

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

NATALIA NOWAK<sup>1</sup>, PAWEŁ POMORSKI<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych Centrum Neurobiologii
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
<sup>2</sup>Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Zakład Biochemii
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
<sup>3</sup>Środowiskowe Multimodalne Laboratorium Adhezji i Ruchu Komórek Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: p.pomorski@nencki.gov.pl

# MIKROSKOPOWE METODY BADANIA CYTOSZKIELETU

# WPROWADZENIE

Termin cytoszkielet, jak wiele innych terminów zbiorczych, jest równie oczywisty, co nieprecyzyjny. Z jednej strony, oczywiste jest, że cytoszkielet tworzą włókna białkowe, odpowiedzialne za utrzymywanie kształtu komórki, mniej oczywiste jest, które z bia-łek związanych z nimi, zaliczymy do białek cytoszkieletalnych. W latach 80. XX w. powstała definicja funkcjonalna cytoszkieletu mówiąca, że jest to "wewnątrzkomórkowa sieć włókien białkowych nierozpuszczająca się w detergentach niejonowych" (ANDERSEN i współaut. 1991). Ta definicja, jakże wygodna z punktu widzenia biochemii, zalicza do cytoszkieletu także wszystkie białka, które towarzyszą tworzącym go włóknom białkowym. Cytoszkielet tworzą zatem podstawowe białka polimeryzujące w filamenty czy sieci: aktyna, tubulina, białka włókien pośrednich czy specyficzne komórkowo białka, takie jak spektryna, oraz tysiące innych cząsteczek: białek regulatorowych, motorów molekularnych, białek adaptorowych czy też białek uczestniczących w przekazywaniu sygnałów. Tak złożona struktura białkowa, o tak dobrze zdefiniowanej formie przestrzennej, jest wymarzonym obiektem do badań mikroskopowych i mikroskopia towarzyszy studiom nad cytoszkieletem od ich zarania. Postaramy się tu opisać podstawowe metody mi-kroskopowe, które każdy badacz struktury i

funkcji cytoszkieletu powinien znać. Zarysujemy też tło historyczne ich rozwoju i wykażemy, że badania nad cytoszkieletem odegrały niebagatelną rolę w rozwoju tych metod.

# METODY STRUKTURALNE

# METODY ZNAKOWANIA CYTOSZKIELETU W UTRWALONYCH KOMÓRKACH I TKANKACH

# Mikroskopia fluorescencyjna i przełom w badaniach strukturalnych komórki

Wraz z rozwojem metod biochemii i genetyki molekularnej, biologia oddalała się od modelu nauki obserwacyjno-opisowej i stawała się nauką eksperymentalną. Towarzyszyła temu utrata znaczenia tradycyjnej mikroskopii optycznej, której rozdzielczość była niedostateczna do bezpośredniej obserwacji badanych struktur, a specyficzność dostępnych wówczas barwień dalece niewystarczająca. Jednocześnie, od połowy XIX w. znana była niezwykle czuła metoda barwienia, jaką jest barwienie fluorescencyjne. Ponieważ barwnik fluorescencyjny emituje, a nie pochłania, światło możemy wykryć znacznie mniejsze jego stężenia. Już na początku XX w. pojawiły się pierwsze mikroskopy fluorescencyjne. Problemem było jednak wzbudzanie fluorescencji. W tym celu należało oświetlić obserwowany obiekt światłem wzbudzającym, które w tradycyjnym mikroskopie

**Słowa kluczowe**: cytoszkielet, immunocytochemia, mikroskopia elektronowa, mikroskopia optyczna, mikroskopia superrozdzielcza, sondy molekularne

optycznym oślepia obserwatora. Problem ten został częściowo rozwiązany w latach 20. wraz ze skonstruowaniem mikroskopu epifluorescencyjnego (ELLINGER i HIRT 1929). Epifluorescencja (od greckiego επί oznaczającego "na") polega na wprowadzeniu światła wzbudzającego przez obiektyw za pomocą półprzepuszczalnego lustra wstawionego w drogę optyczną mikroskopu. Taka konstrukcja ma dwie ogromne zalety: po pierwsze, światło wzbudzające nie wnika bezpośrednio w szlak obserwacyjny mikroskopu. Po drugie, obiektyw stanowi jednocześnie kondensor dla światła wzbudzającego i znajduje się z definicji w idealnej pozycji. W momencie powstania tej konstrukcji, problemy z technologią produkcji filtrów powodowały jednak, że nawet niewielka ilość światła wzbudzającego, która odbijała się od preparatu lub zostawała w nim rozproszona, wciąż mogła być jaśniejsza od światła emitowanego przez preparat i tylko bardzo jasne barwienia mo-gły być obserwowane. Techniki mikroskopii fluorescencyjnej wymagały jeszcze pół wieku rozwoju, by w latach 70. dorównać precyzją molekularnym technikom in vitro. Jednym z podstawowych powodów tego stanu rzeczy był problem z wydajną filtracją światła i dopiero rozwój filtrów interferencyjnych, dostępnych od lat 70. w racjonalnych cenach, umożliwił rozwój mikroskopii fluorescencyjnej jaką znamy dziś (Ryc. 1).

Znakowanie białek cytoszkieletu przeciwciałami

Wydajne barwienie preparatów biologicznych nie zapewniało wystarczającej specyficzności, pozwalając barwić chemicznie całe klasy związków, ale nie precyzyjnie znakować konkretne białka. Istnieje jednak w naturze klasa cząsteczek, która pozwala precyzyjnie wykrywać specyficzne, przestrzenne struktury molekularne białek czy wielocukrów, zwane epitopami. Są to przeciwciała. Organizm kręgowca może produkować miriady rodzajów przeciwciał, wykrywających praktycznie wszystkie możliwe białka występujące w przyrodzie. Pierwsze zastosowanie przeciwciał jako specyficznego znacznika w mikroskopii nastąpiło już w latach 40. XX w. Wtedy to stworzono niezwykle czułą metodę wykrywania pneumokoków przy pomocy przeciwciał sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym, skierowanych przeciwko białkom powierzchniowym tych bakterii (COONS i współaut. 1942). Była to wówczas jednak bardziej metoda diagnostyczna niż sposób obrazowania. Na pierwsze prace pokazujące przestrzenne obrazy cytoszkieletu znakowanego przeciwciałami trzeba było czekać do 1974 r. (LA-ZARIDES i WEBER 1974), gdy autorzy pokazali filamenty aktynowe w fibroblastach linii 3T3 i w komórkach zarodków kurczaka.

Podczas gdy do znakowania włókien cytoszkieletu wystarczające było wykorzystanie mieszaniny przeciwciał izolowanych z



Ryc. 1. Fluorescencyjne obrazowanie cytoszkieletu w komórce.

A. Komórki linii U-2 OS kostniakomięsaka człowieka; czerwono znakowana przeciwciałami tubulina, zielono znakowane przeciwciałami włókna pośrednie (nestyna), na niebiesko znakowano jądro komórkowe (DAPI). Obraz z Human Protein Atlas (HPA). B. Fibroblast 3T3 kurczaka; czerwono znakowana falloidyną aktyna, zielono znakowane włókna pośrednie, niebiesko znakowane jądro komórkowe (DAPI), ze zbiorów Wellcome Images Project. Oba obrazy pobrano z Cell Image Library, prowadzonej przez Amerykańskie Towarzystwo Biologii Komórki. Obrazy udostępnione na licencji Creative Commons.

osocza immunizowanych białkami cytoszkieletu zwierząt (głównie królików), to znakowanie białek inkrustujących te włókna stało się znacznie bardziej specyficzne wraz z wprowadzeniem przeciwciał monoklonalnych. Teoria selekcji klonalnej w układzie odpornościowym (BURNET 1976) wskazywała, że powinno być możliwe wyizolowanie grupy komórek, produkującej przeciwciała odpowiadające tylko na jeden, wybrany epitop, czyli niewielki fragment białka mogący wiązać przeciwciało. Już wcześniej, takie pojedyncze klony były izolowane i namnażane w myszach pozbawionych układu odpornościowego (ASKONAS i współaut. 1970), ale dopiero w połowie lat 70. opracowano technikę hybrydyzacji limfocytów B z komórkami szpiczaka, w celu uzyskania trwałego źródła przeciwciał o ściśle zdefiniowanej specyficzności (KÖHLER i MILSTEIN 1975). Co ciekawe, autorzy tej publikacji mieli poważne problemy z powtórzeniem swych prac po przeniesieniu doświadczeń w potencjalnie znacznie lepsze warunki. Problemy były tak znaczne, że Milstein był bliski wycofania pracy z Nature, szczęśliwie Giovanni Galfré znalazł źródło problemów w pożywce, na której hodowano komórki i zoptymalizował proces fuzji (GALFRÈ i MILSTEIN 1981). W 1984 r. autorzy pracy otrzymali za swoje badania nagrode Nobla, a dziś trudno sobie wyobrazić współczesną biologię komórki bez wykorzystywania przeciwciał monoklonalnych.

Znakowanie przeciwciałami ma ogromną specyficzność i pozwala zidentyfikować nie tylko białka, ale nawet ich stan fizjologiczny (np. to czy są ufosforylowane w określonym miejscu czy nie). Niestety rozdzielczość mikroskopu optycznego jest niewspółmiernie duża do rozmiarów cząsteczek białka, a to, że znakowane białka znajdujemy w tym samym miejscu na mikrofotografii nie znaczy, że tworzą one kompleks. Aby przekonać się, że obiekty znakowane przeciwciałami znajdują się wystarczająco blisko by ze sobą oddziaływać, stworzono technikę zwaną ligacją zbliżeniową (ang. proximity ligation assay, PLA). Polega ona na użyciu przeciwciał znakujących epitopy na dwóch badanych białkach, każde związane z połową startera PCR. Po związaniu przeciwciał, do preparatu dodaje się ligazy. Jeśli dwa fragmenty startera znajdują się od w odległości kilkudziesięciu nanometrów od siebie, ligaza przeprowadzi reakcję ligacji i powstanie kompletny starter PCR. Do roztworu dodaje się następnie kolistą cząstkę jednoniciowego DNA, kompatybilną ze starterem oraz znakowane fluorescencyjnie nukleotydy i polimerazę, która prowadzi reakcję polimeryzacji DNA na dodanej kolistej matrycy. Powstaje fluorescencyjny produkt, który możemy zobaczyć w mikroskopie jako punkt. Jeśli do ligacji nie dojdzie, połówki startera będą za krótkie i reakcja się nie rozpocznie. Pojawienie się świecących punktów świadczy o bardzo bliskim położeniu dwóch białek i praktycznie gwarantuje, że mogą one tworzyć kompleks. Metoda jest uniwersalna, ale z powodzeniem bywa wykorzystywana również w badaniach nad cytoszkieletem (SCHNEIDER i współaut. 2010).

# Aktyna i falloidyna, marker wyjątkowy i jego wady

Falloidyna, odkryta w latach 30. XX w., jako jedna z toksyn produkowanych przez muchomora sromotnikowego Ammanita phalloides (LYNEN i WIELAND 1938), jest związkiem ze wszech miar niezwykłym. Cząsteczka falloidyny jest cyklicznym heptapeptydem (składa się z siedmiu aminokwasów), tworzącym, dzięki mostkowi siarczkowemu łączącemu cysteinę z tryptofanem, podwójny pierścień. Peptyd ten silnie wiąże się z filamentami aktyny w taki sposób, że jedna cząsteczka falloidyny trwale wiąże się z trzema protomerami aktyny (informacje o budowie aktyny i filamentów aktynowych patrz Redowicz oraz Moraczewska w tym zeszycie KOSMOSU). Fluorescencyjne znakowanie aktyny falloidyną okazało się metodą niezwykle szybką i wygodną w użyciu, barwiąc tylko spolimeryzowaną forme aktyny i wymagając tylko jednej, krótkiej inkubacji białka ze znacznikiem (WULF i współaut. 1979). Z czasem falloidyna stała się złotym standardem w wizualizacji mikrofilamentów. Nie można jednak zapominać, że falloidyna jest silną toksyną i nadaje się głównie do barwienia preparatów utrwalonych; falloidyna stabilizuje bowiem mikrofilamenty i blokuje uwalnianie związanego z aktyną ADP, co w konsekwencji uniemożliwia depolimeryzację filamentów i zaburza dynamikę cytoszkieletu (VANDEKERCKHOVE i współaut. 1985). Przyżyciowe podanie peptydu w większych stężeniach, koniecznych do wizualizacji mikrofilamentów, zmienia fizjologię komórki i ostatecznie prowadzi do jej śmierci (WE-HLAND i współaut. 1977). Jeśli jednak stę-żenia falloidyny są niskie, nie zakłóca ona funkcji komórki, co wykorzystano do ratiometrycznego określania stosunku F/G aktyny w komórkach Amoeba proteus, do których wstrzyknięto mieszaninę znakowanej fluorescencyjnie falloidyny i przeciwciał przeciw aktynie (POMORSKI i współaut. 2007). Metoda ta pozwalała na pokazanie stopnia polimeryzacji w różnych rejonach komórki, ale nie wizualizację struktur cytoszkieletu. Dziś falloidyna jest powszechnie używana w badaniach biologii komórki, a nowe rozwiązania stosowane w jej syntezie (falloidyny nie otrzymuje się dziś z grzybów) pozwalają mieć nadzieję na dalsze udoskonalanie funkcjonalności tego znacznika (ANDERSON i współaut. 2005).

# Zastosowanie znakowania cytoszkieletu w mikroskopii elektronowej, mikroskopia korelacyjna

Rozdzielczość optyczna, czyli najmniejsza odległość między obiektami jaką możemy zobaczyć w tradycyjnej mikroskopii świetlnej, wynosi ~200 nm (co jest równe mniej więcej połowie długości fali światła użytego do obrazowania). Co najmniej kilkukrotnie przewyższa ona średnicę filamentów tworzących cytoszkielet. Mikroskopia elektronowa (ang. electron microscopy, EM) do uzyskania obrazu zamiast światła wykorzystuje wiązkę elektronów. Zgodnie z teorią kwantową, taką wiązkę możemy interpretować w świetle dualizmu korpuskularno-falowego, jako fale de Broglie'a o długości zależnej od pędu elektronów, który w mikroskopie elektronowym determinowany jest przez napięcie rozpędzające cząsteczki. Długość fali związanej z wiązką elektronów rozpędzonych napięciem 200.000 Voltów (o energii 200 keV) wynosi 2,5 pm (pikometra, 10<sup>-12</sup> m). W rzeczywistości rozdzielczości subpikometrowe są nieosiągalne (atom helu ma w teorii 62 pikometry średnicy) nie ze względu na naturę falową wiązki, ale na niedoskonałość soczewek magnetycznych używanych w mikroskopii elektronowej. Dzięki mikroskopii elektronowej po raz pierwszy zwizualizowano cytoszkielet i to głównie ona dostarcza informacji o ultrastrukturze tworzących go komponentów (SVITKINA 2009).

Mikroskopia elektronowa wymaga specjalnie przygotowanego materiału. Jedna z mniej skomplikowanych metod przygotowania próbki do EM, barwienie negatywne, polega na zatopieniu cienkiego plasterka utrwalonej chemicznie próbki w warstwie soli metalu ciężkiego (np. osmu i uranu), który pochłania wiązkę elektronów. Sole te słabo penetrują cząstki organiczne, przez co na obrazie elektronowym tworzone przez nie struktury są znacznie jaśniejsze od tła (Bo-OTH i współaut. 2011). W ten sposób możliwe było zwizualizowanie filamentów aktynowych, mikrotubul i filamentów pośrednich in vitro, kontrastowanych octanem uranylu. Uzyskana rozdzielczość umożliwiła także zobrazowanie i zidentyfikowanie tych struktur w komórkach mięśniowych (IP i FISCHMAN 1979).

Niewątpliwym ograniczeniem tej techniki jest jednak brak informacji o strukturze przestrzennej badanych obiektów, ponieważ jednocześnie obrazowane są dwuwymiarowe, cienkie skrawki próbki. Z tego względu badacze cytoszkieletu wykorzystują również inne podejście - metodę metalowej repliki obrazowanej w elektronowym mikroskopie skaningowym (ang. metal replica, metal shadowing), która pozwala zwizualizować topografie badanej struktury, dostarczając danych o jej strukturze przestrzennej. Technika ta, początkowo stosowana głównie do obrazowania in vitro wirusów i wyizolowanych biomolekuł, polega na napyleniu na utrwaloną próbkę bardzo cienkiej (kilku nanometrowej) warstwy metalu ciężkiego i węgla. Metal ciężki, którym może być np. platyna czy iryd bądź ich mieszanka, umożliwia za pomocą obrazowanie takiej "repliki" wiązki elektronów, natomiast węgiel ma za zadanie ustabilizowanie powstałej struktury (WEPF i współaut. 1991, SVITKINA 2009). W ten sposób uzyskano m.in. dokładne informacje o strukturze i rozmiarach oligomerów tubuliny oraz filamentów pośrednich składających się z desminy (SCHEELE i BORISY 1978, GEISLER i współaut. 1986). Pokazano także charakterystyczne rozgałęzianie się mikrofilamentów, możliwe dzięki jednemu z białek wiążących aktynę, Arp 2/3, w keratynocytach Xenopus laevis (SVITKINA i BORISY 1999) i w warstwie kortykalnej Amoeba proteus (POMORSKI i współaut. 2007).

Opisane powyżej metody wizualizacji cytoszkieletu za pomocą mikroskopii elektronowej, jak każde zastosowanie tej techniki, niosą ze sobą duże prawdopodobieństwo wprowadzenia artefaktów podczas wieloetapowej obróbki materiału biologicznego przed obrazowaniem. Dlatego też, do znacznego postępu w obrazowaniu struktur cytoszkieletarnych (i nie tylko) przyczyniła się metoda cryo-EM, nad którą prace, trwające ponad dwie dekady, zostały w 2017 r. nagrodzone Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii dla Jacques'a Dubocheta, Joachima Franka i Richarda Hendersona. W technice tej przygotowanie i obrazowanie prób zachodzi w bardzo niskich temperaturach (najczęściej w temperaturze ciekłego azotu, -193°C), w kawałku zeszkliwionego lodu. Taki lód nie tworzy kryształów, które mogłyby zniszczyć strukturę zamrażanego materiału. Dzięki użyciu wysokonapięciowych mikroskopów i związanej z tym niezwykle wysokiej rozdzielczości (poniżej 4 Å, czyli 0,4 nm), którą badacze są w stanie obecnie uzyskać, technika ta jest stosowana jako alternatywa dla metod krystalograficznych. Brak suszenia, odwadniania i kontrastowania znacząco ogranicza występowanie artefaktów, dzięki czemu cryo-EM jest metodą umożliwiającą badanie biomolekuł, w tym cytoszkieletu, w formie najbardziej zbliżonej do fizjologicznej. Uzyskiwane obrazy charakteryzują się jednak dużo mniejszym kontrastem niż w przypadku technik wykorzystujących znakowanie związkami metali ciężkich. Z tego względu, rozwój cryo-EM jest bardzo ściśle związany ze stosowaniem coraz czulszych detektorów elektronów oraz opracowywaniem coraz doskonalszych metod obróbki obrazów (MURATA i WOLF 2018). Metoda ta pozwala nie tylko na badanie pojedynczych cząsteczek, ale też wielkich kompleksów białkowych, co stwarza ciekawe perspektywy w kontekście badań nad cytoszkieletem.

Turgay z współpracownikami wykorzystali EM do zbadania ultrastruktury filamentów pośrednich tworzących blaszkę jądrową - lamin (Turgay i Medalia 2017). Analiza przestrzennego ułożenia poszczególnych filamentów w sieciach laminowych wykazała, że sa one bardzo elastyczne. Ponadto, autorom udało się zaobserwować globularne struktury o średnicy ~3,5 nm, rozmieszczone na tetramerowych włóknach laminowych dokładnie co 20 nm. Analiza profilu intensywności obrazu elektronowego pozwoliła zidentyfikować te struktury jako dimery laminowe. Stąd badacze zaproponowali nowy model filamentu, który zakłada naprzemienne występowanie odcinków tetramerowych i heksamerowych (tetramer z bocznie dołaczonym dimerem) o precyzyjnie określonym wzorze.

Mikroskopia elektronowa umożliwia obserwację materiału wyłącznie po utrwaleniu, pozbawiając badacza szerszego biologicznego kontekstu, jaki zapewnia obserwacja przyżyciowa. Z tego względu, często łączy się zalety EM oraz mikroskopii świetlnej stosując mikroskopię korelacyjną (ang. correlative light and electron microscopy, CLEM). Tradycyjna mikroskopia korelacyjna wymaga zastosowania systemu precyzyjnych koordynatów przestrzennych, ponieważ próbka jest najpierw obrazowana za pomocą mikroskopu świetlnego, a następnie poddawana dodatkowej obróbce (odwadnianiu, kontrastowaniu i zatapianiu w żywicy), celem wizualizacji w mikroskopie elektronowym. Koordynaty umożliwiają nałożenie na siebie obu obrazów z zachowaniem odpowiednich relacji przestrzennych. Metoda ta wiąże się jednak z ryzykiem wprowadzenia artefaktów podczas przygotowania próbki do EM, a więc już po obrazowaniu w mikroskopie świetlnym (Ku-KULSKI i współaut. 2011). Problem ten pozwalają obejść urządzenia łączące w sobie mikroskopię świetlną i EM (ang. integrated CLEM, iCLEM), w których skaningowy mikroskop konfokalny jest wbudowany w mikroskop elektronowy. Obrazowanie obiema metodami zachodzi tutaj sekwencyjnie, ale w jednym urządzeniu. Uzyskane obrazy są od razu odpowiednio zorientowane względem siebie, a możliwość "podglądu" próbki w mikroskopie świetlnym znacznie ułatwia odnalezienie w preparacie konkretnych komórek i struktur interesujących badacza (AGRONSKAIA i współaut. 2008). Wyzwaniem jest w tym przypadku zastosowanie takiej metody przygotowania próbki, aby była ona jednocześnie widoczna w obu mikroskopach. Metale ciężkie, stosowane powszechnie do uzyskania kontrastu w mikroskopii elektronowej, mogą powodować wygaszanie fluorescencji barwników i białek fluorescencyjnych znajdujących się w ich pobliżu. Ponadto, samo odwodnienie próby również może negatywnie wpływać na świecenie niektórych z nich. Opracowane protokoły zakładają więc uzyskanie równowagi między zachowaniem fluorescencji a kontrastem widocznym w mikroskopie elektronowym. Zazwyczaj dąży się do sytuacji, w której kontrast jest na tyle wysoki, aby umożliwił uzyskanie odpowiedzi na pytanie badawcze, a nie by powstał doskonały obraz. Stąd też próby do zintegrowanej mikroskopii CLEM mogą w ogóle nie być kontrastowane lub kontrastowane tylko w bardzo niewielkim stopniu (VOORTMAN i współaut. 2014).

Dzięki mikroskopii korelacyjnej udało się lepiej poznać mechanizm podziału komórki (GUIZETTI i współaut. 2011). Badacze początkowo obserwowali dzielące się komórki w mikroskopie fluorescencyjnym, aby następnie je utrwalić i zobrazować za pomocą mikroskopii elektronowej. Obrazowano w ten sposób kolejne stadia cytokinezy. Udało się stwierdzić, że w miejscu podziału cytoplazmy, oprócz mikrotubul, powstają również helikalne, kurczliwe filamenty zależne od kompleksu białkowego ESCRT-III (ang. endosomal sorting complexes required for transport), który odpowiada za transport pęcherzykowy. Wykazano, że to te filamenty są niezbędne, aby ostatecznie przerwać ciągłość błony komórkowej i doprowadzić do rozdzielenia się komórek potomnych.

## METODY OBSERWACJI CYTOSZKIELETU W ŻYWYCH KOMÓRKACH

## Domeny fluorescencyjne a znakowanie białek cytoszkieletu

Niekwestionowana rewolucja w mikroskopii fluorescencyjnej miała miejsce w latach 90. XX w. wraz z wykorzystaniem do wizualizacji fluorescencyjnego białka produkowanego bezpośrednio w badanym materiale. Znacznikiem tym było zielone białko fluorescencyjne (ang. green fluorescent protein, GFP). GFP odkryto w latach 60., w morskiej meduzie *Aequorea victoria* (SHIMO-MURA i współaut. 1962), w latach 90. zsekwencjonowano jego gen, a kilka lat później wykorzystano go do stworzenia sztucznych konstruktów składających się z badanego białka natywnego z dodaną domeną fluorescencyjną (CHALFIE i współaut. 1994). Wprowadzenie takiego konstruktu do żywej komórki skutkuje produkowaniem przez nią zmodyfikowanych białek (tzw. białek fuzyjnych), które składają się z zielonego białka fluorescencyjnego dołączonego do praktycznie dowolnego innego białka interesującego badaczy (Ryc. 2). Od tamtego czasu prace nad GFP zostały nagrodzone Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 2008 r., a same białka fluorescencyjne niezmiennie są przedmiotem wielu badań w celu doskonalenia ich właściwości fluorescencyjnych, takich jak jasność i odporność na blaknięcie. Obecnie dostępny jest cały wachlarz białek, które emitują światło pokrywające praktycznie cały zakres światła widzialnego - od niebieskiego do podczerwieni. Powstały one na skutek wprowadzenia mutacji do oryginalnego zielonego białka fluorescencyjnego, bądź też zostały odkryte w innych organizmach żywych wykazujących naturalną fluorescencję. Dzięki temu, podobnie jak w przypadku immunofluorescencji, przyżyciowa obserwacja materiału może odbywać się z jednoczesnym użyciem kilku różnych znaczników, co jest nieocenione w badaniach biologicznych, także tych dotyczących cytoszkieletu (CHUDAKOV i współaut. 2010).

Należy jednak mieć na uwadze, iż sama obecność znacznika fluorescencyjnego może nie być całkowicie obojętna dla funkcjonalności badanego białka. Może ona zaburzać lub uniemożliwiać jego oddziaływanie z partnerami, lokalizację subkomórkową, a także



Ryc. 2. Schemat konstruktu zawierającego GFP oraz białko fuzyjne.

Konstrukt składa się z genu *GFP* i genu badanego białka, umieszczonych jako jeden gen, pod kontrolą tego samego promotora. W procesie translacji GFP i białko badane są produkowane jako pojedyncza cząsteczka białka fuzyjnego. Na pokazanym przykładzie domena GFP znajduje się na aminowym końcu białka fuzyjnego. wpływać na dynamikę tworzenia polimerów. I tak np., dołączenie eGFP (ang. enhanced green fluorescent protein) do końca aminowego cytoplazmatycznej β-aktyny zmieniało właściwości mechaniczne komórek, co wpływało na ich zdolność do migrowania. Okazało się, że synteza  $\beta$ -aktyny z eGFP dołączonym na końcu aminowym białka powodowała zmianę w stopniu spolimeryzowania aktyny endogennej (NAGASAKI i współaut. 2017). Opisywanych efektów nie zaobserwowano natomiast w przypadku fuzji na końcu karboksylowym. Badacze porównali również stosunek ilości G- do F-aktyny, rozdzielając białka zawarte w badanych komórkach na frakcję rozpuszczalną (aktyna monomeryczna, G-aktyna) i odporną na działanie detergentu (aktyna filamentowa, F-aktyna), a następnie mierząc zawartość  $\beta$ -aktyny w obu frakcjach za pomocą techniki immunodetekcji na błonie nitrocelulozowej (Western blot).

### Sondy służące do przyżyciowego znakowania cytoszkieletu

Do wizualizacji filamentów tworzonych przez białka cytoszkieletu stosuje się również metody znakowania pośredniego. Polegają one na syntezie białka fuzyjnego, składającego się ze znacznika fluorescencyjnego dołączonego do białka inkrustującego specyficznie struktury cytoszkieletu bądź fragmentu takiego białka. Takie podejście powoduje uzyskanie wyraźniejszych obrazów filamentów aktynowych lub mikrotubul, na skutek wyższego stosunku intensywności sygnału do tła niż w przypadku znakowania białkiem fluorescencyjnym monomerów tworzących filamenty (SLIOGERYTE i współaut. 2016). W tej sytuacji uzyskanie odpowiedniej jakości obrazów jest możliwe przy niższym poziomie ekspresji genów białka fuzyjnego, co jest korzystne ze względu na jego wpływ na procesy komórkowe. W przypadku F-aktyny, najczęściej stosowanymi markerami są sprzężone z białkiem fluorescencyjnym różne białka wiążące filamenty aktynowe: fimbryna, podjednostka ARP-3 kompleksu białkowego Arp2/3, tropomiozyna, F-traktyna (fragment złożony z aminokwasów 10-52), utrofina człowieka (fragment złożony z aminokwasów 1-261) oraz opracowany stosunkowo niedawno Lifeact (złożony z 17 reszt aminokwasowych fragment białka ABP-140 pochodzącego z Saccharomyces cerevisiae) (DELGADO-ÁLVA-REZ i współaut. 2010, RIEDL 2010, MELAK i współaut. 2017). W przypadku mikrotubul, używane są znakowane fluorescencyjnie białka EB1, wiążące końce "+" mikrotubul, oraz CLIP170/190, znakujące całe mikrotubule (FOLKER i współaut. 2005, MUROYAMA i LECHLER 2017; patrz JAWORSKI w tym zeszycie KOSMOSU). Opisywane podejście, po-

dobnie jak bezpośrednie znakowanie białkami fluorescencyjnymi, może wpływać na strukturę i funkcję znakowanych elementów cytoszkieletu. Najczęściej obserwowane efekty syntezy takich znaczników to stymulacja tworzenia filamentów i stabilizowanie tych już istniejących (MELAK i współaut. 2017). Ponadto, porównanie efektów znakowania F--aktyny za pomocą różnych znaczników fluorescencyjnych wykazało, że każde z testowanych białek charakteryzowało się nieco inną lokalizacją w komórce względem falloidyny i preferencyjnie znakowało jedną lub kilka subpopulacji aktyny: w lamellipodium, filopodiach, włóknach naprężeniowych czy korteksie komórki (BELIN i współaut. 2014). W efekcie, przeprowadzając doświadczenia z wykorzystaniem opisywanych znaczników, nie tylko warto minimalizować ekspresję ich genów, ale także rozważyć wykorzystanie więcej niż jednego markera, aby zwiększyć wiarygodność uzyskiwanych wyników.

## METODY FUNKCJONALNE

# FLUORESCENCYJNA MIKROSKOPIA PUNKTOWA I RUCH MONOMERÓW W POLIMERACH CYTOSZKIELETALNYCH

Zarówno mikrotubule, jak i mikrofilamenty aktynowe są polimerami spolaryzowanymi. Mikrofilamenty mają łatwo rozróżnialne końce: plus lub kolczasty (ang. barbed end) i minus lub ostry (ang. pointed end). Końce mikrotubul również oznacza się jako plus i minus. Na końcu plus eksponowana jest podjednostka β-tubuliny dimeru, natomiast na końcu minus, a-tubuliny. W obu przypadkach polaryzacja ta jest istotna przy wzroście długości włókien i dodawanie nowych monomerów odbywa się na końcu + polimerów (patrz REDOWICZ oraz NIEZNAŃSKA w tym zeszycie KOSMOSU). Istnieje jednak inny aspekt tego zjawiska, który badać możemy tylko metodami mikroskopowymi. Z polaryzacją filamentów aktynowych i mikrotubul wiąże się zjawisko, polegające na przesuwaniem sie monomerów wewnatrz struktury polimeru od końca plus (gdzie są przyłączane do polimeru) do końca minus (gdzie są odłączane). Zjawisko to zwane jest z angielska "treadmillingiem". Taki ruch wewnątrz struktury można obserwować, jeśli do struktury polimeru wprowadzimy losowo pojedyncze, fluorescencyjne monomery. Tak powstała FSM (ang. fluorescent speckle microscopy), czyli fluorescencyjna mikroskopia punktowa. To, że taka technika jest praktycznie możliwa, pokazali Clair Waterman--Storer i Ted Salmon, najpierw na mikrotubulach (WATERMAN-STORER i SALMON 1998), a potem na mikrofilamentach (WATERMAN-STO-

RER i współaut. 1998). Technika oryginalnie polegała na wstrzyknięciu małej ilości znakowanego fluorescencyjnie białka do badanej komórki. Ilość sondy była tak dobrana, by nie przekraczała ona 5% natywnej puli białka w komórce. Dzięki temu udało się uniknąć problemów z nadmiarem fluorescencji tła. Jednocześnie, podczas polimeryzacji fluorescencyjnie znakowane białko współzawodniczyło z natywnym, tworząc charakterystyczny wzór świecących kropek, który następnie można było śledzić i obserwować ruch pojedynczych monomerów w polimerze. Wykorzystując tę metodę badacze pokazali, że w komórkach kultur pierwotnych z płuc traszki (Taricha granulosa) mikrotubule przejawiają zarówno dynamiczną niestabilność, jak i klasyczny "treadmilling". Co więcej, sama dekompozycja cytoszkieletu aktynowego powodowała zanik dynamicznej niestabilności mikrotubul, a nie wpływała na ruch podjednostek od końca plus mikrotubul ku środkowi komórki (WATERMAN-STORER i SAL-MON 1997). Wraz z upływem czasu technika ta stała się w pełni ilościowa (DANUSER i WATERMAN-STORER 2006) i do dziś jest używana w analizie dynamiki cytoszkieletu w żywych komórkach (ATHAMNEH i współaut. 2017).

### NAPRĘŻENIA W CYTOSZKIELECIE

### Elastyczne podłoża i nieinwazyjne pomiary naprężeń cytoszkieletu

Jedną z funkcji cytoszkieletu jest wytwarzanie siły mechanicznej kosztem hydrolizy cząstek ATP. Ta funkcja, najbardziej znana z komórek mięśniowych, oparta jest przede wszystkim na interakcjach filamentów aktynowych z filamentami miozyny (zwłaszcza tymi z rodziny II, a dokładniej z domenami motorycznymi ciężkich łańcuchów miozyny). Więcej informacji o miozynach w artykułach SUSZEK i współaut. oraz NOWAK i RĘ-DOWICZ w tym zeszycie KOSMOSU. Opisane poprzednio metody pozwalają na obrazowanie składu białek aparatu kurczliwego, obecnego w innej wprawdzie postaci, nie tylko w mięśniach. Powstały również metody pozwalające na mikroskopowe badanie sił powstających podczas skurczu aktomiozyny w żywej komórce. Metody te polegają na zastosowaniu elastycznego podłoża, które pod wpływem działania sił ulega odkształceniu. Początkowo była to metoda jakościowa, polegająca na obserwacji wielkości zmarszczek powstających na cienkim, elastycznym podłożu, zawieszonym na płynnym podkładzie (HARRIS i współaut. 1980). W celu uzyskania wyników ilościowych zmieniono podejście i w podłożu zatopiono drobne koraliki, które po wysianiu komórek zmieniają położenie w miarę odkształcania się podłoża wskutek działania siły generowanej przez cytoszkielet. Na podstawie tych przesunięć możliwe jest obliczenie naprężeń przenoszonych na podłoże (DEMBO i współaut. 1996). Wraz ze wzrostem mocy obliczeniowych komputerów i doskonaleniem podłoży, metodyka stała się łatwiejsza w stosowaniu, a wynikiem jej zastosowania są dokładne mapy naprężeń wytwarzanych przez komórkę (HIND i współaut. 2015). Metodyka ta doczekała się ciekawej modyfikacji, w której zastosowano trójwybloku elastycznego miarowe obrazowanie podłoża z zatopionymi znacznikami. Dzięki temu możliwy jest pomiar nie tylko sił w płaszczyźnie równoległej do podłoża, ale także prostopadłych. Ta metoda pozwala obrazować cały złożony wzór mechanicznych oddziaływań między komórką a jej otoczeniem (FRANCK i współaut. 2011). Chociaż metody rejestracji sił można uznać za powtarzalne i wystarczająco dokładne, to są one skomplikowane technicznie i złożone obliczeniowo, trudno zatem wyobrazić sobie ich powszechne użycie.

Znacznie prostszą metodą analizy przylegania komórek do podłoża jest mikroskopia IRM (ang. interference reflection microscopy). Nie pozwala ona co prawda na określenie faktycznej siły, ale umożliwia pomiar odległości błony komórkowej od szkiełka nakrywkowego, na którym znajduje się komórka. Pomiar ten odbywa się za pomocą interferencji światła odbitego od błony komórkowej i szkła podłoża (CURTIS 1964, VERSCHU-EREN 1985). Metoda, mimo iż mniej doskonała niż bezpośredni pomiar naprężeń, jest jednak prosta i doskonale łączy się z innymi metodami fluorescencyjnymi takimi, jak zastosowanie sond molekularnych do pomiaru aktywności białek czy stężenia jonów w cytoplazmie i badania zależności między badanymi tymi metodami zjawiskami a ruchem i adhezją komórki (POMORSKI i współaut. 2004).

# Inwazyjna metoda badania naprężeń cytoszkieletu

Inwazyjna metoda badania naprężeń cytoszkieletu jest metodą polegającą na niszczeniu cząsteczek białka, z którym związano barwnik (ang. chromofore assisted laser inactivation, CALI). Jak wiadomo, każdy barwnik pochłania światło o określonej długości i ulega pod jego wpływem wzbudzeniu. Jeśli ilość światła będzie zbyt duża, może dojść do termicznego zniszczenia cząstki związanej z barwnikiem. Początkowo, metoda ta oparta była o zieleń malachitową, barwnik toksyczny dla komórek (JAY 1988). Przy odpowiedniej konfiguracji systemu doświadczalnego wykazano, że można do dezaktywacji białka wykorzystać związaną z nim domenę eGFP (RAJFUR i współaut. 2002). Udowodniono, że wiązką laserową można zniszczyć związaną z eGFP a-aktyninę, białko wchodzące w skład włókien naprężeniowych, i w ten sposób zerwać integralność pojedynczego włókna. Precyzja takiego cięcia jest ograniczona jedynie obszarem, do jakiego można zogniskować wiązkę światła przez obiektyw (około ćwierć µm średnicy).

## BADANIA MECHANIZMÓW REGULACJI FUNKCJI CYTOSZKIELETU

## Sondy molekularne

Techniki mikroskopowe umożliwiają nie tylko przyżyciowe badanie cytoszkieletu na poziomie struktury, ale również funkcji. Znakowanie fluorescencyjne (chemiczne lub biologiczne) nie ogranicza się tylko do emisji światła o określonej długości fali przy odpowiednim wzbudzeniu. W latach 40. ubiegłego wieku odkryto bowiem zjawisko przenoszenia energii między barwnikami fluorescencyjnymi na drodze innej niż promieniowanie, które nazwano nazwiskiem badacza, który po raz pierwszy je opisał - Förster resonance energy transfer (FRET).

Zjawisko to w uproszczeniu polega na przekazaniu energii przez jedną wzbudzoną cząsteczkę fluorescencyjną (zwaną donorem) innej cząsteczce fluorescencyjnej (zwanej akceptorem). W efekcie, populacja pierwszej z cząsteczek świeci słabiej, a drugiej mocniej niż miałoby to miejsce, gdyby zjawisko FRET nie zachodziło (HOCHREITER i współaut. 2015). Najprościej rzecz ujmując, za pomocą mikroskopu porównuje się stosunek intensywności fluorescencji obu fluorochromów. Aby przekazanie energii miało miejsce, musi być jednak bardzo precyzyjnie spełniony podstawowy warunek, a mianowicie cząsteczki, między którymi dochodzi do transferu energii, muszą znajdować się w bardzo niewielkiej odległości, wynoszącej około 3-6 nm. Przy czym efektywność transferu spada z szóstą potęgą odległości między cząsteczkami. Ponadto, akceptor i donor muszą mieć zbliżone widma wzbudzenia i emisji, tzn. widmo emisji donora musi pokrywać się częściowo z widmem wzbudzenia akceptora. Stąd też opracowano wiele chemicznych i biologicznych par FRET, czyli par cząsteczek fluorescencyjnych o widmach odpowiednio dobranych, aby zjawisko FRET między nimi zachodziło wydajnie. Przykładem takiej pary są niebiesko-zielone (ang. cyan fluorescent protein, CFP) i żółte (ang. yellow fluorescent protein, YFP) białka fluorescencyjne. Szczególnym przypadkiem zastosowania zjawiska FRET jest połączenie pary białek fluorescencyjnych w jedną czą-



Ryc. 3. Schemat działania sensora FRET.

Sensor zawiera badane białko połączone elastycznym łącznikiem z białkową domeną sensorową wiążącą badane białko w formie aktywnej. Oba białka są wyznakowane domenami fluorescencyjnymi tworzącymi parę FRET, w tym przypadku CFP i YFP. Kiedy białko badane jest w formie nieaktywnej, nie jest wiązane przez domenę sensorową, a domeny fluorescencyjne znajdują się w tak dużej odległości od siebie, że zjawisko FRET nie zachodzi, a wzbudzenie donora (CFP) skutkuje emisją fluorescencji niebiesko-zielonej. Zaktywowanie badanego białka powoduje związanie go przez domenę sensorową i zbliżenie do siebie fluoroforów na taką odległość, że zjawisko FRET zachodzi w sposób wydajny. Wzbudzenie donora powoduje teraz przekazanie energii akceptorowi i emisję żółtej fluorescencji przez domenę YFP.

steczkę, w której zjawisko FRET zachodzi lub nie w zależności od przyjętej przez białko fuzyjne konformacji. Jednym z najciekawszych zastosowań takich konstruktów jest opracowywanie kodowanych biologicznie sond, które umożliwiają m.in. wizualizację stopnia aktywności białek, w tym tych odpowiedzialnych za regulację cytoszkieletu. Mamy wówczas do czynienia z białkiem fuzyjnym składającym się z donora, badane-



Ryc. 4. Przykładowy obraz otrzymany przy użyciu sondy FRET.

Komórki U-251 MG produkujące sensor aktywności białka Rac1 - Raichu-Rac1 (ITOH I współaut. 2002), z widoczną zwiększoną aktywacją białka w obszarze lamellipodium. Skala barw przedstawia stosunek intensywności obrazu akceptora do obrazu donora. Dla zwiększenia czytelności obrazu obszar poza komórką został zamaskowany. Obraz został uzyskany przez Autorów przy pomocy odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Axio Observer Z.1 (Zeiss) z modułem konfokalnym Spinning Disc CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation) i komorą przyżyciową. Preparat obserwowano za pomocą obiektywu HC Apo 63x/1.20 (Zeiss) z imersją wodną. Do wzbudzenia zastosowano laser diodowy 405 nm. Emisję fluorescencji rejestrowano jednocześnie za pomocą dwóch kamer Evolve 512 (Photometrics) w zakresie 419-465 nm (donor) i 500-550 nm (akceptor).

go białka, domeny wiążącej badane białko w stanie aktywnym (część sensorowa) oraz akceptora. Aktywacja badanego białka w komórce powoduje związanie go przez domenę sensorową i zbliżenie do siebie pary FRET (Ryc. 3). W efekcie, na obrazie mikroskopowym widoczne jest znaczne zwiększenie wydajności zjawiska FRET (SEKAR i PERIASAMY 2003).

W przypadku cytoszkieletu często używanymi sondami molekularnymi są biosensory aktywności białek z rodziny małych GTPaz: Rho, Rac i Cdc42, będących kluczowymi regulatorami cytoszkieletu aktynowego (Ryc. 4). Narzędzia te umożliwiły poznanie czasowo-przestrzennych wzorów aktywacji tych białek w komórce podczas jej przemieszczania się, fagocytozy, formowania podosomów czy pod wpływem sił ścinających (HANNA i współaut. 2014, MARTIN i współaut. 2016, SHAO i współaut. 2017).

## Mikroskopia TIRF jako metoda badania obecności białek regulatorowych w błonie komórkowej

Wśród licznych metod stosowanych w mikroskopii optycznej, część ma charakter "trików technicznych" pozwalających w prostv sposób rozwiazywać trudne problemy. Do takich szczególnych technik należy wykorzystanie mikroskopii całkowitego wewnetrznego odbicia (ang. total internal reflection fluorescent microscopy, TIRF) do obrazowania ruchu cząstek fluorescencyjnych pomiędzy cytoplazmą a wentralną (brzuszną, czyli tą która bezpośrednio styka się ze szkiełkiem nakrywkowym) błoną cytoplazmatyczną komórki. Mikroskopia TIRF wykorzystuje efekt polegający na występowaniu fali ewanescencyjnej, emitowanej przez powierzchnię, od której odbija się światło. Fala ta pozwala wzbudzić cząstki barwnika znajdujące się w pobliżu granicy ośrodków, nawet jeśli światło ulega całkowitemu odbiciu na tej granicy i, zgodnie z optyką klasyczną, nigdy do cząstek barwnika nie dociera. Fala elektromagnetyczna nie może być lokalnie nieciągła, co powoduje powstanie przy granicy ośrodków pola zdolnego do wzbudzania barwnika. Głębokość tego pola jest związana z częstotliwością fali elektromagnetycznej światła i kątem jego padania na powierzchnie, i w typowych przypadkach wynosi około 100 nm. Pozwala to na wybiórcze obserwowanie zjawisk zachodzacych w przylegającej do szkiełka nakrywkowego błonie, z pominieciem zjawisk zachodzących w głębi cytoplazmy (AXELROD 1981).

Jednym z zastosowań tej metody obserwacyjnej, jest badanie składu lipidowego błony przy pomocy fluorescencyjnie znakowanych białek zdolnych do wiązania określonych jej komponentów. Wiele z tych komponentów ma działanie regulatorowe i uczestniczy w przekazywaniu sygnałów z otoczenia komórki do jej wnętrza. Z punktu widzenia regulacji struktury cytoszkieletu, jak i będą-cej jej rezultatem, kontroli ruchu komórki, ważna jest obserwacja dynamiki powstawania 3,4,5-trisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP<sub>3</sub>) z 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu. Ta reakcja, katalizowana przez enzym kinazę PI3, jest pozytywnym sygnałem sterującym kierunkowością ruchu komórki. PIP<sub>3</sub> wiąże się specyficznie z domeną białkową zwaną domeną homologii plekstryny (ang. plextrin homology domain, PH). Białko fluorescencyjne wyposażone w taką domenę będzie się gromadziło w pobliżu obszarów błony, w których jest podwyższone stężenie PIP3. Wykorzystanie mikroskopii TIRF pozwala wybiórczo obserwować błonę adherującej komórki i obrazować zmiany stężenia białka z domeną PH w jej pobliżu. Dzięki temu można w żywej komórce obserwować sygnały sterujące

kierunkiem jej ruchu (WEIGER i współaut. 2009). Autorzy pracy stosują w swoich badaniach dość nietypową konfiguracje mikroskopu TIRF. Większość dostępnych na rynku konfiguracji tej mikroskopii opiera się na wprowadzeniu światła wzbudzającego przez obiektyw o bardzo dużej aperturze numerycznej (ang. numerical aperture, NA). Apertura numeryczna jest miarą rozwartości stożka, z którego obiektyw jest w stanie zbierać światło. Duża apertura charakteryzuje obiektywy bardzo jasne, apertury powyżej wartości 1 wymagają użycia olejku immersyjnego i mają duże powiększenia, zazwyczaj powyżej 60x. Tak duże powiększenia nie sprzyjają badaniu ruchu komórek, wypełniających zbyt dużą część pola widzenia, by zarejestrować na jednym obrazie długą trajektorię ruchu. Z tego powodu autorzy pracy stosują obiektyw o niewielkim powiększeniu, a światło wzbudzające wprowadzają bezpośrednio do specjalnego pryzmatu, przyklejonego do szkiełka nakrywkowego. Takie systemy nie są komercyjnie dostępne, co poważnie ogranicza możliwość stosowania metody.

Mikroskopia TIRF jest też używana w metodach *in vitro*, podczas obserwacji poruszania znakowanych fluorescencyjnie włókien cytoszkieletu (zarówno mikrotubul, jak i mikrofilamentów) przez immobilizowane białka motoryczne. Mała głębia wzbudzenia fluorescencji mikroskopu TIRF powoduje, że obserwacje nie są zakłócane przez fluorescencję włókien nie związanych białkami motorycznymi (Szczęsna i Kasprzak 2016).

## MIKROSKOPIA SUPERROZDZIELCZA W BADANIU STRUKTUR CYTOSZKIELETU

Nie miejsce tu na techniczny opis zagadnienia zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego, niemniej jednak czytelnik powinien zdawać sobie sprawę, że przestrzenna bariera obrazowania przy pomocy takiego mikroskopu istnieje i zależy ona od długości fali świetlnej używanej do tworzenia obrazu przez obiektyw. Rozdzielczość ta wynosi około ćwierć mikrometra dla współczesnych mikroskopów wyposażonych w najwyższej jakości obiektywy immersyjne i jest o rząd wielkości za niska, by precyzyjnie obrazować większość struktur białkowych. Na przełomie wieków opracowano jednak szereg technik, pozwalających przełamać ograniczenie zdolności rozdzielczej i określanych wspólnym mianem "mikroskopii superrozdzielczej". Ten sukces przyniósł autorom Nagrodę Nobla w 2014 r. i został opisany w artykule poświęconym tej nagrodzie w numerze Kosmosu z 2015 r.; wszystkich zainteresowanych podstawami mikroskopii superrozdzielczej odsyłam do tego artykułu (POMORSKI 2015). Biorąc pod uwagę średnicę mikrofilamentów (~8-9 nm) czy mikrotubul (~24 nm z kanałem w środku o średnicy ~12 nm), zdolność rozdzielcza mikroskopu świetlnego jest absolutnie niewystarczająca do tego, by rozróżniać pojedyncze filamenty. Nawet złożone struktury, jakimi są kontakty zogniskowane, nie przekraczają 200 nm średnicy i ich struktura pozostaje poza zasięgiem zwykłego, nawet bardzo dobrego, mikroskopu optycznego i w związku z tym mikroskopia superrozdzielcza wydaje się być narzędziem stworzonym do badań skomplikowanych struktur cytoszkieletalnych.

Techniki mikroskopii superrozdzielczej pozwalają rozróżniać obiekty tak małe jak 20 nm i wydawałoby się, że jako takie stanowią idealne narzędzie do wizualizacji struktur cytoszkieletu. Niestety, w beczce miodu jaką stanowią techniki superrozdzielcze, jest łyżka dziegciu: doskonała rozdzielczość jest łatwa do uzyskania na płaszczyźnie, w osiach x i y obrazu, ale nie w trzecim wymiarze. Uzyskanie porównywalnie dokładnego pomiaru położenia białka w pionie, w płaszczyźnie prostopadłej do płaszczyzny obrazu, stanowi poważny problem.

Złożone struktury związane z funkcjonowaniem cytoszkieletu są trójwymiarowe i ich obrazowanie wymaga wysokiej rozdzielczości we wszystkich trzech wymiarach. Doskonałym przykładem takiego kompleksu białkowego, którego trójwymiarowa struktura została zobrazowana przy pomocy technik superrozdzielczych, są kontakty zogniskowane (ang. focal contacts). Kotwiczą one zbudowane głównie z aktyny i miozyny II włókna naprężeniowe w błonie komórkowej. Aby stworzyć mikroskopowy model struktury kontaktu zogniskowane-go, grupa Clare M. Waterman z National Institutes of Health w Bethesdzie musiała wizualizować wzajemne pozycje aż dziewięciu białek uczestniczących w budowie tej struktury: integryny  $\alpha_v$ , paksyliny, taliny, winkuliny, zyksyny, a-aktyniny, aktyny oraz kinazy FAK (ang. focal adhesion kinase) i białka VASP (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein) (KANCHANAWONG i współaut. 2010). Do obrazowania zastosowano technikę PALM, która wymaga stosowania fotoaktywowalnych znaczników. W tym przypadku wybrano fotoaktywowalne białko fluorescencyjne mEos, będące wariantem białka pochodzącego z koralowca Lobophyllia hemprichii (MCKINNEY i współaut. 2009). Białko to pod wpływem naświetlania światłem z bliskiego UV (\lambda 390 nm) zmienia własności fluorescencyjne. Przed naświetleniem białko emituje światło zielone (\lambda 516 nm) w odpowiedzi na wzbudzenie światłem niebieskim

 $(\lambda 506 \text{ nm})$ , a po naświetleniu emisja zmienia się na czerwoną (λ 581 nm), wymagającą wzbudzania światłem żółto-zielonym (λ 571 nm). Wymóg zastosowania białka fotoaktywowalnego wynika z natury metody PALM i silnie ogranicza wybór znacznika, powodując konieczność osobnej wizualizacji każdego z badanych białek. Do wyznaczenia pozycji białek konieczne jest określenie ich odległości od błony plazmatycznej, co wymaga precyzyjnego określenia położenia w osi Z. Do tego celu użyta została wersja mikroskopu PALM, iPALM, wykorzystująca interferencję światła i pozwalająca określać średnie położenia białek w osi Z (SHTENGEL i współaut. 2009). Niektóre z obrazowanych białek mają wyraźnie wydłużoną strukturę i dla ustalenia ich względnych pozycji konieczne okazało się obrazowanie dwóch białek fuzyjnych: osobno zawierających znacznik fluorescencyjnych na końcu aminowym i osobno na końcu karboksylowym białka. Tak postąpiono z paksyliną, taliną i a-aktyniną. Okazało się, że tylko talina wykazywała rzeczywistą rozciągłość przestrzenną w osi Z i koniec karboksylowy białka był średnio oddalony o 40 nm od jego końca aminowego. Problemem okazała się wzrastająca wraz z oddalaniem się od powierzchni preparatu niepewność określenia położenia w osi z. Dla białek położonych w pobliżu błony plazmatycznej wynosiła ona około 5 nm, a w odległości 100 nm od błony osiągała już 30 nm. Autorzy wykazali podział struktury kontaktu na szereg warstw funkcjonalnych: przekazującą sygnały warstwę integrynową (integryny, paksylina, kinaza FAK), warstwę przekazującą siły mechaniczne (talina, winkulina), warstwę regulującą strukturę aktyny (VASP, zyksyna, aktyna) oraz początek włókien naprężeniowych (aktyna, a-aktynina). Dopiero jednak obrazowanie szeregu skróconych analogów taliny (LIU i współaut. 2015) pozwoliło wykazać, że właśnie to białko jest kluczowym elementem łączącym integryny z włóknami naprężeniowymi. Białko to rozciąga się na długości około 100 nm i jest nachylone pod kątem 15° do powierzchni błony. Dokładna lektura powyżej cytowanych prac z jednej strony ujawnia wielki potencjał mikroskopii superrozdzielczej w badaniach struktur cytoszkieletu, z drugiej, pokazuje jak trudne i skomplikowane są takie badania pod względem technicznym. Autorzy wiedzą o istnieniu jedynie dwóch mikroskopów iPALM na świecie, jeden znajduje się w Janelia Research Campus Instytutu Medycznego Howarda Hughes'a w Ashburn w USA, a drugi w Instytucie Mechanobiologii na Narodowym Uniwersytecie Singapuru.

## PODSUMOWANIE

Struktura cytoszkieletu komórek eukariotycznych i dynamika czasowa jego zmian stwarzają optymalne warunki do zastosowania metod mikroskopii optycznej w ich badaniu. Długie i cienkie filamenty, występujące w komórkach niemięśniowych w postaci relatywnie rzadkiej sieci, dają się łatwo obserwować. Jednocześnie, stabilność struktur cytoszkieletu pozwala na stosunkowo łatwe utrwalanie i barwienie. Dzięki tym cechom, badania mikroskopowe nie tylko stały się nieodzownym elementem badań nad cytoszkieletem, ale jednocześnie były poligonem skutecznie weryfikującym zastosowanie tych technik do znakowania i lokalizacji innych białek i struktur, znacznie mniej stabil-nych i mniejszych niż cytoszkielet. Włókna cytoszkieletu mają tak charakterystyczną strukturę, że można je łatwo identyfikować również w obrazach pochodzących z mikroskopu elektronowego i nie wymaga to żadnego dodatkowego znakowania. Mikroskopia elektronowa, ze swoją subnanometrową rozdzielczością, pozwoliła weryfikować rezultaty pochodzące z badań prowadzonych przy użyciu metod mikroskopii optycznej i nabrać zaufania do obrazów uzyskiwanych z rozdzielczością znacznie mniejszą niż rozmiary badanych białek czy struktur. To badania cytoszkieletu pokazały, że wykorzystując mikroskopię optyczną można w ogóle obrazować struktury, których wymiary są znacznie mniejsze niż zdolność rozdzielcza mikroskopu optycznego i włókna o średnicy wielokrotnie od niej mniejszej tworzą wyraźne obrazy. Można więc zaryzykować stwierdzenie, że to badania nad cytoszkieletem przetarły drogę dla wszystkich współczesnych badań struktur biologicznych, jakie prowadzimy dziś z użyciem mikroskopii optycznej.

### Streszczenie

Cytoszkielet to sieć białkowych polimerów oraz związanych z nimi setek białek motorycznych, regulatorowych i łączących cytoszkielet z innymi strukturami komórkowymi. Rozwój wiedzy o cytoszkielecie jest nierozerwalnie zwiększany z postępem technik mikroskopowych używanych do jego obserwacji. Początki tych badań to niespecyficzne, nieskomplikowane barwienia utrwalonego materiału biologicznego, które później rozwinęły się w nowoczesną mikroskopię strukturalną, pozwalającą na precyzyjne znakowanie określonych białek tworzących cytoszkielet, badanie ich stanu fizjologicznego czy też oddziaływań cytoszkieletu z luźno związanymi białkami błony czy cytoplazmy. Obecnie możliwe jest nie tylko obrazowanie struktury i funkcji cytoszkieletu ze znacznie lepszą rozdzielczością przestrzenną, ale także prowadzenie tych obserwacji na żywym materiale biologicznym. Z drugiej strony, stabilność cytoszkieletu umożliwia poszukiwanie nowych metod jego obrazowania, co niewątpliwie należy do kół napędowych postępu, jaki dokonał się i wciąż dokonuje się w dziedzinie mikroskopii.

## LITERATURA

- AGRONSKAIA A. V., VALENTIJN J. A., VAN DRIEL L. F., SCHNEIJDENBERG C. T. W. M., HUMBEL B. M., VAN BERGEN EN HENEGOUWEN P. M. P., VERKLEIJ A. J., KOSTER A. J., GERRITSEN H. C., 2008. Integrated fluorescence and transmission electron microscopy. J. Struct. Biol. 164, 183-189.
- ANDERSEN R. A., BARR D. J. S., LYNN D. H., MEL-KONIAN M., MOESTRUP O., SLEIGH M. A., 1991. Terminology and nomenclature of the cytoskeletal elements associated with the flagellar/ ciliary apparatus in protists. Protoplasma 164, 1-8.
- ANDERSON M. O., SHELAT A. A., GUY R. K., 2005. A solid-phase approach to the phallotoxins: total synthesis of [Ala7]-phalloidin. J. Org. Chem. 70, 4578-4584.
- Askonas B. A., WILLIAMSON A. R., WRIGHT B. E., 1970. Selection of a single antibody-forming cell clone and its propagation in syngeneic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1398-1403.
- ATHAMNEH A. I. M., HE Y., LAMOUREUX P., FIX L., SUTER D. M., MILLER K. E., 2017. Neurite elongation is highly correlated with bulk forward translocation of microtubules. Sci. Rep. 7, 7292.
- AXELROD D., 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. J. Cell Biol. 89, 141-145.
- BELIN B. J., GOINS L. M., MULLINS R. D., 2014. Comparative analysis of tools for live cell imaging of actin network architecture. Bioarchitecture 4, 189-202.
  BOOTH D. S., AVILA-SAKAR A., CHENG Y., 2011.
- BOOTH D. S., AVILA-SAKAR A., CHENG Y., 2011. Visualizing proteins and macromolecular complexes by negative stain EM: from grid preparation to image acquisition. J. Vis. Exp., doi: 10.3791/3227.
- BURNET F. M., 1976. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. CA. Cancer J. Clin. 26, 119-121.
- CHALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W. W., PRASHER D. C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263, 802-805.
- CHUDAKOV D. M., MATZ M. V, LUKYANOV S., LU-KYANOV K. A., 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. Physiol. Rev. 90, 1103-1163.
  COONS ALBERT H., HUGH J., CREECH R., JONES NORMAN, BERLINER ERNST, 1942. The demon-
- COONS ALBERT H., HUGH J., CREECH R., JONES NORMAN, BERLINER ERNST, 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. J. Immunol. 45, 159-170.
- CURTIS A. S., 1964. The mechanism of adhesion of cells to glass. a study by interference reflection microscopy. J. Cell Biol. 20, 199-215. DANUSER G., WATERMAN-STORER C. M., 2006. Qu-
- DANUSER G., WATERMAN-STORER C. M., 2006. Quantitative fluorescent speckle microscopy of cytoskeleton dynamics. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35, 361-387.
  DELGADO-ÁLVAREZ D. L., CALLEJAS-NEGRETE O. A., GÓMEZ N., FREITAG M., ROBERSON R. W., Martin Proceeding Proce
- DELGADO-ÁLVAREZ D. L., CALLEJAS-NEGRETE O. A., GÓMEZ N., FREITAG M., ROBERSON R. W., SMITH L. G., MOURIÑO-PÉREZ R. R., 2010. Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in Neurospora crassa. Fungal Genet. Biol. 47, 573-586.
- crassa. Fungal Genet. Biol. 47, 573-586. DEMBO M., OLIVER T., ISHIHARA A., JACOBSON K., 1996. Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method. Biophys. J. 70, 2008-2022.

- ELLINGER P., HIRT A., 1929. Mikroskopische Untersuchungen an lebenden Organen. Z. Anat. Entwicklungsgesch. 90, 791-802.
- FOLKER E. S., BAKER B. M., GOODSON H. V, 2005. Interactions between CLIP-170, tubulin, and microtubules: implications for the mechanism of Clip-170 plus-end tracking behavior. Mol. Biol. Cell 16, 5373-5384.
- FRANCK C., MASKARINEC S. A., TIRRELL D. A., RAVI-CHANDRAN G., 2011. Three-dimensional traction force microscopy: a new tool for quantifying cell-matrix interactions. PLoS One 6, e17833. GALFRÈ G., MILSTEIN C., 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and proce-dures Matheda Engrupol 72 2.46
- dures. Methods Enzymol. 73, 3-46. GEISLER N., POTSCHKA M., WEBER K., 1986. Are the terminal domains in intermediate filaments organized as octameric complexes? Reevaluation of a recent suggestion. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 94, 239-245. GUIZETTI J., SCHERMELLEH L., MÄNTLER J., MAAR
- S., POSER I., LEONHARDT H., MÜLLER-REICHERT T., GERLICH D. W., 2011. Cortical constriction during abscission involves helices of ES-CRT-III-dependent filaments. Science 331, CRT-III-dependent filaments. Science 1616-1620.
- HANNA S., MISKOLCI V., COX D., HODGSON L., 2014. A new genetically encoded single-chain biosensor for Cdc42 based on FRET, useful for live-cell imaging. PLoS One 9, e96469.
  HARRIS A. K., WILD P., STOPAK D., 1980. Silicone
- rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. Science 208, 177-179.
- HIND L. E., DEMBO M., HAMMER D. A., 2015. Macrophage motility is driven by frontal-tow-ing with a force magnitude dependent on substrate stiffness. Integr. Biol. 7, 447-453.
- HOCHREITER B., GARCIA A. P., SCHMID J. A., 2015. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. Sensors 15, 26281-26314.
- IP W., FISCHMAN D. A., 1979. High resolution scanning electron microscopy of isolated and in situ cytoskeletal elements. J. Cell Biol. 83, 249-254.
- ITOH R. E., KUROKAWA K., OHBA Y., YOSHIZAKI H., MOCHIZUKI N., MATSUDA M., 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-mol-ecule probes in the membrane of living cells. Mol. Cell. Biol. 22, 6582-6591.
- JAY D. G., 1988. Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inacti-vation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5454-5458.
- KANCHANAWONG P., SHTENGEL G., PASAPERA A. M., RAMKO E. B., DAVIDSON M. W., HESS H. F., WATERMAN C. M., 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. Nature 468, 580-584.
- KÖHLER G., MILSTEIN C., 1975. Continuous cul-tures of fused cells secreting antibody of pre-
- defined specificity. Nature 256, 495-497. KUKULSKI W., SCHORB M., WELSCH S., PICCO A., KAKSONEN M., BRIGGS J. A. G., 2011. Cor-related fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision.
- J. Cell Biol. 192, 111-119. LAZARIDES E., WEBER K., 1974. Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2268-2272.
- LIU J., WANG Y., GOH W. I., GOH H., BAIRD M. A., RUEHLAND S., TEO S., BATE N., CRITCHLEY D. R., DAVIDSON M. W., KANCHANAWONG P., 2015. Talin determines the nanoscale architec-

ture of focal adhesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, E4864-E4873. EN F., WIELAND U., 1938. Über die Giftstoffe

- LYNEN F., des Knollenblätterpilzes. IV. Justus Liebig's Ann. der Chemie 533, 93-117.
- MARTIN K., REIMANN A., FRITZ R. D., RYU H., JEON N. L., PERTZ O., 2016. Spatio-temporal co-or-dination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retrac-
- tion dynamics. Sci. Rep. 6, 21901. MCKINNEY S. A., MURPHY C. S., HAZELWOOD K. L., DAVIDSON M. W., LOOGER L. L., 2009. A
- bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. Nat. Methods 6, 131-133.
  MELAK M., PLESSNER M., GROSSE R., 2017. Actin visualization at a glance. J. Cell Sci. 130, 505-520. 525-530.
- MURATA K., WOLF M., 2018. Cryo-electron micros-copy for structural analysis of dynamic biolog-ical macromolecules. Biochim. Biophys. Acta 1862, 324-334.
- MUROYAMA A., LECHLER T., 2017. A transgenic toolkit for visualizing and perturbing microtu-bules reveals unexpected functions in the epi-dermis. Elife 6, e29834.
   NAGASAKI A., KIJIMA S. T., YUMOTO T., IMAIZUMI M. YAMACISHI, A. KIM, H. NAKAMURA C. LIVE
- M., YAMAGISHI A., KIM H., NAKAMURA C., UYE-DA T. Q. P., 2017. The position of the GFP Tag on actin affects the filament formation in mammalian cells. Cell Struct. Funct. 42, 131-140.
- POMORSKI P., 2015. Nagroda nobla z chemii za rok 2014: za "Opracowanie metod superroz-dzielczych w mikrosko pii fluorescencyjnej", Eric Betzig, William Moerner i Stefan Hell. Kosmos 64, 203-209.
- POMORSKI P., WATSON J. M., HASKILL S., JACOB-SON K. A., 2004. How adhesion, migration, and cytoplasmic calcium transients influence interleukin-Ibeta mRNA stabilization in human monocytes. Cell Motil. Cytoskeleton 57, 143-157.
- POMORSKI P., KRZEMIŃSKI P., WASIK A., WIERZBIC-KA K., BARAŃSKA J., KŁOPOCKA W., 2007. Actin dynamics in Amoeba proteus motility. Proto-plasma 231, 31-41. RAJFUR Z., ROY P., OTEY C., ROMER L., JACOBSON
- K., 2002. Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP
- fusion proteins. Nat. Cell Biol. 4, 286-293. DL J., 2010. Development and characteriza-RIEDL J., 2010. Development and characteriza-tion of Lifeact - a versatile marker for the visualization of F-actin. Praca doktorska, Electronische Hochschulschriften, Monachium.
- SCHEELE R. B., BORISY G. G., 1978. Electron mi-croscopy of metal-shadowed and negatively stained microtubule protein. Structure of the 30 S oligomer. J. Biol. Chem. 253, 2846-2851.
- Schneider G., Nieznanski K., Jozwiak J., Slom-Nicki L.P., Redowicz M.J., Filipek A., 2010. Tubulin binding protein, CacyBP/SIP, induces actin polymerization and may link actin and tubulin cytoskeletons. Biochim. Biophys. Acta 1803, 1308-1317. SEKAR R. B., PERIASAMY A., 2003. Fluorescence
- resonance energy transfer (FRET) microsco-py imaging of live cell protein localizations. J. Cell Biol. 160, 629-633.
- SHAO S., XIANG C., QIN K., UR REHMAN AZIZ A., LIAO X., LIU B., 2017. Visualizing the spa-tiotemporal map of Rac activation in bovine aortic endothelial cells under laminar and dis-turbed flows. PLoS One 12, e0189088. SHIMOMURA O., JOHNSON F. H., SAIGA Y., 1962. Extraction, purification and properties of ae-

quorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J. Cell. Comp. Physiol. 59, 223-239.

- SHTENGEL G., GALBRAITH J. A, GALBRAITH C. G., LIPPINCOTT-SCHWARTZ J., GILLETTE J. M., MAN-LEY S., SOUGRAT R., WATERMAN C. M., KAN-CHANAWONG P., DAVIDSON M. W., FETTER R. D., HESS H. F., 2009. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 3125-3130.
- SLIOGERYTE K., THORPE S. D., WANG Z., THOMPSON C. L., GAVARA N., KNIGHT M. M., 2016. Differ-ential effects of LifeAct-GFP and actin-GFP on cell mechanics assessed using micropipette aspiration. J. Biomech. 49, 310-317.
- SVITKINA T., 2009. Imaging cytoskeleton components by electron microscopy. Methods Mol. Biol. 586, 187-206.
- SVITKINA T. M., BORISY G. G., 1999. Arp2/3 com-plex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. J. Cell Biol. 145, 1009-1026.
- SZCZESNA E., KASPRZAK A. A., 2016. Insights into the process of EB1-dependent tip-tracking of kinesin-14 Ncd. The role of the microtubule Eur. J. Cell Biol. 95, 521-530. TURGAY Y., MEDALIA O., 2017. The structure of lomin filements in contraction of the structure of
- lamin filaments in somatic cells as revealed by cryo-electron tomography. Nucleus 8, 475-481.
- VANDEKERCKHOVE J., DEBOBEN A., NASSAL M., WIELAND T., 1985. The phalloidin binding site of F-actin. EMBO J. 4, 2815-2818.
   VERSCHUEREN H., 1985. Interference reflection mi-
- VERSCHOERK III, 1966. Interference rejection interferen
- ration for integrated correlative light and elec-

tron microscopy. www.researchgate.net/publication/271210667\_Sample\_Preparation\_for\_Integrated\_Correlative\_Light\_and\_Electron\_Microscopy

- WATERMAN-STORER C. M., SALMON E. D., 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. J. Cell Biol. 139, 417-434.
- WATERMAN-STORER C. M., SALMON E. D., 1998. How microtubules get fluorescent speckles. Biophys. J. 75, 2059-2069.
  WATERMAN-STORER C. M., DESAI A., BULINSKI J. C., SALMON E. D., 1998. Fluorescent speckle
- microscopy, a method to visualize the dynamics of protein assemblies in living cells. Curr. Biol. 8, 1227-1230. WEHLAND J., OSBORN M., WEBER K., 1977. Phal-
- loidin-induced actin polymerization in the cy-toplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth (microfilaments/microtubules/tonofilaments/movement/immunofluores-
- cence microscopy). 74, 5613-5617. WEIGER M. C., WANG C.-C., KRAJCOVIC M., MEL-VIN A. T., RHODEN J. J., HAUGH J. M., 2009. Spontaneous phosphoinositide 3-kinase signaling dynamics drive spreading and random migration of fibroblasts. J. Cell Sci. 122, 313-323.
- WEPF R., AMREIN M., BURKLIT U., GROSS N. Z., 1991. Platinum/iridium/carbon: a high-reso-lution shadowing material for TEM, STM and SEM of biological macromolecular structures. J. Microsc. 163, 51-64.
- WULF E., DEBOBEN A., BAUTZ F. A., FAULSTICH H., WIELAND T., 1979. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4498-4502.

#### KOSMOS Vol. 67, 1, 219-232, 2018

#### NATALIA NOWAK<sup>1</sup>, PAWEŁ POMORSKI<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Imaging Tissue Structure and Function, Neurobiology Center, <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Department of Biochemistry, <sup>3</sup>Multimodal Laboratory of Cell Adhesion and Motility, NanoBioGeo Consortium, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, E-mail: p.pomorski@nencki.gov.pl

### MICROSCOPY TECHNIQUES FOR CYTOSKELETON RESARCH

#### Summary

Cytoskeleton is basically a network of protein polymers, but it also contains thousands of motor, regulatory and scaffolding proteins that interact with this network. Discoveries related to the cytoskeleton were strictly connected to the development of microscopy techniques used to observe the cytoskeletal structures. At first, the imaging involved only unspecific, very simple staining of fixed material. Then, the methods evolved into advanced structural microscopy, which enabled accurate detection of specific cytoskeletal proteins, their physiological status, and interactions with loosely bound membrane and cytoplasmic proteins. Today, it is possible not only to visualize the structure and function of the cytoskeleton with better spatial resolution but also to perform the imaging in vivo on live biological specimens. On the other hand, one should also notice that observations of the stable, well defined cytoskeletal structures from their very discovery have continuously stimulated the progress in the microscopy field.

Keywords: cytoskeleton, electron microscopy, immunocytochemistry, molecular probes, optical microscopy, superresolution microscopy