



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

ELEKTROFYZIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE MEMBRÁNOVÉHO KANÁLU KIR2.1

ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF KIR2.1 MEMBRANE CHANNEL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klára Měsíčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ondřej Svoboda

BRNO 2018



Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské a ekologické inženýrství**
Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Klára Měsíčková

ID: 147483

Ročník: 2

Akademický rok: 2017/18

NÁZEV TÉMATU:

Elektrofyzilogická charakterizace membránového kanálu Kir2.1

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s možností elektrofyziologické charakterizace membránových kanálů. 2) Nastudujte elektrofyziologické vlastnosti membránového kanálu Kir2.1. 3) Prostudujte kultivaci buněčné linie HEK293T s transienně transfekovaným membránovým kanálem. Prakticky ověřte v buněčné laboratoři. 4) Proveďte elektrofyziologickou charakterizaci membránového konstruktu pomocí techniky patch clamp. 5) Naměřená data statisticky vyhodnoťte ve vhodném programovém prostředí. 6) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] KURATA, Harley T., Wayland W. L. CHENG a Colin G. NICHOLS. Polyamine Block of Inwardly Rectifying Potassium Channels. 2011-1-13. DOI: 10.1007/978-1-61779-034-8_6. ISBN 10.1007/978-1-61779-034-8_6.

[2] AKITA, T., M. OHARA a Y. OKADA. Patch-Clamp Techniques: General Remarks. In: Yasunobu OKADA, ed. Patch Clamp Techniques SE - 2 [online]. B.m.: Springer Japan, 2012, Springer Protocols Handbooks, s. 21–41. ISBN 978-4-431-53992-6.

Termín zadání: 5.2.2018

Termín odevzdání: 18.5.2018

Vedoucí práce: Ing. Ondřej Svoboda

Konzultant:

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 diplomová práce se věnuje problematice elektrofyziologické charakterizace membránového kanálu $K_{ir}2.1$. Vnitřně usměrňující draslíkový kanál $K_{ir}2.1$ se nachází v buňkách svalových, srdečních i nervových a jeho dysfunkce způsobuje různá onemocnění. Praktická část práce je zaměřená na kultivaci buněčné linie HEK293T sloužící k transfekci plasmidu $K_{ir}2.1$ a následné měření iontových proudů elektrofyziologickou měřicí metodou patch-clamp v režimu whole-cell.

KLÍČOVÁ SLOVA

iontové kanály, HEK293, $K_{ir}2.1$, transfekce, patch-clamp

ABSTRACT

The topic of this thesis is electrophysiological characterization of $K_{ir}2.1$ membrane channel. Inward rectifier potassium channel $K_{ir}2.1$ is located in muscular, heart and nerve cells and its dysfunction causes various diseases. Practical part of this stage is focused on cultivation of the HEK293T cell line that is used to transfection of the plasmid $K_{ir}2.1$ and subsequent measurement of the ionic current through the electrophysiological method patch-clamp in whole-cell mode.

KEYWORDS

ion channels, HEK293, $K_{ir}2.1$, transfection, patch-clamp

MĚSÍČKOVÁ, K. *Elektrofyzilogická charakterizace membránového kanálu Kir2.1*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2018. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Ondřej Svoboda.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma *Elektrofyzilogická charakterizace membránového kanálu Kir2.1* 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 a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Srdečně děkuji vedoucímu práce Ing. Ondřeji Svobodovi za cenné rady, odborné vedení a především za ochotu při zpracování této diplomové práce. Další můj velký dík patří rodičům, prarodičům, sestře a příteli za podporu během psaní práce i celého studia.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK.....	11
ÚVOD.....	12
1 MEMBRÁNOVÉ KANÁLY	13
1.1 STRUKTURA A FUNKCE MEMBRÁNOVÝCH KANÁLŮ	13
1.2 ELEKTROFYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI KANÁLŮ	14
1.3 SODÍKOVÉ IONTOVÉ KANÁLY	17
1.4 VÁPŇÍKOVÉ IONTOVÉ KANÁLY	18
1.5 DRASLÍKOVÉ IONTOVÉ KANÁLY.....	19
1.5.1 <i>K_{ir}2.1</i>	21
2 BUNĚČNÉ KULTURY	22
2.1 BUNĚČNÁ LINIE HeLa	23
2.2 BUNĚČNÁ LINIE CHO	23
2.3 BUNĚČNÁ LINIE HEK293.....	24
2.3.1 <i>Podmínky kultivace buněk HEK293</i>	25
3 TRANSFEKCE	27
3.1 BIOLOGICKÉ METODY TRANSFEKCE	28
3.2 FYZIKÁLNÍ METODY TRANSFEKCE.....	28
3.3 CHEMICKÉ METODY TRANSFEKCE.....	29
4 PATCH-CLAMP	31
4.1 VARIANTY PATCH-CLAMP TECHNIKY	32
4.2 MĚŘICÍ MIKROELEKTRODY	33
4.3 VYUŽITÍ PATCH-CLAMP TECHNIKY PŘI STUDIU ELEKTROFYZIOLOGIE MEMBRÁNOVÉHO KANÁLU <i>K_{IR}2.1</i>	35
5 ELEKTROFYZIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE MEMBRÁNOVÉHO KANÁLU <i>K_{IR}2.1</i>.....	38
5.1 KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE HEK293T	38
5.2 OPTIMALIZACE TRANSFEKCE PLASMIDU <i>K_{IR}2.1</i>	39
5.3 PATCH-CLAMP	42
5.4 DOSAŽENÉ VÝSLEDKY A DISKUZE.....	48
ZÁVĚR	51

LITERATURA.....	53
SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK	59
SEZNAM PŘÍLOH.....	60
A OBSAH PŘILOŽENÉHO CD	61
B VÝLEDNÉ SNÍMKY TRANSFEKCE	62

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Funkční schéma membránového kanálu [4].....	14
Obrázek 2: Náhradní schéma buněčné membrány [2]	15
Obrázek 3: Průběh akčního napětí nervové a srdeční buňky [32].....	17
Obrázek 4: Struktura α podjednotky sodíkového kanálu [35]	18
Obrázek 5: Struktura podjednotek vápníkového iontového kanálu [37].....	19
Obrázek 6: Proudově - napěťová závislost I_{K1} , tvořená skupinou kanálů $K_{ir2.x}$ v myocyty [27].....	20
Obrázek 7: Primární struktura podjednotek K_{ir} kanálu. TM1 a TM2 - transmembránové oblasti, H5 - pór tvořící oblast, NH_2 a $COOH$ - cytosolové konce [29]	21
Obrázek 8: Buněčná linie HeLa [43].....	23
Obrázek 9: Buněčná linie CHO [39]	24
Obrázek 10: Buněčná linie HEK293 [7]	25
Obrázek 11: Schéma stabilní a přechodné transfekce [33]	27
Obrázek 12: Transfekce pomocí PEI [13].....	30
Obrázek 13: Princip patch-clamp techniky [1]	31
Obrázek 14: Varianty patch-clamp techniky [1]	32
Obrázek 15: Rozdílný tvar špičky a velikost odporu mikroelektrody při jednostupňovém a dvoustupňovém tahání; $R's > R''s$ [1]	34
Obrázek 16: Patch-clamp experimenty testující blokování kanálu $K_{ir2.1}$ látkou styraX. (A) Whole-cell patch-clamp buněk HEK293T exprimující $K_{ir2.1}$. (B) Inside-out patch-clamp buněk HEK293T exprimující D172N. (C) Inside-out patch-clamp buněk HEK293T exprimující E299V. Data reprezentují střední hodnoty $\pm SE$ ($n = 6$ pro $K_{ir2.1}$, $n = 4$ pro D172N a $n = 8$ pro E299V) [48].	36
Obrázek 17: Vnitřně usměrňující K^+ proudy z izolované nativní BCE buňky. Levá část obrázku: whole-cell proud měřený v koupelovém roztoku o koncentraci K^+ 5 a 140 mM; ve spodní části použitý stimulační protokol. Pravá část obrázku: výsledná proudově-napěťová závislost vytvořená průměrnými hodnotami šesti buněk [46].....	37
Obrázek 18: Snímek neúspěšně transfekovaných buněk HEK293T plasmidem $K_{ir2.1}$, vzorek č. 8.....	40
Obrázek 19: Snímek úspěšně transfekovaných buněk HEK293T plasmidem $K_{ir2.1}$, vzorek č. 4.....	41
Obrázek 20: Změna koncentrací pDNA (trojúhelník), PEI (křížek) a NaCl (čtverec) v jednotlivých transfekčních roztocích. Přerušovaný obdélník vyznačuje hodnoty koncentrace s nejlepší transfekční účinností – vzorek 4 a 5. ρ_A - hmotnostní koncentrace [$\mu g/ml$], c_A - molární koncentrace [$mmol/l$]	42
Obrázek 21: Signál pocházející z porušené mikroelektrody ponořené do roztoku.....	43
Obrázek 22: Signál pocházející z neporušené mikroelektrody ponořené do roztoku ...	44

Obrázek 23: Průběh signálu při dotyku mikroelektrody s buňkou.....	44
Obrázek 24: Průběh signálu při navázání gigaseal.....	45
Obrázek 25: Průběh signálu při navázání gigaseal po vykompenzování frekvenčních špiček	45
Obrázek 26: Průběh signálu při otevření buňky	46
Obrázek 27: Stimulační protokol pro kanály $K_{ir}2.1$ - holding potential -80 mV, napěťové impulzy -80 mV až +60 mV s krokem 10 mV	46
Obrázek 28: Ukázka whole-cell proudu zaznamenaného z buňky HEK293T s exprimovaným plasmidem $K_{ir}2.1$ a ve spodní části použitý stimulační protokol	48
Obrázek 29: I-V charakteristika buňky HEK293T s exprimovaným plasmidem $K_{ir}2.1$	49
Obrázek 30: I-V charakteristika netransfekované buňky HEK293T	49
Obrázek 31: I-V charakteristika membránového kanálu $K_{ir}2.1$ exprimovaného v buňkách HEK293T v koupelovém roztoku s 5mM K^+ . Data reprezentují průměr \pm SE osmi změřených buněk.	50
Obrázek 32: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 1 (pDNA 2,77 μ g/ml, PEI 2,27 μ g/ml) a vzorek 2 (pDNA 5,45 μ g/ml, PEI 2,22 μ g/ml)	62
Obrázek 33: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 3 (pDNA 8,02 μ g/ml, PEI 2,18 μ g/ml) a vzorek 4 (pDNA 10,50 μ g/ml, PEI 2,14 μ g/ml)	62
Obrázek 34: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 5 (pDNA 5,44 μ g/ml, PEI 4,44 μ g/ml) a vzorek 6 (pDNA 7,90 μ g/ml, PEI 6,53 μ g/ml)	63
Obrázek 35: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 7 (pDNA 10,45 μ g/ml, PEI 8,53 μ g/ml) a vzorek 8 (pDNA 12,94 μ g/ml, PEI 10,44 μ g/ml)	63

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení transfekčních roztoků	40
Tabulka 2: Chemické složení pipetového roztoku	46
Tabulka 3: Chemické složení koupelového roztoku	47

ÚVOD

Vznik ani původní funkce iontových kanálů v dřívějších formách života nebyl dosud objasněn. Dnes jsou iontové kanály považovány za základní excitabilní prvky buněčné membrány excitabilních buněk. Funkční vztah mezi elektrickým signálem v nervech, svalech a synapsemi je stejný jako mezi enzymy a metabolismem [3].

Studiu iontových kanálů je věnována pozornost vzhledem k jejich nezbytnosti pro život. Mají základní vliv na fyziologické procesy, jimiž jsou neurální signalizace, svalová kontrakce či transport živin. Iontové kanály se nacházejí v plazmatických membránách všech žijících buněk i v membránách intracelulárních organel (mitochondrie, endoplazmatické retikulum, lysozomy, endozomy). Tokem iontů přes kanály vzniká elektrický proud umožňující buňkám rychlou komunikaci mezi sebou [31].

První část této práce poskytuje teoretický základ nutný pro pochopení a provedení experimentální části. Úvodní kapitola obsahuje obecný popis struktury a funkce membránových kanálů, jejich elektrofyziologické vlastnosti a hlubší rozbor vlastností draslíkových membránových kanálů. Další kapitola se věnuje problematice buněčných kultur a poslední kapitola teoretického základu se zabývá elektrofyziologickou metodou *patch-clamp* včetně příkladů využití této techniky při studiu elektrofyziologických vlastností membránového kanálu $K_{ir}2.1$.

Druhá část diplomové práce v jednotlivých podkapitolách popisuje provedení experimentů, které předchází samotné elektrofyziologické charakterizaci daného membránového kanálu. Buněčná linie HEK293 patří v praxi k často využívaným biologickým modelům díky své snadné kultivaci a transfekci, proto v této práci slouží k expresi plasmidu $K_{ir}2.1$ vpraveného do buněk chemickou transfekcí pomocí transfekčního reagentu PEI.

Elektrofyziologické vlastnosti transfekovaného plasmidu jsou zkoumány prostřednictvím techniky *patch-clamp* prováděné v módu *whole-cell*, kdy se měří proudová odezva na napěťové stimulační impulzy z celé buňky. Poslední podkapitola přináší diskuzi získaných dat, jejich vyhodnocení a nabízí možnosti dalšího rozšíření experimentu.

1 MEMBRÁNOVÉ KANÁLY

Komunikace mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím buňky, klidový membránový potenciál, transport iontů přes membránu, vznik akčního napětí - ve všech těchto pojmech hrají klíčovou roli membránové kanály. Jsou to vysoce selektivní proteiny, které dovolují přenos jednoho nebo jen několika typů iontů skrz buněčnou membránu a nachází se u eukaryotických i prokaryotických buněk [2][3]. Tato kapitola obsahuje obecný popis struktury a funkce membránových kanálů se zaměřením na jejich elektrofyziologické vlastnosti. Poslední podkapitola se věnuje popisu vlastností konkrétního kanálu, kterým je vnitřně usměrňující draslíkový kanál Kir2.1.

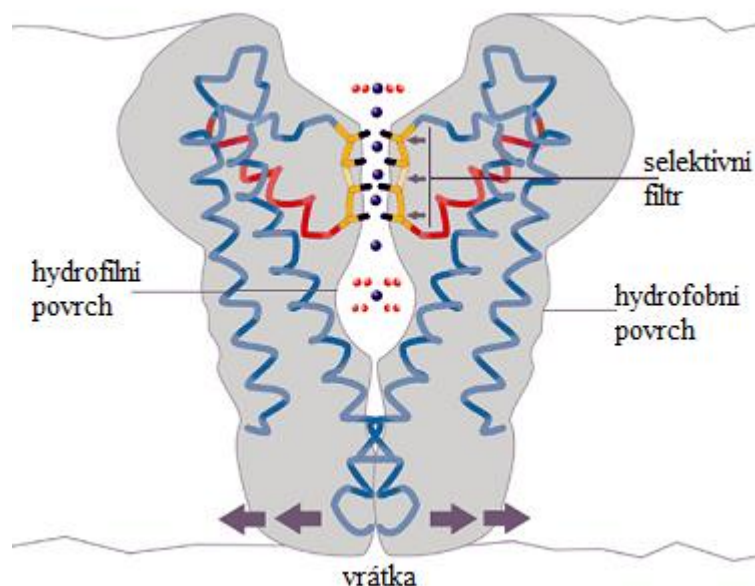
Dle nejspíše procházejících iontů, které se běžně nacházejí v přirozeném prostředí buněk, kanály dostaly své názvy. V roce 1952 při klasické analýze iontových proudů axonu olihně, Hodgkin a Huxley rozpoznali tři různé součásti proudu: sodíkový (Na^+), draslíkový (K^+) a prosakovací (*leakage*). Názvy sodíkový a draslíkový kanál jsou dnes univerzálně akceptovány pro odpovídající třídy iontových kanálů [3].

Později pokroky v molekulární genetice umožnily klonovat jednotlivé kanály a nakonec i sekvenovat celé genomy. Tímto způsobem došlo k nalezení mnohem většího množství subtypů kanálů, než dokázaly rozlišit elektrofyziologické metody. Predikce aminokyselinové sekvence iontových kanálů odhalila silné strukturální podobnosti mezi jednotlivými skupinami, což nám umožňuje mluvit o rodinách homologních kanálových proteinů, které vznikly procesy postupné genové duplikace, mutace a selekcí ze společných předchůdců [3].

1.1 Struktura a funkce membránových kanálů

Membránové kanály jsou makromolekulární póry v buněčné membráně. Jedná se o bílkovinné molekuly nacházející se ve struktuře primární, sekundární, terciární a kvartérní. Kvartérní struktura reprezentuje soustavu podjednotek, které jsou tvořeny navzájem spojenými peptidovými řetězci. Buněčná membrána představuje hydrofobní elektrický izolátor a iontové kanály poskytují vysoce vodivou hydrofilní dráhu [2].

Kanály procházejí skrz dvouvrstvou fosfolipidovou membránu, a proto u nich rozlišujeme vnější povrch hydrofobní a vnitřní hydrofilní. Obrázek 1 přináší zjednodušený popis iontového kanálu. U vnějšího ústí sodíkového i vápníkového iontového kanálu se vyskytuje zúžené místo, kde dochází k interakci mezi vstupujícími ionty a kanálovými proteiny. Jedná se o tzv. selektivní filtr zajišťující selektivitu propustnosti kanálu pro jednotlivé druhy iontů [2].



Obrázek 1: Funkční schéma membránového kanálu [4]

Konformační změna mezi uzavřeným a otevřeným stavem kanálu se nazývá vrátkování. Vrátkovací mechanismus je náhodný proces, díky kterému mohou být iontové kanály klasifikovány podle toho, jaký chemický nebo fyzikální modulátor řídí jejich aktivitu vrátkování. Modulátorem může být změna membránového potenciálu, neurotransmitter nebo jiný chemický stimulus, mechanická deformace atd. [26].

1.2 Elektrofyziologické vlastnosti kanálů

Ionty hrají hlavní roli v excitabilitě nervů a svalů. Při plném otevření iontových kanálů prochází jedním kanálem až 100 milionů iontů za sekundu. Vlivem toku iontů se mění jejich koncentrace v intracelulárním prostředí a dochází ke změně membránového potenciálu, jež je využívána pro signalizaci [31].

Schopnost kanálů propouštět ionty lze vyjádřit vodivostmi g_x . Na základě této znalosti a faktu, že buněčná membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů slouží jako izolační vrstva označená kapacitou membrány C , lze vytvořit náhradní schéma buněčné membrány (Obrázek 2) důležité pro elektrofyziologické experimenty.

Rozdílnou koncentrací iontů v intracelulárním a extracelulárním prostředí vzniká na membráně elektrické napětí popsané rovnicí

(1)

$$U_m = \varphi_i - \varphi_e,$$

kde je U_m membránové napětí, φ_i potenciál intracelulárního prostředí a φ_e potenciál extracelulárního prostředí.

Vnitřní prostředí má vzhledem k vnějšímu prostředí záporný potenciál. Když se buňka nachází v klidu, hovoříme o tzv. klidovém membránovém napětí (U_{mk}), jehož velikost závisí na typu buňky, ale standardně se pohybuje v rozmezí hodnot -90 mV až -50 mV. Na základě známých koncentrací v obou prostředích buňky lze získat velikost membránového napětí pomocí obecné Nernstovy rovnice

(2)

$$U_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X^Z]_e}{[X^Z]_i},$$

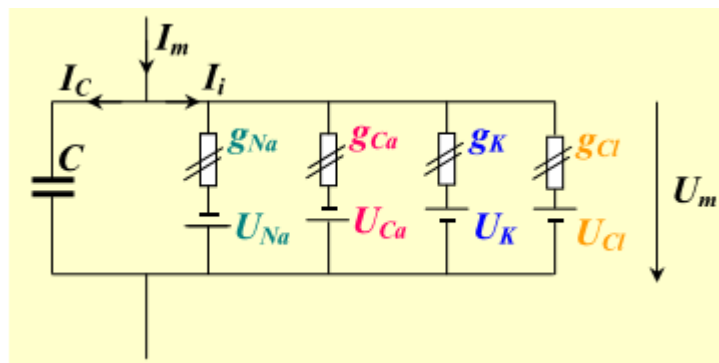
kde U_X představuje rovnovážné napětí X iontu, R plynovou konstantu, T absolutní teplotu, F Faradayův náboj, z je počet elementárních nábojů nesených iontem X^Z a $[X^Z]$ koncentrace daných iontů vnitřního a vnějšího prostředí [2].

Další možnost určení membránového potenciálu poskytuje Goldmanova rovnice, která na rozdíl od Nernstovy nepředpokládá, že je membrána propustná pouze pro jeden druh iontů, ale roztoky od sebe odděluje polopropustná membrána. Tato rovnice je pro popis membránových dějů přesnější, jelikož uvažuje propustnost buněčné membrány pro více iontů a v případě biologických membrán ji lze uvést ve tvaru

(3)

$$U = \frac{2.3.R.T}{F} \cdot \log \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_e + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_e + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_i}{P_{K^+} \cdot [K^+]_i + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_i + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_e},$$

kde U v tomto případě znamená stacionární membránové napětí, R je plynová konstanta, T absolutní teplota, F Faradayův náboj, P_{K^+} , P_{Na^+} a P_{Cl^-} představují koeficienty propustnosti pro draslíkové, sodné a chloridové ionty a $[K^+]$, $[Na^+]$, $[Cl^-]$ jsou jejich koncentrace ve vnitřním a vnějším prostředí [2].



Obrázek 2: Náhradní schéma buněčné membrány [2]

Náhradní schéma buněčné membrány zohledňuje skutečnost, že biologická membrána propouští více iontů zároveň, konkrétně ionty Na^+ , Ca^+ , K^+ a Cl^- . Ze schématu lze určit celkový membránový proud I_m jako součet iontového a kapacitního proudu. Přičemž kapacitní proud I_C je dán vztahem

(4)

$$I_C = C \frac{dU_m}{dt},$$

kde C představuje kapacitu membrány a U_m membránové napětí buňky. Celkový iontový proud I_i určuje součet proudů jednotlivých iontových kanálů dle vztahu

(5)

$$I_i = I_{Na} + I_{Ca} + I_K + I_{Cl},$$

kde I_{Na} , I_{Ca} , I_K a I_{Cl} jsou jednotlivé iontové proudy, které lze vyjádřit vztahy

(6)

$$I_{Na} = g_{Na}(U_m - U_{Na}),$$

$$I_{Ca} = g_{Ca}(U_m - U_{Ca}),$$

$$I_K = g_K(U_m - U_K),$$

$$I_{Cl} = g_{Cl}(U_m - U_{Cl}),$$

kde g_x je vodivost daného iontového kanálu, U_m membránové napětí a U_x rovnovážná napětí. Za předpokladu, že membránou neprotéká proud, tedy

(7)

$$I_{ik} = 0,$$

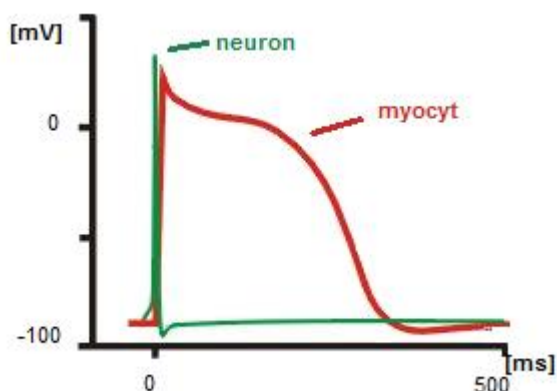
kde I_{ik} je klidový membránový proud, lze určit klidové membránové napětí dle vztahu

(8)

$$U_m = \frac{g_{Na}U_{Na} + g_{Ca}U_{Ca} + g_KU_K + g_{Cl}U_{Cl}}{g_{Na} + g_{Ca} + g_K + g_{Cl}},$$

kde g_x jsou vodivosti jednotlivých iontových kanálů a U_x jejich rovnovážná napětí. Dle uvedeného vztahu klidové membránové napětí nejvíce ovlivní rovnovážné napětí, kterému odpovídá největší hodnota vodivosti. Membránové kanály tedy nejsou dokonale selektivní a v určité míře propouštějí i jiné než dominantní ionty. Existuje více druhů iontových kanálů selektivně propouštějících stejný druh iontů, ukázkovým příkladem jsou draslíkové iontové kanály [2].

Při nadprahovém podráždění excitabilních buněk vyvolaném změnou membránového napětí nebo chemickým činitelem vzniká tzv. akční napětí (AN), které je charakterizováno rychlou změnou membránového napětí a schopností šířit se do okolního prostředí. Například buňky srdeční tkáně jsou v místě dotyků membrán elektricky propojeny a AN se šíří z buňky na buňku. Průběhy AN nelze odvodit z velikosti hodnoty nadprahového impulzu, ale odvíjí se od typu excitabilní buňky, jak znázorňuje Obrázek 3 [2].



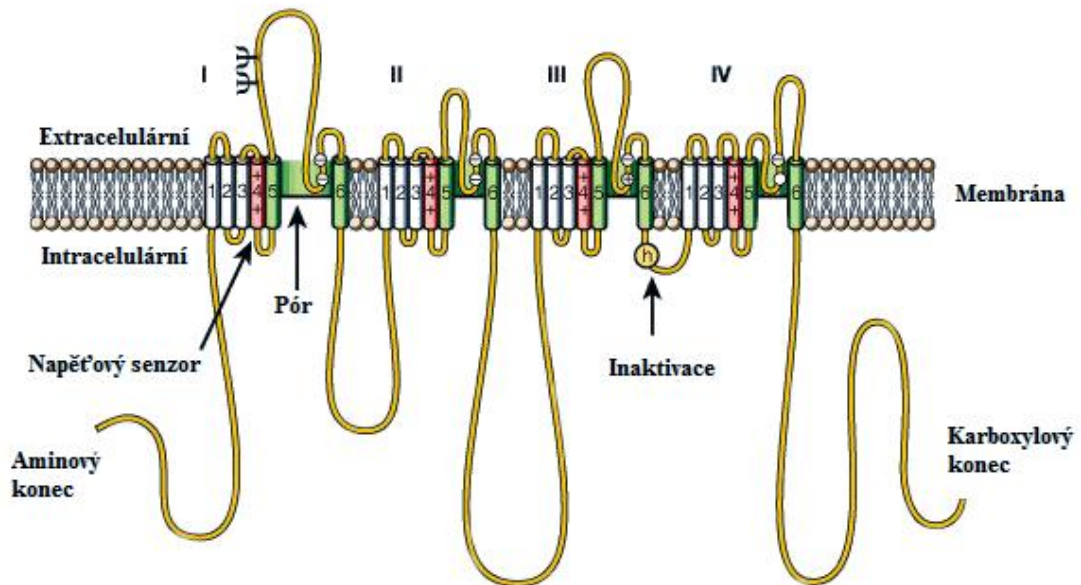
Obrázek 3: Průběh akčního napětí nervové a srdeční buňky [32]

1.3 Sodíkové iontové kanály

Prvními objevenými členy ze skupiny iontových kanálů byly sodíkové kanály. Jedná se o integrální membránové proteiny tvořící iontové kanály, které vedou sodíkové ionty skrz buněčnou membránu. V excitabilních buňkách, jako jsou neurony, myocyty a určité typy gliových buněk, zodpovídají za rostoucí fázi akčního potenciálu. Jejich klasifikace spočívá v triggeru otevírajícím kanál, jímž může být změna napětí ("napětově závislé sodíkové kanály" či "NaV kanály") nebo vazba ligandu na kanál ("ligandově řízené sodíkové kanály") [3]. Pokud nastane depolarizace membrány pouze pár milivoltů, sodíkové kanály se aktivují a inaktivují během několika milisekund [34].

Napětově závislý sodíkový kanál je velký komplex složený z α podjednotky a jedné nebo více menších β podjednotek (Obrázek 4). Funkčně charakterizováno je devět typů α podjednotek ($\text{Na}_v1.1\text{-Na}_v1.9$). Primární sekvence predikuje, že se α podjednotka skládá ze čtyř navzájem podobných domén (I-IV), které obsahují šest α -helikálních transmembránových segmentů (S1-S6), přičemž napětový senzor se nachází na segmentu S4. Napětovou citlivost tohoto segmentu způsobuje aminokyselina s kladným nábojem na každé třetí pozici. Při stimulaci změnou transmembránového

napětí se segment S4 pohybuje směrem k extracelulární straně buněčné membrány, což umožňuje propustnost kanálu vůči iontům [34].



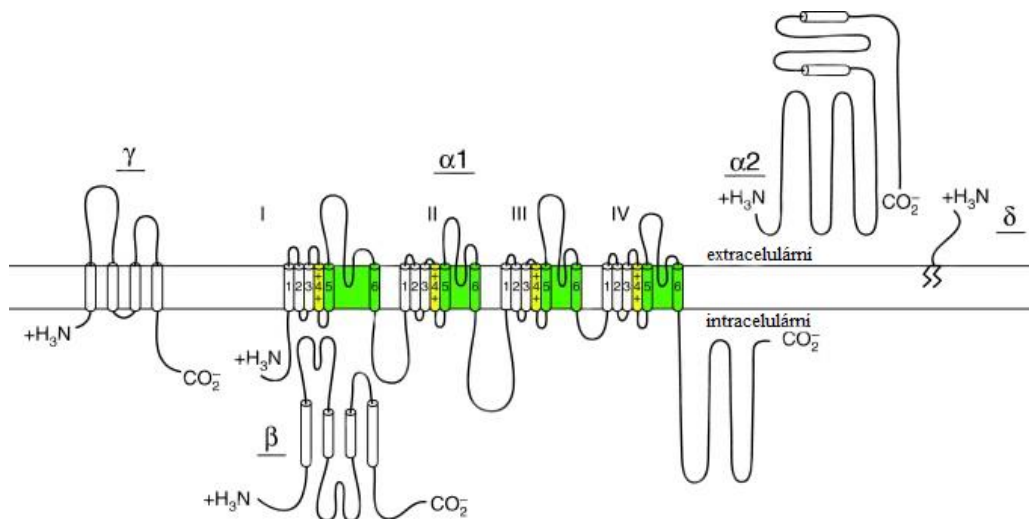
Obrázek 4: Struktura α podjednotky sodíkového kanálu [35]

1.4 Vápníkové iontové kanály

Vápníkové iontové kanály jsou proteiny plasmatické membrány obsahující selektivní pór pro ionty Ca^{2+} a otevírají se při depolarizaci membránového napětí. Tok vápníkových iontů vyvolává depolarizaci nervových, svalových a dalších excitabilních i neexcitabilních buněk. Stejně jako u sodíkových kanálů, je otevření vápníkových iontových kanálů podmíněno změnou napětí nebo navázáním ligandu. Hlavní funkce zprostředkované vápníkovými kanály zahrnují kontrakci svalů, uvolnění neurotransmiterů či hormonů neurony a neuroendokrinními buňkami a kontrolu genové transkripce. Mnoho lidských nemocí, zejména v srdečním a nervovém systému (včetně bolesti, záchvatů, hypertenze a migrény), způsobují určité dysfunkce vápníkových kanálů [36].

Strukturu vápníkového kanálu tvoří podjednotky $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ and δ , které jsou vyznačeny na Obrázek 5. $\alpha 1$ je protein o délce 2000 aminokyselinových zbytků a predikuje transmembránovou strukturu - stručně popsanou v kapitole 1.3 u sodíkových iontových kanálů. Na základě aminokyselinové sekvence $\alpha 1$ podjednotky se napětově závislé vápníkové kanály dělí do podskupin: L-typ ($\text{Cav}1.1$ - $\text{Cav}1.4$), P-typ ($\text{Cav}2.1$), N-typ ($\text{Cav}2.2$), R-typ ($\text{Cav}2.3$) a T-typ ($\text{Cav}3.1$ - $\text{Cav}3.3$). Intracelulární

β podjednotka predikuje α -helix, který neformuje transmembránový segment, zatímco γ podjednotka je glykoprotein se čtyřmi transmembránovými segmenty. V případě $\alpha 2$ podjednotky studie naznačují, že jde o extracelulární membránový glykoprotein, připojený k membráně prostřednictvím disulfidové vazby k podjednotce δ , která je kódována 3'-koncem kódující sekvence stejného genu jako $\alpha 2$ [37].



Obrázek 5: Struktura podjednotek vápníkového iontového kanálu [37]

1.5 Draslíkové iontové kanály

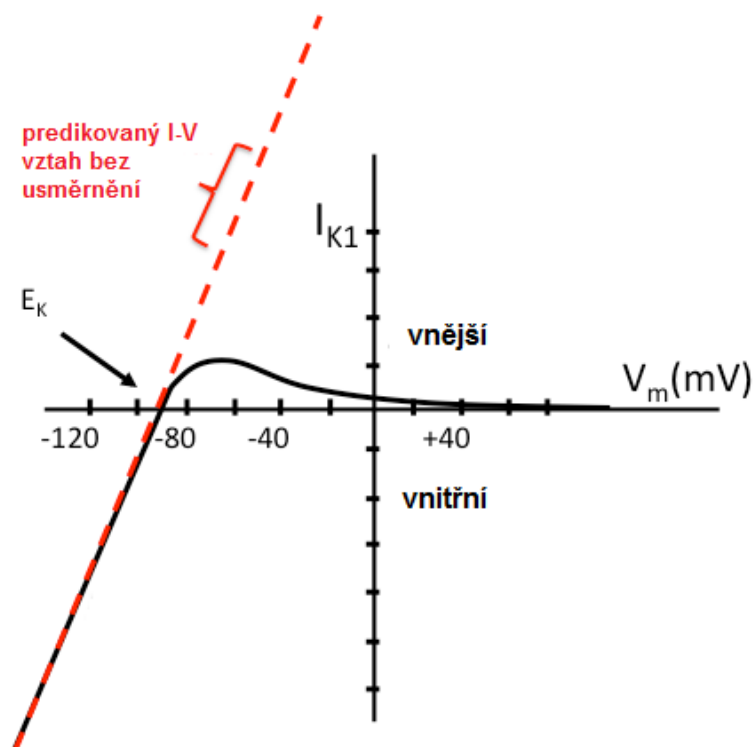
Draslíkové iontové kanály se vyskytují ve všech eukaryotických i prokaryotických buňkách a jsou hlavním rysem buněčného života. Tak jako ostatní iontové kanály se i draslíkové nachází v membráně buněk, kde řídí transport K^+ iontů směrem z buňky a do buňky. Zásadní roli hrají jak v excitabilních, tak neexcitabilních buňkách [30] [53].

K^+ kanály tvoří transmembránové šroubovice (TM) procházející lipidovou dvouvrstvou buněčné membrány. Na základě struktury a funkce jsou kategorizovány do tří hlavních tříd: napětově závislé (K_v , 6TM), prosakovací (K_2P , 4TM) a vnitřně usměrňující (K_{ir} , 2TM). Nezávisle na tom, do které třídy patří, se skládají z oblastí tvořící póry a regulační oblasti. Póry tvořící oblast zodpovídá za transport K^+ iontů a její struktura se shoduje u všech typů draslíkových kanálů. Regulační oblast je citlivá na různé podněty a mezi jednotlivými třídami se její struktura liší [30].

Vnitřně usměrňující draslíkové kanály K_{ir} mají různé fyziologické funkce závislé na jejich typu a umístění. Mezi K_{ir} kanály se řadí sedm podskupin, které mohou být klasifikovány do čtyř funkčních skupin: klasické K_{ir} kanály ($K_{ir2.x}$) - konstitutivně

aktivní, K_{ir} kanály řízené G proteiny ($K_{ir3.x}$)– vazba G proteinu s receptory, draslíkové kanály závislé na ATP ($K_{ir6.x}$)– úzce spjaté s buněčným metabolismem a K^+ transportní kanály ($K_{ir1.x}$, $K_{ir4.x}$, $K_{ir5.x}$, $K_{ir7.x}$) [29].

Poprvé byly vnitřně usměrňující draslíkové proudy identifikovány v kosterní svalovině. Původně jim náleželo označení „anomální“, protože jejich vodivost roste za hyperpolarizace a klesá za depolarizace, což vyvrací Nernstovu rovnici. Za fyziologických podmínek K_{ir} kanály generují mohutnou K^+ vodivost o záporném potenciálu E_K , ale dovolují jen malý proudový tok o kladném potenciálu E_K . Přirozená napěťová nezávislost umožňuje K_{ir} kanálům zastávat klíčovou roli v udržování klidového membránového potenciálu (E_{res}) a v regulaci doby trvání akčního potenciálu u elektricky excitabilních buněk (např. srdeční svaloviny). Obrázek 6 zobrazuje experimentálně získanou proudově-napěťovou závislost I_{K1} srdeční buňky, na které se podílí kanály ze skupiny $K_{ir2.x}$ [28].

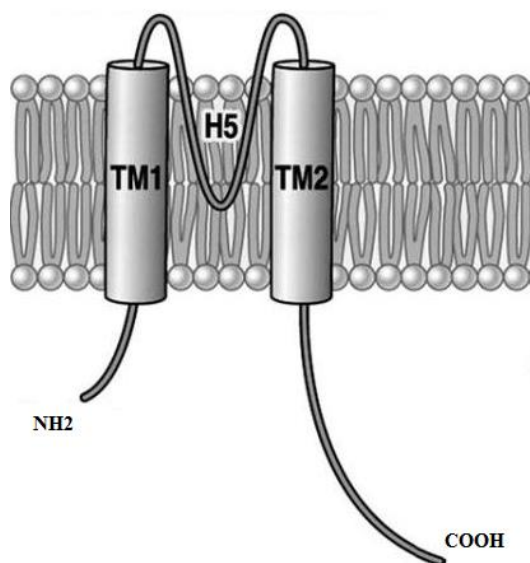


Obrázek 6: Proudově - napěťová závislost I_{K1} , tvořená skupinou kanálů $K_{ir2.x}$ v myocyty [27]

1.5.1 $K_{ir}2.1$

Protein $K_{ir}2.1$, kódovaný genem *KCNJ2*, náleží do rodiny vnitřně usměrňujících draslíkových kanálů K_{ir} a nachází se v kosterních svalech, cévách, neuronech a srdeční tkáni. Tento typ kanálů umožňuje K^+ iontům proudit jednodušeji do buňky než z buňky ven, proto měřený proud směřuje přednostně směrem dovnitř. Základní architektura K_{ir} kanálů (viz Obrázek 7) náleží celé $K_{ir}2.x$ skupině. Vnitřní usměrňování zapříčiňují intracelulární ionty jako Mg^{2+} a polyaminy. Studie mutovaných kanálů $K_{ir}2.x$ odhalily, že podjednotky obsahují více než jedno vazebné místo pro Mg^{2+} a polyaminy [29].

Dysfunkcí kanálu $K_{ir}2.1$ vzniká tzv. Andersen-Tawil syndrom (ATS) projevující se komorovými arytmiemi, dysmorfními rysy a periodickými paralýzami. Většina ATS pacientů má mutaci v genu *KCNJ2* způsobující poruchu srdeční repolarizace, jelikož proud I_{K1} , na kterém se podílí i $K_{ir}2.1$, poskytuje repolarizační proud během nejterminálnější repolarizační fáze a zajišťuje primární vodivost řídicí potenciál diastolické membrány [19].



Obrázek 7: Primární struktura podjednotek K_{ir} kanálu. TM1 a TM2 - transmembránové oblasti, H5 - pór tvořící oblast, NH_2 a $COOH$ - cytosolové konce [29]

2 BUNĚČNÉ KULTURY

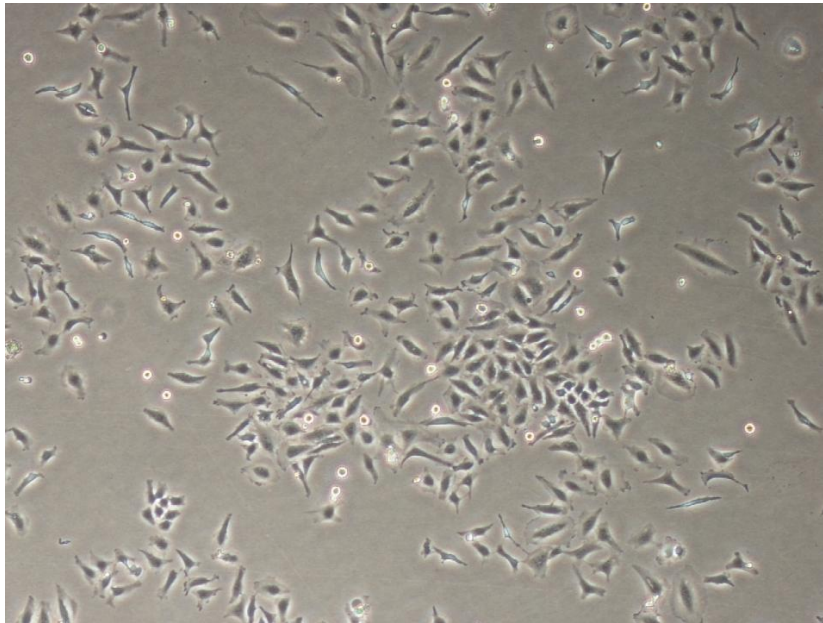
Pro studium chování buněk se využívalo tkáňových kultur již počátkem 20. let. Zprvu vědci prováděli studie na fragmentech tkání, postupně pak vyvinuli techniky ke sledování chování jednotlivých buněk. V dnešní době patří buněčné kultury mezi základní techniky užívané nejen ve výzkumech coby pokusný model, ale také ve výrobě např. dalších bílkovinných molekul. Hlavní výhodou experimentů na buněčných kulturách oproti jiným biologickým modelům je dobrá charakterizace daného buněčného typu a nemožnost interakcí s jinými tkáněmi či orgány. Naopak se musí také počítat s jistými omezeními limitujícími použití kultur. V důsledku pěstování buněk *in vitro* se může měnit jejich fenotyp, jelikož nedochází k výměně látek a informací s okolním prostředím tak, jako je tomu *in vivo*. To znamená, že vlastnosti kultivovaných buněk se mohou lišit od vlastností buněk stejného typu v organismu [5] [6].

Založení tzv. primokultury je realizováno izolací určitého typu buněk zvířecích, lidských či rostlinných. Buňky mohou být izolovány z dospělého jedince či embrya. Obecně se snáze pěstují buněčné kultury embryonálních buněk a výhodu také mají v delší životnosti. Pro izolaci buněk bylo vyvinuto několik metod. Některé z nich jsou založené na mechanické disociaci tkáně a enzymatickém narušení mezibuněčné matrix, zapříčiněném působením látek jako je např. trypsin nebo kolagenáza za přítomnosti EDTA. Tímto způsobem získáme kromě požadovaného typu buněk i příměs dalších elementů. Jednou z možností, jak zajistit čistotu buněčné kultury, je užití kultivačních podmínek, které jsou příznivé pouze pro požadovaný buněčný typ. Jinou možností separace je schopnost buněk adherovat na určité typy povrchů různou rychlostí. Následně se získané buňky ve vhodném prostředí (tzn. fyziologicky podobnému jejich přirozenému prostředí) namnoží a naředěné se přenesou do nových kultivačních nádob. Tento krok se označuje jako pasáž. Pasáží vzniká subkultura, která se pěstuje, dokud nezískáme potřebné množství materiálu pro experiment [5] [6].

Buněčné linie pocházející z primokultur se mohou dělit jen po určitou dobu, která je dána geneticky. Buňky tedy postupně ztrácí schopnost dělení, jelikož podléhají procesu stárnutí a počet pasáží je touto skutečností limitován. Transformací může vzniknout tzv. kontinuální buněčná linie, mající heteroploidní počet chromozomů a neomezenou dobu dělení [5] [6]. Kontinuálních buněčných linií se často využívá při experimentech, které si žádají více opakování, neboť jsou například složité na provedení. Jednotlivé podkapitoly se věnují buněčným liniím obvykle používaným pro patch-clamp techniku.

2.1 Buněčná linie HeLa

Buněčná linie HeLa byla založena v roce 1951 z biopsie cervikálního nádoru pacientky Henrietty Lacks, dělnické afroamerické ženy žijící poblíž Baltimore, od jejíhož jména dostala linie svůj název. Buněčný biolog George Otto Gey izoloval jednu specifickou buňku, kterou dále množil a vyvinul buněčnou linii. Tyto buňky se staly prvními lidskými buňkami, které v laboratorních podmínkách dobře rostly a přispěly například k vývoji vakcíny proti obrně nebo k objevu lidské telomerázy [41] [42].



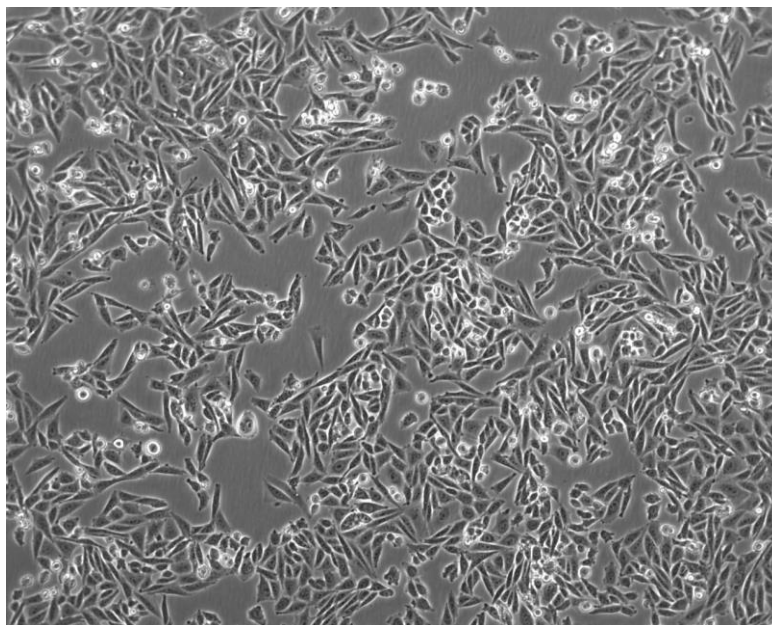
Obrázek 8: Buněčná linie HeLa [43]

HeLa buňky jsou v laboratořích využívány při nejrůznějších testech a experimentech. Díky dobré kultivovatelnosti vědci mohou studovat účinky určitých onemocnění na buňky a vyvíjet tak léky a vakcíny [44].

2.2 Buněčná linie CHO

Buňky CHO (Chinese hamster ovary), derivované z epitelálních buněk vaječníku čínského křečka, byly využívány už v roce 1919 pro typizaci pneumokoků. Do kultivačních misek tyto buňky poprvé umístil Dr. Theodore T. Puck z Coloradské univerzity v roce 1957 a zjistil, že mají velice dobrou životaschopnost a rychlý růst. Na základě tohoto nového poznatku se CHO buňky začaly hojně používat v laboratorních studiích, které nakonec vedly k jejich výběru jako hostitelské buněčné linie pro tvorbu rekombinantních proteinů [38].

Pro různé účely bylo vyvinuto několik variant této buněčné linie. Mezi nejčastěji používané se řadí adherentní buněčná linie CHO-K1, která vznikla jako subklon původní buněčné linie CHO. Z buněk CHO-K1 byla několika mutagenézemi odvozena buněčná linie CHO-DG44, nesoucí dvojitou delecí pro gen dihydrofolát reduktázy (DHFR) umístěný na druhém chromozomu. Buňky CHO-DG44 jsou užitečné pro genetickou manipulaci a široce se používají pro stabilní produkci rekombinačních proteinů [40].



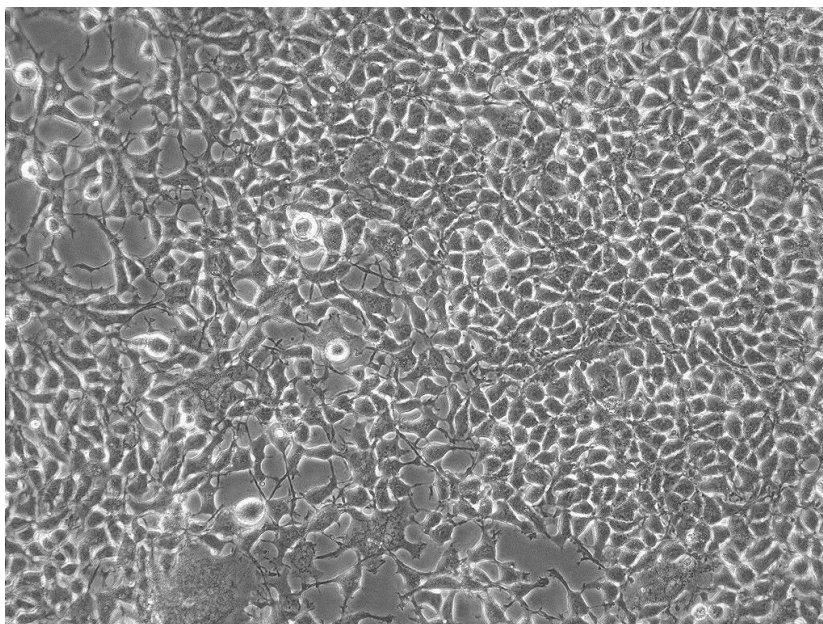
Obrázek 9: Buněčná linie CHO [39]

2.3 Buněčná linie HEK293

HEK (human embryonic kidney) 293 je buněčná linie pocházející z buněk ledvinového epitelu lidského embrya. Buňky poprvé kultivoval v roce 1970 na univerzitě v Holandsku vědec Alex van der Eb. O 7 let později buněčnou linii transformoval Frank Graham vpravením virové DNA adenoviru 5. Přibližně 4,3 kb z virového genomu se začlenilo do lidského 19. chromozomu, čímž došlo k imortalizaci, neboli možnosti nekonečného dělení buněk, této buněčné linie. S Grahamovou transformací se pojí označení 293, jež značí 293. transformační pokus, ze kterého linie vzešla [8].

Buňky HEK293 mají širokou oblast použití. Využívají se k transfekčním experimentům, výrobě rekombinantní DNA či genetických produktů. Výhodou je jejich snadná kultivace, transfekovatelnost a schopnost rychlého množení. Vzhledem k poměrně jednoduché transfekci, buňky nejsou využívány pro studium vlastností

či chování buněk samotných, ale např. pro studium účinku léků na membránové kanály nebo interakcí dvou proteinů [8] [25].



Obrázek 10: Buněčná linie HEK293 [7]

Využitelnost buněčné linie HEK293 byla ještě zvýšena odvozením několika variant (HEK293A, HEK293E, HEK293S ...), které vznikly začleněním určitého genu do genomu buněk. Tímto došlo ke snazší kultivaci, rychlejšímu růstu a v neposlední řadě ke zlepšení účinnosti transfekce [9] [24].

Linie HEK293T, využitá v této práci, patří k často kultivovaným za účelem exprese proteinů a produkce rekombinantních retrovirů. Vznikla stabilní transfekcí plasmidem, nesoucím mutantní verzi velkého T antigenu SV40 (onkoprotein). Díky expresi velkého T antigenu SV40 mohou být transfekované plasmidové DNA, mající počáteční místo replikace SV40, replikovány bez úbytku tohoto plasmidu. Výsledkem popsané episomální replikace je značné zvýšení produkce rekombinací proteinů [9] [24].

2.3.1 Podmínky kultivace buněk HEK293

Buňkám, pěstovaným *in vitro*, je třeba zajistit optimální podmínky pro přežití a rozmnožování. První důležitý bod zastává povrch kultivační nádoby. Protože buňky HEK293 patří mezi kultury adherentní, musí být zvolen vhodný kultivační povrch, na kterém buňky rostou. Kultivační nádoby bývají často z polystyrenu s hydrofilním povrchem. V některých případech je zapotřebí adhezi povrchu zvýšit, na což se používá

např. kolagen, želatina, fibronektin a další adhezní faktory. Pomocí kolagenu se mohou vytvořit i tzv. trojrozměrné struktury, do kterých některé buněčné kultury vrůstají [5].

Extracelulární tekutinu napodobuje kultivační médium bohaté na živiny. Mezi potřebné živiny patří bílkoviny, lipidy, glukóza, vitamíny, stopové prvky, růstové faktory, anorganické soli a pufrů. Do média se také přidává antibiotikum pro zamezení bakteriální kontaminace. Buňky přirozeně odebírají živiny z kultivačního média, proto musí být často měněno [5].

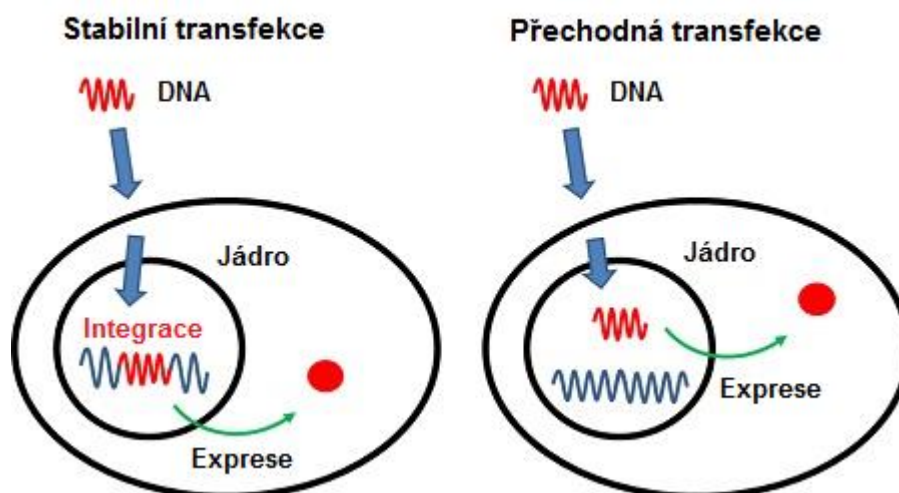
Kultivace buněk HEK293 probíhá v inkubátorech při teplotě 37 °C, což je přibližně teplota přirozeného prostředí buněk, tedy lidského organismu. Inkubátor udržuje relativní vlhkost atmosféry na hodnotě 90%, aby nedošlo k odpaření média, změně koncentrace látek a tím pádem k usmrcení buněk. Důležitá je také zvýšená koncentrace CO₂ v atmosféře inkubátoru, protože se podílí na udržení pH média a přesněji odpovídá množství oxidu uhličitého v extracelulární tekutině [5].

3 TRANSFEKCE

Přenos genetické informace do hostitelské buňky probíhá prostřednictvím vektorů. Vektorem se myslí molekula DNA či RNA používaná nejčastěji v podobě plasmidů a virů. Dle typu cílové buňky se vpravení vektoru nazývá *transformace* pro bakteriální buňky, *transdukce* pro viry a pro eukaryotické hostitelské buňky se užívá název *transfekce*. Transfekcí z eukaryotických buněk vznikají geneticky modifikované buňky, využívající se ve studiu funkce genů či genových produktů. V této práci je metoda transfekce využita pro vpravení plasmidu Kir2.1. do buněk HEK293T, aby mohl být tento iontový kanál následně charakterizován [10].

Transfekci lze provádět *in vitro*, tzn. v laboratorních podmínkách i *in vivo*, kdy je cizorodá genetická informace přenesena do živého organismu. Transfekce *in vivo* pomáhá při léčbě některých nemocí nebo alespoň tlumí jejich symptomy [10].

Podle účelu, za jakým chceme přenos nukleové kyseliny uskutečnit, volíme transfekci stabilní nebo přechodnou. Na Obrázek 11 je patrný rozdíl mezi oběma druhy. V případě stabilní transfekce je vpravená genetická informace začleněna do genomu hostitelské buňky, čímž vzniká stabilní buněčná linie replikující se s vloženým genem. Naopak při přechodné (transientní) transfekci nedochází k integraci vloženého genetického materiálu do jaderného genomu buňky, proto se při dělení buněk vpravená DNA nepředává z mateřské buňky na dceřinou. Tímto způsobem nelze vytvořit stabilní buněčnou linii, která by neomezeně produkovala daný protein. Výhoda přechodné transfekce spočívá v rychlejší produkci rekombinantních proteinů, které se začnou tvořit ihned po expresi genu, ovšem pouze po určitý časový úsek (než dojde k dělení buněk) [12].



Obrázek 11: Schéma stabilní a přechodné transfekce [33]

Transfekci dále klasifikujeme do třech základních skupin dle metody provedení na biologickou, chemickou a fyzikální. Při výběru metody se musí brát v potaz účel transfekce i typ použité buněčné linie. Optimálně by námi zvolená transfekční metoda měla mít vysokou účinnost, nízkou toxicitu, snadnou reprodukovatelnost a co nejmenší mírou ovlivňovat přirozenou fyziologii buněk [12].

3.1 Biologické metody transfekce

Mezi biologické metody se řadí viry zprostředkovaná transfekce, známá pod pojmem transdukce, hojně využívána v klinických výzkumech. Vysoká účinnost virální transfekce je dána díky snadno udržitelné expresi transgenů, způsobené přirozenou schopností virů integrovat do genomu hostitele [12].

Tato metoda má jisté nevýhody, kvůli kterým bylo vynaloženo úsilí na vývoj metod transfekce bez užití virů. Hlavní nevýhodou je imunogenicitu, vyvolávající nežádoucí imunitní odpověď a cytotoxicita, patřící k imunitní reakci, při níž dochází k poškození až likvidaci buněk. Na zavedení virového vektoru může buňka odpovědět zánětlivou reakcí nebo inzerční mutací genomu, protože integrace virového vektoru probíhá náhodně. Vlivem mutace se mohou aktivovat onkogeny a narušit funkce supresorových nádorových genů. Následkem takto vyvolaných změn se snižuje viabilita buněk [12].

3.2 Fyzikální metody transfekce

Fyzikální metody se řadí mezi nejnovější transfekční metody. Zahrnují využití různých fyzikálních nástrojů, kterými jsou mikroinjekce, optické transfekce (využití laserů), sonoporace, elektroporace, částicové zbraně („gene gun“). Fyzikální transfekce nezávisí na konkrétních chemických nebo biologických vlastnostech buňky, proto se těmito metodami úspěšně transfekují buňky obtížně transfekovatelné jinými metodami [14].

Pokud máme k dispozici omezený počet buněk, používají se pro přenos genu mikroinjekce. Výhodou této metody je jistota, že buňka, která je předmětem zájmu, je skutečně transfekována. Jedná se o invazivní metodu, kdy je cizorodá DNA vstříknuta přímo do cytoplazmy či jádra buňky. V praxi má tato metoda využití při asistované reprodukci [14].

Zajímavý je koncept laserem zprostředkované transfekce. Laser může být užitečný pro přímou perforaci buněčné membrány nebo pro techniku využívající optické vlnovodiče [14].

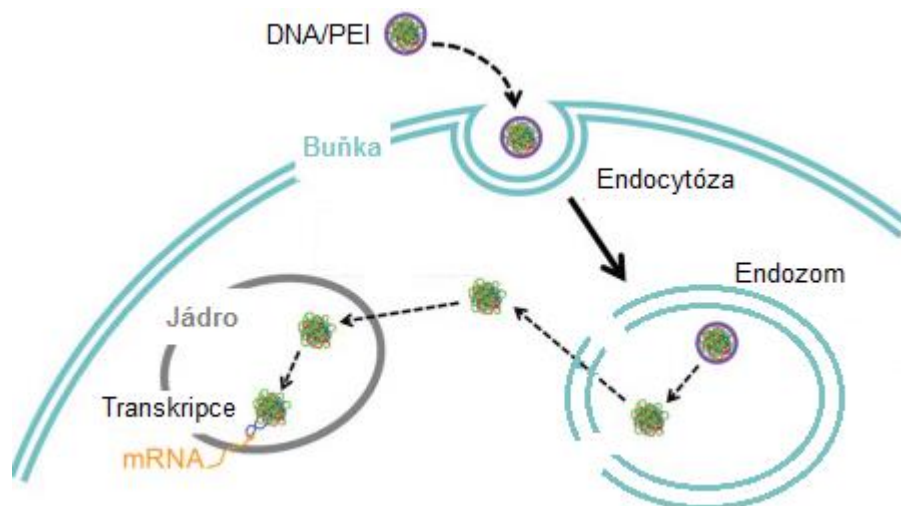
Nejčastěji vyhledávanou metodou fyzikální transfekce je elektroporace, použitelná na všechny typy buněk pro transfekci stabilní i přechodnou. Princip elektroporace spočívá v uvedení buněčných membrán do vysokonapětového elektrického pole (pomocí krátkých intenzivních elektrických impulzů), které vedou k jejich dočasnému rozpadu a vzniku pórů. Póry umožní prostup přenášené DNA do vnitřního prostředí buňky a po určité době se opět uzavřou. Doba, po kterou jsou póry otevřeny, se prodlužuje zajištěním teploty 0°C [15].

3.3 Chemické metody transfekce

Chemické metody byly jako první použity k zavedení genů do savčích buněk a v současnosti patří mezi nejpoužívanější. Tyto transfekční techniky využívají nosiče molekul k překonání bariéry buněčné membrány. Jak by název metody mohl mylně napovídat, mezi nosičem a nukleovou kyselinou nedochází k žádné chemické reakci. Princip spočívá v interakci záporně nabitých nukleových kyselin s kladně nabitými nosiči, čímž vznikne kladný komplex umožňující styk se záporně nabitou membránou buněk. Endocytózou dojde k proniknutí genu do buňky a následnému uvolnění do cytoplazmy [11][12].

Jako nosič molekul se běžně používá kationový polymer, fosforečnan vápenatý nebo kationový lipid. Často využívaným transfekčním činidlem je kationový lipid lipofektamin obsahující lipidové podjednotky, které ve vodném prostředí vytváří liposomy. Tyto formují spolu s vnášenou DNA kladný komplex, který může splynout se záporným nábojem plazmatické membrány a tím umožnit uvolnění nukleové kyseliny do cytoplazmy [45].

Dalším často využívaným transfekčním reagentem je polymer PEI (polyethylenimin), který dosahuje více jak 50% pravděpodobnosti účinnosti. Proces této metody transfekce znázorňuje Obrázek 12. Interakcí PEI s vnášenou DNA vznikne komplex, který je přitahován k buněčné membráně. DNA komplex je endocytózou vnesen do intracelulárního prostředí buňky, kde endozom v důsledku kladného náboje podléhá lýze, čímž se uvolní přenášená DNA do cytoplazmy, prostoupí do jádra a následně se začlení do jaderného genomu buňky. PEI je pro transfekci často používáno i díky ceně, která není vysoká [12][52].



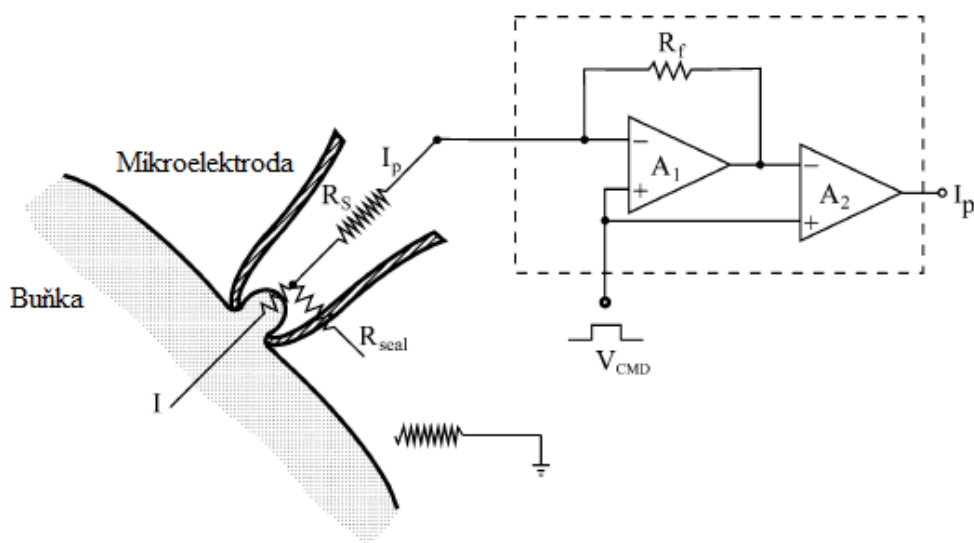
Obrázek 12: Transfekce pomocí PEI [13]

Chemické metody transfekce mají poměrně nízkou cytotoxicitu a nedochází k mutagenězi, což je jejich výhodou. Úspěšnost transfekce závisí na typu buněčné linie a dalších faktorech, jako jsou např. pH roztoku či stav buněčné membrány. Z důvodu těchto transfekci ovlivňujících faktorů přináší chemická metoda nižší transfekční úspěšnost než viry zprostředkovaná transfekce [11].

4 PATCH-CLAMP

Technika *patch-clamp* dnes patří k základním elektrofyzilogickým metodám a využívá se nejen k měření membránového potenciálu buněk. V překladu se pro ni vžil pojem metoda terčíkového zámku. Tento revoluční nástroj vymysleli Erwin Neher a Bert Sakmann v roce 1976 a znamenal velký pokrok pro oblast fyziologického výzkumu na buněčné a molekulární úrovni. Na základě vynálezu této techniky dostali v roce 1991 Neher a Sakman Nobelovu cenu. Původně byla metoda navržena tak, aby detekovala aktivitu jednoho nebo jen několika proteinů iontových kanálů v buněčné membráně jako iontové proudové toky napříč proteiny. Následně se zřízením techniky tzv. *giga-seal*, mohla být tato metoda široce aplikována na různé typy buněk [1] [23].

Na Obrázek 13 se nachází schéma principu *patch-clamp* techniky, kde R_s představuje sériový odpor (odpor mikroelektrody) sériově spojený s membránovým odporem a R_{seal} značí odpor vzniklý dosažením *seal*, který se řádově pohybuje v desítkách až stovkách $G\Omega$. Hodnota R_s odpovídá rozmezí 1-5 $M\Omega$. Výstup operačního zesilovače A1 aplikuje vnucené napětí V_{CMD} a skrz operační zesilovač A2 je odečten pokles napětí detekující proud I_p [1].



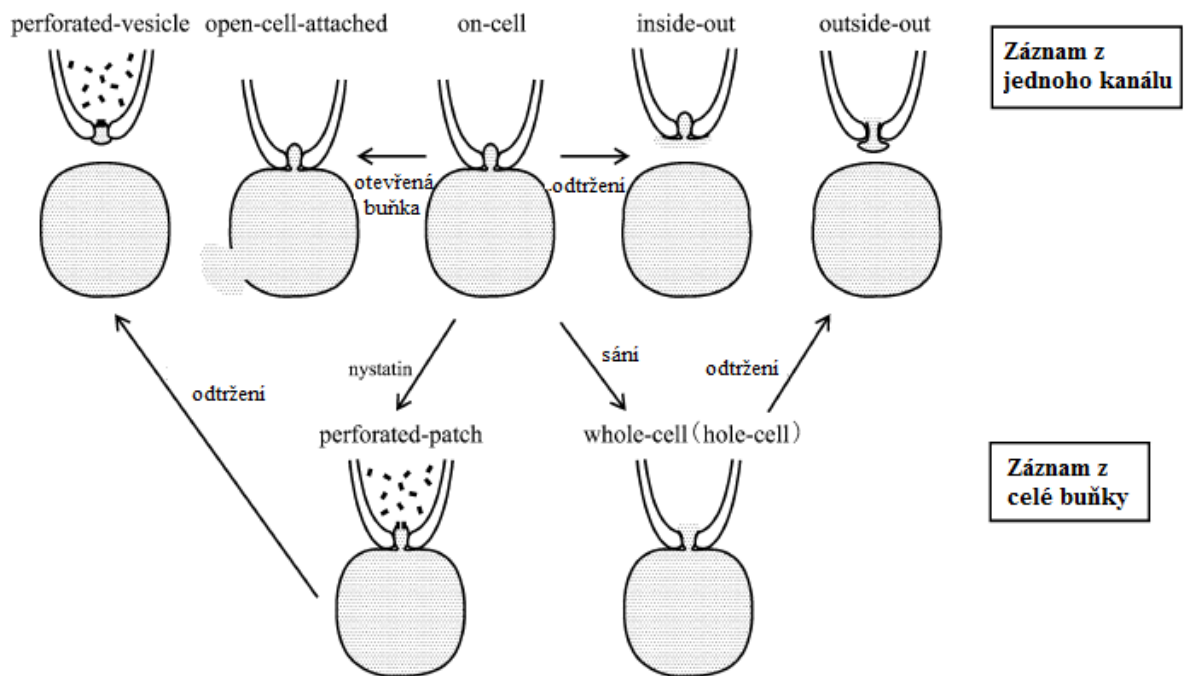
Obrázek 13: Princip patch-clamp techniky [1]

Princip *patch-clamp* techniky spočívá v doteku špičky skleněné mikroelektrody a buněčné membrány. Těsným spojením, pomocí lehkého podtlaku, vzniká mezi referenční a měřicí elektrodou elektrický odpor v jednotkách $G\Omega$, tzv. *giga-seal* (pouto). Oblast buněčné membrány ve vnitřním hrotu mikroelektrody je, díky vytvoření *seal*, elektricky izolovaná od vnějšího roztoku a tím mohou být zaznamenávány proudy tekoucí do měřeného úseku membrány. Úroveň velikosti iontových proudů se pohybuje

v řádu jednotek pikoampérů a jejich detekce je umožněna prostřednictvím zesilovače (I-V převodník složený z několika operačních zesilovačů) [1].

4.1 Varianty patch-clamp techniky

První varianta techniky *patch-clamp* byla navržena pro zaznamenání proudu z jednoho kanálu a jedná se o režim *cell-attached* později doplněn módem *inside-out* a *outside-out*. Následně byly vymyšleny módy *open-cell-attached* a *perforated-vesicle*. Pro záznam proudu procházejícího celou membránou jedné buňky se používá konvenční *whole-cell* režim a *perforated-patch* režim. Ilustrace jednotlivých módů se nachází na Obrázek 14 [1].



Obrázek 14: Varianty patch-clamp techniky [1]

Jak již bylo výše zmíněno, režim *cell-attached* zaznamenává proudy pocházející z jednoho kanálu za podmínky vzniku *giga-seal* (na některých typech zesilovačů má tento režim označení „*on cell*“). Mikroelektroda je tedy dokonale přisátá k buněčné membráně, ale nedochází k jejímu protržení ani oddělení. Výhoda *cell-attached* režimu spočívá ve sledování činnosti kanálu s minimálním narušením intracelulárního prostředí, což je zároveň i jistou nevýhodou. Intracelulární podmínky nemohou být přímo kontrolovány a aktuální transmembránové napětí pro nás zůstává neznámé, protože v důsledku minimálního kontaktu s intracelulárním prostředím buňky, neexistují informace o potenciálu intracelulární membrány [1][23].

Pokud se při tomto módu elektroda pozvedne nebo sklouzne do strany, izolovaný úsek membrány může být vyjmut z buňky, čímž vzniká *inside-out* mód. Při *inside-out* módu jsou podmínky na intracelulární straně úseku membrány řízeny perfúzí z koupelového roztoku a aktivita jednoho iontového kanálu může být pozorována nezávisle na buněčné aktivitě. Další variantou *cell-attached* režimu je *open-cell-attached*, kdy mechanickým roztržením části buněčné membrány vzdálenější od místa doteku mikroelektrody vznikne díra. Během jednokanálového nahrávání pak intracelulární prostředí řídí perfúze skrz díru v buněčné membráně [1][23].

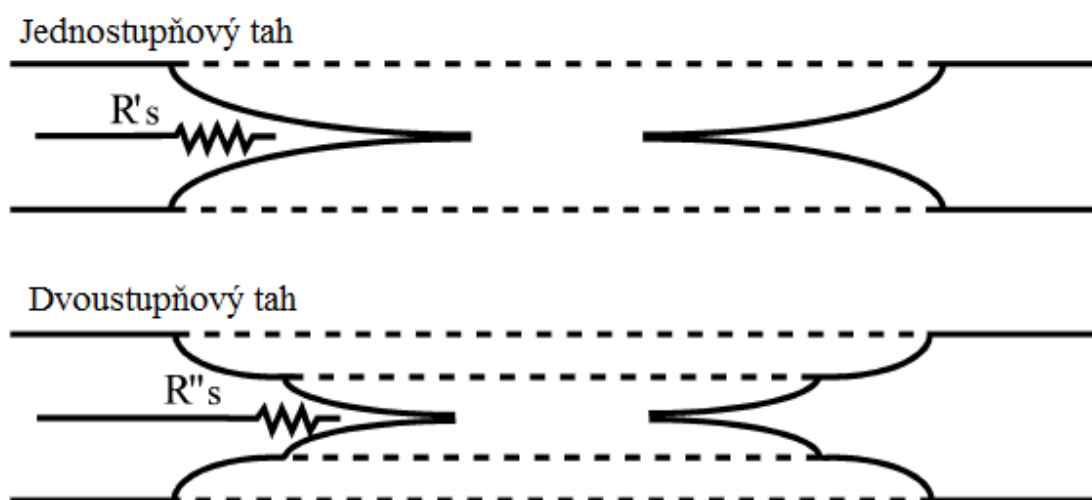
Měření proudu pocházejícího z celé buňky je realizováno v režimu *whole-cell*. Po vytvoření *cell-attached* se krátkým a silným nasáním protrhne buněčná membrána, jejíž konce vlivem podtlaku přilnou ke stěně mikroelektrody. Intracelulární prostředí se tak nachází v přímém kontaktu s pipetovým (intracelulárním) roztokem. Následně metodou *voltage-clamp* (vnucené napětí) měříme proudové odezvy nebo jinou metodou zvanou *current-clamp* (vnucený proud) změny membránového potenciálu. Když se odpojí při *whole-cell* režimu elektroda od buněčné membrány, odtrhne se část membrány, která se spojí v jeden úsek a čelí svou intracelulární stranou pipetovému roztoku. Tento způsob se nazývá *outside-out* mód a získáme opět záznam z jednoho kanálu [1][23].

Další možnost, jak získat záznam z celé buňky, spočívá v modifikaci *whole-cell* režimu tzv. *perforated-patch*. Rozdíl spočívá v tom, že nedojde k protržení buněčné membrány, ale iontovou kontinuitu zajišťuje určité činidlo (tvořící vodivé póry), dodané do pipetového roztoku. Opatrným oddělením elektrody od buňky, je možné na špičce elektrody vytvořit membránový váček obsahující některé buněčné organely (např. mitochondrie). Při tomto režimu, *perforated-vesicle*, se detekuje proud z jednoho kanálu za téměř fyziologických podmínek [1].

4.2 Měřicí mikroelektrody

Seal buněčné membrány a skleněné mikroelektrody mají velmi vysoký odpor, zapříčiněný hydrofobní chemickou interakcí mezi nimi. Už jen z tohoto důvodu je důležité chemické složení skla, ze kterého mikroelektrody vznikly, jelikož může do určité míry ovlivnit schopnost tvořit *seal*. Při výběru elektrodového skla se musí brát v potaz schopnost vytvářet špičky s vhodnou velikostí a kuželovitým tvarem, míra tlumení šumu pozadí a fakt, že je sklo dopováno těžkými kovy (pro snížení tavného bodu), které se mohou uvolňovat do pipetového roztoku a tím modifikovat vlastnosti membránového kanálu [23].

Obvykle mikroelektrody pochází z borosilikátového skla „pyrex“, mající elektrické vlastnosti tlumící nechtěný šum pozadí. Tvoří se v tahači elektrod taháním mikrokapilár za působení žhaveného platinového drátku. Z jedné mikrokapiláry vzniknou dvě totožné mikroelektrody, jejichž hroty musí být po odtržení *polishovány* (lehké otavení), aby ztratily ostré okraje. Různých vlastností mikroelektrod lze dosáhnout vhodnou kombinací stupně teploty žhavení, velikostí a časového působení tahu. V nejužší části mikroelektrody je soustředěn elektrický odpor. Pomocí vícestupňového tahání dojde ke zkrácení úzké části mikroelektrody, což zajistí co nejnižší hodnotu odporu (viz Obrázek 15) [16][17].



Obrázek 15: Rozdílný tvar špičky a velikost odporu mikroelektrody při jednostupňovém a dvoustupňovém tahání; $R''s > R's$ [1]

Některé studie ukazují, že typ použitého skla mikroelektrody může mít vliv na vlastnosti naměřeného signálu z membránového kanálu. Například bylo dokázáno, že sodné nebo potašové sklo (potaš je starší označení pro uhličitán draselný) způsobují rychlejší inaktivaci draselného kanálu, než je tomu při užití borosilikátového skla. Při výběru skla mikroelektrody je tedy třeba vyhnout se takovým typům skel, která prokázala ovlivnění vlastností měřeného kanálu [23] [17].

Mikroelektrody určené pro *patch-clamp* se plní solným roztokem, napodobujícím iontové složení fyziologických tekutin. K samotnému naplnění slouží injekční stříkačka s dlouhým, tenkým plnicím vláknem, které se umísťuje co nejhluběji do špičky mikroelektrody. Je důležité, aby při plnění mikroelektrody nevznikly v roztoku bublinky. Zásadně by ovlivnili odpor mikroelektrody a celkovou přesnost měření [16][17].

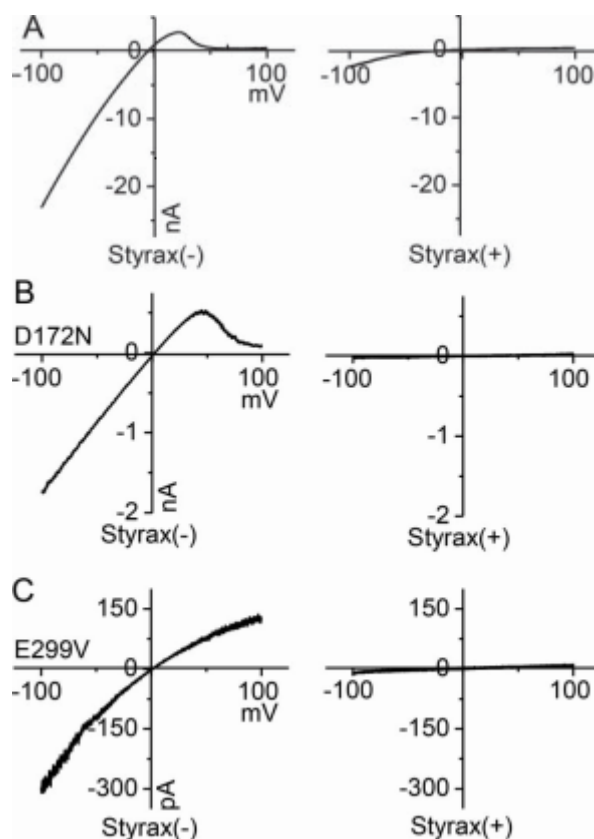
4.3 Využití patch-clamp techniky při studiu elektrofyziologie membránového kanálu $K_{ir2.1}$

Vnitřně usměrňující membránové kanály K_{ir} zastávají klíčovou funkci v udržení stabilního klidového membránového potenciálu, excitabilitě i tvarování akčních potenciálů jak počáteční depolarizace, tak konečné repolarizace v excitabilních buňkách. Fyziologické funkce jsou úzce spjaty s tokem K^+ a přestože jsou proudy K_{ir} malé, hrají zásadní roli při řízení excitability membrány a délce akčního potenciálu. Z těchto důvodů patří studium jejich elektrofyziologických vlastností a regulace k důležité součásti výzkumů [47] [49].

Typický vnitřně usměrňující kanál $K_{ir2.1}$ byl poprvé zaznamenán roku 1949 v kosterní svalovině žáby a o více než 50 let později byl klonován pro laboratorní účely. Abnormální funkce proteinu $K_{ir2.1}$ ve smyslu ztráty funkčnosti může způsobovat Andersenův syndrom (Syndrom prodlouženého QT intervalu, LQTS) a ve smyslu zesílení funkčnosti Syndrom krátkého QT intervalu (SQT3). Se zesílením funkce kanálu $K_{ir2.1}$ se pojí zrychlení repolarizačního procesu, které prozatím nemá medikamentózní řešení, a proto pacientům musí být implantován kardioverter- defibrilátor (ICD). Implantace ICD skýtá závažné neurologické poškození u pacientů (obzvláště u dětí), tudíž nalezení klinických inhibitorů nebo blokátorů kanálu $K_{ir2.1}$ by znamenalo nesčetné výhody [48].

K nalezení účinných sloučenin, které by bylo možné aplikovat v klinické terapii, již bylo vynaloženo velké úsilí. Kanál $K_{ir2.1}$ inhibují látky jako chlorethylclonidine, celastrol, chloroquine, avšak jsou to chemosyntetické látky, jejichž toxikologické a farmakologické účinky se těžko vyhodnocují. Ve studii Shuxi Ren a kol. [48] se vědci z Technologické univerzity Hebei v Číně zaměřili na lék pocházející z tradiční čínské medicíny – styra – a jeho schopnost blokátoru $K_{ir2.1}$ kanálů prokázaly za pomoci patch-clamp techniky [48].

Experimenty byly provedeny na buněčné linii HEK293T přechodně transfekované plasmidem $K_{ir2.1}$ a dvěma mutovanými variantami (D172N a E299V), které byly dříve identifikovány jako příčiny SQT3. V režimu whole-cell byla měřena proudová odezva na napěťové impulzy dle stimulačního protokolu (-100 mV až +100 mV s krokem 10 mV). Obrázek 16 obsahuje naměřené I-V závislosti, kde křivky na levé straně pochází z buněk v koupelovém roztoku bez látky styra (-) a u křivek na pravé straně byly buňky vystaveny koupelovému roztoku obsahující styra (+) o koncentraci 0,05 % [48].



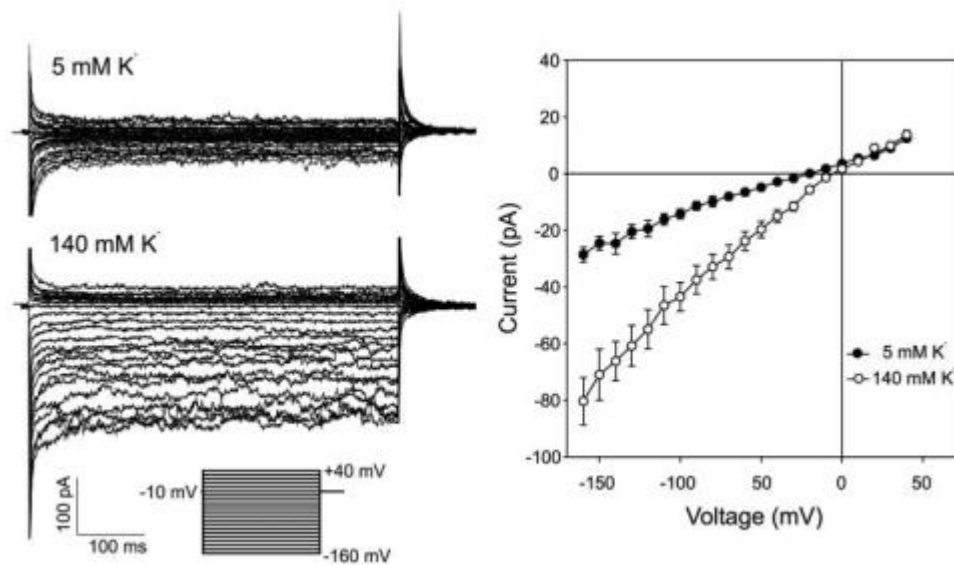
Obrázek 16: Patch-clamp experimenty testující blokování kanálu $K_{ir}2.1$ látkou styraX. (A) Whole-cell patch-clamp buněk HEK293T exprimující $K_{ir}2.1$. (B) Inside-out patch-clamp buněk HEK293T exprimující D172N. (C) Inside-out patch-clamp buněk HEK293T exprimující E299V. Data reprezentují střední hodnoty \pm SE ($n = 6$ pro $K_{ir}2.1$, $n = 4$ pro D172N a $n = 8$ pro E299V) [48].

Na základě naměřených výsledků, tato studie prokazuje účinnost látky styraX na blokování kanálu $K_{ir}2.1$ a jeho mutovaných verzí. Ve skutečnosti se styraX skládá z několika stovek monomerů, proto se do budoucna nabízí zkoumání, jaký monomer má kritické postavení v blokování kanálu a jak tento blokovací mechanismus funguje [48].

Studie Dongli Yang a kol. [46] se zaměřuje na prokázání přítomnosti kanálu $K_{ir}2.1$ v nativních endoteliálních buňkách rohovky (BCE) a posouzení, zda se podílí na udržování membránového potenciálu. Přítomnost tohoto kanálu v buňkách BCE byla potvrzena analýzou RT-PCR a analytickou technikou Western Blot běžně používanou pro detekci specifického proteinu. Následná charakterizace kanálu $K_{ir}2.1$ byla provedena technikou *patch-clamp* v režimu *whole-cell* [46].

Obrázek 17 ukazuje skupinu proudů naměřených na reprezentativní nativní BCE buňce v koupelovém roztoku 5 mM K^+ a 140 mM K^+ včetně příslušného stimulačního protokolu. Pravá část tohoto obrázku poskytuje korespondující proudově-napěťovou (I-V) závislost zprůměrovanou z měřených proudů šesti buněk. I-V charakteristika v koupelovém roztoku s 5 mM draselných iontů má v podstatě lineární průběh,

ale poněkud větší sklon vodivosti vykazuje při negativním napětí zhruba do -80 mV. Při zvýšení koncentrace draselných iontů na 140 mM proud směrem dovnitř buňky výrazně vzrostl [46].



Obrázek 17: Vnitřně usměřňující K^+ proudy z izolované nativní BCE buňky. Levá část obrázku: whole-cell proud měřený v koupelovém roztoku o koncentraci K^+ 5 a 140 mM; ve spodní části použitý stimulační protokol. Pravá část obrázku: výsledná proudově-napěťová závislost vytvořená průměrnými hodnotami šesti buněk [46].

S rostoucí koncentrací K^+ (5 a 140 mM K^+) vzrostla vnitřní vodivost měřená u šesti buněk mezi -140 a -150 mV v průměru z $0,26 \pm 0,12$ na $0,76 \pm 0,20$ nS a depolarizace membránového napětí z $-22,4 \pm 3,0$ na $-3,13 \pm 2,3$ mV. Změny indukované draslíkovými ionty jsou v souladu s přítomností vnitřně usměřňujících draslíkových kanálů. Tato studie poskytla první důkaz o přítomnosti kanálu $K_{ir2.1}$ v nativních BCE buňkách a identifikovala proudy procházející tímto kanálem. Dongli Yang a kol. stanovili, že $K_{ir2.1}$ kanály pomáhají určovat membránový potenciál, mohou se podílet na transendoteliálním transportu iontů a regulaci objemu buněk [46].

5 ELEKTROFYZIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE MEMBRÁNOVÉHO KANÁLU $K_{ir}2.1$.

Cílem experimentální části práce bylo provedení elektrofyziologické charakterizace membránového kanálu $K_{ir}2.1$. Jedná se o poměrně rozsáhlý a časově náročný experiment, jelikož samotnému elektrofyziologickému měření metodou *patch-clamp* v režimu *whole-cell* předchází kultivace buněčné linie HEK293T s následnou transfekcí syntetizovaného plasmidu $K_{ir}2.1$. Podstatnou část práce tvořilo praktické osvojení *patch-clamp* techniky, která je bez náležitých zkušeností velice těžce proveditelná. K tomuto účelu posloužily čisté, tedy netransfekované, buňky HEK293T.

Transfekce plasmidu byla provedena transientně chemickou metodou pomocí polyetyleniminu a její efektivita byla hodnocena na fluorescenčních snímcích. Transfekovaná buňka byla vystavena v rámci metody *patch-clamp* stimulačním napěťovým impulsům v rozmezí -80 mV až +60 mV s krokem 10 mV při *holding potential* -80 mV. Z proudových odezev na dané stimuly byla vytvořena I-V charakteristika, která potvrdila funkčnost exprimovaného plasmidu. Následující podkapitoly obsahují detailnější popis jednotlivých částí experimentu.

5.1 Kultivace buněčné linie HEK293T

Buněčná linie HEK293T byla pro tento experiment zvolena z důvodu snadné kultivace, transfekce a vysoké produkce rekombinantních proteinů. Buňky se uchovávají v mrazáku při teplotě -80 °C. Po vytažení z mrazáku byly buňky rychle rozmrazeny ve vodní lázni vyhřáté na teplotu 37°C a následně přeneseny do kultivační lahve (25 cm²) naplněné 8 ml média. Lahve s buňkami byla vložena do inkubátoru, který zajišťuje fyziologickou teplotu 37°C spolu s atmosférou obsahující 5% CO₂.

Použité kultivační médium - Eagle's minimal Essential medium (EMEM) - obsahuje aminokyseliny, soli, glukózu, vitamíny a přidané 10% FBS (fetální hovězí sérum), 1% penicilin a 1% L-glutamine. Pro udržení optimální koncentrace živin bylo médium minimálně 3x týdně měněno. Zhruba po čtyřech dnech se buňky nacházely v konfluentním stavu a tvořily na dně kultivační lahve tzv. monolayer. V této fázi následovalo pasážování. Adherované buňky byly opláchnuty 5 ml PBS za účelem odstranění zbytků kultivačního média. Aby došlo k uvolnění buněk z vnitřního povrchu kultivační lahve, byly buňky vystaveny působení 1 ml trypsinu po dobu 2 minut. Vlivem delšího působení trypsinu by se buňky mohly poškodit, proto musel být včas přidán 1 ml kultivačního média.

Následovalo přemístění buněk do centrifugační zkumavky (15 ml) a centrifugace po dobu 4 minut na 1200 otáček. Na dně zkumavky vznikl buněčný sediment, od kterého byl pipetou opatrně odsán supernatant. Buněčný sediment se poté resuspendoval v 1 ml kultivačního média, čímž byly buňky připraveny pro další kultivaci. Do nové kultivační lahve (25 cm²) se zpasážované buňky standardně vkládají v ředění 1:5, tzn. přibližně 1 200 000 buněk, protože v jedné kultivační lahvi se nachází asi 6 milionů buněk. Pro osvojování *patch-clamp* techniky bylo při pasážování cca 120 000 buněk umístěno do Petriho misek s povrchem 9,2 cm² naplněných 3 ml kultivačního média.

5.2 Optimalizace transfekce plasmidu K_{ir}2.1

Pro vpravení plasmidu K_{ir}2.1 do buněčné linie HEK293T byla zvolena metoda přechodné chemické transfekce pomocí transfekčního reagentu PEI (polyethylenimin). Transfekční protokol byl experimentálně optimalizován s cílem dosažení co nejefektivnější transfekce neboli největšího počtu transfekovaných buněk. Vyhodnocení úspěšnosti metody proběhlo prostřednictvím fluorescenční mikroskopie.

Zvolená transfekční metoda byla provedena během pasážování, přičemž buněčná linie byla po rozmrazení alespoň třikrát pasážována. Prvotní krok spočíval v přípravě transfekčních roztoků. Do osmi mikrozkuvek bylo přidáno 11 μl 150 mM NaCl, ve kterém bylo rozpuštěno dané množství plasmidové DNA a transfekčního reagentu PEI. Koncentrace použitého plasmidu K_{ir}2.1 byla 144 ng/μl, Tabulka 1 udává přepočítané výsledné koncentrace pDNA, NaCl i PEI.

Po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě, kdy pDNA a PEI vytvořili kladný komplex, bylo do mikrozkuvek přidáno 200 μl média EMEM a následně zpasážované buňky v přibližné hustotě 1×10⁵/ml. Takto vytvořené transfekční roztoky byly přemístěny do mikrodestičky o osmi jamkách (2×4) a vloženy do inkubátoru. Každý den probíhala výměna média pro zajištění fyziologických podmínek vhodných k růstu transfekované buněčné linie. 96 hodin po provedení transfekce byla pomocí konfokálního mikroskopu ověřena úspěšnost metody a pro znázornění výsledků pořízeny fluorescenční snímky. Úspěšně transfekované buňky jevíly fluorescenci zapříčiněnou expresí plasmidu K_{ir}2.1.

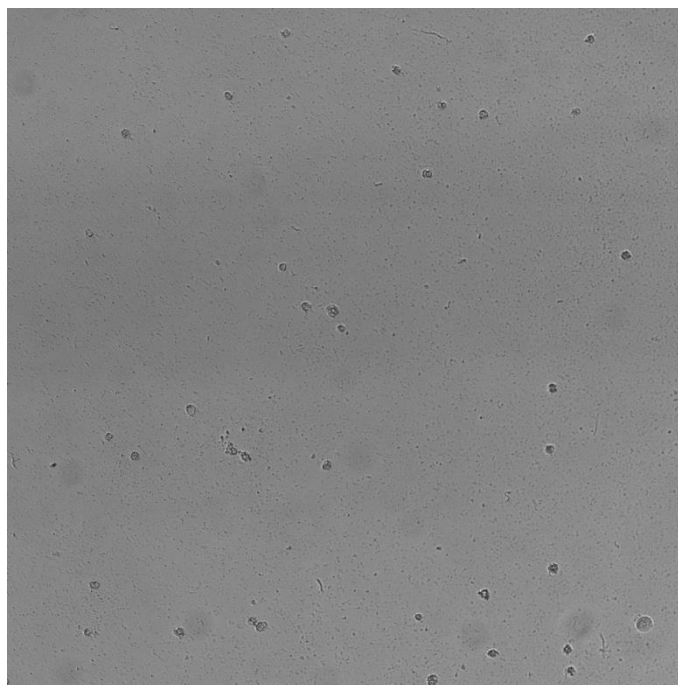
Plasmid K_{ir}2.1 s sebou nese červený fluorescenční protein mCherry, jehož excitační maximum leží na vlnové délce 587 nm a emisní maximum na 610 nm. Tento protein se řadí do skupiny monomerních fluorescenčních proteinů označených jako

mFruit (např. mApple, mRaspberry, mBanana). Samotné názvy těchto proteinů napovídají, že barva emisního spektra bude podobná barvě daného ovoce [50].

Tabulka 1: Složení transfekčních roztoků

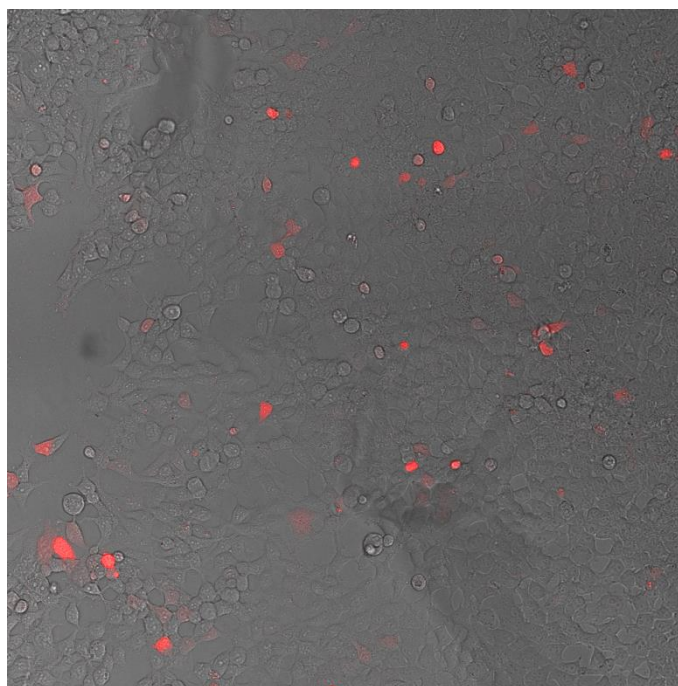
číslo vzorku	NaCl [mmol/l]	pDNA [μg/ml]	PEI [μg/ml]	EMEM [μl]	buňky [počet/ml]	celkový objem [μl]
1	7,50	2,77	2,27	200	$1,15 \times 10^5$	220
2	7,35	5,45	2,22	200	$1,13 \times 10^5$	224,25
3	7,20	8,02	2,18	200	$1,11 \times 10^5$	228,5
4	7,08	10,50	2,14	200	$1,09 \times 10^5$	232,75
5	7,33	5,44	4,44	200	$1,13 \times 10^5$	224,75
6	7,18	7,90	6,53	200	$1,11 \times 10^5$	229,5
7	7,03	10,45	8,53	200	$1,08 \times 10^5$	234,25
8	6,88	12,94	10,44	200	$1,06 \times 10^5$	239,25

Použití transfekčního reagentu PEI skýtá jistou nevýhodu spočívající v jeho toxicitě [51], tudíž je důležité najít vhodný kompromis v množství postačujícím k proniknutí pDNA do buňky a stavem, kdy již přílišná toxicita prostředí začne způsobovat apoptózu buněk. Tuto skutečnost prokazují vzorky č. 6, 7, 8, do nichž byl vkládán postupně se navyšující objem PEI, jenž zapříčinil nízkou viabilitu. Na příslušných snímcích lze vidět pouze apoptotické buňky bez známek fluorescence viz Obrázek 18.



Obrázek 18: Snímek neúspěšně transfekovaných buněk HEK293T plasmidem K_{ir}.2.1, vzorek č. 8

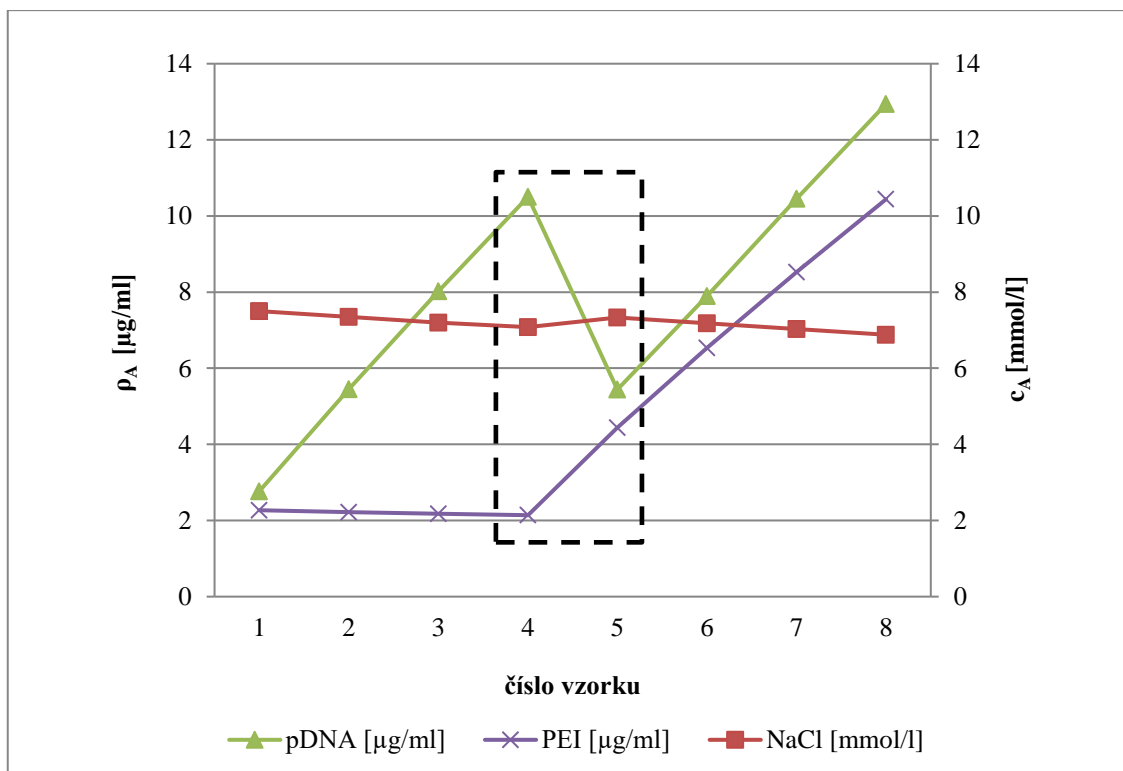
Jako nejlépe transfekované buňky se dle pořizovaných snímků jeví vzorky 4 a 5 obsahující nejvíce červeně fluoreskujících buněk. V případě vzorku č. 4 (Obrázek 19) byla výsledná koncentrace PEI ve vzorku 2,14 $\mu\text{g/ml}$ a pDNA 10,5 $\mu\text{g/ml}$. Vzorek č. 5 obsahuje naopak vyšší koncentraci PEI (4,44 $\mu\text{g/ml}$) při nižší koncentraci pDNA (5,44 $\mu\text{g/ml}$). Výsledné snímky všech vzorků se nachází v příloze práce.



Obrázek 19: Snímek úspěšně transfekovaných buněk HEK293T plasmidem Kir2.1, vzorek č. 4

Koncentrace NaCl, pDNA a PEI jednotlivých transfekčních roztoků byly vyneseny do grafu, který znázorňuje Obrázek 20. Na ose x se nachází označení vzorků (1-8), na hlavní ose y je vynesena hmotnostní koncentrace ρ_A [$\mu\text{g/ml}$] pDNA i PEI a na vedlejší ose y molární koncentrace c_A [mmol/l] NaCl. Přerušovaný obdélník vyznačuje koncentrace vzorků 4 a 5, které dle snímků prokázaly nejlepší transfekční účinnost.

Z uvedených výsledků plyne, že koncentrace PEI 4,44 $\mu\text{g/ml}$ nezpůsobuje apoptózu buněk a za použití tohoto množství postačí méně pDNA (5,44 $\mu\text{g/ml}$). V případě použití 2,14 $\mu\text{g/ml}$ PEI je nutno přidat alespoň dvojnásobný objem pDNA (10,5 $\mu\text{g/ml}$) než v předchozím případě. Fluorescence buněk potvrdila expresi proteinu Kir2.1 v buňkách HEK293T, funkčnost tohoto membránového konstruktů byla ovšem ověřena až elektrofyziologickým měřením. Pro provedení techniky *patch-clamp* byly buňky transfekovány postupem popsáním v této kapitole, přičemž složení transfekčních roztoků odpovídalo nejvhodnějším koncentracím, které byly zjištěny na základě tohoto optimalizačního experimentu.



Obrázek 20: Změna koncentrací pDNA (trojúhelník), PEI (křížek) a NaCl (čtverec) v jednotlivých transfekčních roztocích. Přerušovaný obdélník vyznačuje hodnoty koncentrace s nejlepší transfekční účinností – vzorek 4 a 5. ρ_A - hmotnostní koncentrace [$\mu\text{g/ml}$], c_A - molární koncentrace [mmol/l].

5.3 Patch-clamp

Technika *patch-clamp* byla nejprve realizována na buňkách HEK293T za účelem osvojení této techniky a až následně měření probíhalo na transientně transfekovaných buňkách HEK293T plasmidem $K_{ir}2.1$. Při pasážování byly buňky nasazeny do Petriho misek ($9,2 \text{ cm}^2$) a po 3-4 dnech kultivace mohly být použity na měřicí experiment.

Za pomoci tahače mikroelektrod (DMZ Universal Puller) byly vyrobeny z borosilikátových kapilár (World Precision Instruments, Inc.) měřicí mikroelektrody. Nastaveným programem P50 byly kapiláry víceokrovým nahříváním s protisměrným tahem roztrženy za vzniku dvou totožných elektrod. Špičky obou elektrod byly následně postupně vystaveny žáru platinového drátku k dosažení lehkého otavení ostrých okrajů (*polishování*). S takto vyrobenými mikroelektrodami bylo nutné manipulovat se zvýšenou opatrností, aby nedošlo k poškození hrotů nebo vniknutí nečistot.

Následně byla mikroelektroda naplněna pipetovým (interním) roztokem o teplotě 37°C pomocí injekční stříkačky s plnicím vláknem. Pipetový roztok svým složením (Tabulka 2) připomíná intracelulární roztok buněk. Při plnění mikroelektrod nesměly v roztoku vzniknout bubliny, které by negativně ovlivnily měření. Předjet

vzniku bublin lze umístěním plnicího vlákna co nehlouběji do špičky mikroelektrody současně s pomalým, plynulým stlačováním injekční stříkačky naplněné roztokem. Pokud přesto došlo ke vzniku bublin, jemným pohybem pinzety do stran přes mikroelektrodu bylo možné dosáhnout jejich odstranění. Tímto způsobem připravená mikroelektroda byla nasunuta na stříbrný drátek mikromanipulátoru.

Petriho miska s buňkami přichystanými pro experiment byla vyjmuta z inkubátoru a místo kultivačního média byly k buňkám přidány 3 μ l koupelového roztoku, jehož chemické složení udává Tabulka 3. Miska byla umístěna pod objektiv a opatřena referenční elektrodou propojenou s mikromanipulátorem. Před samotným ponořením mikroelektrody do koupelového roztoku byla vybrána vhodná buňka a pomocí posuvného stolku vycentrována do středu zorného pole. V případě transfekovaných buněk byl pro jejich detekci využit připojený zdroj fluorescenčního záření s fluorescenční kostkou, kdy ve tmavém poli úspěšně transfekované buňky červeně září.

Posuvným zařízením spolu s pohybem mikromanipulátoru v osách X, Y, Z byla mikroelektroda ponořena do roztoku a prostřednictvím zesilovače Axopatch 200B (Axon Instruments) a AD převodníku Digidata 1440A (Axon Instruments) byl v softwarovém prostředí Clampex 10.4 sledován průběh signálu. V této fázi probíhal v měřicím okně programu v režimu *Bath* obdélníkový signál (Obrázek 22), který zaujímá roli ukazatele neporušenosti mikroelektrody mající odpor 1,2- 3 M Ω . Pokud byla špička mikroelektrody ulomená či jinak poškozená, v měřicím okně bylo možné pozorovat signál rušený a s výraznými hroty. Mikroelektroda musela být v tomto případě vyměněna (Obrázek 21).

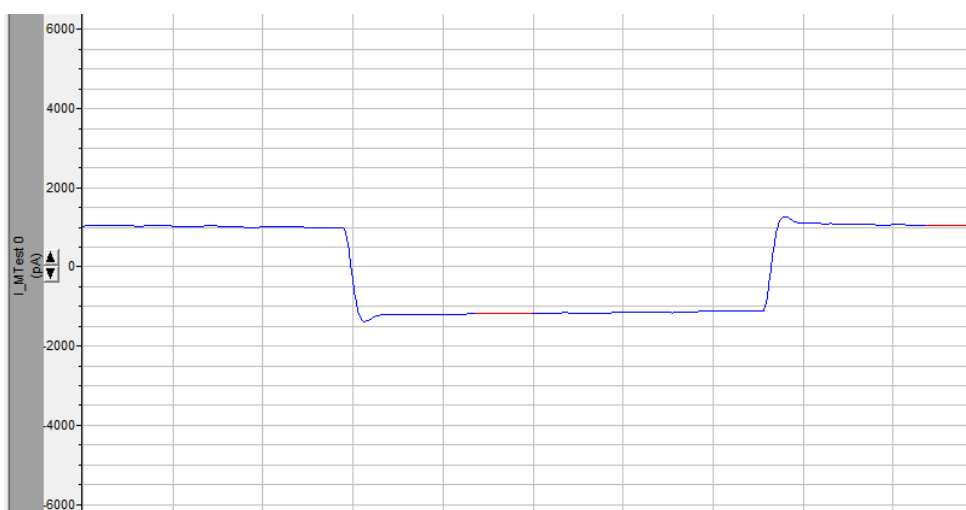


Obrázek 21: Signál pocházející z porušené mikroelektrody ponořené do roztoku



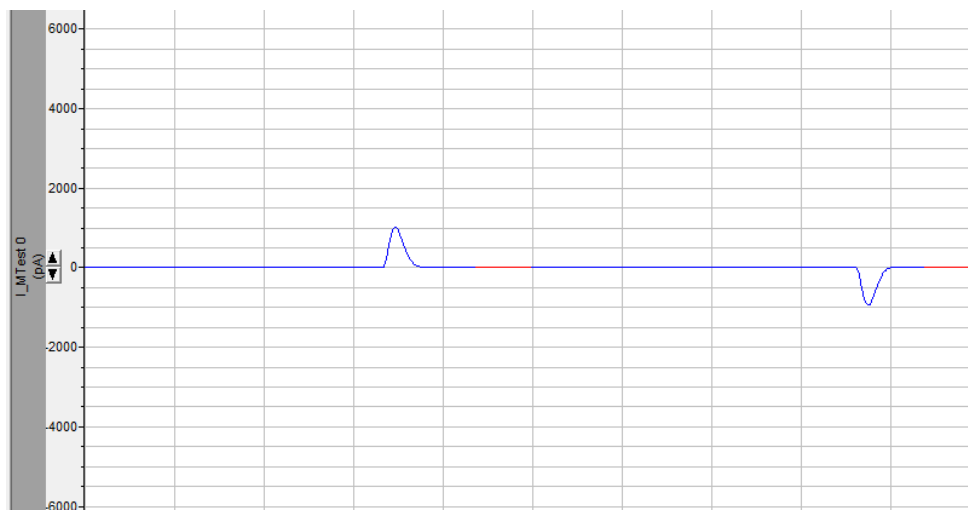
Obrázek 22: Signál pocházející z neporušené mikroelektrody ponořené do roztoku

Špička neporušené mikroelektrody byla umístěna do zorného pole světelného mikroskopu a nasměrována do středu vybrané buňky. Pomalým snižováním mikroelektrody ve směru osy Z došlo k dotyku mikroelektrody s buňkou, jenž se projevil snížením obdélníkového signálu zhruba na jednu třetinu (Obrázek 23). Pokud by byl na buňku vyvinut příliš velký tlak, mohla by se buněčná membrána protrhnout, postupovat se tedy muselo opatrně.

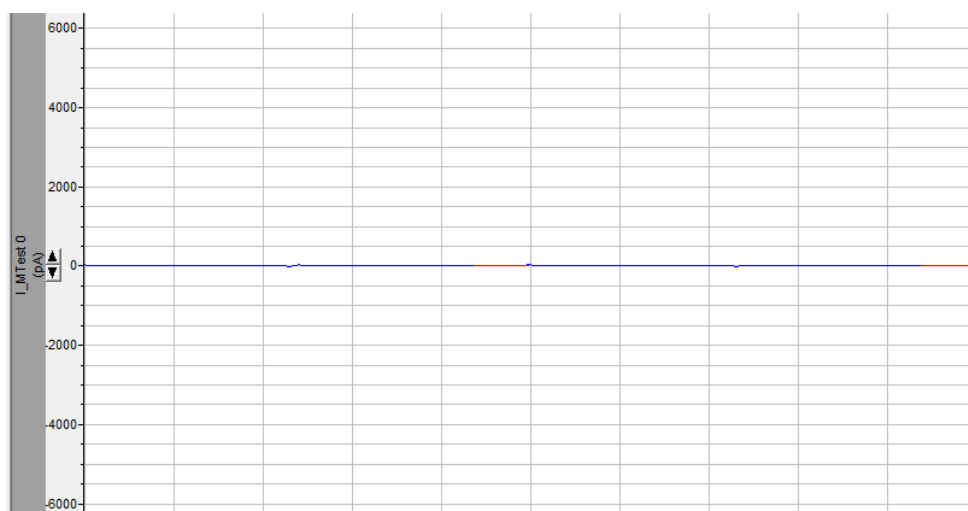


Obrázek 23: Průběh signálu při dotyku mikroelektrody s buňkou

V okamžiku dotyku byl injekční stříkačkou vyvinut podtlak za účelem vytvoření těsného spojení (*gigaseal*, viz Obrázek 24). Vznik *gigaseal* byl odhalen na monitoru počítače průběhem signálu tvořící *baseline* (po kompenzaci frekvenčních špiček na Obrázek 25) a hodnotou odporu v řádu $G\Omega$. Program Clampex byl přepnut do režimu *Patch*, kde se postupným snižováním nastavil *holding potential* na hodnotu -80 mV.

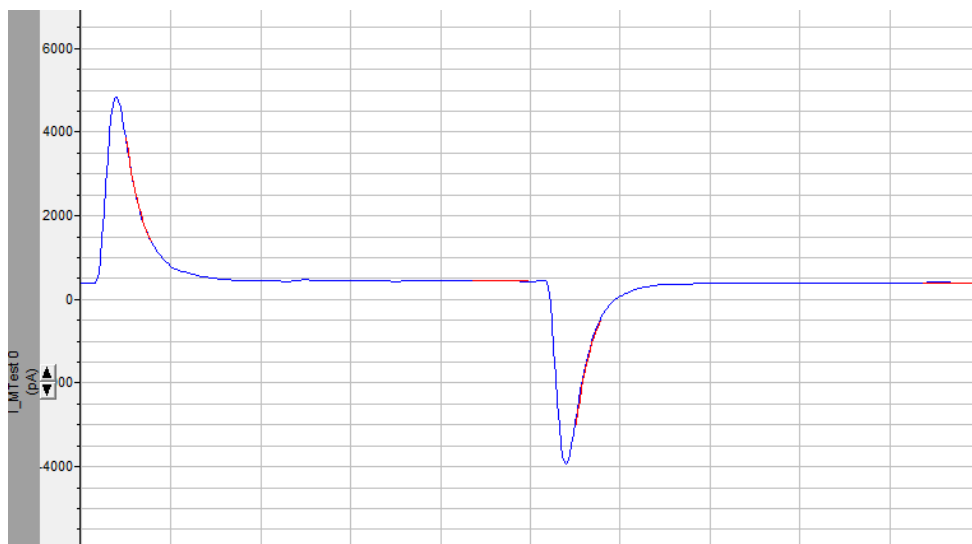


Obrázek 24: Průběh signálu při navázání gigaseal



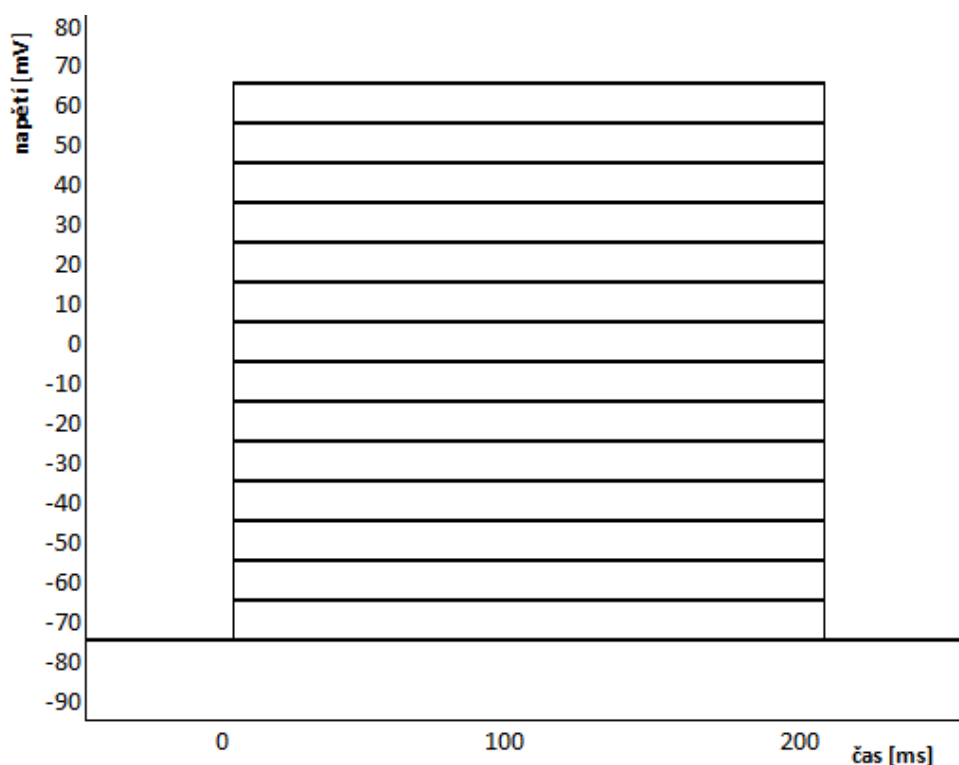
Obrázek 25: Průběh signálu při navázání gigaseal po vykompenzování frekvenčních špiček

Následující krok spočíval v zajištění kontaktu mikroelektrody s intracelulárním prostředím buňky, čehož bylo docíleno vyvinutím krátkého silného podtlaku. Tímto podtlakem došlo k protržení buněčné membrány a přilnutí volných krajů k vnitřní stěně mikroelektrody. V případě správného provedení byl signál tvořen amplitudou o rychlém nástupu a pozvolném sestupu, jako je znázorněno na Obrázek 26. Kontrolou taktéž byla hodnota membránového napětí, která by se měla pohybovat kolem hodnoty -40 mV, protože tato je hodnotou vnitřního napětí buněk HEK293T.



Obrázek 26: Průběh signálu při otevření buňky

Režim v programu Clampex byl po správném otevření buňky přepnut do režimu *Cell* zobrazujícího hodnoty odporu a kapacitance. Na zesilovači byl změněn mód *TRACK* na mód *V-CLAMP* a přepínač *EXTERNAL COMMAND* byl uveden do zapnuté pozice. Při experimentu na transfekovaných buňkách, byl v této fázi zapnut stimulační protokol (viz Obrázek 27) a probíhalo měření proudových odezev na jednotlivé stimuly s cílem získání elektrofyziologických vlastností kanálu $K_{ir}2.1$.



Obrázek 27: Stimulační protokol pro kanály $K_{ir}2.1$ - holding potential -80 mV, napěťové impulzy -80 mV až +60 mV s krokem 10 mV

Tabulka 2: Chemické složení pipetového roztoku

Sloučenina	Molární hmotnost [g/mol]	Koncentrace [mmol]
KCl	74,55	130
Na-ATP	507,18	5
TEA-Cl	149,20	10
HEPES	238,30	10
EGTA	380,35	10
MgCl ₂	203,30	5
Objem roztoku [ml]	pH roztoku	Osmolarita roztoku [mosm]
25	7,2	285

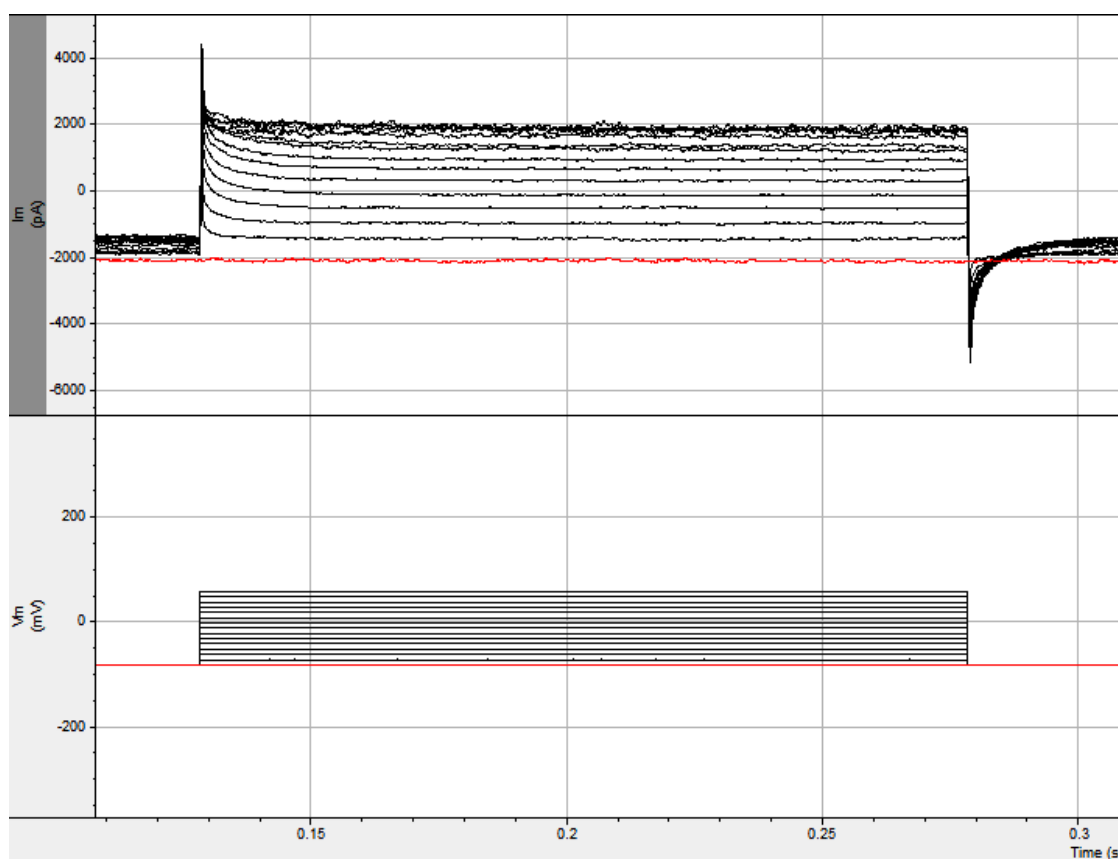
Tabulka 3: Chemické složení koupelového roztoku

Sloučenina	Molární hmotnost [g/mol]	Koncentrace [mmol]
NaCl	58,44	140
HEPES	238,30	10
D- Glucose	180,16	10
MgCl ₂	203,30	1
EGTA	380,35	2
KCl	74,55	5
Objem roztoku [ml]	pH roztoku	Osmolarita roztoku [mosm]
50	7,4	293

5.4 Dosažené výsledky a diskuze

Elektrofyzilogická charakterizace syntetizovaného membránového kanálu $K_{ir}2.1$ byla realizována technikou *patch-clamp* v režimu *whole-cell*. Měření proudových odpovědí na stimulační napěťové impulzy probíhalo v softwaru Clampex 10.4 s následným zpracováním získaných dat v softwaru Clampfit a v Microsoft Office Excel 2007.

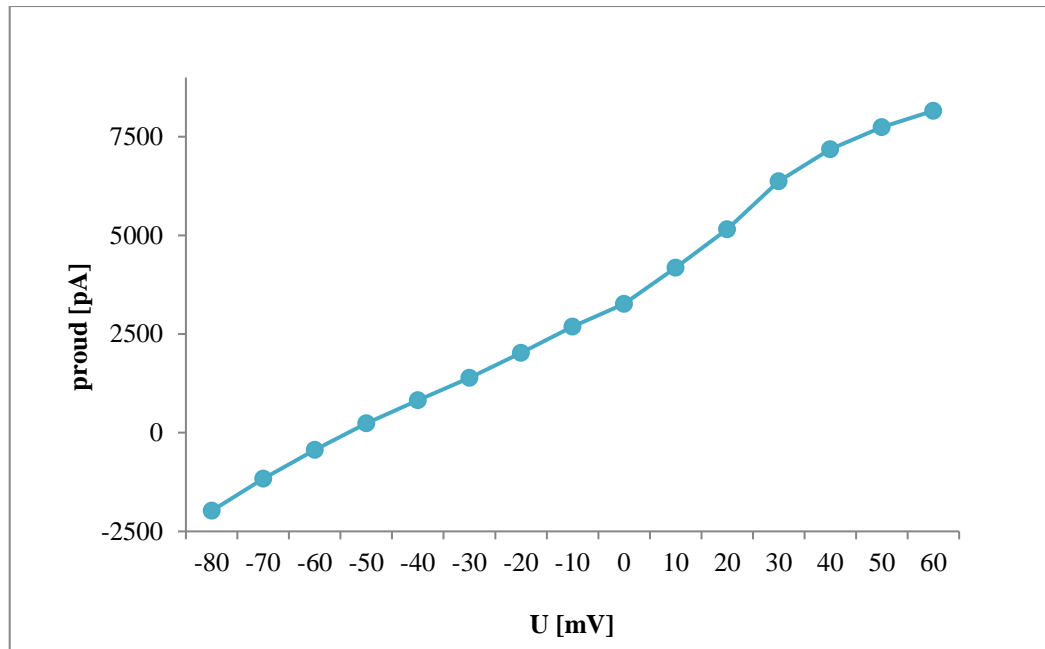
V rámci experimentálního měření bylo otevřeno a snímáno 28 buněk, avšak kompletně změřit se povedlo pouze 8 transfekovaných buněk. Hlavní problém spočíval v těsném spojení buňky s mikroelektrodou - *gigaseal*, které nevydrželo po dobu celého trvání stimulačního protokolu (asi 75 s). Tak zvané puštění buňky mohlo být způsobeno stářím buňky, špatným stavem buněčné membrány nebo nesprávně namíchanými roztoky. Pro ukázkou (Obrázek 28) byl vybrán reprezentativní průběh proudů transfekované buňky HEK293T, kde jednotlivé proudy vznikly odezvou na příslušný stimulační protokol (změna hodnoty membránového napětí).



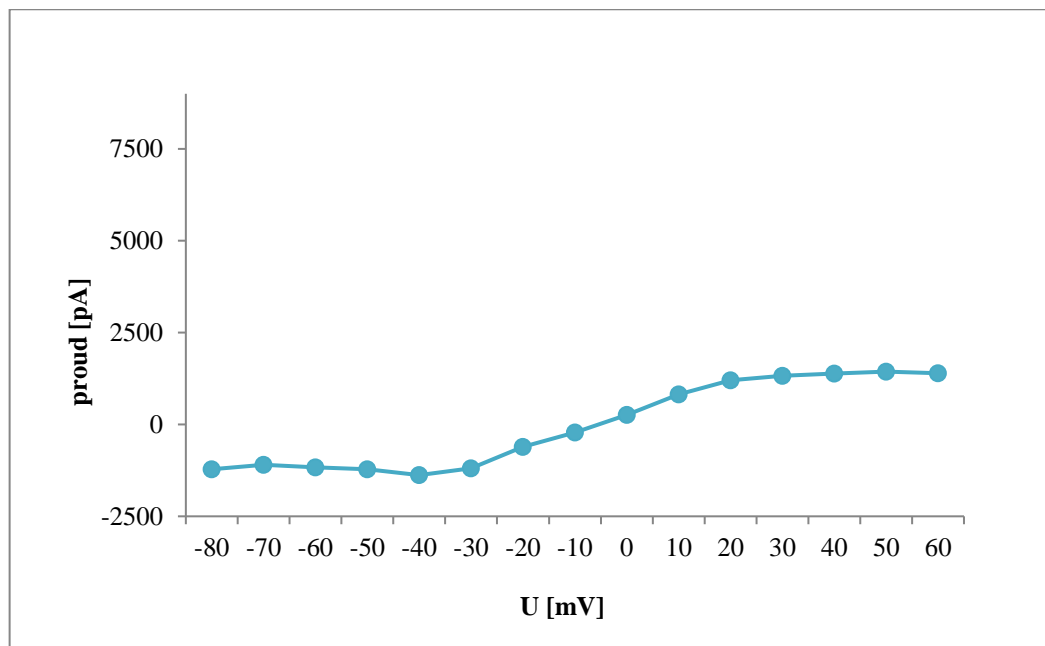
Obrázek 28: Ukázka *whole-cell* proudů zaznamenaného z buňky HEK293T s exprimovaným plasmidem $K_{ir}2.1$ a ve spodní části použitý stimulační protokol

Z jednotlivých průběhů proudů se pro danou hodnotu napětí vypočetla průměrná hodnota proudu a tyto posloužily k vytvoření I-V charakteristiky, na jejímž základě lze

vidovat přítomnost a funkčnost membránového kanálu $K_{ir}2.1$. Na Obrázek 29 se nalézá I-V charakteristika vybrané reprezentativní buňky HEK293T s exprimovaným plasmidem $K_{ir}2.1$ v 5 mM K^+ roztoku. Pro srovnání byla za stejných podmínek změřena netransfekovaná buňka HEK293T (viz Obrázek 30) a na první pohled je zřejmé, že sama o sobě obsahuje pouze malé množství K^+ kanálů.

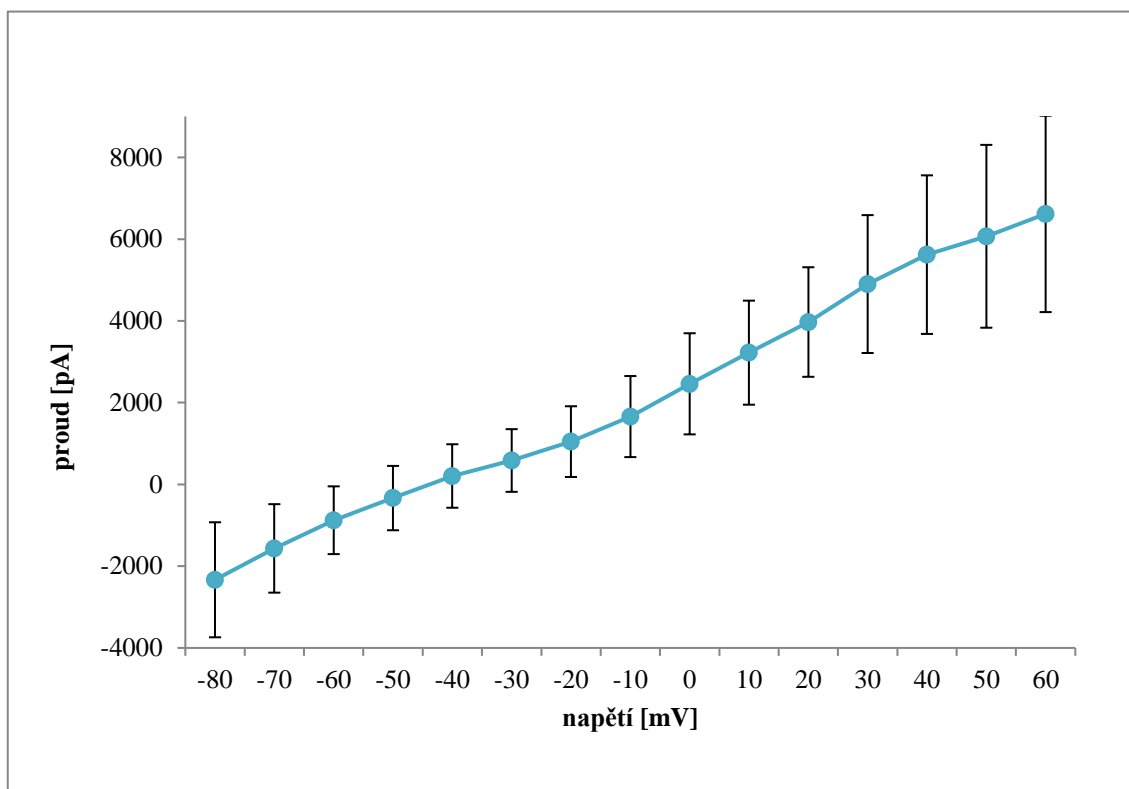


Obrázek 29: I-V charakteristika buňky HEK293T s exprimovaným plasmidem $K_{ir}2.1$



Obrázek 30: I-V charakteristika netransfekované buňky HEK293T

Data osmi kompletně změřených buněk HEK293T s exprimovaným plasmidem $K_{ir2.1}$ byla zprůměrována a výsledná I-V charakteristika včetně vypočtených směrodatných odchylek se nachází na Obrázek 31. Dosažené výsledky odpovídají známým skutečnostem o subrodině draslíkových kanálů K_{ir} .



Obrázek 31: I-V charakteristika membránového kanálu $K_{ir2.1}$ exprimovaného v buňkách HEK293T v koupelovém roztoku s 5mM K^+ . Data reprezentují průměr \pm SE osmi změřených buněk.

Získaná výsledná I-V charakteristika prokazuje napět'ovou závislost kanálu $K_{ir2.1}$, při záporném hyperpolarizačním impulzu je vyšší pravděpodobnost otevření většího počtu těchto kanálů. Proud draslíkových iontů směrem dovnitř buňky tedy roste se zvyšujícím se záporným membránovým napětím. Stimulační protokol udával napět'ové impulzy v rozmezí -80 mV až +60 mV s krokem 10 mV při *holding potential* -80 mV, což je hodnota membránového potenciálu, při které se nachází většina kanálů otevřena z inaktivace.

Bylo by vhodné provést další experimentální měření se stimulačním protokolem, který by postupoval do zápornějších hodnot např. až do -160 mV, jako použili Dongli Yang a kol. [46]. Také se nabízí charakterizace tohoto kanálu při vyšší koncentraci K^+ v koupelovém roztoku, kdy by změřené proudy měly dosahovat vyšších záporných hodnot [46].

ZÁVĚR

Náplní této diplomové práce bylo seznámení se s možností elektrofyziologické charakterizace membránových kanálů, prostudování elektrofyziologických vlastností konkrétního kanálu a následná experimentální měření vedoucí k získání elektrofyziologické charakterizace vnitřně usměrňujícího draslíkového kanálu $K_{ir}2.1$.

První část práce se věnuje obecnému popisu membránových kanálů, jejich základní struktury a funkci. Hluběji byly analyzovány draslíkové iontové kanály v čele se zástupcem funkční skupiny klasických vnitřně usměrňujících draslíkových kanálů - kanálem $K_{ir}2.1$. Expresi tohoto kanálu ve formě plasmidu umožňuje transfekce do buněčné linie HEK293T. Problematikou kultivace buněčných linií se zabývá druhá kapitola a následující kapitola přináší vysvětlení možností vpravování cizorodé DNA do buňky. Pro elektrofyziologickou charakterizaci byla zvolena metoda *patch-clamp*, jejíž teoretický postup provedení pojímá čtvrtá kapitola.

Druhá část práce zahrnuje využití teoretických poznatků v praxi, přičemž se jedná o poměrně rozsáhlý a časově náročný experiment. V laboratoři čistých prostor byla provedena kultivace buněčné linie HEK293T, která následně sloužila pro transfekci plasmidu $K_{ir}2.1$. Transfekce byla uskutečněna metodou transientní chemické transfekce prostřednictvím polymeru polyethyleniminu (PEI) a dosažené výsledky byly diskutovány v kapitole 5.2. Transfekční protokol byl optimalizován za účelem nalezení optimální koncentrace PEI a pDNA, jelikož PEI od určité koncentrace navozovalo toxické prostředí způsobující buněčnou smrt.

Červeně fluoreskující buňky – úspěšně transfekované buňky HEK293T s kanálem $K_{ir}2.1$ – byly dále podrobeny elektrofyziologickému měření. Za měřicí metodu byla vybrána základní elektrofyziologická metoda *patch-clamp* v režimu *whole-cell*, s níž pomocí byly zaznamenávány odezvy na stimulační napěťové impulzy v rozmezí -80 mV až +60 mV s krokem 10 mV a *holding potential* -80 mV.

Kompletně charakterizováno bylo 8 buněk, data byla zprůměrována a závislost proudu na membránovém napětí byla graficky znázorněna. Dosažené výsledky korespondují s teoretickými předpoklady, že se zvyšujícím záporným membránovým napětím roste proud směrem dovnitř buňky. Experimentálním měřením byla získána I-V charakteristika kanálu $K_{ir}2.1$ a ověřena funkčnost tohoto syntetizovaného plasmidu. Cíl diplomové práce byl tedy splněn i přes náročnost správného provedení *patch-clamp* techniky a přes veškeré komplikace, které se vyskytovaly během experimentů a jsou bezpochyby spojeny s prací s živým buněčným materiálem.

Protože se kanály $K_{ir}2.1$ podílí na řízení excitability membrány, jejich mutace způsobující dysfunkce jsou známkou určitých patologií např. syndrom krátkého QT intervalu či Tawil-Andersenův syndrom. Studium tohoto membránového konstrukturu vedoucí k nalezení jeho vlastností a funkčnosti patří k aktuálním trendům výzkumné činnosti.

LITERATURA

- [1] AKITA, T., M. OHARA a Y. OKADA. Patch-Clamp Techniques: General Remarks. In: Yasunobu OKADA, ed. Patch Clamp Techniques SE - 2 [online]. B.m.: Springer Japan, 2012, Springer Protocols Handbooks, s. 21–41. ISBN 978-4-431-53992-6.
- [2] ŠIMURDA, Jiří. *Bioelektrické jevy*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno, 2007. 72 s.
- [3] HILLE, Bertil. *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer, 2001. ISBN 978-0-87893-321-1.
- [4] *Definition of Ion channel* [online]. Dostupné z: <http://drugline.org/medic/term/ion-channel/> [cit. 2017-12-3].
- [5] VEJRAŽKA, Martin. Buněčné kultury. In Praha: Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- [6] *Primary cell culture* [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html> [cit. 2017-11-15].
- [7] *Cell search system* [online]. Dostupné z: http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell_no=RCB1637 [cit. 2017-11-10].
- [8] *HEK293 Cell Line* [online]. Dostupné z: <http://www.hek293.com/> [cit. 2017-11-15].
- [9] DUBRIDGE, R B, P TANG, H C HSIA, P M LEONG, J H MILLER a M P CALOS. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and Cellular Biology*. 1987, **7**(1), 379-387. DOI: 10.1128/MCB.7.1.379. ISSN 0270-7306. Dostupné také z: <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.7.1.379>
- [10] ALBERTS, B, D BRAY a A JOHNSON. *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [11] Lonza Cologne GmbH. *An Introduction to Transfection Methods*. Technical Reference Guide, 2012. Dostupné z: http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_An_Introduction_to_Transfection_Methods__Technical_Reference_Guide.pdf [cit. 2017-11-5].

- [12] KIM, Tae Kyung a James H. EBERWINE. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 397(8), 3173-3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3821-6>
- [13] ITO Tomoko, KOYAMA Yoshiyuki, OTSUKA Makoto. *Preparation of Calcium Phosphate Nanocapsule Including Deoxyribonucleic Acid–Polyethyleneimine–Hyaluronic Acid Ternary Complex for Durable Gene Delivery* [online]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, s. 179-184. ISSN: 0022-3549.
- [14] Lars Kaestner, Anke Scholz, Peter Lipp. *Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery* [online]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, s.1171-1176.
- [15] POTTER, Huntington. Transfection by Electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA, 2001. DOI: 10.1002/0471142727.mb0903s62. ISBN 0471142727. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142727.mb0903s62>
- [16] MOLLEMAN, A. *Patch clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology*. New York: J. Wiley, 2003. ISBN 04-714-8685-X.
- [17] STANDEN, N.B., etc.: *Microelectrode Techniques: The Plymouth Workshop Handbook*. 2nd Edition. Edited by Ogden, D.C. Company of Biologists, Cambridge, UK, 1994. Dostupné na URL: <http://www.utdallas.edu/~tres/microelectrode/me.html>
- [18] ZHANG, Li, QingHua LIU, ChengFang LIU, et al. Zacopride selectively activates the Kir2.1 channel via a PKA signaling pathway in rat cardiomyocytes. *Science China Life Sciences* [online]. 2013, 56(9), 788-796 [cit. 2017-12-04]. DOI: 10.1007/s11427-013-4531-z. ISSN 1674-7305. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11427-013-4531-z>
- [19] TRISTANI-FIROUZI, Martin a Susan P. ETHERIDGE. Kir 2.1 channelopathies: the Andersen–Tawil syndrome. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* [online]. 2010, 460(2), 289-294 [cit. 2017-12-04]. DOI: 10.1007/s00424-010-0820-6. ISSN 0031-6768. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-010-0820-6>
- [20] 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.

- [21] UMIGAI, Naofumi, Yoko SATO, Akifumi MIZUTANI, Toshihiko UTSUMI, Masao SAKAGUCHI a Nobuyuki UOZUMI. Topogenesis of Two Transmembrane Type K + Channels, Kir 2.1 and KcsA. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(41), 40373-40384 [cit. 2017-12-04]. DOI: 10.1074/jbc.M307451200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M307451200>
- [22] SHAW, Gerry, Silas MORSE, Miguel ARARAT a Frank L. GRAHAM, 2002. *Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology [online]. **16**(8), 869–871. ISSN 15306860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01-0995fje
- [23] 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
- [24] Rio DC, Clark SG, Tjian R (4 Jan 1985). "A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction" [online]. *Science*. 227 (4682): 23–28. doi:10.1126/science.2981116
- [25] THOMAS, Philip a Trevor G. SMART. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2005, 51(3), 187-200 [cit. 2017-12-05]. DOI: 10.1016/j.vascn.2004.08.014. ISSN 10568719. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056871905000110>
- [26] *Ion channels: Structure and Function* [online]. Dostupné z: <http://www.whatislife.com/reader/channels/channels.html> [cit. 2017-11-25]
- [27] DHAMOON, Amit S. a José JALIFE. The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* [online]. 2005, 2(3), 316-324 [cit. 2017-12-23]. DOI: 10.1016/j.hrthm.2004.11.012. ISSN 15475271. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1547527104007921>
- [28] *Modelling the short qt syndrome gene mutations*. New York: Springer, 2014. ISBN 9783319071992.
- [29] Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. *Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles*. *Physiol Rev* 90: 291–366, 2010; doi:10.1152/physrev.00021.2009.
- [30] KUANG, Qie, Pasi PURHONEN a Hans HEBERT. Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2015, **72**(19), 3677-

3693 [cit. 2017-12-25]. DOI: 10.1007/s00018-015-1948-5. ISSN 1420-682x.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1948-5>

- [31] RUBAIY, Hussein Nori. A Short Guide to Electrophysiology and Ion Channels. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, **20**, 48- [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.18433/J32P6R. ISSN 1482-1826. Dostupné z: <https://journals.library.ualberta.ca/jpps/index.php/JPPS/article/view/28694>
- [32] KLABUNDE, Richard E. *Cardiovascular physiology concepts*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer, c2012. ISBN 1451113846.
- [33] *Virtual – LAB* [online]. Dostupné z: http://www.virtual-lab.or.kr/demo/Experiment_PnP.asp?gCNum=20301 [cit. 2017-12-30].
- [34] YU, Frank H a William A CATTERALL. *Genome Biology* [online]. 4(3), 207- [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1186/gb-2003-4-3-207. ISSN 14656906. Dostupné z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2003-4-3-2077>
- [35] CATTERALL, William A. Structural biology: A 3D view of sodium channels. *Nature* [online]. 409(6823), 988-991 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1038/35059188. ISSN 00280836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/35059188>
- [36] BEAN, Bruce P a Stefan I MCDONOUGH. Calcium Channels. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2001, 2010-09-15 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000028.pub2. ISBN 0470016175. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0000028.pub2>
- [37] CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, 3(8), a003947-a003947 [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.1101/cshperspect.a003947. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a003947>
- [38] Jayapal K. P., Wlaschin K. F., Yap M. G. S., & Hu W-S. (2007). Recombinant protein therapeutics from CHO cells — 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.*, 103(7), 40–47.
- [39] *Culture collections* [online]. Dostupné z: https://www.ph-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jp?refId=85051005&collection=ecacc_gc [cit. 2018-4-29].
- [40] MARTINET, D., M. DEROUAZI, N. BESUCHET, M. WICHT, J. BECKMANN a F.M. WURM. Karyotype of CHO DG44 cells. SMITH,

- Rodney, ed. *Cell Technology for Cell Products* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007, s. 363-366 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1007/978-1-4020-5476-1_59. ISBN 978-1-4020-5475-4. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-5476-1_59
- [41] CALLAWAY, Ewen. Deal done over HeLa cell line. *Nature* [online]. 2013, 500(7461), 132-133 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1038/500132a. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/500132a>
- [42] Brendan P. Lucey, Walter A. Nelson-Rees, and Grover M. Hutchins (2009) Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: September 2009, Vol. 133, No. 9, pp. 1463-1467.
- [43] *Cell supplies* [online]. Dostupné z: <http://cellsupplies.blogspot.cz/2016/03/hela-cell-line.html> [cit. 2018-4-30]
- [44] AccessScience Editors. Importance of HeLa cells [online]. 2013, in *AccessScience*, McGraw-Hill Education. [cit. 2018-4-30] DOI: 10.1036/1097-8542.BR0826141. Dostupné z: <https://www.accessscience.com/content/importance-of-hela-cells/BR0826141>
- [45] DALBY, B. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* [online]. 2004, 33(2), 95-103 [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2003.11.023. ISSN 10462023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202303003001>
- [46] YANG, Dongli, Donald K. MACCALLUM, Stephen A. ERNST a Bret A. HUGHES. Expression of the Inwardly Rectifying K⁺ Channel Kir2.1 in Native Bovine Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2003, 44(8), 3511- [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1167/iovs.02-1306. ISSN 1552-5783. Dostupné z: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.02-1306>
- [47] CHANG, Hsueh-Kai a Ru-Chi SHIEH. Voltage-dependent inhibition of outward Kir2.1 currents by extracellular spermine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2013, 1828(2), 765-775 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.016. ISSN 00052736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273612002970>
- [48] REN, Shuxi, Chunli PANG, Junwei LI, Yayue HUANG, Suhua ZHANG, Yong ZHAN a Hailong AN. StyraX blocks inward and outward current of Kir2.1 channel. *Channels* [online]. 2016, 11(1), 46-54 [cit. 2018-05-01]. DOI:

10.1080/19336950.2016.1207022. ISSN 1933-6950. Dostupné z:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19336950.2016.1207022>

- [49] KURATA, Harley T., Wayland W. L. CHENG a Colin G. NICHOLS. Polyamine Block of Inwardly Rectifying Potassium Channels. PEGG, Anthony E. a Robert A. CASERO,, ed. *Polyamines* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-1-13, s. 113-126 [cit. 2018-05-01]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-61779-034-8_6. ISBN 978-1-61779-033-1. Dostupné z:
http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-034-8_6
- [50] DAY, Richard N. a Michael W. DAVIDSON. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, 38(10), 2887- [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1039/b901966a. ISSN 0306-0012. Dostupné z:
<http://xlink.rsc.org/?DOI=b901966a>
- [51] GODBEY, W T, K K WU, G J HIRASAKI a A G MIKOS. Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Therapy* [online]. 1999, 6(8), 1380-1388 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1038/sj.gt.3300976. ISSN 0969-7128. Dostupné z:
<http://www.nature.com/articles/3300976>
- [52] LONGO, Patti A., Jennifer M. KAVRAN, Min-Sung KIM a Daniel J. LEAHY. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 227-240 [cit. 2018-05-17]. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5. ISBN 9780124186873. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124186873000185>
- [53] SANSOM, Mark S.P., Indira H. SHRIVASTAVA, Joanne N. BRIGHT, John TATE, Charlotte E. CAPENER a Philip C. BIGGIN. Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2002, 1565(2), 294-307 [cit. 2018-05-17]. DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00576-X. ISSN 00052736. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000527360200576X>

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

AN	akční napětí
ATP	adenosintrifosfát
ATS	Andersen-Tawil syndrom
BCE	nativní endoteliální buňky rohovky
CLCN1	napěťově závislý chloridový kanál
C	kapacita membrány
c_A	molární koncentrace
CHO	Chinese hamster ovary, vaječníky čínského křečka
CO₂	oxid uhličitý
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMEM	Eagle's minimal Essential medium
GΩ	giga ohm
HEK293	human embryonic kidney, lidské embryonální ledvinné buňky
I_C	kapacitní proud
I_i	iontový proud
K_{ir}	inward rectifier potassium channel, vnitřně usměřňující draslíkový kanál
LQTS	syndrom prodlouženého QT intervalu
Na_v	napěťově závislé sodíkové kanály
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr
pDNA	plasmidová deoxyribonukleová kyselina
PEI	polyethylenimin
ρ_A	hmotnostní koncentrace
R_s	sériový odpor
RNA	ribonukleová kyselina
SV40	Simian virus 40
SQT	syndrom krátkého QT intervalu
U	stacionární membránové napětí
U_m	membránové napětí

SEZNAM PŘÍLOH

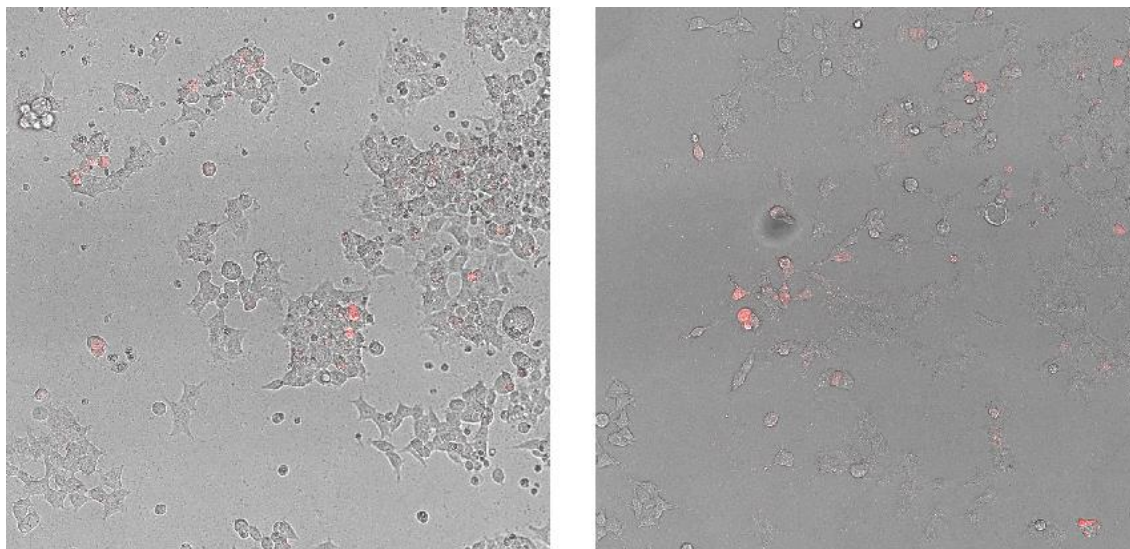
A OBSAH PŘILOŽENÉHO CD přiloženého CD

B VÝSLEDNÉ SNÍMKY TRANSFEKCE snímky transfekce

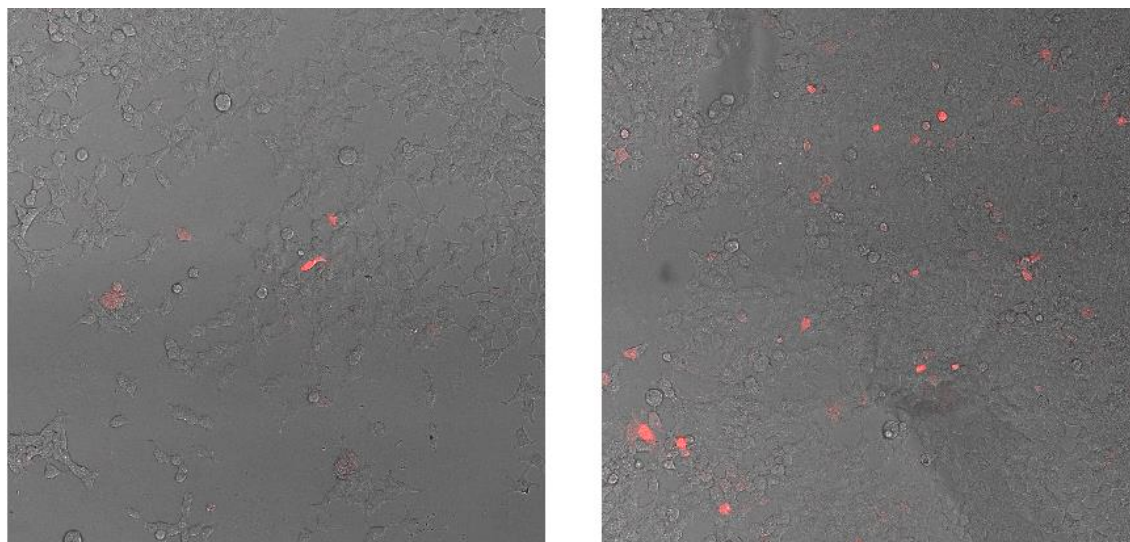
A OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

Na přiloženém CD se nachází elektronická verze této diplomové práce a jsou zde vloženy všechny snímky transfekčního experimentu v původní velikosti. Dále CD obsahuje I-V charakteristiky jednotlivých osmi buněk.

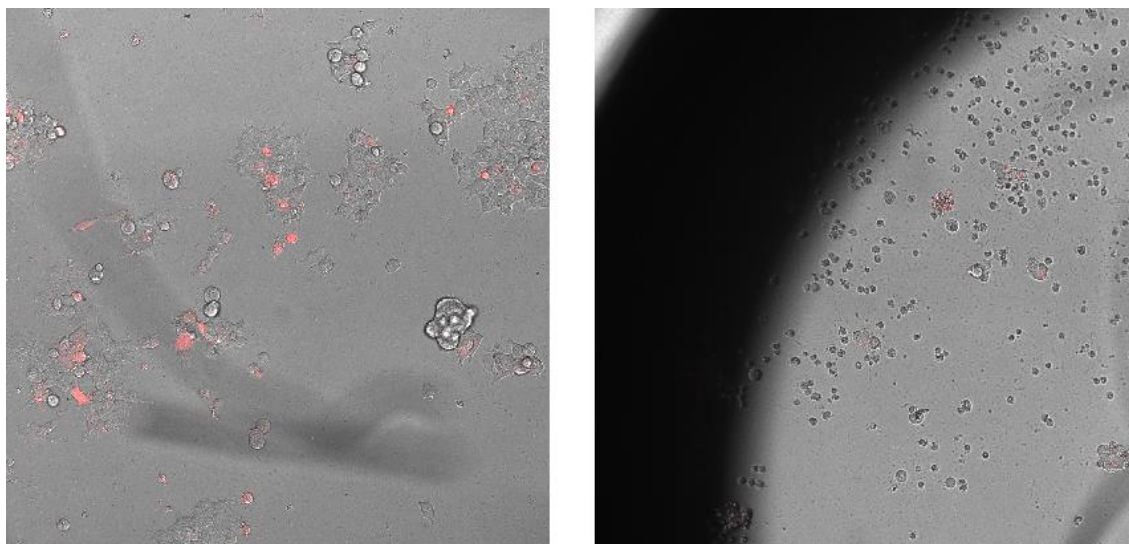
B VÝSLEDNÉ SNÍMKY TRANSFEKCE



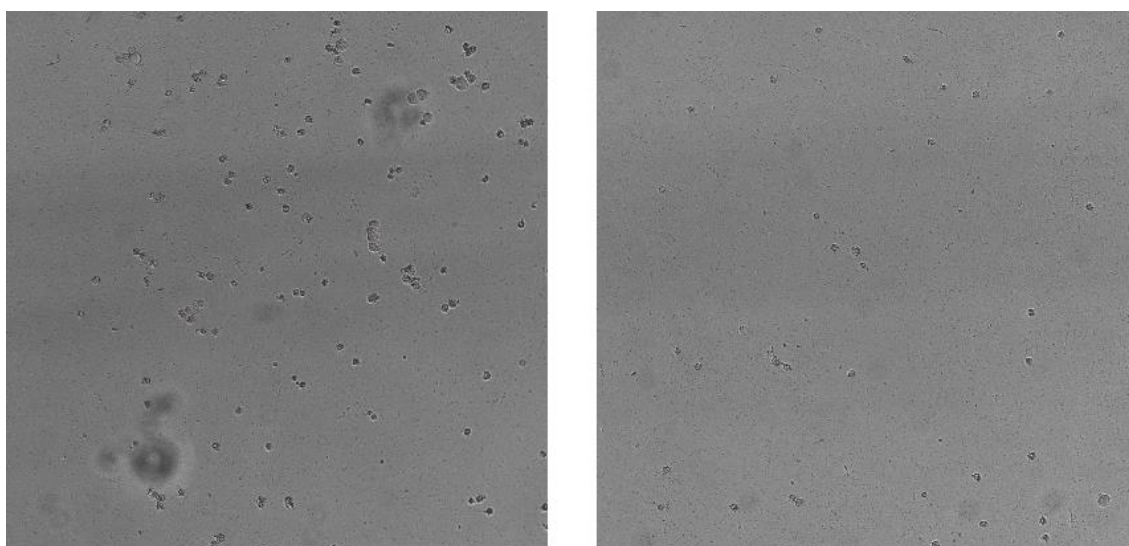
Obrázek 32: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 1 (pDNA 2,77 $\mu\text{g/ml}$, PEI 2,27 $\mu\text{g/ml}$) a vzorek 2 (pDNA 5,45 $\mu\text{g/ml}$, PEI 2,22 $\mu\text{g/ml}$)



Obrázek 33: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 3 (pDNA 8,02 $\mu\text{g/ml}$, PEI 2,18 $\mu\text{g/ml}$) a vzorek 4 (pDNA 10,50 $\mu\text{g/ml}$, PEI 2,14 $\mu\text{g/ml}$)



Obrázek 34: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 5 (pDNA 5,44 $\mu\text{g/ml}$, PEI 4,44 $\mu\text{g/ml}$) a vzorek 6 (pDNA 7,90 $\mu\text{g/ml}$, PEI 6,53 $\mu\text{g/ml}$)



Obrázek 35: Snímky transfekovaných buněk; zleva – vzorek 7 (pDNA 10,45 $\mu\text{g/ml}$, PEI 8,53 $\mu\text{g/ml}$) a vzorek 8 (pDNA 12,94 $\mu\text{g/ml}$, PEI 10,44 $\mu\text{g/ml}$)