

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Elektrofyzilogické studie geneticky kódované fluorescentní sondy napětí ArcLight**

Bakalářská práce

**Kristýna Sládková**

Školitel: Josef Lazar, Ph.D.

České Budějovice 2018

Bakalářská diplomová práce:

**Sládková K. (2018):** Elektrofyzilogické studie geneticky kódované fluorescentní sondy napětí s názvem ArcLight. [Electrophysiological studies of genetically encoded fluorescent probe ArcLight. Bc. Thesis, in Czech] 41p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

Elektrické signály jsou charakteristickým znakem nervové aktivity. K tomu, abychom pochopili fungování mozku, musíme být schopni sledovat tyto elektrické signály. Slibný způsob sledování elektrických signálů v neuronech zahrnuje použití fluorescentního proteinu citlivého na napětí a optický mikroskop. Jeden z nejlepších fluorescentních proteinů citlivých na napětí je ArcLight. Cílem této práce bylo zjistit molekulární mechanismus funkce tohoto konstruktů. Nejdříve jsou v této práci popisovány metody, které se zabývají měřením membránového potenciálu a s ním spojených změn intenzity fluorescence. V poslední části jsou uvedeny výsledky našeho mikroskopického pozorování.

### **Annotation**

Electrical signals are a hallmark of neuronal activity. In order to understand how the brain works, we need to be able to visualize the electrical signals. A promising way to observe the electrical signals in neurons involves using a voltage sensitive fluorescent protein and an optical microscope. One of the best voltage sensitive fluorescent proteins is ArcLight. The aim of this work was to investigate the molecular mechanism of the function of this construct. First, this work describes methods for measuring membrane potential and associated changes in fluorescence intensity. The last part presents the results of our microscopic observation.

**Prohlášení:**

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

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Kristýna Sládková

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Josefu Lazarovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Tímto bych chtěla také poděkovat A. Bondarovi, A. Brzákové a I. Iermak za pomoc, hlavně v začátcích. V neposlední řadě děkuji své rodině za plnou podporu.

## Obsah:

1. Úvod .....	1
2. Buněčná membrána .....	2
2.1 Struktura buněčné membrány .....	2
2.2 Transport látek cytoplasmatickou membránou .....	3
2.2.1 Iontové kanály .....	5
2.2.2 Přenašečové proteiny (transportéry) .....	5
3. Fyziologie nervové soustavy .....	6
3.1 Signalizace v nervových buňkách .....	6
3.1.1 Membránový potenciál .....	7
3.1.2 Akční potenciál .....	8
3.2 Synapse .....	10
4. Metody studia fyziologie nervové soustavy .....	10
4.1 Principy fluorescenční mikroskopie .....	11
4.1.1 Fluorescence .....	11
4.1.2 Fosforescence .....	11
4.1.3 Zpožděná fluorescence .....	11
4.1.4 Princip fluorescenčního mikroskopu .....	12
4.1.5 Fluorescentní proteiny .....	13
4.2 Metody zkoumání membránového potenciálu .....	14
4.2.1 Metody zkoumání membránového potenciálu bez využití fluorescence .....	14
4.2.1.1 Buněčná elektrofyziologie .....	14
4.2.1.2 Metoda druhé harmonické emise (second-harmonic imaging microscopy) ...	16
4.2.2 Metody využívající fluorescenci .....	16
4.2.2.1 Metoda FRET .....	17
4.2.2.2 Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM) .....	18
4.2.2.3 Použití barviv citlivých na napětí .....	19
4.2.2.4 Geneticky kódované sondy .....	21
5. ArcLight .....	24
6. Cíle práce .....	25

6.1	Dílčí cíle.....	26
7.	Materiál a metody.....	26
7.1	Použité metody.....	27
7.1.1	Molekulární metody.....	27
7.1.2	Mikroskopické pozorování (elektrofyzologie) .....	28
7.1.3	Vyhodnocování výsledků z mikroskopického pozorování.....	29
8.	Výsledky.....	31
9.	Diskuze.....	37
10.	Závěr .....	38
11.	Seznam citované literatury .....	39

# 1. Úvod

Řídící orgánovou soustavou u savců je nervový systém, který zachycuje a zpracovává informace a řídí mnoho funkcí organismu. Základní funkční a anatomickou jednotkou nervového systému je neuron. Rozlišují se celkem 3 typy neuronů podle jejich funkce. Aferentní neurony mají schopnost přijmout určitou formu signálu, modifikovat ho a následně ho vést prostřednictvím synapsí na další neurony až do řídicího centra mozku, kde dochází k jeho integraci. Na opačném principu fungující eferentní neurony, které zpracovávají informace z mozku a ovlivňují tak funkci efektoru. Interneurony přenášejí signály v rámci specifických oblastí centrální nervové soustavy. Přenos signálů probíhá na základě změny elektrického napětí na buněčné membráně neuronu<sup>1</sup>.

Základním cílem neurobiologie je porozumění všem aspektům lidského chování, a to na úrovni přenosu a zpracování informací neurony a nervovými sítěmi. Tyto nervové procesy probíhají prostřednictvím změn koncentrací iontů, které vedou ke změnám elektrického napětí na buněčné membráně, které se projeví jako elektrické signály<sup>1</sup>. V současné době probíhá intenzivní výzkum, jehož cílem je vyvinutí a vylepšení optických metod sloužící k pozorování elektrických signálů probíhajících v neuronech a neuronových sítích.

Cílem této práce bylo zjištění principu fungování konstruktů ArcLight vyvinutého Vincentem Allenem Pieribonem a Lawrence B. Cohenem Ph.D. v laboratoři buněčné a molekulární biologie Yale University School of Medicine<sup>2</sup>. Zaznamenává změny membránového potenciálu a přenáší je v optické signály. Svou účinností je zařazován mezi sondy s velmi vysokou citlivostí na elektrické napětí<sup>2</sup>. Tato práce nejdříve podává ucelený přehled metod pozorování membránového potenciálu a v posledních částech se zabývá zmíněným konstruktem ArcLight a výzkumem jeho mechanismu funkce.

## 2. Buněčná membrána

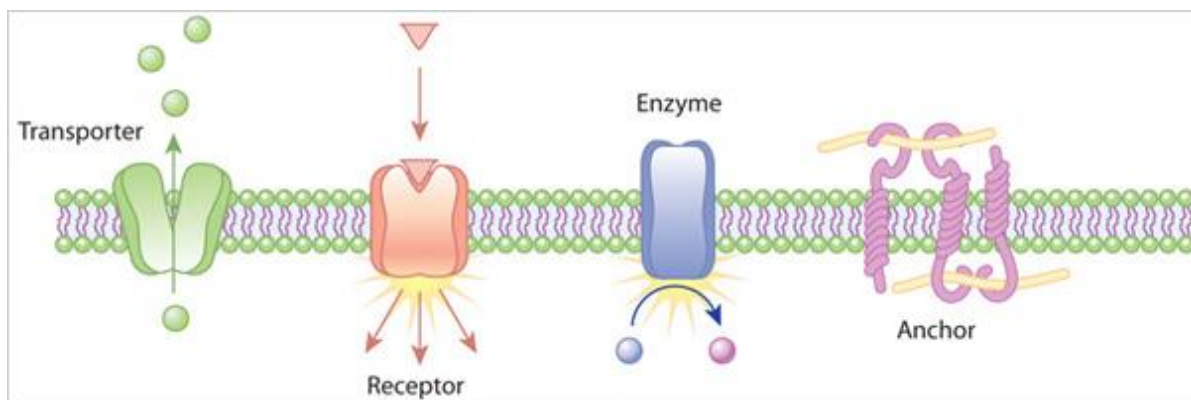
### 2.1 Struktura buněčné membrány

Velmi důležitou roli v buňce hraje plasmatická membrána, která uzavírá buňku a definuje její hranice. Plasmatická membrána od sebe odděluje dvě naprosto odlišná prostředí. Díky ní si buňka zachovává své charakteristické vnitřní vlastnosti<sup>1</sup>.

Každá buněčná membrána sestává z lipidové vrstvy tenké asi 5 nm. Molekuly lipidů v plasmatické membráně jsou amfipatické, mající hydrofilní (polární) hlavičku a dva hydrofobní (nepolární) uhlovodíkové konce. Amfipatický charakter molekul membránových lipidů způsobuje spontánní tvorbu lipidové dvojvrstvy vycházející z jejich schopnosti vytvářet specifické interakce s vodou. Z hlediska energetické náročnosti je dvojvrstvá struktura nejvýhodnější: hydrofilní hlavičky molekul lipidů jsou v přímém kontaktu s vodou na povrchu lipidové dvojvrstvy a hydrofobní konce jsou orientovány směrem dovnitř dvojvrstvy a tak chráněny před vodou<sup>1</sup>.

Přítomnost hydrofobních uhlovodíkových konců uvnitř lipidové dvojvrstvy znemožňuje průchod většiny polárních molekul. Tato vlastnost je velmi důležitá z hlediska udržení stálých koncentrací látek uvnitř buňky, které jsou obecně odlišné od koncentrací vně. Neprostupnost membrány je klíčová pro regulaci transportu důležitých živin do buňky a naopak při vylučování odpadních metabolických produktů. K těmto procesům slouží specializované transmembránové proteiny, zodpovědné za transport specifických iontů nebo molekul<sup>1</sup>.

Přítomnost specializovaných membránových proteinů umožňuje mj. vznik iontového gradientu napříč membránou. Tento iontový gradient je buňkou využíván např. k syntéze významných energetických přenašečů (ATP, GTP) potřebných k mnoha procesům v buňce spotřebovávajících energii, nebo také k transmembránovému transportu molekul. Další důležitou funkcí využívající gradient iontů je produkce a přenos elektrických signálů v nervových a svalových buňkách. Důležitou funkci v membráně mají též proteiny fungující jako receptory extracelulárních signálů, které umožňují změnu chování jako důsledek působení vnějších vlivů<sup>1</sup>.

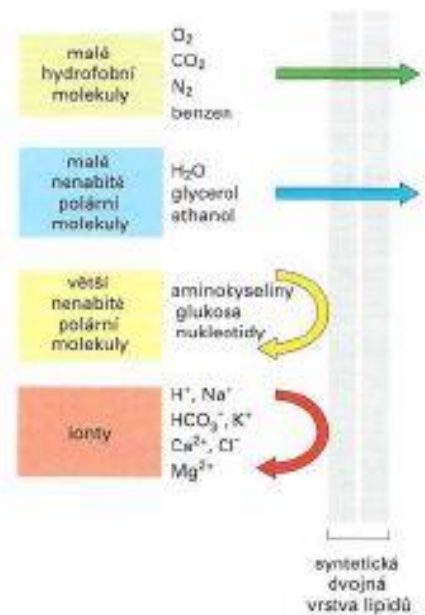


Obr. 1: Znárodnění funkce membránových proteinů. Zleva: transportéry zprostředkovávají přenos látek přes buněčnou membránu; receptory detekují přítomnost ligandů a přenášejí informaci o této přítomnosti do nitra buňky; enzymy katalyzují chemické reakce; kotvy zprostředkovávají interakce mezi membránou a proteiny.

## 2.2 Transport látek cytoplasmatickou membránou

Molekuly spontánně procházející cytoplasmatickou membránou do cytosolu buňky difundují po svém koncentračním gradientu. Rychlost transportu je závislá na velikosti gradientu, na velikosti transportované molekuly a na její rozpustnosti v tucích. Čím menší a více rozpustná molekula je (například  $O_2$  a  $CO_2$ ), tím lépe difunduje napříč membránou. Naopak lipidová dvojvrstva je nepropustná pro nabitě molekuly (ionty). Za transport těchto polárních molekul jsou zodpovědné membránové proteiny prostupující membránou. V cytoplasmatické membráně se nacházejí dva druhy těchto membránových proteinů: přenašeče a iontové kanály. Transport rozpuštěných látek těmito proteiny probíhá na základě změny konformace proteinových přenašečů nebo v tvorbě vodních pórů v případě iontových kanálů<sup>1</sup>.





Obr. 2: Propustnost syntetické dvojně vrstvy lipidů pro jednotlivé třídy molekul. Malé hydrofobní a nenabitě molekuly snadno prochází dvojnou vrstvou lipidů ( $O_2$ ,  $H_2O$ , ethanol). Naopak mnohé látky, které buňka využívá jako živiny (aminokyseliny, glukosa), jsou moc velké a polární na to, aby mohly projít skrz. K jejich transportu slouží membránové proteiny umístěné v plasmatické membráně buněk<sup>1</sup>.

Klasifikace některých transportních proteinů založených na mechanice a energetice<sup>3</sup>:

#### 1) Kanály

- a. Napětově řízené kanály ( $Na^+$  kanály)
- b. Chemicky regulované kanály (Nikotinový acetylcholinový receptor)
- c. Jiné (neregulované, citlivé na tlak, atd.)

#### 2) Transportéry

- a. Pasivní uniporty (Glukosový transporter v erytrocytu)
- b. Aktivní transportéry
  - i. Primárně aktivní
    1. Spojené s redukcí (Oxidáza cytochromu c)
    2. Spojené se světlem (Bakteriorhodopsin)
    3. ATPázy ( $Na^+ / K^+$  -ATPáza)

- ii. Sekundárně aktivní transportéry
  - 1. Symporty (laktoza – permeasa)
  - 2. Antiporty (Band 3)

### **2.2.1 Iontové kanály**

Iontové kanály nebo póry jsou charakterizovány jako bílkovinné kanály procházející cytoplasmatickou membránou. Přenos iontů přes membránu probíhá prostřednictvím specifických míst přítomných na iontových kanálech. Tato vazebná místa jsou dostupná z obou stran cytoplasmatické membrány a jsou všechna otevřená ve stejný čas jako důsledek navázání určitého typu ligandu, který vyvolá jeho otevření. Samotný přesun iontů z jedné strany membrány na druhou nevyžaduje konformační změnu<sup>3</sup>.

Iontové kanály obecně vykazují iontovou selektivitu. To znamená, že jen určitý anorganický iont je schopen projít určitým iontovým kanálem. Transport je tedy omezen velikostí a nábojem přenášených iontů. Systém zavírání a otevírání iontových kanálů umožňuje regulaci toku iontů napříč buněčnou membránou. Otevírání kanálů probíhá jako odpověď na specifický podnět, kterým může být navázání určitého typu ligandu (chemicky regulované kanály), změna elektrického napětí buněčné membrány (napětově řízené kanály) nebo mechanický stres. Aktivita iontových kanálů může být dále modulována fosforylací/defosforylací a dalšími procesy<sup>1</sup>.

### **2.2.2 Přenašečové proteiny (transportéry)**

Tyto proteiny membránového transportu jsou tvořeny polypeptidovým řetězcem, který několikrát prostupuje cytoplasmatickou membránu, jsou tedy transmembránovými proteiny. Jejich prostřednictvím jsou transportovány malé organické molekuly nerozpustné v tucích<sup>1</sup>. Translokace rozpuštěných látek probíhá pomocí vazebných míst přítomných na jedné straně cytoplasmatické membrány. K jejich přenosu je vyžadována reverzibilní změna konformace transmembránových proteinů<sup>3</sup>.

Rozpuštěné látky mohou být přenášeny pasivním transportem (po svém koncentračním gradientu, bez spotřeby energie) nebo aktivním transportem (proti koncentračnímu gradientu, spřažením s reakcí, při které se uvolňuje energie)<sup>3</sup>.

V rámci pasivního transportu rozlišujeme uniporty, které přenáší pouze jednu molekulu. Příkladem takové reakce může být přenos glukózy pomocí přenašeče nacházejícího se v membráně savčích jaterních buněk (hepatocytů)<sup>3</sup>.

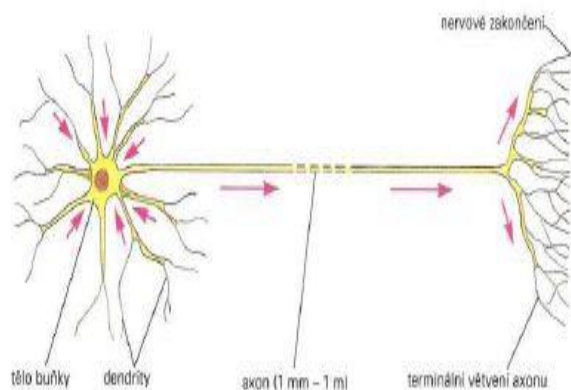
Aktivní transport probíhá na základě primárně aktivních a sekundárně aktivních transportérů, které jsou navzájem spřaženy. Primárně aktivní transport způsobí akumulaci rozpuštěných látek na jedné straně cytoplasmatické membrány proti svému koncentračnímu gradientu a takovýto gradient je poté využit sekundárně aktivními transportéry k transportu dalších látek přes membránu. Většina primárně aktivních transportérů jsou iontové pumpy, kdy je přenos iontů spojen s chemickou nebo fotochemickou reakcí uvolňující energii. Příkladem je bakteriorhodopsin, který využívá energii uvolněnou absorpcí fotonu viditelného záření. Příkladem sekundárně aktivních transportérů je laktózová permeáza z bakterie *Escherichia coli*, využívající elektrochemický gradient vytvořený v elektron-transportním řetězci. Tento typ transportéru patří mezi symporty, kdy jsou protony a laktóza přenášeny současně ve stejném směru. Současný přenos solutů v opačném směru se nazývá antiport a příkladem je sodno-draselná pumpa, která zprostředkovává přenos iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  přes buněčnou membránu<sup>3</sup>.

## **3. Fyziologie nervové soustavy**

### **3.1 Signalizace v nervových buňkách**

Základní funkcí nervových buněk je zachytit, zpracovat a přenášet elektrické signály. Každý neuron se skládá z těla buňky a z dlouhých tenkých výběžků zvaných axony a dendrity. Každý neuron má většinou jeden dlouhý axon, který vede signály od těla buňky ke vzdáleným cílovým buňkám a několik kratších dendritů, které zvětšují povrch pro příjem signálů z axonů ostatních neuronů. Přenos signálu nervovými buňkami probíhá na základě změny elektrického potenciálu přes plasmatickou membránu neuronu, šířící se po jeho celé délce<sup>1</sup>.

Tato kapitola tedy slouží k porozumění základním principům membránového potenciálu, jeho modifikaci v akční potenciál a přenosu tohoto signálu nervovými sítěmi coby základní funkce signalizace v nervových buňkách.



Obr. 3: Schéma neuronu. Červené šipky znázorňují příjem a vedení signálů. Příjem signálu začíná na dendritech od axonů ostatních neuronů, zatímco jeden dlouhý axon odvádí signál až k dendritům dalších neuronů či k nervovým zakončením<sup>1</sup>.

### 3.1.1 Membránový potenciál

Nositeli elektrického náboje ve vodných roztocích a buňkách jsou ionty, které jsou buď kladně nabitě (kationty) nebo záporně nabitě (anionty). Jejich nerovnovážným rozložením na obou stranách cytoplasmatické membrány dochází ke vzniku elektrického membránového potenciálu. Membránový potenciál slouží jako hnací elektrická síla pro mnoho biologických procesů v buňkách a je základem správného fungování živých organismů<sup>1</sup>.

Membránový potenciál je udržován především sodno-draselnou pumpou, která zajišťuje aktivní transport iontů přes plasmatickou membránu. Zároveň funguje jako enzym ATPáza, kdy hydrolyzuje ATP na ADP a uvolněnou energii využívá k transportu iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ . Výsledné nerovnovážné rozložení iontů na buněčné membráně způsobuje, že vnitřek buňky je záporně nabitý oproti jejímu okolí<sup>1</sup>.

Během funkce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy dochází v intracelulárním prostředí k navázání  $\text{Na}^+$  iontů na pumpu. Tento signál způsobí fosforylaci (navázání fosfátové skupiny) ATPázy a uvolnění energie, která slouží ke změně její konformace a následnému přesunu  $\text{Na}^+$  iontů do extracelulárního prostředí. Zde se současně uvolní místo pro navázání iontů  $\text{K}^+$ . To je signál

pro defosforylaci pumpy (odstranění fosforylové skupiny) a pro návrat do její původní konformace, vedoucí k uvolnění  $K^+$  do intracelulárního prostředí buňky<sup>1</sup>.

Transport  $K^+$  iontů probíhá i pasivně, na základě koncentračního gradientu těchto iontů, draslíkovými kanály přítomnými v cytoplasmatické membráně. Tyto kanály mají za následek větší průchodnost buněčné membrány pro ionty  $K^+$  oproti jiným iontům. Ionty  $K^+$  tak po svém koncentračním gradientu mohou vycházet z buňky ven, čímž se na vnější straně buněčné membrány hromadí kladně nabitě ionty<sup>1</sup>.

Každý přenos kladného náboje do okolí buňky však za sebou nechává záporný náboj v buňce. Vzniklý membránový potenciál brání dalšímu pohybu iontů  $K^+$  ven z buňky. V rovnovážném stavu dochází k vyrovnání tendence těchto iontů opouštět buňku na základě jejich koncentračního gradientu a působení elektrostatických sil, které naopak kladně nabitě draslíkové ionty do buňky přitahují<sup>1</sup>.

Stav rovnováhy, kdy není pozorován žádný tok iontů napříč plasmatickou membránou, se nazývá klidový membránový potenciál. Je to ustálený stav, kdy nedochází ke změnám náboje ani na jedné straně membrány. V různých živočišných buňkách má klidový potenciál hodnoty mezi -20 a -200 mV<sup>1</sup>.

### 3.1.2 Akční potenciál

Akční potenciál neboli nervový impuls je elektrický signál, zprostředkovaný napětově řízenými iontovými kanály, které jsou hojně přítomné v plasmatické membráně. Akční potenciál je charakterizován postupným střídáním přesně definovaných fází (viz obr. 4). Důležitými fázemi akčního potenciálu jsou depolarizace a repolarizace<sup>4</sup>.

Depolarizace plasmatické membrány je fáze akčního potenciálu, při níž dochází ke změně membránového napětí na méně zápornou hodnotu. K depolarizaci dochází po příjmu elektrického signálu o dostatečné velikosti. Tento signál způsobí otevření napětově řízených sodných kanálů, které umožňují průchod  $Na^+$  iontů dovnitř buňky po svém koncentračním gradientu. Zvýšení vnitrobuněčné koncentrace kladně nabitých iontů dále depolarizuje membránu, což vede k otevření dalších sodných kanálů, umožňujících vstup dalších iontů  $Na^+$ . Díky tomu, že proces depolarizace se tímto způsobem sám pozitivně ovlivňuje (dochází k tzv. pozitivní zpětné vazbě), i malý vstupní signál, jenž překročí určitý práh, vede k rychlému otevření všech napětově řízených sodíkových kanálů. To vede ke změně hodnot membránového potenciálu z asi -60 mV až na +40 mV. V tomto stavu jsou

koncentrace  $\text{Na}^+$  iontů na obou stranách membrány vyrovnané a nedochází k žádnému transportu těchto iontů dovnitř ani ven z buňky<sup>4</sup>.

Depolarizace membrány spouští opačný proces, repolarizaci. Kromě aktivace sodných kanálů totiž změna membránového potenciálu vede k aktivaci draselných kanálů, umožňujících únik  $\text{K}^+$  iontů z buňky ven po jejich koncentračním gradientu. To způsobí návrat membránového napětí z hodnot akčního potenciálu do klidového stavu. Protože aktivace napěťově řízených draselných kanálů je pomalejší než aktivace sodíkových kanálů, jsou procesy depolarizace a repolarizace od sebe časově oddělené<sup>4</sup>.

Akční potenciál je tedy rychlý výkyv hodnot membránového potenciálu ze záporných hodnot do hodnot kladných a následné vrácení do klidového stavu. Tento signál se dál šíří jedním směrem a je reakcí na příjem signálu o určité velikosti. U živočišných buněk vzniká ve vzrušivých buňkách, tedy neuronech, svalových buňkách a endokrinních buňkách. U neuronů je základem vzájemné komunikace na dlouhé vzdálenosti. U ostatních buněk vyvolává stimulaci intracelulárních pochodů, jako je vznik stahu u svalových buněk nebo sekrece hormonů specifických pro danou endokrinní buňku<sup>4</sup>.

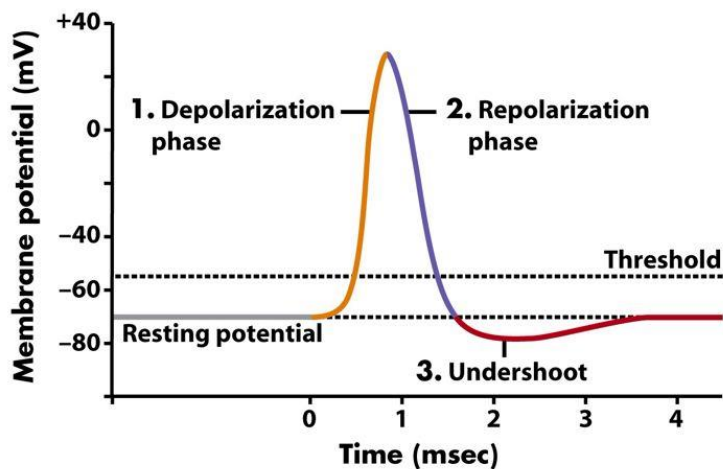


Figure 45-5 Biological Science, 2/e  
© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Obr. 4: Průběh akčního potenciálu. Klidový membránový potenciál je zde -60 mV. Po depolarizaci asi o 20 mV (což je v tomto případě prahová hodnota) nastává akční potenciál. Membrána je dále depolarizována až na kladné hodnoty až kolem +40 mV. Po dosažení maximální hodnoty se membránové napětí opět vrací do klidových záporných hodnot.

## 3.2 Synapse

K přenosu signálu mezi neurony je potřeba nějakým způsobem přenést akční potenciál z jednoho neuronu na další. Předání akčního potenciálu probíhá z nervového zakončení axonu na cílovou buňku (neuron nebo svalovou buňku), a to prostřednictvím specializovaných oblastí styku - synapsí. U člověka se nejčastěji vyskytuje synapse chemická, u níž je přenos elektrických signálů mezi buňkami zprostředkován molekulami neurotransmitterů, tj. chemickými signály. Prostor mezi neurony, přes který probíhá přenos signálu (synaptická štěrbina) je 20 – 50 nm široký a odděluje plasmatickou membránu presynaptické buňky od plasmatické membrány postsynaptické buňky. Depolarizace membrány vyvolaná příchodem akčního potenciálu do nervového zakončení axonu způsobí přechodné otevření napěťově řízených vápníkových kanálů a transport  $\text{Ca}^{2+}$  do cytosolu z okolí buňky. Zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  uvnitř nervového zakončení umožní sloučení synaptických vesikulů obsahujících neurotransmitery s presynaptickou membránou a tím uvolnění jejich obsahu do synaptické štěrbině. Tímto způsobem probíhá změna elektrického signálu v presynaptické membráně v signál chemický<sup>4</sup>.

Neurotransmitery uvolněné do synaptické štěrbině jsou následně zachyceny receptory v postsynaptické membráně cílové buňky. Aktivace receptorů pak způsobí vznik akčního potenciálu těchto buněk a tedy opětovnou přeměnu chemického signálu v signál elektrický. Neurotransmitery jsou následně odstraněny v synaptické štěrbině enzymatickým odbouráním nebo opětovným pohlcením nervovými zakončeními nebo sousedními buňkami, což zajistí zklidnění obou synaptických membrán v místě jejich styku<sup>4</sup>.

## 4. Metody studia fyziologie nervové soustavy

Mozek je nejdůležitějším a nejsložitějším orgánem lidského těla. K pochopení jeho fungování je potřeba vyvinout metody schopné zobrazení pochodů, které v něm probíhají. Nejdůležitějším procesem nervové soustavy je přenos elektrických vzruchů probíhající na základě transmembránového přenosu iontů. K pozorování tohoto přenosu bylo vyvinuto mnoho metod využívajících jako zobrazovací techniku fluorescenci, jsou to tedy optické metody. Jejich prostřednictvím je přímo měřen elektrochemický transmembránový potenciál.

## 4.1 Principy fluorescenční mikroskopie

Mnoho metod zaměřených na zkoumání elektrických vlastností buněk využívá fluorescenci. V této kapitole jsou tedy vysvětleny její principy a souvislosti spojené s jejím využíváním. Kromě fluorescence může dále nastat fosforescence a zpožděná fluorescence. Tyto druhy emisního záření společně s fluorescencí patří mezi luminiscenci, tj. přebytek světelného záření nad tepelným vyzařováním tělesa způsobená emisí světla z elektricky excitovaných stavů elektronů<sup>5</sup>.

### 4.1.1 Fluorescence

Fluorescence je optický jev: schopnost určitých molekul emitovat světlo o vyšší vlnové délce poté, co byly vystaveny světlu vhodných vlnových délek (viditelné světlo, UV záření). Působení elektromagnetického záření vhodné vlnové délky způsobí přechod fluorescentních molekul do elektronicky excitovaného stavu, který je ale nestabilní a nastává deexcitace doprovázená emisí fotonů, která látku navrací zpět do základního energetického stavu. Emisní záření je charakterizováno jako fluorescentní záření<sup>5</sup>.

### 4.1.2 Fosforescence

Fosforescence je jev, při kterém dochází k emisi záření z excitovaného tripletového elektronového stavu. Fosforescence probíhá oproti fluorescenci během delší doby, často během milisekund až sekund (oproti nanosekundám). Fosforescenci běžně nelze sledovat při pokojové teplotě<sup>5</sup>.

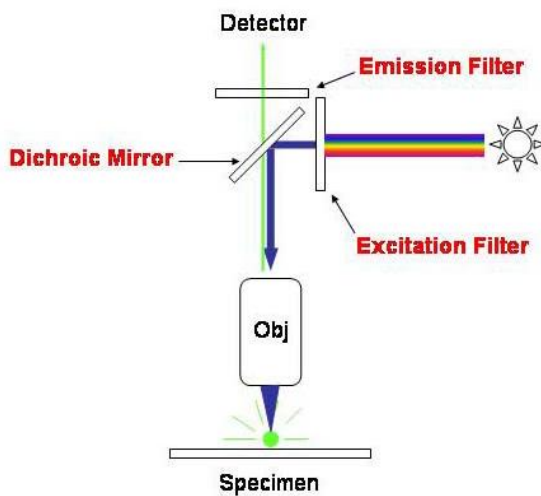
### 4.1.3 Zpožděná fluorescence

Zpožděná fluorescence je, tak jako fluorescence, taktéž zářivý přechod ze singletního stavu (S1), ale její doba dohasínání je prodloužená o čas pobytu molekuly v metastabilním tripletovém stavu<sup>5</sup>.



#### 4.1.4 Princip fluorescenčního mikroskopu

Základní funkcí fluorescenčního mikroskopu je ozářit zkoumaný vzorek světlem určité vlnové délky, které způsobí excitaci fluorescence a poté oddělit požadované fluorescenční záření od excitačního záření a umožnit tak pozorování fluorescence. Toho je dosaženo za pomoci vhodných optických filtrů propouštějících, pohlcujících či odrážejících světlo různých vlnových délek. Světlo z excitačního světelného zdroje nejdříve přichází do kontaktu s excitačním filtrem sloužícím k vymezení vlnových délek použitelných pro excitaci fluoroforu. Propuštěné světlo požadovaných vlnových délek se odráží od povrchu dichroického zrcátka, a po průchodu objektivem mikroskopu dopadá v na zkoumaný vzorek. Za přítomnosti fluorescentních molekul ve vzorku vzniká fluorescenční záření o vlnových délkách delších než záření použité pro excitaci fluorescence. Fluorescenční záření prochází objektivem mikroskopu, prochází dichroickým zrcátkem na emisní filtr, který blokuje nechtěné rozptýlené excitační záření. Fluorescenční záření po průchodu emisním filtrem dopadá na detektor, kterým je nejčastěji citlivá kamera nebo fotonásobič<sup>6</sup>.

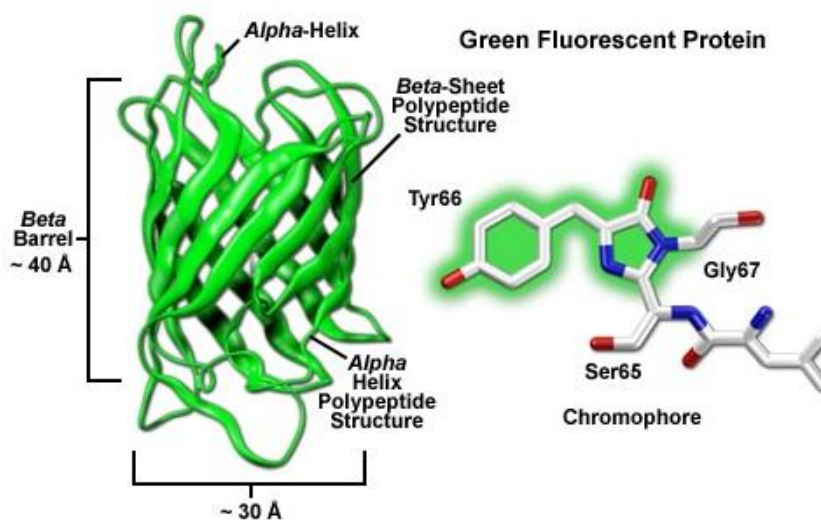


Obr. 5: Schéma fluorescenčního mikroskopu.

### 4.1.5 Fluorescentní proteiny

Fluorescentní proteiny jsou základem téměř všech geneticky kódovaných sond napětí. Prvním objeveným fluorescentním proteinem byl zelený fluorescentní protein (GFP) z medúzy *Aequorea victoria* zásluhou vědce Osamu Shimomura v roce 1962, který za tento přínos v roce 2008 získal Nobelovu cenu. Jejich objev vedl k objasnění dynamických procesů probíhajících v živých buňkách, kdy tato schopnost byla do jejich objevu možná až po fixaci nebo homogenizaci buněk. Navázání fluorescentního proteinu na jiné proteiny umožňuje barevné označení a mikroskopické pozorování různých buněčných struktur přímo v živých buňkách<sup>7</sup>.

Základní strukturou zeleného fluorescentního proteinu je  $\beta$ -souděk složený z 11  $\beta$ -vláken a  $\alpha$ -šroubovice procházející středem soudku. Kovalentně na  $\alpha$ -šroubovici je vázán fluorofor tvořený třemi aminokyselinami (serin 65, tyrosin 66 a glycin 67), které spolu spontánně reagují, čímž vzniká fluorofor, díky němuž fluorescentní proteiny vykazují fluorescenci<sup>7</sup>.



Obr. 6: Struktura zeleného fluorescentního proteinu<sup>8</sup>.

## **4.2 Metody zkoumání membránového potenciálu**

Z pohledu neurovědy a fyziologie buněk je velice důležité pozorovat elektrickou aktivitu buněk v lidském těle (membránový potenciál), a to především nervových buněk, které jsou zodpovědné za aspekty lidského chování. V posledních letech probíhá vývoj geneticky kódovaných sensorů napětí s vysokou citlivostí. Kromě citlivosti je velmi důležitá rychlost odpovědi na změnu membránového potenciálu, kdy je třeba aby časová konstanta byla méně než 1 ms. Předmětem zájmu je zejména současné pozorování elektrické aktivity z více neuronů<sup>9</sup>.

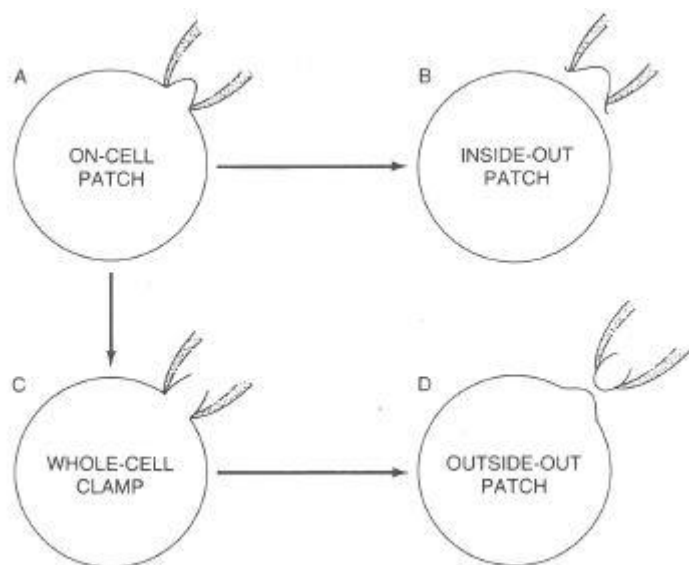
### **4.2.1 Metody zkoumání membránového potenciálu bez využití fluorescence**

#### **4.2.1.1 Buněčná elektrofyziologie**

Tento způsob zkoumání membránového potenciálu neuronů je založen na přímém měření elektrických vlastností buněk a tkání v nervovém systému. Transmembránový přenos iontů je možné měřit extracelulárně, kdy je zjišťována iontová koncentrace na vnější straně plasmatické membrány. Mnohem častěji jsou však užívány intracelulární způsoby detekce změn elektrického napětí na membráně s využitím skleněných elektrod. Tento způsob spočívá v přímém připojení elektrody na jednotlivý neuron.

Tradiční techniky elektrofyziologie využívají k přímému měření elektrických vlastností buněk elektrody. Tyto elektrody jsou v podobě skleněných mikropipet naplněných roztokem se složením obdobným složení cytosolu. Uvnitř mikropipety je kovový vodič, připojený k elektrickému zesilovači, který může zaznamenávat elektrické signály, nebo je naopak generovat, případně obojí. Použité mikropipety by měly mít optimální průměr pro vytvoření správné rezistence a přesné zaznamenání elektrického napětí. Tato velikost je většinou okolo 1  $\mu\text{m}$ .

Mechanismus měření změn membránového potenciálu pomocí mikropipet je využíván metodou patch-clamp. Při této metodě je skleněná mikropipeta umístěna v blízkosti buněčné membrány a jemným sáním je vytvořeno mechanicky stabilní spojení mezi membránou a elektrodou. Tím je umožněno pozorování toku iontů buď v oddělené části membrány nebo v celé buňce, podle celkového uspořádání mikropipety vůči buňce<sup>3</sup>.



Obr. 7: Možnosti připojení skleněné mikroelektrody na buněčnou membránu. A) Jednoduché připojení elektrody na buněčnou membránu (tzv. on-cell konfigurace) umožňující pozorování elektrických vlastností v neporušené buňce. B) Část membrány je připojená na konec elektrody a oddělená od zbytku buňky (tzv. inside-out konfigurace). Vnitřní strana membrány orientována do cytosolu je nyní vystavena vnějšímu prostředí buňky. Tato konfigurace slouží k modifikaci vnějšího prostředí okolo oddělené části membrány. C) Silnější sání aplikovaným prostřednictvím elektrody narušuje membránu a tím je umožněn přístup do vnitřku buňky (tzv. whole-cell konfigurace). Tímto způsobem se měří elektrické vlastnosti celé buňky. D) Pomalé odstranění části membrány může mít za následek opětovné uzavření tohoto místa přes špičku mikroelektrody, ve které má odstraněná část obrácenou orientaci (tzv. outside-out konfigurace) – tzn. vnější část membrány je vystavena do vnějšího prostředí (opak inside – out patch)<sup>3,10</sup>.

Na úrovni jednotlivých buněk poskytuje tato metoda velice dobré výsledky. Umožňuje jak sledování jednotlivých akčních potenciálů, tak i elektrickou stimulaci neuronů. Omezením této metody je obtížné pozorování více než jedné buňky a invazivnost při sledování aktivity neuronů v živých organismech.

#### **4.2.1.2 Metoda druhé harmonické emise (second-harmonic imaging microscopy)**

Tato metoda slouží k optickému nelineárnímu zobrazování s vysokým rozlišením a poskytuje informace o buněčných strukturách a živých tkáních. Může být použita k zobrazování membránových sond s vysokou membránovou specifitou a je vysoce citlivá k detekci membránového potenciálu. Má také schopnost zobrazit vysoce uspořádané strukturální proteiny bez jakéhokoli vnějšího označení. Nevýhodou je potřeba vysoce intenzivního světla, které nepříznivě působí na zkoumané buňky<sup>11</sup>.

Princip druhé harmonické emise spočívá v produkci fotonů o dvojnásobné energii (zdvojnásobení energie má za následek zvýšení frekvence a zároveň snížení původní vlnové délky na polovinu) a to pouze při průchodu světla polarizovatelnými molekulami postrádajícími centrum symetrie (např. anisotropním krystalem nebo rozhraním membrán). Oscilující elektrické pole původního světelného paprsku interaguje s polarizovatelnými molekulami a dochází ke generaci světla o poloviční vlnové délce<sup>11</sup>.

#### **4.2.2 Metody využívající fluorescenci**

Elektrickou aktivitu neuronů je možné sledovat pomocí optických metod založených na množství vyzářené fluorescence. Mezi nejčastější způsoby detekce akčního potenciálu patří aplikace barviv citlivých na elektrické napětí a dále použití geneticky kódovaných sond. K vizualizaci elektrické aktivity buněk pomocí fluorescence lze použít syntetická barviva citlivá na elektrické napětí, avšak jako perspektivnější se jeví využití geneticky kódovaných fluorescentních sond membránového napětí.

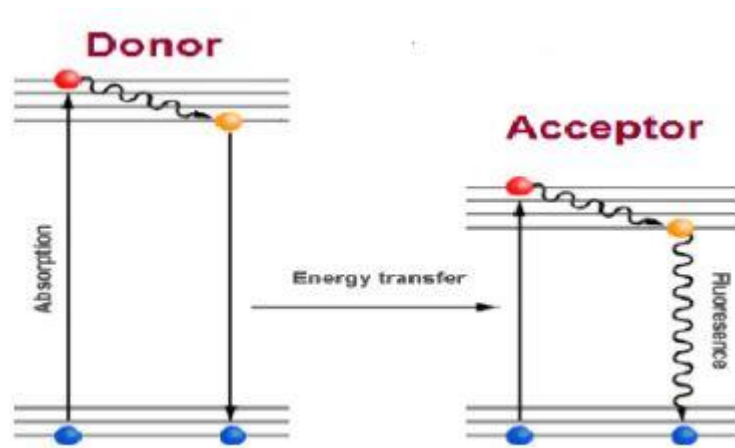
#### 4.2.2.1 Metoda FRET

Současné pokroky ve fluorescenční mikroskopii společně s vývojem nových fluorescentních sond činí metodu FRET (fluorescence resonance energy transfer) velmi silnou a účinnou technikou pro studium molekulárních interakcí v živých buňkách s dobrým prostorovým a časovým rozlišením, vysokou citlivostí, a také širokým spektrem biologických aplikací<sup>12</sup>.

Mechanismus FRET zahrnuje molekulu donoru v elektronicky excitovaném stavu, který může svou excitační energii přenést na molekulu akceptoru v těsné blízkosti nezářivým přenosem prostřednictvím dipól-dipólové interakce. Sám se přitom vrací zpět do základního energetického stavu. K takovému přenosu mezi dvěma fluorescentními molekulami může dojít, pokud se donor a akceptor nacházejí v blízkosti umožňující přenos energie (minimální vzdálenost od 1 do 10 nm) a dále pokud se emisní spektrum donoru překrývá s absorpčním spektrem akceptoru. Po splnění těchto podmínek donor v excitovaném stavu může přenést svou excitační energii na molekulu akceptoru, který se tak excituje do vyšších energetických hladin. Zde molekula dlouho nevydrží a vrací se zpět do základního stavu vyzářením přebytečné energie ve formě fluorescence<sup>13</sup>.

$$K_T = \left(\frac{1}{T_D}\right) \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6$$

Tato rovnice udává rychlost přenosu rezonanční energie ( $K_T$ ), kde  $T_D$  je doba dohasínání fluorescence donoru,  $R_0$  je vzdálenost, která je potřeba pro dokonalý nezářivý přenos energie,  $r$  je vzdálenost mezi donorem a akceptorem<sup>14</sup>.



Obr. 8: Jablonského diagram procesu FRET. Během tohoto procesu nejdříve molekula donoru absorbuje excitační záření, které ho posune do vyššího energetického stavu vůči akceptoru. Pokud jsou molekuly daleko od sebe, nedochází mezi donorem a akceptorem k žádnému přenosu rezonanční energie a excitovaná molekula donoru přebytečnou energii vyzáří ve formě fluorescence. Pokud ale molekuly dosáhnou potřebné minimální vzdálenosti, donor přenáší svou excitovanou energii přímo na akceptor bez vyzáření jakéhokoliv množství fotonů. Akceptor tak získává dostatečné množství energie pro excitaci do vyšších energetických stavů, ale ihned se vrací zpět na svou základní hladinu. Tato změna se projeví vyzářením fluorescence<sup>14</sup>.

#### 4.2.2.2 Metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM)

Novou a účinnou technikou k pozorování membránových proteinů a v nich probíhajících procesů je metoda dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM). Využívá anisotropických vlastností molekuly fluoroforu fluorescentních proteinů, tedy vlastností měnících se v závislosti na orientaci fluoroforu<sup>15</sup>.

Základní vlastností fluoroforu je absorpce energie světla o určité vlnové délce a její opětovné vyzáření ve formě fluorescentního záření (viz Fluorescence). Jednofotonová absorpce a emise jsou charakterizovány dipólovým momentem přechodu (transition dipole moment – TDM). Při jednofotonové (1P) absorpci světla molekulou je rychlost absorpce úměrná druhé mocnině kosinu úhlu mezi vektorem elektrického pole excitujícího paprsku a vektorem přechodového dipólového momentu absorbující molekuly. Pokud je tedy směr vektoru elektrického pole dopadajícího excitačního záření paralelní s vektorem TDM, rychlost absorpce je maximální. Dvoufotonová excitace (2P) je popisována absorpčním

tenzorem, a proto můžou být optické anizotropní vlastnosti fluoroforů komplikované a odlišné od vlastností fluoroforů popisovaných pomocí jednofotonové excitace. Často se však 2P vlastnosti fluoroforů dají popsat vektorem, přičemž rychlost absorpce je úměrná čtvrté mocnině kosinu úhlu mezi vektorem elektrického pole excitujícího paprsku a vektorem přechodového dipólového momentu absorbující molekuly. Dvoufotonová absorpce je tak výrazně citlivější na orientaci fluoroforu než jednofotonová absorpce<sup>15</sup>.

Technika 2PPM umožňuje pozorovat rozdíly v absorpci světla různých polarizací (tzv. lineární dichroismus), a pomocí těchto rozdílů sledovat změny v orientaci fluorescentních proteinů připevněných k membránovým proteinům. Změny v orientaci fluorescentních proteinů způsobené změnami membránového napětí tak umožňují optické sledování změn membránového napětí<sup>16</sup>.

#### **4.2.2.3 Použití barviv citlivých na napětí**

Jedním ze způsobů detekce elektrické aktivity neuronů je použití syntetických barviv citlivých na elektrické napětí (voltage sensitive dyes, VSDs). Tato optická zobrazovací metoda poskytuje možnost zviditelnit aktivitu nervových uskupení s velkým prostorovým (20 – 50  $\mu\text{m}$ ) a časovým (v řádech milisekund) rozlišením<sup>17</sup>.

Po aplikaci barviv dochází k jejich navázání na vnější povrch membrány buněk. Navázané molekuly barviva vykazují změny intenzity fluorescence v závislosti na elektrickém napětí na buněčné membráně. Změny ve vyzážené fluorescenci obecně nastávají během mikrosekund a jsou lineárně korelované se změnami membránového potenciálu obarvených buněk<sup>17</sup>.

Výběr samotného barviva závisí na zkoumaném objektu. Žádné syntetické fluorescentní barvivo není díky svým fyzikálním vlastnostem a interakcím s buněčnými procesy vhodné pro všechny situace. Důležitými vlastnostmi barviva musí být<sup>18</sup>:

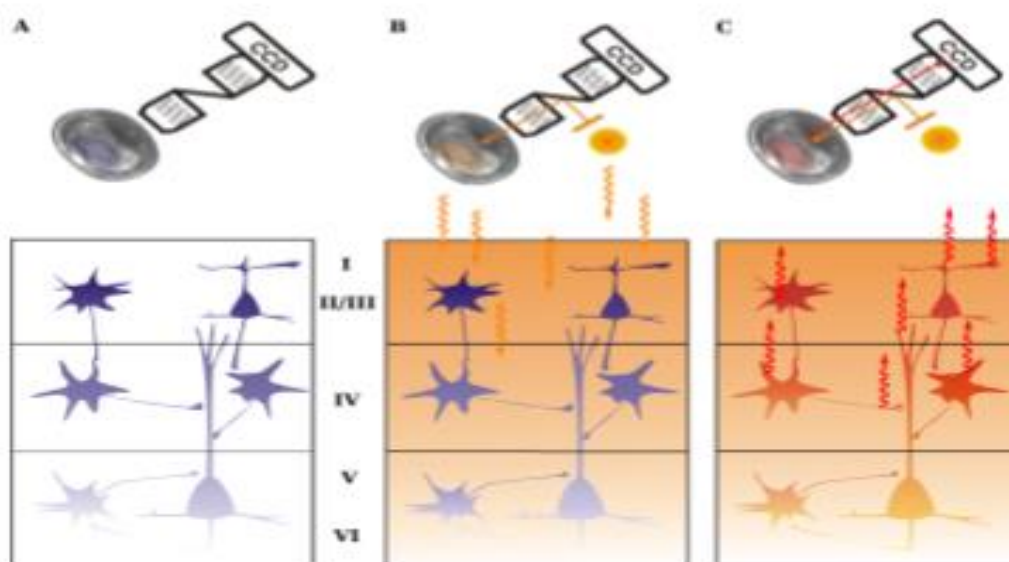
- (a) Fotostabilita – schopnost emitovat miliony fotonů před vyblednutím (ztrátou schopnosti emitovat další fotony).
- (b) Jas – vysoký extinkční koeficient a kvantový výtěžek.
- (c) Změny intenzity fluorescence v čase věrně reprodukuje elektrickou aktivitu buňky
- (d) Excitace a emise vlnovými délkami ve viditelné oblasti elektromagnetického záření



- (e) Slučitelnost s běžnými fyziologickými procesy v buňce
- (f) Komerční dostupnost

Nevýhodou fluorescentních barviv jsou:

- (a) Toxicita – buňky nedlouho po aplikaci barviv hynou.
- (b) Ovlivňování buněčných procesů.
- (c) Vysoké fluorescenční pozadí v důsledku nespecifického obarvení všech přítomných buněk (nejen neuronů) i mezibuněčných prostorů



Obr. 9: Princip použití barviv citlivých na elektrické napětí. Obrázky reprezentují část mozkové kůry s jejími 6 vrstvami. (A) Aplikace barviva, pronikajícího jednotlivými kortikálními vrstvami, na povrch mozkové kůry (B) Všechny nervové a gliální buňky jsou nyní obarveny barvivem. Po osvětlení vhodnou vlnovou délkou světla se barvivo chová jako molekulární převaděč změn membránového potenciálu na optické signály. (C) Fluorescentní signál (červená šipka) je zachycen kamerou CCD<sup>17</sup>.

#### 4.2.2.4 Geneticky kódované sondy

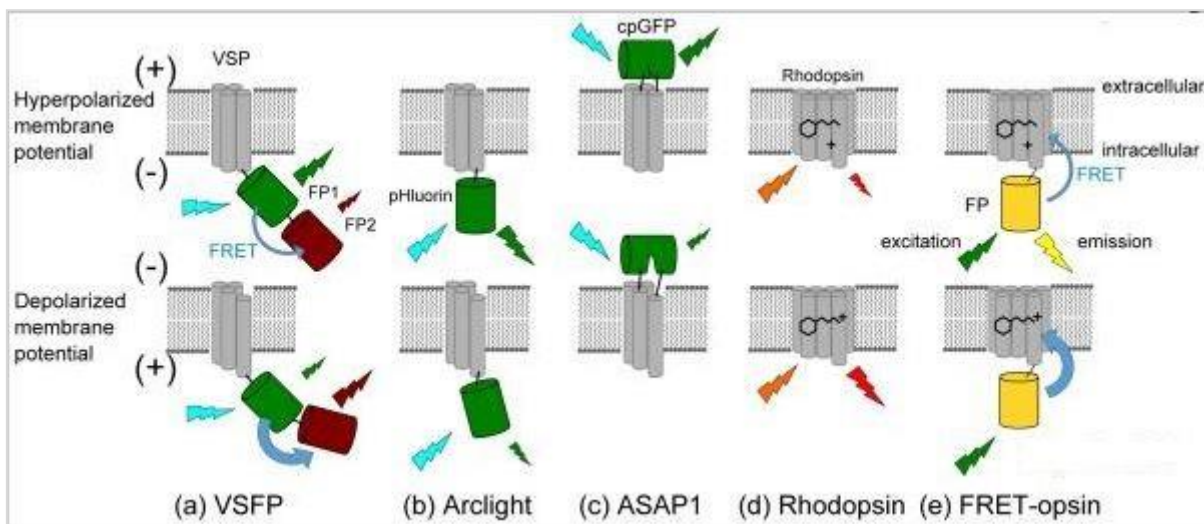
Druhý častý způsob monitorování elektrické dynamiky neuronů pomocí fluorescence je založen na použití geneticky kódovaných sond napětí (GEVIs – Genetically Encoded Voltage Indicators). Vývoj těchto senzorů byl motivován potřebou sledování specifických typů buněk, přičemž jednotlivé oblasti mozku zahrnují množství různých buněčných typů.

První vytvořenou geneticky kódovanou sondu (sondu první generace) napětí představoval senzor FlaSh, který byl vytvořen fúzí napěťově řízeného draselného kanálu se zeleným fluorescentním proteinem (GFP). Značné omezení jeho používání způsobovala malá rychlost (poločas odpovědi kolem 100 ms) a malá velikost ( $\Delta F/F < 5\%$ ) změn fluorescence. Nejdůležitějším omezením však byla funkčnost pouze v žábích oocytech. Další vývoj konstruktů GEVI umožnil expresi v savčích buňkách a postupné zlepšování funkčních vlastností<sup>19</sup>.

V současné době existuje velký počet různých konstruktů GEVI, vyvinutých za použití různých bílkovin citlivých na elektrické napětí a různých způsobů jak tuto citlivost převést na optické signály. Zatímco sensory první generace byly založené výhradně na iontovém kanálu a na něj připojeném fluorescentním proteinu, jejich následný vývoj vedl k záměně iontového kanálu za fosfatázu citlivou na elektrické napětí (ze sumky *Ciona intestinalis*). Takto byly vytvořeny sensory druhé generace<sup>20</sup>. První z nich byl nazván VSFP2 a obsahuje modrý (CFP) a žlutý (YFP) fluorescentní protein, fungující na principu FRET<sup>21</sup>. V takovém případě je rezonanční přenos energie mezi dvojicí fluorescentních proteinů ovlivňován v důsledku relativní změny jejich orientace<sup>20</sup>. Dalším příkladem GEVI je ASAP1, kde centrální roli hraje cirkulárně permutovaný GFP, který je připojený na extracelulární zakončení domény citlivé na napětí. Fluorescence je zde modulována konformační změnou fluorescentního proteinu<sup>22</sup>. Mezi sensory využívající fosfatázu ze sumky *Ciona intestinalis* patří i konstrukt ArcLight, který je předmětem této práce a je podrobněji popsán v kapitole 5.

Ke sledování elektrické aktivity neuronů se dále využívá druhý typ geneticky kódovaných sond napětí využívající mikrobiální rhodopsin. U těchto indikátorů síla transmembránového elektrického pole ovlivňuje pravděpodobnost, s jakou proton protonuje chromofor rhodopsinu – retinal. Tento protonační stav rhodopsinu má vliv na množství vyzařovaných fotonů. Důležitým limitujícím parametrem je u těchto sond jas, který je limitován nízkým fluorescenčním kvantovým výtěžkem retinalu. Tyto sensory proto vyžadují vysokou intenzitu osvětlení k dosažení odpovídajícího poměru signálu a šumu. Připojení fluorescentního proteinu na rhodopsinovou doménu zvyšuje intenzitu

fluorescence a umožňuje sledovat změny napětí metodou FRET<sup>23</sup>. Sondy založené na tomto mechanismu jsou označovány jako FRET-opsin sensors (detailněji popsáno níže – Jas a fotostabilita GEVI).



Obr. 10: Struktury a principy funkce různých geneticky kódovaných sensorů napětí  
a) Konstrukt VSFP, fungující na principu FRET, složený ze 2 fluorescentních proteinů připojených na doménu citlivou na elektrické napětí. Napětím vyvolané konformační změny způsobí posun donoru (FP1) a akceptoru (FP2), změnu jejich vzájemné orientace, a sníženou emisi donoru vůči akceptoru. b) Konstrukt ArcLight složený z jediného fluorescentního proteinu. c) Konstrukt ASAP1 vytvořený sloučením cirkulárně permutovaného fluorescentního proteinu s doménou citlivou na elektrické napětí. d) GEVI založené na mikrobiálním rhodopsinu. e) FRET-opsin sensors – připojení fluorescentního proteinu na rhodopsinovou doménu a fungující na principu FRET<sup>22</sup>.

Pro široké použití geneticky kódovaných sond napětí je potřeba, aby splňovaly několik kritérií<sup>23</sup>.

### 1. Správná buněčná lokalizace GEVIs

Pro pozorování změn elektrického napětí je důležitá správná lokalizace do plasmatické membrány. Sensory, které nejsou správně lokalizovány, sice vykazují fluorescenci, avšak nejsou schopny reagovat na změny elektrického napětí, které probíhají

na buněčné membrán. Suboptimální membránová lokalizace tedy snižuje velikost změn fluorescence v závislosti na elektrickém napětí.

## 2. Nízká fototoxicita

Při vystavení buněk světlu potřebnému k pozorování fluorescence dochází v průběhu času ke změnám morfologie buněk. K výrazným změnám dochází zejména, pokud je doba osvětlení dlouhá, při vysoké intenzitě osvětlení, při použití krátkých vlnových délek nebo v případech opakovaného zobrazování stejných buněk. Takovými podmínkám je tedy třeba se v rámci možností vyhnout.

## 3. Vysoký jas a fotostabilita

K rychlé detekci akčních potenciálů je také potřeba, aby použité GEVIs byly jasné a fotostabilní. Vždy je tedy důležité, aby použité sondy produkovaly dostatek detekovatelných fotonů dostatečně převyšující optický a elektronický šum, který má negativní vliv na měření.

Geneticky kódované sondy se výrazně liší svým jasem. Např. sondy na bázi opsinu často vykazují nízký jas, v důsledku nízkého kvantového výtěžku jejich opticky aktivní složky, retinalu. Novější genetické sondy na bázi opsinu (FRET - opsin sensors), jsou spřažené s fluorescentním proteinem fungujícím jako donor světelné energie v metodě FRET. Elektrické napětí na membráně má v tomto případě sice dopad na absorpční spektrum rodopsinu, tím však ovlivňuje účinnost FRET a tím emisi fotonů ze spřaženého fluorescentního proteinu. Tato metoda tvorby senzorů sloučením fluorescentního proteinu (donor) s opsinem (akceptor) vedla ke zvýšení jasu geneticky kódovaných senzorů napětí.

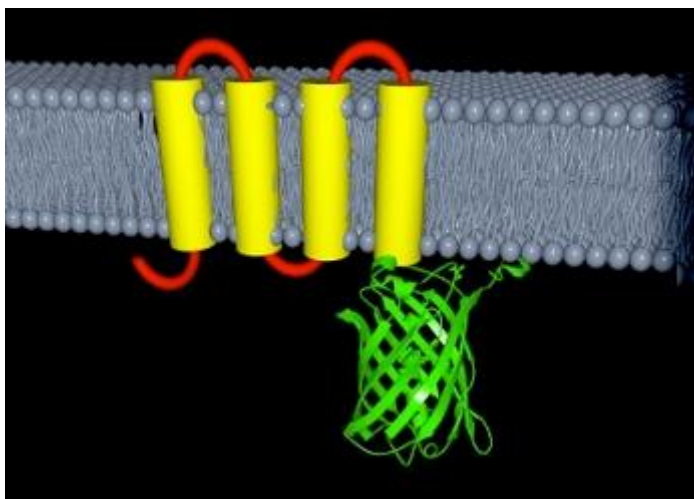
## 4. Vysoká citlivost

Kritickým parametrem pro vyhodnocování GEVIs je jejich citlivost, tj. velikost změny fluorescence v reakci na změny elektrického napětí. První GEVIs vykazovaly poměrně malou citlivost. Citlivost v současnosti nejčastěji používaných GEVI (ArcLight) se pohybuje okolo ~-35% změny fluorescence po depolarizaci z -70 mV na +30 mV. Sondy na bázi opsinu v současnosti vykazují nejvyšší citlivost (nárůst o 90% v porovnání s dříve vyvinutými sensory), avšak jejich využití je omezoáno dalšími faktory, jako je fluorescence pozadí nebo buněčná autofluorescence.

## 5. ArcLight

Použití geneticky kódovaných senzorů napětí k pozorování elektrické aktivity neuronů bylo limitováno malou rychlostí a intenzitou odpovědi na změnu elektrického napětí. Konstrukt ArcLight umožňuje detekci jednotlivých akčních potenciálů i podprahových elektrických pochodů v savčích nervových buňkách na základě standardní světelné mikroskopie<sup>2</sup>.

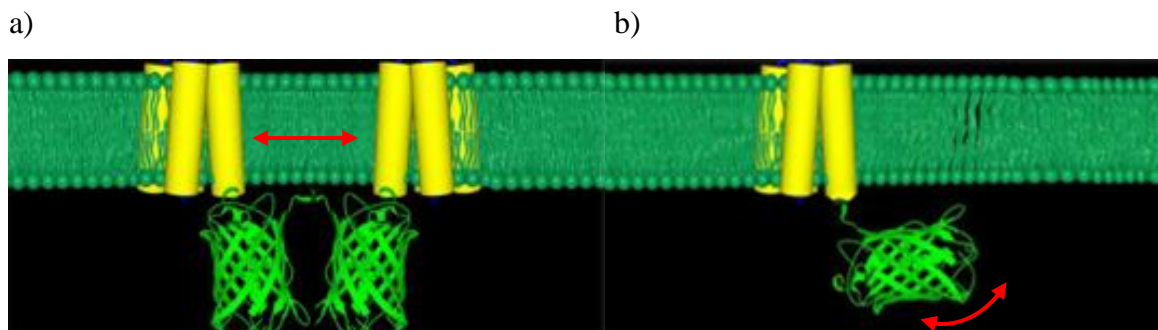
Byl vytvořen zřezováním fosfatázy citlivé na elektrické napětí ze sumky *Ciona intestinalis* s fluorescentním proteinem pHluorinem nesoucím bodovou mutaci A227D<sup>2</sup>. PHluoriny obecně jsou modifikace zeleného fluorescentního proteinu citlivé na pH<sup>24</sup>. Bodová mutace A227D, výrazně zvyšující citlivost fluorescence na elektrické napětí, je přenositelná do ostatních senzorů napětí. Změna fluorescence vyvolaná 100 mV depolarizací je až -30 až -40%.



Obr. 11: Struktura konstruktů ArcLight. Fluorescentní protein pHluorin je připojený na fosfatázu citlivou na elektrické napětí pocházející ze sumky *Ciona intestinalis*<sup>2</sup>.

V souvislosti s mechanismem konstruktů ArcLight byly navrženy 2 hypotézy jeho fungování. První z nich předpokládá, že odpovědí na změnu elektrického napětí je dimerizace fluorescentních proteinů obsažených ve dvou molekulách sondy ArcLight spojená se změnami fluorescence. Druhá hypotéza postulují, že změna konformace domény citlivé na elektrické napětí narušuje strukturu připojeného fluorescentního proteinu čímž snižuje množství fluorescence<sup>16</sup>. Znalost mechanismu této geneticky kódované sondy napětí

umožní cílené vylepšení jejích vlastností a tím i lepší sledování elektrických signálů v mozku a lepší porozumění celé řadě procesů, které se v něm odehrávají.



Obr. 12: Možné mechanismy konstruktů ArcLight. a) Dimerizace fluorescentních proteinů. b) Konformační změna samotného fluorescentního proteinu. V obou případech dochází po aplikaci elektrického napětí ke konformačním změnám fosfatázy ze sumky *Ciona intestinalis*, které jsou přenášeny i na připojené fluorescentní proteiny. To způsobí měřitelné změny intenzity fluorescence. Červené šipky znázorňují (a) dimerizaci/disociaci fluorescentních proteinů nebo (b) změnu konformace fluorescentního proteinu.

## 6. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo zjistit molekulární mechanismus funkce konstruktů ArcLight. K tomu bylo zapotřebí splnění následujících dílčích cílů.

- 1) Zvládnutí technik práce s buněčnými kulturami.
- 2) Zvládnutí techniky buněčné elektrofyzologie.
- 3) Zjištění kinetiky odpovědi konstruktů ArcLight a tím zjištění, zda dochází k dimerizaci nebo konformační změně fluorescenčních proteinů.

## 6.1 Dílčí cíle

### 1) Zvládnutí technik práce s buněčnými kulturami.

Pro dosažení hlavního cíle této práce bylo důležité zvládnutí několika technik práce s buněčnými kulturami. Nejdříve bylo nutné vložit plasmid kódující konstrukt ArcLight do bakteriálních buněk *E. coli*, poté jej z namnožených bakteriálních kultur vyizolovat a nakonec jej tranfekcí vložit do eukaryotních buněk HEK293. Zároveň bylo nutné provádět pravidelné pasážování buněčné kultury a udržování stálé teploty v termostatu (37°C). Po provedení těchto molekulárních kroků byly buňky připraveny k mikroskopickému pozorování.

### 2) Zvládnutí techniky buněčné elektrofyziologie.

V tomto kroku bylo zapotřebí dosáhnout schopnosti měnit membránový potenciál jednotlivých buněk. Bylo tedy nutné prostřednictvím skleněné kapiláry měnit či měřit elektrické napětí na membránách buněk za současného sledování změn fluorescence. Jednotlivá data poté sloužila ke zjištění mechanismu funkce konstruktů ArcLight.

### 3) Zjištění kinetiky odpovědi konstruktů ArcLight a tím zjištění, zda dochází k dimerizaci nebo konformační změně fluorescenčních proteinů.

Konečným dílčím cílem pro správné určení mechanismu konstruktů ArcLight bylo zjištění kinetiky odpovědi tohoto konstruktů na změnu napětí prostřednictvím dat z měření jednotlivých buněk. Pokud kinetika odpovědi závisí na koncentraci sondy ArcLight, mechanismus funkce je pravděpodobně bimolekulární, a tedy zahrnuje dimerizaci. V opačném případě (při nezávislosti kinetiky změn fluorescence na koncentraci) se jedná o monomolekulární mechanismus, tj. o změnu konformace fluorescentního proteinu v důsledku konformačních změn domény citlivé na elektrické napětí.

## 7. Materiál a metody

Během práce v laboratoři byly používány buňky HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cells). Je to buněčná linie odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk pěstovaných v tkáňové kultuře. V molekulární biologii jsou hojně využívány z důvodu

efektivního růstu a vhodných dispozic pro transfekci. Po splnění několika základních molekulárních procesů byly buňky připraveny k mikroskopickému pozorování. DNA konstrukt kódující sondu ArcLight byl získán jako dar od L. Cohena a V. Pieribona (Yale University).

## 7.1 Použité metody

### 7.1.1 Molekulární metody

#### 1) Bakteriální transformace

Transformace je metoda, která slouží k vpravení molekul DNA do bakterií, např. za účelem namnožení molekul DNA do požadovaného množství kopií.

Postup:

- Na ledu bylo smícháno 10  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* a 1  $\mu$ l plasmidové DNA. Směs byla protřepána a ponechána 20 minut na ledu.
- Směs byla ponechána 45 sekund ve vodní lázni o teplotě 42°C a poté vrácena na 10 minut zpět na led.
- Ke směsi bylo přidáno 150  $\mu$ l LB média a následně se 1 hodinu inkubovala při 37°C.
- Po inkubaci bylo 50  $\mu$ l směsi nanášeno na agarové plotny s příslušnými antibiotiky (ampicilin).
- Takto byly vzorky inkubované 10 – 18 hodin při teplotě 37°C, po ukončení inkubace byly plasmidy izolovány.

#### 2) Izolace DNA

Namnožená DNA kódující konstrukt ArcLight byla izolována z buněk bakterií metodou minipreparace za použití kitu High-Speed Plasmid Mini Kit od firmy Geneaid podle protokolu výrobce.

#### 3) Pasážování savčích buněk

Pravidelné pasážování tkáňové kultury je nutné z důvodu udržení vhodných podmínek, které jsou postupným růstem buněk omezeny. Pasážování zamezuje



nadměrnému přerůstání buněk a obnovuje podmínky jejich růstu, tzn. živiny, prostředí, pH apod.

Postup:

Buňky byly udržovány v kultivační nádobě v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), který byl doplněn o fetální bovinní sérum iniciující růst buněčné kultury a antibiotika zabraňující infekci. Při pasážování byl k buňkám přidán fosfátový pufr PBS ke stabilizaci pH. Buňky byly opláchnuty a přebytečný pufr odstraněn. Dále byly buňky uvolněny z podkladu pomocí trypsinu a přeneseny do nové kultivační nádoby společně s novým živným médiem DMEMV tomto kroku je také důležité udržování stálé teploty, proto byly tkáňové kultury po dobu jejich růstu udržovány v termostatu při teplotě 37°C.

#### 4) Transfekce

Transfekce je proces vložení cizorodé DNA do eukaryotních buněk, v tomto případě do buněk HEK293. Transfekce byly prováděny za použití DNA konstruktů ArcLight a transfekčního reagentu Lipofectamine 2000 od firmy Fisher Scientific. Po úspěšné transfekci byly buňky udržovány v termostatu při teplotě 37°C v kultivačním médiu po dobu 24–48 hodin. Po uplynutí této doby jsou buňky připraveny k mikroskopickému pozorování.

### 7.1.2 Mikroskopické pozorování (elektrofyzologie)

Buněčná elektrofyzologie byla prováděna metodou patch clamp, kdy je prostřednictvím skleněné kapiláry měněno či měřeno elektrické napětí na buňkách. Během našeho měření jsme použili kapiláry z borosilikátového skla (vnější průměr - 1,5 mm, vnitřní průměr - 1,17 mm) od firmy Harvard Apparatus. Nejdříve byly tyto kapiláry zformovány vytažením při vhodné vysoké teplotě. To zajistilo vytvoření optimální rezistence (4-6 megaohmů). Poté byly elektrody naplněny interním roztokem, který zajišťuje přenos elektrického signálu a zároveň uvnitř kapiláry vytváří podmínky podobné podmínkám uvnitř buňky. Měření změn membránového potenciálu bylo provedeno pomocí konfigurace whole-cell. Pomocí elektrod bylo měněno elektrické napětí na membráně buňky za současného sledování změn fluorescence.

Tab. I: Použité reagentie a jejich koncentrace pro vytvoření interního roztoku kapilár.

Reagentie	Koncentrace
K-aspartát	120 mM
NaCl	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
EGTA	10 mM
Na <sub>2</sub> ATP	3 mM
HEPES	5 mM

Při buněčné elektrofyzilogii byl měřen proud mezi vnitřkem skleněné mikroelektrody, připojené k buňce, a vnější stříbrnochloridovou elektrodou ponořenou do buněčného média (pufu PBS).

Buňky byly zobrazovány pomocí mikroskopu (Olympus IX71) s objektivem na vodní imerzi (Olympus UApo 40x/1,15 N.A.). Jako excitační světelný zdroj byl použit modrý laser Cobolt 05MLD o vlnové délce 488 nm. Jako optické filtry byly použity dichroické zrcadlo (505DCXR) a emisní filtr (HQ510LP) značky Chroma. Jako elektrofyzilogický zesilovač byl použit HEKA EPC10 USB ovládaný softwarem PatchMaster. Obraz byl promítán na kameru PCO SensiCam QE běžící s frekvencí 30 fps.

### 7.1.3 Vyhodnocování výsledků z mikroskopického pozorování

Hodnoty měření fluorescence jednotlivých buněk byly zanalyzovány a statisticky vyhodnoceny pomocí počítačového programu ImageJ. Díky tomuto programu byly získány hodnoty fluorescence, které byly následně matematicky zpracovány. Výsledkem byly hodnoty parametrů kinetických křivek popisujících změny fluorescence konstruktu ArcLight v čase.

Metodický postup:

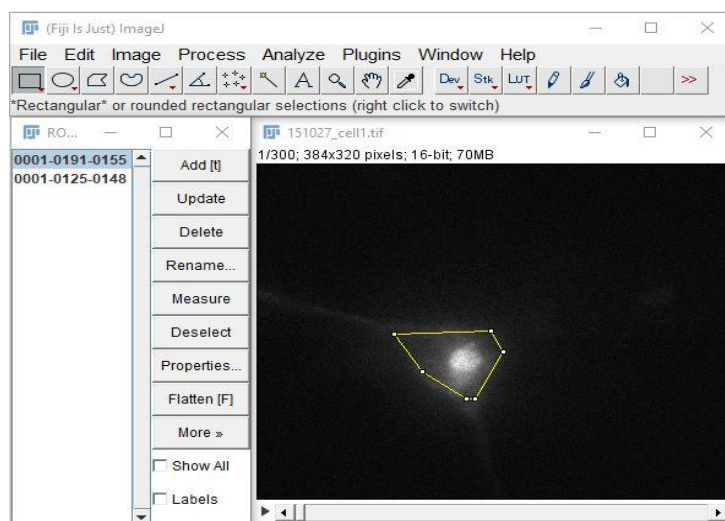
- a) Nejdříve byl každý záznam (sekvence obrázků) fluorescence buňky během aplikace elektrického napětí, převeden do programu ImageJ. V tomto programu bylo změřeno fluorescenční pozadí a odečteno od fluorescence samotné buňky. Takto byly získány hodnoty buněčné fluorescence pro různé časové body.
- b) Naměřené hodnoty byly dále zpracovány v programu MS Excel. Každému obrázku byl přiřazen časový bod. Sekvence obrázků byla rozdělena na část naměřenou během depolarizace membrány a část naměřenou během repolarizace membrány. Každá část byla nafitována exponenciální funkcí ve tvaru

$$F(t) = F_0 e^{-kt}$$

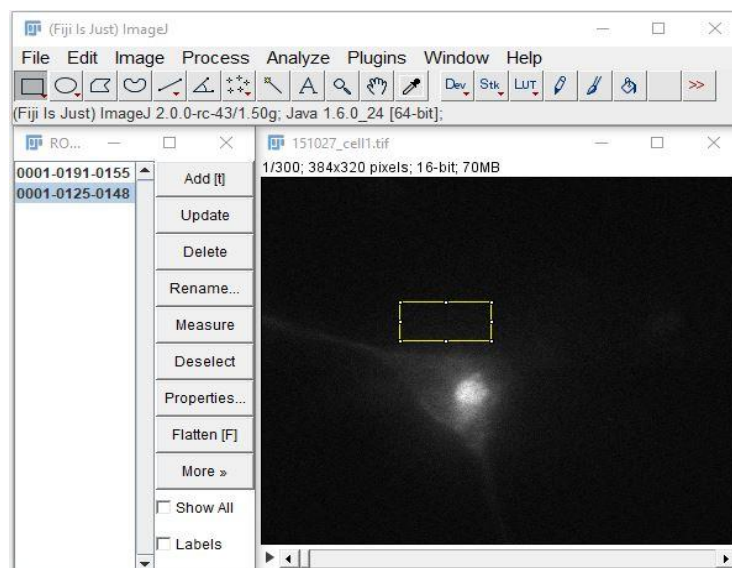
Z parametru  $k$ , získaného fitováním, pak byl spočítán poločas změny fluorescence:

$$t_{1/2}$$

Hodnoty poločasů změn fluorescence jako funkce počáteční intenzity fluorescence byly vyneseny do grafu.



Obr. 13: Buňka HEK293 zobrazená pomocí počítačového programu ImageJ. Žlutým ohraničením je znázorněna část obrázku použitá pro měření intenzity fluorescence uvnitř buňky.



Obr. 14: Buňka HEK293 zobrazená pomocí počítačového programu ImageJ. Žlutým ohraničením je znázorněna část obrázku použitá pro měření hodnot pozadí.

## 8. Výsledky

### 1) Zvládnutí technik práce s buněčnými kulturami.

V tomto projektu byly využity buňky HEK293. Pomocí bakteriální transformace bylo umožněno vložení DNA kódující genetickou sondou ArcLight do buněk *E. coli* a její následné vyizolování. Buněčné kultury byly pasážovány pomocí trypsinizace, připravovány do formy vhodné k pozorování a transfekovány. Konečným bodem při manipulaci s buňkami bylo mikroskopické pozorování změn fluorescence sondy ArcLight.

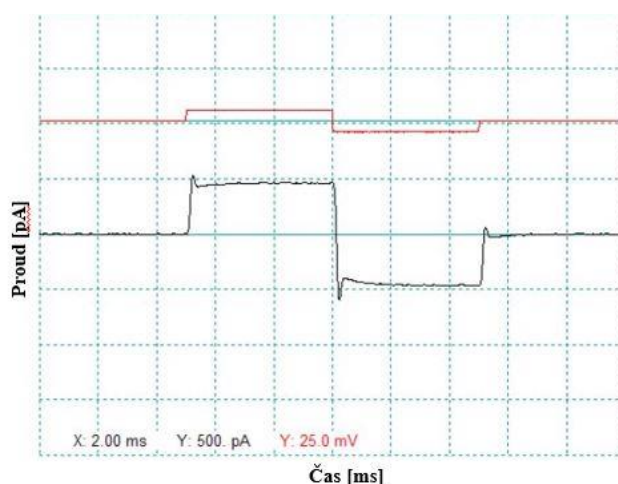
### 2) Zvládnutí techniky buněčné elektrofyziologie.

Tohoto cíle bylo dosaženo prostřednictvím metody patch clamp, kdy byla ke zkoumané buňce připojena skleněná mikroelektroda umožňující měnit elektrické napětí na buněčné membráně. Byla zvládnuta příprava a použití skleněných kapilár zformovaných vytažením při vhodné teplotě, jejich připojení k živé buňce za pomoci mikroskopu a mikromanipulátoru a vytvoření vodivého spojení s vnitřkem buňky pomocí hydraulických a elektrických pulsů.

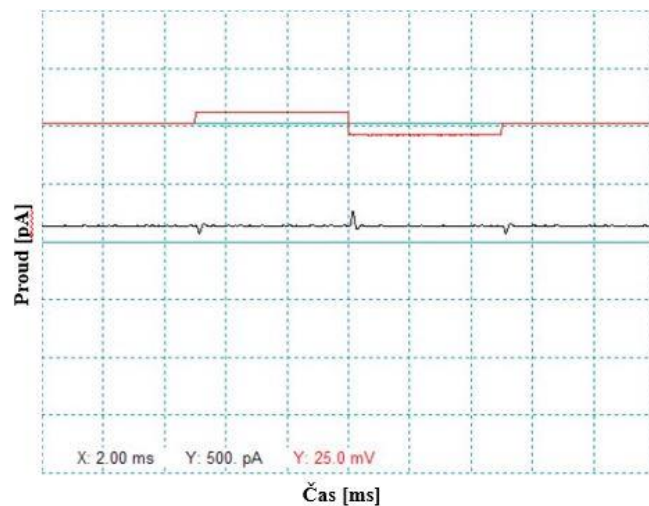
Naše elektrofyzilogické experimenty umožnily mj. rozlišit tři polohy, které může skleněná mikroelektroda zaujmout vůči buňce (viz Obr. 15,16,17).

V případě, že je skleněná mikroelektroda od buňky vzdálená, prochází obvodem v odpoředi na přikládání čtvercové napěťové pulzy přibližně čtvercové elektrické proudy (viz Obr. 15). Obvod vykazuje elektrický odpor (typicky 4-6 megaohmů) daný převážně průřezem otvoru na konci mikroelektrody. Při přiblížení elektrody buňce se pozorovaný odpor zvyšuje v důsledku toho, že blízkost buněčné membrány brání průchodu elektrického proudu.

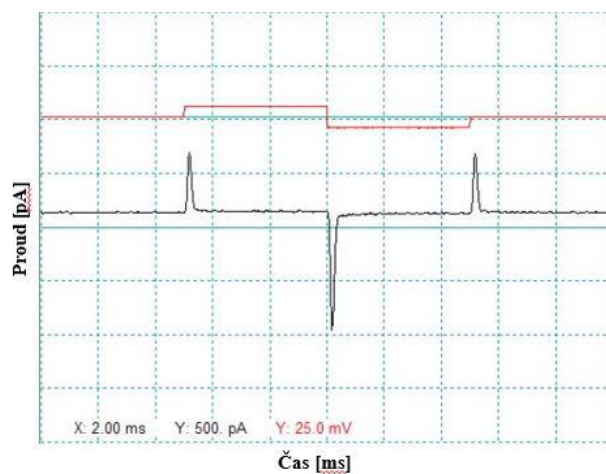
Po připojení mikroelektrody k buněčné membráně (Obr. 16) vzroste odpor elektrického obvodu na hodnoty vyšší než 1 gigaohm. Aplikace napěťových pulsů se projeví pouze malými elektrickými proudy velmi krátkého trvání (tzv. kapacitní proudy) při změnách napětí. V takovém případě napětí přikládání na mikroelektrodu způsobí pouze lokální změnu membránového potenciálu buňky v oblasti styku s elektrodou. Nepochází však k aplikaci napěťových pulsů na celou buňku. Ke změnám membránového potenciálu v celé buňce dochází až po vytvoření vodivého spojení elektrody s nitrem buňky (viz Obr. 17). Spojení elektrody s nitrem buňky se projeví zvětšením velikosti kapacitních proudů a snížením elektrického odporu obvodu na hodnoty okolo 200 megaohmů.



Obr. 15: Záznam elektrických procesů v situaci, kdy elektroda ještě není v kontaktu s buňkou. Červená křivka znázorňuje napěťové pulsy ( $\pm 5$  mV, trvání 5 ms) přikládání na skleněnou mikroelektrodu. Černá křivka zobrazuje naměřený proud procházející mikroelektrodou [pA].



Obr. 16: Záznam elektrických procesů v situaci, kdy je elektroda připojena k buňce (konfigurace on-cell). Připojení k membráně způsobuje vysoký elektrický odpor, takže aplikace napěťových pulsů (červená křivka,  $\pm 5$  mV, trvání 5ms) vede k průchodu pouze velmi malých, transientních, tzv. kapacitních proudů (černá křivka).



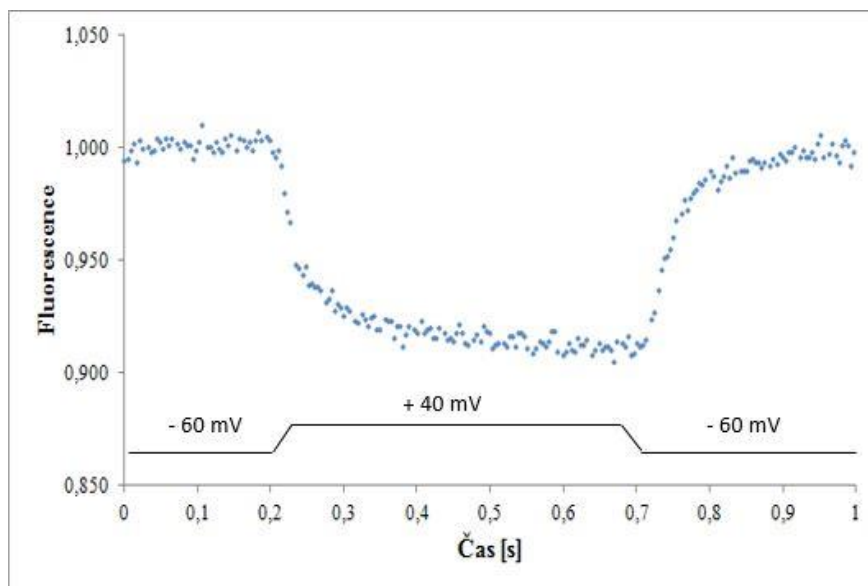
Obr. 17: Záznam elektrických procesů signálu při spojení elektrody s nitrem buňky (konfigurace whole cell). Aplikace napěťových pulsů (červená křivka,  $\pm 5$  mV, trvání 5ms) způsobuje průchod větších proudů (černá křivka) než v konfiguraci on-cell.

Po zvládnutí samotné techniky buněčné elektrofyzologie byla zvládnuta i elektrofyzologie za současného pozorování buněčné fluorescence. Výsledkem byla měření změn intenzity fluorescence sondy ArcLight při změnách elektrického napětí na buněčné

membráně. Tato měření byla následně použita ke zjištění mechanismu funkce konstruktů ArcLight.

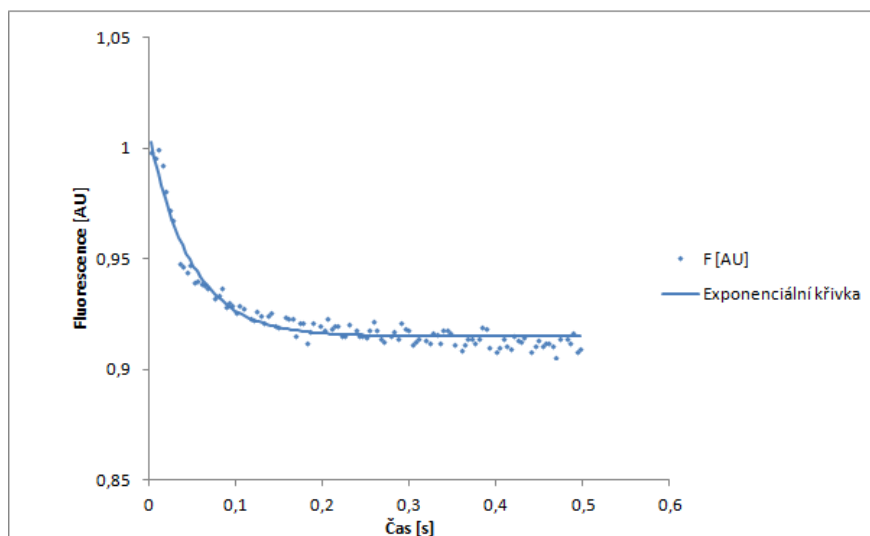
**3) Zjištění kinetiky odpovědi konstruktů ArcLight a tím zjištění, zda dochází k dimerizaci nebo konformační změně fluorescenčních proteinů.**

Časové série obrázků fluorescence byly zpracovány pomocí software ImageJ, čímž byla získána měření kinetiky změn fluorescence (Obr. 18). Naše dosavadní data ukazují, že kinetika odpovědi konstruktů ArcLight nezávisí na jeho koncentraci, či na ní závisí pouze málo (Obr. 21, 22). Při monomolekulárním mechanismu změn fluorescence bychom očekávali, že poločas těchto změn nebude záviset na koncentraci konstruktů. Při znázornění dat ve formě závislosti logaritmu poločasu na logaritmu koncentrace bychom očekávali, že data se budou blížit vodorovné přímce, tj. přímce o směrnici rovné 0. Naproti tomu, při bimolekulárním mechanismu (dimerizaci) bychom očekávali nepřímou úměrnost mezi poločasem změn a koncentrací. Tento vztah lze také vyjádřit tak, že směrnice závislosti logaritmu poločasu na logaritmu koncentrace je rovna -1. Naše výsledky jsou v protikladu s možným dimerizačním mechanismem funkce tohoto konstruktů a v souladu s mechanismem založeným na konformační změně v proteinu ArcLight.

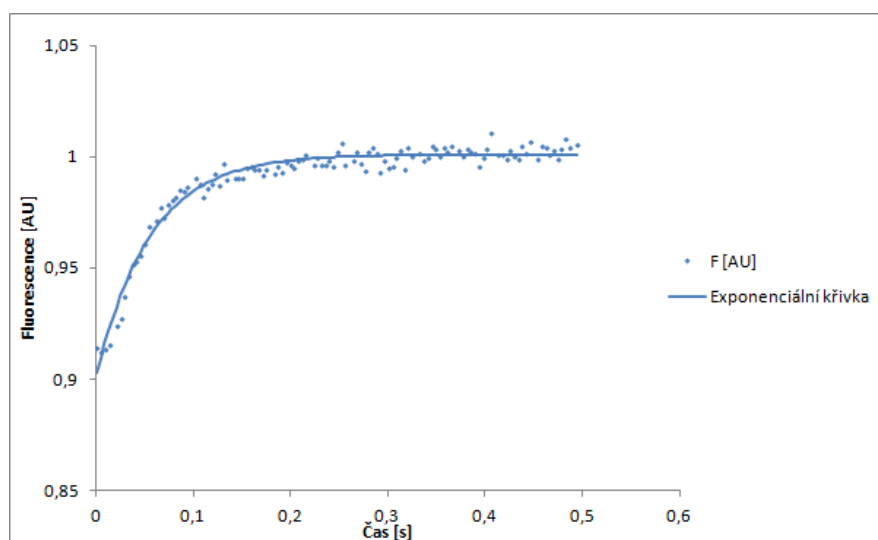


Obr. 18: Změna intenzity fluorescence konstruktů ArcLight po aplikaci elektrického napětí během 500 ms depolarizace. Celkové pozorování změn membránového potenciálu a z nich vyplývajících změn intenzity fluorescence jedné buňky probíhalo

1 s.

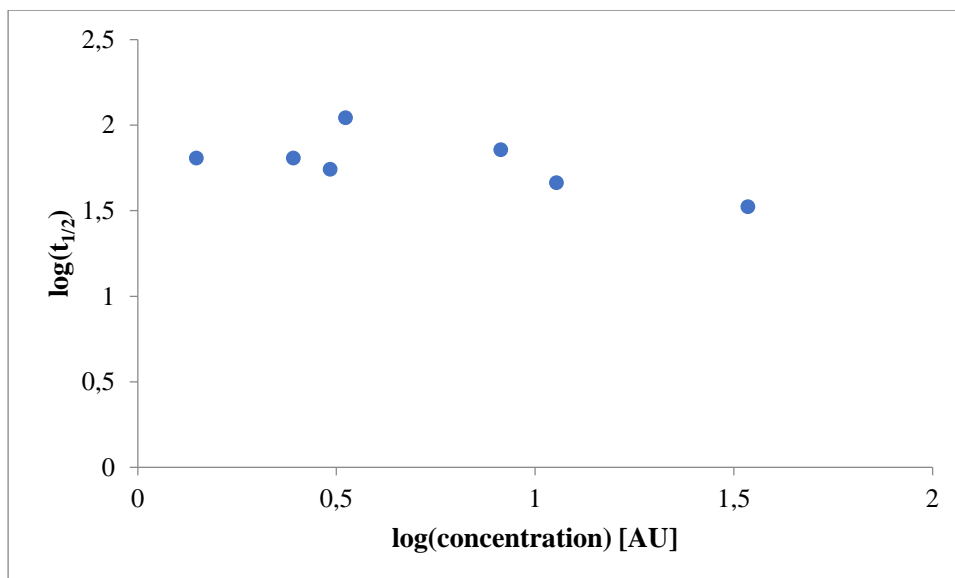


Obr. 19: Exponenciálně vyjádřená změna intenzity fluorescence konstruktů ArcLight v čase během depolarizace ( $t_{1/2} = 33$  ms)

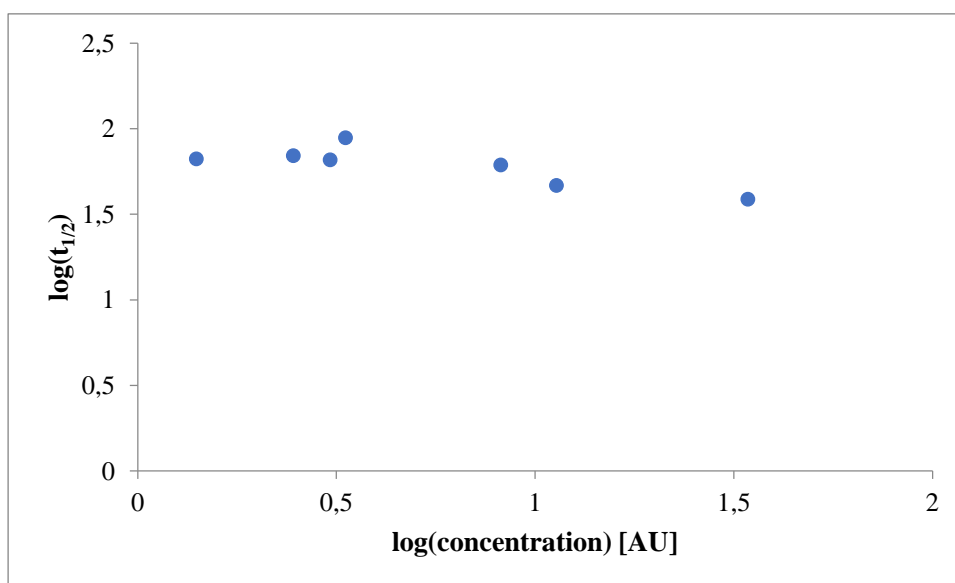


Obr. 20: Exponenciálně vyjádřená změna intenzity fluorescence konstruktů ArcLight v čase během repolarizace ( $t_{1/2} = 39$  ms)





Obr. 21: Závislost rychlosti změn intenzity fluorescence konstruktů ArcLight (vyjádřená jako logaritmus poločas) na koncentraci tohoto konstruktů (logaritmu intenzity fluorescence buněk) při depolarizaci.



Obr. 22: Závislost rychlosti změn intenzity fluorescence konstruktů ArcLight (vyjádřená jako logaritmus poločas) v závislosti na koncentraci tohoto konstruktů (logaritmu intenzity fluorescence buněk) při repolarizaci. Mechanismus funkce konstruktů zahrnující dimerizaci by měl vést k nepřímé úměře, která nebyla pozorována.

## 9. Diskuze

Jedním ze základních cílů v neurobiologii byl již v minulosti vývoj vhodných prostředků ke sledování komunikace mezi buňkami (především mezi buňkami účastnicími se přenosu nervových vzruchů), a to přímo v živých organismech. Tento záměr přetrvává až do současnosti, kdy již existuje řada nástrojů k pozorování mozkových funkcí na buňkách *in vivo*<sup>25</sup>. Existující metody však stále mají významné limity, jako například obtížnost až nemožnost sledování transmembránového napětí ve větším počtu buněk současně u metody patch clamp<sup>25,26</sup>. Jako slibné se jevílo použití barviv umožňující pozorování změn elektrického napětí při vysokém prostorovém i časovém rozlišení. Avšak nevýhodou je fototoxicita a vysoké fluorescentní pozadí z důvodu nespecifického barvení buněk<sup>25,27</sup>.

Mnohé nevýhody může odstranit použití geneticky kódovaných sond napětí. Mohou být zaměřené na geneticky definované skupiny buněk, které jsou předmětem našeho zájmu s minimálním zásahem do struktury buněk. Genetická kontrola také snižuje signál pozadí ze zdrojů, které nejsou cíleně pozorovány, což zvyšuje poměr signálu a šumu. Dále je umožněno současné pozorování větších populací buněk s dobrým prostorovým rozlišením<sup>25</sup>.

První geneticky kódované sondy napětí (FlaSh, SPARC, VSFP 1) byly založeny na napětěově řízeném draselném kanálu nebo jejich doménách. Vykazovaly však nízký poměr signálu a šumu, pomalou kinetiku odpovědi na změny elektrického napětí a špatnou lokalizaci v membránách savčích buněk. Další generace těchto sond (VSFP2, ASAP1, ArcLight) už byla vytvořena sloučením fosfatázy ze sumky *Ciona intestinalis*, které vykazovaly zvýšený jas i kinetiku odpovědi. Zároveň byla umožněna exprese v savčích buňkách<sup>25</sup>.

Geneticky kódovaná sonda napětí ArcLight vykazuje velké změny intenzity fluorescence jako odpověď na změny napětí. Je to dáno nejen přítomností fosfatázy pocházející ze sumky *Ciona intestinalis*, která je citlivá na elektrické napětí, ale také přítomností bodové mutace A227D v proteinu pHluorinu, bez které sonda produkuje velmi malé změny intenzity fluorescence ( $\sim 1\%$ )<sup>2</sup>. Nicméně je stále nejasné, na základě jakého mechanismu je zvýšená intenzita fluorescence modulována. Cílem mé práce bylo tedy zjistit molekulární mechanismus této sondy.

Při zkoumání vlastností sondy ArcLight bylo navrženo, že citlivost tohoto konstruktu na elektrické napětí může souviset s citlivostí použitého fluorescentního proteinu na pH. Bylo prokázáno, že změny fluorescence konstruktu ArcLight během změn napětí nejsou způsobeny změnami pH. Je však možné, že konformační změna v molekule fosfatázy

zvyšuje či snižuje citlivost použitého fluorescentního proteinu na ionty  $H^+$ . Tento proces je nezávislý na koncentraci konstruktů ArcLight a díky tomu by měly být výsledné kinetické odpovědi stejné při různé koncentraci konstruktů<sup>16</sup>.

Další navržená hypotéza předpokládala intermolekulární dimerizaci sondy ArcLight prostřednictvím fluorescentních proteinů. Během hyperpolarizace by měla být umožněna tvorba dimerů fluorescentních proteinů. Depolarizace naopak způsobí přerušení této dimerizace se vznikem monomerů. Rychlost odpovědi by v tomto případě měla být závislá na koncentraci přítomných fluorescentních proteinů. To znamená, že při nízké koncentraci fluorescentních proteinů očekáváme pomalý nástup reakce a naopak větší počet fluorescentních proteinů generuje rychlejší změny intenzity fluorescence<sup>16</sup>.

Naše dosavadní data ukazují, že změna intenzity fluorescence není spojená s dimerizací fluorescenčních proteinů, jelikož nebyla pozorována nepřímá úměra mezi koncentrací konstruktů a poločasem odpovědi na změnu napětí. Naopak, kinetické křivky se jeví v souladu s druhou navrženou hypotézou, tedy s monomolekulárním mechanismem zahrnujícím změnu konformace fluorescentního proteinu. Pro potvrzení této hypotézy je však potřeba získat větší množství dat. Kromě zatím omezeného množství dat by bylo prospěšné i zvýšení kvality dat, např. lepším udržováním konstantní teploty během všech měření. Další podporu by mohly přinést např. měření FRET mezi konstruktem ArcLight a obdobným konstruktem nesoucím modrý nebo červený fluorescentní protein.

## 10. Závěr

Výsledkem práce je pokrok v porozumění mechanismu funkce konstruktů ArcLight. Naše data naznačují, že tento mechanismus je monomolekulární, a tedy nezahrnuje dimerizaci/disociaci, jak bylo navrženo v literatuře. Po získání většího množství dat bude možno o molekulárním mechanismu rozhodnout. Tento výsledek umožní lepší cílený vývoj konstruktů ArcLight, jenž zlepší naše schopnosti sledovat elektrické signály v neuronech pomocí optické mikroskopie.

## 11. Seznam citované literatury

1. **ALBERTS B.; BRAY D.; JOHNSON A.** (1998). Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 630 s.
2. **JIN L.; HAN Z., PLATISA J.; WOOLTORTON R. A. J.; COHEN LB.; PIERIBONE V. A.** (2012). Single Action Potentials and Subthreshold Electrical Events Imaged in Neurons with a Fluorescent Protein Voltage Probe. *Neuron* 75(5), pp. 779-785
3. **GENNIS R. B.** (1989). Biomembranes: Molecular Structure and Function. Springer-Verlag, New York, USA, 533 p.
4. **GOODMAN S. R.** (1998). Medical Cell Biology. Second Edition, Lippincott-Raven Publishers, New York, 320 p.
5. **VALEUR, B.** (2001). Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH Verlag, 381 p.
6. **SPRING K. R.; DAVIDSON M. W.** Introduction to Fluorescence Microscopy [online]. [cit 28. 10. 2017].  
Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
7. **PISTON D. W.; PATTERSON G. H.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ J.; CLAXTON S. N.; DAVIDSON M.W.** Introduction to Fluorescent Proteins [online]. [cit. 28. 10. 2017]  
Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescent-proteins>
8. **PISTON D. W.; CAMPBELL R. E.; DAY R. N.; DAVIDSON M. W.** Introduction to Fluorescent Proteins. Zeiss [online]. [cit. 10. 11. 2017]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>
9. **BRAUNBACH O.; COHEN L.B.; CHOI Y.** (2015). Historical Overview and General Methods of Membrane Potential Imaging. In: Membrane Potential Imaging in the Nervous System and Heart (eds. M. Canepari, O. Bernus and D. Zecevic), Springer International Publishing, Schwitterland, p. 3–4
10. **VEITINGER S.** (2011). The Patch-Clamp Technique. [online] Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>

11. **CAMPAGNOLA P. J.; CLARK H. A.; MOHLER W. A.; LEWIS A.; LOEW L. M.** (2001). Second-harmonic imaging microscopy of living cell. *Journal of Biomedical Optics* 6(3), p. 277–286
12. **SEKAR R. B.; PERIASAMY A.** (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *Journal of Cell Biology* 160(5), p. 629–633
13. **HUSSAIN S. A.; DEY D.; CHAKRABORTY S.; SAHA J.; ROY A. D.; CHAKRABORTY S.; DEBNATH P.; BHATTACHARJEE D.** (2015). Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) sensor. *Journal of Spectroscopy and Dynamics* 5(7)
14. **HERMAN B.; FROHLICH V. C.; LAKOWICZ J. R.; FELLERS T. J.; DAVIDSON M. W.** Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy [online]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro/>
15. **LAZAR J.; BONDAR A.; TIMR S.; FIRESTEIN S. J.** (2011). Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nature Methods* 8, p. 684-690
16. **HAN Z.; JIN L.; CHEN F.; LOTURCO J.J.; COHEN L.B.; BONDAR A.; LAZAR J.; PIERIBONE V. A.** (2014). Mechanistic Studies of the Genetically Encoded Fluorescent Protein Voltage Probe ArcLight. *PLoS ONE* 9(11), p. 1-21
17. **CHEMLA S.; CHAVANE F.** (2009). Voltage-Sensitive Dye Imaging: Technique review and Models. *Journal of Physiology-Paris: Elsevier* 104(1-2), p. 40–50
18. **SELVIN P. R.; TAEKJIP HA.** (2008). *Single-Molecule Techniques: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 507
19. **KAESTNER L.; TIAN Q.; KAISER E.; XIAN W.; MÜLLER A.; OBERHOFER M.; RUPPENTHAL S.; SINNECKER D.; TSUTSUI H.; MIYAWAKI A.; MORETTI A.; LIPP P.** (2015). Genetically Encoded Voltage Indicators in Circulation Research. *International Journal of Molecular Sciences* 16(9), p. 21626–21642
20. **ST-PIERRE F.; CHAVARHA M.; LIN Z. M.** (2015). Designs and sensing mechanisms of genetically encoded fluorescent voltage indicators. *Curr Opin Chem Biol* 27, p. 31–38

21. **DIMITROV D.; HE Y.; MUTOH H.; BAKER B. J.; LAWRENCE C.; AKEMANN W.; KNÖPFEL T.** (2007). Engineering and Characterization of an Enhanced Fluorescent Protein Voltage Sensor. *PLoS ONE* 2(5), e440
22. **GONG Y.** (2015). The Evolving Capabilities of Rhodopsin-based Genetically Encoded Voltage Indicators. *Curr Opin Chem Biol* 27, p. 84–89
23. **YANG H. H.; ST-PIERRE F.** (2016). Genetically Encoded Voltage Indicators: Opportunities and Challenges. *The Journal of Neuroscience* 36(39), p. 9977–9989
24. **SANKARANARAYANAN S.; ANGELIS D.; ROTHMAN J. E.; RYAN T. A.** (2000). The Use of pHluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity. *Biophysical Journal* 79(4), p. 2199-2208
25. **BROUSSARD J. G.; LIANG R.; TIAN L.** (2014). Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7(98), p. 1-17
26. **LIU B.; PINGYANG L.; LI Y.; SUN Y. J.; YANAGAWA Y.; OBATA K.; ZHANG L. I.; TAO H. W.** (2009). Visual Receptive Field Structure of Cortical Inhibitory Neurons Revealed by Two-Photon Imaging Guided Recording. *The Journal of Neuroscience* 29(34), p. 10520–10532
27. **STOSIEK CH.; GARASCHUK O.; HOLTHOFF K.; KONNERTH A.** (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *PNAS* 100(12), p. 7319-7324