

Παραμετροποίηση πρωτοκόλλου καταγραφών whole-cell patch clamp σε κύτταρα HEK293T

ΡΕΜΠΗ Αγγελική^{1,2}, ΛΑΓΟΥΔΑΚΗ Ρόζα², ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ Ευθυμία¹, ΚΟΣΜΙΔΗΣ Ευστράτιος²

¹Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, angelikr@bio.auth.gr, eantono@bio.auth.gr

²Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, rlagoud@auth.gr, kosmidef@auth.gr

Περίληψη

Η τεχνική whole-cell patch clamp αποτελεί σημαντική μέθοδο μελέτης των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των κατάλληλων παραμέτρων για καταγραφές whole-cell voltage clamp σε κύτταρα HEK293T. Η επιλογή μεμονωμένων κυττάρων με λεία μεμβράνη, τα οποία αναπτυσσόταν σε μονοστιβάδα, μικροπιπετών αντίστασης 2,5-5 MΩ από βοριοπυριτικό γυαλί παχέος τοιχώματος και διαλυμάτων με ωσμωμοριακότητα 304-308 mOsm/L για το εξωκυττάριο και 295 mOsm/L για το ενδοκυττάριο διάλυμα αποτέλεσαν βασικές παραμέτρους για την επιτυχή πραγματοποίηση των καταγραφών. Ο σχηματισμός gigaseal διευκολύνθηκε από τον συνδυασμό εφαρμογής αρνητικής πίεσης και σταδιακής μεταβολής του δυναμικού συγκράτησης. Η λειτουργικότητα του πρωτοκόλλου επιβεβαιώθηκε με καταγραφή ενδογενών ρευμάτων από διαδοχικά βήματα τάσης και την κατασκευή καμπυλών ρεύματος-τάσης (I-V).

Λέξεις-Κλειδιά:

Patch clamp, whole-cell, HEK293T, παράμετροι, καμπύλη I-V

Εισαγωγή

Η τεχνική patch clamp χρησιμοποιείται για τη μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των κυττάρων. Ειδικότερα, στη διαμόρφωση whole-cell voltage clamp καταγράφεται το συνολικό ρεύμα υπό ελεγχόμενο δυναμικό μεμβράνης (Hamill et al. 1981). Κάθε πειραματική διάταξη περιλαμβάνει βασικά στοιχεία, ενώ οι επιμέρους παράμετροι μπορούν να διαφοροποιούνται ανάλογα με τον σκοπό και τις απαιτήσεις της καταγραφής (Penneer 1995). Τα κύτταρα HEK293 συνιστούν διαδεδομένη επιλογή ηλεκτροφυσιολογικών μελετών και ενδέχεται να παρουσιάζει μεταβλητότητα ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και τα διαφορετικά πρωτόκολλα καταγραφών (Ponce et al. 2018, Zhang et al. 2022). Σκοπός της

εργασίας ήταν ο προσδιορισμός κατάλληλων παραμέτρων για whole-cell voltage clamp σε κύτταρα HEK293T.

Μέθοδοι

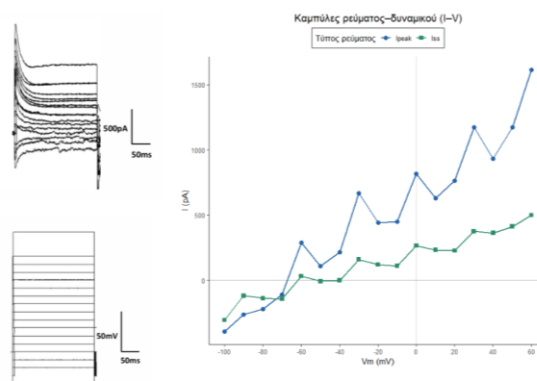
Οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές πραγματοποιήθηκαν με ενισχυτή MultiClamp 700B, ψηφιοποιητή Digidata 1550B (Molecular Devices) και μικροχειριστή MP225A (Sutter Instrument). Οι μικροπιπέτες κατασκευάστηκαν από βοριοπυριτικό γυαλί παχέος τοιχώματος με χρήση του μικροπιπετοκατασκευαστή puller Sutter P-1000, με το πρόγραμμα 51 (Sutter Instrument 2018). Η καταγραφή και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό pClamp11 (Molecular Devices). Το εξωκυττάριο διάλυμα περιείχε 140mM NaCl, 4mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES, 11mM D-glucose (pH=7,4) και το ενδοκυττάριο διάλυμα 110mM KCl, 2mM MgCl₂, 10mM HEPES, 5mM EGTA, 0,2mM Na₂ATP (pH=7,2-7,3). Εφαρμόστηκε πρωτόκολλο διαδοχικών βημάτων τάσης διάρκειας 200ms από -100 mV έως +60 mV, με βήμα τάσης 10 mV.

Αποτελέσματα

Η επιτυχής εφαρμογή του πρωτοκόλλου whole-cell voltage clamp σε κύτταρα HEK293T, εξαρτήθηκε από την επιλογή κατάλληλων κυττάρων, τα οποία εμφάνιζαν λεία μεμβράνη και αναπτυσσόταν σε μονοστιβάδα, χωρίς εμφανείς αλλοιώσεις ή έντονη κοκκίωση. Η αντίσταση των μικροπιπετών (R_p) κυμαίνονταν μεταξύ 2,5 και 5 MΩ, ενώ δεν επιτεύχθηκε σχηματισμός giga-seal για R_p άνω των 6 MΩ. Η ρύθμιση της ωσμωτικότητας του εξωκυττάρου διαλύματος στα 304-308 mOsm/L και του ενδοκυττάρου στα 295 mOsm/L συνέβαλε στον περιορισμό έντονων μεταβολών του κυτταρικού όγκου. Ο σχηματισμός giga-seal βελτιώθηκε με τον συνδυασμό αρνητικής πίεσης και σταδιακής μεταβολής του δυναμικού συγκράτησης από 0mV σε -60mV, με βήμα 20mV. Η συνδυαστική εφαρμογή των παραπάνω παραμέτρων επέτρεψε την καταγραφή ενδογενών ρευμάτων σε κύτταρα HEK293T. Η λειτουργικότητα του πρωτοκόλλου αξιολογήθηκε περαιτέρω μέσω της κατασκευής καμπύλης ρεύματος-τάσης (I-V curve) για το μέγιστο παροδικό ρεύμα (I_{peak}) και το σταθεροποιημένο ρεύμα (I_{ss}) (Εικόνα 1).

Συμπεράσματα

Η παραμετροποίηση του πρωτοκόλλου whole-cell voltage clamp σε κύτταρα HEK293T βασίστηκε στη συνδυαστική αξιολόγηση παραμέτρων που αφορούσαν τα κύτταρα, την αντίσταση των μικροπιπετών και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυμάτων. Η καταγραφή ενδογενών μεμβρανικών ρευμάτων και η κατασκευή καμπυλών I-V επιβεβαίωσαν τη λειτουργικότητα του πρωτοκόλλου, παρέχοντας βάση για περαιτέρω ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές.



Εικόνα 1. Καταγραφή whole cell voltage clamp σε κύτταρο HEK293T. Αριστερά: Ίχνη μεμβρανικών ρευμάτων (επάνω) και πρωτόκολλο βημάτων τάσης (Holding potential=-60 mV, -100 έως +60 mV, $\Delta V=10$ mV) (κάτω). Δεξιά: Καμπύλες ρεύματος-τάσης (I-V) για το μέγιστο παροδικό ρεύμα (I_{peak} , μπλέ κύκλοι) και το σταθεροποιημένο ρεύμα στο τέλος του παλμού (I_{ss} , πράσινα τετράγωνα). Κλίμακες: (A) 50 ms και 500 pA, (B) 50 ms και 50 mV

Βιβλιογραφία

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 391, 85–100.
- Penner, R. (1995). A practical guide to patch clamping. Στο B. Sakmann & E. Neher (επιμ.), *Single-channel recording*, 3–30. New York: Plenum Press.
- Ponce, A., Castillo, A., Hinojosa, L., Martinez-Rendon, J. & Cereijido, M. (2018). The expression of endogenous voltage-gated potassium channels in HEK293 cells is affected by culture conditions. *Physiological Reports*, 6, e13663.
- Sutter Instrument. (2018). *Pipette cookbook 2018: P-97 & P-1000 micropipette pullers*. Novato: Sutter Instrument Company.
- Zhang, J., Yuan, H., Yao, X. & Chen, S. (2022). Endogenous ion channels expressed in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 474, 665–680.