

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

**Fluorescentní protein citlivý na elektrické napětí,
využívající motorický protein prestin**

Vypracoval: Karel Divoký

Vedoucí práce: Josef Lazar, Ph.D.

České Budějovice 2011

Bakalářská diplomová práce:

Divoký K. (2011): Fluorescentní protein citlivý na elektrické napětí, využívající motorický protein prestin. [Voltage sensitive fluorescent protein based on the motor protein prestin.] Bachelor thesis in Czech, 25p, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace:

Cílem této práce bylo připravit sérii fluorescentně značených konstruktů na bázi prestinu, exprimovat tyto konstrukty v savčích buňkách a změřit jejich lineární dichroismus metodou dvoufotonové polarizační mikroskopie, za účelem přípravy geneticky kodované optické sondy membránového napětí. Tato práce uvádí do současných způsobů sledování elektrických vzruchů v neuronech, poskytuje informace o metodě dvoufotonové polarizační mikroskopie, popisuje naše výsledky při přípravě zmiňovaných konstruktů a shrnuje naše mikroskopická pozorování.

Annotation:

The aim of this work was to create a series of fluorescently labeled constructs based on the motor protein prestin, express these constructs in mammalian cells, and measure their linear dichroism by two photon polarization microscopy, in order to develop a genetically encoded optical probe of cell membrane voltage. This thesis provides an introduction to current methods of observing electrical activity in neurons, describes the method of two-photon polarization microscopy, describes our results in preparing the abovementioned constructs, and summarizes our microscopic observations.

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Karel Divoký

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Josefu Lazarovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, poskytnuté materiály, cenné rady a především za jeho trpělivost. Tímto bych chtěl také poděkovat P. Prášilovi a A. Bondarovi za pomoc, zejména v začátcích. V neposlední řadě děkuji své rodině za plnou podporu.

Obsah:

1.	Úvod.....	1
1.1.	Přenos signálů v neuronech	1
1.2.	Metody zkoumání aktivity neuronu	2
1.3.	Optické metody	3
1.3.1.	Metoda druhé harmonické emise (second harmonic imaging).....	3
1.3.2.	Metody využívající fluorescenci	4
1.3.2.1	Metody využívající syntetické fluorescentní molekuly	4
1.3.2.2	Geneticky kódované sondy	4
1.3.2.2.1	Autofluorescentní proteiny	5
1.3.2.2.2.	Metoda využívající zhasnutí fluorescence	6
1.3.2.2.3.	Metoda FRET	7
1.3.2.2.4.	Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM)....	8
1.4	2PPM	8
1.5	Prestin	10
2	Cíle práce.....	12
3	Materiál a metody.....	12
4	Výsledky.....	19
4.1	Příprava konstruktů	19
4.1.1	Příprava konstruktů vycházejících z PY-pEPAx1.4.....	19
4.1.2	Příprava konstruktů vycházejících z A744YFP-P.1-pDONR201.....	19
4.2	Výsledky mikroskopických pozorování.....	21
4.2.1.	A744YFP-P.1-pEPAx2.4	21
4.2.2.	N603YFP-P.1-pEPAx2.4	21
5	Diskuse.....	22
6	Závěr.....	22
7	Seznam citované literatury.....	23

1. Úvod

Mozek je řídicí orgán celé nervové soustavy. Jeho základní funkční a anatomickou jednotkou je neuron. Tato buňka je velmi specializovaná. Je schopna přijímat, zpracovávat a odesílat signály, kterými ovládá naše tělo. Mnoho aspektů zpracování těchto signálů jednotlivými nervovými buňkami i celým mozkem zůstává neprozkoumaných. Důležitým typem přenosu signálů v neuronech jsou změny elektrického napětí na buněčné membráně. Pro pochopení funkce neuronových obvodů je třeba sledovat tyto změny elektrického napětí v několika neuronech současně. Toto však v současné době až na výjimky není proveditelné. Dlouhodobým cílem naší práce je vyvinout optickou metodu, umožňující pozorování jednotlivých akčních potenciálů v přesně definovaných souborech neuronů.

Následující části stručně shrnují průběh přenosu signálu v neuronech a popisují současné metody sledování membránového napětí a jiných známek aktivity neuronu. Dále uvádějí náš přístup k řešení problému, shrnují a diskutují naše výsledky.

1.1. Přenos signálů v neuronech

Důležitou součástí přenosu informací v mozku je šíření elektrických vzruchů po spojnicích mezi neurony (axonech, dendritech). Mezi vnějším a vnitřním povrchem nervového vlákna je klidový potenciálový rozdíl přibližně -50 až -90mV . V okamžiku průchodu vzruchu nervovým vláknem se mění iontová rovnováha na membráně. Náhle je zvýšena propustnost membrány pro Na^+ a tento kation se přesunuje dovnitř neuronu. Nastává depolarizace až na $+40\text{mV}$. Dále následuje zvýšení permeability membrány pro K^+ ionty, tím nastává jejich proudění ven z buňky, čímž se vyrovná akční kolísnutí membránového potenciálu (nastává repolarizace). Kolísnutí membránového potenciálu (tzv. akční potenciál) trvá přibližně $1\text{-}2\text{ms}$.

Když akční potenciál dosáhne nervového zakončení axonu, depolarizace membrány vyvolá uvolnění Ca^{2+} iontů ze záporně nabitých částí membrány a tím umožní průchod Na^+ a K^+ iontů. Současně dochází ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} uvnitř presynaptického váčku, tím dochází ke stimulaci synaptických váčků, které uvolní v nich obsažený nervový mediátor do synaptické štěrbině.

Nejdůležitějšími neurotransmitery jsou acetylcholin, biogenní aminy (dopamin, norepinefrin, epinefrin, serotonin, histamin) a některé aminokyseliny (glutamát, aspartát, kyselina gama-aminomáselná (GABA), glycin a taurin). Interakce mezi neurotransmitery a receptory v postsynaptickém váčku vedou ke změně membránových potenciálů a ke vzniku akčního potenciálu na prvním Ranvierově zářezu postsynaptického neuronu. (Trojan S., 2003)

1.2. Metody zkoumání aktivity neuronu

Během posledních let bylo vyvinuto mnoho metod zkoumajících aktivitu neuronu. Základem těchto metod jsou různé fyzikální a molekulární procesy, jejichž prostřednictvím lze sledovat rozmanité aspekty neuronové aktivity. Rozlišujeme metody přímého měření elektrického napětí a optické metody, využívající optické sondy, ať již syntetické nebo geneticky kodované (nejčastěji fluorescentní proteiny).

Jednou z nejpoužívanějších metod měření elektrické aktivity neuronu je tzv. **buněčná elektrofyziologie**. Tato metoda sleduje elektrické napětí na membráně buňky přímo, pomocí duté skleněné mikroelektrody. Na úrovni jednotlivých buněk poskytuje tato metoda velice dobré výsledky. Umožňuje sledování jednotlivých akčních potenciálů, ale i elektrickou stimulaci neuronů. Omezením této metody je obtížné pozorování více než jedné buňky a invazivnost při sledování aktivity neuronů v živých organismech.

Obdobou buněčné elektrofyziologie na úrovni celého mozku je **elektroencefalografie** (EEG). Většinou je využíváno 18 a více elektrod, které jsou umístěny na povrch hlavy. Zde snímají malé změny elektrického potenciálu vytvořené neurony na povrchu mozku. Tato metoda ale zdaleka neumožňuje sledování jednotlivých neuronů, natož jednotlivých akčních potenciálů.

Další metodou pro zobrazování aktivity mozku je metoda **funkční magnetické rezonance**, fMRI (functional magnetic resonance imaging). Tato metoda je založena na principu mapování přítomnosti okysličené krve v různých částech mozku. Při navázání molekuly kyslíku na molekulu hemoglobinu přítomnou v krvi se molekula hemoglobinu začne chovat diamagneticky. To vytváří lokální nehomogenitu magnetického pole, která je dále detekována. Metoda fMRI umožňuje neinvazivně mapovat aktivitu celého mozku, avšak nikoliv na úrovni jednotlivých neuronů a akčních potenciálů. (FMRI TEAM Brno [online], 2004)

Méně známá metoda **optical imaging of intrinsic signals** (OIS) mapuje aktivitu mozku měřením změn v odrazivosti světla tkání v závislosti na fyziologických procesech probíhajících v buňce. Využití této poměrně rychlé metody je například při sledování mozkové aktivity během operace mozku. OIS ale zatím nemá požadované rozlišení pro sledování jednotlivých akčních potenciálů jednotlivých neuronů. (*Laboratory of Neuro Imaging* [online]. 2008)

1.3. Optické metody

Funkce neuronu je možné sledovat mikroskopickým zobrazováním za využití vhodných fyzikálních jevů. Využívány jsou např. druhá harmonická emise nebo různé aspekty fluorescence, ať už malých molekul nebo fluorescentních proteinů. Tato kapitola je věnovaná právě optickým metodám.

1.3.1. Metoda druhé harmonické emise (second-harmonic imaging microscopy)

Tato metoda je založena na detekci konverze laserového světla na světlo o dvojnásobné frekvenci, ke které může docházet při průchodu intenzivního světla vysoce polarizovatelnými materiály skládajícími se z centrálně nesymetrických molekul (harmonoforů). Účinnost této konverze závisí na molekulárním prostředí v okolí harmonoforu, tj. např. na elektrickém poli v buněčné membráně (membránovém napětí). V minulosti byla tato mikroskopická metoda používána hlavně k zobrazování endogenních proteinů, např. molekul kolagenu. Metoda druhé harmonické emise se jeví jako nadějná pro pozorování změn membránového napětí v neuronech, ale zatím je nedostatek vhodných molekulárních sond. Nepříznivým faktorem je také potřeba vysoce intenzivního světla, které negativně působí na zkoumané buňky. (Campagnola, P.J. and Loew, L.M., 2003)

1.3.2. Metody využívající fluorescenci

Velké využití při zkoumání funkce neuronů mají fluorescenční jevy, ať už využívající malé molekuly nebo fluorescentní proteiny.

1.3.2.1. Metody využívající syntetické fluorescentní molekuly

Syntetické fluorescentní indikátory jsou velmi hojně využívány ke zkoumání různých buněčných procesů. Jedná se o malé molekuly, které se mohou volně pohybovat uvnitř buňky nebo mohou být lokalizovány např. v buněčných membránách. Intenzita jejich fluorescence je přitom závislá například na přítomnosti Ca^{2+} iontů nebo na změně membránového potenciálu. (*The Molecular Probes Handbook*. 11th Edition)

Malé molekuly fluorescentního barviva jsou často využívány např. pro sledování změn koncentrace Ca^{2+} (komerčně dostupná jsou např. barviva fluo-4, fluo-3, fura-2, indo-1 nebo rhod-2). Existují i fluorescentní molekuly citlivé například na změnu koncentrace Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , nebo na změnu membránového potenciálu (di-8-ANEPPS, kombinace DiO/DPA). (*Vergara Lab* [online]. 2010)

Metody zobrazování buněčných procesů pomocí malých fluorescentních molekul jsou poměrně snadno aplikovatelné, bez genetického upravování zkoumaných buněk. Malé fluorescentní sondy mají však i mnoho nevýhod, díky nimž nejsou ideální pro výzkum neuronů. Jednou z hlavních nevýhod je jejich přítomnost ve všech buňkách (ne pouze v neuronech) vzorku. Dalšími nevýhodami bývají problémy s dopravou sond do buňky, malá specifita, vedlejší účinky, a toxicita, častá obzvláště u indikátorů napětí.

(*The Molecular Probes Handbook*. 11th Edition)

1.3.2.2. Geneticky kódované sondy

Mnohé nevýhody spojené s používáním syntetických optických sond odstraňují geneticky kódované sondy. Geneticky kódované sondy mají obecně velmi nízkou toxicitu. Buňky si je syntetizují samy, což mj. umožňuje cílení sondy do přesně definované skupiny buněk. Geneticky kódované sondy jsou často specifické pro jeden buněčný proces.

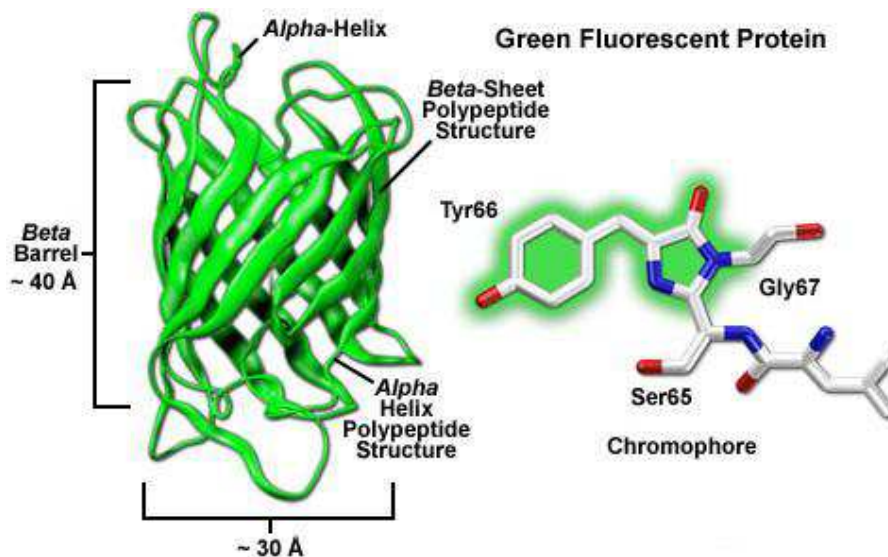
Geneticky kódované sondy bývají nejčastěji konstruovány tak, že k proteinu citlivému na zkoumaný jev je připojen autofluorescentní protein tak, aby změny ve zkoumaném jevu nějakým způsobem ovlivnily optické vlastnosti autofluorescentního proteinu (Suter et al., 2000). Následující odstavce se zabývají autofluorescentními proteiny a různými způsoby jejich využití v geneticky kódovaných optických sondách neuronové aktivity.

1.3.2.2.1. Autofluorescentní proteiny (AFP)

Základem téměř všech geneticky kodovaných optických sond je molekula fluorescentního proteinu. Historie využití autofluorescentních proteinů (AFP) je datována od roku 1962, kdy byl zveřejněn článek vědců Shimomura O., Johnson F.H. a Saiga Y. o izolaci zeleného fluorescentního proteinu (GFP) z medúzy *Aequorea victoria* (*Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea*). Osamu Shimomura později (v roce 2009) získal za objevení a výzkum GFP Nobelovu cenu za chemii. Velký rozmach fluorescentních proteinů však nastal až po zjištění, že GFP produkuje fluorescenci i po vložení do jiných organismů. (Chalfie, M., 1994) Pomocí technik molekulární biologie bylo využito schopnosti GFP označit proteiny a následně je lokalizovat v živých organismech. (Sullivan, K.F., 2008)

Základem struktury všech autofluorescentních proteinů je β -soudek složený z jedenácti β -vláken. Středem této soudkové struktury prochází jedna α -šroubovice. (Sullivan, K.F., 2008) Tři aminokyseliny této šroubovice (u GFP se jedná o serin 65, tyrosin 66 a glycin 67) spolu spontánně reagují, čímž vytvářejí fluorofor. Tento fluorofor zůstává kovalentně vázán ke šroubovici procházející středem soudku. Zde je fluorofor chráněn před molekulami vody, které by jinak zhasly jeho fluorescenci. (Tsien, R.Y., 1998) Substituce některé ze tří aminokyselin vytvářejících fluorofor (např. glycinu za serin, nebo tryptofanu za tyrosin) vedou ke změnám v optických vlastnostech fluoroforu, jako např. v excitačních a emisních spektrech.

Oba konce aminokyselinového řetězce jsou přítomny na povrchu struktury proteinu. Proto lze AFP připojit k jiným proteinům. Tyto konce jsou také poměrně blízko u sebe, což někdy dovoluje vložit fluorescentní protein doprostřed jiného proteinu bez poškození funkce tohoto proteinu. (Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A., 1998).



Obr.1.: Schéma molekuly zeleného fluorescentního proteinu a jeho chromoforu. (Zeiss [online]. 2010)

Stabilita AFP je značně vysoká, což je užitečné při experimentálním využití. I přes velkou stabilitu β -obalu závisí intenzita fluorescence na parametrech okolního prostředí, jako např. pH nebo koncentraci chloridových iontů.

1.3.2.2.2. Metoda využívající zhášení fluorescence

Jedním z procesů užívaných při vývoji molekulárních sond na bázi fluorescentních proteinů je zhášení fluorescence. Sondy založené na zhášení využívají toho, že optické vlastnosti fluoroforu AFP jsou citlivé na přítomnost zhášedel jako např. molekul vody nebo chloridových iontů. Příkladem využití této metody je geneticky kódovaná sonda Ca^{2+} zvaná GCaMP. GCaMP obsahuje molekulu zeleného fluorescentního proteinu (GFP) se spojenými N a C konci a namísto nich vytvořenými novými konci v blízkosti fluoroforu. Na jeden konec je upevněn protein zvaný calmodulin, na druhý konec je připojen peptid (M13), který se v přítomnosti Ca^{2+} váže na calmodulin. Při klidové koncentraci Ca^{2+} je fluorescence GFP slabá, protože neinteragující konce GFP umožňují pronikání vody do blízkosti fluoroforu, což vede ke zhášení fluorescence. Při zvýšení koncentrace Ca^{2+} konce GFP navzájem interagují, zamezují pronikání vody do blízkosti fluoroforu, a tím dochází ke zvýšení fluorescence (*Brain Windows* [online] 2009).

Mezi konstrukty používané pro sledování koncentrace vápníku patří dále například GCaMP2 a GCaMP3. Ale ani tyto molekuly nejsou zatím schopné detekovat v savčím mozku změny koncentrace vápníku způsobené jedním akčním potenciálem (Tian, L., et al., 2009).

Ke sledování membránového napětí pomocí zhášení fluorescence byl vyvinut konstrukt FlaSh. Tento konstrukt využívá kombinaci K^+ kanálu citlivého na změnu elektrického potenciálu na membráně buňky a molekuly GFP umístěné na jeho C konec (*GFP Δ C*). (Siegel, M.S.; Isacoff, E.Y., 1997). Praktická využitelnost tohoto konstruktu je však malá, protože změny fluorescence nastávají pomalu (~100 ms), a jsou pozorovatelné pouze v oocytech (tj. nikoliv v neuronech).

Konstrukty využívající zhášení fluorescence jsou poměrně jednoduché (např. ve srovnání s konstrukty využívajícími FRET), relativně fotostabilní, a změny fluorescence jsou dobře patrné. Jejich nevýhodou, zejména při vývoji sond umožňujících sledovat jednotlivé akční potenciály, bývá nedostatečná rychlost.

1.3.2.2.3. Metoda FRET

Velký počet geneticky kódovaných optických sond molekulárních procesů využívá ke své funkci rezonanční přenos fluorescenční energie (fluorescence resonance energy transfer - FRET). Jedná se o nezářivý přenos energie mezi dvěma molekulami fluorescentních proteinů, v podstatě tudíž opět o zhášení fluorescence. Molekula donoru (například CFP) absorbuje záření o určité vlnové délce a tím je excitována do vyššího energetického stavu. Molekula akceptoru (YFP) je excitovanou molekulou donoru sama excitována a vyzářuje fluorescenční záření, které má delší vlnovou délku než vlnová délka záření donoru. Účinnost přenosu energie závisí na vzájemné vzdálenosti a orientaci donoru a akceptoru. FRET umožňuje pozorovat interakce mezi molekulami proteinů a konformační změny v proteinech. Příkladem použití je cíleně vyvinutý protein D3cpV, jenž reaguje na zvýšení koncentrace Ca^{2+} přiblížením fluorescentních molekul CFP a YFP, což vede ke zvýšení přenosu energie z CFP na YFP a změnám v emisním spektru. (Palmer, A.E., et al., 2006)

Mezi sondy umožňující sledování membránového napětí patří například VSFP2.3. Tato molekula je kombinací proteinu citlivého na změnu membránového napětí (Ci-VSP), CFP a YFP. Novějším konstruktem je pak VSFP3.1 obsahující pouze Ci-VSP a CFP. (Perron, A, et al., 2009)

Výhodami metody využívající FRET je velká citlivost na změny vzdálenosti mezi donorem a akceptorem a malá závislost přenosu energie na vlastnostech okolního prostředí. Mezi nevýhody patří velikost molekul sond, složitost jejich přípravy, přítomnost dvou fluorescentních proteinů, a sklony CFP k bělení. Signál FRET také bývá často slabý na pozadí fluorescence CFP a YFP. (Sullivan, K.F., 2008).

1.3.2.2.4. Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM)

Dvoufotonová polarizační mikroskopie fluorescentních proteinů je nová mikroskopická metoda, která by díky své vysoké citlivosti měla být vhodná pro sledování velmi rychlých procesů v buňce. Tato metoda využívá anisotropických optických vlastností molekul fluorescentních proteinů, zejména při absorpci (tzv. lineární dichroismus) a jejich změn během molekulárních procesů v buňkách. Tato metoda je důkladněji popsána v samostatné kapitole 1.4.

1.4. Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM)

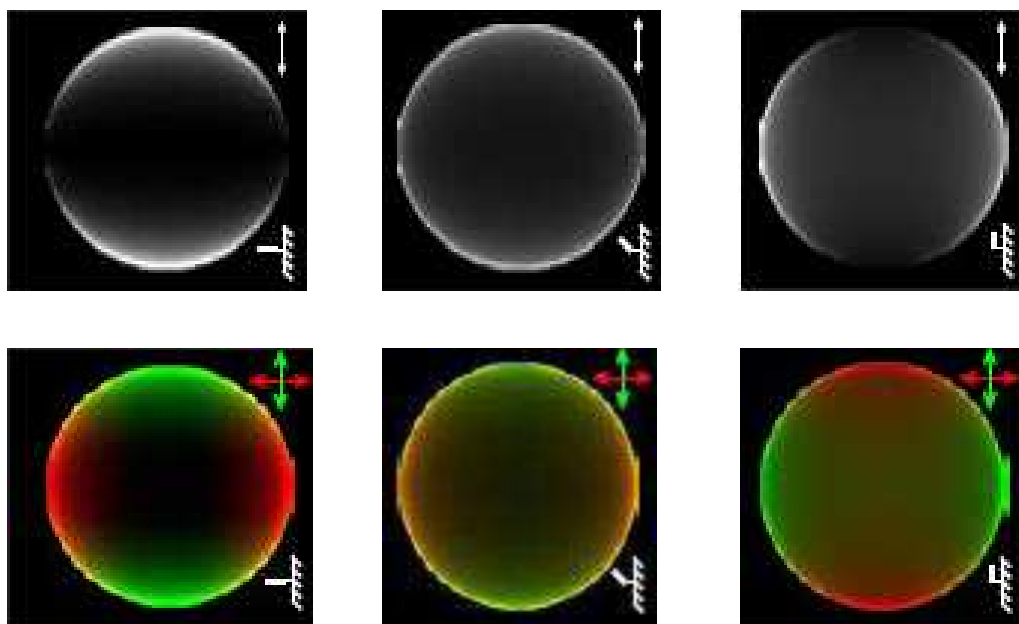
Novým způsobem sledování procesů v membránových proteinech je dvoufotonová polarizační mikroskopie (2PPM). 2PPM využívá částečně známých, doposud málo využívaných anisotropických vlastností fluoroforu fluorescentních proteinů.

Obecně, při jednofotonové (1P) absorpci světla molekulou je rychlost absorpce úměrná druhé mocnině kosinu úhlu mezi vektorem elektrického pole excitujícího paprsku a vektorem přechodu dipólového momentu (TDM) absorbující molekuly. Vektor TDM tak v souřadné soustavě molekuly představuje orientaci polarizace excitačního světla, při níž je rychlost absorpce maximální. Pro dvoufotonovou (2P) absorpci je TDM tenzorem druhého řádu, a vztah mezi orientací molekuly a rychlostí absorpce je často značně komplikovaný. Pro některé molekuly (např. tyčinkovitého tvaru) je však rychlost 2P absorpce úměrná čtvrté mocnině kosinu úhlu mezi směrem polarizace excitujícího světla a vektorem popisujícím orientaci molekuly (Lakowicz, J.R., 2006). Při dvoufotonové excitaci se tak anisotropické vlastnosti fluoroforů mohou projevit výrazněji než při jednofotonové excitaci, což bylo naší laboratoří pro fluorescentní proteiny experimentálně prokázáno (Lazar J. et al.).

U souborů molekul, které nejsou orientovány náhodně lze pozorovat tzv. lineární dichroismus (LD). Ten je definován jako rozdíl v absorpci polarizovaného světla mezi dvěma navzájem kolmými lineárními polarizacemi. V membránových proteinech označených fluorescentním proteinem lze pozorovat jak LD, tak změny v LD vypovídající o konformačních změnách v těchto proteinech.

Pro zobrazení LD je nutno získat separátní obrázky buňky za excitace lineárně polarizovaným světlem se dvěma různými polarizacemi (nejčastěji horizontální a vertikální). Toho lze dosáhnout např. manuálním otočením polarizace laserového svazku pomocí půlvlnové destičky mezi akvizicemi jednotlivých obrázků. Výhodnější je ale využít elektrooptického polarizačního modulátoru synchronizovaného s funkcí laserového skenovacího mikroskopu tak, že polarizace je střídána po akvizici jednotlivých pixelů. Tento způsob eliminuje problémy způsobené pohybem buněk mezi akvizicemi jednotlivých obrázků. Vhodný polarizační modulátor byl vyvinut v naší laboratoři, a je předmětem českého patentu (Lazar J., patent č. 302233) a mezinárodní patentové přihlášky (PCT/CZ2010/000111).

Vizualizaci LD dat lze provést například obarvením snímků získaných s horizontální polarizací červeně a snímků s vertikální polarizací zeleně, a jejich překrytím (Obr.2.), případně s úpravou barevného kontrastu. LD lze kvantitativně popsat tzv. dichroickým poměrem, tj. poměrem intenzit fluorescence získaných s horizontální a vertikální polarizací laserového svazku.



Obr.2.: Matematické modely buněk kulovitého tvaru na kterých je znázorněna fluorescence membránového fluorescentního proteinu v závislosti na polarizaci excitujícího záření a orientaci fluoroforu. Šipky v pravých horních rozích odpovídají směru polarizace a následnému dobarvení. V dolním rohu každého modelu je vyznačena orientace fluoroforu vzhledem k buněčné membráně. Lineární dichroismus se projevuje jako přítomnost zelených či červených odstínů a absence žluté. (Lazar J., et al.)

Naše laboratoř ukázala, že metoda 2PPM je schopna poskytovat mnoho informací o fyziologických procesech v živé buňce, a to v reálném čase. 2PPM umožňuje např. citlivé sledování aktivace G-proteinů, změn v nitrobuněčné koncentraci Ca^{2+} , a sledování dalších procesů jichž se účastní membránové proteiny. Výhodami 2PPM jsou zejména vysoká citlivost, nutnost pouze jednoho fluorescentního proteinu (jednoduchost konstruktů, nedochází ke kontaminaci signálu např. druhou molekulou FP), využití celkové fluorescence jakožto signálu, a vysoké rychlosti odezvy sond. (Lazar J., et al) Metoda 2PPM se jeví jako velmi vhodná pro vývoj geneticky kódované optické sondy membránového napětí.

1.5. Prestin

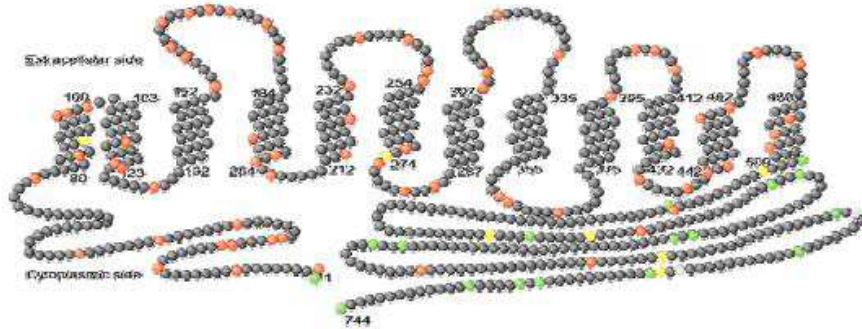
Prestin je protein přítomný v tzv. vnějších vlasových buňkách hlemýždě ucha obratlovců. Válečkovité vnější vlasové buňky reagují na změny elektrického potenciálu na buněčné membráně změnami v délce a tuhosti. Tyto mechanické změny vedou k zesílení zvuku detekovaného příslušnými sensorickými buňkami ucha. Molekulou klíčovou pro převod změn elektrického potenciálu na mechanické změny vnějších vlasových buněk je právě prestin. (Zhenk, J.; et al., 2000)

Prestin je membránový protein obsahující dvanáct transmembránových šroubovic. Nejspíše se jedná o nefukční transportér chloridových iontů. Při změně potenciálu na membráně buňky prestin mění svou konformaci, což vede ke změně mechanických vlastností vnějších vlasových buněk. Robustní konformační změny v molekule prestinu by měly být po spojení s fluorescentním proteinem pozorovatelné.

Pro využití prestinu při vývoji optické sondy umožňující sledování jednotlivých akčních potenciálů mluví několik příznivých vlastností. Reakce prestinu na změnu elektrického potenciálu je velice rychlá (10-20 mikrosekund). Pro srovnání, iontové kanály reagují na změny el. napětí během ~500 mikrosekund. Dalšími příhodnými vlastnostmi jsou robustní změny konformace, neschopnost vést elektrický proud a předpokládaná neschopnost interagovat s endogenně produkovanými iontovými kanály. Tyto vlastnosti dělají ze spojení prestinu a fluorescentního proteinu možný ideální nástroj pro sledování elektrických impulzů procházejících neurony. (Lazar J., Firestein S.J.)

Řada konstruktů na bázi prestinu, obsahujících FP, už byla připravena. Konstrukty obsahující FP vložený jinde než v C-terminální doméně vykazují problémy v membránové lokalizaci a ve funkci molekuly prestinu. Konstrukt, ve kterém je FP připojen k C-konci

prestinu zachovává funkci prestinu a membránovou lokalizaci, avšak nevykazuje LD. Cílem této práce je příprava série konstruktů se zkráceným C-koncem, u nichž lze očekávat jak zachování funkčních vlastností prestinu a membránové lokalizace, tak výskyt LD, jehož změny při změnách membránového napětí by nám měly umožnit sledování těchto změn napětí.



Obr.3.: Model molekuly prestinu prostupující dvanáctkrát membránou s N(1) a C(744) koncem na vnitřní straně membrány. Každá tečka představuje jednu aminokyselinu. Barevné tečky představují místa vložení YFP. (Lazar J., Firestein S.J.)

2. Cíle práce

- 1) Připravit sérii fluorescentně značených konstruktů na bázi prestinu.
- 2) Exprimovat tyto konstrukty v savčích buňkách.
- 3) Změřit optické vlastnosti (lineární dichroismus) exprimovaných proteinů pomocí 2PPM.

3. Materiál a metody

Během práce v laboratoři jsem použil čtyři různé fúzní konstrukty (plazmidy) prestinu a žlutého fluorescentního proteinu (YFP). Tyto plazmidy (PY-pEPAx1.4 , N603YFP-P.1-pEPAx2.4, A744YFP-P.1-pEPAx2.4 a A744YFP-P.1-pDONR201) jsem obdržel od svého školitele.

- **PY-pEPAx1.4 :**
 - Konstrukt obsahující motorický protein prestin citlivý na změnu el. potenciálu a na jeho C-konci navázaný žlutý fluorescentní protein.
 - Konstrukt obsahuje **expresní vektor**.
 - Rezistence na **ampicilin**.
 - Velikost konstruktů je 7,326 kb.

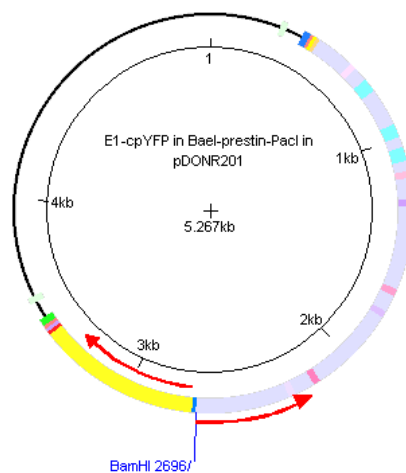
- **N603YFP-P.1-pEPAx2.4**
 - Konstrukt obsahující prestin se žlutým fluorescentním proteinem vloženým do C-terminální domény po aminokyselině N603.
 - Konstrukt obsahuje **expresní vektor**.
 - Rezistence na **kanamycin**
 - Velikost konstruktů je 7,445 kb.

- **A744YFP-P.1-pEPAx2.4**

- Konstrukt obsahující prestin a na jeho C-konci, po aminokyselině A744, navázaný YFP.
- Konstrukt obsahuje **expresní vektor**.
- Rezistence na **kanamycin**
- Velikost konstruktů je 7,445 kb.
- Tento konstrukt vykazuje slabý lineární dichroismus.

- **A744YFP-P.1-pDONR201:**

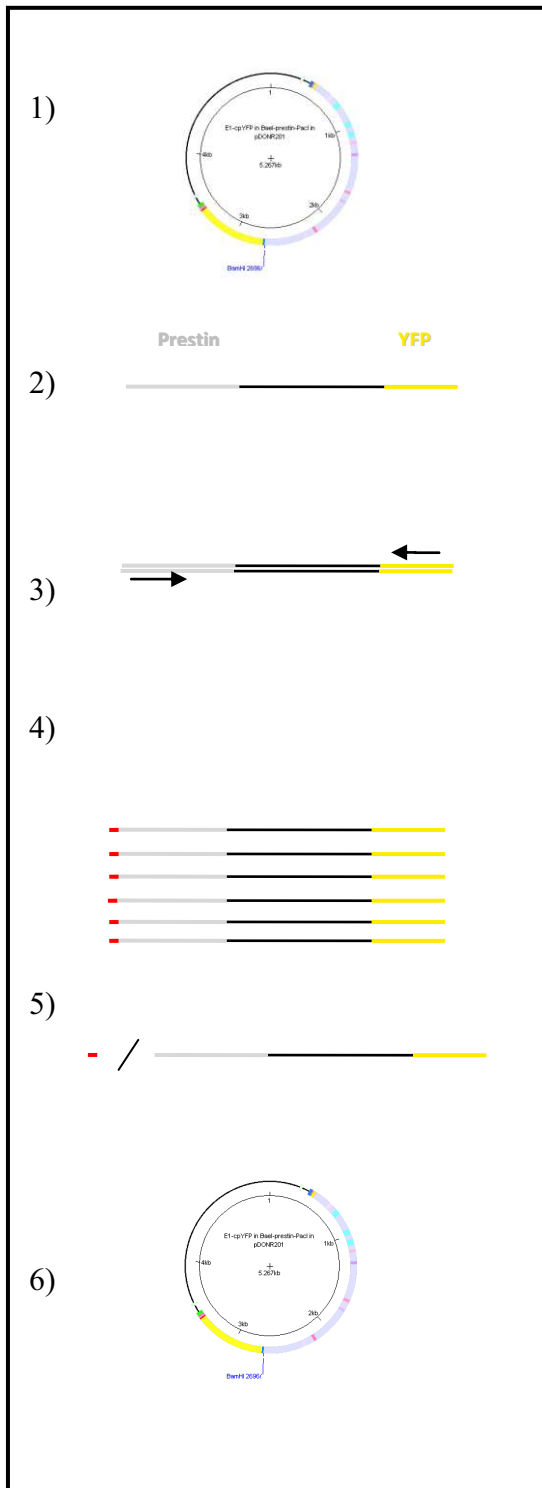
- Konstrukt obsahující prestin a na jeho C-konci, po aminokyselině A744, navázaný YFP.
- Konstrukt obsahuje **klonovací vektor**, který má rekombinační místa AttL, umožňující snadný přenos genů do jiných vektorů.
- Rezistence na **kanamycin**.
- Velikost konstruktů je 5,267 kb.



Obr.4.: Mapa plazmidu A744YFP-P.1-pDONR201 s šipkami označujícími místa a směr nasedání PCR primerů užitých při přípravě nových konstruktů.

2641		cccactccc	caggacgaca	tggagcccaa	tgccacacc	
		gggtggaggg	gtcctgctgt	acctcgggtt	acggtgtggg	
2681		accacaccgg	aggctggatc	cgtgagcaag	ggcgaggagc	
		tggtgtgggc	tccgacctag	gcactcgttc	ccgctcctcg	
2721		tgttcaccgg	ggtggtgccc	atcctggtcg	agctggacgg	
		acaagtggcc	ccaccacggg	taggaccagc	tcgacctgcc	

Obr.7.: Část mapy DNA plazmidu A744YFP-P.1-pDONR201. Šedivou barou je znázorněn C konec prestinu a žlutou barvou začátek YFP.



- 1) Výchozí kruhová molekula DNA.
- 2) Výchozí molekula DNA byla linearizována restričním enzymem BamHI (G'GATCC).
- 3) Linearizovaná molekula výchozího plasmidu byla zamplifikována pomocí PCR a primerů umožňujících zkrácení C-konce molekuly prestinu (Tab. IV).
- 4) Výsledkem metody PCR byly nové molekuly DNA obsahující zkrácený C-konec prestinu.
- 5) Konce molekul DNA byly upraveny restričním enzymem BamHI na tzv. lepivé konce.
- 6) Ligací pomocí T4 DNA ligázy získáme novou kruhovou molekulu DNA. Při využití plasmidu A744YFP-P.1.-pDONR201 je dále nutno přesunout gen prestinu-YFP do expresního vektoru pomocí homologní rekombinace.

Obr.8.: Schéma postupu při mé molekulární práci. Černě je označena DNA plasmidového vektoru, žlutá barva značí YFP, a šedivá barva prestin.

Escherichia coli:

Kompetentní buňky *E.coli* XL1 používané při transformaci byly uchovávány při teplotě -80°C.

Živočišné buňky:

Buňky HEK293 používané během mé práce byly uchovávány v inkubátoru při 37°C, v 5% CO₂ atmosféře se 100 % nasycením vodními parami.

Metody používané během mé práce:

Transformace *Escherichia coli* plazmidovou DNA:

Během transformace *E.coli* DNA byla udržována čistota a sterilní prostředí.

1. Na ledu bylo smícháno cca 50μl kompetentních bakterií s 0,5μl plazmidové DNA. Po přidání DNA byla směs protřepána a ponechána 20 minut v ledové lázni.
2. Směs byla ponořena na 45 sekund do vodní lázně o teplotě 42°C a vrácena zpět na led.
3. Po pěti minutách bylo přidáno 250μl LB média. Převrácením jsme suspenzi promíchali a nechali třepat 1 hodinu při 37°C.
4. 50μl suspenze bylo vyseto na agarové plotny obsahující antibiotikum (kanamycin nebo ampicilin), popřípadě do 5 ml LB média rovněž s přidáním antibiotikem.

Tab.I.:Koncentrace antibiotika.

		Výsledná koncentrace v 5ml LB
Koncentrace ampicilinu	50mg/ml	0,25mg
Koncentrace kanamycinu	50mg/ml	0,25mg

5. Vzorčky byly inkubované 10-18 hodin při teplotě 37°C, po ukončení růstu kolonií následovala izolace plazmidů.

Izolace DNA z *E.coli*:

Izolace DNA byla prováděna pomocí kitu QIAprep Spin firmy QIAGene, podle protokolu výrobce.

Restrikce:

Pomocí restrikčních endonukleáz bylo možné určit správnost vyextrahované DNA z buněk E.coli. Výsledky restrikce byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy.

Štěpení plazmidu A744YFP-P.1-pDONR201 bylo provedeno smísením sterilní H₂O (6 µl), plazmidu (2 µl), L pufru (10x, TaKaRa)(1 µl), a enzymu BamHI (TaKaRa)(1 µl). Směs byla inkubována 2 hodiny při 30°C.

Gelová elektroforéza:

Elektroforéza je analytická metoda založená na rozdílné pohyblivosti částic látky v elektrickém poli. Elektroforéza využívá rovnoměrného rozložení záporného náboje v molekule DNA. V agarózovém gelu jsou produkty restrikčních nebo amplifikačních reakcí (fragменты DNA) děleny podle své velikosti náboje a relativní molekulové hmotnosti.[9]

Postup přípravy agarozového gelu:

Chemikálie: 50ml 1x TAE pufr (50x TAE pufr: 242 g Tris báze, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5M EDTA pH 8, 1l H₂O), agaróza (0.5 g), roztok ethidium bromidu (2 µl)). Agaróza byla přidána k 1x TAE pufru a směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarózy. Po zchladnutí roztoku pod 50°C byl přidán ethidium bromid a směs byla vlita do formy, kde po dalším zchladnutí ztuhla na gel. Elektroforetická separace DNA byla typicky prováděna přiložením napětí 100V po dobu 60 minut. DNA byla vizualizována osvětlením UV zářením (365 nm) na UV-transluminátoru.

PCR – Polymerázová řetězová reakce

Metody PCR bylo použito k přípravě nových konstruktů DNA. Tato metoda umožňuje amplifikaci (zmnožení) určitého úseku DNA. PCR zahrnuje rozvolnění templátové DNA zvýšením teploty (> 90°C), nasedání námi zvolených krátkých molekul DNA (primerů) na komplementární úseky templátové DNA při snížené teplotě (50-70°C), a prodlužování primerů na základě sekvence templátové DNA prostřednictvím termostabilní DNA polymerázy při vhodné teplotě (65-75°C).

Tab.II.: Množství a koncentrace látek použitých v metodě PCR v reakční směsi pro plazmid A744YFP-P.1.-pDONR201. Reagencie (5x HF pufr, 10 mM dNTPs a Phusion polymeráza) pocházely od firmy New England Biolabs.

H ₂ O	18.0 µl
Vzorek DNA	0.2µl
5x HF pufr	5.0 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
forward primer	0,25 µl (50 pmol/ µl)
revers primer	0,25 µl (50 pmol/ µl)
Phusion polymerase	0,15 µl
Celkově	24,35µl

Tab.III.: Reakční teploty a časy užití pro přípravu plazmidů založených na A744YFP-P.1.-pDONR201 pomocí PCR.

	98°C	1 min
28x Denaturace (Denaturation)	98°C	10 s
Nasedání primerů(Annealing)	60°C	20 s
Prodlužování (Elongation)	72°C	2min 40s
	72°C	5 min

Tab.IV.: Použité primery pro PCR u plazmidu A744YFP-P.1.-pDONR201, pocházeli od firmy Sigma-Aldrich.

PrCTesF	5'- AAACGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAG
PrE743esR	5'- AAACGGATCCCTCGGGTGTGGTGGGTGT
PrP742esR	5'- AAACGGATCCGGGTGTGGTGGGTGTGGC
PrT741esR	5'- AAACGGATCCTGTGGTGGGTGTGGCATT
PrT740esR	5'- AAACGGATCCGGTGGGTGTGGCATTGGG
PrP739esR	5'- AAACGGATCCGGGTGTGGCATTGGGCTC
PrT738esR	5'- AAACGGATCCTGTGGCATTGGGCTCCAT
PrA737esR	5'- AAACGGATCCGGCATTGGGCTCCATGTC

Pasážování buněk:

Živočišné tkáňové kultury je třeba pravidelně pasážovat (zřed'ovat) aby nedocházelo k nadměrnému městnání a přerůstání buněk. Pasážováním lze také připravit živočišné buňky pro transfekci. Buňky HEK293 byly uvolněny pomocí trypsinu z podkladu a následně byly vloženy do nového média D-MEM (dodaného firmou Invitrogen). Médium s buňkami pro transfekci bylo umístěno 24 hodin v inkubátoru.

Transfekce buněk:

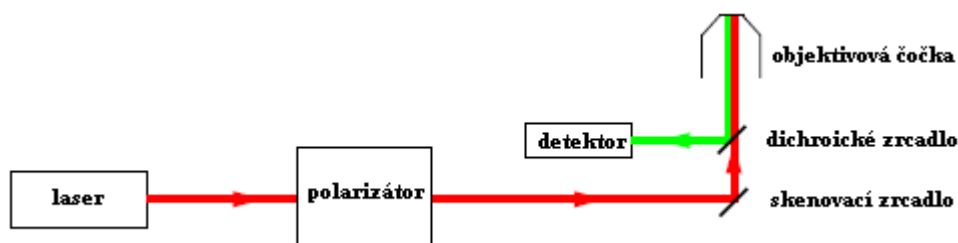
Transfekce je metoda vkládání cizorodé DNA do buněk. Existují různé metody transfekce, např. pomocí mikroinjekčního vložení DNA přímo do jádra buňky, elektroporací, či pomocí liposomů. Při naší práci bylo použito komerčního liposomálního reagentu Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a postupu doporučeného výrobcem. Po transfekci byly buňky umístěny na 24-48 hodin do inkubátoru, a následně byly pozorovány mikroskopicky.

Mikroskopické pozorování (2PPM)

Polarizační mikroskopie byla prováděna pomocí upraveného laserového skenovacího mikroskopu iMic. Tento mikroskop byl vybaven skenerem paprsku Yanus (od firmy Till Photonics) a femtosekundovým pulsním titan:safírovým laserem (Chameleon Ultra II, Coherent, UK), který pracoval při 800nm (pro CFP) nebo 960nm (pro YFP).

Při 2PPM bylo použito dichroického zrcadla (HQ700SP-2P, Chroma) a vhodných emisních filtrů (Brightline 479/40 – CFP, Brightline 542/27 – YFP, obě dodané firmou Semrock). Fluorescence byla detekována fotonásobičem (R6357, Hamamatsu Photonics). Mikroskop byl dále vybaven polarizátorem dovolujícím změnu polarizace excitujícího paprsku.

Pro zpracování obrazu bylo použito programu ImageJ.



Obr.9.: Schéma dvoufotonového polarizačního mikroskopu.

4. Výsledky

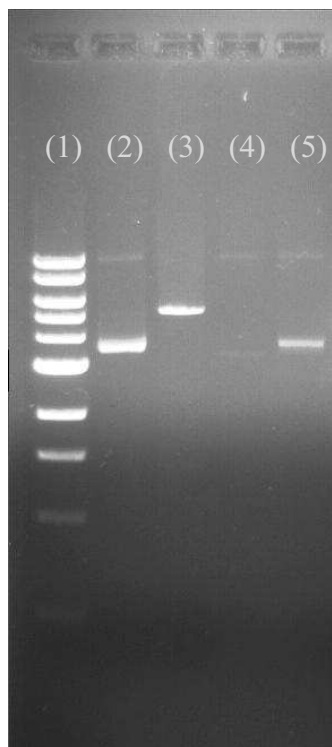
4.1. Příprava konstruktů

4.1.1. Příprava konstruktů vycházejících z PY-pEPAx1.4

Pro konstrukt PY-pEPAx1.4 byla navržena série primerů, které byly použity v PCR. Výsledky PCR však byly i po mnoha pokusech upravování reakčních teplot, časů a koncentrací reaktantů neúspěšné. Nejspíše zde docházelo ke tvorbě sekundárních struktur DNA zabraňujících nasedání primerů na žádoucí místa templátové DNA, a naopak k tvorbě nežádoucích produktů. Tyto problémy byly nakonec vyřešeny použitím jiného výchozího konstruktů (A744YFP-P.1-pDONR201) a jiných primerů.

4.1.2. Příprava konstruktů vycházejících z A744YFP-P.1-pDONR201

Jako druhý byl pro sestavení geneticky modifikované sondy použit konstrukt A744YFP-P.1-pDONR201. Byla navržena série nových primerů, které byly použity při amplifikaci metodou PCR. Tato metoda byla po přizpůsobení reakčních časů a teplot úspěšná a došlo tak k vytvoření žádaných molekul DNA.



Obr.10.: Výsledky přípravy nových molekul DNA znázorněné gelovou elektroforézou. Na gelu je znázorněn:

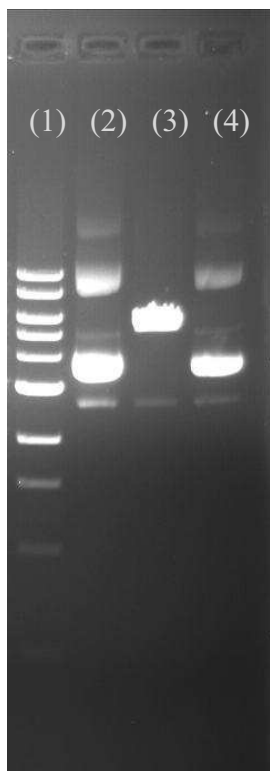
(1) marker-1kb DNA ladder (New England Biolabs).

(2) výchozí plazmid A744YFP-P.1-pDONR201 – tento konstrukt má velikost 5,267kb, zde je však v kruhové formě, proto umístění DNA na gelu vzhledem k markeru neodpovídá velikosti.

(3) produkt reakce PCR s dvojicí primerů PrCTesF a PrT741esR. Poloha proužku odpovídá očekávané velikosti výsledné DNA.

(4) produkt ligace (cirkularizace) molekul DNA získané z reakce PCR. Velikosti přítomných proužků se shodují s výchozí kruhovou DNA v (2).

(5) výsledný plazmid (opět kruhová molekula) získaný transformací zligované DNA (4) a izolací z bakterií.



Obr.11.: Analýza správnosti sekvence připraveného plazmidu pomocí gelové elektroforézy. Na gelu je postupně znázorněn:

- (1) marker- 1kb DNA ladder (dodaný firmou New England Biolabs).
- (2) nový plazmid (stejný jako slot 5, obr. 10), vycházející z A744YFP-P.1-pDONR201 (jedná se o kruhovou molekulu DNA)
- (3) štěpení pomocí enzymu BamHI ukazuje přítomnost restrikčního místa pro tento enzym, v souladu s očekáváním.
- (3) štěpení pomocí enzymu PmeI nám ukazuje nepřítomnost bází kódovaných primery při metodě PCR, odstraněných při přípravě lepivých konců.

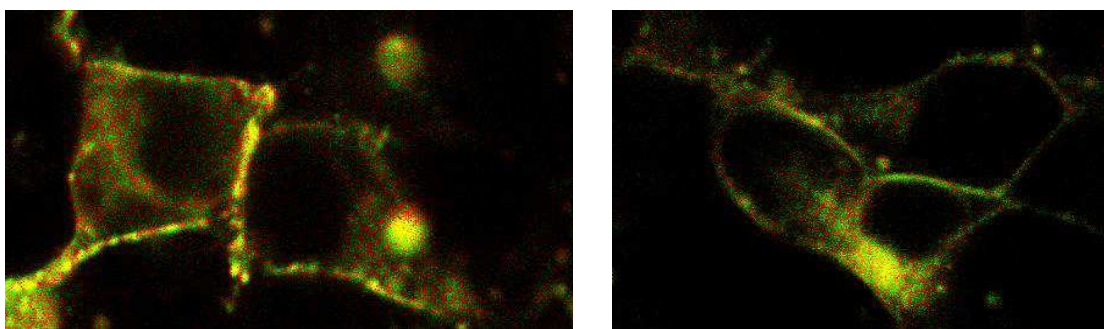
Podařilo se nám připravit nový konstrukt s primery PrCTesF a PrT741esR. Tento konstrukt obsahuje klonovací vektor pDONR201. Proto je nutné pro exprimaci v živočišných buňkách provést rekombinaci do vhodného expresního vektoru.

PCR reakce za použití primerů PrE743esR, PrP742esR, PrT741esR, PrT740esR a PrP739esR poskytly molekuly DNA očekávané velikosti. Pro získání konečných konstruktů je však třeba tyto molekuly upravit tak, jak to bylo provedeno s výše popsaným produktem reakce PCR, a také provést rekombinaci do expresního vektoru.

4.2. Výsledky mikroskopického zobrazování

4.2.1. A744YFP-P.1-pEPAx2.4

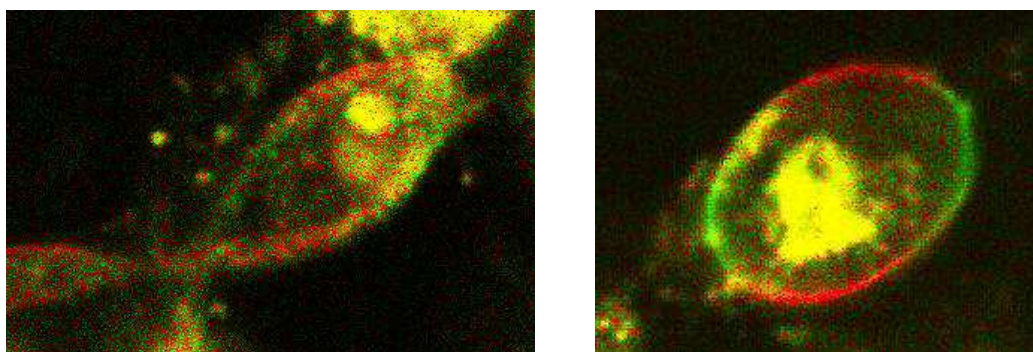
Konstrukt A744YFP-P.1-pEPAx2.4 byl úspěšně transfekován do živočišných buněk HEK293. Následně byla pozorována dvoufotonová fluorescence.



Obr.12.: Seskupení živočišných buněk HEK293 transfekovaných plazmidem A744YFP-P.1-pEPAx2.4. Poměr intenzit fluorescence získaných s horizontální a vertikální polarizací laserového svazku (dichroický poměr) je u obou výrazně menší než 1.25, tj. přítomný LD je malý.

4.2.2. N603YFP-P.1-pEPAx2.4

Konstrukt N603YFP-P.1-pEPAx2.4 byl transfekován do živočišných buněk HEK293. Následně byla pozorována fluorescence. Tento konstrukt byl transfekován jako pozitivní kontrola, protože je z našich předchozích pokusů známo, že vykazuje LD.



Obr.13.: Buňky HEK293 transfekované plazmidem N603YFP-P.1-pEPAx2.4. Je dobře patrný lineární dichroismus. Dichroický poměr je u obou roven 1.3.

4. Diskuse

Sledování přenosu elektrického vzruchu na neuronech je možné pomocí různých metod využívající jak fluorescenci, tak i jiné fyzikální jevy. Slibnými se jeví obzvláště metody využívající geneticky kódovaných optických sond, avšak tyto zatím neumožňují sledování jednotlivých akčních potenciálů v neuronech. Lze očekávat, že tuto bariéru prolomí v naší laboratoři vyvinutá metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie fluorescentních proteinů.

Cílem mé práce bylo proto vytvořit geneticky kódovanou sondu citlivou na membránové napětí na bázi motorického proteinu prestinu. Tuto sondu, které by splňovala námi požadovaná kritéria, se sice zatím zkonstruovat nepodařilo, avšak dosažené výsledky ukazují proveditelnost přípravy zvolených konstruktů, a možnost pozorování lineárního dichroismu u konstruktů na bázi prestinu. Během práce na projektu se podařilo překonat obtíže spojené s přípravou konstruktů, a dosažené výsledky jsou dobrým základem pro pokračování úsilí o vytvoření geneticky kódované sondy membránového napětí.

5. Závěr

Ačkoliv plánovaná série konstruktů na bázi motorického proteinu prestinu nebyla zatím připravena, příprava několika konstruktů je v pokročilé fázi. Výsledky mé práce budou využity při další práci na vývoji geneticky kódované sondy membránového napětí, využitelné ke sledování jednotlivých akčních potenciálů v neuronech.

6. Seznam citované literatury:

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A. (1998), *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2.vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 630 s., ISBN 80-902906-2-0.

Brain Windows [online]. 9.11.2009 [cit. 2011-01-03]. Dostupné z WWW: <<https://brainwindows.wordpress.com/tag/gcamp3/>>.

CAMPAGNOLA, P.J. and LOEW, L.M., (2003) Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms.. *Nature biotechnology*., 21, s. 1356 - 1360.

FMRI TEAM Brno [online]. 2004, 24. 11. 2010 [cit. 2011-01-03]. Dostupné z WWW: <<http://fmri.mchmi.com>>.

GUERRERO, G.; ISACOFF, E.Y. (2001), Genetically encoded optical sensors of neuronal activity and cellular function. *Current Opinion in Neurobiology*. 11, s. 601–607

HAMRLOVÁ, A. (2007), *Identifikace osob pomocí DNA*. Brno, 47 s. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita.

CHALFIE, M. (1994), Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, Vol 263, s. 802-805.

Laboratory of Neuro Imaging [online]. 2008 [cit. 2011-01-03]. Optical Intrinsic Signals. Dostupné z WWW: <<http://www.loni.ucla.edu/Research/Projects/OIS.shtml>>.

LAKOWICZ, J R., (2006), *Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed.*. New York : Springer, 925 s.

LAZAR J., Způsob získávání strukturních a funkčních informací o proteinech na bázi polarizační fluorescenční mikroskopie a zařízení k provádění tohoto způsobu. patent č. 302233 ÚPV ČR.

LAZAR J., et al. Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. Manuskript v druhém kole reviews, Nature Methods.

LAZAR J.; FIRESTEIN S.J., Voltage sensitive fluorescent protein based on the motor protein prestin.- Dosud nepublikováno.

PALMER, A.E. , et al., (2006), Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs . *Chemistry & Biology.*, 13, s. 521-530.

PERRON, Amelie, et al. (2009), Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential. *Frontiers in Molecular Neuroscience.*, vol.2., s. Article 5.

SIEGEL, M.S.; ISACOFF, E.Y. (1997), A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. *Cell Press : Neuron.*, Vol. 19., s. 735–741.

SULLIVAN, K.F. (2008), *Fluorescent Proteins.*, Vol:85, Methods in Cell Biology. USA : Elsevier, Academic press, 585 s.

SUTER, K.J., et al. (2000) Genetic Targeting of Green Fluorescent Protein to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons: Characterization of Whole-Cell Electrophysiological Properties and Morphology. *Endocrinology.*, Vol 141, s. 412-419.

The Molecular Probes Handbook. 11th Edition. [s.l.] : Invitrogen, 2010. Dostupné z WWW: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/>>.

TIAN, L., et al., (2009), Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods.*, 6, s. 875–881

TSIEN, R.Y. (1998), The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, s. 509-544.

TROJAN S. (2003), *Lékařská fyziologie*, Grada Publishing, ISBN 80-247-0512-5

Vergara Lab [online]. 2010 [cit. 2011-01-03]. Development of optical methods for monitoring voltage in groups of neuroanatomically-defined neurons. Dostupné z WWW: <<http://www.physiology.ucla.edu/Labs/jv/Projects.html>>.

Zeiss [online]. 2010 [cit. 2011-01-03]. Zeiss Logo Education in Microscopy and Digital Imaging. Dostupné z WWW:<<http://zeisscampus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>>.

ZHENG, J.; et al., (2000), Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, VOL 405(6783), s 149-155.