červený fluorescenční protein
- EBFP* – Enhanced Blue Fluorescent Protein; modrý fluorescenční protein
- ECFP* – Enhanced Cyan Fluorescent Protein; azurový fluorescenční protein
- EGFP* – Enhanced Green Fluorescent Protein; substituovaná varianta zeleného fluorescenčního proteinu
- EYFP* – Enhanced Yellow Fluorescent Protein; žlutý fluorescenční protein
- FP* – Fluorescenční protein
- GFP* – Green Fluorescent Protein; zelený fluorescenční protein
- GUI* – Grafické uživatelské rozhraní
- HcRed* – *Heteractis crista* Red; červený fluorescenční protein
- HEK293* – Human Embryonic Kidney cells; ledvinné buňky z lidského embrya
- HP* – *holding potential*
- PEI* – kationový polymer polyethylenimin
- VSD* – Voltage-Sensing Domain; napětově citlivá oblast
- VSFP* – Voltage-Sensitive Fluorescent Protein; fluorescenční protein citlivý na napětí
- wtGFP* – Wild Type GFP; divoký gen GFP

SEZNAM PŘÍLOH

A Obsah přiloženého CD

B Manuál ke grafickému uživatelskému rozhraní (GUI)

C Vyhodnocení jednotlivých buněk

A OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

Na přiloženém CD je program určený ke spuštění grafického uživatelského rozhraní (GUI) – `gui.m`, `gui.fig` vytvořené v programovacím prostředí MATLAB, manuál pro ovládání programu a `READ_ME` soubor.

Dále jsou zde vloženy všechny snímky jednotlivých buněk, které byly získány během praktické části této práce a na kterých proběhla následná analýza. Jedna buňka má 17 snímků, jeden snímek pro jednu hodnotu membránového napětí (od -120 mV až +40 mV s krokem 10 mV). Snímky jsou pojmenovány podle potřeb pro program uvedených v manuálu.

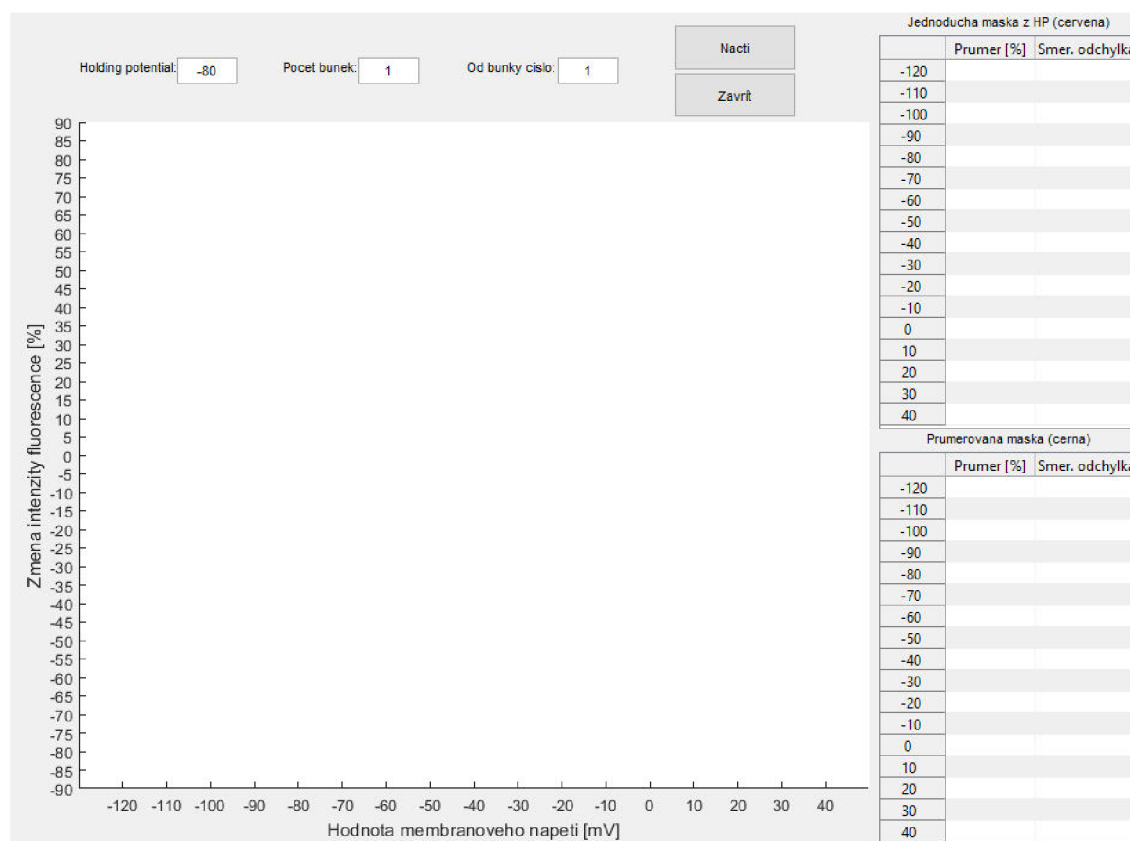
B MANUÁL KE GRAFICKÉMU UŽIVATELSKÉMU ROZHRAŇÍ (GUI)

Pro správnou funkci se program musí nacházet ve stejné složce jako snímky, které mají být analyzovány. Minimální konfigurace je MATLAB 2013a.

Snímky musí být pojmenované následujícím způsobem:

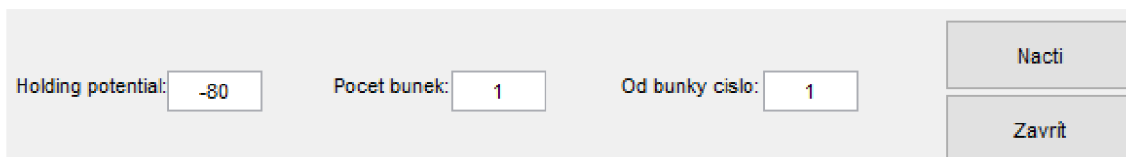
- předpona X- (01-, 02-, 03-, ...) označuje číslo buňky
- následuje označení hodnoty membránového napětí, při kterém byl snímek pořízen (-120, -110, ... 0, 10, 20, 30, 40)
- koncovka *.jpg*.
- příklad: **01--120.jpg**

Po otevření programu se spustí GUI (obr. 27).



obr. 27: GUI po spuštění s přednastavenými hodnotami

Na obr. 28 je detailněji zobrazena část GUI, která je ovládaná uživatelem. Do všech třech boxů je nutné zadávat pouze čísla, v případě *holding potential* může číslo začít znaménkem mínus. Po spuštění programu jsou přednastaveny hodnoty, které jsou uvedeny na obr. 28. Po nastavení požadovaných hodnot se zmáčkne klávesa *Enter* nebo tlačítko *Nacti*.



The image shows a graphical user interface (GUI) for a program. It features three input fields for numerical values: 'Holding potential:' with the value '-80', 'Počet bunek:' with the value '1', and 'Od bunky cislo:' with the value '1'. To the right of these fields are two buttons: 'Nacti' (Run) and 'Zavřít' (Close).

obr. 28: Část GUI ovládaná uživatelem

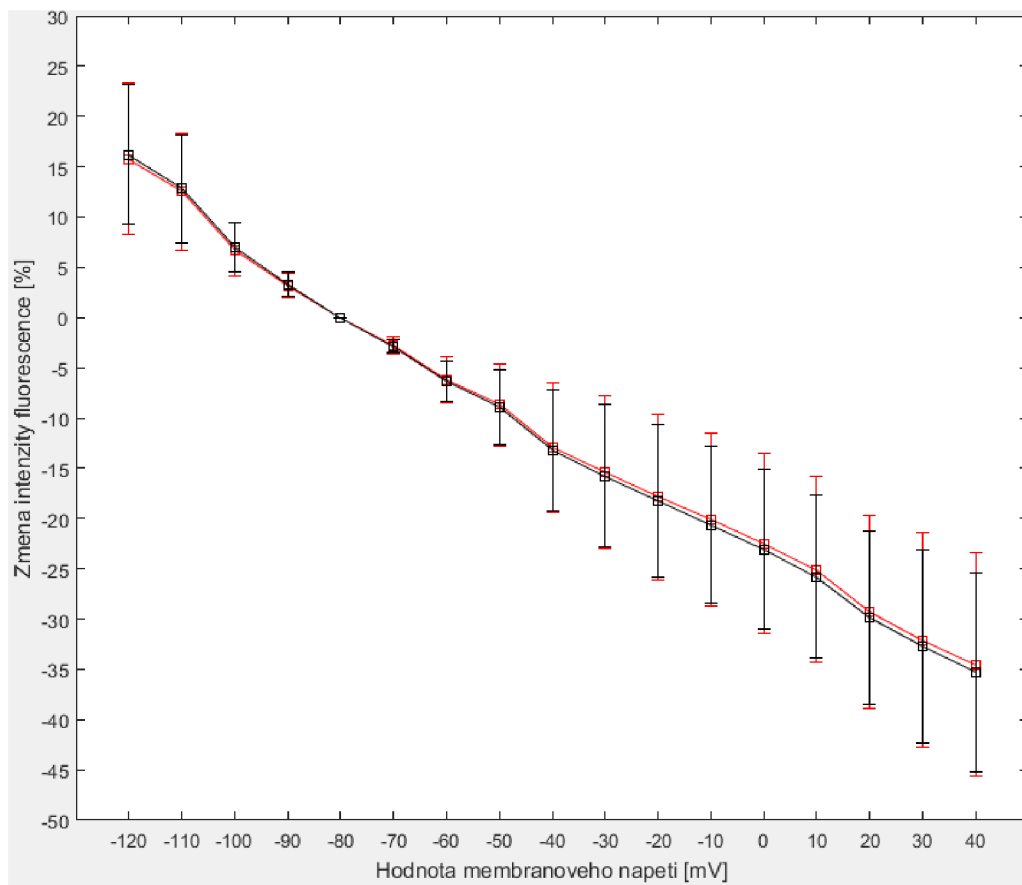
Měnitelné boxy pro nastavení analýzy:

- *Holding potential*: Pro zadání *holding potential*, při kterém měření probíhalo. Podle této hodnoty bude vytvořena jednoduchá maska a také v této hodnotě bude změna intenzity fluorescence nulová.
- *Počet bunek*: Určuje počet buněk, které mají být analyzovány.
- *Od bunky cislo*: Udává, od kolikáté buňky má proběhnou požadovaná analýza.

Jsou-li hodnoty v měnitelných boxech zadány špatně – neexistující HP, počet buněk, které chce uživatel analyzovat, objeví se chybová hláška. Tato chybová hláška se může objevit, nejsou-li soubory ve stejné složce nebo jsou špatně pojmenované.

Po zpracování podle zadaných hodnot programem se vykreslí graf a zobrazí data v tabulce. V obou případech je zobrazena i směrodatná odchylka. Výstupní hodnoty získané aplikací jednoduché masky jsou vykresleny do grafu červeně a získané aplikací průměrované masky jsou vykresleny černě.

Na obr. 29 je uveden příklad výsledného grafu při HP -80 mV a analýze na 3 buňkách. Příklad výstupních hodnot v tabulkách pro stejné zadání jako je uvedený graf znázorňuje obr. 30. Hodnoty v tabulkách jsou uvedeny v procentech s přesností na 4 desetinná místa.



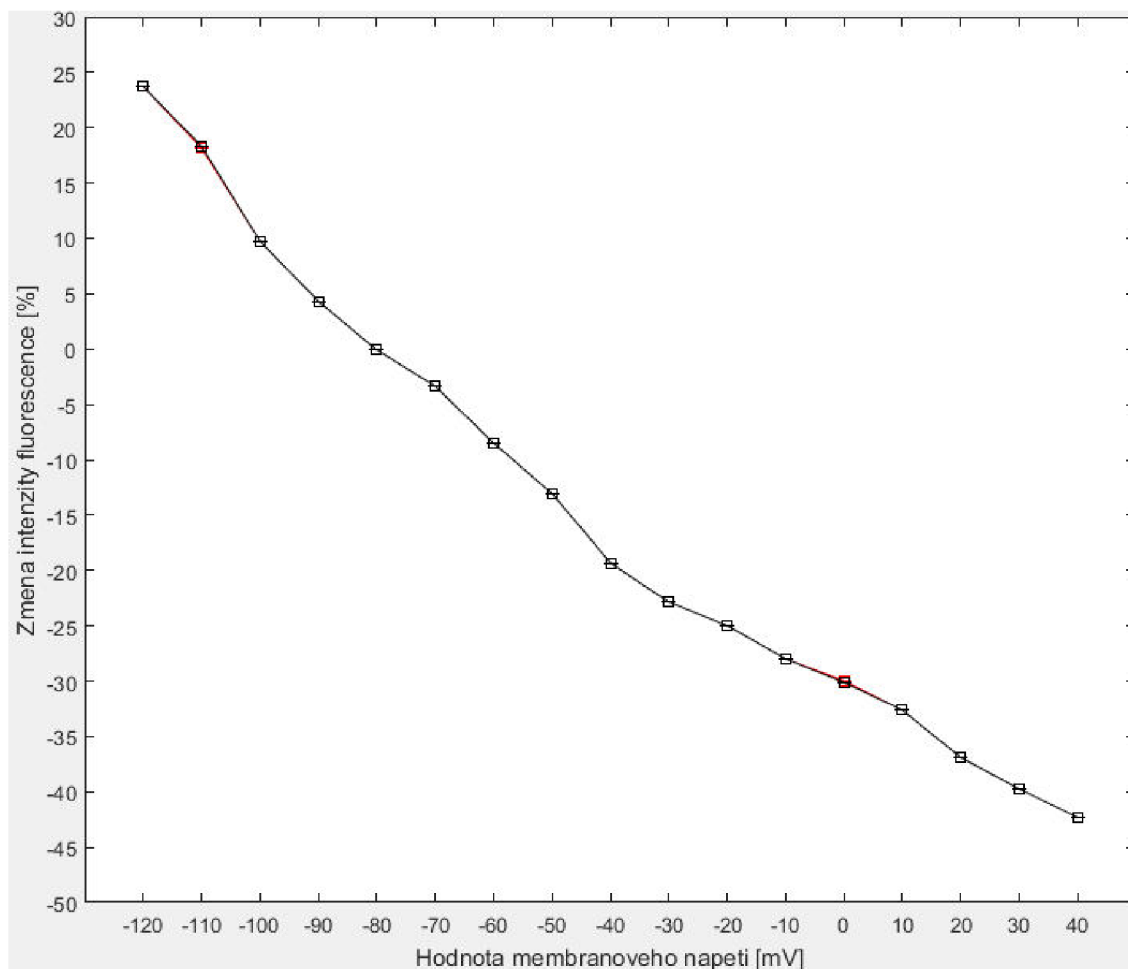
obr. 29: Příklad grafu při zadaném HP -80 mV a analýze na 3 buňkách

Jednoduchá maska z HP (červená)			Průměrovaná maska (černá)		
	Průměr [%]	Smer. odchylka		Průměr [%]	Smer. odchylka
-120	15.7681	7.5056	-120	16.2156	6.9149
-110	12.5091	5.8774	-110	12.8413	5.3849
-100	6.7564	2.6662	-100	6.9998	2.4138
-90	3.1557	1.2129	-90	3.3251	1.2612
-80	0	0	-80	0	0
-70	-2.7452	0.8354	-70	-2.8316	0.6877
-60	-6.2025	2.2481	-60	-6.3738	2.0004
-50	-8.7040	4.0714	-50	-8.9231	3.7777
-40	-12.9175	6.4527	-40	-13.2152	6.0227
-30	-15.4099	7.6287	-30	-15.7575	7.1041
-20	-17.8347	8.2471	-20	-18.2437	7.5873
-10	-20.1274	8.6456	-10	-20.6360	7.8418
0	-22.4909	8.9345	0	-23.0880	7.9647
10	-25.0686	9.2082	10	-25.7711	8.0514
20	-29.2890	9.5530	20	-29.8441	8.6356
30	-32.1196	10.6979	30	-32.7406	9.6526
40	-34.5541	11.0883	40	-35.2720	9.8771

obr. 30: Příklad tabulek při zadaném HP -80 mV a analýze na 3 buňkách

C VYHODNOCENÍ JEDNOTLIVÝCH BUNĚK

Buňka 1

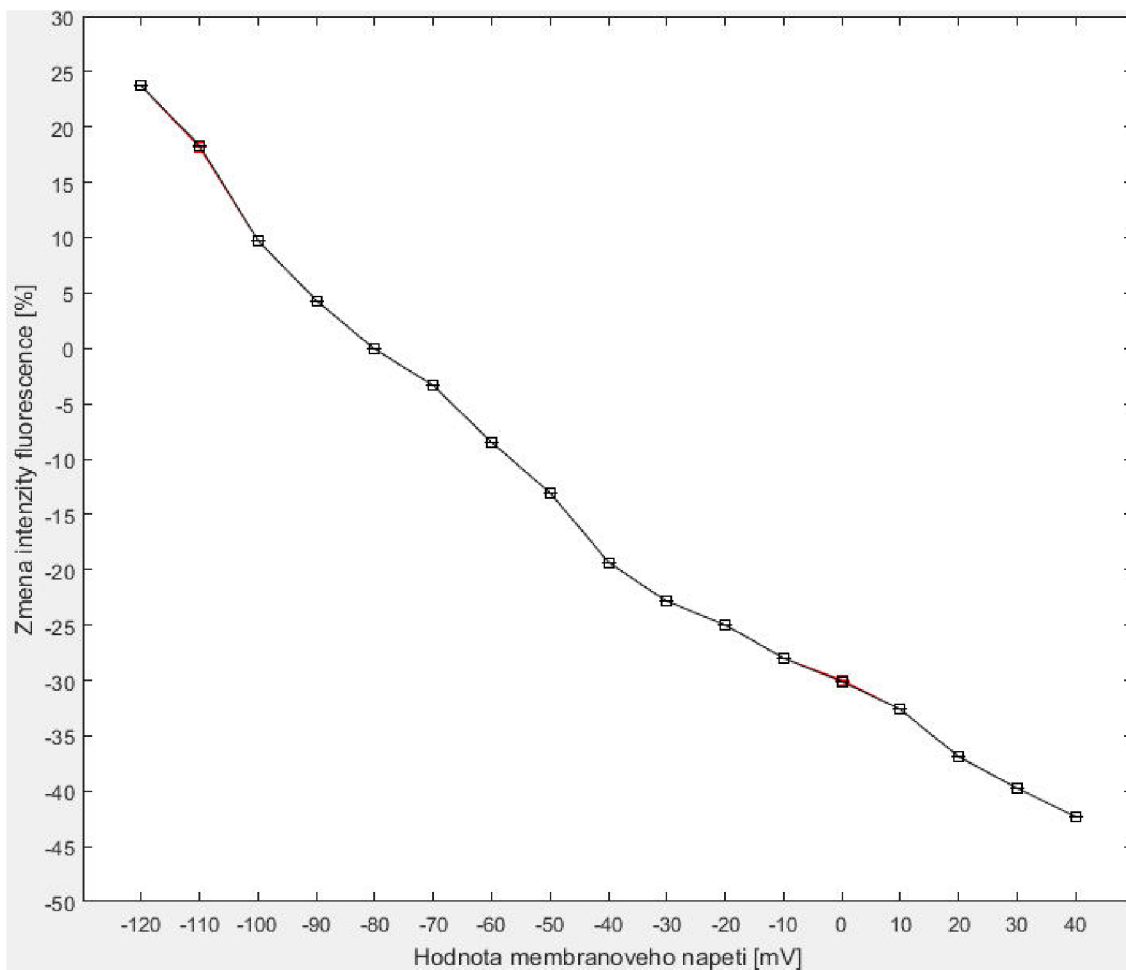


obr. 31: Graf změny fluorescence podle membránového napětí buňky 1

tab. 4: Hodnoty procentuální změny fluorescence podle membránového napětí buňky 1

Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]		Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]	
	Jednoduchá maska	Průměrovaná maska		Jednoduchá maska	Průměrovaná maska
-120	23,7582	23,7666	-30	-22,8054	-22,8095
-110	18,2381	18,2452	-20	-24,9711	-24,9756
-100	9,7752	9,7805	-10	-27,9217	-27,9279
-90	4,3311	4,3335	0	-30,0673	-30,0743
-80	0	0	10	-32,5626	-32,5697
-70	-3,3537	-3,3534	20	-36,8151	-36,8234
-60	-8,4696	-8,4701	30	-39,7554	-39,7637
-50	-13,0316	-13,0336	40	-42,3423	-42,3522
-40	-19,4388	-19,4427			

Buňka 2

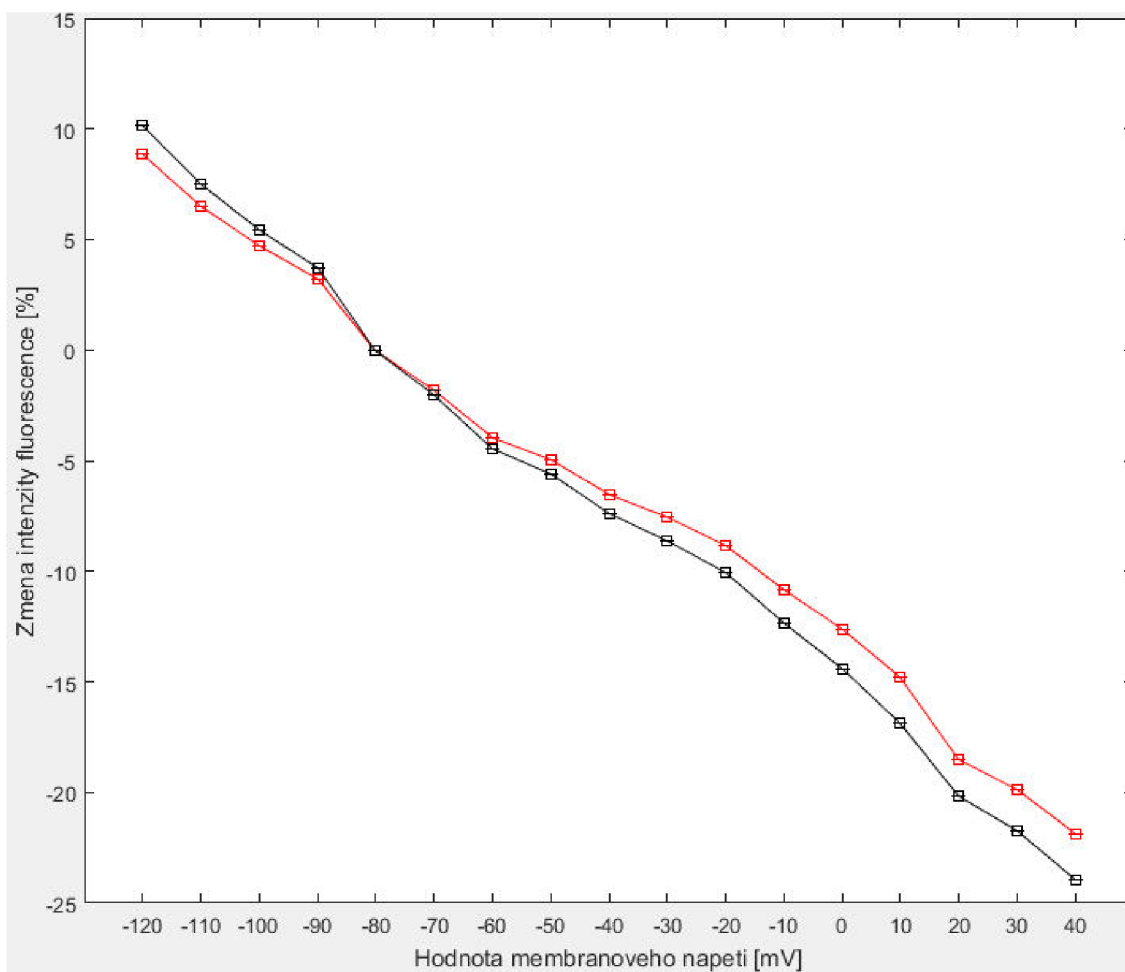


obr. 32: Graf změny fluorescence podle membránového napětí buňky 2

tab. 5: Hodnoty procentuální změny fluorescence podle membránového napětí buňky 2

Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]		Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]	
	Jednoduchá maska	Průměrovaná maska		Jednoduchá maska	Průměrovaná maska
-120	14,6806	14,6880	-30	-15,8566	-15,8606
-110	12,7955	12,8030	-20	-19,7272	-19,7333
-100	5,7702	5,7740	-10	-21,6323	-21,6392
-90	1,9086	1,9110	0	-24,7668	-24,7747
-80	0	0	10	-27,8539	-27,8636
-70	-3,0892	-3,0890	20	-32,5102	-32,5223
-60	-6,1639	-6,1655	30	-36,7111	-36,7244
-50	-8,1310	-8,1326	40	-39,4610	-39,4753
-40	-12,7782	-12,7823			

Buňka 3



obr. 33: Graf změny fluorescence podle membránového napětí buňky 3

tab. 6: Hodnoty procentuální změny fluorescence podle membránového napětí buňky 3

Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]		Hodnota napětí [mV]	Změna intenzity fluorescence [%]	
	Jednoduchá maska	Průměrovaná maska		Jednoduchá maska	Průměrovaná maska
-120	8,8656	10,1922	-30	-7,5676	-8,6023
-110	6,4937	7,4756	-20	-8,8058	-10,0220
-100	4,7238	5,4449	-10	-10,8282	-12,3409
-90	3,2274	3,7309	0	-12,6385	-14,4151
-80	0	0	10	-14,7893	-16,8800
-70	-1,7927	-2,0523	20	-18,5419	-20,1867
-60	-3,9739	-4,4856	30	-19,8924	-21,7338
-50	-4,9494	-5,6032	40	-21,8589	-23,9886
-40	-6,5356	-7,4207			