



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 Sanetníková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ondřej Svoboda

BRNO 2016



Diplomová práce

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

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Dominika Sanetrníková

ID: 147704

Ročník: 2

Akademický rok: 2015/16

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: 8.2.2016

Termín odevzdání: 20.5.2016

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Svoboda

Konzultant diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provozník, 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

Tato práce se v úvodu věnuje seznámení s plasmidovou DNA, která se v podobě vektoru využívá v molekulární biologii. Ve formě fluorescenčních sond lze plasmidy využít pro měření změn membránového potenciálu. Do jejich struktury se přidává barvivo fluorofor. Důležitým zástupcem této práce je fluorescenční sonda ASAP1, která obsahuje zelený fluorescenční protein, jehož reakcí na změnu membránového potenciálu je pokles intenzity emitovaného světla. Cílem práce bylo provést chemickou transfekci tohoto plasmidu do buněčné linie HEK293 a provést jeho charakterizaci. V práci je rovněž navržena metoda pro analýzu časového průběhu změn fluorescence v závislosti na depolarizaci buněčné membrány. V závěru práce je popsán uskutečněný experiment včetně diskuze získaných výsledků.

ABSTRACT

In the beginning of this thesis is a short introduction into plasmid DNA which is in the form of a vector used in molecular biology. Plasmids can be used in the form of fluorescent probes to measure changes in membrane potential. Into their structure is added a dye called fluorophore. As an important representative of this thesis is a fluorescent probe ASAP1 which contains green fluorescent protein whose response to the membrane potential change is the decrease in the intensity of emitted light. The aim of this thesis was to make chemical transfection of this plasmid into the HEK293 cell line and carry out its characterization. In the work is also described the design of a method for the analysis of the time course of changes in fluorescence depending on the cell membrane depolarisation. In the end of this thesis is also described realized experiment including the discussion of acquired results.

KLÍČOVÁ SLOVA

napěťový senzor, fluorescenční sonda, Accelerated Sensor of Action Potentials 1, ASAP1, zelený fluorescenční protein, GFP, HEK293, transfekce, patch-clamp

KEY WORDS

voltage sensor, fluorescent probe, Accelerated Sensor of Action Potentials 1, ASAP1, green fluorescent protein, GFP, HEK293 cells, transfection, patch-clamp

SANETRŇÍKOVÁ, D. *Studium vlastností membránového napěťového senzoru ASAP1 exprimovaného v buněčné linii HEK 293*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016. 114 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Ondřej Svoboda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma „*Studium vlastností membránového napěťového senzoru ASAP1 exprimovaného v buněčné linii HEK 293*“ 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních anebo 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 20. května 2016

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Ondřeji Svobodovi za trpělivost, účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Velké poděkování patří také mojí rodině, příteli a nejbližším za neustálou podporu, pomoc, trpělivost a lásku, kterou mi dodávali během mého studia.

OBSAH

Seznam obrázků	viii
Seznam tabulek	xii
Seznam symbolů, veličin a zkratek	xiv
Úvod	15
1 Plasmidová DNA	16
2 Fluorescenční napět'ově citlivé sondy	18
2.1 Fluorescenční proteiny	20
2.1.1 Zelený fluorescenční protein	20
2.1.2 Červený fluorescenční protein	24
2.2 Fluorescenční sondy založené na bázi napět'ově citlivých oblastí.....	25
2.2.1 Napět'ově citlivá oblast mikrobiálního rhodopsinu	25
2.2.2 Napět'ově citlivá oblast fosfatáz	27
2.2.3 Accelerated Sensor of Action Potentials 1	28
2.3 Fluorescenční sondy založené na bázi vápníku	30
2.3.1 GCaMP fluorescenční sondy	32
2.3.2 TN fluorescenční sondy	33
2.3.3 Camgaroo fluorescenční sondy.....	35
3 Chemická napět'ově citlivá membránová barviva	37
3.1.1 Barviva ANEP	38
3.1.2 Barviva RH	40
4 Buněčné kultury	41
4.1 Buněčné linie.....	42
4.1.1 Buněčná linie HEK293	42
4.1.2 Kultivace buněčných linií HEK293	44
5 Transfekce plasmidů	46
5.1 Transfekční metody.....	48
5.1.1 Biologické metody transfekce plasmidů.....	48

5.1.2	Biochemické metody transfekce plasmidů	50
5.1.3	Fyzikální metody transfekce plasmidů	52
6	Patch-Clamp	54
6.1	Metody využívané pro záznam technikou patch-clamp.....	56
6.2	Skleněné mikroelektrody určené pro patch-clamp.....	59
6.3	Využití techniky patch-clamp při studiu změn membránového napětí pomocí napětově citlivých sond	61
7	Studium vlastností napět'ového senzoru ASAP1	64
7.1	Použité materiály a přístroje.....	64
7.2	Experiment	65
7.3	Dosažené výsledky a jejich diskuze	71
	Závěr	79
	Literatura	80
	Přílohy	88
A	Obsah přiloženého CD	88
B	Studium vlastností napět'ového senzoru ASAP1	89
B.1	Buňka číslo 1	91
B.2	Buňka číslo 2.....	93
B.3	Buňka číslo 3.....	95
B.4	Buňka číslo 4.....	97
B.5	Buňka číslo 5.....	99
B.6	Buňka číslo 6.....	101
B.7	Buňka číslo 7.....	103
B.8	Buňka číslo 8.....	105
B.9	Buňka číslo 9.....	107
B.10	Buňka číslo 10.....	109
B.11	Buňka číslo 11	111
B.12	Standardizované hodnoty maximálních úrovní stupňů šedi pro konkrétní napětí u všech buněk.....	113

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.1: Obecné schéma vektoru, [16].	17
Obrázek 2.1: Jablonského diagram, [20].	19
Obrázek 2.2: Vlevo chemická struktura GFP, [27]; vpravo 3D struktura GFP, beta-soudek, uvnitř alfa-helix, [28].	22
Obrázek 2.3: Excitační a emisní spektra EGFP, jeho barevných variant, a proteinu DsRed, [31].	23
Obrázek 2.4: 3D struktura DsRed, čtyři beta-soudky s vnořenými alfa-šroubovicemi, [32].	24
Obrázek 2.5: Protonace Schiffovy báze při depolarizaci membrány oranžovým světlem, [40].	26
Obrázek 2.6: Fosfolipidová membrána s doménami a vyznačenou extracelulární smyčkou mezi oblastí S3-S4, [41].	27
Obrázek 2.7: Chování cpGFP při polarizaci a depolarizaci membrány, [6].	28
Obrázek 2.8: Mapa vektoru ASAP1.	30
Obrázek 2.9: Struktura vápníkové sondy GCaMP reagující na vazbu s vápníkovými ionty, [48].	32
Obrázek 2.10: Mapa vektoru GCaMP6s, [49].	33
Obrázek 2.11: Struktura vápníkové sondy TN reagující na vazbu s vápníkovými ionty, [45].	34
Obrázek 2.12: Minimální motiv troponinu C, [45].	35
Obrázek 2.13: Mapa vektoru Twitch, [52].	35
Obrázek 2.14: Struktura vápníkové sondy Camgaroo reagující na vazbu s vápníkovými ionty, [51].	36
Obrázek 3.1: Excitační a emisní spektrum, Stokesův posun, [18].	37
Obrázek 3.2: Chemická struktura základního a excitovaného stavu barviva di-4-ANEPPS, [57].	38
Obrázek 3.3: Posun emisního spektra u barviv ANEP, změna fluorescence ΔF .	39
Obrázek 3.4: Chemická stavba barviva RH-1691, [60].	40
Obrázek 4.1: Buněčná linie HEK293, [75].	44
Obrázek 5.1: Rozdíl mezi stabilní a přechodnou transfekcí, [77].	47
Obrázek 5.2: Životní cyklus bakteriálního viru, [81].	49
Obrázek 5.3: Obecná transdukce, [84].	50
Obrázek 5.4: Chemická transfekce polykationtovým ligandem PEI, [85].	51
Obrázek 5.5: Transfekce pomocí elektroporace, [89].	53

Obrázek 6.1: Tvorba <i>seal</i> mezi buněčnou membránou a špičkou mikroelektrody, [12].	55
Obrázek 6.2: Metoda <i>patch-clamp</i> , [11].	56
Obrázek 6.3: Režim <i>cell-attached</i> , měřený úsek zůstává součástí buněčné membrány, [90].....	57
Obrázek 6.4: Režim <i>whole-cell</i> , měřený úsek zůstává součástí protržené buněčné membrány, [90].....	57
Obrázek 6.5: Režim <i>inside-out</i> , měřený úsek nezůstává součástí buněčné membrány, [90].....	58
Obrázek 6.6: Režim <i>outside-out</i> , měřený úsek nezůstává součástí buněčné membrány, [90].....	58
Obrázek 6.7: Režim <i>perforated-patch</i> , měřený úsek zůstává součástí buněčné membrány, [90].....	59
Obrázek 6.8: Metoda <i>loose-patch clamp</i> , mezera mezi mikroelektrodou a membránou, [90].....	59
Obrázek 6.9: Postup zahřívání a tahání trubičky vedoucí k vytvoření mikroelektrod, [12].....	60
Obrázek 7.1: Stimulační protokol vyšetřovaných buněk.	66
Obrázek 7.2: Signál pocházející s neporušené mikroelektrody.	68
Obrázek 7.3: Signál pocházející z prasklé mikroelektrody.....	68
Obrázek 7.4: Maximální hodnoty úrovně stupně šedi [0 255] v jednotlivých snímcích.	73
Obrázek 7.5: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV.....	74
Obrázek 7.6: Grafické vyjádření zprůměrovaných hodnot maximálních hodnot stupňů šedi pro všechny buňky a konkrétní napětí.....	75
Obrázek 7.7: Grafické vyjádření standardizovaných hodnot stupňů šedi vůči dvěma zvoleným napětím <i>holding potential</i> -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.	76
Obrázek 7.8: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí.....	77
Obrázek B.1: Stimulační protokol vyšetřovaných buněk.....	89
Obrázek B.2: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV pro buňku číslo 1 (B1).....	91
Obrázek B.3: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B1.	91

Obrázek B.4: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B1.	92
Obrázek B.5: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B2.	93
Obrázek B.6: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B2.	93
Obrázek B.7: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B2.	94
Obrázek B.8: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B3.	95
Obrázek B.9: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B3.	95
Obrázek B.10: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B3.	96
Obrázek B.11: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B4.	97
Obrázek B.12: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B4.	97
Obrázek B.13: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B4.	98
Obrázek B.14: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B5.	99
Obrázek B.15: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B5.	99
Obrázek B.16: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B5.	100
Obrázek B.17: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B6.	101
Obrázek B.18: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B6.	101
Obrázek B.19: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B6.	102
Obrázek B.20: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B7.	103
Obrázek B.21: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B7.	103

Obrázek B.22: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B7.	104
Obrázek B.23: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B8.	105
Obrázek B.24: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B8.	105
Obrázek B.25: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B8.	106
Obrázek B.26: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B9.	107
Obrázek B.27: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B9.	107
Obrázek B.28: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B9.	108
Obrázek B.29: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B10.	109
Obrázek B.30: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B10.	109
Obrázek B.31: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B10.	110
Obrázek B.32: Vlevo hodnota výchozího <i>holding potential</i> -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B11.	111
Obrázek B.33: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B11.	111
Obrázek B.34: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B11.	112
Obrázek B.35: Grafické vyjádření zprůměrovaných hodnot maximálních hodnot stupňů šedi pro všechny buňky a konkrétní napětí.	113
Obrázek B.36: Grafické vyjádření standardizovaných hodnot stupňů šedi vůči dvěma zvoleným napětím <i>holding potential</i> -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.	114

SEZNAM TABULEK

Tabulka 7-1: Použité chemikálie pro výrobu pipetových a koupelových roztoků.....	64
Tabulka 7-2: Použité přístroje a pomůcky při manipulaci s buňkami HEK293, výrobě mikroelektrod a pipetových a koupelových roztoků.....	65
Tabulka 7-3: Použité přístroje a pomůcky při <i>patch-clamp</i>	65
Tabulka 7-4: Chemické složení koupelového roztoku K_{ir}	70
Tabulka 7-5: Chemické složení pipetového roztoku číslo 5.....	70
Tabulka 7-6: Chemické složení koupelového roztoku ASAP.....	71
Tabulka 7-7: Chemické složení pipetového roztoku číslo 6.....	71
Tabulka 7-8: Hodnoty maximální úrovně stupně šedi pro dané hodnoty stimulačního napětí.....	73
Tabulka 7-9: Zprůměrované hodnoty maximálních stupňů šedi pro všechny buňky u konkrétního napětí.....	75
Tabulka 7-10: Standardizované hodnoty stupňů šedi konkrétních napětí pro všechny vyšetřované buňky vztažená k hodnotám <i>holding potential</i> -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.....	76
Tabulka 7-11: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu.....	77
Tabulka 7-12: Konfigurace používaného počítače.....	78
Tabulka B-1: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B1.....	91
Tabulka B-2: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B1.....	92
Tabulka B-3: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B2.....	93
Tabulka B-4: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B2.....	94
Tabulka B-5: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B3.....	95
Tabulka B-6: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B3.....	96
Tabulka B-7: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B4.....	97
Tabulka B-8: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B4.....	98

Tabulka B-9: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B5.....	99
Tabulka B-10: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B5.....	100
Tabulka B-11: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B6.....	101
Tabulka B-12: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B6.....	102
Tabulka B-13: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B7.....	103
Tabulka B-14: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B7.....	104
Tabulka B-15: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B8.....	105
Tabulka B-16: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B8.....	106
Tabulka B-17: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B9.....	107
Tabulka B-18: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B9.....	108
Tabulka B-19: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B10.....	109
Tabulka B-20: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B10.....	110
Tabulka B-21: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B11.....	111
Tabulka B-22: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B11.....	112
Tabulka B-23: Zprůměrované hodnoty maximálních stupňů šedi pro všechny buňky u konkrétního napětí.....	113
Tabulka B-24: Standardizované hodnoty stupňů šedi konkrétních napětí pro všechny vyšetřované buňky vztažené k hodnotám <i>holding potential</i> -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.....	114

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
CFP	cyan fluorescent protein, tyrkysový fluorescenční protein
BFP	blue fluorescent protein, modrý fluorescenční protein
YFP	yellow fluorescent protein, žlutý fluorescenční protein
RFP	red fluorescent protein, červený fluorescenční protein
DsRed	Discosoma Red fluorescent protein, červený fluorescenční protein
GKI	geneticky kódovaný indikátor
GCaMP	sonda obsahující zelený fluorescenční protein, vápník vázající protein kalmodulin a peptid M13 reagující s kalmodulinem
CaM	vápník vázající protein kalmodulin
TN	sondy obsahující vápník vázající protein troponin C
cpGFP	cirkulární (permutovaný) zelený fluorescenční protein
EGFP	enhanced GFP
ASAP1	Accelerated Sensor of Action Potentials 1
cpsfGFP-OPT	circularly permuted superfold GFP OPT
ANEP	barviva obsahující aminonaphthylethylenylpyridinium
RH	barviva syntetizovaná Rinou Hildesheimovou
HEK293	lidské embryonální ledvinné buňky
PEI	polyethylenimin

ÚVOD

Plasmidová DNA je důležitou součástí výzkumu a molekulární biologie. Ve formě vektorů jsou plasmidy využívány pro přenos cizorodé DNA do hostitelské buňky metodou zvanou transfekce. Transfekcí stabilní dochází k plnému začlenění vpravené nukleové kyseliny do genomu hostitelské buňky. Přejídnou transfekcí se začlenění nedocílí, vpravená nukleová kyselina se po buněčném dělení nestává součástí buněk dceřiných [1,2,3,4,5].

Fluorescenční sondy, využívané pro sledování změn membránového napětí, představují kruhové plasmidy, do jejichž struktury byl uměle přidán fluorofor. Barvivo reaguje na změny membránového potenciálu změnou intenzity emitovaného světla. Fluorescenční plasmid ASAP1 obsahuje zelený fluorescenční protein, který se nachází na extracelulární smyčce mezi napěťově citlivými oblastmi S3 a S4. Změnou membránového potenciálu při depolarizaci buňky dochází ke změně jejich konformace. Výsledkem je postupné snižování intenzity fluoreskujícího proteinu, a proto se zdá, že dochází k jeho vyhasínání. Ve skutečnosti však v zelené oblasti září neustále, pouze se mění intenzita emitovaného světla [6].

Fluorescenční sondy se pomocí transfekčních metod vpravují do hostitelského organismu, aby změny membránového napětí mohly monitorovat. Konkrétně uvedený plasmid ASAP1 lze vložit do buněčné linie HEK293. Tato linie pochází z ledvinných buněk lidského embrya a k její první kultivaci došlo v roce 1970. Jelikož do ní byla vložena virová DNA adenoviru 5, došlo k transformaci. Tímto způsobem buněčná linie získala vlastnosti neuronálních buněk [7,8,9,10].

Měření membránového potenciálu je umožněno metodou *patch-clamp*, která byla objevena v roce 1976 německými badateli Bertem Shackamennem a Erwinem Neherem. Díky dalšímu objevu, skleněných mikroelektrod, se měření membránového napětí posunulo až na molekulární úroveň. Mikroelektrody musejí obsahovat roztoky, které svým složením napodobují intracelulární prostředí vyskytující se v buňce. *Patch-clamp* metodou nedochází ke vpichu elektrody do vnitřního prostředí buňky. Elektroda se membrány pouze dotýká a následně vzniklým podtlakem dochází k jejímu vchlípení do špičky elektrody. Další techniky *patch-clamp* metody mohou pracovat s částí membrány (*inside-out*, *outside-out*) anebo s celou buňkou (*whole-cell*) [11,12,13,14].

1 PLASMIDOVÁ DNA

Plasmidovou deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), nebo také plasmidem, rozumíme malou kruhovou dvouvláknovou molekulu DNA, která je schopna samostatné replikace. Je součástí cytoplazmy prokaryotických organismů – bakterií a archebakterií, u nichž se vyskytují nejčastěji, objevuje se však také u některých eukaryot. Jejich obsah v buňce tvoří asi 5% prokaryotní DNA ve srovnání s DNA chromozomální [1,2].

Největší význam mají plasmidy u bakterií, které se často vyznačují tím, že geny obsažené v plasmidech poskytují bakteriím jistou výhodu, kterou známe například pod pojmem rezistence vůči antibiotikům, dále nesou geny rezistence vůči mutagenům, jsou odolné vůči těžkým kovům a bakteriofágům, a také jsou v plasmidech obsaženy geny, které umožňují produkci restričních enzymů a toxinů. V neposlední řadě obsahují geny pro přenos informací mezi organismy – bakterie jsou schopné si takto předávat informace prostřednictvím horizontální výměny nebo během dělení, kdy každá dceřiná buňka získá kopii každého plasmidu. Pro životní funkce bakterie však geny obsažené v plasmidech nezbytné nejsou [1,15].

Plasmidy se staly důležitou součástí výzkumu v molekulární biologii a to z několika důvodů. Jedním z nich je například vlastní replikace – pokud je plasmid jednou získán, lze z něj dále tvořit nekonečné množství kopií tohoto plasmidu umístěním do bakterie, v níž se množí; jednoduchost jejich uchování – jsou stabilní jak uvnitř bakterie, tak jako purifikovaná DNA; jejich velikost dosahující od tisíce po desítky tisíc párů bází umožňuje snadnost zacházení a práce s nimi [3,4].

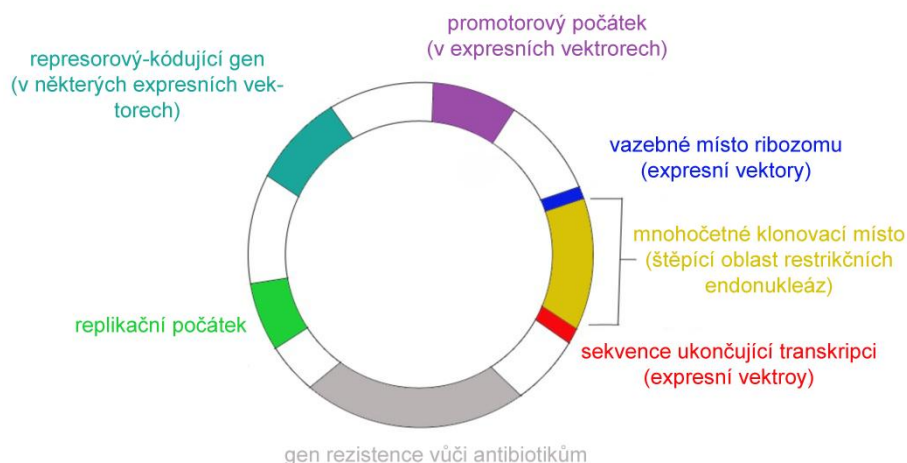
Jejich využití spočívá ve formě tzv. vektoru, což je syntetizovaná molekula DNA obsahující všechny sekvence potřebné pro inserci, začlenění a replikaci v daném hostitelském organismu. Vektory jsou využívány pro přenos cizí DNA do hostitelské buňky. Fragментy DNA nebo geny se vkládají do plasmidu a výsledkem je tzv. rekombinantní vektor, jehož následný přenos do hostitelské buňky probíhá formou transformace (u prokaryot) nebo transfekce (u eukaryot). Tento proces zajišťuje, že se daná sekvence DNA (fragment) rekombinantního vektoru přenesou do jádra hostitelské buňky, kde může dojít k expresi genů tohoto plasmidu nebo k jeho začlenění do genomu hostitelské buňky [1,3,4,5].

Pokud má tento vektor sloužit jak k přenesení do cílové buňky, tak i k zajištění jeho klonování v buňce, jedná se o tzv. klonovací vektor. Pro klonování je důležité upravit daný plasmid pro konkrétní účel genetickou modifikací. Tyto plasmidy obsahují sekvenci pro zajištění replikace, jež je rozpoznávána DNA-polymerázou hostitelské buňky, označení takového místa nese název počátek replikace (*ori*). Dále

musí obsahovat bakteriální gen představující rezistenci nejčastěji vůči antibiotikům, tedy gen poskytující bakterii určitou výhodu, jak již bylo napsáno výše a nakonec tzv. mnohočetné klonovací místo (*MCS* – multiple cloning site) představující krátký úsek DNA, který obsahuje velké množství restričních míst umožňujících tento plasmid rozštěpit mnoha různými restričními endonukleázami. Nejčastějším hostitelem buněčných kultur, který je v molekulární biologii využíván, je bakterie *Escherichia coli*. Patří mezi nejvíce prozkoumané bakterie, a proto slouží jako modelový organismus [3,4,5].

Vedle vektorů klonovacích existují i specializované plasmidy, které umožňují expresi specifického genu uvnitř hostitelského organismu například pro účely studia daného genu nebo pro nadprodukcii proteinů. Existují také pozitivně selektivní vektory, které umožňují růst pouze těm bakteriálním koloniím, jež nesou rekombinantní plasmidy. Naopak ty, které jej nenesou, nemohou kolonie tvořit [4].

Schéma obecného plasmidu je uvedeno na **obrázku 1.1**.



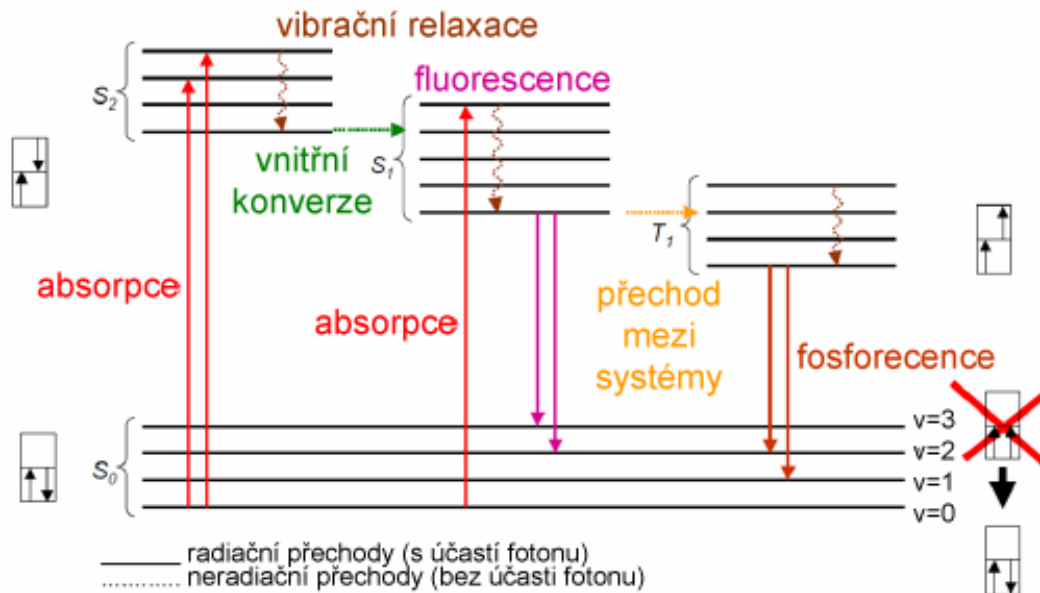
Obrázek 1.1: Obecné schéma vektoru, [16].

2 FLUORESCENČNÍ NAPĚŤOVĚ CITLIVÉ SONDY

Každá buňka nacházející se v klidu se vyznačuje klidovým membránovým napětím, které se pohybuje v rozmezí -90 mV (některé buňky -100 mV) až -50 mV. Záporné znaménko představuje záporný potenciál vnitřního prostředí buňky vůči jejímu okolí. Pokud u excitabilní buňky dojde během depolarizace k překročení určitého prahu membránového napětí, vzniká impulz akčního potenciálu. Depolarizace následně pokračuje spontánně. Tato vlastnost generace akčního napětí je lokální vlastností membrán vzrušivých (excitabilních) buněk a buněčných vláken, u nichž se vybuzený úsek stává zdrojem nadprahového podráždění pro sousední úsek, který nebyl doposud vybuzen [11].

Fluorescenční sondy jsou ve skutečnosti kruhové molekuly, tzv. plasmidy. Patří do skupiny nevlastních fluorescenčních barviv (fluoroforů, fluorochromů). Do sledované struktury se uměle přidávají, přičemž vazba k této struktuře je nekovalentní a často během ní dochází ke změně fluorescenčních vlastností fluoroforů. Fluorofory jsou látky absorbující světelnou energii o určité vlnové délce (z viditelné i ultrafialové oblasti), což způsobí přeskok elektronů v obalu atomu z nižší (základní) energetické hladiny na hladinu vyšší (excitovanou). Jednotlivé singletové stavy jsou na **obrázku 2.1** označeny pomocí symbolů S_0 , S_1 , S_2 . Každý tento energetický stav umožňuje molekulám fluoroforů existenci v jednotlivých vibračních hladinách v_0 , v_1 , v_2 , v_3 . Excitovaný stav do některé z vyšších vibračních hladin energetických stavů S_1 a S_2 není stabilní. Molekuly nacházející se v excitovaném stavu mají tendenci dostat se na nižší energetickou hladinu stavu S_1 a na nejnižší vibrační hladinu v_0 . Během tohoto přestupu dochází k tzv. interní (vnitřní) konverzi, je důsledkem interakce molekul. Tento návrat je doprovázen uvolněním přebytečné energie v podobě energie tepelné. Jedná se o nezářivý přechod. Vnitřní konverze (vibrační relaxace), jak je vidět na **obrázku 2.1**, probíhá ještě před emisí a je následována zářivými přechody, kterými se vyznačuje fluorescence a fosforescence. U fluorescence je typický tzv. dovolený stav (velmi pravděpodobný), během nějž jsou spiny elektronů v klidovém a excitovaném stavu opačné, a obvykle dochází k přechodu z vibrační hladiny v_0 energetického stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního energetického stavu S_0 . Fluorescence nastává absorbováním fotonu o velké energii fluoroforem, který je schopný tuto přijatou energii ihned vyzářit v podobě světla, přičemž vyzářené světlo má nižší energii a delší vlnovou délku než světlo absorbované. Fosforescence nastává v případě, kdy jsou spiny vlivem spinové konverze excitovaného a relaxovaného elektronu stejné, jedná se o tzv. tripletový stav (T). Přechod ze stavu T_1 do stavu základního se nazývá mezisystémová

konverze a uvolněná světelná energie se vyznačuje fosforescencí. Během ní je určitá část absorbované energie uschována a i po skončení ozařování excitačním světlem je molekula schopna po určitou dobu vyzařovat světelnou energii. Na rozdíl od fluorescence má fosforescence posunutější emisní spektrum do delších vlnových délek, což znamená, že má vyšší energii [17,18,19].



Obrázek 2.1: Jablonského diagram, [20].

Fluorescenční sondy jsou konstruovány tak, aby byly schopné opticky zachytit výše zmíněnou elektrickou aktivitu buněk fluorescencí (v tomto případě neuronů představujících typické zástupce excitabilních buněčných vláken) a popsat způsob jakým mezi sebou neurony v mozku komunikují. V průběhu monitorování elektrické aktivity fluorescenční sondy umožňují sledování geneticky definovaných neuronálních okruhů, aniž by bylo zapotřebí chemického přístupu [6].

Ideální geneticky kódovaný indikátor (GKI) akčních potenciálů (AP) by měl produkovat dostatečně velké fluorescenční odpovědi, což usnadňuje časoprostorové dekódování komunikace na buněčné úrovni. Výstupní odpovědí je akční potenciál, který fluorescenční sonda vizualizuje. GKI by měl dále vykazovat nízkou časovou konstantu, umožňující synchronní komunikaci a kódování ve spánkové oblasti jak u jednotlivých neuronů, tak v celé neuronální populaci. Například k vizualizaci přenosu elektrické aktivity mezi buňkami a k tomu jakým způsobem zároveň dochází k dekódování tohoto přenosu postsynaptickými neurony, by sledování vysokofrekvenčního buzení právě pomocí takovýchto fluorescenčních sond bylo velice přínosné. Zároveň by bylo možné lépe pochopit způsob, jakým buzení rychle

vzrušivých interneuronů (neurony, které přenášení impulz mezi neurony okolními) ve frekvenčním rozmezí 50 – 200 Hz reguluje zpracování signálu v mozku, nebo jak moc je toto buzení ovlivněno během nemoci [6].

2.1 Fluorescenční proteiny

Fluorescenční proteiny vyznačující se vlastní fluorescencí se nazývají fluorofory vlastní (vnitřní), které se vyskytují přirozeně a do struktury (fluorescenční sondy) jsou přidávány uměle. Fluorescence proteinů je zprostředkována fluorofory s aromatickými aminokyselinami, ke kterým se řadí tryptofan (Try), tyrozin (Tyr) a fenylalanin (Phe). Dominantním fluoroforem je tryptofan obsahující indolovou skupinu. Jeho fluorescence je velmi citlivá na vlastnosti okolního prostředí, a proto ji lze využít ke sledování konformačních změn v proteinech (například tvorba vazeb mezi proteiny při protein-proteinové interakci). Indolová skupina má mnohem širší emisní spektrum než tyrozin, jehož fluorescence je způsobena fenolovým kruhem. Nejmenší význam na fluorescenci bílkovin má fenylalanin, který se na ní významně nepodílí [17,21,22,23].

2.1.1 Zelený fluorescenční protein

Zelený fluorescenční protein (*green fluorescent protein*, GFP) se řadí k bílkovinám, jejichž vlastní fluorescence nastává při delších vlnových délkách. Jestliže je GFP ozářen excitačním světlem o vlnové délce v rozmezí 395-470 nm (fialové až modré světlo), vyzáří po návratu elektronů na základní hladinu světlo o vlnové délce 509 nm (zelené světlo). Emitovaná fluorescence je velice stabilní a prakticky u ní nedochází k photobleachingu [17,21,22,23].

GFP je bílkovina zodpovědná za bioluminiscenci mořské medúzy *Aequorea victoria* a za jejího objevitele se považuje japonský organický chemik a mořský biolog Osamu Shimomura, jemuž se ji podařilo izolovat v roce 1962. Své jméno však zelený fluorescenční protein získal až v roce 1971. Světlo vychází z masy žluté tkáně medúzy, z nichž každá obsahuje asi 6000-7000 fotogenických buněk (fotocyty). Tyto buňky jsou schopné vytvářet již zmíněnou bioluminiscenci. Obsahují fotoprotein aequorin, který je v přítomnosti kladně nabitých vápníkových iontů schopný vyzařovat modro-zelené světlo. Zelený fluorescenční protein absorbuje světelnou energii předanou nezářivým přenosem od proteinu aequorin, která je opětovně vyzářena jako světlo zelené. Je zde uplatňován princip založený na Försterově rezonančním přenosu energie (FRET), kdy donor (v tomto případě protein aequorin) předává svou energii akceptoru (GFP), který ji

následně vyzáří v podobě světla dané vlnové délky (v případě GFP se jedná o zelené spektrum) [22,24,25].

Samotná izolace proteinu však nebyla dostačující, jelikož k tomu, aby bílkovina vydávala luminiscenci, potřebovala mateřskou tkáň medúzy, její enzymatický aparát, a zároveň bylo důležité, aby během syntézy došlo ke správnému sbalení proteinu do beta-soudku s centrální alfa-šroubovicí. Syntéza zeleného fluorescenčního proteinu v háďátku obecném (*Caenorhabditis elegans*) publikovaná v roce 1994 Martinem Chalfiem v časopisu Science znamenala průlom v buněčné biologii. Pokusil se v háďátku syntetizovat proteiny s připojeným zeleným fluorescenčním proteinem jako fluorescenční značkou. Následně v roce 1992 byla provedena syntéza zeleného proteinu v bakterii *Escherichia coli*, po jejímž ozáření modrým světlem došlo k emisi světla zeleného. Zelený fluorescenční protein se tak stal bílkovinou, již je možno exprimovat i v jiných živých organismech než je medúza *Aequorea victoria* [21,24].

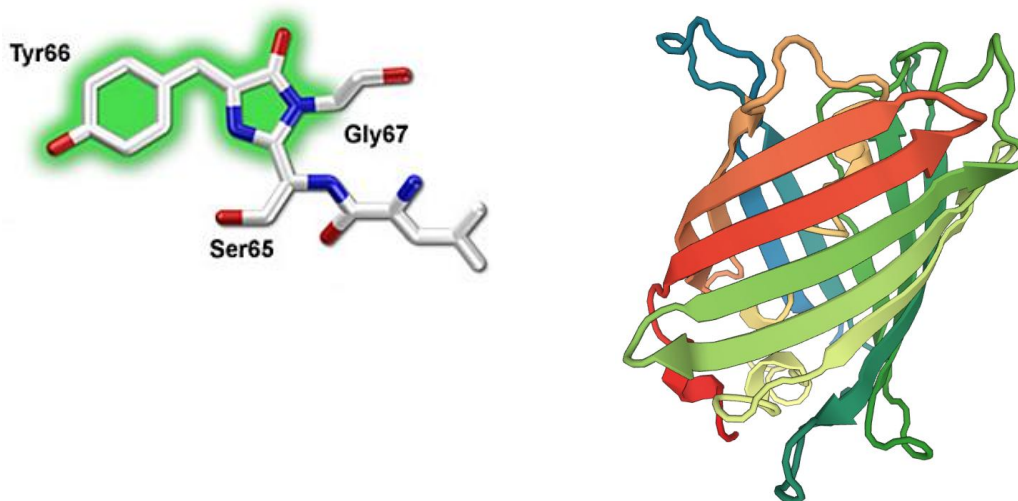
Pro sledování genové aktivity a proteinové distribuce mezi buňkami lze využít mnoho dostupných metod, k nimž patří například použití bakteriální luciferázy nebo luciferázy pocházející z čeledi světluškovitých (*Lampyridae*). Některé z nich však vyžadují exogenně přidané substráty nebo kofaktory, což omezuje jejich použití s živou tkání. K detekci intracelulárního zeleného fluorescenčního proteinu je zapotřebí ozáření světlem svou vlnovou délkou blízkým UV nebo světlu modrému, není zde omezení týkající se dostupnosti substrátů. Zelený fluorescenční protein neovlivňuje růst a buněčné funkce, proto jej lze použít jako lokalizátor proteinů, jejich dynamiky a purifikace v živých buňkách. Především u transparentních živočichů, k nimž patří háďátko obecné a zebříčka obecná (*Danio rerio*), je možné GFP využít jako marker pro sledování buněčného růstu (zpracování neuronálních procesů) a pohybu *in situ*. Je využíván pro značení proteinů v buňkách, pro sledování protein-proteinových interakcí a jako reportér genové exprese. Poměrně malá velikost bílkoviny usnadňuje její šíření cytoplazmou značně rozvětvených buněk, k nimž patří neurony a gliové buňky [21,24,26].

Zelený fluorescenční protein je poměrně malá bílkovina složená z 238 aminokyselin, které jsou uspořádané do tzv. „barvy v plechovce“ (*Paint in a Can*). Jedná se o monomer, jež obsahuje beta-barel tvořený 11 antiparalelními vlákny skládaných beta-listů a z jedné centrální alfa-šroubovice umístěné uvnitř tohoto beta-soudku (**Obrázek 2.2** vpravo). Fluorescenční barvivo obsahující tři aminokyseliny – serin (Ser-65), tyrozin (Tyr-66) a glycin (Gly-67) je součástí alfa-helixu. Zdrojem fluorescence je aminokyselina tyrozin (**Obrázek 2.2** vlevo). Sekvence těchto tří aminokyselin v denaturovaném stavu není významná, sbalením do tvaru soudku je

vyvolána chemická reakce zapříčiněná prudkým zakřivením. Samotné sbalení však fluorescence nevyvolává [21,22,24].

Spontánní vznik komplexní struktury centra chromoforu lze uskutečnit, aniž by bylo zapotřebí specifických enzymů mateřského organismu. Důležitým zjištěním Rogera Tsieny byl fakt, že samotné správné sbalení proteinu do soudku jeho fluorescence nijak neovlivňuje, pokud k jeho exprimaci v organismu dochází bez přítomnosti kyslíku. Za anaerobních podmínek protein po ozáření světlem nijak nefluoreskuje. Během sbalování proteinu se aminokyseliny kovalentně uspořádávají, fluorescenční chromofor p-hydroxybenzylideneimidazolonin vzniká spontánně a autokatalyticky po dokončeném překlada proteinu cyklizací serin-dehydrotyrosin-glycinu až za přítomnosti molekulárního kyslíku posttranslačními úpravami. Kyslík způsobuje oxidaci tyrozinu, která fluorescence vyvolává. Denaturací GFP se fluorescence vytrácí, jedná se však o opětovnou renaturaci vratný jev [21,24].

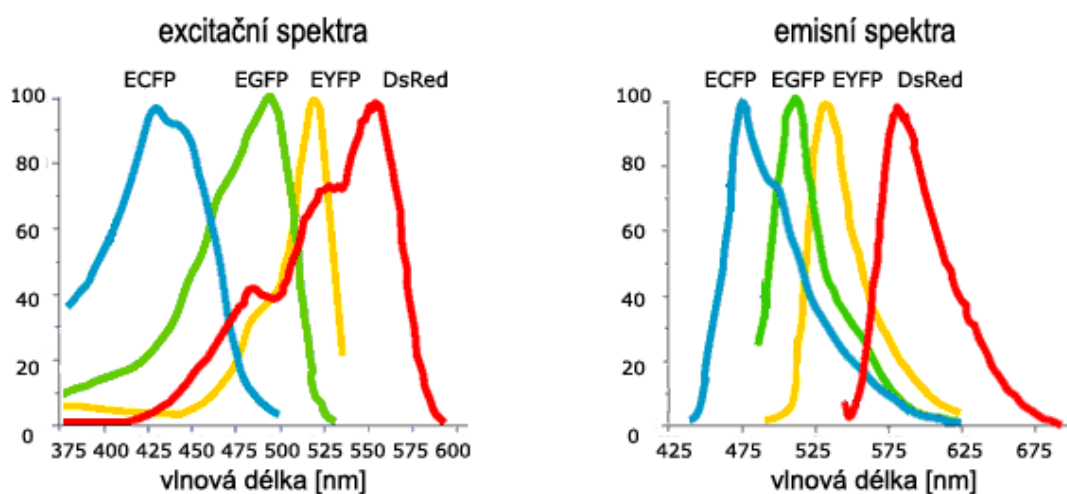
I přes monolitický vzhled beta-soudku s vnořenou alfa-šroubovicí, lze zelený fluorescenční protein exprimovat jako dva samostatné segmenty, které se ihned po vložení do buňky kombinují. Opět tak vzniká fungující fluorescenční protein. Tuto schopnost GFP lze využít ve dvou-hybridním systému, kdy jsou jednotlivé segmenty zeleného proteinu fúzí připojeny k dalším dvěma proteinům, přičemž geny vznikají paralelní exprimací. Fluorescencí lze ověřit, že fúzí spojené proteiny spolu *in vivo* velmi úzce interagují [23].



Obrázek 2.2: Vlevo chemická struktura GFP, [27]; vpravo 3D struktura GFP, beta-soudek, uvnitř alfa-helix, [28].

Modifikací aminokyselin Ser-65, Tyr-66 a Gly-67 bylo vyvinuto několik variant GFP, které se liší absorpcí excitovaného a barvou emitovaného světla, jež se nachází

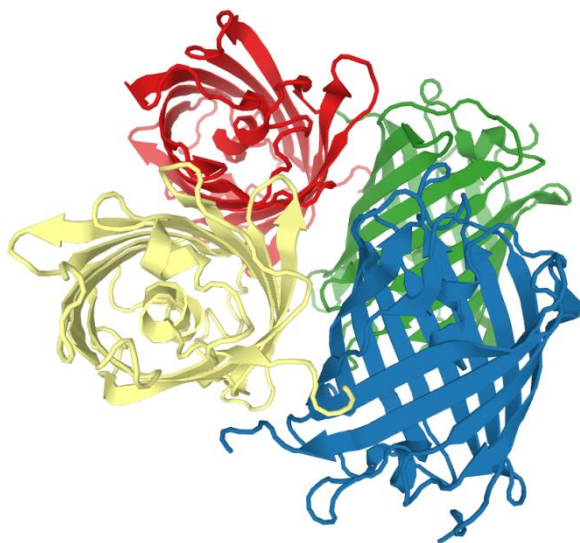
v modrém (blue, BFP), tyrkysovém (cyan, CFP), přirozeném zeleném (green, GFP), žlutém (yellow, YFP) a červeném (red, RFP, DsRed protein) spektru (**Obrázek 2.3**). Krystalická struktura varianta GFP/S65T, vytvořená záměnou aminokyseliny Ser-65 původního proteinu za threonin, umožnila vytvoření právě YFP jednoduchou záměnou aminokyselin. Zároveň je GFP/S65T možné excitovat světlem z modrého spektra, na rozdíl od původního GFP proteinu, který má excitační maximum spíše v UV oblasti. Různá spektra emitovaného světla našla využití ve dvojitým značení vzorků a sledování exprese dvou a více fluorescenčně značených proteinů. Modifikace se vyznačují také lepší fotostabilitou, zlepšeným kvantovým výtěžkem, rozdílnou svítivostí a lepší mírou exprese v hostitelském organismu. Varianta EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) se stejně jako GFP/S65T vyznačuje substitucí aminokyseliny Ser-65 za threonin (Thr), která po excitaci modrým světlem způsobuje zvýšení intenzity fluorescence oproti klasickému GFP, což z EGFP činí velice perspektivního kandidáta mezi optickými indikátory jak v biologických aplikacích, tak ve studiích na molekulární úrovni. Další variantou je cpGFP (*circularly permuted green fluorescent protein*) obsahující kruhově permutovanou aminokyselinovou sekvenci. Toto spojení vedlo ke tvorbě nových N- a C- konců, aniž by byla narušena funkce zeleného fluorescenčního proteinu. Stejně jako EGFP se vyznačuje větší svítivostí než GFP, protože právě rozdílný pohyb N- a C- konců dramaticky ovlivňuje fluorescenci. Církulární permutace na konkrétním místě polypeptidu způsobují, že dojde k překlopení jeho dvou částí okolo centrální sítě. Vznikem trhlin na beta-soudku se chromofor cpGFP stává přístupnější pro protony mimo bílkovinu. Využití cpGFP spočívá v převedení signálových interakcí mezi dvěma doménami proteinu na změny elektrostatického potenciálu chromoforu, tzn. přenos informací z interakcí na fluorescenční odezvu [22,23,24,26,29,30].



Obrázek 2.3: Excitační a emisní spektra EGFP, jeho barevných variant, a proteinu DsRed, [31].

2.1.2 Červený fluorescenční protein

Roger Tsien se kromě studia zeleného fluorescenčního proteinu a snahy vytvořit jeho vylepšené varianty s optimálními vlastnostmi věnoval také vývoji jiných fluorescenčních proteinů, a jedním z nich byl právě červený fluorescenční protein (DsRed) z rodiny GFP-like proteinů. Červený fluorescenční protein byl izolován Konstantinem A. Lukyanovem a jeho kolegy v roce 1999 z korálového útesu druhu *Discosoma* („korálová houba“), kteří u korálnatců (*Anthozoa*) objevili schopnost vydávat fluorescenci ve světlých odstínech, k nimž patří modrá, zelená, oranžová a červená barva. Schopnost vydávat fluorescenci je způsob ochrany organismu před silným slunečním zářením v tropických vodách. Stejně jako je tomu u zeleného fluorescenčního proteinu, tak i u DsRed dochází k excitaci při delších vlnových délkách (488 nm, modré světlo). Delší vlnová délka excitačního světla také minimalizuje problémy spojené s rozptylem světla a s autofluorescencí buněk. Emitované světlo se pak nachází v oranžovo-červené oblasti, konkrétně na vlnové délce 586 nm (**Obrázek 2.3**). DsRed může být použit jako reportér v obdobných aplikacích jako GFP, k nimž patří například již zmíněná exprese genů a lokalizace proteinů [24,33,34].



Obrázek 2.4: 3D struktura DsRed, čtyři beta-soudky s vnořenými alfa-šroubovicemi, [32].

Bílkovina svou strukturou připomíná strukturu zeleného fluorescenčního proteinu, ale má tendence tvořit tetrametry, tedy molekuly složené ze čtyř menších podjednotek (monomerů) vázaných kovalentní vazbou (**Obrázek 2.4**). Rogeru Tsienovi se podařilo přijít na způsob, jak lze přetvořit tuto tetramerní strukturu proteinu pomocí nevratné denaturace polypeptidů v samostatný monomer, který by bylo možné využít jako fluorescenční značku. Vzhledem ke svým vlastnostem, ke kterým patří pomalé zrání

fluorescence a špatná rozpustnost divokého typu tohoto červeného fluorescenčního proteinu, musely být vyvinuty modifikované varianty, aby se usnadnila exprese v savčích buňkách. Dalším zlepšením u modifikovaného červeného fluorescenčního proteinu bylo snížení zbytkové emise nacházející se v zeleném oblasti viditelného spektra. Divoký typ DsRed má také sklon tvořit v živých buňkách proteinové agregáty. Druhá generace DsRed2 obsahuje několik mutací N-konce peptidu, aby se tvorbě těchto agregátů zabránilo. Zvýšení rychlosti začlenění do buňky spojené s rychlejším zráním fluorescence bylo docíleno u třetí generace DsRed-Express s devíti aminokyselinovými substitucemi, jehož fluorescenci je možné pozorovat již hodinu po expresi. V současnosti se uvažuje o teorii, že jasná fluorescence spolu s nefluorescenčním zbarvením korálovců *Anthozoa* je dána homology zeleného fluorescenčního proteinu [24,27,33,34,35,36].

Využití červeného fluorescenčního proteinu spočívá i v jeho kombinaci se zeleným fluorescenčním proteinem ve více barevném značení. Je vhodný k užití jako marker v rostlinách, jelikož díky červenému posunu (red-shift) vlnových délek je zabráněno poškození buněk (a také tkání) excitačním světlem. Ve vyšších rostlinách slouží jako vynikající značka i přes rušivou červenou autofluorescenci chlorofylu [33,37].

2.2 Fluorescenční sondy založené na bázi napětově citlivých oblastí

Napětově citlivé sondy jsou konstruovány ze dvou typů napětově citlivých proteinů a stejně jako fluorescenční sondy založené na bázi vápníku (viz dále), jsou schopné opticky signalizovat jednotlivé individuální potenciály. Mezi napětově citlivé proteiny patří napětově citlivá oblast 7 helix mikrobiálního rhodopsinu a 3-4 helix napětově citlivá oblast fosfatáz nebo iontových kanálů [6].

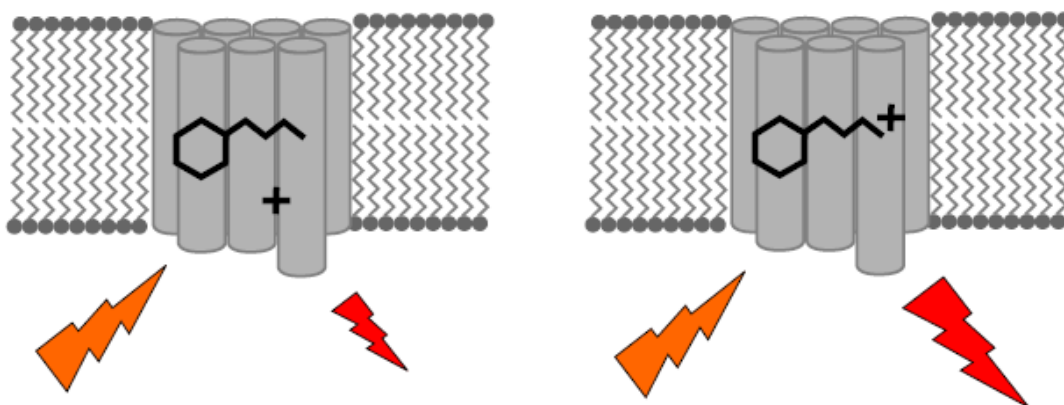
2.2.1 Napětově citlivá oblast mikrobiálního rhodopsinu

Simultánní zaznamenávání neuronální aktivity z jednotlivých neuronů i neuronové sítě je klíčovým prvkem pro pochopení dynamiky komplexních neuronálních obvodů. Tento požadavek slibuje splnit právě optické zobrazování, které využívá fluorescenčních proteinů, napětových indikátorů na bázi velmi malých molekul a hybridních proteinových barviv [38,39].

Základem rhodopsinových sond je využití vnitřní fluorescence mikrobiálního proteinu („protonové pumpy“) rhodopsinu Archærhodopsin 3 (Arch) odvozeného od

mikroorganismu *Halorubrum sodomense*. Tento protein byl exprimován v kulturách hipokampálních neuronů potkana. Je označován jako geneticky kódovaný fluorescenční indikátor membránového napětí. Jeho primární vlastností je citlivost na změny membránového napětí a rychlost jejich detekce [38,39].

Protein Arch se skládá ze sedmi transmembránových podjednotek a chromoforu sítnice, který je kovalentní vazbou přes Schiffovu bázi spojen s lysinem. Funguje jako světlem řízená protonová pumpa a pro svého hostitele se vyznačuje možností indukovat sluneční energii. Během depolarizace při konstantním budícím výkonu dochází ke zvýšení protonace Schiffovy báze, což vede ke zvýšení absorpce rhodopsinu a fluorescenční emise (**Obrázek 2.5**). Při expresi v neuronech se však může chovat jako optogenetický neuronální tlumič, což znamená, že pokud je ozářen zeleným světlem (525 nm), generuje hyperpolarizační fotoproud. Tento proud má za následek potlačení neuronálního buzení. Jestliže je k ozáření použito oranžové (600 nm) nebo červené světlo (640 nm), protein Arch emituje fluorescenční záření v červené oblasti viditelného spektra. Pro jeho excitaci se tedy používá vlnová délka oranžovo-červeného světla [38,39,40].

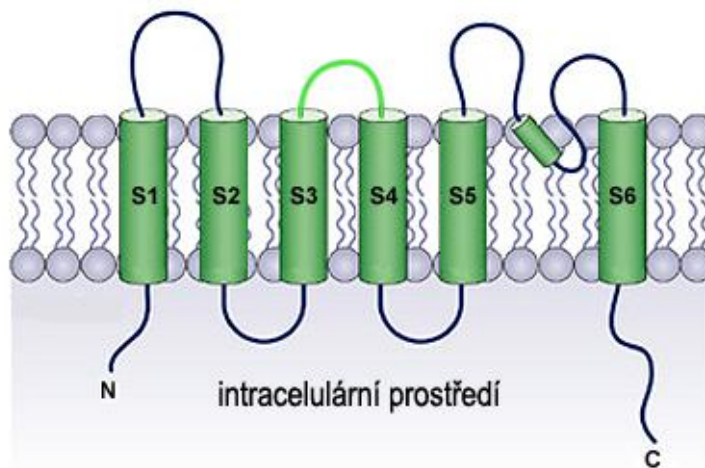


Obrázek 2.5: Protonace Schiffovy báze při depolarizaci membrány oranžovým světlem, [40].

K nevýhodám proteinu Arch však patří velmi slabá fluorescence. Aby mohla být detekovatelná, je k jeho ozáření a excitaci zapotřebí použití silnějšího laseru. Další nevýhodou je slabé narušování membránového potenciálu během ozařování proteinu. Arch tak v neuronech generuje již zmíněný vnější fotoproud, a tím dochází k hyperpolarizaci membrány. Vykazuje se však srovnatelnou fotostabilitou jako zelený fluorescenční protein [38,39].

2.2.2 Napětově citlivá oblast fosfatáz

Fluorescenční napětově citlivé sondy tohoto typu jsou obvykle jasnější než sondy obsahující rhodopsin. Vytvářejí suboptimální fluorescenční odezvy na neuronální aktivitu. Vykazují rychlost inaktivace, která je pro sledování rychlých průběhů akčních potenciálů příliš pomalá. Dále se fosfatázy vyznačují tím, že ke své excitaci vyžadují použití vlnové délky, jejíž hodnota se pohybuje pod 450 nm. Při ozařování vlnovou délkou této hodnoty se vyskytuje problém s fototoxicitou a autofluorescencí [6].



Obrázek 2.6: Fosfolipidová membrána s doménami a vyznačenou extracelulární smyčkou mezi oblastí S3-S4, [41].

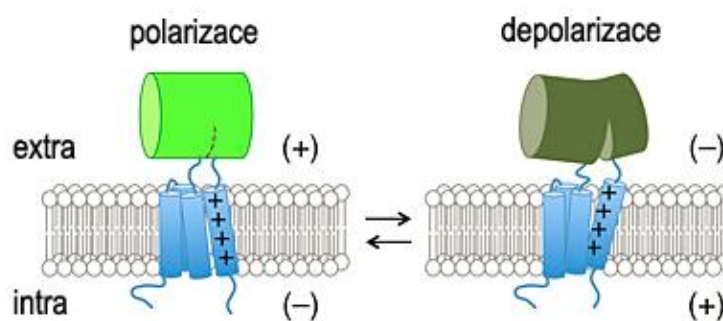
Extracelulární smyčka nacházející se mezi třetí a čtvrtou transmembránovou částí napětově citlivé oblasti fosfatáz, která je k vidění a na **obrázku 2.6** vyznačena zelenou barvou, prochází během depolarizace konformačními změnami. Krystalické struktury napětově citlivých oblastí fosfatáz izolovaných ze sumky naznačují, že repolarizace (deaktivace) způsobuje vzestupnou reorientaci smyčky u oblastí S3-S4. Dochází k částečnému odvíjení S3 a jejího extracelulárního konce a vymizení krátké alfa-šroubovice ze středu S3-S4 smyčky. Pokud se na toto místo vloží kruhově permutovaný zelený fluorescenční protein (cpGFP), dojde k rušení fluorescence proteinu již zmíněnými změnami konformace během depolarizace. Dále bylo zjištěno, že pokud se N- a C- konec (termini) cpGFP umístí poblíž chromoforu, dojde ke zlepšení konformačního párování mezi napětově citlivou oblastí a oblastí fluorescenčního proteinu [6].

ArcLight senzor obsahuje napětově citlivou oblast sumky (*Ciona intestinalis*) a splňuje první podmínku ideálního indikátoru akčních potenciálů. Je schopný produkovat doposud největší fluorescenční odpověď na akční potenciály a k vybuzení mu stačí vlnová délka 488 nm. Jeho nevýhodou však je pomalá rychlost detekce blízko se

nacházejících hrotů, které se nacházejí nad velkými excitačními postsynaptickými potenciály [6].

2.2.3 Accelerated Sensor of Action Potentials 1

ASAP1, celým názvem *Accelerated Sensor of Action Potentials 1*, jehož schéma lze vidět na **obrázku 2.8**, představuje uměle vytvořený napěťový senzor akčních potenciálů savčích buněk, do nějž byl vložen cirkulární zelený fluorescenční protein (cpGFP). Vložením fluorescenčního proteinu do extracelulární smyčky napěťově citlivých oblastí buněk kura bankivského (*Gallus gallus*), u kterých došlo k velmi snadné expresi na plasmatické membráně buněk HEK293A (lidské embryonální ledvinné buňky), se docílilo fluorescenčního poklesu jako odpovědi na depolarizaci membrány. Napěťově citlivá oblast kura bankivského obsahuje kratší extracelulární S3-S4 smyčku než stejná oblast u sumky (ArcLight sonda). Kratší smyčka způsobuje zlepšení párování mezi napěťově indukovanými pohyby a kroucením soudků proteinu GFP, a to je příčinou zvýšení rychlosti optického signálu (**Obrázek 2.7**). Během samotného vývoje fluorescenční sondy bylo cílem nalezení optimální varianty z mnoha sestrojených obměn a podob cirkulárního fluorescenčního proteinu. Výběr varianty vloženého zeleného fluorescenčního proteinu mezi rezidua 147 a 148 napěťově citlivých oblastí kura bankivského zlepšilo jak jas, tak dynamické rozlišení během udržování účinné exprese na membráně. Tato varianta cirkulárně permutovaného GFP byla pojmenována jako cpsfGFP-OPT. Jak již bylo uvedeno výše, fluorescenční sonda ASAP1 pracuje na principu pohasínání fluorescence při depolarizaci membrány. Pokud dojde ke změně membránového napětí, vznikne akční potenciál a původně světle zeleně zářící plasmid ASAP1 postupně vyhasíná. Dojde k poklesu intenzity fluorescence vlivem změny konformace napěťově citlivých oblastí (**Obrázek 2.7**). Jestliže je buňka naopak nepodrážděná a v klidu a její membrána je polarizovaná, plasmid emituje světlo v zelené oblasti s vyšší intenzitou [6].



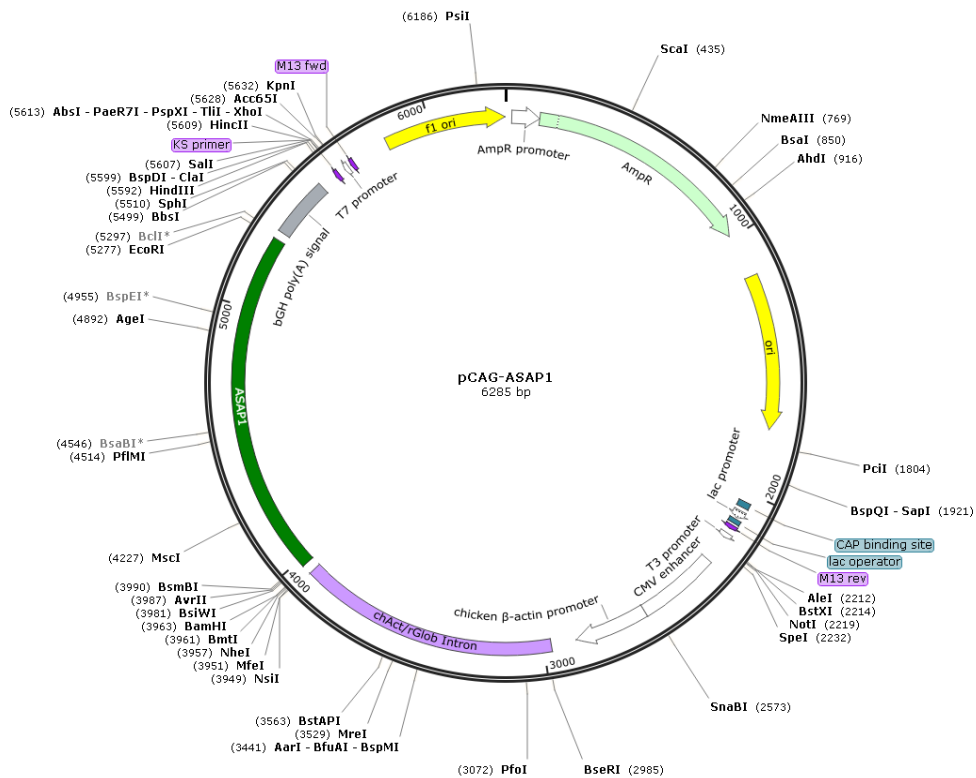
Obrázek 2.7: Chování cpGFP při polarizaci a depolarizaci membrány, [6].

Určení strukturálních determinantů bylo nezbytné pro správnou citlivost na změny napětí u fluorescenční sondy. Pohasínání fluorescence po depolarizaci membrány naznačuje, že změny konformace napěťově citlivých oblastí a jejich pohyb narušuje interakci vodíkové vazby mezi beta-soudkem a fluorescenčním chromoforem, která stabilizuje formu chromoforu, z níž byl v důsledku depolarizace odštěpen proton. Modifikace breakpointu cirkulárně permutovaného zeleného fluorescenčního proteinu zapříčinila buď snížení amplitudy u odezvy, nebo získání její invertované podoby. Vyjmutí prvního rezidua z vytvořeného cirkulárně permutovaného sfGFP-OPT taktéž způsobilo snížení odezvy. Odstranění dalších aminokyselin mělo však pouze nepatrný vliv na dynamický rozsah. Dále bylo zjištěno, že určité konzervativní mutace aminokyseliny fenylalaninu (Phe-145), konkrétně substituce nahrazující pozici tyrozinu (Tyr-66), snižují jak jas, tak dynamický rozsah a to zásadně. Modulace cpsfGFP-OPT napětím je velice citlivá na strukturu poblíž breakpointu, reaguje na konformační změnu na spojovací části vnořené do oblasti S3 [6].

Dynamický rozsah a kinetika fluorescenční sondy po expresi v buňkách HEK293A reagující na napětí s kroky od -120 mV do 50 mV představují pokles fluorescence o necelých 37%, přičemž reakce na 100 mV depolarizaci membrány vycházející z klidového potenciálu -70 mV vyvolává změnu fluorescence o necelých 18%. Napěťové fluorescenční senzory s vloženým cpGFP, k nimž patří například ElectricPk s napěťově citlivými oblastmi sumky (více o sondě v kapitole 6.3 *Využití techniky patch-clamp při studiu změn membránového napětí pomocí napěťově citlivých sond*), vykazují až o řád menší hodnoty ve srovnání se sondou ASAP1. Fluorescenční změny reagující na hyperpolarizaci membrány se pohybují v rozmezí 12% poklesu fluorescence, konkrétně při hyperpolarizačním napětí 30 mV a 50 mV se pokles intenzity fluorescence projevil o necelých 24%. V buněčné linii HEK293A a při teplotě prostředí 22°C má sonda ASAP1 prudkou biexponenciální kinetiku, přičemž aktivace a inaktivace se vyznačuje rychlými složkami s časovými konstantami 2,1 ms a 2,0 ms. V porovnání se sondou ArcLight, která představuje hlavního zástupce napěťově citlivých sond s největší fluorescenční odpovědí na změnu membránového potenciálu, jsou rychlé složky odezvy sondy ASAP1 pro aktivaci a inaktivaci sedmkrát a 22,5 krát rychlejší než u ArcLight. Rychlejší kinetika fluorescenční sondy ASAP1 tedy zvyšuje věrnost zachycených fluorescenčních změn během monitorování transmembránového napětí. Fluorescenční odpovědi sondy ASAP1 na jednotlivé akční potenciály kultivovaných hipokampálních neuronů ve srovnání se sondou ArcLight se odezvě na odpovídající napětí taktéž přibližují mnohem více. Odezva na akční potenciál jdoucí přes celou neuronální buňku zachycená senzorem ASAP1 je v porovnání s ArcLight

sondou prakticky dvakrát větší. ASAP1 umožňuje detekci spontánních hrotů, podprahových změn potenciálu mezi neurony [6].

Fluorescenční sonda ASAP1 je schopná vynikající membránové lokalizace u živých disociovaných hipokampálních neuronů a fixních řezů mozku, a to jak na celém těle neuronu, tak na jednotlivých dendritech, a jeho samotná exprese v buňkách nijak nemění membránovou kapacitanci. ASAP1 umožňuje detekovat jednotlivé akční potenciály standardně trvající 2 ms, podprahové změny potenciálu a sledovat průběhy těchto změn až do frekvence 200 Hz, čehož sonda ArcLight schopná není. Průběhy při 100 Hz se zdají být zploštělé se zvýšenou základní linií a dochází u ní ke špatnému rozlišení píků. ASAP1 umožňuje také kontinuální monitorování membránových potenciálů pomocí standardního epifluorescenčního mikroskopu v rozsahu kilohertz díky kombinaci jasů, dynamického rozsahu a rychlosti detekce. Zobrazuje pokles fluorescence o 29% na 100 mV [6,42,43].



Obrázek 2.8: Mapa vektoru ASAP1.

2.3 Fluorescenční sondy založené na bázi vápníku

Fluorescenční sondy založené na bázi vápníku jsou geneticky kódované napětěvé senzory umožňující detekci jednotlivých akčních potenciálů. Využití v zobrazování neuronální aktivity je velmi široké. Principem zobrazování aktivity neuronů pomocí

sond citlivých na vápník je, že důsledkem této aktivity dochází k velice rychlým změnám koncentrace volného vápníku v intracelulárním prostředí buňky jeho průchodem přes vápníkové kanály. Vápník je považován za univerzální signalizační molekulu, která určuje jak buněčnou diferenciaci, tak buněčnou smrt. Stejně tak je vápník schopný spouštět neurotransmisi a regulovat synaptickou poddajnost. Stanovení prostorové a časové dynamiky intracelulární koncentrace vápníku je proto velmi důležité, jak v buněčné biologii, tak pro pochopení imunitní fyziologie a mozkových funkcí. Monitorování dynamiky volných vápníkových iontů je jedním z hlavních využití ve fluorescenční mikroskopii. Vápník při depolarizaci buněčné membrány neuronů a vzniku akčního napětí přechází z intracelulárního prostředí prostřednictvím transientních vápníkových kanálů, které zajišťují krátkodobé otevření. Geneticky kódovaný proteinový senzor tak může být využit pro neinvazivní sledování aktivity u jednotlivých neuronů nebo jejich oddělených shluků a zároveň jej lze přímo nasměrovat na specifický typ buněk [11,44,45].

Geneticky kódované fluorescenční sondy založené na bázi vápníku se staly cenným nástrojem v buněčné biologii a v oblasti výzkumu mozkové aktivity. Je možné je využít jako ukazatele přesně definovaných buněk a dokonce i k zobrazení na subcelulární úrovni buněčných kompartmentů. Fluorescenčními sondami založenými na bázi vápníku lze opakovaně zobrazovat tytéž buňky po delší časový úsek. K jejich nevýhodám však patří malá síla signálu a pomalá rychlost odezvy, o zlepšení těchto nedostatků se neustále usiluje, protože žádný zástupce geneticky kódovaných indikátorů však zatím nedokáže překonat detekční limity běžně používaných syntetických vápníkových indikátorů (například malé molekuly indikátoru Oregon Green 488 BAPTA-1, OGB-1), jejichž vpravení do buňky probíhá invazivní chemickou nebo fyzikální metodou [44,45].

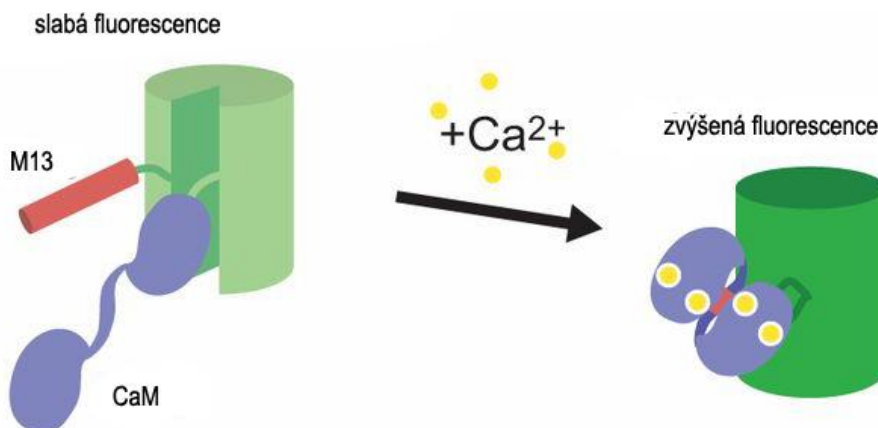
Zmíněné transientní vápníkové kanály v neuronální membráně mohou být otevřené až stovky milisekund. Toto má za příčinu, že průběhy vysokofrekvenčních akčních potenciálů pomocí reakcí vápníku nelze považovat za dostatečně přesné zaznamenávání neuronální aktivity. Sondy založené na bázi vápníku proto nalézají větší uplatnění spíše při studiu nízkofrekvenční elektrické aktivity neuronů [6,38,44,46].

V následujících podkapitolách jsou uvedeny vybrané typy rodin vápníkových indikátorů.

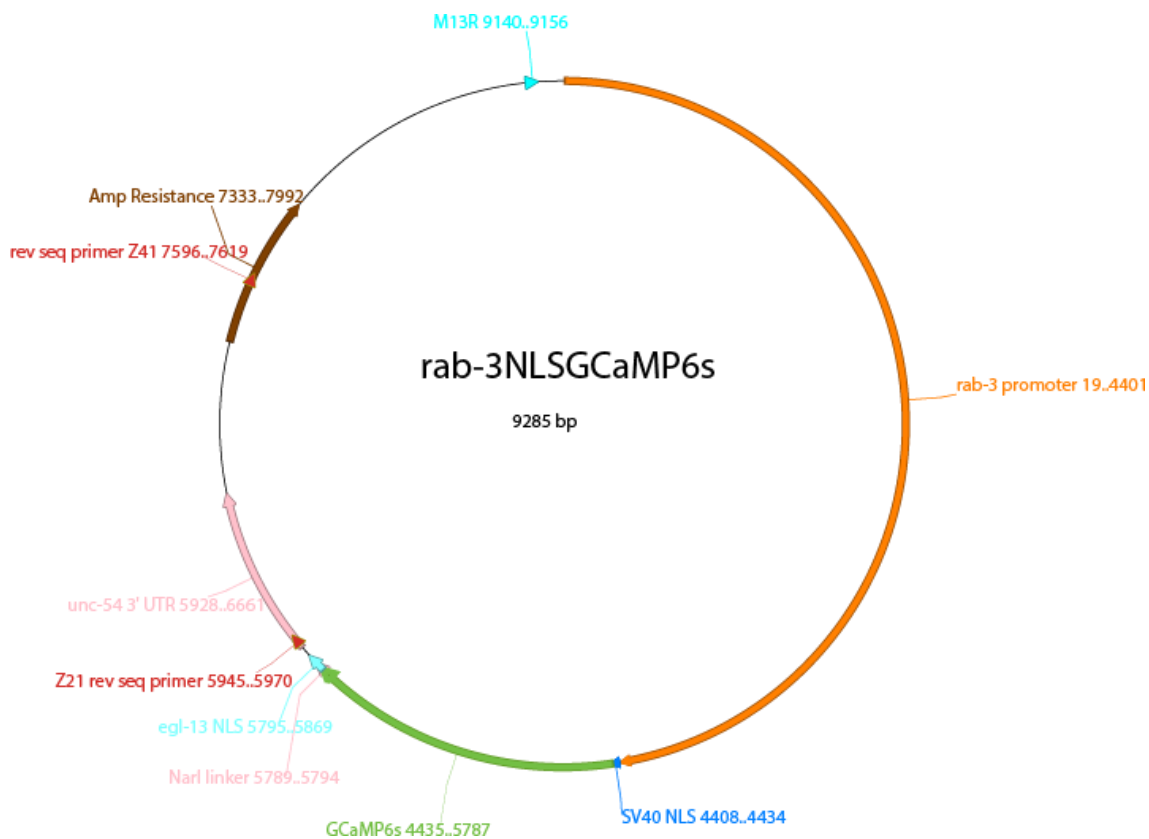
2.3.1 GCaMP fluorescenční sondy

GCaMP sonda, jejíž strukturu a princip funkce lze vidět na **obrázku 2.9**, se skládá z cirkulárního zeleného fluorescenčního proteinu (cpGFP), z proteinu kalmodulin vázajícího vápník (CaM) a peptidu M13, který interaguje s kalmodulinem a tvoří s ním tzv. výhybku. Jsou umístěni v blízkosti chromoforu uvnitř beta listu zeleného fluorescenčního proteinu, jehož nativní N- a C- konce spolu tvoří vazbu. Z jádra vnitřní struktury beta-soudku jsou GFP konce nově vytvářeny. Přítomnost vápníkových iontů poblíž proteinu CaM a peptidu M13 způsobuje tvorbu těchto nových konců vycházejících ze středu zeleného fluorescenčního proteinu. Nově vytvořený C- konec je navázán na vápník vázající protein CaM a N- konec vytváří vazbu s peptidem M13. Vzniklý komplex CaM-M13 spojený s N- C- koncem fluoroforu způsobuje zvýšení jasu zeleného fluorescenčního proteinu během vazby s vápníkem, což způsobuje fluorescenci. Studie týkající se krystalické struktury této fluorescenční sondy ukázaly, že jestliže se nachází ve stavu, kdy jsou domény kalmodulinu a peptidu M13 nevázané, tzv. Ca^{2+} -free, chromofor je vystaven roztoku, objevuje se v něm mezera způsobující zhášení. Interakce tohoto komplexu v závislosti na přítomnosti vápníkových iontů má za důsledek konformační změny a dojde ke vstřebání mezery. Částečným blokováním přístupu roztoku do jádra beta-soudku chromoforu tak dochází k obnovení fluorescence [44,47,48].

Jejich nevýhodou však je, že oproti syntetickým indikátorům nemají dostatečnou rychlost odezvy a zároveň je jejich citlivost velmi nízká, jak již bylo uvedeno výše. A proto se různými genetickými modifikacemi uzpůsobovaly a následně testovaly varianty GCaMP, z nichž byly vybrány tři ultracitlivé sondy GCaMP6. GCaMP6m, dále GCaMP6s (**Obrázek 2.10**), která je nejcitlivější na akční potenciály a vyznačuje se vysokou afinitou k vápníku a nejrychleji indikující senzor akčních potenciálů označovaný jako GCaMP6f [44,47].



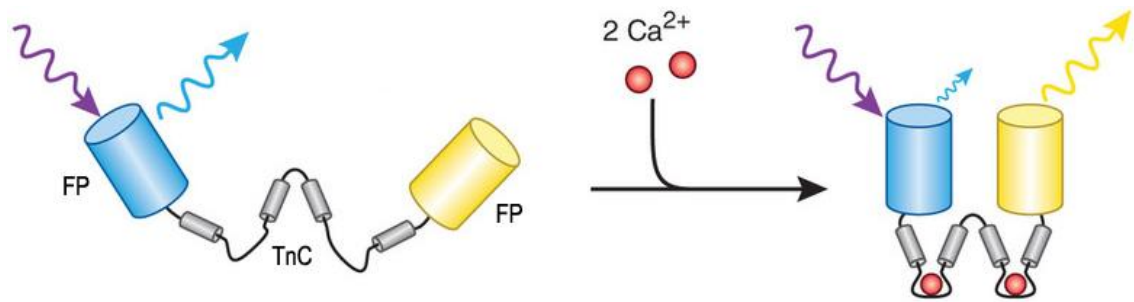
Obrázek 2.9: Struktura vápníkové sondy GCaMP reagující na vazbu s vápníkovými ionty, [48].



Obrázek 2.10: Mapa vektoru GCaMP6s, [49].

2.3.2 TN fluorescenční sondy

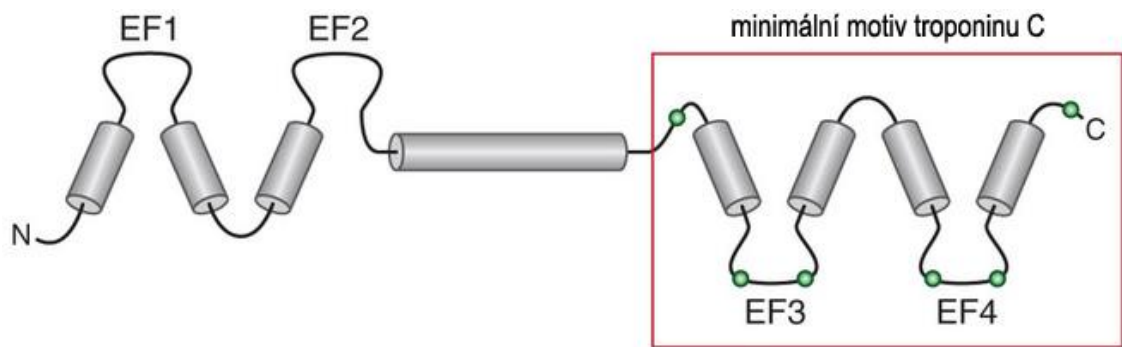
TN fluorescenční sondy (**Obrázek 2.11**) pocházejí z generace senzorů založených na Försterově rezonančním přenosu energie (FRET). Tento přenos je založen na principu absorpce energie pouze molekulami donoru, které získanou energii excitovaného stavu předávají vhodným molekulám nazývaným akceptor prostřednictvím tzv. dipól-dipólové interakce, aniž by při této interakci došlo k vyzáření fotonu donorem. Výsledkem jsou excitované molekuly akceptorů vydávající emitované záření v podobě fluorescence. Jak je vidět na **obrázku 2.11**, na němž je zvýrazněna sonda Twitch, sondy rodiny TN se skládají ze dvou fluorescenčních proteinů navzájem spojených doménou troponinu C (TnC). Světelnou energii přijímá první fluorescenční protein (modrý CFP), ale pokud se v jeho blízkosti nacházejí vápníkové ionty v malé koncentraci, přijatá energie je v podobě modrého světla vyzářena do okolí. Naopak zvýšená koncentrace vápníkových iontů způsobuje vazbu s troponinem C a dochází ke změně konformace, fluorescenční proteiny se k sobě přiblíží, donor CFP předá svou energii akceptoru, jímž je druhý fluorescenční protein (žlutý cpCitrine, YFP), a ten emituje světlo ve žluté oblasti viditelného spektra [25,44,45].



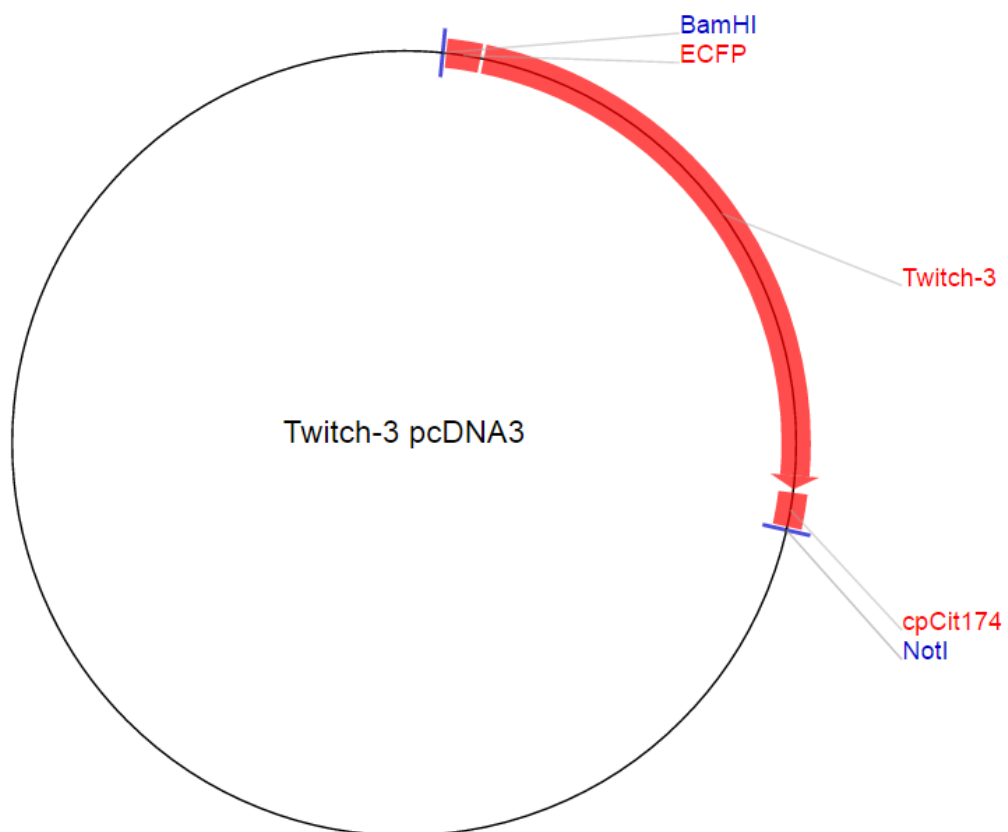
Obrázek 2.11: Struktura vápníkové sondy TN reagující na vazbu s vápníkovými ionty, [45].

Sondy rodiny TN FRET- Ca^{2+} interakce využívají C- konec troponinu C (TnC) jako část vázající vápníkové ionty místo proteinu kalmodulin, jehož využívá generace senzorů GCaMP uvedená výše. TnC představuje specializovaný vápník vázající senzor v kosterních svalech a v srdeční svalovině. Záměna za troponin C vedla ke zlepšení vydávané fluorescence, vazba vápníku a troponinu je rychlejší a v zobrazovacích experimentech je stabilní. Tyto senzory jsou považovány za minimálně rušivé, jelikož nezasahují do biochemie hostitelské buňky a jsou schopné pracovat na úrovni subcelulárního směřování, při němž senzory obsahující kalmodulin nebyly úspěšné [50,51].

Struktura troponinu C se skládá z regulačního N-terminálního laloku specifického na vápník a C- konce. Každá molekula TnC dokáže navázat až čtyři vápníkové ionty pomocí čtyř specializovaných proteinových domén, které se vyznačují názvem EF ručky. Pro zlepšení citlivosti na přítomnost vápníkových iontů byla vyvinuta varianta TN-XXL, která obsahuje duplikovaný C- konec EF ruček troponinu C s opakujícím se motivem vazebných míst pro vápníkové ionty mezi donorem a akceptorem fluorescenčních proteinů. Fluorescenční sonda Twitch, jejíž mapa vektoru je k vidění na **obrázku 2.13**, se od sondy TN-XXL liší v počtu motivů, ze kterých se skládá. Její struktura byla sestavena s využitím minimálního motivu, to znamená, že místo čtyř vazebných míst pro vápníkové ionty obsahuje pouze dvě, přičemž byla zachována vysoká afinita k Ca^{2+} iontům (**Obrázek 2.12**). Tato modifikace přispěla ke zlepšení biokompatibility senzoru při využití během dlouho trvající exprese [45,50,51].



Obrázek 2.12: Minimální motiv troponinu C, [45].

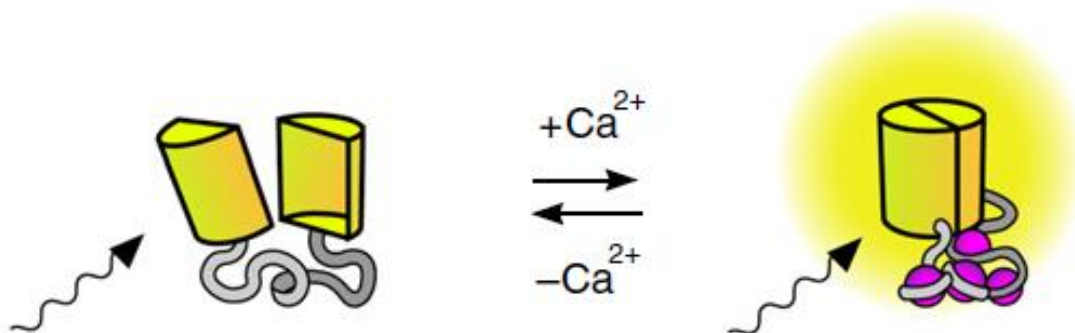


Obrázek 2.13: Mapa vektoru Twitch, [52].

2.3.3 Camgaroo fluorescenční sondy

Camgaroo fluorescenční sondy tvoří výjimku v podobě struktury, ze které jsou složeny. Stejně jako rodina vápníkových indikátorů GCaMP obsahuje fluorescenční protein a fragment proteinu vázající vápníkové ionty kalmodulinu (CaM). Žlutá varianta zeleného fluorescenčního proteinu (YFP) je rozdělena na dvě poloviny, které jsou navzájem

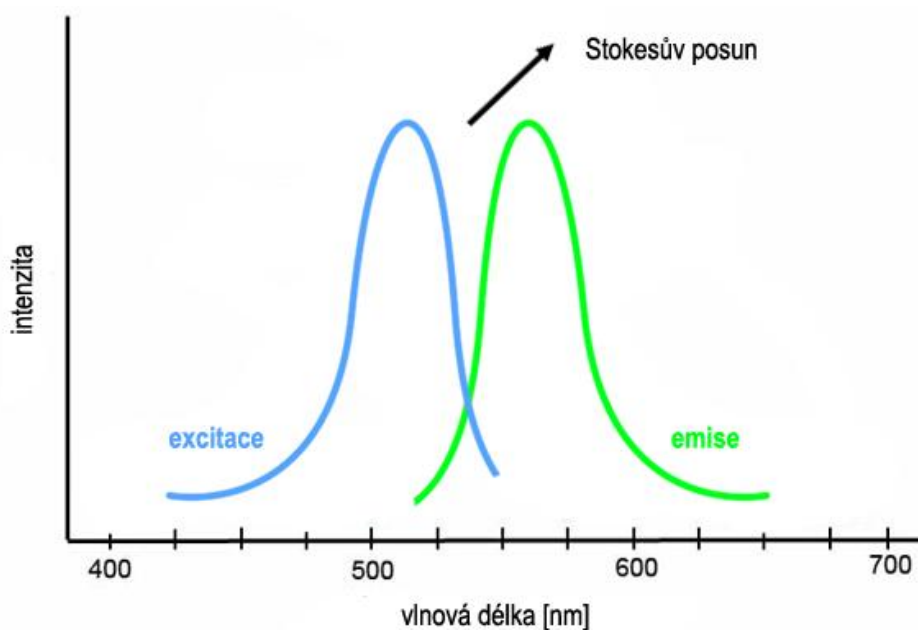
spojené právě fragmentem kalmodulinu. Vazba volných vápníkových iontů podporuje intramolekulární uspořádání, což má za důsledek změnu protonovaného stavu chromoforu do stavu deprotonovaného. Obě poloviny fluorescenčního proteinu se konformačními změnami kalmodulinu spojí do celku, v němž je molekula schopná emitovat fluorescenční záření [51,53].



Obrázek 2.14: Struktura vápníkové sondy Camgaroo reagující na vazbu s vápníkovými ionty, [51].

3 CHEMICKÁ NAPĚŤOVĚ CITLIVÁ MEMBRÁNOVÁ BARVIVA

Chemická napěťově citlivá barviva umožňují neinvazivní sledování změn napětí vyskytujícího se na membráně buněk díky změnám ve spektrální oblasti daného barviva. Každá molekula barviva musí obsahovat látku zvanou chromofor, která je schopna reagovat na změny ozařujícího světla. Hydrofobním koncem se barvivo naváže na fosfolipidovou dvojvrstvu buněčné membrány. Jak již bylo uvedeno v úvodu druhé kapitoly, jakmile dojde k vystavení buňky s navázaným barvivem světelné excitaci o vlnové délce specifické danému barvivu, dochází k absorpci světla. V excitovaném stavu setrvá molekula řádově několik nanosekund. Návrat do základního stavu je doprovázen uvolněním energie v podobně fluorescenčního záření. Emisní spektrum má vyšší vlnovou délku než spektrum excitační (Stokesův posun, **Obrázek 3.1**). Kratší vlnová délka má větší energii potřebnou k vybuzení molekul na vyšší energetickou hladinu. Intenzita emitovaného světla zvolené excitační vlnové délky je závislá na napětí, které se vyskytuje na membráně a pro každý fluorofor má určitou vlnovou délku [54,55].



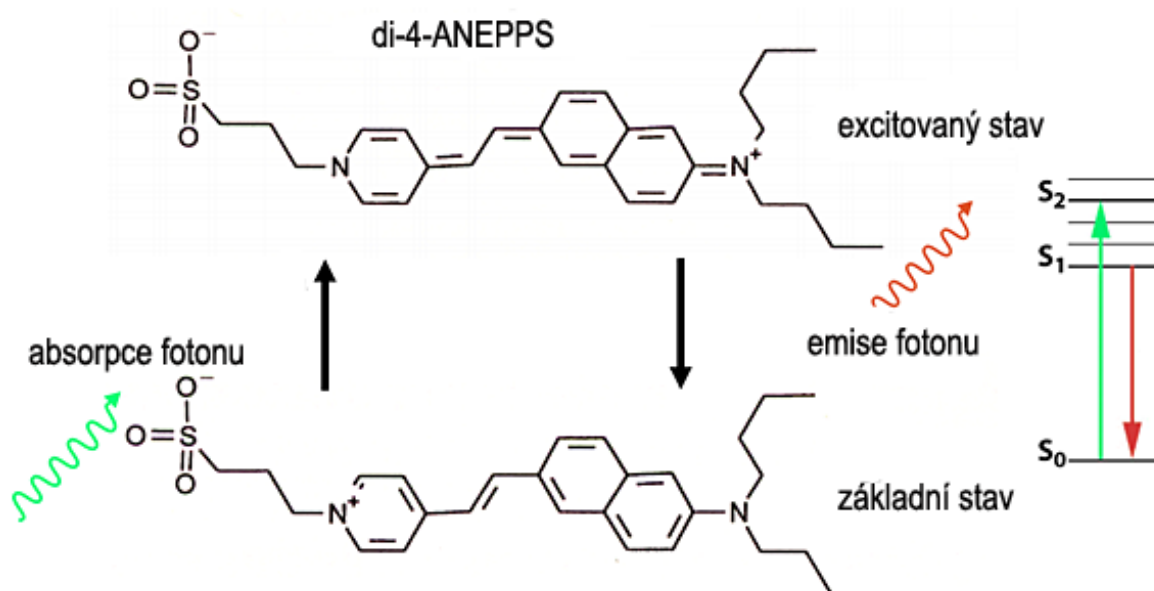
Obrázek 3.1: Excitační a emisní spektrum, Stokesův posun, [18].

Důležitou vlastností, kterou musejí barviva obecně splňovat, je maximální odolnost proti photobleachingu (vybělování fluorochromu laserovým paprskem), tzv. fotostabilita. Vybělováním totiž chromofor ztrácí své vlastnosti. Dále musí mít minimální vliv na chování a funkci sledované buňky v klidovém i v excitovaném stavu

a na její membráně by mělo zůstat navázané co nejdéle. Pro snímání změn membránového napětí se využívá barviv s rychlou odezvou. Musejí být schopna reagovat dostatečnou rychlostí na změny a přesně tak popsat časový průběh AP [54].

3.1.1 Barviva ANEP

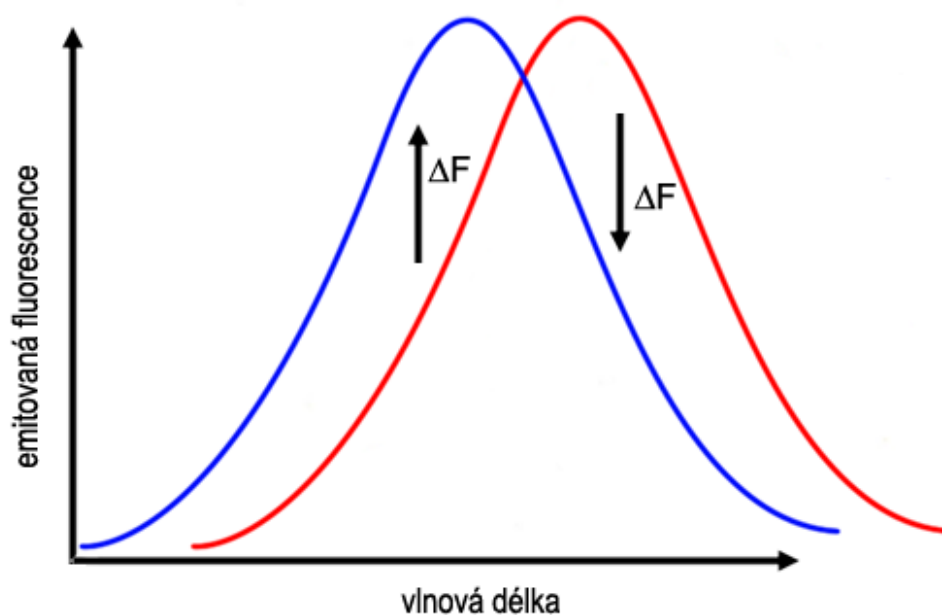
Barviva ANEP (celým názvem aminonaphthylethenylpyridinium) se řadí mezi barviva reagující na změny membránového napětí, přičemž odezva na depolarizaci membrány se pohybuje v řádech milisekund, čímž se tato barviva řadí mezi fluorescenční barviva s rychlou odezvou. Fungují na principu změny jejich elektronové struktury. Během excitace dochází k přesunu kladného náboje z atomu dusíku hydrofilní části molekuly vázané na vnější stranu buněčné membrány přes celý vlastní chromofor na hydrofobní část vázanou k vnitřní straně buněčné membrány. U membrány v polarizovaném stavu dochází k souhlasnému pohybu kladného náboje spolu s napětím na membráně. Na **obrázku 3.2** je k vidění princip změny elektronové struktury u barviva di-4-ANEPPS. Reagují změnou fluorescence na změny v elektrickém poli, ve kterém se nacházejí. Změna napěťově závislé fluorescence je však i u takto rychle reagujících barviv často malá. Obvykle vykazují 2-10% změny fluorescence na 100 mV. Slouží k fluorescenčnímu mapování změn akčního potenciálu podél neuronových a svalových vláken, ale původně byla vyvinuta ke sledování elektrické aktivity srdeční tkáně. Typickými zástupci ANEP barviv jsou di-4-ANEPPS a di-8-ANEPPS [56].



Obrázek 3.2: Chemická struktura základního a excitovaného stavu barviva di-4-ANEPPS, [57].

Di-4-ANEPPS je vhodné pro použití na velmi krátkých experimentech, jelikož jeho vazba na membránu není tak silná jako u di-8-ANEPPS, které je fotostabilnější a také vykazuje menší fototoxicitu. Barviva fluoreskují až po navázání na buněčnou membránu. Jejich další vlastností je zavedení posunu maxima excitačního a emisního spektra umožňující kvantifikaci membránového potenciálu užitím poměrů (**Obrázek 3.3**). Jestliže jsou barviva navázána na membránu neuronu, hodnoty excitačních a emisních maxim se pohybují na vlnové délce 475 nm a 635 nm. Po změně membránového potenciálu dochází k poklesu maxima excitačního spektra a nárůstu emisního spektra fluorescence. Výsledkem je tzv. red shift, snížení energetického rozdílu mezi základním a excitovaným stavem. Dochází k posunu k delším vlnovým délkám o nižší energii. Opakem je tzv. blue shift vznikající během depolarizace, kdy dochází k posunu ke kratším vlnovým délkám mající vyšší energetickou hodnotu [54,55,58].

Kromě di-4-ANEPPS a di-8-ANEPPS patří mezi barviva ANEP také barviva kationtová. Di-1-ANEPEQ, které je rozpustné ve vodě a lze jej do buňky vložit mikroinjekcí. Dále například di-4-ANEPPDHQ využitelné při snímání elektrické aktivity u neuronových sítí. ANEP barviva barví oranžově [55,56].

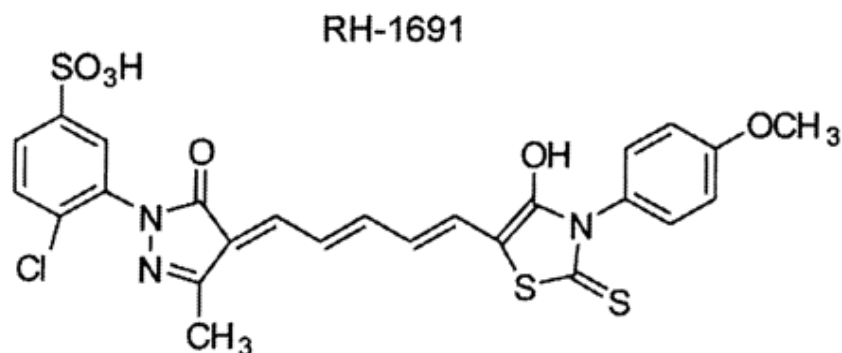


Obrázek 3.3: Posun emisního spektra u barviv ANEP, změna fluorescence ΔF .

3.1.2 Barviva RH

RH barviva původně syntetizovaná a pojmenovaná po Rině Hildesheimové vznikla v laboratořích Amirama Grinvalda. Obsahují dialkylaminophenylpolyenylpyridinium. Stejně jako barviva ANEP patří mezi barviva s rychlou odezvou a slouží především k funkčnímu zobrazování elektrické aktivity neuronů. K nejpoužívanějším RH barvivům patří RH-237, RH-414, RH-421 a RH-795. Každé barvivo má své speciální určení, kdy by nemělo způsobovat obtíže po aplikaci. Jestliže dojde k použití například RH-414 barviva k obarvení mozkové kůry, dojde k zúžení arterií. Barvivo určené k tomuto účelu – RH-795, tyto nežádoucí účinky nemá. Z toho vyplývá, že různá barviva mají různé fyziologické účinky. Nejpozději vzniklá barviva RH-1691 (chemická stavba, **Obrázek 3.4**) a RH-1692 byla úspěšně použita *in vivo* na zvířatech bez anestezie [55,59].

Stejně jako u barviv ANEP dochází i u barviv RH k excitačnímu a emisnímu posunu spektra v reakci na akční potenciál. Spektra jsou silně závislá na okolním prostředí, ve kterém se barviva nacházejí a po depolarizaci membrány dochází ke snížení fluorescence. Využití RH-237 barviva v kombinaci s fluorescenčním Ca^{2+} indikátorem umožňuje simultánní optické mapování membránových potenciálů. Barví modrou barvou [59].



Obrázek 3.4: Chemická stavba barviva RH-1691, [60].

4 BUNĚČNÉ KULTURY

Smyslem buněčné kultivace je udržení životaschopnosti buněk a buněčných součástí, jejich rozmnožení a následné využití mimo tělo (*in vitro*) v pufrovacích roztocích obsahujících živiny, které napodobují fyziologické prostředí těla. Buněčné kultury představují zdroj biologického materiálu, který lze využít jak pro vědecké účely v oblasti výzkumu (například pro pokusné účely související s vývojem léků, nebo během testů toxicity), tak i ve výrobě (například bílkovinných molekul a peptidů nebo monoklonálních protilátek, virových vektorů). Přispívají také k omezování pokusů prováděných na zvířatech, jelikož oproti živým organismům mají zásadní výhody. Pokus probíhá na konkrétním buněčném typu a není nijak omezen interakcemi s dalšími buněčnými populacemi, tkáněmi nebo orgány. Na druhou stranu však práce s živými modely není nahraditelná beze zbytku, jelikož buňky pěstované *in vitro* nemohou spolehlivě odrážet vlastnosti buněk, tkání a orgánů, které se nacházejí v podmínkách *in vivo*. Buněčné kultury mohou zahrnovat jak kultury prokaryotických organismů (bakterie), tak kultury eukaryotických organismů (kvasinky, rostliny a živočišné buňky). Tkáň, které slouží pro prvotní založení buněčné kultury v laboratorních podmínkách pocházející z živočišných buněk, mohou být původem z pupečnickové šňůry, krevních buněk, placenty nebo chrupavek, ale i ze zvířat [61,62,63].

Prvním krokem pro získání buněčné kultury je izolace buněk daného typu buď z laboratorního zvířete, lidského organismu nebo rostliny (méně časté). Izolace se provádí mnoha různými technikami, které jsou založené na kombinaci mechanického rozvolnění tkáně a enzymatického natrávení mezibuněčné matrix kolagenázou, trypsinem nebo elastázou, v přítomnosti EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina, která váže Ca^{2+}). Buňky jaterního parenchymu se izolují perfuzí orgánu vhodným roztokem obsahujícím proteázy. Následná separace buněk je umožněna centrifugací založené na rozdílných fyzikálních vlastnostech (velikost částic, hustota), využití různých kultivačních podmínek, na které reagují pouze požadované buňky určené ke kultivaci (nevýhodou je však menší spolehlivost), anebo využití schopnosti buněk různě rychle adherovat na určité typy kultivačních povrchů [61].

Buňky získané přímo z organismu a následně pěstované v kultuře se nazývají buněčné kultury primární. Vhodným zdrojem primárních buněčných kultur jsou embrya a mladí jedinci a orgány jako ledviny či játra. Po převedení do kultivačního média jsou schopny přežít pouze ty buňky, které jsou lépe přizpůsobeny daným podmínkám. Existují několik dní, poté, po rozmnožení, je nutné jejich převedení do nového kultivačního média, aby bylo možné je udržet při životě. Cílenou selekcí těchto kultur vhodnými fyzikálními nebo chemickými mutageny se získávají buněčné linie. Buněčné

kultury se dělí do dvou skupin. První skupinou jsou buňky suspenzní, které je možné získat například přímo z nádorových buněk. Druhou skupinou jsou kultury jednovrstvé, jež byly odebrány z buněk normálních a na rozdíl od suspenzních kultur obvykle rostou v jedné vrstvě (monolayer). Primární buněčné kultury mají diploidní sadu chromozomů [62,63,64].

4.1 Buněčné linie

Jakmile se buňky (buněčné kultury) nacházejí před koncem exponenciální růstové fáze, provádí se jejich pasážování. Množící se buňky adherují na kultivační povrch i na sebe navzájem, a proto je nutné je před pasážováním uvolnit. Poté se rozvolní například pomocí enzymů (trypsin, kolagenáza), naředí a přenesou do nové kultivační nádoby s médiem, které je opět bohaté na živiny. Buněčné linie získané z primárních buněčných kultur mají omezenou schopnost buněčného dělení. Jedná se o tzv. omezené linie dělící se po určitou dobu, která je dána geneticky podmíněným procesem stárnutí, během něž buňky tuto schopnost dělení postupně ztrácejí. Jsou plně přizpůsobené na život *in vitro* a mohou být opakovaně pasážovány, ale pouze po určitém počtu pasáží. Během pasážování převládají buňky s nejvyšší schopností růstové kapacity a navíc dochází ke změně jejich vlastností. Jejich životnost však do jisté míry záleží i na typu kultivovaných buněk. Například buňky embryonálního původu je možné kultivovat déle než buňky, které pochází z dospělého jedince [61,63,64].

Neomezené buněčné linie (kontinuální, immortalizované) se z nich stávají procesem zvaným transformace (vzniká spontánně, může jít o nádorové buňky, nebo je podmíněna například virovou nebo chemickou transformací). Kontinuální buněčné linie mají ploidní (aneuploidní, heteroploidní) sadu chromozomů [61,63,64].

4.1.1 Buněčná linie HEK293

Buněčná linie HEK293 (**Obrázek 4.1**) byla odvozena z lidských embryonálních ledvinných epiteliálních buněk (human embryonic kidney), které byly získány legálně provedenou interrupcí, a v roce 1970 poprvé laboratorně zkultivována Alexem van der Ebem na univerzitě v Leidenu v Holandsku. Její následná transformace založená na použití fosforečnanu vápenatého byla provedena Frankem Grahamem v roce 1977. Původně bylo provedeno celkem osm transformací, při nichž získal pouze jeden klon buněk schopný přežít po dobu několika měsíců. Při provádění transformace byla do ledvinných buněk vpravena virová DNA adenoviru 5. Transformace vedla k začlenění přibližně 4,5 kilobází z virového genomu do lidského chromozomu 19 a k immortalizaci

této buněčné linie. Přídomek 293 získala buněčná linie HEK na základě Grahamova 293. pokusu v řadě [7,8].

Embryonální ledvinné buňky obsahují malou heterogenní směs téměř všech typů buněk, které jsou přítomny v těle a transformací adenovirem 5 může být podstatně narušena exprese a morfologie ledvinných buněk. Touto transformací získávají lidské embryonální ledvinné buňky vlastnosti typické pro nezralé neuronální buňky. O neuronálním původu se uvažuje z důvodu přítomnosti mitochondriální ribonukleové kyseliny (mRNA) a genových produktů, které jsou typické pro neuronální buňky. Silná imunoreaktivita buněk HEK pro čtyři hlavní podjednotky neurofilament běžně exprimovaných v neuronech taktéž poukazuje na souvislost s neuronálním původem [8,9,10].

Buněčná linie HEK293 se v praxi hojně využívá pro výrobu savčích rekombinantních proteinů, a jelikož pochází z lidských buněk, je její hlavní výhodou, že tyto proteiny obsahují přirozené posttranslační modifikace, ke kterým patří například správná tvorba disulfidových můstků důležitá při skládání molekuly do terciární struktury. Další výhodou buněčné linie HEK293 je velmi snadná kultivace, taktéž se dobře a rychle dělí a množí a účinnost transfekce je poměrně vysoká. Vzhledem k jednoduchosti provedení transfekčních metod jsou buňky využívány pro studium, ve kterém není hlavním cílem sledovat chování samotné buňky. Lze je například využít pro studium účinků léků na sodíkové kanály. Naopak k jejich nevýhodám se řadí poměrně velká náchylnost k infekcím a potřeba dražších kultivačních médií [8,65].

Existuje několik variant odvozených od mateřské buněčné linie HEK293, které mají mnohem rychlejší růst, snazší kultivaci a došlo u nich ke zlepšení výsledků transfekcí.

HEK293A – subkultura buněčné linie HEK293, která se vyznačuje plochou morfologií, která usnadňuje počáteční výrobu, amplifikaci a titraci replikačního adenoviru. Ve své struktuře obsahuje stabilní E1 gen podporující E1 proteiny potřebné pro generaci rekombinantního adenoviru [66].

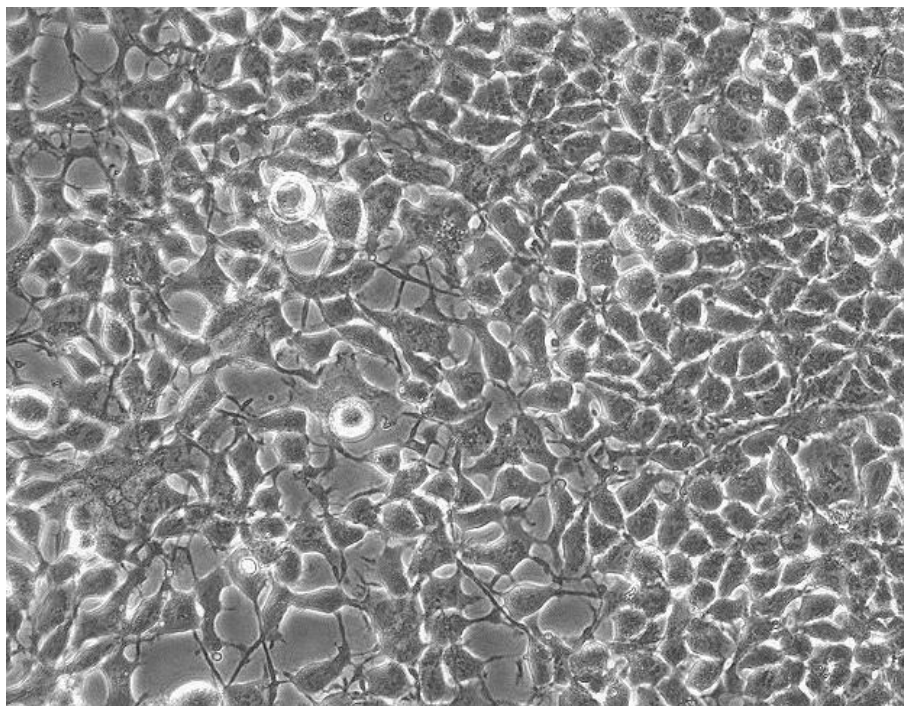
HEK293E – linie se stabilně provedenou transfekcí exprimující virus Epstein-Barrové pro nukleární antigen 1 (EBNA1). Obsahuje replikační počátek *oriP*. Takto upravené buňky jsou schopné během buněčného dělení plasmidy přenášet do buněk dceřiných. Výsledkem je tedy zvýšení celkového výtěžku rekombinantních proteinů oproti liniím, které antigen EBNA1 neobsahují. [67,68,69].

HEK293-6E – podobná linii 293E, pouze obsahuje kratší verzi genu EBNA1, kterým byla transfekovaná, jehož vlastností je nižší cytotoxicita, a lze ji kultivovat bez séra [70].

HEK293F – linie s bezsérovou a suspenzní kultivací („freestyle“) [71].

HEK293S – linie exprimující opsiny, skupinu světlo-citlivých proteinů. Buňky této linie jsou adaptované na suspenzní kultivaci [72,73].

HEK293T – linie využitá i v této diplomové práci má stabilně provedenou transfekci genem pro velký T antigen polyomaviru SV40 (onkoprotein). Výsledkem je episomální replikace transfekovaných plasmidů s počátečním místem replikace SV40. Episomální replikace představuje děj, během něž dochází k replikaci plasmidu v hostitelském organismu, do kterého byl transfekován. Množením buněk nedochází k úbytku tohoto plasmidu a projevem je nárůst produkce rekombinantních proteinů. Episomální replikaci kromě 293T umožňují také linie 293E a 293-E6. Využívají se pro tvorbu retrovirových vektorů [69,74].



Obrázek 4.1: Buněčná linie HEK293, [75].

4.1.2 Kultivace buněčných linií HEK293

Zajištění životnosti buněk a jejich následného množení v prostředí *in vitro* je umožněno pouze při dodržení vhodných kultivačních podmínek, ke kterým se řadí teplota prostředí, složení atmosféry a kultivačního média [61].

Kultivované buňky HEK293 žijí a množí se v kultivačních nádobách umístěných v inkubátoru, které jsou schopné tyto podmínky zajistit. Důležitá je sterilita inkubátorů, aby nedocházelo ke kontaminaci kultivovaných buněk mikroorganismy z okolního prostředí, bakteriemi a plísněmi. Optimální teplota pro růst buněk se pohybuje v rozmezí teploty organismu, ze kterého pocházejí, tedy 37 °C. Aby nedocházelo k odpařování vody z média v kultivační nádobce, měla by se relativní vlhkost atmosféry v inkubátoru udržovat na hodnotě 90%. Dalším důležitým prvkem u složení atmosféry je 5% obsah oxidu uhličitého (udržuje pH média) [61].

Pěstování buněk probíhá v kultivačním médiu, které musí napodobovat extracelulární tekutinu. Musí být bohaté na živiny, ke kterým se řadí bílkoviny, vitamíny, růstové faktory, glukóza jako zdroj energie, některé peptidy, mastné kyseliny a lipidy, anorganické soli, pufrů a stopové prvky. Dále by mělo usnadňovat difúzi kyslíku a oxidu uhličitého tím, že nad vrstvou buněk uchycených k povrchu vytvoří tenkou vrstvu kapaliny. Živiny musí médium dodávat neustále, proto je potřeba jej dvakrát až třikrát týdně vyměnit. Růstové faktory, stopové prvky a vitamíny lze do kultivačního média dodávat v podobě séra, které také podporuje adhezi buněk. Napomáhá buňkám odolávat mechanickému poškození danou koncentrací bílkovin. Nejčastěji využívanými séry jsou séra bovinní, hlavně fetální bovinní sérum, jelikož je bohaté na obsah růstových faktorů, které jsou pro následnou proliferaci buněk důležité. Ke kultivaci buněk bylo použito médium Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), které obsahuje 10% fetální bovinní sérum (FBS). Přidává se do něj 1% antibiotikum (penicilin/streptomycin), které zabraňuje kontaminaci kultury bakteriemi, a 1% L-glutamine [61].

Pokud se buňky pěstují v suspenzi, je dalším krokem pro udržení životaschopnosti buněk a jejich dělení promíchávání. Promícháváním se napomáhá přenosu plynů mezi plynnou a kapalnou fází, lze je takto udržet v suspenzi a zároveň tak zamezit sedimentaci. U suspenzní kultivace je však vhodné se vyvarovat vyšší koncentraci vápenatých iontů Ca^{2+} způsobující spojování buněk ve shluky, což je příčinou snížení aktivní plochy určené k interakci s transfekčními komplexy [61,76].

Jelikož pěstování buněčné linie HEK293 probíhá většinou adherentně, potřebují buňky pevný povrch v podobě kruhových sklíček, na něž se uchytí. Povrchy by měly být hydrofilní. Mohou být speciálně upraveny potahováním pomocí polypeptidů z aminokyselin majících polární postranní řetězec nebo kolagenů (i želatiny), aby se buňkám usnadnilo uchycení [61].

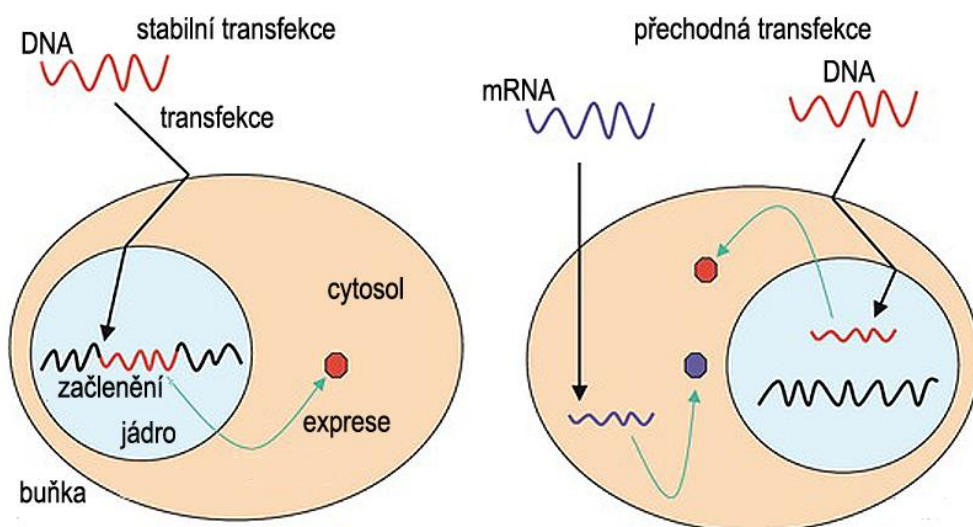
5 TRANSFEKCE PLASMIDŮ

Studium funkce proteinů, produkce jejich rekombinantů v savčích buňkách a studium funkce genů a genových produktů stimulací nebo inhibicí exprese daných genů je umožněno nástrojem zvaným transfekce. Jedná se o molekulárně biologickou metodu, kterou je cizorodá nukleová kyselina, nejčastěji v podobě vektorů, vpravena do hostitelské (eukaryotické) buňky, aniž by k tomu bylo zapotřebí virových metod, které jsou z hlediska úrovně zabezpečení pracoviště velice náročné. Jako cizorodou nukleovou kyselinu lze použít DNA, plasmidovou DNA nebo RNA. Výsledkem jsou tak geneticky modifikované buňky, v nichž vpravená nukleová kyselina může přežívat jako stabilní (permanentní) nebo přechodná (transientní) v závislosti na povaze genetického materiálu. Účel transfekce RNA je podobný účelu transfekce plasmidů – zvýšit či potlačit expresi daných genů. Rozdíl mezi nimi je takový, že transfekce RNA může být provedena pouze přechodně. Lze ji provádět jak *in vitro*, tak *in vivo* [77,78].

Transfekce *in vitro* probíhá v laboratorních podmínkách ve zkumavce, kdy je buněčná kultura smíchána s cizorodou DNA a po nějaký čas dochází k inkubaci. Transfekce *in vivo* představuje přenesení cizorodého genetického materiálu do živého organismu buďto lokálně (například přímo do nádoru), systémově, nebo například do břišní dutiny. Většinou se tento způsob transfekce používá při léčbě nemocí nebo pro zlepšení symptomů nemoci [77].

Naopak transfekcí plasmidů se rozumí metoda přenosu genetického materiálu do prokaryotické hostitelské buňky, která se nazývá pojmem transformace. Nejpoužívanějším hostitelským organismem určeným pro transformaci je bakterie *Escherichia coli*

Rozdíl mezi oběma druhy transfekce je na **obrázku 5.1**. U stabilní transfekce (vlevo) je cizorodá DNA vpravena do jádra buňky přes plasmatickou a jadernou membránu. V jádře dochází k její integraci do genomu hostitelské buňky a reprodukovatelné expresi. U přechodné transfekce (vpravo) je cizorodá DNA vpravena do jádra, ale k její následné integraci do hostitelského genomu již nedochází. Cizorodá mRNA se vpravuje do homogenní části cytoplazmy zvané cytosol, kde dochází k její translaci. Šestiúhelníky představují produkty (exprimované proteiny) transfekčních nukleových kyselin [77].



Obrázek 5.1: Rozdíl mezi stabilní a přechodnou transfekcí, [77].

Výsledkem stabilní transfekce je tedy integrace cizorodé nukleové kyseliny do chromozomální DNA. Genetické materiály mající specifické sekvence pro selekci (transgeny) se do genomu hostitelské buňky začleňují rekombinací a stávají se tak jeho trvalou součástí. Nehrozí tak vymizení včleněné nukleové kyseliny a spolu s hostitelskou buňkou se tento vložený cizorodý genetický materiál replikuje i při následném dělení buněk. Přenášený gen musí překonat plasmatickou i jadernou membránu. Pravděpodobnost výskytu dvou a více kopií transfekčních nukleových kyselin je velmi malá. Z transfekované kultury se vybírá zástupce mající vhodné vlastnosti, které byly od transfekce vyžadovány, například vysoká produkce rekombinantních proteinů. Tento zástupce je poté dále používán pro klonování. Stabilní transfekce je však časově velice náročná [77,79].

Úspěšnost stabilní transfekce se mění v závislosti na typu použité nukleové kyseliny. Vyšší efektivnosti je však dosaženo použitím lineárního typu. Zda bylo provedení transfekce úspěšné lze zjistit pomocí selektivního média. Buňky, které se nepodařilo transfekovat nebo u nich došlo k transfekci přechodné, v médiu zemřou. Úspěšně transfekované, exprimující gen rezistence vůči antibiotikům na dostatečné úrovni, nebo ty, které mohou kompenzovat nedostatek esenciálního genu, v něm přežijí [77,79].

Přechodná transfekce se využívá v případech, kdy je potřeba v co nejkratším časovém úseku (několik hodin) vyprodukovat rekombinantní proteiny na úkor jejich menšího množství. Oproti permanentní transfekci se liší v tom, že začleněná cizorodá nukleová kyselina se trvalou součástí genomu hostitelské buňky nestává. Přetrvává v ní

v extrachromozomálním stavu pouze po několik dní. Nedochozí tedy k její integraci do genomu eukaryotické buňky. K expresi vložených genů dochází pouze po určitou dobu, do okamžiku, než proběhne buněčné dělení, jelikož během něj se transfekční nukleová kyselina na buňky dceřiné nepřenáší. V hostitelské buňce se transfekčních nukleových kyselin může nacházet hned několik. To může zvýšit expresi žádaných transgenů, k níž dochází hned v okamžiku po proniknutí do jádra hostitelské buňky. Po expresi genů ihned následuje syntéza proteinu [77,80].

Přechodně transfekovaný genetický materiál lze velmi lehce ztratit vlivem faktorů prostředí, degradací pomocí nukleáz a při již zmíněném buněčném dělení. Zatímco transfekovaná DNA je přemístěna do jádra buňky, kde proběhne její transkripce, transfekovaná RNA přetrvává v cytosolu. Během několika minut po provedení transfekce proběhne buď její exprese, nebo pomocí navázání na mRNA dojde k potlačení exprese daného cílového genu [77,80].

5.1 Transfekční metody

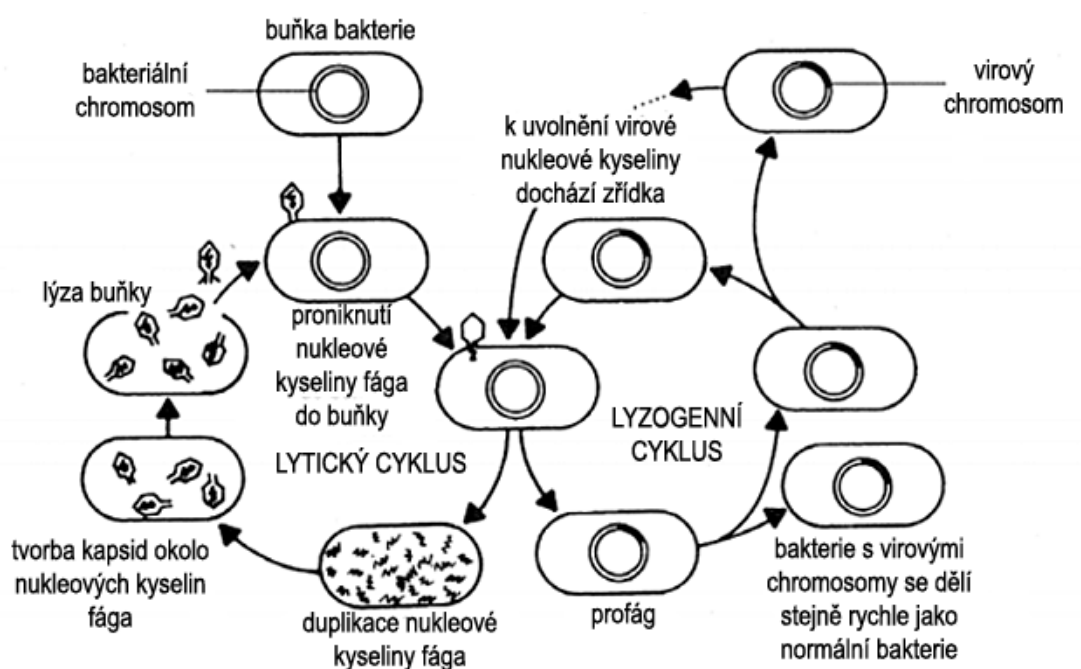
Výběr mezi stabilní a přechodnou transfekcí je proto závislý na typu experimentu, jelikož každá z těchto metod má svá pro a proti. Zvolení optimální metody se také odvíjí od použití daného typu buněčné linie, účelu transfekce a cíli, kterého má být během pokusů dosaženo. Obecně však platí, že by ideální metoda měla mít vysokou účinnost transfekce, pro buňku by měla být co nejméně toxická a zároveň by měla co nejméně ovlivňovat její přirozenou fyziologii. Také by měla být snadno reprodukovatelná a její použití by nemělo být příliš složité. Jak již bylo uvedeno výše, hlavním cílem transfekčních metod je kromě studia funkce genů a genových produktů zvýšením či potlačením exprese specifických genů také produkce rekombinantních proteinů savčích buněk [77].

Transfekční metody se obvykle dělí do tří skupin – biologické, biochemické a fyzikální. [77].

5.1.1 Biologické metody transfekce plasmidů

Biologické metody transfekce nesou označení pod pojmem transdukce, jelikož pro přenos cizorodé DNA do hostitelské buňky využívají především virových a fágových vektorů. Bakteriofágy se dělí na temperátní, které se do bakteriálního genomu včleňují lyzogenní infekcí, a virulentní, jež během lytické infekce hostitelskou buňku zabíjejí, a jejich DNA zůstává nezávislá na hostitelském genomu. Jedná se o nejběžněji používanou metodu transfekce z důvodu vysoké účinnosti a snadného dosažení

udržitelné exprese transgenů viru *in vivo*. Viry mají integraci do genomu hostitelské buňky ve své povaze již od přírody. Při jejich množení dochází k přenosu virového genetického materiálu přes plasmatickou membránu hostitelské buňky a zároveň i k jejich expresi. Proto je u těchto metod možné přímo využít jejich přirozeného životního cyklu. Nejvíce jsou využívány adenoviry a retroviry, které slouží spíše pro přenesení genu v jeho stabilní podobě do buněčné linie nebo pro včlenění do buněk zvířecích. Po začlenění do hostitelského genomu dochází k expresi integrované DNA a společně s hostitelským genomem je přenášena i do následujících generací transfekovaných buněk, a tak je zajištěna její trvalá exprese [77].



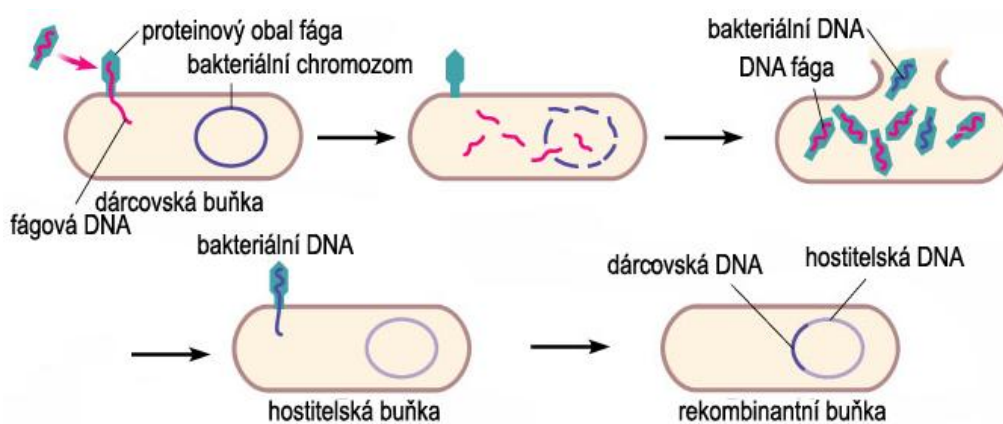
Obrázek 5.2: Životní cyklus bakteriálního viru, [81].

Transdukce se dělí na transdukci obecnou (generalizovanou, **Obrázek 5.3**) a specializovanou (restringovanou). Mechanismus obecné transdukce je proces probíhající během přechodu z lyzogenního cyklu bakteriofága na cyklus lytický. Do malé části fágových hlaviček se zabalí místo DNA fágové rozstříhaná hostitelská nukleová kyselina, která má stejnou velikost jako DNA fágová. Dárčovská buňka je poté vystavena lýze (destrukci), což má za důsledek uvolnění fágových partikulí obsahujících bakteriální DNA. Fág nesoucí tuto DNA napadá novou hostitelskou buňku a rekombinací vzniká buňka obsahující jak svou původní DNA, tak cizorodou. Během přenosu je bakteriofág schopen přenést jakýkoliv úsek genomu dárčovské buňky do buňky hostitelské [82].

Specializovaná transdukce nastává během chybného vystřížení bakteriofága z hostitelského genomu při přechodu z lyzogenního cyklu na cyklus lytický, během něž je do hostitelského genomu začleněna cizorodá nukleová kyselina jako tzv. profág. K jeho vyčlenění z genomu hostitelské buňky dochází buď spontánní cestou, nebo účinkem indukčních činitelů (UV), což má za následek spuštění lytického cyklu. Během transdukce je vždy přenesena pouze malá část bakteriální DNA, která s integrovaným fágem sousedí [82].

I přes svou velkou využitelnost má tato metoda jisté nedostatky. Patří k nim schopnost imunogenicity, vyvolání nežádoucí buněčné imunitní odpovědi, a cytotoxicity, což je vlastnost způsobující poškození transfekované buňky, konkrétně její buněčné membrány. Začlenění virového vektoru do genomu hostitelské buňky probíhá náhodně, a proto může dojít k zánětlivé reakci nebo k mutaci typu inserce. Tato mutace má za následek spuštění projevů nádorových genů, onkogenů a je příčinou poškození genů nezbytných pro život [77,83].

Snadnost použití a vysoká účinnost transfekce však nedokáže zastínit již zmíněné nedostatky v průběhu využívání těchto vektorů. Proto je snahou vytvořit metody, v nichž by virových vektorů nebylo zapotřebí [77].



Obrázek 5.3: Obecná transdukce, [84].

5.1.2 Biochemické metody transfekce plasmidů

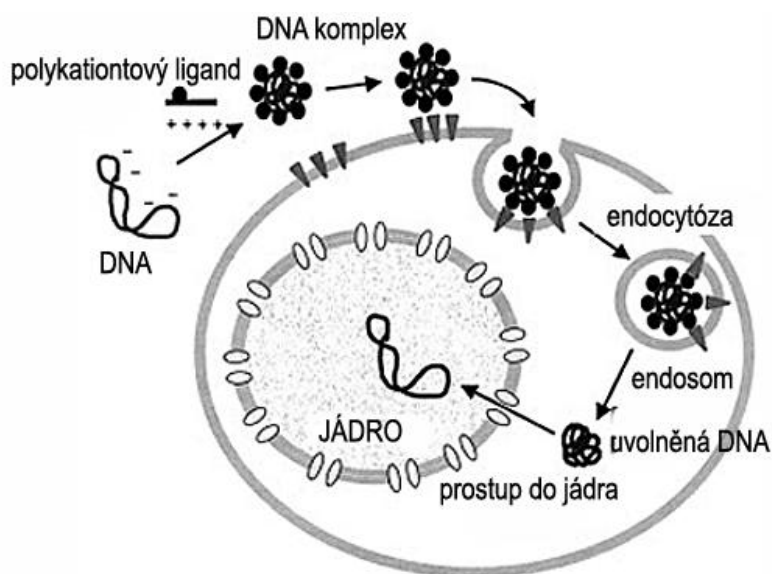
K přenesení cizorodé DNA do savčích buněk byly jako první použity právě biochemické metody. K látkám, které se používají během transfekce, patří kationové polymery (poly(L-lysin), polyethylenimin (PEI), DEAE-D) a aminokyseliny, fosforečnan vápenatý, a k nejčastěji využívaným kationové lipidy (lipofekce) [77,85].

Pracují na principu tvorby vazeb mezi kladně nabitými nukleovými kyselinami (chemickými komplexy) a záporně nabitou buněčnou membránou. Přesný postup

nukleové kyseliny nebo chemického komplexu buněčnou membránou prozatím není znám, ale například smícháním fosforečnanu vápenatého s cizorodou DNA se vytvoří jemná sraženina, jejíž precipitát je buňkou pohlcen prostřednictvím endocytózy. Pravděpodobně se tedy v rámci biochemických metod jedná o endocytózu a fagocytózu. Stejně jako v předchozím případě musí být transfekční nukleová kyselina dopravena do jádra buňky, aby mohla proběhnout její exprese. Ani v tomto případě není známo, jak tento děj probíhá [77].

Lipofekce využívá transfekčního činidla s kladně nabitými skupinami, kterým je lipofilní molekula. Ta má za úkol postupně obklopit přenášenou cizorodou DNA nesoucí záporné znaménko, čímž je usnadněna vazba mezi molekulou a nukleovou kyselinou. Tento komplex fúzuje s buněčnou membránou, a zajistí tak její přenos do hostitelské buňky [86].

Chemická transfekce buněčné linie HEK293 pomocí polyethyleniminu (PEI) přesahuje 50% hranici účinnosti. Jedná se o polymer obsahující primární, sekundární a terciární aminy, které mu udávají pufrovací vlastnosti a schopnost vytvářet komplex s přenášenou cizorodou nukleovou kyselinou. Jak lze vidět na **obrázku 5.4**, po vytvoření DNA komplexu postupuje PEI s navázanou nukleovou kyselinou směrem k buněčné membráně, přes niž je vnesen do intracelulárního prostředí pomocí endocytózy. Vzniklý endosom uvnitř buňky praská kvůli přebytku kladného náboje, který je obsahem PEI, a to způsobí uvolnění cizorodé DNA do cytoplazmy buňky. Vpravená nukleová kyselina překonává jadernou obálku a hromadí se v jádře, kde dojde k jejímu začlenění [85,87].



Obrázek 5.4: Chemická transfekce polykationtovým ligandem PEI, [85].

Existují dva typy PEI, lineární (IPEI) a rozvětvený (bPEI). Větší využití našel IPEI vzhledem ke své vyšší transfekční účinnosti. Usnadňuje navázání na vnášenou nukleovou kyselinu a chrání ji během přenosu. Vyšší transfekční účinnost může být způsobena větší velikostí vzniklých transfekčních komplexů. Konjugaci s komplexem a stálost náboje neseného PEI usnadňuje přítomnost aminoskupin. Komplexy díky tomu rychleji sedimentují a interakce s membránou buňky je tímto vyšší než u bPEI. IPEI ulehčuje translokaci cizorodé nukleové kyseliny do jádra a není závislý na buněčném cyklu a vykazuje zvýšenou životaschopnost buněk [85].

Ve srovnání s transdukcí využívající virových vektorů je efektivita chemických metod závislá na pH roztoku, na stavu buněčné membrány, na chemickém poměru nukleové kyseliny, a obzvláště *in vivo*, je výsledkem menší efektivita transfekce. Stejně tak se však efektivita mění v rámci typu použitých buněk. K výhodám chemických metod patří nízká cytotoxicita, nedochází k mutagenезi a sbalená nukleová kyselina není omezena velikostí [77].

5.1.3 Fyzikální metody transfekce plasmidů

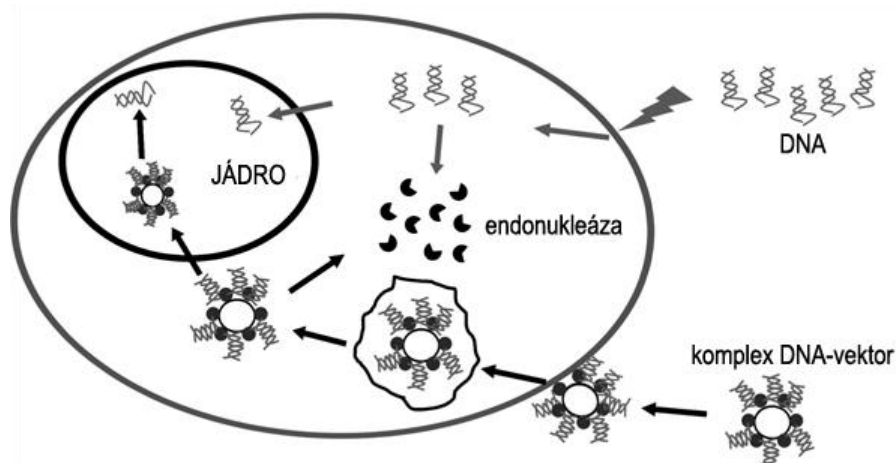
Fyzikální metody patří k nejnovějším metodám, které se k transfekci využívají. Pro přenesení cizorodé nukleové kyseliny do hostitelské buňky se používá mnoho druhů fyzikálních nástrojů. Patří k nim například mikroinjekce, elektroporace, transfekce založená na použití laseru (fototransfekce, optoporace) a například transfekce genovou pistolí [77,86].

Principem mikroinjekce je přímé vstříkávání cizorodé DNA do cytoplazmy nebo jádra hostitelské buňky. Jedná se o velmi invazivní metodu, k jejímž nevýhodám patří častá buněčná smrt způsobená špatnou insercí DNA do buňky. Je využívána hlavně u oocytů při umělém oplodnění [77].

Transfekce genovou pistolí pracuje na principu nastřelování buněk pomocí kovových projektilů, které jsou nejčastěji vyrobeny ze zlata, na jejichž povrchu se nachází cizorodá DNA. Tato metoda je přímá a spolehlivá, její nevýhodou je však velmi vysoká cena a stejně jako u mikroinjekce může dojít k poškození vzorků [77,86].

Elektroporace (srovnání s přenosem pomocí chemického vektoru na **obrázku 5.5**) byla poprvé vyzkoušena na fibroblastech v roce 1982 Neumannem a Wongem. Postupně byla rozšířena na všechny typy buněk. Využívá principu, že buněčná membrána může fungovat jako kondenzátor, který není schopen propustit elektrický proud. Výjimkou jsou iontové kanály, které propustné jsou. Jakmile je však buňka vystavena vysokonapětovému elektrickému poli, dojde k dočasnému přerušování této

bariéry a póry vyskytující se v membráně se otevírají na dostatečnou velikost umožňující průchod makromolekulám (stejně tak i molekulám menším jako například ATP) směrem do buňky, nebo směrem ven. Během této doby vstupuje nukleová kyselina přes intracelulární prostředí buňky až do jejího jádra. Pro získání permanentních transfektantů je vhodnější použití lineární DNA s volnými konci, jejíž začlenění do chromozomu hostitelské buňky probíhá snadněji, jelikož je rekombinogenní. Opětovné uzavírání pórů je přirozeným procesem buněčných membrán, který je při teplotě 0°C možné pozdržet. Jelikož je elektroporace použitelná na všechny typy buněk, k jejím výhodám patří vysoká frekvence permanentních transfektantů, dále vysoká efektivita genové exprese u přechodné transfekce a snadnost použití. Oproti biochemické metodě využívající fosforečnan vápenatý je však náročná na počet buněk určených k přechodné transfekci a na velké množství transfekční nukleové kyseliny [88].



Obrázek 5.5: Transfekce pomocí elektroporace, [89].

Na podobném principu, který využívá elektroporace, funguje i transfekce založená na použití laseru. Místo vysokonapěťového elektrického pole je použit laserový pulz zapříčiňující ozáření buněčné membrány, což vede k vytvoření póru na jejím povrchu. Přechod nukleové kyseliny do prostředí buňky je způsobeno rozdílným osmotickým tlakem mezi médiem, v němž se nachází buňka a nukleová kyselina, a cytosolem buňky. Výhodou optoporace je možnost zvolení, kde přesně na povrchu membrány se má vznikající pór nacházet. Lze ji použít na velmi malých buňkách díky velikosti laserového paprsku [77].

Kromě těchto metod existují také metody založené na využití ultrazvuku (sonoporace) nebo magnetického pole (magnetoporace) [77].

6 PATCH-CLAMP

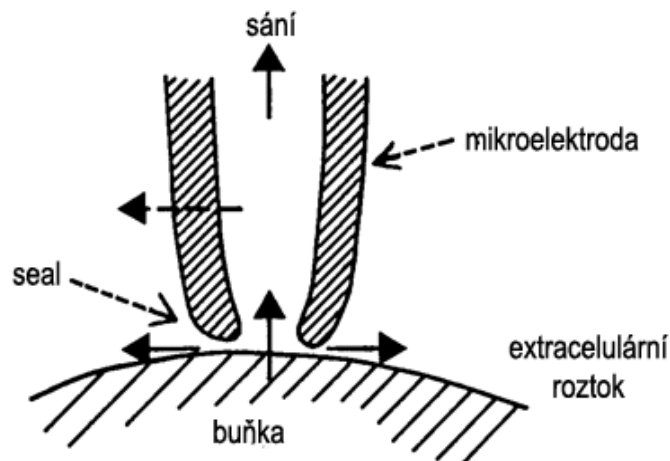
Patch-clamp představuje elektrofyziologickou metodu, kterou lze měřit membránové napětí buněk. Pochází z anglických slov *patch* (kousíček, flíček) a *clamp* (zámek), jejichž spojením vzniká pojem metoda terčíkového zámku. Za její objevitele se považují němečtí badatelé Bert Sakmann a Erwin Neher, kteří tuto metodu poprvé použili v roce 1976, a následně jim za ni byla v roce 1991 udělena Nobelova cena. Ke svému pokusu vysvětlit proudy skrze jeden acetylcholinem aktivovaný kanál v módu *cell-attached* použili úsek membrány kosterního svalu žáby. Počátky využití této metody se dočkaly mnoha rozšíření vedoucích k vylepšení technik zaznamenávajících membránové proudy na oddělených úsecích (*patches*) membrány s vysokou rozlišovací schopností. Monitorování proudů z jednoho jediného molekulárního kanálu poskytuje informace o unitární vodivosti a kinetice chování iontových kanálů. Mimo jiné tato technika umožnila objev nových tříd iontových kanálů. Společně s využitím *voltage-clamp* metody, při níž by úsek membrány měl být dostatečně malý na to, aby obsahoval pouze ojedinelé kanály (nebo jediný kanál), slouží metoda *patch-clamp* ke zkoumání fyziologické role iontových kanálů v buňkách jinak nepřístupných u *voltage-clamp* a u buněk, jež nejsou elektricky excitabilní. Za mezník v rozvoji buněčné elektrofyziologie se však považuje rok 1949 a objev metody měření membránového napětí pomocí skleněných mikroelektrod, která je zásluhou G. Linga a R. W. Gerarda. Do této doby bylo nejčastějším problémem při měření membránového napětí získání elektrického kontaktu s intracelulárním prostředím buňky, aniž by došlo k jejímu poškození. Tímto objevem se přímé měření membránového napětí posunulo až na molekulární úroveň [11,12,13,90].

Principem metody *patch-clamp* je elektrická izolace úseku membrány z vnějšího roztoku (**Obrázek 6.1**) a zaznamenávání proudů tekoucích do měřeného kousku membrány. Toho je dosaženo přiblížením skleněné mikroelektrody naplněné vhodným roztokem elektrolytu (blízkým fyziologickému složení) pomocí mikromanipulátoru proti povrchu buněčné membrány tak, aby došlo pouze k dotyku špičky mikroelektrody a membrány. Nedochozí k jejímu průniku do intracelulárního prostředí buňky. Vlivem podtlaku vyvolaným lehkým sáním dochází k vytvoření tzv. *seal* (pouto). Elektrický odpor v místě kontaktu buněčné membrány a špičky mikroelektrody se pohybuje v hodnotách větších než 10 GΩ. Vysoký odpor vytvořeného pouta je důležitý ze dvou důvodů. Čím vyšší je odpor v kontaktním místě, tím lepší je elektrická izolace části buněčné membrány. Druhým důvodem je snížení proudového rušení na pozadí během zaznamenávání, což následně poskytuje dobré časové rozlišení jednotlivých proudových kanálů, jejichž amplituda se pohybuje v řádu jednotek pikoampérů (pA). Zlomkové

vyjádření mikroelektrodou měřené hodnoty proudu procházejícího úsekem membrány se vypočítá podle vztahu

$$\frac{R_{seal}}{R_{seal} + R_{pipette}} \quad (6.1)$$

v němž R_{seal} vyjadřuje hodnotu odporu vzniklého *seal* a $R_{pipette}$ odpor mikroelektrody [11,12].



Obrázek 6.1: Tvorba *seal* mezi buněčnou membránou a špičkou mikroelektrody, [12].

Odpory úseků membrány jsou velice vysoké, mohou dosahovat hodnoty až 100 GΩ, odpor vytvořeného pouta membrány a mikroelektrody již tak velký není, proto se podílí na tvorbě šumu na pozadí u proudů s hodnotou menší než 4 nebo 5 pA. Přispívá tak ke zhoršení rozlišení u takto malých proudů. S příchodem *gigaseal* však došlo k radikálnímu zlepšení kvality zaznamenávání a možnosti studovat kanály s nižší vodivostí. Termínem *gigaseal* se označuje dokonalé přilnutí špičky mikroelektrody k povrchu buněčné membrány způsobené podtlakem, při němž vzniká kontaktní odpor v řádově desítek až stovek GΩ. Tímto spojením lze měřit i malé proudy díky vylepšení poměru signál šum [12,14].

Podmínky k vytvoření *gigaseal* by měly být následující:

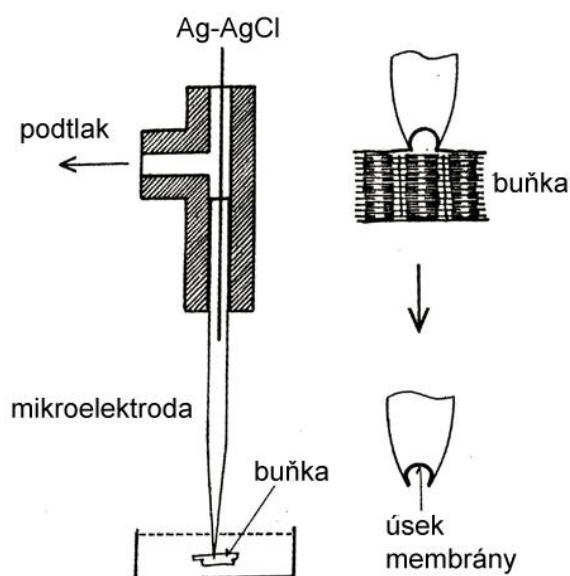
Za první, povrch použité buněčné membrány musí být zcela čistý, nesmí obsahovat extracelulární matrix a zbytky pojivové tkáně. Dává se přednost buňkám tkáňových kultur, jelikož dospělé buňky musejí být vyčištěny buďto enzymaticky, nebo mechanicky [12].

Za druhé, použité roztoky musejí být bez nečistot a makromolekul, kterými mohou být složky obsažené v séru kultivačního média [12].

Za třetí, čistá špička mikroelektrody, uhlazená žárem [12].

Za čtvrté, mírným přetlakem působícím na mikroelektrodu pomocí injekční stříkačky připojené přes mikromanipulátor k elektrodě se docílí malého vypuštění roztoku z elektrody, který ji zbaví možných zbytků nečistot [12].

Schéma měření iontových kanálů pomocí metody *patch-clamp* je k vidění na **obrázku 6.2**.



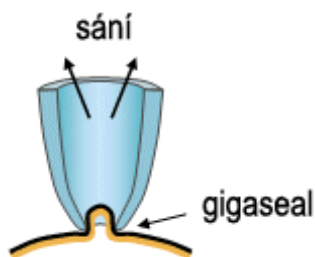
Obrázek 6.2: Metoda *patch-clamp*, [11].

6.1 Metody využívané pro záznam technikou *patch-clamp*

Gigaseal patch-clamp se provádí jak na úsecích buněčné membrány, které zůstávají její součástí v režimu *cell-attached*, tak na úsecích, které její součástí nejsou, tzv. *cell-free*.

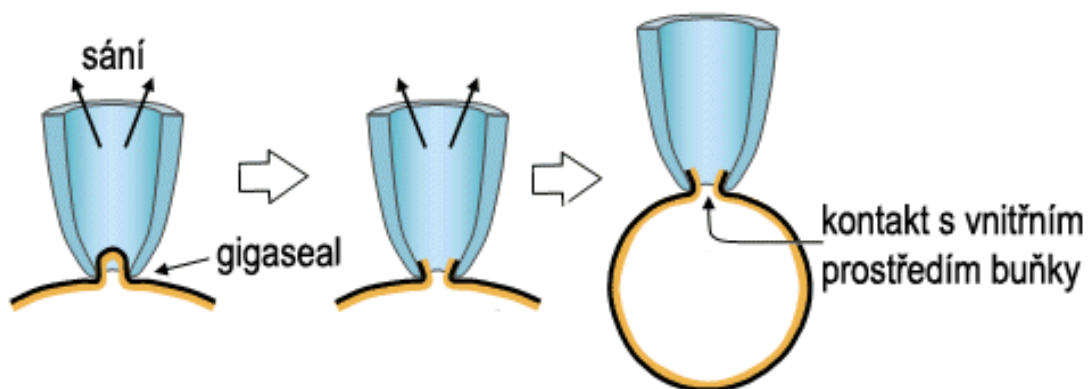
Režim *cell-attached* (**Obrázek 6.3**) se využívá ke studiu proudů jednotlivých iontových kanálů. Během tohoto módu je mikroelektroda dokonale přisátá k povrchu buněčné membrány. Nedochozí k jejímu protržení, ani k oddělení jejího úseku od celku, zůstává součástí. Kanály mohou být řízeny jak napětově změnou potenciálu uvnitř mikroelektrody, tak chemicky, k čemuž je potřeba signálních molekul, tzv. ligandů. Ligandy se vpravují do mikroelektrodového roztoku a zároveň je nutné, aby se daný chemicky řízený kanál nacházel na přisátém úseku membrány. Nevýhodou měření chemicky řízených kanálů je však nutnost měnit koncentraci ligandu v roztoku uvnitř mikroelektrody, k čemuž je třeba využít pro měření další buňky. Výměna iontů mezi vnitřkem a vnějškem mikroelektrody probíhá pouze prostřednictvím všech iontových kanálů té části membrány, která je k ní přisátá. Z tohoto důvodu je někdy nutné pracovat

s vchlípenými částmi oddělenými od buněčné membrány, tzv. *cell-free*, k nimž patří *inside-out* a *outside-out* [12,14,90].



Obrázek 6.3: Režim *cell-attached*, měřený úsek zůstává součástí buněčné membrány, [90].

Dalším režimem využívaným při měření iontových kanálů je *whole-cell* (měření na celé buňce, **Obrázek 6.4**). Rozdíl mezi *whole-cell* a *cell-attached* je ten, že u *whole-cell* režimu dochází k protržení buněčné membrány pomocí krátkého a silného pulzu sání, který vytvoří podtlak a vtáhne protrženou buněčnou membránu do nitra mikroelektrody, která přilne k jejím stěnám. Měřený úsek zůstává nadále součástí buněčné membrány. Intracelulární prostředí buňky je v kontaktu s roztokem v mikroelektrodě. Využívá se k měření iontových proudů z celé buňky. U této techniky lze zvolit dva způsoby měření. Metodu *voltage-clamp* (vnucené napětí), při které měříme proudové odezvy nebo *current-clamp* (vnucený proud), při níž měříme změny napětí membránového potenciálu [11,12,14,90].

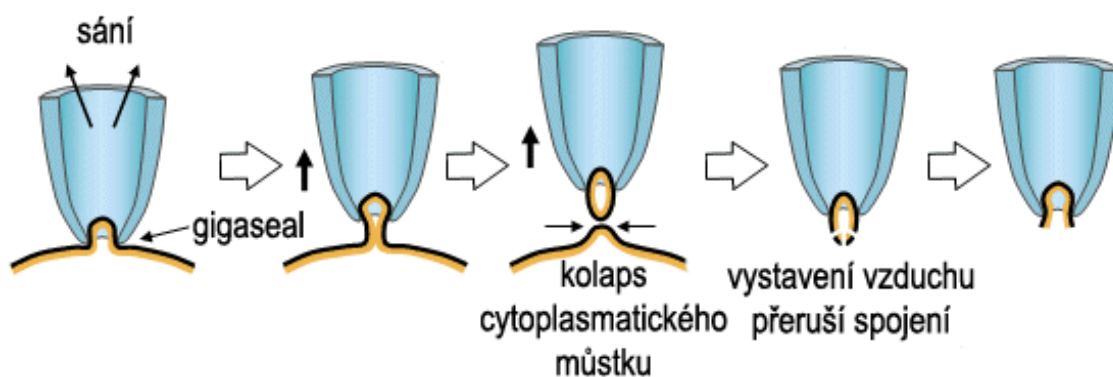


Obrázek 6.4: Režim *whole-cell*, měřený úsek zůstává součástí protržené buněčné membrány, [90].

Následující dvě uvedené techniky spadají do režimu *cell-free*, kdy měřené úseky s iontovými kanály nejsou součástí buněčné membrány, pracuje se pouze s jejími „vystřiženými“ částmi (patches).

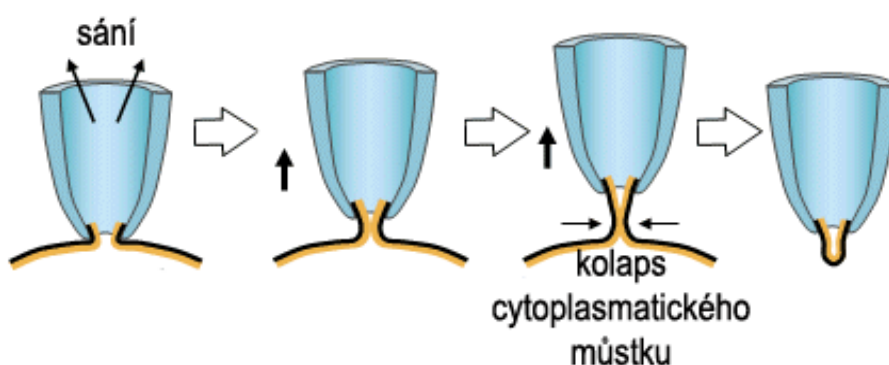
Inside-out (úsek membrány orientovaný vnitřkem ven, **Obrázek 6.5**) vychází z režimu *cell-attached* a nezpůsobuje protržení buněčné membrány. Jedná se o postupné

jemné nasávání vchlípené části membrány, dokud nedojde k odtržení této části od membrány. Održená část se následně spojí v celek. Aby se spojení měřeného úseku membrány předešlo, může se provádět ve vápníkovém roztoku, který tomuto procesu brání. K rozpojení membrány také dojde po vystavení této utržené části vzduchu. Výsledkem je orientace vnitřního prostoru membrány do vnějšího prostoru lázně. Využívá se ke sledování regulace iontových kanálů [11,12,14,90].



Obrázek 6.5: Režim *inside-out*, měřený úsek nezůstává součástí buněčné membrány, [90].

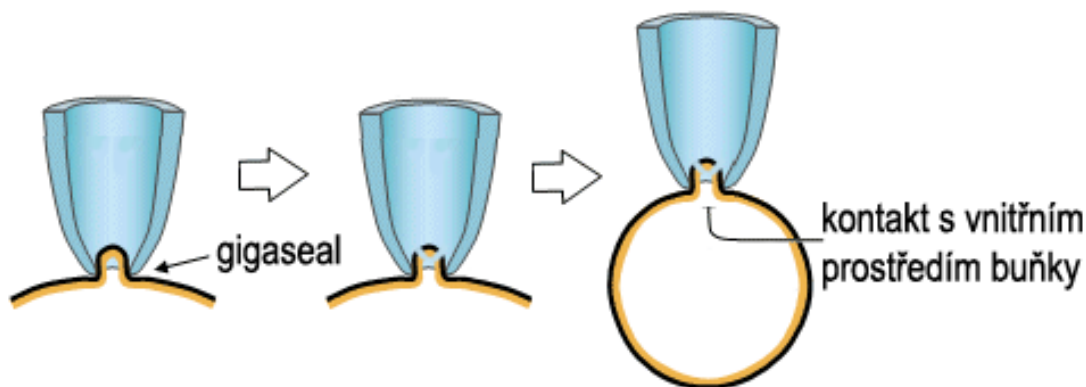
Outside-out (úsek membrány orientovaný vnějškem ven, **Obrázek 6.6**) vychází z režimu *whole-cell* a provádí se na „zmenšené verzi celé buňky“. Při této metodě tedy dochází k protržení buněčné membrány, jelikož je do vnitřku mikroelektrody nasávána síla. Odtržením od membrány dojde ke spojení části nasáté mikroelektrodou v jednotlivý úsek membrány, čímž se získá kontakt roztoku mikroelektrody s vnitřním prostředím buňky. Výsledkem je orientace vnější části membrány do vnějšího prostředí roztoku lázně. Slouží ke sledování chování extracelulárních receptorů [11,12,14].



Obrázek 6.6: Režim *outside-out*, měřený úsek nezůstává součástí buněčné membrány, [90].

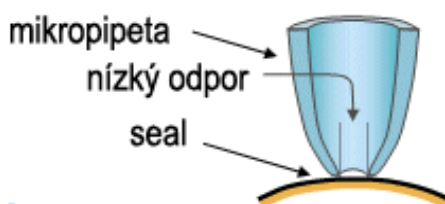
Další modifikací režimu *whole-cell* měření proudu iontových kanálů na celé buňce je tzv. *perforated patch* (**Obrázek 6.7**), při němž ale nedochází k protržení buněčné membrány vzniklým podtlakem, ale za pomoci určitého typu čidla přidaného do roztoku uvnitř mikroelektrody. Činidlem narušujícím povrch membrány jsou obvykle

antibiotika. Narušení membrány tímto způsobem zajišťuje iontovou kontinuitu, ale zároveň zaručuje, že intracelulární bílkoviny nejsou vymývány roztokem uvnitř mikroelektrody. Povrch buněčné membrány nemusí být rozrušen úplně celý, vznikají na něm malé póry, kterými je možné testovat schopnost difuze jednovazebných kationtů a malých molekul s neutrálním nábojem [14,91].



Obrázek 6.7: Režim *perforated-patch*, měřený úsek zůstává součástí buněčné membrány, [90].

V určitých situacích může být nízký odpor při *seal* naopak výhodou. Způsob měření s nízkým odporem v řádech se nazývá *loose-patch clamp* (**Obrázek 6.8**) a byl vyvinut pro účely měření distribuce iontových kanálů na buněčné membráně, konkrétně k vyšetření sodíkových kanálů kosterního svalu. Nízký odpor u *seal* má za důsledek vytvoření mezery, která se nachází mezi membránou a špičkou mikroelektrody. Umožňuje tak měření boční mobility iontových kanálů [12].



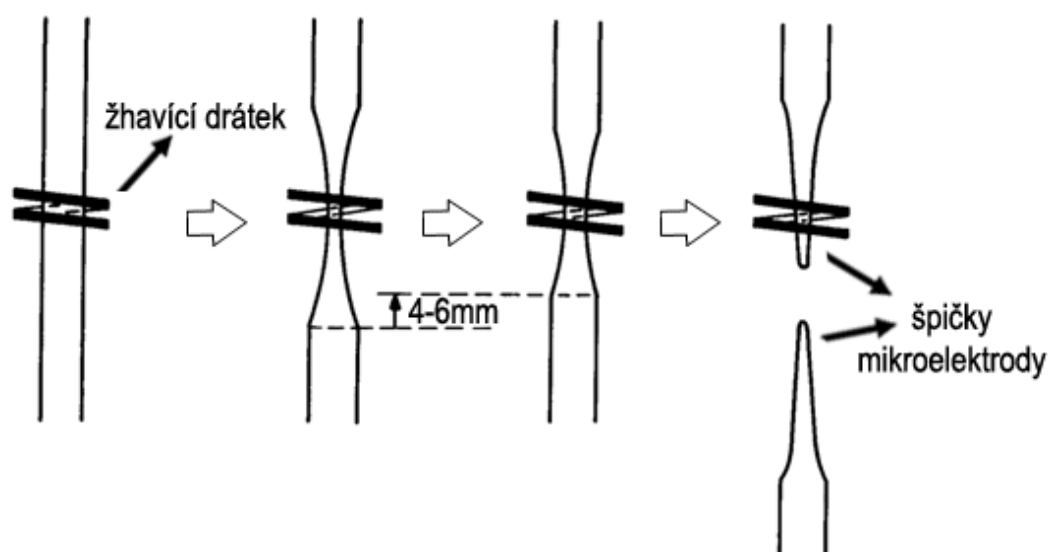
Obrázek 6.8: Metoda *loose-patch clamp*, mezera mezi mikroelektrodou a membránou, [90].

6.2 Skleněné mikroelektrody určené pro patch-clamp

Skleněné mikroelektrody jsou mikrokapilárky, jejichž tvar na koncích připomíná zužující se kužel o průměru řádově jednotek mikrometrů. Velmi vysoký odpor mezi buněčnou membránou a špičkou mikroelektrody znamená, že mezi nimi dochází k jistým hydrofobním chemickým interakcím. Z tohoto důvodu je důležité chemické složení použitého skla, jelikož má na tvorbu *seal* velký vliv, ačkoliv ze studií vyplývá, že vlastnosti skel různého typu nelze vyvodit pevný závěr o ideálním typu skla, který by

měl být využitý jako materiál pro výrobu mikroelektrod. Sklo obsahuje těžké kovy, které snižují bod tání, může však dojít k vyplavení jejich iontů do roztoku uvnitř mikroelektrody, což má za následek modifikaci vlastností iontových kanálů buněčné membrány [11,12,92].

Standardním typem skla využívaným pro výrobu mikroelektrod je „pyrex“ borosilikátové nebo flintové sklo, které má nižší tavný bod a lépe komunikuje s buněčnou membránou. Použití borosilikátového skla však převažuje kvůli svým elektrickým vlastnostem, díky nimž snižuje šum na pozadí. Mikroelektrody vznikají taháním a leštěním za vysokých teplot, k čemuž se nejčastěji využívá platinový drátek vyzářující oranžový žár. Měkké sklo, které má nižší hodnotu tavného bodu a jeho zpracování taháním a tvarováním za nižších teplot je mnohem jednodušší než u skla borosilikátového, však může mít s buněčnou membránou lepší vlastnosti pro tvorbu *seal*. Mikroelektrody využívané pro tvorbu *seal* o nízkém odporu (*loose-patch clamp*) jsou vyrobeny právě z tenkostěnného skla. Silnostěnné mikroelektrody vytvářejí silnější pouto mezi membránou a svou špičkou, čímž snižují šum na pozadí vzhledem k nízkým hodnotám kapacitního odporu elektrody [12].



Obrázek 6.9: Postup zahřívání a tahání trubičky vedoucí k vytvoření mikroelektrod, [12].

Mikroelektrody vznikají zahříváním povrchu v jejich středu až na hodnotu tavného bodu a postupným taháním se docílí úplného přetržení skleněné trubičky. Postup tvorby mikroelektrody je k vidění na **obrázku 6.9**. Zahřívání a tahání mikroelektrody probíhá alespoň dvakrát. K tomuto účelu se využívá tahač elektrod s platinovým drátkem. Tímto způsobem se ze skleněné trubičky získávají dvě identické mikroelektrody. Varianta zaleštění povrchu špičky mikroelektrody pomocí žáru je

možné provést přímo v mikroelektrodevém tahači vyhřívaným platinovým drátkem, kdy je špička mikroelektrody v těsném kontaktu s platinovým drátkem [12].

Nejčastěji se plní roztoky, které svým iontovým složením napodobují roztoky fyziologické. Připomínají tak vnitřní prostředí buňky a díky jejich malým rozměrům lze dosáhnout kýženého kontaktu s tímto prostředím bez poškození i u těch nejmenších buněk. [11,12].

Uvnitř mikroelektrody naplněné fyziologickým roztokem se nachází stříbrný drátek, který zprostředkovává kontakt s elektrolytem. Na povrchu tohoto drátku se nachází vrstva chloridu stříbrného, která zabraňuje polarizaci mikroelektrody, jejíž odpor dosahuje hodnot kolem 10 M Ω . Na mikromanipulátoru je umístěn předzesilovač se vstupním odporem o velikosti 1 G Ω [11].

6.3 Využití techniky patch-clamp při studiu změn membránového napětí pomocí napětově citlivých sond

Zobrazování změn membránového potenciálu metodou *patch-clamp* s použitím napětově citlivých sond patří k hojně využívané technice, jak pro studium jednoho nebo více iontových kanálů a změn membránového napětí monitorováním fluorescenčních poklesů exprimovaných sond v buněčných kulturách, tak pro vývoj a zlepšování jejich vlastností. Vývoj geneticky kódovaných fluorescenčních napětových sond, které by mohly být zaměřeny na konkrétní typ neuronů je z hlediska vědeckého výzkumu velice důležitý [47].

Plasmidem ASAP1 exprimovaném v buněčné kultuře buněk HEK293A byla vyšetřována indikace změn membránového potenciálu metodou *patch-clamp*. Měření se provádělo pomocí borosilikátových mikroelektrod s odporem o hodnotě 2,5 – 5 M Ω . Při měření se původní udržované napětí na membráně o hodnotě -70 mV měnilo v rozsahu -120 mV a následně opět z výchozí hodnoty *holding potential* -70 mV bylo testováno napětí jdoucí k hodnotám +50 mV. Tímto se docílilo postupné depolarizace buněčné membrány a plasmidem ASAP1 byly tyto změny indikovány. Odezva na -100 mV napětový depolarizační impuls z výchozího *holding potential* o hodnotě -70 mV představuje pokles fluorescence o -17,5%, což je mnohonásobně větší odezva než u níže jmenované fluorescenční sondy ElectricPk. Sonda ASAP1 byla rovněž použita pro *patch-clamp* měření a zaznamenávání elektrické aktivity disociovaných neuronů. Odpor borosilikátových elektrod dosahoval hodnot 3 – 5 M Ω . Znamky fluorescence byly získány metodou vnuceného napětí a proudu v režimu *whole-cell* [6].

Fluorescenční sonda ASAP1 je v oblasti monitorování akčních potenciálů silným konkurentem jak v rychlosti odezvy na změnu membránového napětí, tak v poměru poklesu fluorescence a přesnosti fluorescenční změny na danou změnu membránového potenciálu fluorescenční sondě ArcLight, která obsahuje napětově citlivé oblasti fosfatáz sumky *Ciona intestinalis* a super ekliptický zelený fluorescenční protein citlivý na změny pH pHlurion nesoucí mutaci A227D. Pár fluorescenčních proteinů založených na bázi FRET (mUKG a mKOk), které obsahuje sonda Mermaid, byl nahrazen proteinem pHlurion. Je schopná zaznamenat jednotlivé akční potenciály a podprahové elektrické události v kultivovaných savčích neuronech. Studium změn membránového napětí bylo provedeno exprimací v buněčných kulturách buněk HEK293. Metodou *voltage-clamp* při režimu *whole-cell* bylo buňkám dodáno stále *holding potential* o hodnotě -70 mV. Spontánní aktivita kultivovaných hipokampálních neuronů byla měřena při vnuceném proudu. Akční potenciály byly evokovány 2 ms trvajícím proudovými pulzy. Depolarizační krok dosahoval hodnoty +100 mV. Fluorescenční odezva na tento krok byla vyhodnocena jako pětikrát větší než u již zmíněné sondy Mermaid a taktéž u sond VSFP zmíněných níže. Pokles intenzity fluorescence byl u této sondy stanoven na 35% při odezvě na +100 mV depolarizační krok [6,93].

Zkonstruování fluorescenční sondy obsahující napětově citlivou oblast fosfatázy (S1-S4) sumky *Ciona intestinalis*, do níž byl vložen cirkulárně permutovaný zelený EGFP, vedlo k vytvoření sondy ElectricPk. Metodou *patch-clamp* vnuceného proudu byly vyšetřovány změny fluorescence buněčné kultury HEK293 na základě změn membránového potenciálu. Citlivost na změny napětí byla testována v rozmezí hodnot +100 mV měřených z výchozího *holding potential* -70 mV. Fluorescenční sonda ElectricPk vykazuje téměř lineární průběh změny fluorescence vzhledem ke změně napětí hyperpolarizačních i depolarizačních kroků (-100 mV – +200 mV). Vysoké hodnoty depolarizačního napětí (+310 mV) u této sondy způsobují saturaci [47].

Amy Lam, François St-Pierre, Yiyang Gong a kolegové se pokoušeli o vývoj fluorescenční sondy VSFP-CR (Voltage Sensitive Fluorescent Protein) záměnou původního komplexu fluorescenčních proteinů Clover-mRuby2 (obsahem sondy VSFP2.3) za proteiny Cerulean-Citrin, aby získali lepší vlastnosti. Plasmidy VSFP2.3 a VSFP-CR lokalizované na membráně hipokampálních neuronů poté testovali *patch-clamp* metodou v režimu vnuceného napětí a proudu *whole-cell* technikou. Poměr reakce poklesu fluorescence na napětové změny od -100 mV do 20 mV bylo dosaženo nejprudší odezvy při hodnotě napětí -40 mV. Postupnou depolarizací membrány z výchozího napětí o hodnotě -70 mV do hodnoty +60 mV získali výraznější odezvu u plasmidu VSFP-CR. Sondy lze také využít k detekci akčních potenciálů za použití metody FRET po transfekci do buněčné linie HEK293. Modifikace VSFP-Butterfly

slouží k indikování elektrické aktivity jednotlivých neuronů a celého mozku *in vivo*. Spojením *patch-clamp* a FRET bylo provedeno měření vpravením exprimované sondy na mozkové tkáni myši do dělohy [94,95].

K monitorování elektrické aktivity savčích neuronů metodou *patch-clamp* v režimu *whole-cell* byl také využit mikrobiální rhodopsin Archaeorhodopsin 3 (Arch). Arch byl exprimován v buněčné kultuře buněk HEK293, do jejichž růstového média byl uměle přidán roztok retinalu (aldehyd vitamínu A). K měření fluorescence jako funkce membránového potenciálu byly buňkám vnuceny trojúhelníkové impulzy s amplitudou v rozsahu od -150 mV do +150 mV. Při další variantě testování fluorescenčních odpovědí na změnu membránového napětí bylo od trojúhelníkových impulzů upuštěno a naopak byla zvolena série napěťových impulzů vycházející z hodnot membránového potenciálu -70 mV až do hodnot +30 mV s dobou trvání 300ms a periodou 1 ms. Další pokusy s archaeorhodopsinem probíhaly na krysích vzorcích, exprese na kultivovaných krysích neuronech způsobila desetinásobné zvýšení citlivosti a rychlosti. Měření fluorescence proteinu Arch ve vzorku oddělených membrán bakterie *Escherichia coli*, obsahujících komplex proteinů Arch-EGFP (*enhanced GFP*), vedlo se současným zvýšením intenzity iluminace proteinu ke zvýšení intenzity fluorescence [38,39].

Dále je možné využít *patch-clamp* fluorometrii, kterou lze měřit iontové proudy a zároveň detekovat konformační změny technikou *inside-out*. Tento způsob měření vychází z metody *voltage-clamp* fluorometrie (VCF). *Patch-clamp* fluorometrie oproti VCF nabízí hned tři výhody. Je schopná přímého a rychlého přístupu k iontovým kanálům ve vnitřním prostředí buňky s možností fluorescenčního značení intracelulárních nukleových kyselin. Díky tomuto přístupu je možné aplikovat intracelulární ligandy a modifikátory ovlivňující otevírání a uzavírání iontových kanálů. Poskytuje lepší poměr signálu a šumu fluorescenčních signálů, protože díky ní lze snížit autofluorescenci vnitřního prostředí buňky. Poslední výhodou této metody je vysoké časové rozlišení měřených iontových proudů [96].

7 STUDIUM VLASTNOSTÍ NAPĚŤOVÉHO SENZORU ASAP1

V praktické části této práce byly použity buněčné linie HEK293T transfekované plasmidem ASAP1 pomocí přechodné chemické transfekce kationovým polymerem polyethyleniminem (PEI). Tato fluorescenční sonda byla vybrána jako předmět zkoumání diplomové práce pro své již uvedené vlastnosti, kterými předčí doposud největšího zástupce ve velikosti fluorescenčních odpovědí na změny membránového napětí u sond založených na napětově citlivých oblastech.

Cílem bylo s využitím techniky *patch-clamp* ověřit, zda při změnách napětí z výchozího *holding potential* buněčné membrány pohybujícího se na hodnotě -80 mV dojde k poklesu intenzity fluorescence plasmidu ASAP1. Depolarizační kroky z výchozího *holding potential* byly zvoleny v rozmezí od -120 mV do +40 mV. Fyziologická hodnota tohoto výchozího potenciálu se u buněk HEK293 nachází na hodnotě membránového napětí -40 mV, s níž byly následně získané výsledky srovnávány a normalizovány. Normalizace byla zvolena také u *holding potential* -80 mV.

7.1 Použité materiály a přístroje

V následující podkapitole jsou uvedeny všechny chemikálie, přístroje a pomůcky a materiál použitý v této diplomové práci.

Tabulka 7-1: Použité chemikálie pro výrobu pipetových a koupelových roztoků.

Chemikálie	
KCl	EGTA
MgCl ₂	NaOH
CaCl ₂	KOH
HEPES	NaCl
D-Glucose	Na ₂ ATP

Tabulka 7-2: Použité přístroje a pomůcky při manipulaci s buňkami HEK293, výrobě mikroelektrod a pipetových a koupelových roztoků.

Přístroj	
stolní třepačka (vortex)	pH metr
serologická pipeta	sušička
serologická pipeta	tahač mikroelektrod
serologická pipeta	přístroj pro měření osmolarity
serologická pipeta	CO ₂ inkubátor
injekční stříkačka	-

Tabulka 7-3: Použité přístroje a pomůcky při *patch-clamp*.

Přístroj	Výrobce
světelný mikroskop	OLYMPUS
mikromanipulátor	Axon Instruments
ovladač mikromanipulátoru	Sutter Instruments
zesilovač	Axon Instruments
tahač mikroelektrod	DMZ Universal Puller
program Clampex	KTR Kupplungstechnik GmbH
fotoaparát	Nikon
laserový zdroj	Lumen Dynamics
fluorescenční kostka	-
měřicí miska	-

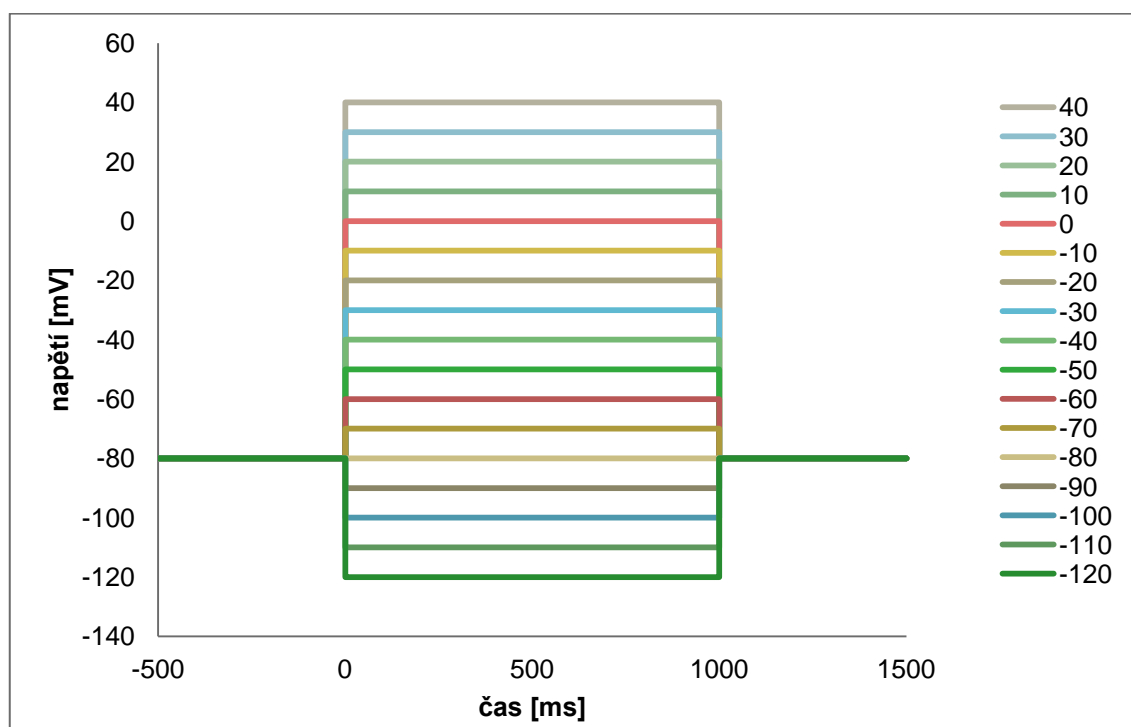
7.2 Experiment

Buněčná linie HEK293 byla transfekována přechodnou chemickou transfekcí pomocí kationového polymeru polyethyleniminu (PEI), během níž byl do buněk vpraven plasmid ASAP1. Přechodná transfekce byla použita během pasážování buněčné linie, jelikož potřebují určitý růstový čas k tomu, aby mohly být k experimentu využity. Ideální je situace, kdy byly buňky pasážovány alespoň třikrát od prvního nasazení do misek s kultivačním médiem. Kontrola úspěšnosti transfekce byla ověřena pod světelným mikroskopem, k němuž byl připojen zdroj fluorescenčního záření

s fluorescenční kostkou. Úspěšně transfekované buňky ve tmavém poli zeleně září a přepínáním mezi světlým a tmavým polem pomocí filtrů lze přesně vyhledat buňky, které se transfekovat podařilo a u kterých byla transfekce neúspěšná. Takto připravené buňky rostou na podkladových sklíčkách umístěných v kultivačních miskách naplněných růstovým médiem.

Před vlastním měřením technikou *patch-clamp* je potřeba si připravit skleněné mikroelektrody. Pomocí tahače mikroelektrod se z jedné borosilikátové trubičky byly získány dvě identické mikroelektrody. Zvoleným typem programu na mikroelektrodovém tahači P50 se trubičky nejdříve zahřívají platinovým drátkem za působení protisměrné síly tažného zařízení tahače. Po roztržení trubičky byla každá špička mikroelektrody poté ještě zaleštěna žářem tavícího drátku. Natahané mikroelektrody byly ukládány do pěnového držátka, aby nedošlo k mechanickému poškození jejich hrotů.

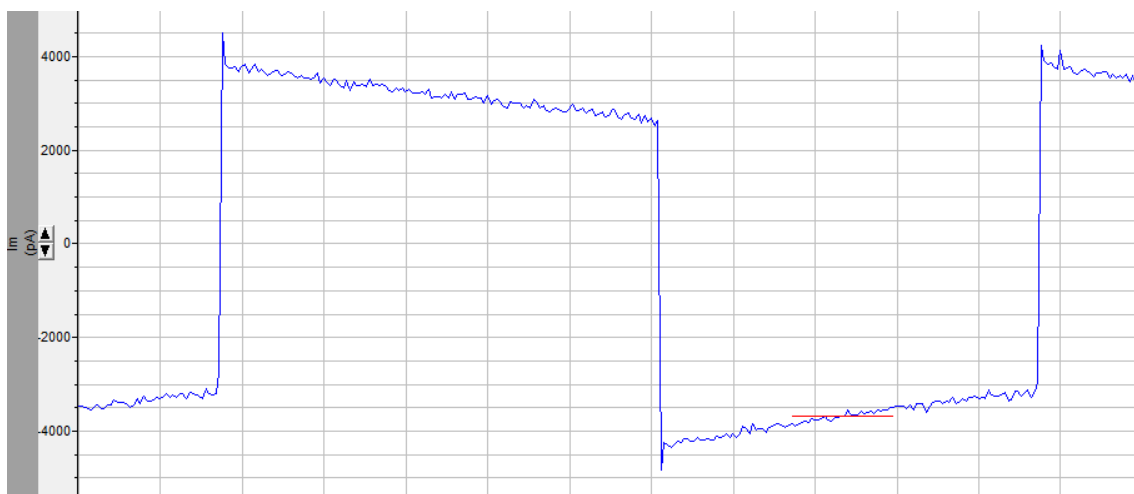
Před zahájením samotného experimentu bylo potřeba stanovit, jaký stimulační protokol pro vyšetřované buňky bude použit. Jeho grafické vyjádření je vidění na **obrázku 7.1**



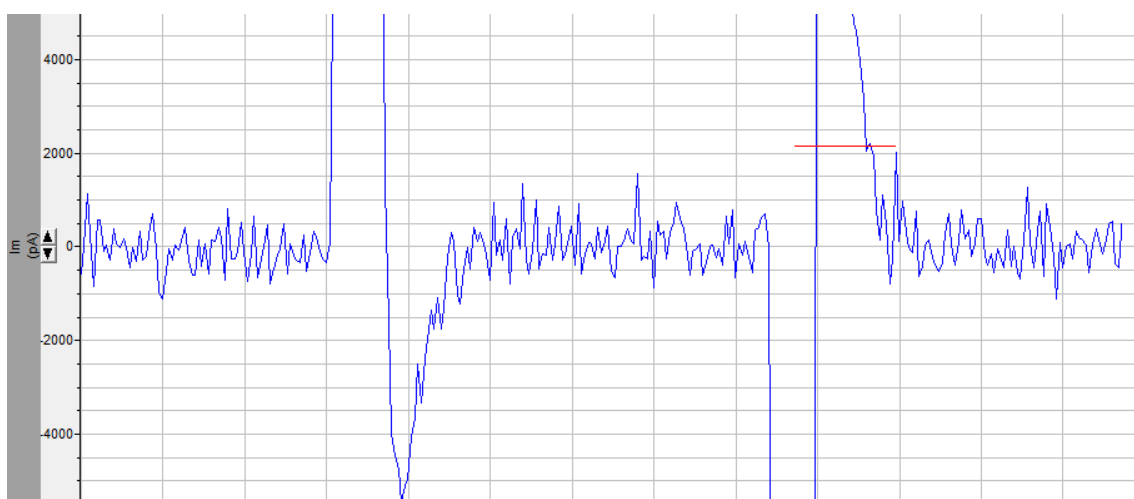
Obrázek 7.1: Stimulační protokol vyšetřovaných buněk.

Pro samotný experiment bylo z kultivační nádoby umístěné v inkubátoru pokaždé vyjmuto jedno podkladové sklíčko s přirostlými buňkami a to bylo posléze vloženo do měřicí misky. Měřicí miska byla vždy pro každé další sklíčko pomocí serologické

pipety naplněna novým koupelovým roztokem o teplotě 37 °C (**Tabulka 7-4** a **Tabulka 7-6**) o objemu 600 µl. Miska s růstovým sklíčkem buněk byla poté vložena pod objektiv světelného mikroskopu a drátkem připojena k mikromanipulátoru s měrnou mikroelektrodou, kterým je možné měřit membránový potenciál vyšetřované buňky. Do skleněné mikroelektrody bylo s využitím injekční stříkačky pro jednotlivá měření nutno vpravit pipetový roztok o teplotě 37 °C (**Tabulka 7-5** a **Tabulka 7-7**), který je svým složením blízký roztoku fyziologickému a připomíná tak složení intracelulárního roztoku uvnitř buněk. V roztoku uvnitř mikroelektrody se nesmí nacházet bubliny, způsobily by chyby měření, nebo by měření nemohlo proběhnout vůbec. Vzniklé bublinky lze odstranit pinzetou a jemným pohybem doprava-doleva u špičky mikroelektrody nebo jemným oťukáváním špičky pomocí nehtu. Dalším způsobem, kterým je možno se bublinek zbavit, je přetlak vyvinutý injekční stříkačkou napojenou na mikroelektrodu, bublinka se vyfoukne i s nepatrným množstvím pipetového roztoku, čímž se zároveň očistí od případných zbytků nečistot při výrobě hrotu. Aby se nežádoucím bublinkám v pipetovém roztoku uvnitř mikroelektrody předešlo, je potřeba tento roztok vpravovat pomalým stlačováním pístu injekční stříkačky, přičemž vlákno napojené místo jehly by mělo být umístěno téměř v samotné špičce mikroelektrody. Mikroelektroda s pipetovým roztokem byla následně nasunuta na stříbrný drátek mikromanipulátoru. Před samotným použitím mikromanipulátoru je vhodnější nejprve nalézt zeleně zářící morfologicky vhodnou buňku určenou k experimentu, která není součástí shluku okolních buněk. Tento shluk ovlivňuje *gigaseal* a v mnoha případech se buňka špičky mikroelektrody pustí. Zvolením filtru pro fluorescenční kostku, která světelnou energii v modré oblasti (395-470 nm) viditelného světla excituje všechny úspěšně transfekované buňky v koupelovém roztoku, je možné takovouto buňku nalézt. Vybranou buňku poté lze vycentrovat do středu zorného pole pomocí posuvného stolku mikroskopu, na němž je umístěna měřící miska s buňkami. Posuvným zařízením, které určuje pohyb mikromanipulátoru v ose x, y a z, byla mikroelektroda ponořena do koupelového roztoku s buňkami v měřící misce. Průběh signálu bylo možné sledovat na monitoru počítače, na němž byl spuštěn program Clampex určený k provedení změn hodnot membránového napětí. Po ponoření neporušené mikroelektrody do koupelového roztoku se v měřícím okně programu Clampex v režimu *Bath* objeví obdélníkový tvar signálu (**Obrázek 7.2**). Jestliže došlo k porušení hrotu mikroelektrody ať už jeho ulomením, nebo prasknutím při vpravování pipetového roztoku, průběh signálu nebude mít tvar obdélníků, ale trojúhelníkovitý tvar s výraznými hroty podél celého signálu (**Obrázek 7.3**), a mikroelektrodu je potřeba vyměnit za novou.



Obrázek 7.2: Signál pocházející s neporušené mikroelektrody.



Obrázek 7.3: Signál pocházející z prasklé mikroelektrody.

Mikromanipulátor s neporušenou mikroelektrodou byl poté posuvným zařízením nasměrován na vybranou buňku, přičemž bylo potřeba ověřit její správnost přepínáním mezi světlým a tmavým polem, protože mikroelektroda je na tmavém poli hůře viditelná a nedošlo tak k nechtěnému porušení buňky. Zároveň bylo třeba se ujistit, aby špička mikroelektrody směřovala do středu dané buňky. Posuvným zařízením mikromanipulátoru lze nastavit rychlost přibližování mikroelektrody k buňce. Jakmile byl hrot mikroelektrody dostatečně přiblížen k buněčné membráně, v měřicím okně programu Clampex došlo ke snížení amplitudy signálu obdélníkového tvaru. Dalším pomalým přibližováním se amplituda signálu nadále snižuje. V tomto okamžiku je potřeba opatrnosti, aby nedošlo k přílišnému přiblížení mikroelektrody k buněčné membráně, což by vedlo k jejímu protržení a ke smrti buňky. Zároveň by došlo k porušení hrotu mikroelektrody, takže by se pro další měření stala nepoužitelnou.

Dostatečné přiblížení mikroelektrody je proto třeba správně odhadnout. Jakmile bylo tohoto dostatečného přiblížení dosaženo, injekční stříkačkou byl vyvinut jemný podtlak, kterým došlo k nasátí buněčné membrány do špičky mikroelektrody. Vzniklý *seal* bylo také možné odhalit podle průběhu signálu v měřícím okně programu Clampex. Probíhající signál získávaný platinovým drátkem uvnitř mikroelektrody se vyrovnal na nulovou hodnotu.

Během experimentu bylo měření ovlivňováno také stářím buněk a stavem kultivačního média. Jestliže byly buňky příliš mladé (1-2 dny), nebylo lehké jejich nasátí a následné otevření. Většinou po přilnutí ke špičce elektrody docházelo k jejich puštění nebo prasknutí. Stejný případ nastával u buněk starších, jejichž živiny v kultivačním médiu začínaly být již vyčerpány. Buňky se nafukovaly a většinou se vytvoření kontaktu jejich buněčné membrány se špičkou mikroelektrody (*gigaseal*) nepodařilo vůbec. Následné otevření buňky tedy nebylo možné.

Po úspěšném vytvoření kontaktu špičky mikroelektrody a buněčné membrány bylo cílem vytvoření přímého kontaktu hrotu mikroelektrody s vnitřním prostředím buňky jejím protržením. Jak již bylo popsáno v režimech využívaných při měření technikou *patch-clamp*, měření na celé buňce v režimu *whole-cell* lze dosáhnout krátkým silným pulzem podtlaku vyvolaného sáním skrze injekční stříkačku připojenou k mikroelektrodě. Tímto silným pulzem bylo docíleno kontaktu s vnitřním prostředím buňky protržením buněčné membrány, jejíž volné konce ihned přilínají ke stěnám uvnitř mikroelektrody. Protržení buněčné membrány bylo možné pozorovat v měřícím okně programu Clampex, v němž se průběh signálu změnil na zaoblené inverzní špičky. Následně byl režim *Bath* v programu Clampex změněn na další režim a hodnota *holding potential* byla nastavena na výchozí hodnotu napětí -80 mV. V tomto režimu byly poté zadávány hodnoty depolarizačního napětí s kroky od -80 mV v rozmezí -120 mV až +40 mV a fluorescenční kamerou zároveň snímány reakce buňky na změny napětí v podobně změny v intenzitě vydávané fluorescence sondou ASAP1.

V popsaném experimentu, během nějž byly nejprve použity koupelový roztok K_{ir} a pipetový roztok číslo 5, jejichž složení lze vidět v **tabulce 7-4** a **tabulce 7-5**, nebylo snadné dosáhnout vytvoření *seal* mezi špičkou mikroelektrody a membránou buňky. Nemožnost vytvoření kontaktu působícím podtlakem byla nejspíše zapříčiněna právě chemickým složením použitých roztoků. Z tohoto důvodu byly namíchané roztoky nové o jiném složení, pojmenovány jako koupelový roztok ASAP (**Tabulka 7-6**) a pipetový roztok číslo 6 (**Tabulka 7-7**).

Chemické složení koupelových a mikropipetových roztoků, do nichž byla vkládána sklíčka s narostlými buňkami a které byly vpravovány do mikroelektrody, a

které byly použity v praktické části této práce, jsou (včetně daného složení) uvedeny v tabulkách níže.

Tabulka 7-4: Chemické složení koupelového roztoku K_{ir}.

Objem roztoku [ml]	Osmolarita [mosm]	pH
50	307	7,42
Sloučenina	M_m [g/mol]	Koncentrace [mmol]
<i>KCl</i>	74,55	140
<i>MgCl₂</i>	203,3	1,2
<i>CaCl₂</i>	110,98	2,6
<i>HEPES</i>	238,3	5
<i>D-Glucose</i>	180,16	10

Tabulka 7-5: Chemické složení pipetového roztoku číslo 5.

Objem roztoku [ml]	Osmolarita [mosm]	pH
25	303	7,52
Sloučenina	M_m [g/mol]	Koncentrace [mmol]
<i>KCl</i>	74,55	107
<i>MgCl₂</i>	203,3	1,2
<i>CaCl₂</i>	110,98	1
<i>HEPES</i>	238,3	5
<i>EGTA</i>	380,35	10
<i>D-Glucose</i>	180,16	-

Tabulka 7-6: Chemické složení koupelového roztoku ASAP.

Objem roztoku [ml]	Osmolarita [mosm]	pH
50	378	7,4
Sloučenina	M _m [g/mol]	Koncentrace [mmol]
<i>NaCl</i>	58,44	150
<i>KCl</i>	74,55	4
<i>MgCl₂</i>	203,3	1
<i>CaCl₂</i>	110,98	2
<i>HEPES</i>	238,3	5
<i>D-Glucose</i>	180,16	5

Tabulka 7-7: Chemické složení pipetového roztoku číslo 6.

Objem roztoku [ml]	Osmolarita [mosm]	pH
25	314	7,2
Sloučenina	M _m [g/mol]	Koncentrace [mmol]
<i>KCl</i>	74,55	120
<i>MgCl₂</i>	203,3	4
<i>NaCl</i>	58,44	4
<i>CaCl₂</i>	110,98	4
<i>HEPES</i>	238,3	5
<i>EGTA</i>	380,35	10
<i>Na₂ATP</i>	551,14	3

7.3 Dosažené výsledky a jejich diskuze

Poklesy intenzity fluorescence na depolarizační napěťové kroky aplikované na buněčnou membránu pomocí systému *patch-clamp* byly snímány za pomoci fluorescenční kamery, která byla nasazena na objektiv světelného mikroskopu. Získané snímky byly následně analyzovány v programu MATLAB, který umožňuje volbu

vyšetřované buňky pomocí příkazu `ginput` vybráním dvou bodů ve snímku určujících danou buňku tak, aby její oříznutí bylo co nejkonkrétnější. Pokud je daná buňka dostatečně ořezaná, je možné tuto volbu vynechat a pracovat s již ořezanými snímky. K analýze indikace změny intenzity fluorescence byly vybrány dva přístupy. Snímky konkrétní vybrané buňky symbolizující jednotlivé depolarizační kroky byly u všech metod nejprve převedeny do šedotónové stupnice. Dále již bylo pracováno s převedenými obrazy, a proto je i zde volba převodu, nebo práce s již upravenými snímky.

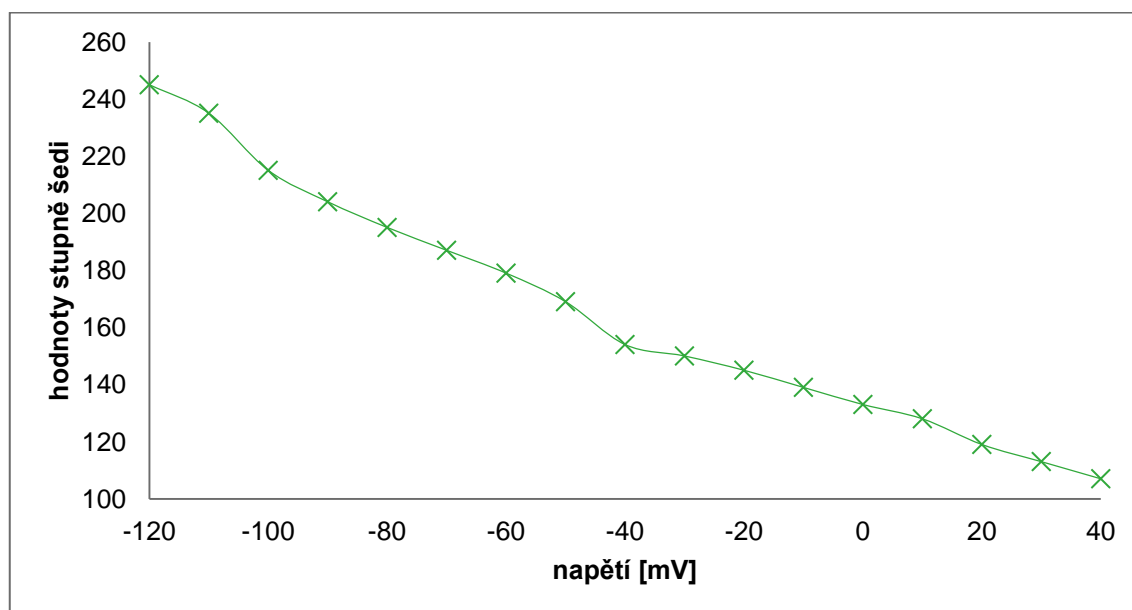
U metody histogramů byly získané výsledky následně zobrazeny. Histogram vyjadřuje distribuci obrazových bodů ve snímku znázorněním počtu pixelů (zde osa y) v konkrétní úrovni intenzity barvy šedotónové stupnice (zastoupena osou x). Lze z něj tedy zjistit, jestli při změnách membránového potenciálu došlo k navýšení nebo naopak ke snížení počtu pixelů dané úrovně šedi. Ze získaných dat touto metodou, která lze vidět uvedená v tabulce a s ní i v souvisejícím grafickém vyjádření, vyplývá, že změny membránového potenciálu vycházející z *holding potential* -80 mV směrem ke kladným hodnotám napětí +40 mV fluorescenční sonda ASAP indikuje poklesem intenzity fluorescence během depolarizace membrány, jelikož se na histogramech vyskytuje více tmavých pixelů, než je tomu u výchozího *holding potential*. Při změnách hyperpolarizace membrány (u napětí jdoucích k záporným hodnotám napětí -120 mV) se naopak ukazuje, že dochází k navýšení počtu světlých pixelů v obraze, z čehož lze vyvodit, že intenzita fluorescence narůstá. Výsledky získané touto metodou potvrzují hypotézu, že fluorescenční sonda ASAP1 na depolarizaci membrány reaguje poklesem intenzity fluorescence. Ke každému histogramu byla navíc vynesena maximální hodnota jasu (stupně šedi), která se v konkrétním snímku nacházela.

V každém histogramu byla navíc pro konkrétní napětí dle navrženého stimulačního protokolu (**Obrázek 7.1**) vynesena maximální úroveň jasu (stupně šedi). Dle výsledků je patrné, že depolarizace membrány, během níž se postupuje od výchozího *holding potential* -80 mV směrem ke kladnějším hodnotám napětí až do +40 mV, způsobuje pokles intenzity fluorescence. Hyperpolarizace membrány způsobuje nárůst intenzity fluorescence. V následující tabulce (**Tabulka 7-8**) jsou uvedeny hodnoty maximální úrovně jasu (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu pro danou vyšetřovanou buňku. Hodnoty se nacházejí v intervalu [0 255], reprezentující šedotónovou škálu. Hodnota 0 reprezentuje černou barvu, hodnota 255 barvu bílou. Získané grafické závislosti s tabulkami hodnot zbylých buněk jsou pro přehlednost uvedeny v příloze této diplomové práce.

Tabulka 7-8: Hodnoty maximální úrovně stupně šedi pro dané hodnoty stimulačního napětí.

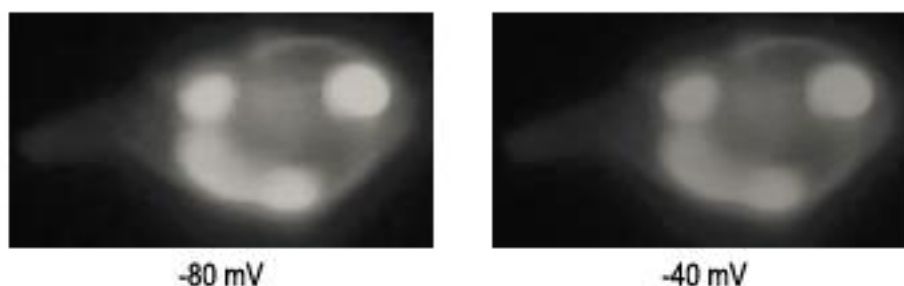
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	245	-30	150
-110	235	-20	145
-100	215	-10	139
-90	204	0	133
-80	195	10	128
-70	187	20	119
-60	179	30	113
-50	169	40	107
-40	154		

Grafické znázornění maximálních úrovní jasu pro konkrétní hodnotu stimulačního napětí.



Obrázek 7.4: Maximální hodnoty úrovně stupně šedi [0 255] v jednotlivých snímcích.

Pro ukázkou (**Obrázek 7.5**) byla vybrána napětí symbolizující výchozí *holding potential* zvolený na hodnotu -80 mV a fyziologickou hodnotu napětí u buněčné linie HEK293 -40 mV. Snímky zbylých buněk jsou opět pro přehlednost uvedeny v příloze diplomové práce.

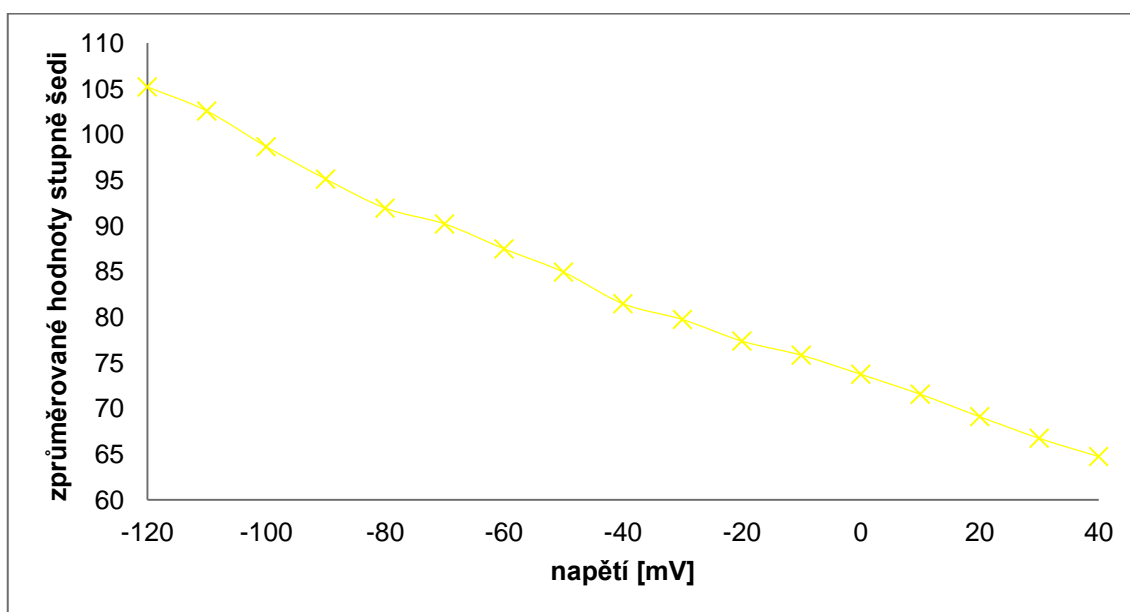


Obrázek 7.5: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV.

Ze všech hodnot maximálních stupňů šedi získaných metodou histogramů u všech vyšetřovaných buněk byly následně získány hodnoty zprůměrované, které byly normalizovány vůči zvoleným napětím, -80 mV *holding potential* a fyziologické hodnotě membránového napětí buněčné linie HEK293 -40 mV. Tabulka se zprůměrovanými hodnotami maximálních úrovní jasů (**Tabulka 7-9**) a její grafické znázornění (**Obrázek 7.6**) je k vidění níže. Dále je v textu uvedena tabulka se standardizovanými hodnotami (**Tabulka 7-10**) včetně grafu vyjadřujícího standardizaci zvoleného napětí pro každou buňku (**Obrázek 7.7**). Podle výsledků, které z hodnot vyplývají lze říci, že tímto krokem byla hypotéza určená pro všechny buňky transfekované fluorescenční sondou ASAP1 potvrzena. Na základě depolarizace buněčné membrány dochází k poklesu intenzity fluorescence a zároveň při její hyperpolarizaci dochází k nárůstu intenzity záření fluorescenční sondy ASAP1.

Tabulka 7-9: Zprůměrované hodnoty maximálních stupňů šedi pro všechny buňky u konkrétního napětí.

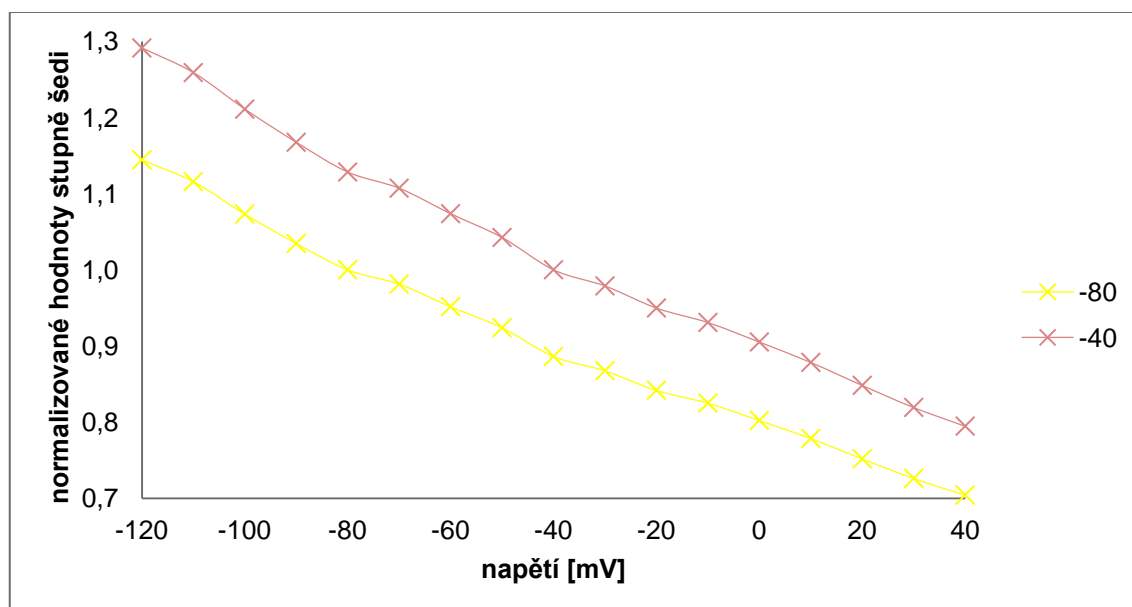
stimulační napětí [mV]	průměrná hodnota stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	průměrná hodnota stupně šedi [0-255]
-120	105	-30	80
-110	103	-20	77
-100	99	-10	76
-90	95	0	74
-80	92	10	72
-70	90	20	69
-60	87	30	67
-50	85	40	65
-40	81		



Obrázek 7.6: Grafické vyjádření zprůměrovaných hodnot maximálních hodnot stupňů šedi pro všechny buňky a konkrétní napětí.

Tabulka 7-10: Standardizované hodnoty stupňů šedi konkrétních napětí pro všechny vyšetřované buňky vztažená k hodnotám *holding potential* -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.

stimulační napětí [mV]	stimulační napětí [mV]		
	-80	-40	
-120	1,144	1,291	standardizované hodnoty stupňů šedi
-110	1,116	1,259	
-100	1,073	1,211	
-90	1,035	1,167	
-80	1,000	1,128	
-70	0,981	1,107	
-60	0,952	1,074	
-50	0,924	1,042	
-40	0,886	1,000	
-30	0,867	0,979	
-20	0,842	0,950	
-10	0,825	0,931	
0	0,802	0,905	
10	0,778	0,878	
20	0,752	0,848	
30	0,726	0,819	
40	0,704	0,795	

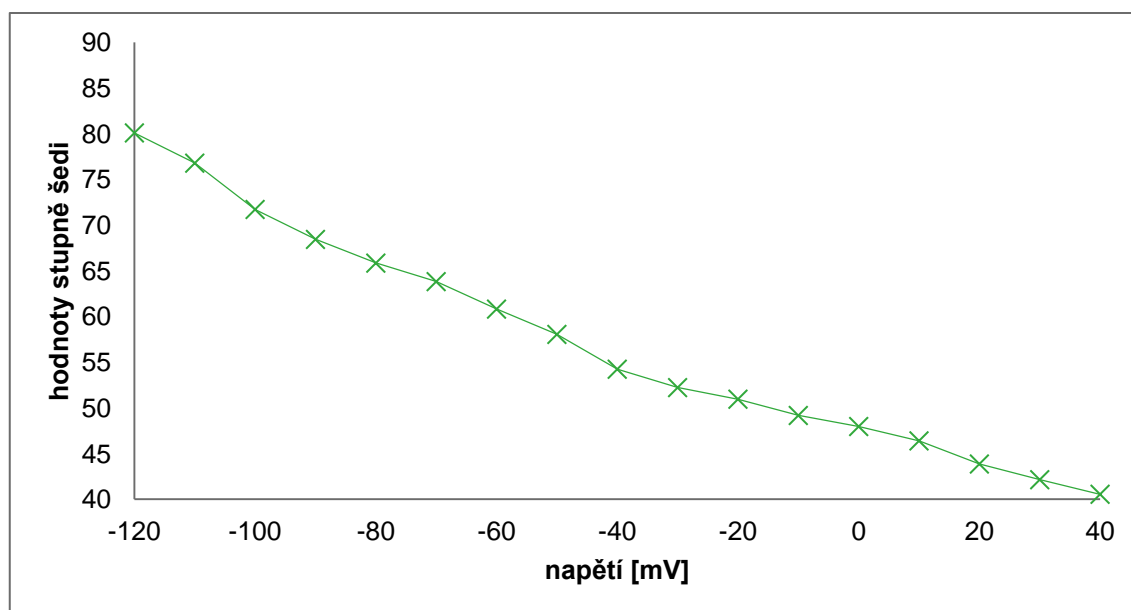


Obrázek 7.7: Grafické vyjádření standardizovaných hodnot stupňů šedi vůči dvěma zvoleným napětím *holding potential* -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.

Druhá realizovaná metoda srovnávání výsledků, metoda průměrů, počítá průměrnou úroveň jasu (stupňů šedi) v obraze u jednotlivých snímků (kroků napětí) vybrané buňky. Po vyhodnocení intenzity jasu v obraze je zobrazen graf (**Obrázek 7.8**) a hodnoty jednotlivých hodnot průměrů (**Tabulka 7-11**) konkrétní vyšetřované buňky pro jednotlivá napětí stimulačního protokolu, ze kterého je patrné, že depolarizační kroky z výchozího *holding potential* -80 mV směřující ke kladnějším hodnotám změny napětí +40 mV mají nižší úroveň jasu v jednotlivých snímcích než snímky se zápornými změnami membránového napětí (hyperpolarizačními kroky) postupujícími do -120 mV. Fluorescenční sonda ASAP1 dle výsledků získaných metodou průměrů indikovala depolarizaci membrány poklesem intenzity fluorescence a stejně jako v prvním případě užití metody histogramů potvrdila ověřovanou hypotézu.

Tabulka 7-11: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	80,083	76,773	71,707	68,426	65,831	63,805	60,799	58,030	54,219
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	52,208	50,936	49,156	47,946	46,376	43,845	42,126	40,529	



Obrázek 7.8: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí.

V následující tabulce je uvedena konfigurace počítače, na němž byly všechny získané výsledky zpracovávány.

Tabulka 7-12: Konfigurace používaného počítače.

procesor	Intel® Core™ i7-4500 CPU @ 1,80 GHz
paměť RAM	8,00 GB

ZÁVĚR

V první kapitole této práce je popsána plasmidová DNA a její význam ve výzkumu v molekulární biologii.

Ve druhé kapitole jsou poté probrány membránové napěťové sondy založené na bázi napěťově citlivých oblastí a na bázi vápníku včetně některých uvedených typů, které se používají a studují a také jsou zde uvedeny fluorescenční proteiny využívané při konstrukcích fluorescenčních sond. Je zde podrobně popsána použitá napěťová sonda ASAP1.

Třetí kapitola se věnuje chemickým napěťově citlivým membránovým barvivům, z nichž jsou jmenováni dva zástupci. Barviva ANEP a RH.

Čtvrtá kapitola se zabývá buněčnými kulturami, jejich využití jako modelového organismu. Podrobněji probranou buněčnou linií je buněčná linie HEK293 odvozená z lidských embryonálních ledvinných epiteliálních buněk a následně transformována virovou DNA adenoviru 5.

Další kapitola popisuje transfekci plasmidů a metody, které se při ní používají. Výsledkem transfekce jsou geneticky modifikované buňky, v nichž vpravená nukleová kyselina může přežívat jako stabilní nebo přechodná.

Šestá kapitola se věnuje metodě *patch-clamp*, kterou lze měřit membránové napětí buněk. Dále jsou popsány techniky využívané během *patch-clamp*, k nimž se řadí přístupy *cell-attached*, zde patří *whole-cell* a *perforated-cell*, a *cell-free* přístupy, k nimž patří *inside-out* a *outside-out*. Dále jsou v kapitole probrána využití metody *patch-clamp* s napěťově citlivými sondami při měření změn membránového potenciálu a při vývoji a zlepšování vlastností samotných sond.

V poslední kapitole je popsána metoda navržená pro práci s fluorescenční sondou ASAP1 pomocí systému *patch-clamp* a snímání experimentu. V diplomové práci byly provedeny experimenty s buňkami transfekovanými membránovým senzorem ASAP1 chemickou metodou PEI. Měření proběhlo na celkem 11 buňkách, na nichž se podařilo prokázat tvrzenou hypotézu, že depolarizací membrány dochází k poklesu intenzity fluorescence. Součástí kapitoly jsou také výsledky potvrzující hypotézu, jichž bylo *patch-clamp* metodou dosaženo. Jedná se o výstupy získané analýzou pořízených snímků sondy ASAP1 programem MATLAB, jejichž hodnoty jsou uvedeny v daných tabulkách a současně s nimi se zde vyskytují grafické výstupy. Zároveň je v kapitole zhodnocen vliv počtu pasáží na schopnost buněk dosáhnout *gigaseal* a otevření.

LITERATURA

- [1] GLOSSARY. *Scitable by Nature Education* [online]. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/definition/plasmid-plasmids-28> [cit. 2015-11-23].
- [2] VONDREJS, Vladimír, STORCHOVÁ, Zuzana. *Genové inženýrství I*. Praha: Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, 1997. 60 s. ISBN 382-110-97.
- [3] ADDGENE. *What is a Plasmid?* [online]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/plasmid-background/> [cit. 2015-11-23].
- [4] SAMBROOK, Joseph, RUSSEL, David W. *Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0-87969-577-3.
- [5] ÚSTAV BIOLOGIE LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY PALACKÉHO V OLOMOUCI. *Klonování DNA* [online]. Dostupné z: [http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani DNA.htm](http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm) [cit. 2015-11-23].
- [6] 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>
- [7] GRAHAM, FL et al. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal general virology*. 1977, roč. 36, č. 2977, s. 59–74.
- [8] *HEK293 Cell Line* [online]. Dostupné z: <http://www.hek293.com/> [cit. 2015-12-20].
- [9] THOMAS, Philip, SMART, Trevor G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol*. 2005, roč. 51, s. 187–200. doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014
- [10] SHAW, Gerry et al. 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*. 2002, roč. 16, č. 8, s. 869–871. doi: 10.1096/fj.01-0995fje
- [11] ŠIMURDA, Jiří. *Bioelektrické jevy*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno, 2007. 72 s.
- [12] 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: http://utdallas.edu/~tres/microelectrode/microelectrodes_ch04.pdf
- [13] MOLNAR, Peter, HICKMAN, James J. Patch-Clamp Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2007, roč. 403, s. 320.
- [14] VEITINGER, Sophie. *The Patch-Clamp Technique* [online]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/> [cit.

- 2015-12-27].
- [15] NAVRÁTIL, Milan et al. *Základní praktická cvičení z molekulární biologie* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2004. Dostupné z: <http://genetika.upol.cz/download.aspx?id=224&t=0>
- [16] HEGYI, György et al. *Introduction to Practical Biochemistry* [online]. Dostupné z: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/index.html> [cit. 2015-11-24].
- [17] 1. LF UNIVERZITY KARLOVY. *Fluorofory v biomedicině* [online]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm> [cit. 2015-12-2].
- [18] LABGUIDE. *Fluorochromy* [online]. Dostupné z: <http://labguide.cz/fluorochromy/> [cit. 2015-12-26].
- [19] JOHNSON, Ian D., DAVIDSON, Michael W. *Jablonski Energy Diagram* [online]. Dostupné z: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/jabintro/> [cit. 2016-05-12].
- [20] TÁBORSKÝ, Petr. *Luminiscence* [online]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/F9600/Taborsky_luminiscence.pdf [cit. 2016-04-16].
- [21] CHALFIE, M et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* [online]. 1994, roč. 263 , č. 5148 , s. 802–805. doi: 10.1126/science.8303295 Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/content/263/5148/802.abstract>
- [22] JOHN INNES CENTRE. *Green Fluorescent Protein (GFP)* [online]. Dostupné z: https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_9.htm [cit. 2016-04-16].
- [23] REMINGTON, S. James. Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science*. 2011, roč. 20, č. 9, s. 1509–1519. doi: 10.1002/pro.684
- [24] ČERNÝ, Jan. Zelený fluorescenční protein. *Vesmír* [online]. 2009, roč. 88, s. 228–231. [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/zeleny-fluorescencni-protein>
- [25] BERNEY, Claude Pascal. *Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy*. 2003. Diplomová práce Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- [26] CINELLI, R a et al. The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level. *Photochemistry and photobiology*. 2000, roč. 71, č. 6, s. 771–776. doi: 10.1562/0031-8655(2000)071<0771:TEGFPA>2.0.CO;2
- [27] PISTON, DW et al. *Introduction to Fluorescent Proteins* [online]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html> [cit. 2016-04-16].
- [28] RCSB PDB. *GREEN FLUORESCENT PROTEIN FROM AEQUOREA VICTORIA* [online]. Dostupné z:

- <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EMA> [cit. 2016-04-16].
- [29] 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
- [30] DOUGLAS, Adam. *New Techniques in Systems Neuroscience*. 15 vyd. Springer International Publishing AG, 2015. 301 s. ISBN 9783319129129.
- [31] FACILITY DUKE UNIVERSITY LIGHT MICROSCOPY CORE. *Spectra of common fluorophores* [online]. Dostupné z: <http://microscopy.duke.edu/spectra.html>
- [32] RCSB PDB. *CRYSTAL STRUCTURE OF DSRED, A RED FLUORESCENT PROTEIN FROM DISCOSOMA SP. RED* [online]. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1G7K> [cit. 2016-05-12].
- [33] LUKYANOV, KA et al. Discovery and properties of GFP-like proteins from nonbioluminescent anthozoa. *Methods Biochem Anal* [online]. 2006, roč. 47, s. 121–138. Dostupné z: <http://www.ibch.ru/lgr/fluor.htm>
- [34] RODRIGUES, Fernando et al. NOTES Red Fluorescent Protein (DsRed) as a Reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 2001, roč. 183, č. 12, s. 3791–3794. doi: 10.1128/JB.183.12.3791–3794.2001
- [35] MIKKELSEN, Lisbeth et al. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, roč. 223, s. 135–139. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00355-0
- [36] PISTON, David W. et al. *Introduction to Fluorescent Proteins* [online]. Dostupné z: <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html> [cit. 2016-05-12].
- [37] DIETRICH, Christof, MAISS, Edgar. Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *BioTechniques* [online]. 2002, roč. 32, č. 2, s. 286, 288–90, 292–3. [cit. 2016-05-12]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848404>
- [38] KRALJ, Joel M et al. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nature methods* [online]. 2012, roč. 9, č. 1, s. 90–5. doi: 10.1038/nmeth.1782 Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1782>
- [39] MACLAURIN, D. et al. Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, roč. 110, č. 15, s. 5939–5944. doi: 10.1073/pnas.1215595110 Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1215595110>
- [40] GONG, Yiyang. The evolving capabilities of rhodopsin-based genetically encoded voltage indicators. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2015, roč. 27, s. 84–89. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.05.006 Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.006>

- [41] THE STATE OF ION CHANNEL RESEARCH IN 2004. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2004, roč. 3, č. 2, s. 239–278. [cit. 2016-04-24]. doi: 10.1038/nrd1361 Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd1361>
- [42] KAESTNER, Lars et al. Genetically encoded voltage indicators in circulation research. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, roč. 16, č. 9, s. 21626–21642. doi: 10.3390/ijms160921626
- [43] BROUSSARD, Gerard J., LIANG, Ruqiang, TIAN, Lin. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. 2014, roč. 7, s. 97. [cit. 2016-04-24]. doi: 10.3389/fnmol.2014.00097 Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2014.00097/abstract>
- [44] CHEN, Tsai-Wen et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* [online]. 2013, roč. 499, č. 7458, s. 295–300. doi: 10.1038/nature12354 Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature12354>
- [45] WILMS, Christian D, HÄUSSER, Michael. Twitching towards the ideal calcium sensor. *Nature Methods* [online]. 2014, roč. 11, č. 2, s. 139–140. [cit. 2016-05-13]. doi: 10.1038/nmeth.2814 Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.2814>
- [46] MURTHY, V N, SEJNOWSKI, T J, STEVENS, C F. Dynamics of dendritic calcium transients evoked by quantal release at excitatory hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2000, roč. 97, č. 2, s. 901–6. doi: 10.1073/pnas.97.2.901 Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [47] BARNETT, Lauren et al. A Fluorescent, Genetically-Encoded Voltage Probe Capable of Resolving Action Potentials. *PLoS ONE* [online]. 2012, roč. 7, č. 9, s. e43454. doi: 10.1371/journal.pone.0043454 Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043454>
- [48] SAMPLE, Vedangi et al. Genetically encoded molecular probes to visualize and perturb signaling dynamics in living biological systems. *Journal of cell science* [online]. 2014, roč. 127, č. Pt 6, s. 1151–60. [cit. 2016-04-23]. doi: 10.1242/jcs.099994 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634506>
- [49] ADDDGENE. *Addgene: Prab-3::NLS::GCaMP6s* [online]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/68119/> [cit. 2015-12-2].
- [50] MANK, Marco et al. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophysical journal* [online]. 2006, roč. 90, č. 5, s. 1790–1796. doi: 10.1529/biophysj.105.073536 Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.073536>
- [51] PÉREZ KOLDENKOVA, Vadim, NAGAI, Takeharu. Genetically encoded Ca²⁺ indicators: Properties and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013, roč. 1833, č. 7, s. 1787–1797. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.011

- [52] ADDGENE. *TN-XXL pcDNA3* [online]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/45797/> [cit. 2016-05-12].
- [53] BAIRD, G S, ZACHARIAS, D a, TSIEN, R Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, roč. 96, č. 20, s. 11241–11246. doi: 10.1073/pnas.96.20.11241
- [54] KOLB, J. et al. 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>
- [55] LOEW, Leslie M. Design and Use of Organic Voltage Sensitive Dyes. In *Membrane Potential Imaging in the Nervous System*. Springer International Publishing Switzerland, 2011. ISBN 978-1-4419-6557-8. s. 13–24.
- [56] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Di-4-ANEPPS* [online]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1199?ICID=search-product> [cit. 2015-12-26].
- [57] BURTON, Francis. *Optical mapping* [online]. Dostupné z: http://www.heartrhythmcongress.com/files/file/HRC2010_Presentations_Sunday/BasicSciences1400_F_Burton.pdf [cit. 2015-12-26].
- [58] YU, Yuan et al. Switchable microwave photonic filter between high Q bandpass filter and notch filter with flat passband based on phase modulation. *Optics Express* [online]. 2010, roč. 18, č. 24, s. 25271–25282. doi: 10.1364/OE.18.025271 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164875>
- [59] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Fast-Response Probes—Section 22.2* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-membrane-potential/fast-response-probes.html#head2> [cit. 2015-12-26].
- [60] SLOVIN, Hamutal et al. Long-term voltage-sensitive dye imaging reveals cortical dynamics in behaving monkeys. *Journal of neurophysiology*. 2002, roč. 88, č. 6, s. 3421–3438. doi: 10.1152/jn.00194.2002
- [61] VEJRAŽKA, Martin. Buněčné kultury. In Praha: Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
- [62] BÁRTOVÁ, Eva. *Buněčné a tkáňové kultury* [online]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-bunecne_a_tkanove_kultury&lang=cz [cit. 2015-12-26].
- [63] GIBCO. Cell culture basics. *Invitrogen* [online]. 2005, s. 55. Dostupné z: www.invitrogen.com/cellculturebasics
- [64] 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>
[cit. 2015-12-26].

- [65] FREDJ, Sandra et al. Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *British journal of pharmacology* [online]. 2006, roč. 148, č. 1, s. 16–24. doi: 10.1038/sj.bjp.0706709 Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1617037&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [66] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *293A Cell Line* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R70507> [cit. 2016-04-13].
- [67] TOM, Roseanne, BISSON, Louis, DUROCHER, Yves. Culture of HEK293-EBNA1 cells for production of recombinant proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2008, roč. 3, č. 3, s. 1–5. doi: 10.1101/pdb.prot4976
- [68] AIYAR, Ashok et al. Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 modulates replication of oriP-plasmids by impeding replication and transcription fork migration through the family of repeats. *Virology journal* [online]. 2009, roč. 6, č. Mcm, s. 29. doi: 10.1186/1743-422X-6-29 Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2654434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [69] PHAM, Phuong Lan et al. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, roč. 84, č. 3, s. 332–342. doi: 10.1002/bit.10774
- [70] JÄGER, Volker et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC biotechnology* [online]. 2013, roč. 13, s. 52. doi: 10.1186/1472-6750-13-52 Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3699382&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [71] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *FreeStyle™ 293-F Cells* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R79007> [cit. 2016-04-13].
- [72] CHAUDHARY, Sarika et al. Overexpressing Human Membrane Proteins in Stably Transfected and Clonal Human Embryonic Kidney 293S Cells Sarika. *Nature Protocols*. 2013, roč. 18, č. 9, s. 1199–1216. doi: 10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate
- [73] BRUEGGEMANN, L. I. HEK293S Cells Have Functional Retinoid Processing Machinery. *The Journal of General Physiology* [online]. 2002, roč. 119, č. 6, s. 593–612. doi: 10.1085/jgp.20018495 Dostupné z: <http://www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.20018495>
- [74] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *293T Cells* [online]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/technical-resources/cell-lines/2/cell-lines-detail-153.html> [cit. 2016-04-13].
- [75] *Cell Search System* [online]. Dostupné z: <http://www2.brc.riken.jp/cache/cell/RCB1637> [cit. 2015-12-26].

- [76] PESHWA, MV et al. Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: effect of calcium concentration of spatial distribution of viability. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993, roč. 41, č. 2, s. 179–187. doi: 10.1002/bit.260410203
- [77] 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. doi: 10.1007/s00216-010-3821-6 Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3821-6>
- [78] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Guidelines for RNA Transfection* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/guidelines-for-rna-transfection.html> [cit. 2016-04-13].
- [79] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Stable Transfection* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/stable-transfection.html> [cit. 2016-04-13].
- [80] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. *Transient Transfection* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/transient-transfection.html> [cit. 2016-04-13].
- [81] BENDA, Vladimír et al. *Základy biologie*. Vydavatelství VŠCHT, 2005. ISBN 8070805870.
- [82] BŘÍZA, Jindřich. *Bakteriální genetika* [online]. Dostupné z: [http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky/240 Genetika/Lekce12-print_GI.pdf](http://kgn.umbr.cas.cz/prednasky/240%20Genetika/Lekce12-print_GI.pdf) [cit. 2016-04-16].
- [83] WOODS, Niels Bjarne et al. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: Risk of insertional mutagenesis. *Blood*. 2003, roč. 101, č. 4, s. 1284–1289. doi: 10.1182/blood-2002-07-2238
- [84] CUMMINGS, Benjamin. No Title. In Pearson Education, Inc., 2004.
- [85] KIRCHEIS, Ralf et al. Tumor targeting with surface-shielded ligand–polycation DNA complexes. *Journal of Controlled Release*. 2001, roč. 72, č. 1, s. 165–170. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00272-3
- [86] ŠMARDA, Jan. *Metody přenosu DNA do buněk* [online]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi6400/um/transfekce.pdf> [cit. 2015-12-21].
- [87] DALTON, Annamarie C, BARTON, William A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein science : a publication of the Protein Society* [online]. 2014, roč. 23, č. 5, s. 517–25. [cit. 2016-04-25]. doi: 10.1002/pro.2439 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510886>
- [88] POTTER, Huntington. *UNIT 10.15 Transfection by Electroporation*. John Wiley and Sons Inc., 2003.
- [89] SU, Cheng-Huang et al. Nonviral gene therapy targeting cardiovascular system.

- American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [online]. 2012, roč. 303, č. 6, s. H629–38. [cit. 2016-04-25]. doi: 10.1152/ajpheart.00126.2012 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22821991>
- [90] BIOELECTROMAGNETISM PORTAL. *BIOELECTROMAGNETISM* [online]. Dostupné z: <http://www.bem.fi/book/index.htm> [cit. 2016-05-13].
- [91] KYROZIS, Andreas, REICHLING, David B. Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *Journal of Neuroscience Methods*. 1995, roč. 57, č. 1, s. 27–35. doi: 10.1016/0165-0270(94)00116-X
- [92] LEVIS, R A, RAE, J L. The use of quartz patch pipettes for low noise single channel recording. *Biophysical journal* [online]. 1993, roč. 65, č. 4, s. 1666–77. [cit. 2016-05-15]. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81224-4 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506069>
- [93] JIN, Lei et al. Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a novel fluorescent protein voltage probe. *Neuron*. 2012, roč. 75, č. 5, s. 779–785. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.040.Single
- [94] LAM, Amy J et al. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nature methods* [online]. 2012, roč. 9, č. 10, s. 1005–12. doi: 10.1038/nmeth.2171 Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3461113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [95] AKEMANN, W. et al. Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. *Journal of Neurophysiology* [online]. 2012, roč. 108, č. 8, s. 2323–2337. doi: 10.1152/jn.00452.2012 Dostupné z: <http://jn.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jn.00452.2012>
- [96] KUSCH, Jana, ZIFARELLI, Giovanni. Patch-Clamp Fluorometry: Electrophysiology meets Fluorescence. *Biophysical Journal* [online]. 2014, roč. 106, č. 6, s. 1250–1257. doi: 10.1016/j.bpj.2014.02.006 Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349514001829>

PŘÍLOHY

A OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

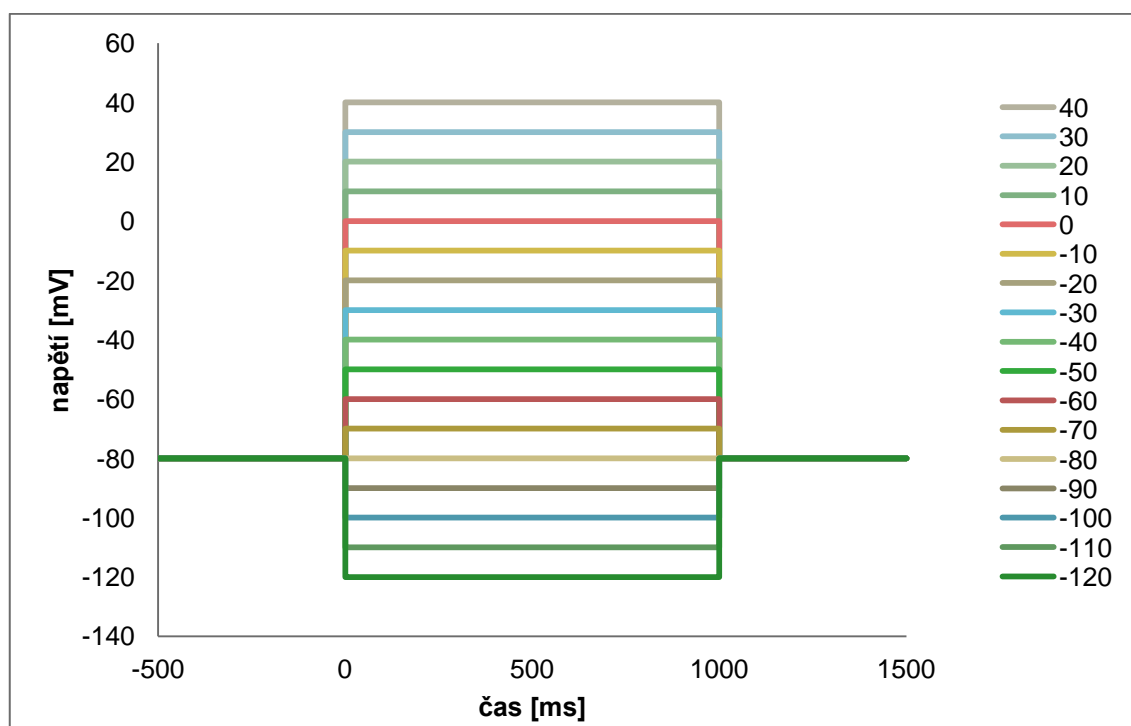
Obsahem přiloženého CD je program ASAP1 určený ke spuštění v programovacím prostředí MATLAB, který byl vytvořený pro zjišťování správnosti indikace poklesu fluorescenčního záření sondou ASAP1.

Dále jsou na CD přiloženy obrázky jednotlivých buněk, na nichž byl proveden experiment, a společně s nimi se v jednotlivých složkách nacházejí výstupy získané z programu, které jsou i součástí přílohy B této diplomové práce. Jedná se o samotné snímky, histogramy s maximálními úrovněmi jasu pro napětí dle stimulačního protokolu, tabulky s hodnotami průměrů pro jednotlivá napětí a následné závislosti poklesu jasu v obraze na změně napětí dle stimulačního protokolu. Poslední součástí jsou tabulky se standardizovanými hodnotami pro dvě daná napětí, fyziologickou hodnotu buněčné linie HEK293 -40 mV a výchozí *holding potential* -80 mV.

B STUDIUM VLASTNOSTÍ NAPĚŤOVÉHO SENZORU ASAP1

V této přílohouvé části se nacházejí výstupy s daty pro jednotlivé buňky, na nichž byl proveden experiment. Pro připomenutí je přiložen stimulační protokol, který byl použitý k vyvolání změn fluorescenčního záření fluorescenční sondou ASAP1.

Obrázky jednotlivých buněk s vybranými napětími, fyziologickou hodnotu buněčné linie HEK293 -40 mV a výchozí *holding potential* hodnotou -80 mV jsou pro srovnání uvedeny taktéž. Dále jsou uvedeny výstupy získané z programu s maximálními úrovněmi stupňů šedi [0 255] pro napětí dle stimulačního protokolu, tabulky s hodnotami průměrů pro jednotlivá napětí a dále závislosti poklesu jasu v obraze na změně napětí dle stimulačního protokolu. Tabulky s rozdílem mezi hodnotami pro dvě daná napětí, fyziologickou hodnotu buněčné linie HEK293 -40 mV a výchozího *holding potential* -80 mV jsou uvedeny na konci této přílohouvé části.

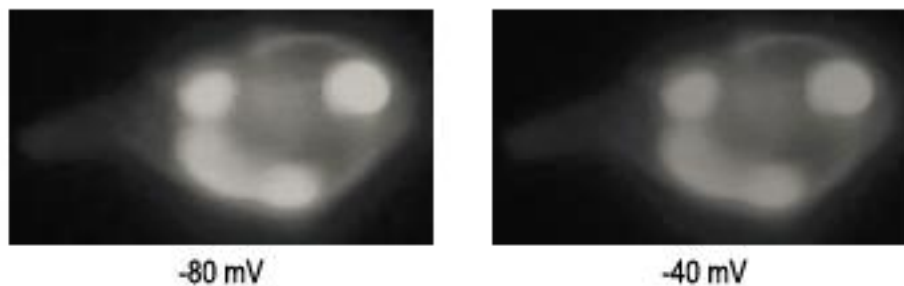


Obrázek B.1: Stimulační protokol vyšetřovaných buněk.

Následují konkrétní buňky s dosaženými hodnotami během prováděného experimentu. Nejprve jsou uvedeny výsledky získané metodou **histogramů**, poté jsou hodnoty získané metodou **průměrů**. V závěru práce se nalézají hodnoty s tabulkami a jimi korespondujícími grafickými vyjádřeními, **zprůměrované** hodnoty maximálních úrovní stupňů šedi a jejich následná **standardizace** k napětím *holding potential* -80 mV

a fyziologické hodnotě buněčné linie HEK293 -40 mV. Všechny výsledky této vyhodnocené části byly získány metodou histogramů.

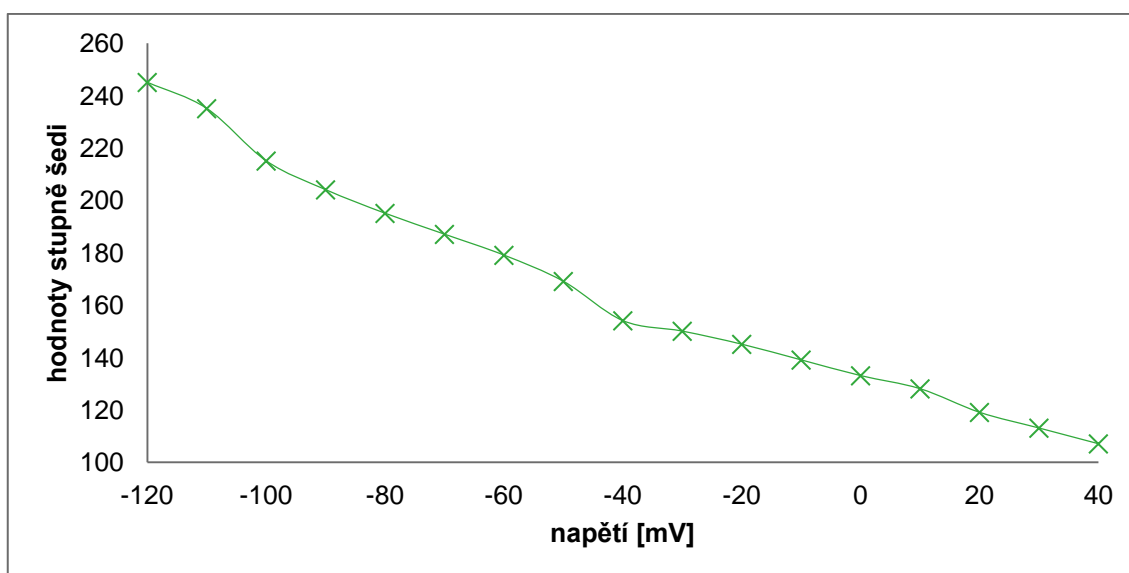
B.1 Buňka číslo 1



Obrázek B.2: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV pro buňku číslo 1 (B1).

Tabulka B-1: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B1.

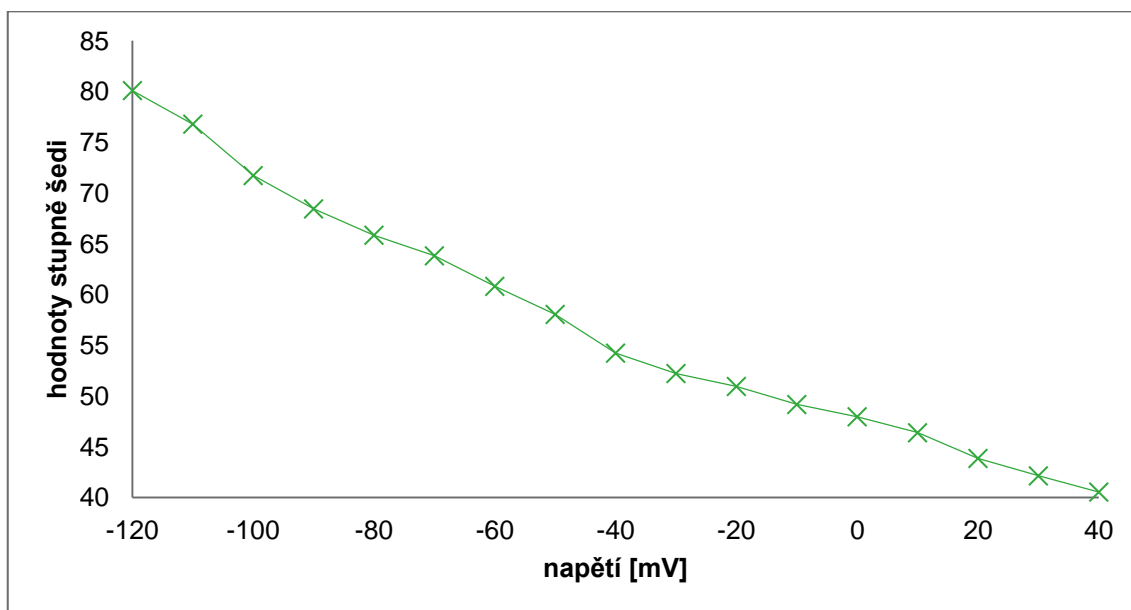
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	245	-30	150
-110	235	-20	145
-100	215	-10	139
-90	204	0	133
-80	195	10	128
-70	187	20	119
-60	179	30	113
-50	169	40	107
-40	154		



Obrázek B.3: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B1.

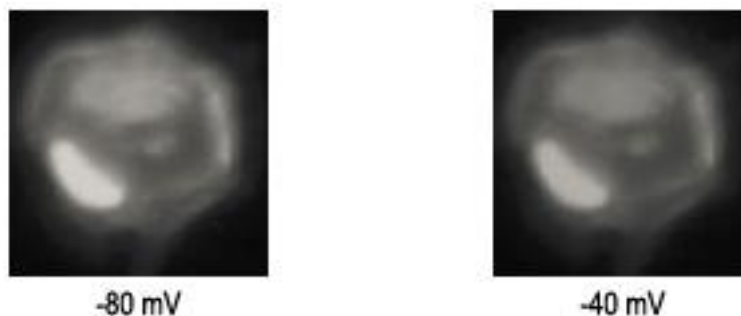
Tabulka B-2: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B1.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	80,083	76,773	71,707	68,426	65,831	63,805	60,799	58,030	54,219
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	52,208	50,936	49,156	47,946	46,376	43,845	42,126	40,529	



Obrázek B.4: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B1.

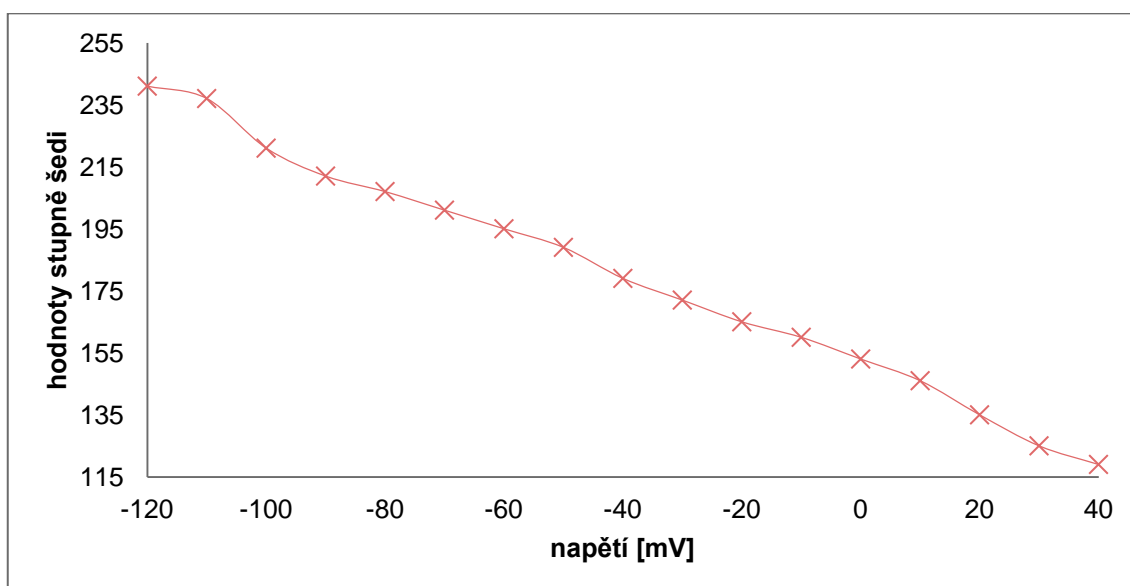
B.2 Buňka číslo 2



Obrázek B.5: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B2.

Tabulka B-3: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B2.

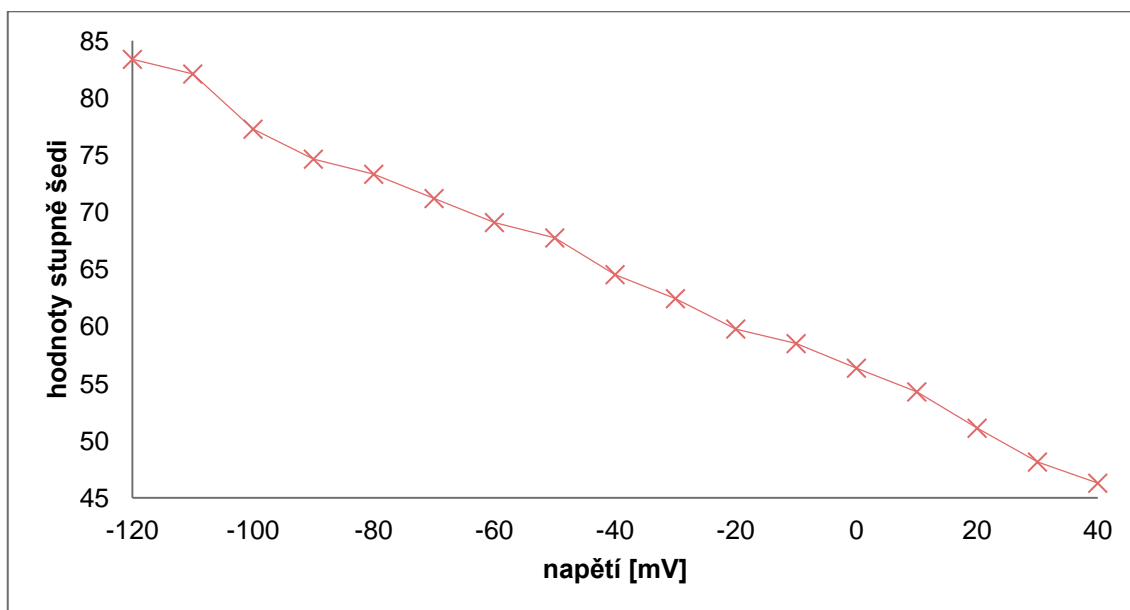
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	241	-30	172
-110	237	-20	165
-100	221	-10	160
-90	212	0	153
-80	207	10	146
-70	201	20	135
-60	195	30	125
-50	189	40	119
-40	179		



Obrázek B.6: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B2.

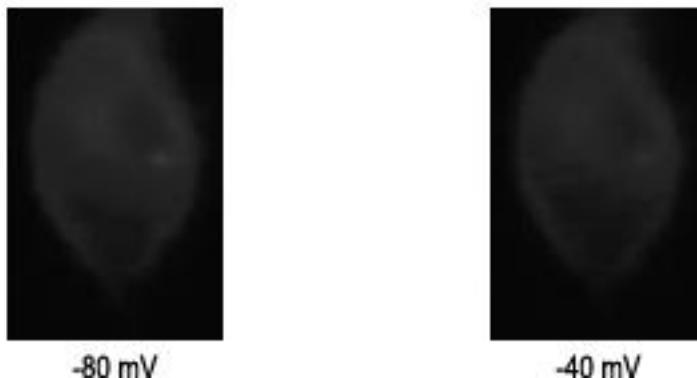
Tabulka B-4: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B2.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	83,365	82,082	77,251	74,627	73,305	71,182	69,082	67,732	64,522
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	62,423	59,764	58,490	56,335	54,261	51,083	48,125	46,273	



Obrázek B.7: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B2.

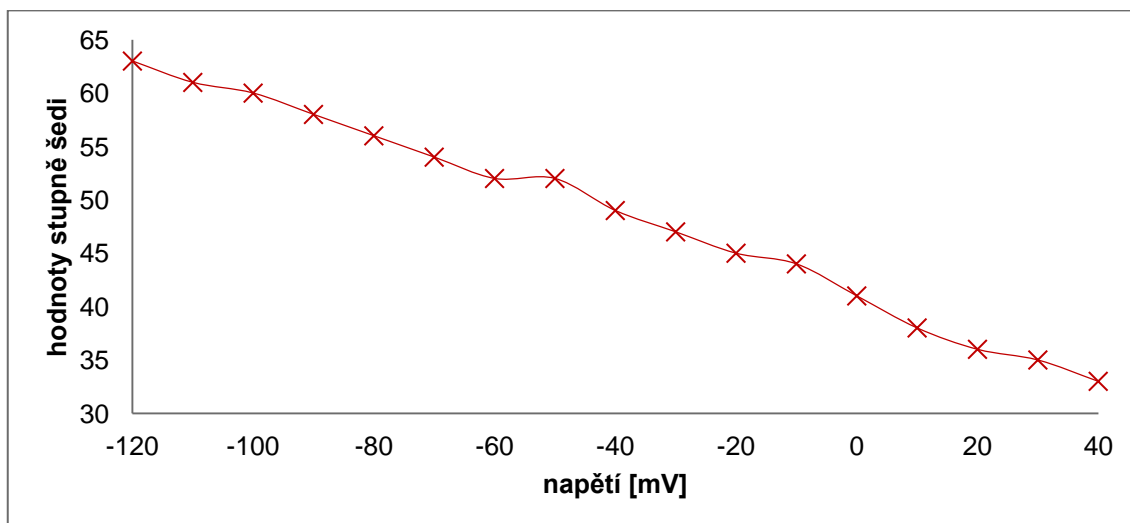
B.3 Buňka číslo 3



Obrázek B.8: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B3.

Tabulka B-5: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B3.

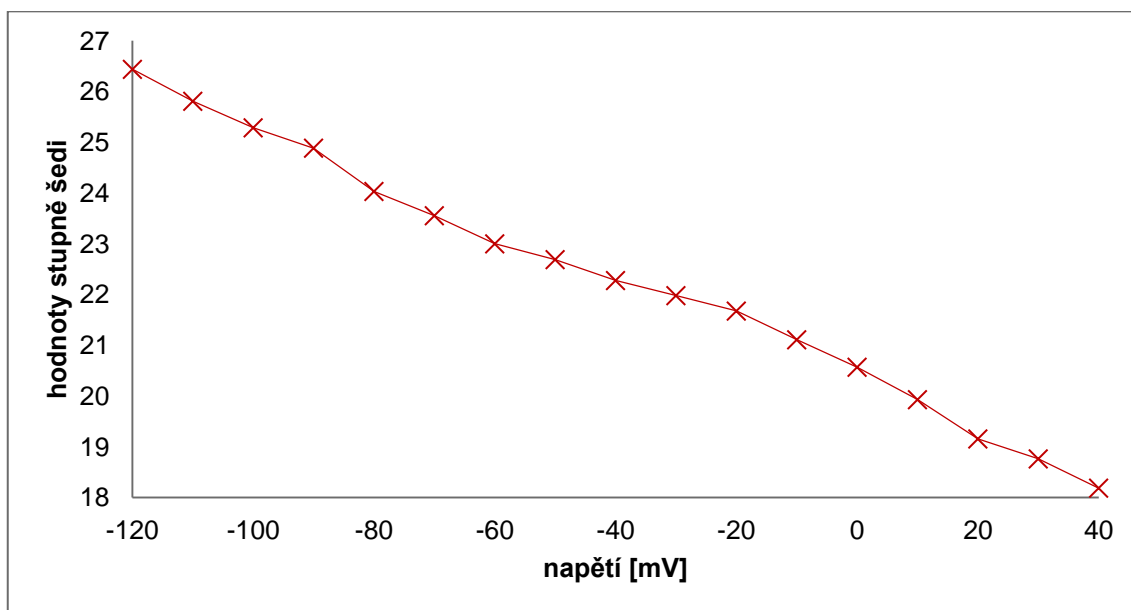
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	63	-30	47
-110	61	-20	45
-100	60	-10	44
-90	58	0	41
-80	56	10	38
-70	54	20	36
-60	52	30	35
-50	52	40	33
-40	49		



Obrázek B.9: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B3.

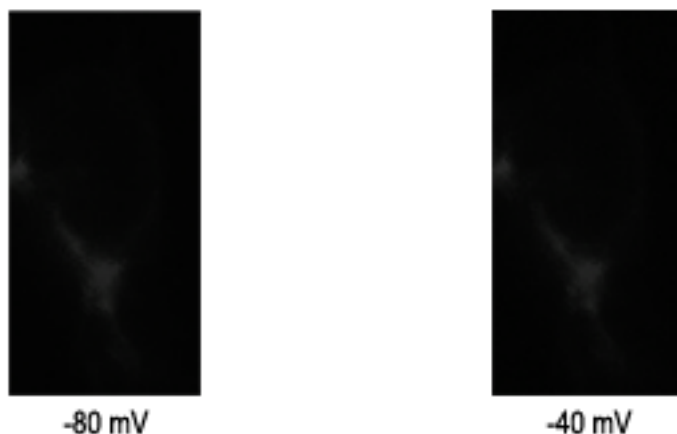
Tabulka B-6: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B3.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	26,435	25,805	25,282	24,881	24,028	23,551	22,997	22,686	22,274
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	21,976	21,672	21,107	20,565	19,926	19,153	18,760	18,183	



Obrázek B.10: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B3.

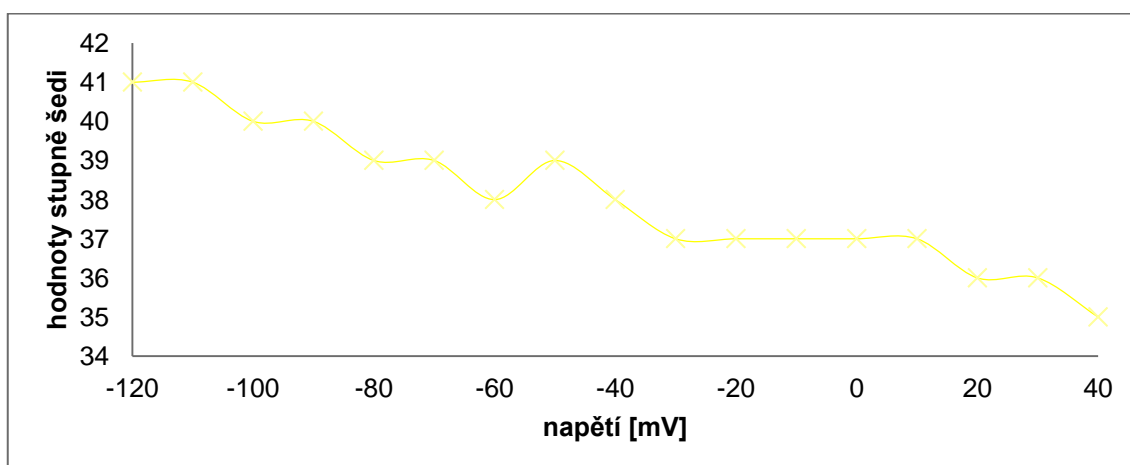
B.4 Buňka číslo 4



Obrázek B.11: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B4.

Tabulka B-7: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B4.

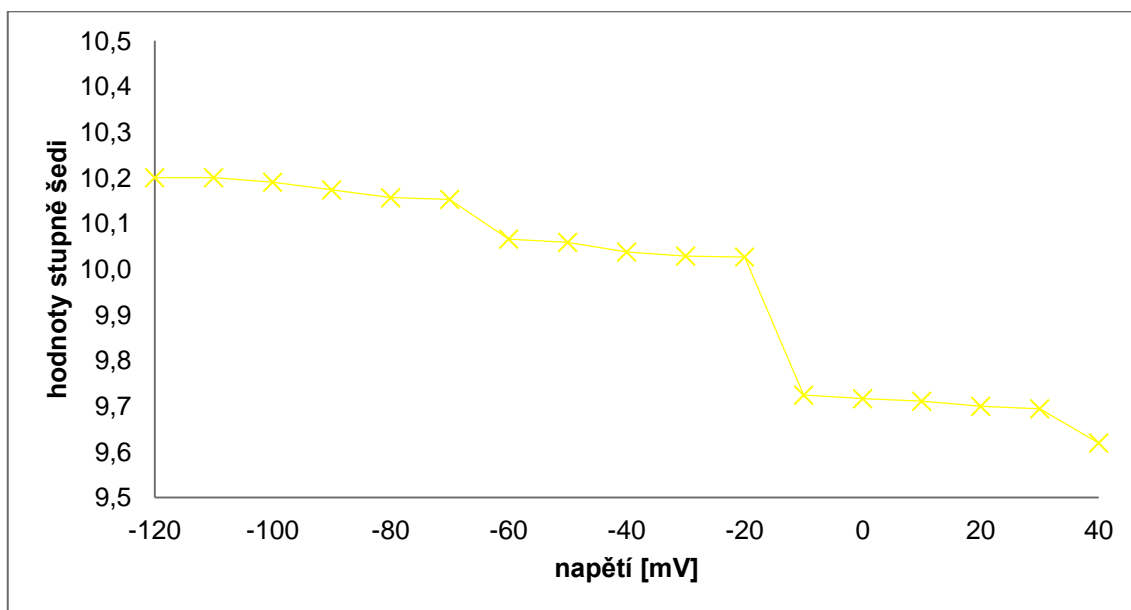
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	41	-30	37
-110	41	-20	37
-100	40	-10	37
-90	40	0	37
-80	39	10	37
-70	39	20	36
-60	38	30	36
-50	39	40	35
-40	38		



Obrázek B.12: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B4.

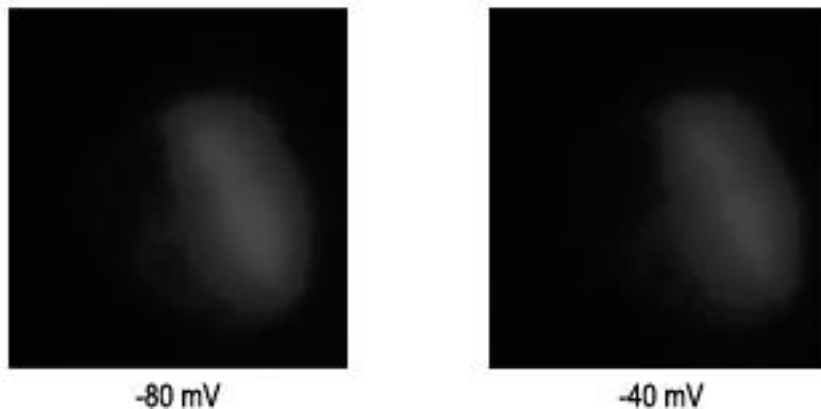
Tabulka B-8: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B4.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	10,200	10,200	10,190	10,173	10,156	10,152	10,066	10,058	10,037
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	10,028	10,026	9,724	9,716	9,711	9,699	9,694	9,619	



Obrázek B.13: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B4.

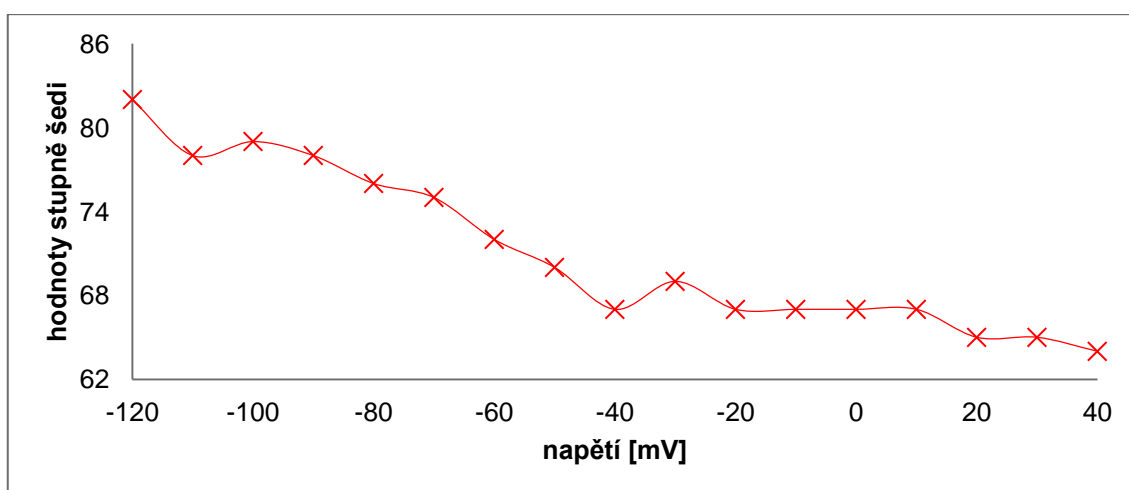
B.5 Buňka číslo 5



Obrázek B.14: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B5.

Tabulka B-9: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B5.

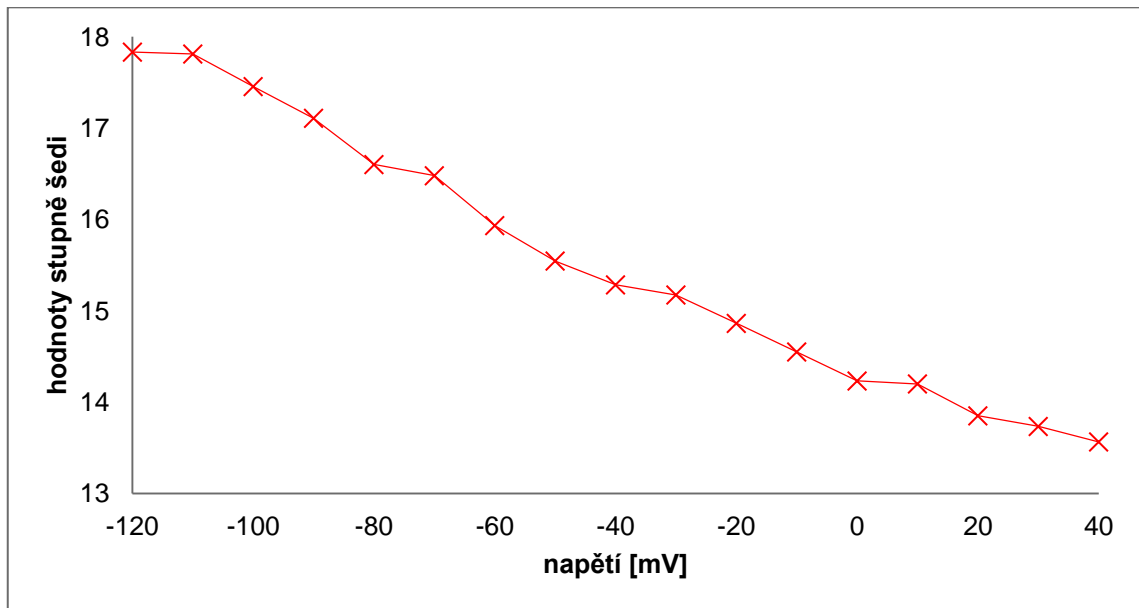
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	82	-30	69
-110	78	-20	67
-100	79	-10	67
-90	78	0	67
-80	76	10	67
-70	75	20	65
-60	72	30	65
-50	70	40	64
-40	67		



Obrázek B.15: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B5.

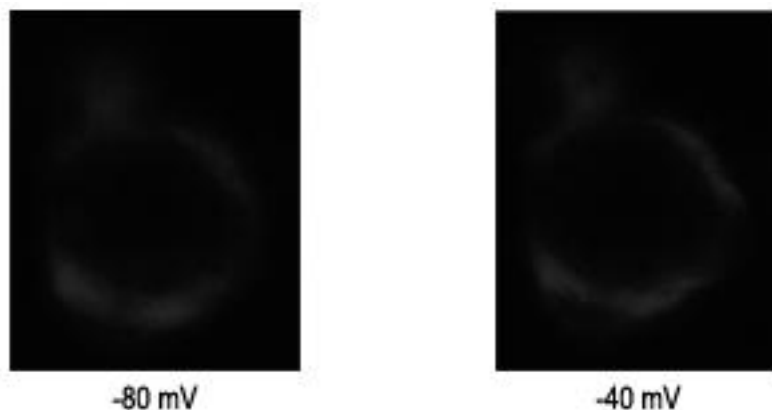
Tabulka B-10: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B5.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	17,831	17,810	17,453	17,106	16,600	16,477	15,932	15,544	15,283
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	15,173	14,861	14,549	14,231	14,199	13,849	13,733	13,564	



Obrázek B.16: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B5.

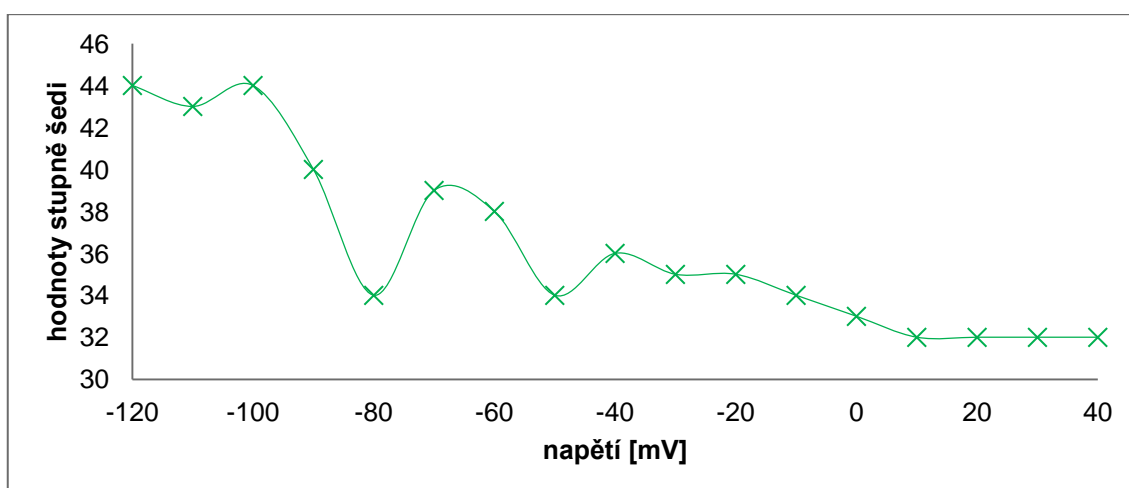
B.6 Buňka číslo 6



Obrázek B.17: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B6.

Tabulka B-11: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B6.

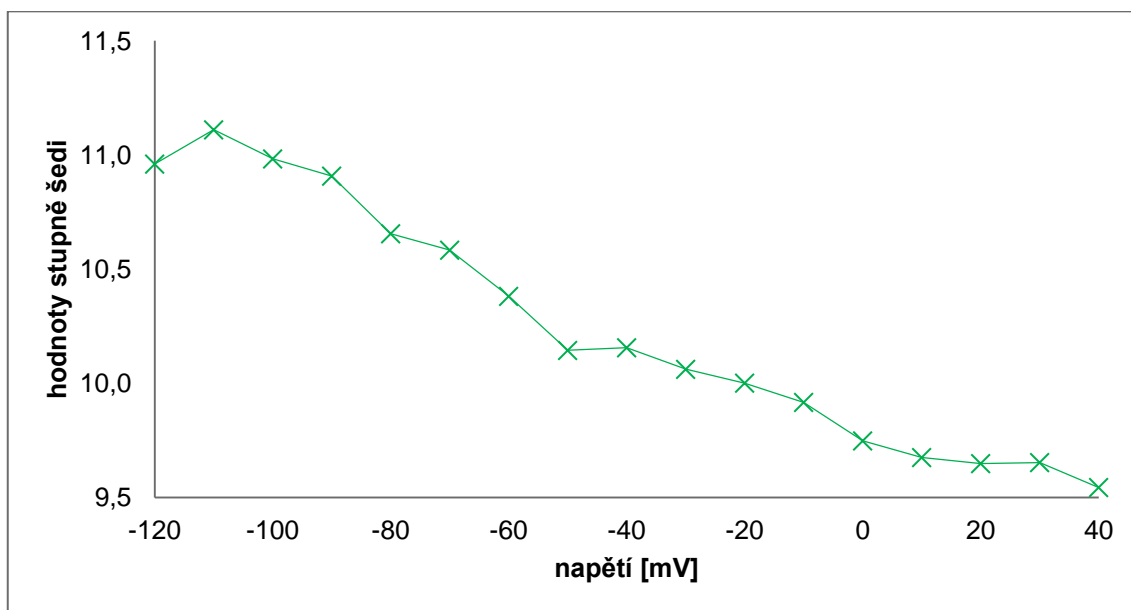
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	44	-30	35
-110	43	-20	35
-100	44	-10	34
-90	40	0	33
-80	34	10	32
-70	39	20	32
-60	38	30	32
-50	34	40	32
-40	36		



Obrázek B.18: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B6.

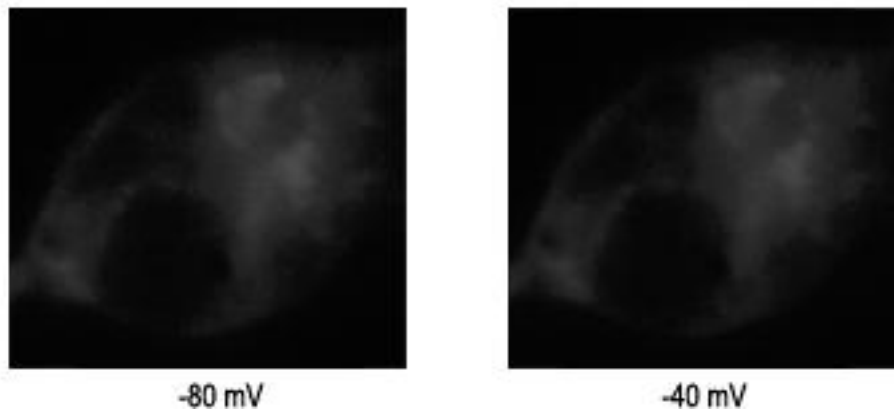
Tabulka B-12: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B6.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	10,960	11,109	10,982	10,907	10,655	10,583	10,380	10,144	10,155
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	10,061	10,000	9,916	9,747	9,675	9,648	9,653	9,543	



Obrázek B.19: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B6.

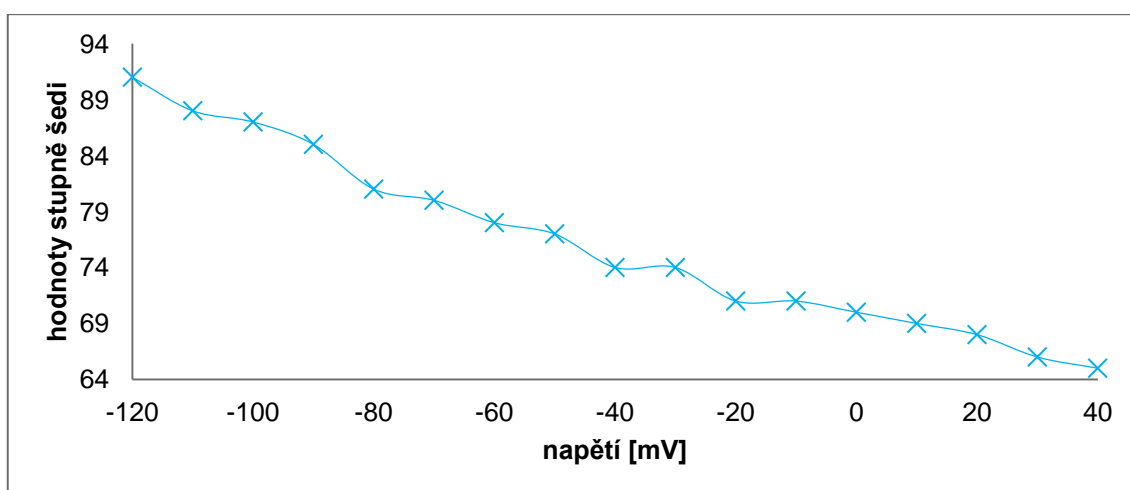
B.7 Buňka číslo 7



Obrázek B.20: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B7.

Tabulka B-13: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B7.

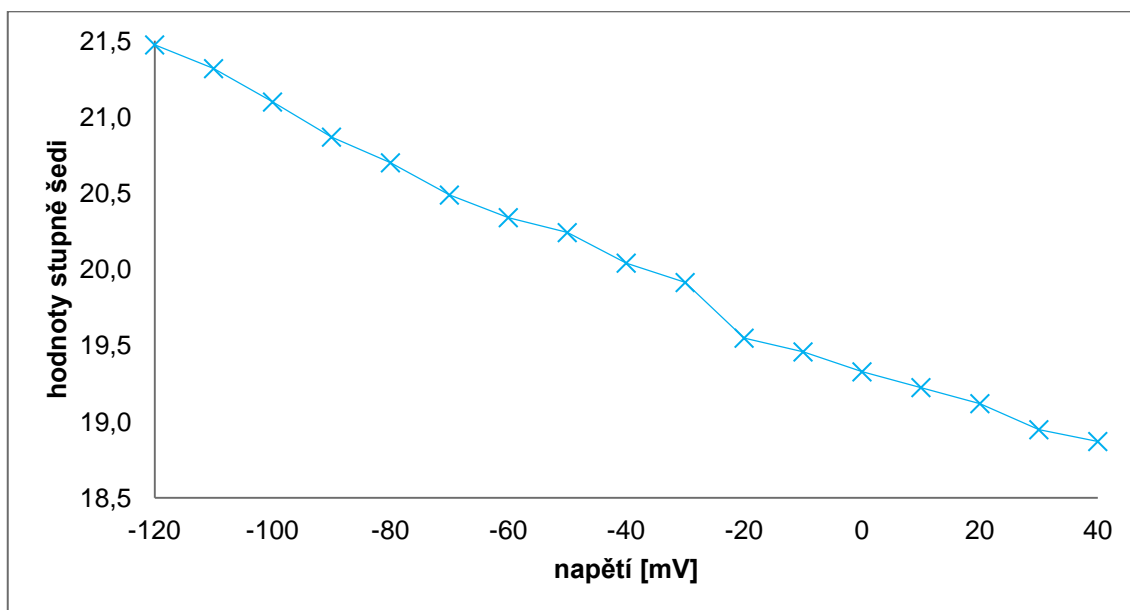
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	91	-30	74
-110	88	-20	71
-100	87	-10	71
-90	85	0	70
-80	81	10	69
-70	80	20	68
-60	78	30	66
-50	77	40	65
-40	74		



Obrázek B.21: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B7.

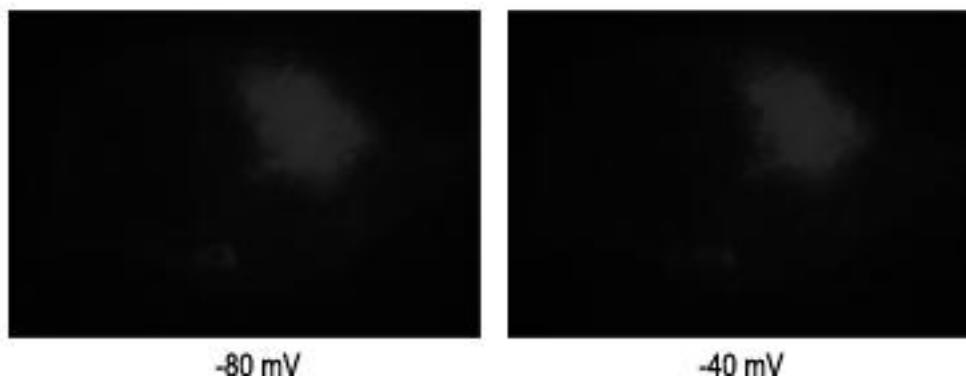
Tabulka B-14: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B7.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	21,472	21,316	21,097	20,867	20,698	20,487	20,338	20,240	20,040
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	19,912	19,547	19,457	19,326	19,223	19,118	18,946	18,869	



Obrázek B.22: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B7.

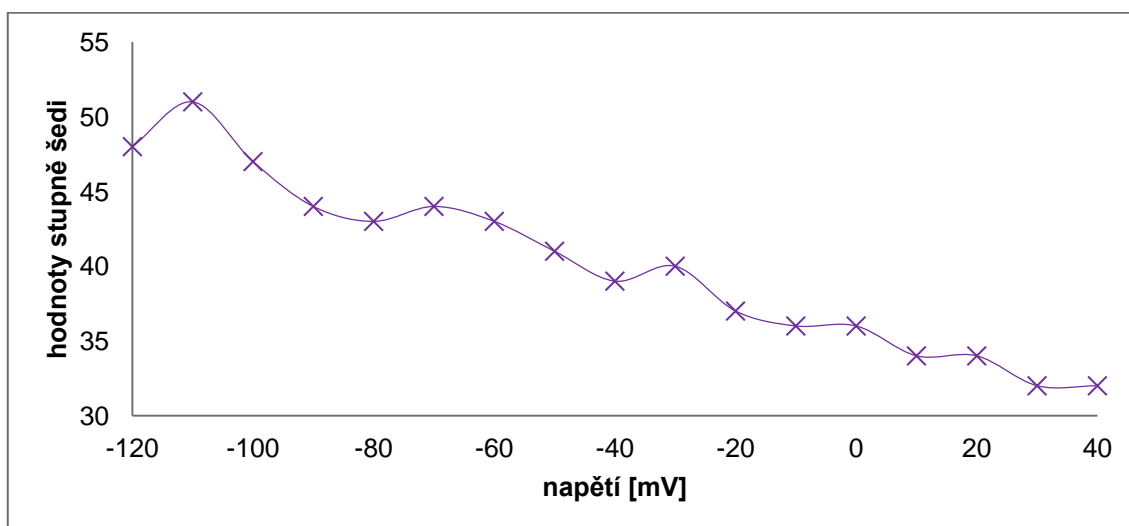
B.8 Buňka číslo 8



Obrázek B.23: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B8.

Tabulka B-15: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B8.

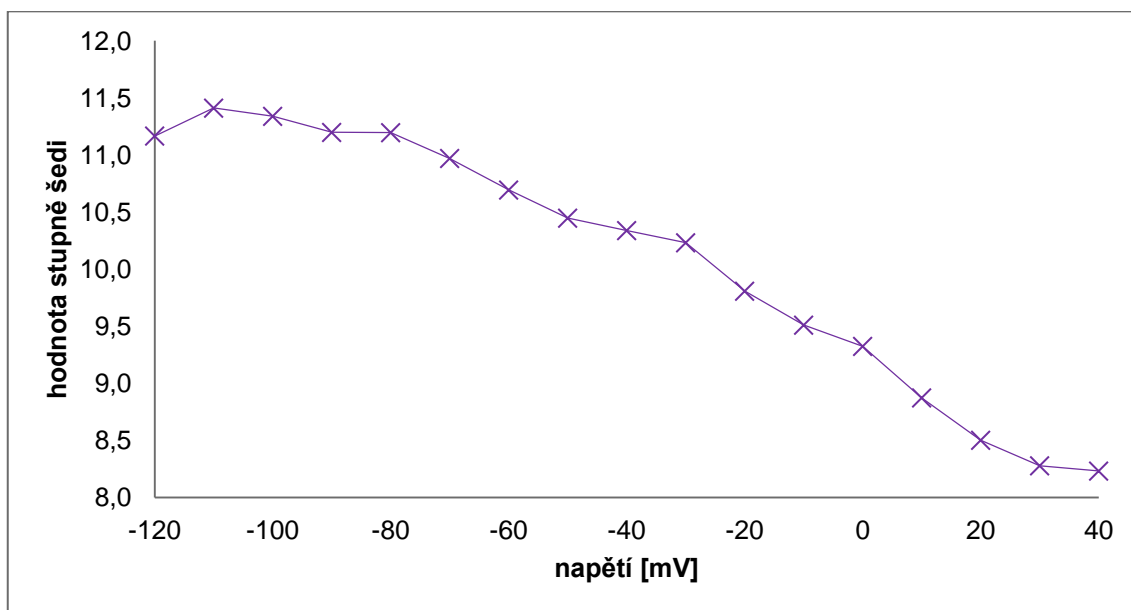
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	48	-30	40
-110	51	-20	37
-100	47	-10	36
-90	44	0	36
-80	43	10	34
-70	44	20	34
-60	43	30	32
-50	41	40	32
-40	39		



Obrázek B.24: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B8.

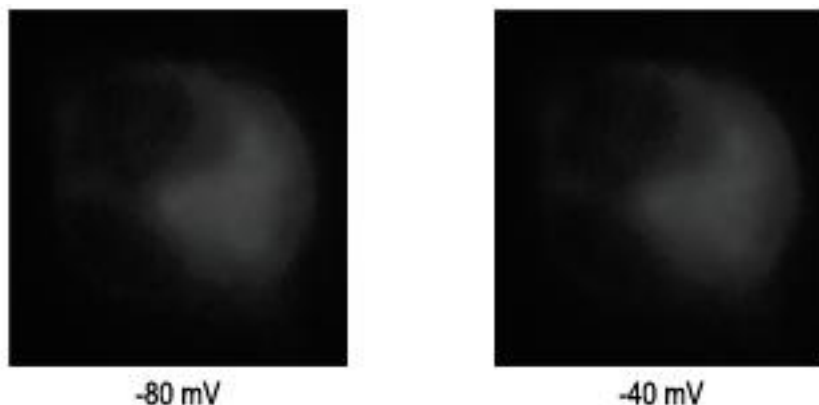
Tabulka B-16: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B8.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	11,165	11,409	11,337	11,196	11,194	10,968	10,692	10,445	10,337
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	10,230	9,806	9,509	9,323	8,872	8,501	8,277	8,231	



Obrázek B.25: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B8.

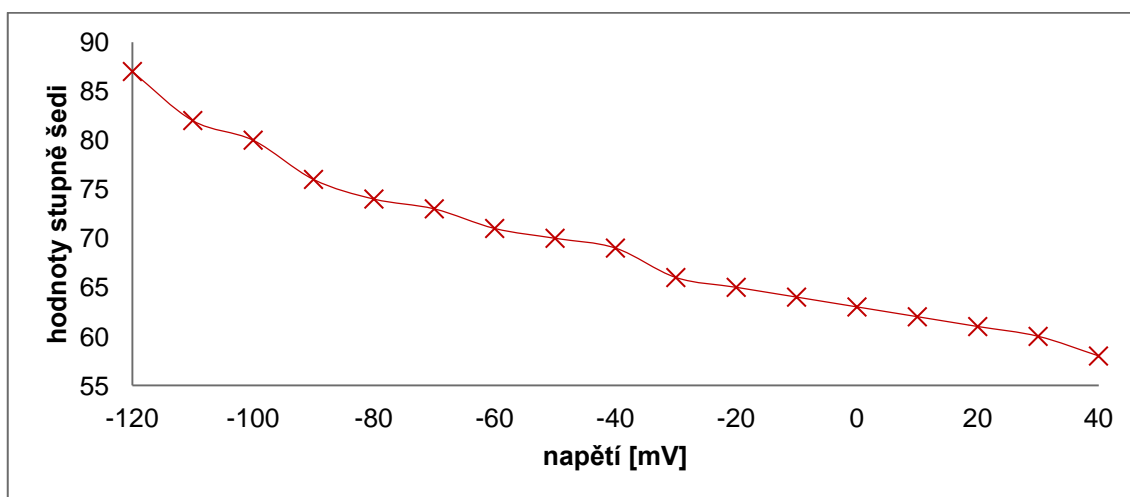
B.9 Buňka číslo 9



Obrázek B.26: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B9.

Tabulka B-17: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B9.

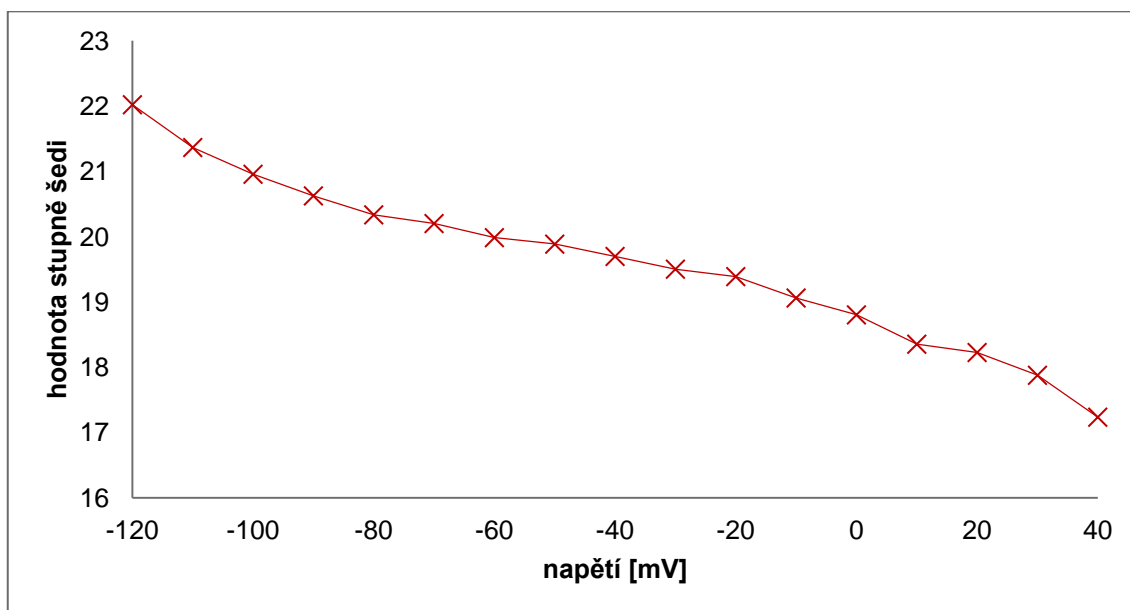
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	87	-30	66
-110	82	-20	65
-100	80	-10	64
-90	76	0	63
-80	74	10	62
-70	73	20	61
-60	71	30	60
-50	70	40	58
-40	69		



Obrázek B.27: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B9.

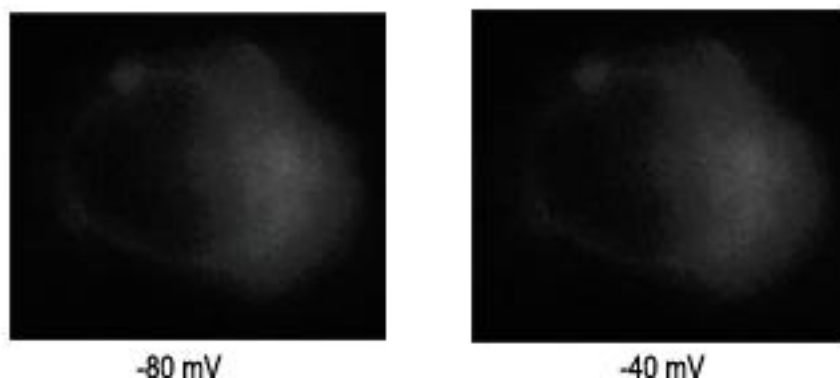
Tabulka B-18: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B9.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	22,019	21,363	20,954	20,623	20,333	20,199	19,983	19,884	19,695
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	19,501	19,387	19,059	18,800	18,352	18,224	17,875	17,234	



Obrázek B.28: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B9.

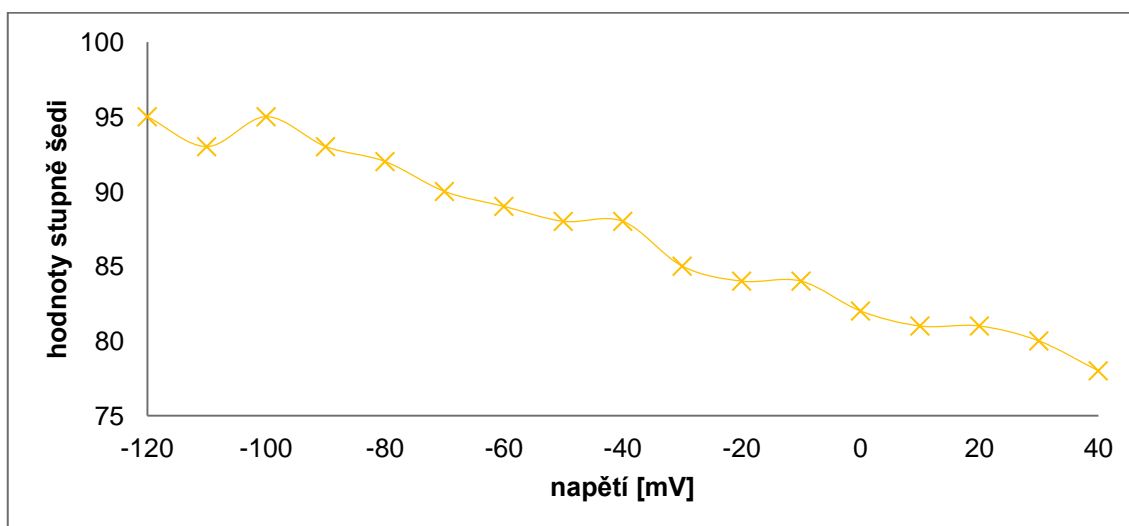
B.10 Buňka číslo 10



Obrázek B.29: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B10.

Tabulka B-19: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B10.

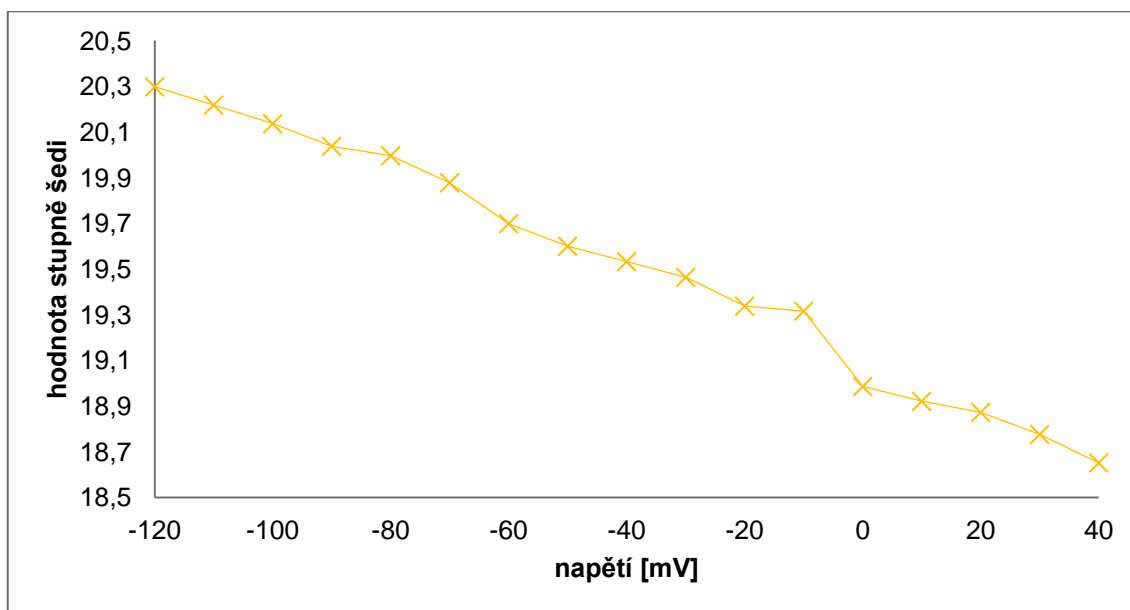
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	95	-30	85
-110	93	-20	84
-100	95	-10	84
-90	93	0	82
-80	92	10	81
-70	90	20	81
-60	89	30	80
-50	88	40	78
-40	88		



Obrázek B.30: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B10.

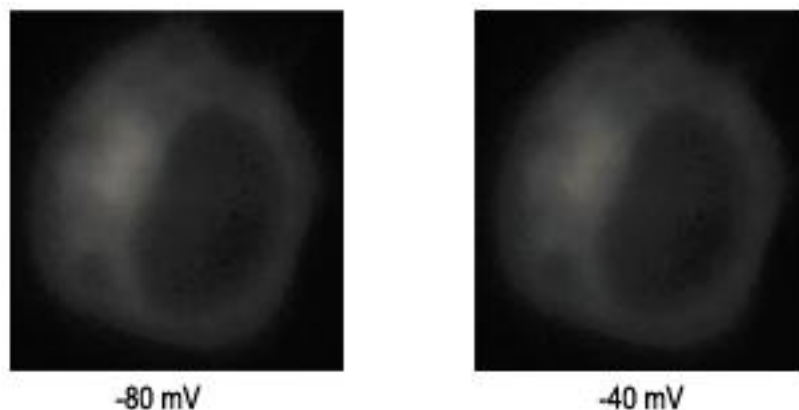
Tabulka B-20: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B10.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	20,297	20,218	20,136	20,037	19,996	19,878	19,698	19,600	19,532
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	19,464	19,337	19,315	18,986	18,921	18,872	18,776	18,651	



Obrázek B.31: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B10.

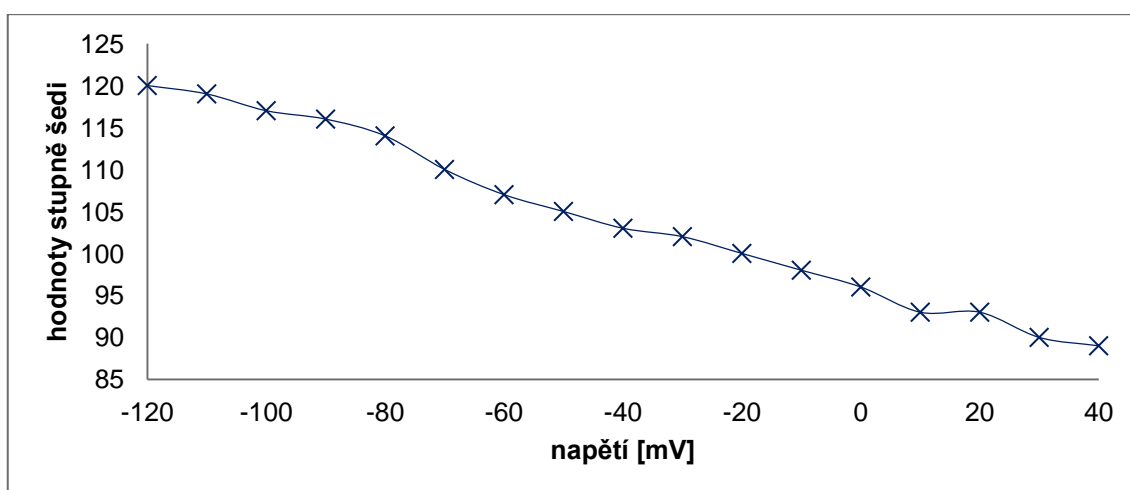
B.11 Buňka číslo 11



Obrázek B.32: Vlevo hodnota výchozího *holding potential* -80 mV, vpravo fyziologická hodnota napětí buněčné linie HEK293 -40 mV; B11.

Tabulka B-21: Hodnoty maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B11.

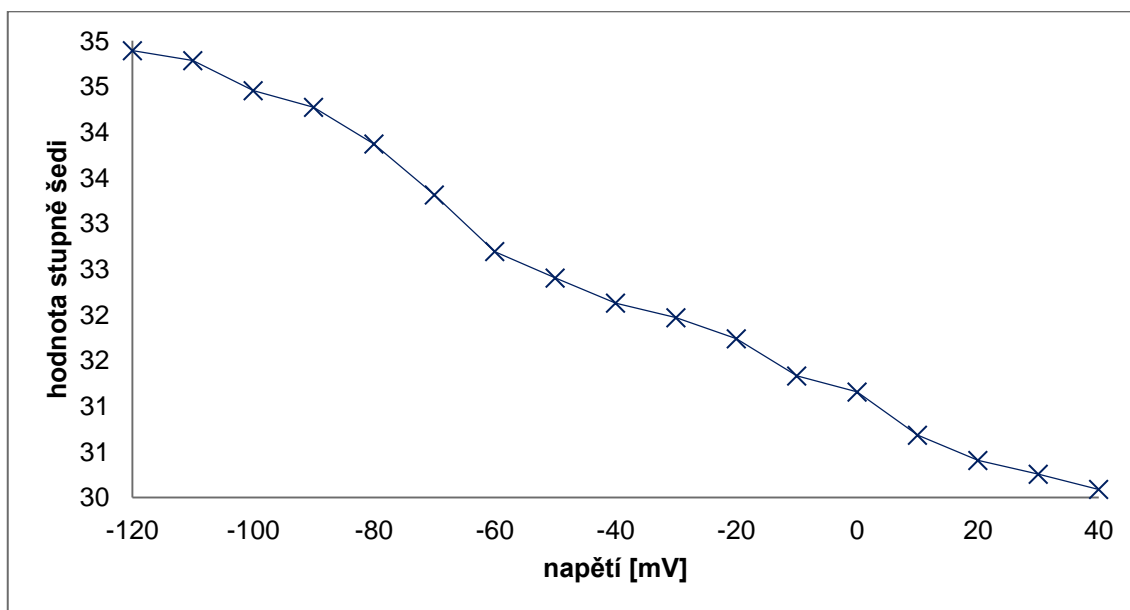
stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	max úroveň stupně šedi [0-255]
-120	120	-30	102
-110	119	-20	100
-100	117	-10	98
-90	116	0	96
-80	114	10	93
-70	110	20	93
-60	107	30	90
-50	105	40	89
-40	103		



Obrázek B.33: Grafické vyjádření maximální úrovně stupňů šedi pro hodnoty stimulačního napětí; B11.

Tabulka B-22: Průměrné hodnoty jasů (stupňů šedi) pro všechna napětí stimulačního protokolu; B11.

napětí [mV]	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
stupěň šedi	34,890	34,781	34,452	34,270	33,869	33,311	32,691	32,401	32,127
napětí [mV]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	
stupěň šedi	31,967	31,736	31,329	31,154	30,681	30,405	30,254	30,088	

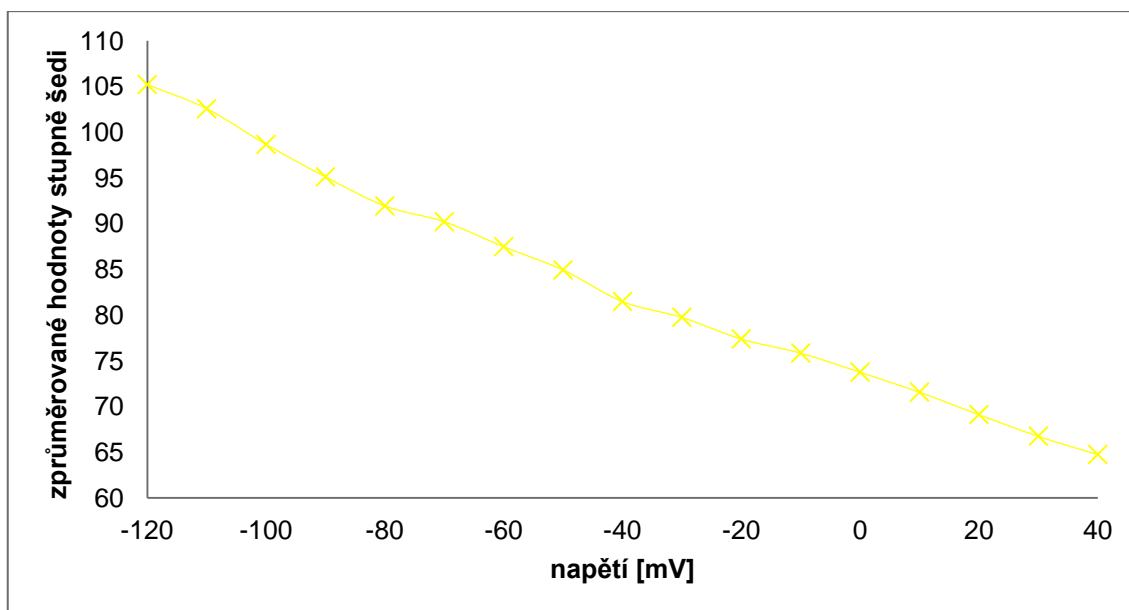


Obrázek B.34: Průměrné hodnoty stupňů šedi v závislosti na zvoleném stimulačním napětí; B11.

B.12 Standardizované hodnoty maximálních úrovní stupňů šedi pro konkrétní napětí u všech buněk

Tabulka B-23: Zprůměrované hodnoty maximálních stupňů šedi pro všechny buňky u konkrétního napětí.

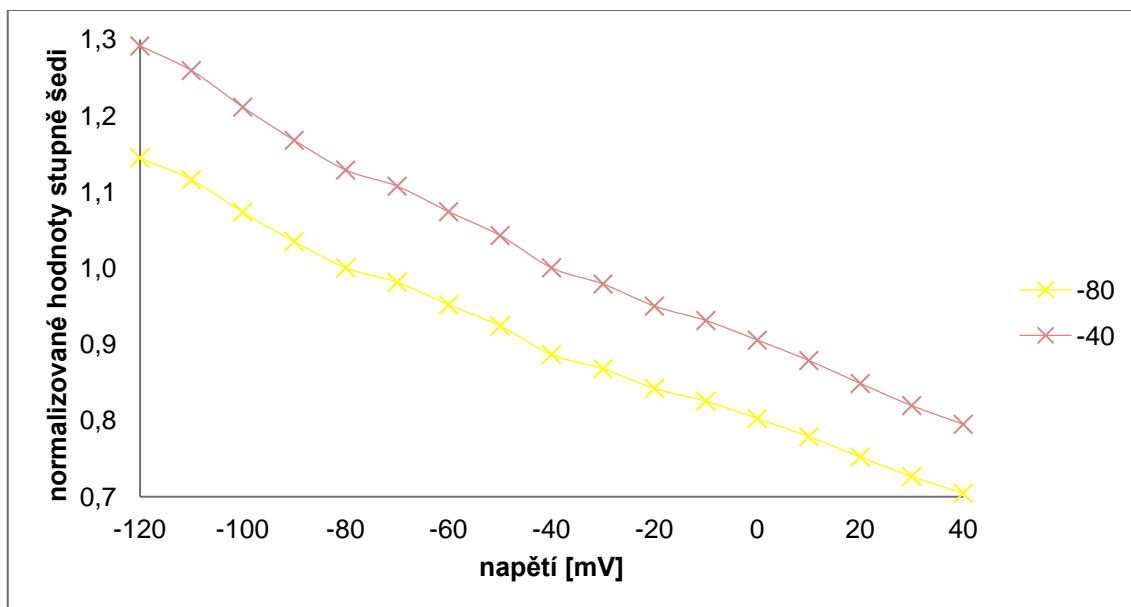
stimulační napětí [mV]	průměrná hodnota stupně šedi [0-255]	stimulační napětí [mV]	průměrná hodnota stupně šedi [0-255]
-120	105	-30	80
-110	103	-20	77
-100	99	-10	76
-90	95	0	74
-80	92	10	72
-70	90	20	69
-60	87	30	67
-50	85	40	65
-40	81		



Obrázek B.35: Grafické vyjádření zprůměrovaných hodnot maximálních hodnot stupňů šedi pro všechny buňky a konkrétní napětí.

Tabulka B-24: Standardizované hodnoty stupňů šedi konkrétních napětí pro všechny vyšetřované buňky vztažená k hodnotám *holding potential* -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.

stimulační napětí [mV]	stimulační napětí [mV]		
	-80	-40	
-120	1,144	1,291	standardizované hodnoty stupňů šedi
-110	1,116	1,259	
-100	1,073	1,211	
-90	1,035	1,167	
-80	1,000	1,128	
-70	0,981	1,107	
-60	0,952	1,074	
-50	0,924	1,042	
-40	0,886	1,000	
-30	0,867	0,979	
-20	0,842	0,950	
-10	0,825	0,931	
0	0,802	0,905	
10	0,778	0,878	
20	0,752	0,848	
30	0,726	0,819	
40	0,704	0,795	



Obrázek B.36: Grafické vyjádření standardizovaných hodnot stupňů šedi vůči dvěma zvoleným napětím *holding potential* -80 mV a fyziologické hodnotě HEK293 -40 mV.