

Zastosowanie biosensorów typu FRET w badaniach mikroskopowych procesu migracji komórkowej

Sławomir Lasota¹

Zbigniew Baster²

Tomasz Witko²

Eliza Zimoląg¹

Jolanta Sroka¹

Zenon Rajfur^{2,✉}

Zbigniew Madeja^{1,✉}

¹Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków
²Zakład Fizyki Materiałów Organicznych, Instytut Fizyki im. M. Smoluchowskiego, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

✉Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (12) 664 61 42, e-mail: z.madeja@uj.edu.pl;

✉Zakład Fizyki Materiałów Organicznych, Instytut Fizyki im. M. Smoluchowskiego, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, ul. Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków; tel.: (12) 664 46 88, e-mail: zenon.rajfur@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 26.01.2017 r.

Artykuł zaakceptowano 31 stycznia 2017 r.

Słowa kluczowe: migracja komórek, białka Rho, biosensory typu FRET, mikroskopia fluorescencyjna, sygnalizacja komórkowa

Wykaz skrótów: FLIM (ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) – mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji; FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) – bezpromienisty rezonansowy transfer energii; GAP (ang. *GTPase activating proteins*) – białko zwiększające aktywność GTPazową; GDI – inhibitor dysocjacji GDP (ang. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*); GEF – czynnik wymiany nukleotydów guaninowych (ang. *guanine nucleotide exchange factor*); PIP₃ – 3,4,5-trifosforan inozytolu; TCSPC (ang. *Time Correlated Single Photon Counting*) – technika skorelowanego czasowo zliczania pojedynczych fotonów

Podziękowania: Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego 2012/07/B/NZ3/02909 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

STRESZCZENIE

Migracja komórkowa jest złożonym procesem biologicznym zaangażowanym w prawidłowe funkcjonowanie organizmów wielokomórkowych. Poszczególne jej etapy przebiegają pod ścisłą kontrolą licznych ścieżek sygnalizacyjnych, które koordynują ukierunkowaną przebudowę cytoszkieletu aktywnego. Kluczowymi elementami w tym procesie są małe GTPazy z rodziny Rho (RhoA, Rac1 i Cdc42), ale też liczne kinazy białkowe, lipidowe, jony wapnia czy białka mechanosensoryczne. Poznawanie tych skomplikowanych zależności jest możliwe dzięki stale rozwijanej technice mikroskopii fluorescencyjnej. Zauważalny postęp w tej dziedzinie dokonał się dzięki opracowaniu biosensorów białkowych, których działanie opiera się na zjawisku bezpromienistego rezonansowego transferu energii (FRET) pomiędzy białkami fluorescencyjnymi. Przejawiają one zmiany wydajności transferu w sposób zależny od aktywności badanych białek. Odpowiednio zaprojektowane i systematycznie doskonalone konstrukty tego typu pozwalają na obserwację w czasie rzeczywistym zmian aktywności elementów sygnalizacyjnych w migrujących komórkach. Wykorzystanie biosensorów typu FRET dla białek Rho i innych kluczowych ścieżek stale dostarcza cennych informacji, które zmuszają do weryfikacji dotychczasowego stanu wiedzy na temat ruchów komórkowych.

WPROWADZENIE

Migracja komórek jest kluczowym procesem dla rozwoju i funkcjonowania organizmów wielokomórkowych. Aktywne przemieszczanie komórek leży u podstaw tak ważnych procesów fizjologicznych, jak: rozwój zarodkowy, odpowiedź układu odpornościowego na patogeny, gojenie ran oraz patologicznych, jak tworzenie przerzutów przez komórki nowotworowe [1]. W klasycznym modelu migracji komórek zwierzęcych wyróżnia się 3 podstawowe fazy ruchu: wysuwanie wypustki migracyjnej, tworzenie nowych miejsc adhezji oraz retrakcję komórki [1,2].

W pierwszym etapie ruchu dzięki polimeryzacji aktywny błona komórkowa ulega przesunięciu, a komórka zwiększa powierzchnię wytwarzając na krawędzi wiodącej wypustki migracyjne, takie jak m.in. filopodia czy lamellipodia. Filopodia to cienkie palczaste wypustki wypełnione wiązkami równoległe ułożonych włókien aktywny. Uważa się, że pełnią kluczową funkcję w reakcjach kierunkowych komórek i służą do „badania” otoczenia przez komórkę, co po napotkaniu odpowiedniego bodźca skutkuje polaryzacją komórki i obraniem odpowiedniego kierunku ruchu [1,3]. Komórki poruszają się w układach dwuwymiarowych najczęściej z wytworzeniem lamellipodium, czyli szerokiej, płaskiej wypustki wypełnionej siecią rozgałęzionych włókien F-aktywny, które w miarę powiększania się lamellipodium ulegają ciągłej przebudowie. Aby komórka mogła efektywnie się przemieszczać koniecznym jest, by nowo powstała wypustka uległa przyłączeniu do podłoża, po którym komórka się porusza. W oddziaływaniu tym najczęściej biorą udział integryny, białka transbłonowe, które częścią zewnątrzkomórkową łączą się z białkami macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*). We wnętrzu komórki integryny oddziałują z kolei z filamentami aktywnymi poprzez szereg białek kotwiczących, takich jak: talina, α -aktywnina i winkulina [1]. Z czasem pojedyncze połączenia integrynowe dojrzewają w większe kompleksy składające się z wielu cząsteczek integryn łączących cytoszkielet aktywny z macierzą zewnątrzkomórkową, czyli kontakty zogniskowane (ang. *focal contacts*). Aby umożliwić przesunięcie komórki, dojrzałe kompleksy adhezyjne muszą ulec zerwaniu, co ma miejsce w ostatniej fazie ruchu – retrakcji. W tej fazie ruchu, dochodzi do aktywacji miozyny II, skurczu ciała komórki, zerwania połączeń z macierzą zewnątrzkomórkową w jej tylnej części i przesunięcia całej komórki w kierunku ruchu. Oprócz czynników czysto mechanicznych, za oderwanie tyłu komórki od podłoża odpowiedzialne mogą być również inne czynniki, na przykład produkowane przez komórkę proteazy, takie jak kalpaina [1].

Wszystkie opisane zdarzenia związane z przebudową sieci aktywności komórki podczas jej ruchu wymagają odpowiedniej koordynacji tak, aby komórka mogła efektywnie się przemieszczać. W przedniej części komórki muszą dominować procesy związane z polimeryzacją aktyny, powstawaniem nowych włókien aktynowych oraz miejsc adhezji, a w tylnej ze skurczem i odrywaniem komórki od podłoża. Kluczowymi białkami w koordynacji tych procesów są monomeryczne GTPazy z rodziny Rho.

UDZIAŁ BIAŁEK Rho W REGULACJI MIGRACJI

Małe białka G z rodziny Rho (GTPazy Rho) należą do nadrodziny białek Ras i stanowią grupę około 20 białek uważanych za główne regulatory dynamiki cytoszkieletu aktynowego w komórce. Przez wpływ na cytoszkielet aktynowy są one zaangażowane m.in. w polaryzację, migrację, adhezję oraz podział komórki [3,4]. Swoją nazwę zawdzięczają stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej (ok. 20 kDa) oraz temu, że ich aktywność zależy od związania guanozyny-5'-trifosforanu (GTP). Białka Rho określane są często mianem przełączników molekularnych (ang. *molecular switches*) ponieważ w komórce nieustannie przechodzą pomiędzy stanem aktywnym, wiążąc GTP, kiedy to mogą regulować aktywność innych białek sygnałowych oraz nieaktywnym, gdy związane są z GDP.

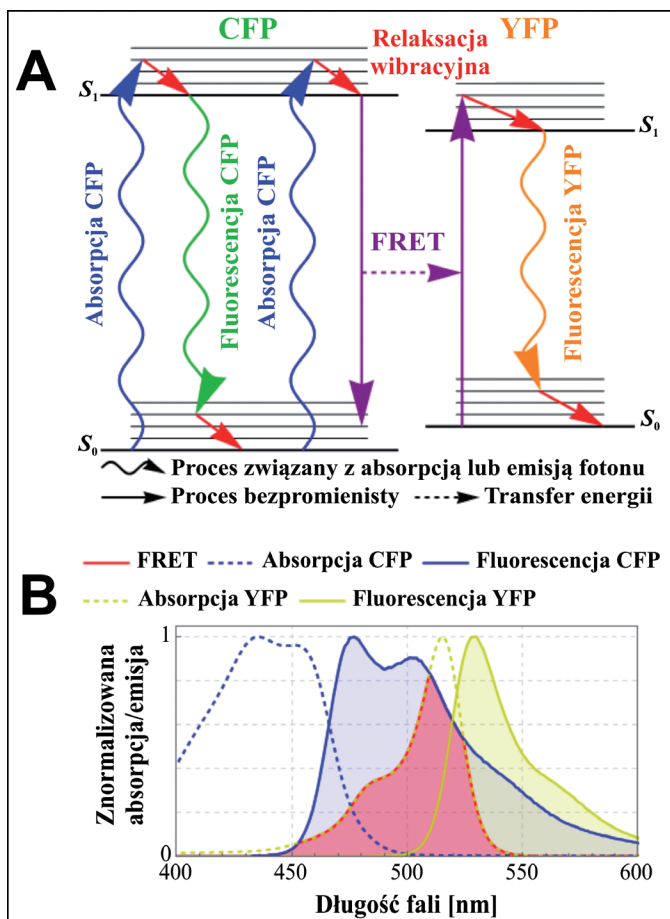
Obecnie wyróżniane są dwa typy białek Rho – klasyczne i atypowe, które różnią się sposobem aktywacji [3]. Do białek klasycznych zaliczanych jest trzech najbardziej konserwatywnych i najlepiej przebadanych przedstawicieli tej rodziny, których udział w migracji komórek został też najszerzej opisany, białka Cdc42, Rac1 i RhoA [2]. Do pełnej aktywacji białka Rho konieczne są 2 czynniki: przemieszczenie białka z cytoplazmy do błony komórkowej lub błon wewnątrzkomórkowych, gdzie zostaje zakotwiczone łańcuchem izoprenylovym oraz wymiana związanego nukleotydu z GDP na GTP. Białka Rho posiadają wysokie powinowactwo do nukleotydów guaninowych przy jednoczesnym niskim stopniu wymiany GDP/GTP oraz niskiej aktywności GTPazowej [4]. Aby zapewnić szybkie przesyłanie sygnału konieczny jest zatem udział dodatkowych białek modulujących ich aktywność. Regulacja aktywności białek Rho odbywa się przez 3 rodzaje białek regulatorowych: czynniki wymiany nukleotydów guaninowych (GEF, ang. *guanine nucleotide exchange factor*), inhibitory dysocjacji GDP (GDI, ang. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*) oraz białka zwiększające aktywność GTPazową (GAP, ang. *GTPase activating proteins*) [3,4]. Białka GEF prowadzą do aktywacji białek Rho przez wymianę związanego z białkiem GDP na GTP. U człowieka opisano dotychczas około 70 różnych białek GEF, przy czym jedno białko GEF może aktywować kilku różnych przedstawicieli rodziny Rho. Białka GDI są mniej zróżnicowane (opisanych zostało 3 przedstawiciele), a ich zadaniem jest blokowanie końca izoprenylowego, co zapobiega przejściu białka Rho z cytoplazmy do błony komórkowej oraz ochrona związanego białka Rho przed degradacją. Białka GAP mogą być specyficzne dla jednego typu białek Rho (np. CDC42GAP) lub, podob-

nie jak GEF, modulować aktywność kilku różnych białek Rho. Ich działanie opiera się na zwiększaniu aktywności GTPazowej białka Rho, a tym samym skróceniu czasu jego związania z GTP i możliwości aktywowania innych białek [2-4].

Zgodnie z kanonicznym modelem udziału białek Rho w regulacji migracji komórek przyjmuje się, że aktywność białek Cdc42 i Rac związana jest ze stymulacją polimeryzacji aktyny i tworzeniem wypustek w przedniej części komórki, a aktywacja białek Rho odpowiada za generowanie skurczu aktomiozynowego w tylnej części migrującej komórki. Białko Cdc42 opisywane jest jako kluczowe w tworzeniu filopodiów. Białka Rac biorą udział w migracji komórki przez regulację powstawania lamel lipodium. [2,3]. Natomiast rola RhoA w procesie migracji sprowadza się głównie do regulacji tworzenia włókien naprężeniowych w tylnej części komórki, które kurcząc się umożliwiają oderwanie jej od podłoża i przesunięcie ciała komórki w kierunku ruchu [5].

Choć liczne dane literaturowe wskazują na kluczową rolę małych GTPaz z rodziny Rho w regulacji migracji komórek, jest to tylko jeden z wielu elementów regulacyjnych tego niezwykle złożonego procesu. Regulacja kierunkowej migracji komórek opiera się w rzeczywistości na koordynacji działania również wielu innych białek, w tym enzymów o aktywności kinazowej, które odpowiadają za przesyłanie sygnału od receptorów błonowych do poszczególnych efektorów warunkujących rearanżację cytoszkieletu. Są to między innymi 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K), kinazy białkowe PKA, PKC oraz Akt. Poszczególne etapy migracji mogą być również koordynowane przez kontrolowane zmiany cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia, które mogą oddziaływać na białka efektorowe, często z pominięciem białek Rho. Procesy migracyjne w warunkach naturalnych wymagają dodatkowo złożonej interakcji z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej, w której komórki funkcjonują. Do migracji przez gęstą sieć włókien macierzy często potrzebna jest aktywność wydzielanych przez komórkę lub związanych z błoną komórkową enzymów proteolitycznych, takich jak metaloproteiny [6,7].

Większość danych na temat aktywności omówionych powyżej komponentów, którymi do niedawna dysponowano, pochodziła z pośrednich badań biochemicznych lub z obserwacji utrwalonych uprzednio komórek. Jednak do pełnego zrozumienia procesów zachodzących w czasie migracji konieczna jest możliwość określenia czasowej sekwencji występowania różnych zdarzeń oraz ich precyzyjnej lokalizacji w komórce. Stąd pojawiła się potrzeba opracowania nowych metod badawczych, które pozwalałyby na precyzyjne monitorowanie aktywności kluczowych regulatorów migracji komórek w czasie rzeczywistym i z wysoką rozdzielczością przestrzenną. Taki wgląd w mechanizmy sygnałowe wewnątrz żywych, migrujących komórek jest możliwy dzięki doskonałym latami technikom mikroskopii fluorescencyjnej. Szczególnie duży postęp nastąpił od czasu wprowadzenia do tych badań różnobarwnych białek fluorescencyjnych. Warsztat badawczy wzbogaciło dodatkowo wprowadzenie technik obrazowania z pogranicza biologii i fizyki, szczegól-



Rycina 1. Zjawisko FRET na przykładzie pary CFP-YFP. A) Diagram Jabłońskiego przedstawiający zjawisko fluorescencji CFP i FRET. Absorpcja fotonu powoduje przeniesienie elektronu do stanu wzbudzonego. Jeżeli elektron znajdzie się w wyższym stanie wibracyjnym, proces relaksacji wibracyjnej pozwoli mu pozbyć się nadmiaru energii, sprowadzając go do podstawowego poziomu wibracyjnego danego poziomu elektronowego. Powrót wzbudzonego elektronu do stanu podstawowego może nastąpić na drodze kilku konkurencyjnych procesów, między innymi fluorescencji (lewa strona) oraz FRET (prawa strona). W przypadku fluorescencji, elektron powraca do podstawowego stanu elektronowego emitując energię w postaci fotonu. W zjawisku FRET relaksacja donora jest bezpromienista, a nadmiar energii jest przekazywany poprzez długodystansowe oddziaływania dipol-dipol na akceptor. Tak wzbudzony akceptor może wrócić na poziom podstawowy emitując fluorescencję charakterystyczną dla cząsteczki akceptora. Występowanie zjawiska FRET powoduje zmniejszenie intensywności fluorescencji donora. B) Widma CFP i YFP z zaznaczonym obszarem nakładania się widm emisji CFP i absorpcji YFP. Na podstawie [17], zmienione.

nie wykorzystanie metod opartych o zjawisko bezpromienistego rezonansowego transferu energii (FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) pomiędzy białkami fluorescencyjnymi sprzęganymi z elementami sygnalizacyjnymi. Doskonalenie konstruktorów oraz metod ich obrazowania na przestrzeni lat doprowadziło do licznych odkryć, które każą nam częściowo zweryfikować dotychczasowe poglądy na wiele aspektów dotyczących migracji komórkowej [8].

FRET

Zjawisko bezpromienistego rezonansowego transferu energii zostało po raz pierwszy opisane w 1948 roku przez Theodora Förstera [9]. Na przełomie lat 60. i 70. XX wieku nastąpił dynamiczny rozwój tej techniki, pozwalający zasto-

sować ją do wyrafinowanych badań biologicznych [10,11]. Efekt FRET polega na bezpromienistym przekazaniu energii w wyniku długodystansowych oddziaływań dipol-dipol pomiędzy wzbudzoną cząsteczką donora (D) oraz akceptora (A) będącego w stanie podstawowym. Cząsteczka donora musi być fluoroforem, natomiast cząsteczka akceptora wystarczy, że będzie chromoforem. Zazwyczaj jednak stosuje się molekuly fluorescencyjne. Schemat procesu przedstawiono na rycinie 1A. Warunki które muszą być spełnione, aby wystąpił efektywny proces bezpromienistego transferu energii pomiędzy parą D-A, są następujące:

- widmo emisji donora musi przynajmniej częściowo pokrywać się z widmem absorpcji akceptora (Ryc. 1B) [12],
- centra chromoforowe cząsteczek muszą się znajdować w odpowiedniej wzajemnej orientacji przestrzennej [13,14],
- cząsteczki muszą znajdować się odpowiednio blisko siebie (zazwyczaj <100 Å).

Zależność wydajności transferu energii (E) od odległości między donorem i akceptorem (r) jest opisana wzorem

$$\text{Wzór (1)} \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6},$$

gdzie R_0 jest to odległość Förstera - parametr charakterystyczny dla danej pary D-A, określający odległość między cząsteczkami, dla której transfer energii z donora do akceptora następuje z 50% wydajnością [9,10,15]. Dzięki tej właściwości można z dużą dokładnością mierzyć odległości w układach biologicznych, a także badać zmiany przestrzenne w nich zachodzące, jeżeli będą one związane ze zmianą odległości pomiędzy parą D-A [16]. Z tego powodu FRET jest często nazywany „linijką molekularną” [10].

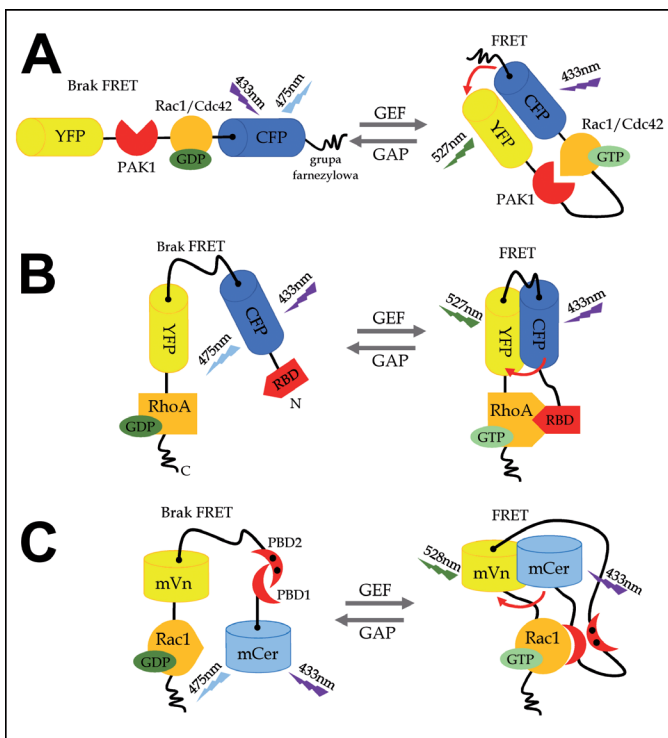
METODY POMIAROWE

Wydajność FRET zazwyczaj mierzy się wykorzystując obserwację jednego z dwóch parametrów fluorescencyjnych donora: intensywności fluorescencji I lub średniego czasu życia fluorescencji τ , czyli średniego czasu jaki donor przebywa w stanie wzbudzonym. W obecności akceptora może dojść do bezpromienistego transferu energii ze wzbudzonych cząsteczek donora do cząsteczek akceptora, w wyniku czego cząsteczki donora szybciej ulegają relaksacji. Intensywność fluorescencji donora w tym przypadku jest mniejsza niż w przypadku braku obecności w jego pobliżu akceptora. Równocześnie skróceniu ulega średni czas życia fluorescencji donora. Wydajność efektu FRET jest silnie związana z obydwoma zależnościami:

$$\text{Wzór (2)} \quad E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D}$$

oraz

$$\text{Wzór (3)} \quad E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D},$$



Rycina 2. Struktura przykładowych biosensorów typu FRET dla małych białek G z rodziny Rho. A) Raichu-Rac1/Cdc42; B) Biosensor RhoA; C) Biosensor Rac1. Czerwona strzałka oznacza bezpromienisty transfer energii FRET. Na podstawie [29,46,49], zmienione

gdzie I_{DA} oraz I_D oznaczają intensywność fluorescencji donora, odpowiednio w obecności i przy braku akceptora; analogicznie dla średniego czasu życia fluorescencji τ . Łącząc powyższe wyrażenia ze Wzorem (1) widać ścisłą zależność zmian intensywności fluorescencji donora oraz czasów życia fluorescencji wraz z jego odległością od akceptora.

Metody pomiaru efektu FRET wykorzystujące różnice w intensywności fluorescencji donora i akceptora niosą ze sobą wiele ograniczeń. Aby przeprowadzić dokładne pomiary potrzebna jest znajomość dokładnych wartości stężeń obu fluoroforów. Problem ten można ograniczyć używając biosensorów jednołańcuchowych (zostaną one dokładniej omówione w dalszej części), w których zachodzi wewnątrzcząsteczkowe zjawisko FRET (przykłady na rycinach 2 i 3). Pozwala to jednoznacznie określić stosunek ilości cząsteczek akceptora do donora jako 1:1 oraz na łatwą normalizację wyników w oparciu o intensywność fluorescencji akceptora. Kolejną niedogodnością pomiarów natężenia fluorescencji FRET jest konieczność zbierania kilku zdjęć komórek dla różnych parametrów spektralnych – zazwyczaj jeden zestaw parametrów ustalany jest na wzbudzenie donora i rejestrację jego emisji, natomiast w drugim kanale rejestruje się emisję akceptora po jego wzbudzeniu lub po wzbudzeniu donora i transferze energii. Skutkuje to potrzebą przeprowadzenia dokładnej kalibracji wzajemnego położenia zbieranych obrazów. Jednak w przypadku relatywnie szybkich procesów biologicznych, takich jak migracja komórkowa, może to być niemożliwe, ze względu na długi czas akwizycji i możli-

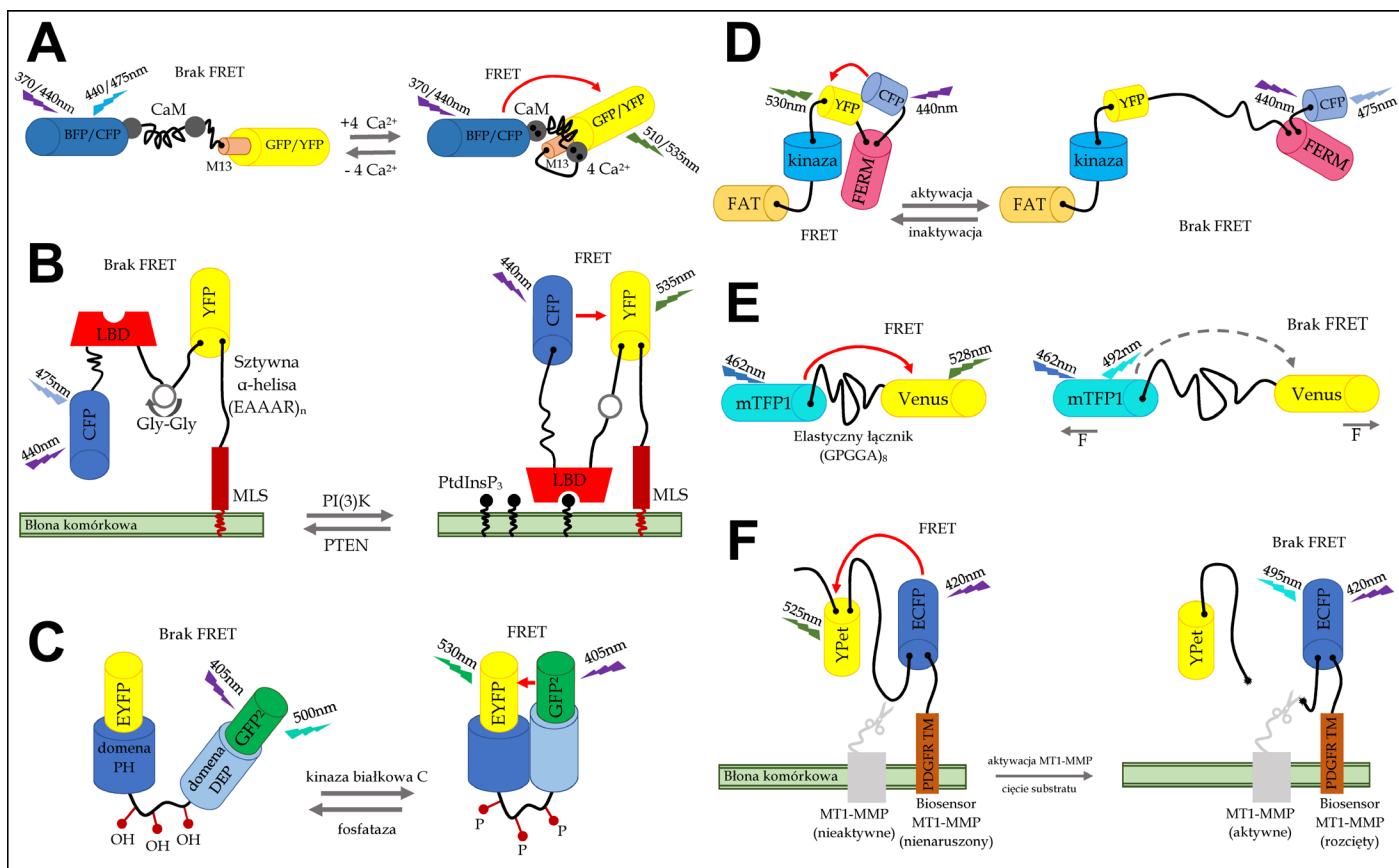
wość przemieszczenia komórek pomiędzy rejestracją kolejnych kanałów [16].

MIKROSKOPIA OBRAZOWANIA CZASÓW ŻYCIA FLUORESCENCJI

Jak wspomniano w poprzednim paragrafie, opis i interpretacja wyników pochodzących z eksperymentów FRET, opartych jedynie na pomiarach intensywności fluorescencji, jest trudny i często ograniczony przez warunki eksperymentalne i możliwą obecność artefaktów. Rozwiązaniem tych problemów jest wykorzystanie metody pomiarów średniego czasu życia fluorescencji donora. Jest on zależny od wydajności transferu energii, ale efekty związane z różnym stężeniem fluoroforów wpływają na niego w znacznie mniejszym stopniu. Zastosowanie mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM, ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) dostarcza najistotniejszych parametrów pomiarowych dla FRET, przy pominięciu ograniczeń i wyeliminowaniu części wad związanych z metodami opartymi na pomiarach intensywności fluorescencji [18].

Pierwszy opis techniki FLIM pojawił się w 1959 roku. Oryginalna konfiguracja eksperymentalna wykorzystywała mikroskopię fazowo-modulacyjną (ang. *phase-modulation microscopy* lub *frequency-domain microscopy*) i umożliwiała pomiar jedynie dla pojedynczych punktów [19]. Obrazowanie układów biologicznych wykonane tą techniką zostało opisane dopiero w 1989 roku [20]. W późniejszym okresie nastąpił intensywny rozwój tej metody przez różne grupy badawcze, ale uznaje się, że Kusumi wraz ze współpracownikami byli pierwszymi, którym udało się zobrazować komórkę metodą czasowo rozdzielczej fluorescencji [21].

Współczesna zaawansowana technika FLIM umożliwia wręcz tworzenie mapy rozkładu długości czasu życia fluorescencji donora w każdym punkcie na obszarze badanej próbki. Czas życia fluorescencji τ jest zdefiniowany jako średni czas przez jaki cząsteczka pozostaje w stanie wzbudzonym, zanim powróci do stanu podstawowego [22]. W praktyce jest to czas w jakim intensywność fluorescencji emitera spadnie do poziomu $1/e$ po jego wzbudzeniu [23]. Pomimo, że czasy życia stanów wzbudzonych są niezależne od zmian intensywności oświetlenia czy rozpraszania światła, zależą one w dużym stopniu od warunków środowiskowych takich jak pH, temperatura czy obecność wybranych jonów [22]. Obecnie, tak zwanym złotym standardem jest wykorzystanie techniki skorelowanego czasowo zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC, ang. *Time Correlated Single Photon Counting*). Bazuje ona na rejestracji zależnych od czasu profili zaniku intensywności fluorescencji emitowanej po wzbudzeniu pikosekundowym błyskiem światła (przeważnie za pomocą lasera impulsowego) dla każdego piksela próbki. Po każdym wzbudzeniu w tzw. oknie akwizycji, trwającym zazwyczaj 20–100 ns (w zależności od wymagań eksperymentu), detektor rejestruje nie więcej niż jeden foton pochodzący z próbki z zapamiętaniem czasu jaki upłynął między wzbudzeniem a jego rejestracją [24–26]. Ponieważ detektory czasowo-rozdzielcze, stosowane w TCSPC, po rejestracji pierwszego fotonu nie są zdolne do rejestracji



Rycina 3. Struktura przykładowych biosensorów typu FRET dla pozostałych elementów sygnalizacyjnych związanych z migracją komórki. A) Cameleon - biosensor poziomu jonów Ca^{2+} ; B) flip-pm - biosensor poziomu PIP_3 w błonie komórkowej; C) KCP1 - biosensor aktywności PKC; D) FAK biosensor - wskaźnik aktywności kinazy kontaktów zogniskowanych FAK; E) TSMod - naprężeniowy biosensor typu FRET, wykorzystany m.in. w badaniach winkuliny; F) MT-MMP1 biosensor - wskaźnik aktywności metaloproteiny MT-MMP1. Czerwona strzałka oznacza bezpromienisty transfer energii FRET. Na podstawie [51,60,63,66,67], zmienione.

kolejnych w tym samym oknie czasowym, to ilość światła dochodząca do detektora należy ustawić tak, by najwyżej w 2% okien czasowych nastąpiła rejestracja [27]. Stosowanie większego wysycenia prowadziło do skrócenia czasu pomiaru, ale równocześnie spowodowało sztuczne skrócenie rejestrowanych średnich czasów życia. Otrzymane w ten sposób informacje o czasach akwizycji pojedynczych fotonów przedstawia się następnie na histogramie wiążącym zależność ilości rejestrowanych fotonów od przedziałów czasowych, w których zostały zarejestrowane, tworząc krzywe zaniku fluorescencji, na bazie których wyznacza się średnie czasy życia.

Wykorzystanie techniki FLIM w pomiarach efektu FRET pozwala na pomiary dynamiki czasów życia fluorescencji piksel po pikselu w badanej próbce, co daje nie tylko informację o zmianach w procesach transferu energii, ale także o ich dokładnym położeniu w badanym obszarze. To z kolei przekłada się na możliwość pośrednich obserwacji interakcji białek, zmian konformacyjnych czy zmian stężeń określonych substancji jednocześnie eliminując problemy wynikające z pomiarów w dziedzinie intensywności fluorescencji.

BIOSENSORY JEDNOŁAŃCUCHOWE

Fluorescencyjne sensory biologiczne znajdują szerokie zastosowanie w badaniach komórkowych, wliczając w to

badania procesów immunologicznych, nowotworzenia czy badania cyklu komórkowego. Ogólna zasada działania biosensorów typu FRET polega na zmianie wydajności transferu energii między donorem a akceptorem na skutek różnych czynników środowiskowych, do badania lub wykrywania których dany sensor został zaprojektowany. Taki biosensor musi mieć przynajmniej dwa stany różniące się między sobą wydajnością transferu energii pomiędzy fluoroforami. Do scharakteryzowania informacji sygnalizowanych przez biosensor lub sensor optyczny bazujący na zjawisku fluorescencji dostępnych jest kilka technik, których dobór zależy od natury i właściwości widmowych stosowanego biosensora [28].

Biosensory stosowane w badaniach biologicznych, w odróżnieniu od prostych barwień immunofluorescencyjnych, umożliwiają obserwację dynamiki zmian parametrów badanych procesów lub elementów komórki. Obecnie istnieją biosensory pozwalające obrazować między innymi aktywność białek [29,30], stężenie składników małowcząsteczkowych komórki (takich jak cukry, lipidy, nukleotydy, jony i inne) [31–34], aktywność kanałów jonowych itp. [35]. Jak wspomniano wcześniej, zastosowanie jednołańcuchowych biosensorów typu FRET znacznie ułatwia przeprowadzenie tego typu eksperymentów. Biosensory jednołańcuchowe można zbudować wykorzystując syntezę chemiczną poprzez dołączenie w odpowiednich miejscach badanych cząsteczek fluorochromów

Tabela 1. Porównanie wybranych białek fluorescencyjnych. Na podstawie [41], zmienione.

Kolor	Białko	Maksimum absorpcji [nm]	Maksimum emisji [nm]	Względna jasność*	Względna fotostabilność**
Czerwony	mCherry	587	610	0,23	18,4
	tdTomato	554	581	1,38	18,8
Pomarańczowy	mOrange	548	562	0,71	1,73
Żółty	mCitrine	516	529	0,86	9,42
	Venus	515	528	0,77	2,88
	YPet	517	530	1,16	9,42
	EYFP	514	527	0,74	11,5
Zielony	EGFP	507	534	2,52	1,15
Błękitny	CyPet	435	477	0,26	11,3
	mCFPm	433	475	0,19	12,3
	Cerulean	433	475	0,39	6,92

*Jasność białka fluorescencyjnego w pH 7,4 względem fluoresceiny w pH 7,4. **Czas po jakim intensywność fluorescencji spada o połowę, znormalizowany względem fluoresceiny w pH 8,4 ($t_{1/2}/5,2$ s)

drobnocząsteczkowych, które tworzą parę FRET. Otrzymane w ten sposób biosensory wprowadza się następnie do komórek poprzez np. mikroiniekcję [36]. Obecnie, aby wytworzyć odpowiednie biosensory, najczęściej korzysta się z technik inżynierii genetycznej. Jeden z pierwszych tego typu biosensorów został zaprezentowany przez zespół Youvana w 1996 roku [37].

Do plazmidów ekspresyjnych zawierających geny kodujące badane białka lub białka, względem których wykazują aktywność biologiczną, wprowadza się DNA kodujące dwa białka fluorescencyjne będące parą FRET. Położenie tych fragmentów zależy od końcowej struktury otrzymanego biosensora. Bardzo często, poza wstawieniem białek fluorescencyjnych, w gen kodujący biosensor wprowadza się również elementy, które pasywnie lub aktywnie uczestniczą w działaniu cząsteczki. Do elementów pasywnych należą głównie łączniki (ang. *linker*), czyli krótkie łańcuchy aminokwasowe pozwalające oddalić domeny fluoryzujące od głównej części białka i jednocześnie zachować jej właściwości (np. katalityczne), a także otrzymać optymalne przestrzenne ustawienie fluoroforów względem siebie. Z kolei elementami aktywnymi mogą być na przykład domeny związane przez badane białko, gdzie przyłączenie domeny zmienia konformację całego biosensora. Tak przygotowany konstrukt wprowadza się do komórek w celu uzyskania przejściowej lub stabilnej ekspresji biosensora [38]. Biosensory utworzone z wykorzystaniem komórkowego układu ekspresji można tak zaprojektować, aby posiadały sekwencje sygnałowe kierujące je do odpowiednich przedziałów komórkowych lub umożliwiały zakotwiczenie ich w błonach [39].

Najczęściej spotykaną w literaturze parą FRET wykorzystywaną w jednołańcuchowych biosensorych jest CFP-YFP. Białka te wykazują bardzo dobre nakładanie się widm emisji i absorpcji. Co więcej, CFP ma szeroki zakres wzbudzenia (400-460 nm) cechujący się dużym przekro-

jem czynnym na absorpcję fotonów i jednocześnie nie pokrywający się z zakresem spektralnym wzbudzenia YFP. Ponadto, widmo emisji CFP nie pokrywa się z widmem emisji YFP (440-490 nm) w dużym zakresie, co pozwala w prosty sposób odseparować sygnał pochodzący z efektu FRET od sygnału z donora. Jedną z wad tego układu jest wykorzystywana do wzbudzenia donora długość fali światła, która może powodować szybkie powstawanie uszkodzeń w komórce w przypadku zastosowania oświetlenia o dużej intensywności. Kolejnym problemem jest duża różnica w jasności świecenia donora i akceptora na korzyść akceptora, co w przypadku jakiegokolwiek „przeciekania” sygnału pomiędzy tymi kanałami prowadzi do powstania dużych niepewności pomiarowych. Ostatnią dużą wadą tego układu jest znaczne nakładanie się widm emisyjnych białek w zakresie YFP, co utrudnia normalizację otrzymywanych wyników [17].

Poza parą CFP-YFP wykorzystuje się kilka innych układów lub białek nowszej generacji, będących analogami omawianej pary. Równocześnie trwają badania nad kolejnymi białkami fluorescencyjnymi, które można wykorzystać przy tworzeniu biosensorów. Przykładowo, białko mCerulean już od kilku lat jest przedstawiane jako analog CFP posiadający lepsze parametry spektralne, wyższą intensywność fluorescencji oraz stabilność [40]. Porównanie wybranych białek fluorescencyjnych zawarto w Tabeli 1 [41]. W zastosowaniu są również pary cechujące się przesunięciem długości fali w kierunku fal dłuższych takie jak mOrange-mCherry, zmniejszając w ten sposób ryzyko uszkodzenia komórek podczas pomiarów. Wybrane przykłady stosowanych par FRET w biosensorych zawarto w tabeli 2.

Jednym z najnowszych zabiegów stosowanych przy projektowaniu biosensorów jest permutacja kołowa. Polega ona na rearanżacji ułożenia domen białka, czasami wraz z insercją krótkich peptydów. Dzięki takim zabiegom, bez

Tabela 2. Zestawienie wybranych biosensorów jednolącuchowych

Badane białko/parametr*	Nazwa biosensora	Zarys budowy biosensora**	Źródło
Ras	Raichu-Ras	YFP-H-Ras-RBD(domena białka Raf)-CFP	[45]
Rac1/Cdc42	Raichu-Rac1/Cdc42	YFP-CRIB(Pak1)-Rac1 lub Cdc42-CFP	[46]
RhoA	Raichu-RhoA	YFP-RBD(PKN)-RhoA-CFP	[47]
RhoA	RhoA biosensor	RBD(Rhotekin)-CFP-YFP-RhoA	[29]
RhoC	RhoC-FLARE	RBD(ROCK1)-mCerulean-mVenus-RhoC	[48]
Rac1	Rac1 biosensor	mCerulean-PBD1-PBD2(PAK1)-mVenus-Rac1	[49]
Cdc42	Cdc42 biosensor	mCerulean-PBD1-PBD2(PAK1)-mVenus-Cdc42	[30]
Cdc42	Cdc42-2G biosensor	mTFP1cp-WASP-cpVenus-Cdc42	[50]
Zmiany stężenia Ca ²⁺	Cameleon	BFP lub CFP-CaM-M13(MLCK)-GFP lub YFP	[51]
Zmiany stężenia Ca ²⁺	TN-XL	cpCerulean-TnC-cpCitrine	[52]
Zmiany stężenia Ca ²⁺	Twitch (np. Twitch-2B)	mCerulean3-domena TnC-cpVenusCD	[53]
Zmiany poziomu PIP ₃	flip-pm/flip-em	CFP-LBD(Grp1)-YFP-MLS	[54]
Zmiany poziomu PIP ₃	InPakt	YFP-pseudoligand-PH(Akt)-CFP	[55]
Zmiany poziomu (PI(3,4)P2)	Pippi-PI(3,4)P2	CFP-PH(TAPP1)-YFP-MLS	[56]
Aktywność PKA	AKAR1/AKAR2	ECFP-domena 14-3-3 lub FHA1-substrat-Citrine	[57]
Aktywność PKA	AKAR3	CyPet-domena FHA1-substrat-YPet	[58]
Aktywność PKC	CKAR	CFP-FHA2-substrat-YFP	[59]
Aktywność PKC	KCPI1	GFP ² -plekstryna-EYFP	[60]
Aktywacja kinazy Akt	Akind	PH(Akt)-YFP-Akt-CFP	[56]
Aktywność kinazy Akt	Eevee-iAkt	YPet-FHA1-substrat-ECFP	[61]
Aktywacja FAK	FERM sensor	YFP-FERM(FAK)-CFP-KD(FAK)-FAT(FAK)	[62]
Aktywacja FAK	CYFAK413	CFP-FERM-YFP-FAK-FAT	[63]
Aktywność kinazy Src	Src biosensor	ECFP-SH2(c-Src)-substrat-EYFP	[64]
Naprężenie białek (np. α-aktyliny)	sstFRET	Cerulean-Spektryna-Venus	[65]
Naprężenie białek (np. winkuliny)	TSMoD	mTFP1-elastyczny łącznik [GPGGA] ₈ -Venus	[66]
Aktywacja MT-MMP1	MT-MMP1 biosensor	YPet lub mCherry-substrat-ECFP lub mOrange2-PDGFR TM	[67,68]

*Biosensory podano w kolejności, w której zostały omówione w dalszej części pracy.

**W nawiasach podano nazwy białek, z których pochodziły wykorzystane domeny.

zmiany ogólnej budowy cząsteczki białka fluorescencyjnego, można poprawić jego parametry, takie jak stabilność w różnych zakresach pH, intensywność fluorescencji czy zawężenie widmo emisyjne, ograniczając w ten sposób przeciekanie (ang. *bleed-through*) między kanałami, bez drastycznej zmiany całej charakterystyki wzbudzeniowo-emisyjnej. Co więcej, takie operacje powodują zmianę przestrzennego ułożenia centrum fluoroforowego w białku bez znacznej zmiany kształtu całego biosensora. Taka możliwość otwiera pole do manipulacji centrami, celem lepszego dopasowania przestrzennego pary FRET w biosensorze [42,43].

BIOSENSORY KONFORMACYJNE, NAPRĘŻENIOWE I LITYCZNE

Jednolącuchowe biosensory oparte na FRET są niezwykle przydatne w badaniu aktywności białek w żywych komórkach. Dzięki tym sensorom możliwa jest obserwacja dynamiki procesów zachodzących wewnątrz komórki w skali milisekund, co nie jest możliwe przy zastosowaniu tradycyjnych technik biochemicznych. Ze względu na sposób aktywacji możemy wyróżnić biosensory lityczne, konformacyjne oraz naprężeniowe.

Biosensory lityczne, a w szczególności proteolityczne, bazują na zdolności białek do lizy wiązań chemicznych. W tego typu biosensorach modyfikacji poddaje się nie samo białko, tylko przygotowuje się cząsteczkę, w której para FRET połączona jest łącznikiem zawierającym charakterystyczne miejsce cięcia dla badanego białka. W natywnym biosensorze, ze względu na małą odległość pomiędzy domenami fluorescencyjnymi, zjawisko FRET zachodzi z dużą wydajnością. Jednakże, po przerwaniu łącznika w wyniku aktywności katalitycznej badanego białka, następuje dyfuzja domen od siebie, co wiąże się ze wzrostem odległości i zmianą parametrów fluorescencyjnych donora. Zanik aktywności tego typu biosensorów, w odróżnieniu od znacznej większości pozostałych biosensorów typu FRET, jest procesem nieodwracalnym. Przykładowy biosensor tego typu przedstawiono na rycinie 3F.

Biosensory konformacyjne są szeroko stosowane wraz z metodą FRET. Wykorzystują one zdolność białek do zmian konformacyjnych w różnych procesach biologicznych. Biosensory tego typu są zdolne wykrywać zarówno

no zmiany potranslacyjne (między innymi fosforylację), jak i zmiany konformacji całego białka na skutek zmian warunków środowiska zewnętrznego i jego aktywności katalitycznych. Istotną zaletą takich biosensorów jest ich wszechstronność i wyspecjalizowanie, dzięki czemu znajdują one zastosowania w szerokim zakresie badań procesów biologicznych. Dodatkowo, aktywacja biosensorów konformacyjnych jest odwracalna, co pozwala na prowadzenie pomiarów ciągłych z wykorzystaniem tych samych cząsteczek. Przykładowe biosensory tego typu przedstawiono na rycinie 2.

Trzecim opisywanym typem biosensorów są biosensory naprężeniowe. W odróżnieniu od biosensorów konformacyjnych, w których czynnik powodujący zmianę układu przestrzennego białka jest pochodzenia chemicznego, w przypadku tego typu zmiana wywołana jest bodźcem mechanicznym pochodzącym ze środowiska i skutkującym odsunięciem się pary D-A od siebie. Taki mechanizm działania wykazuje biosensor na rycinie 3E [44].

BIOSENSORY AKTYWNOŚCI MAŁYCH GTPaz

Opracowanie metod obrazowania zmian aktywności małych GTPaz z rodziny Rho było wysoce pożądane ze względu na kluczowe znaczenie tych białek w regulacji migracji komórek. Pierwsze próby pomiaru aktywności tych białek metodą FRET opierały się na obrazowaniu interakcji dwóch niezależnych konstruktyw. Jednym z nich było białko stanowiące obiekt zainteresowania (białko Rho) drugim fragment białka wiążącego się do jego zaktywowanej formy. Oba białka były dodatkowo sprzęgnięte z odpowiednimi białkami fluorescencyjnymi o charakterze donora i akceptora [69]. Główną wadą takich sensorów dwułańcuchowych była możliwość ich nierównomiernej ekspresji, co znacząco utrudniało analizę zjawiska, gdyż wymuszało uprzednie stosowanie licznych pomiarów korekcyjnych w celu oceny stopnia zaburzenia sygnału przez nakładanie się widm spektralnych donora i akceptora. Metoda uległa znacznemu uproszczeniu po wbudowaniu donora i akceptora w jeden łańcuch białkowy, co sprawiło, że stechiometria pomiędzy białkami fluorescencyjnymi była stała i pomiary aktywności mogły ograniczać się do badania względnych zmian stosunku sygnału FRET do świecenia donora. Taki pomiar ratiometryczny eliminował również ewentualne problemy wynikające ze zmian grubości komórki lub lokalnych zmian gęstości konstruktu. Wymuszał jednak bardzo dokładną obróbkę pozyskiwanych obrazów i precyzyjne wyrównanie obu kanałów przed wykonaniem operacji dzielenia obrazów [70]. Wstępne próby utworzenia jednołańcuchowego biosensora dla małego białka G (w tym przypadku Ras) polegały na połączeniu donora i akceptora do tego białka, jednak jak się okazało, zmiany konformacyjne w jego obrębie zachodzące po aktywacji nie były wystarczające, aby zapewnić odpowiednie zmiany sygnału FRET. Problem został rozwiązany dzięki utworzeniu białka chimerycznego, obejmującego zarówno białko Ras, jak i domenę białka efektorowego [71]. Obecnie biosensory dla małych GTPaz łączą w swojej budowie obecność 4 elementów, a mianowicie samego badanego białka, domeny białka efektorowego i dwóch białek fluorescencyjnych,

między którymi może zachodzić zjawisko FRET. Na przestrzeni lat zmieniała się kolejność tych białek w łańcuchu biosensora, aczkolwiek zasada działania zawsze była wspólna, oparta o interakcję zaktywowanej GTPazy z domeną białka efektorowego, co prowadziło do zmiany konformacyjnej, skutkującej fizycznym zbliżeniem się do siebie białek fluorescencyjnych i zmianą wydajności zjawiska FRET. Z technicznego punktu widzenia, sensory takie stanowią element monitorujący aktywność białek GEF dedykowanych poszczególnym małym GTPazom [4].

BIOSENSORY BIAŁEK Rho PIERWSZEJ GENERACJI

Konstrukcję jednołańcuchowych biosensorów małych białek G opartych o zjawisko FRET zapoczątkowało wytworzenie sensora Raichu (ang. *Ras and interacting protein chimeric unit*) dla białka Ras. Biosensor uzyskano łącząc białko H-Ras z domeną pochodzącą z białka Raf, która wiąże specyficznie zaktywowane białko Ras (RafRBD) i umieszczając na obu końcach wzmocnione białka fluorescencyjne ECFP i EYFP. W efekcie, wymiana GDP na GTP skutkowała wyraźną zmianą konformacyjną tego chimerycznego konstruktów, przekładającą się na zmianę wydajności FRET pomiędzy białkami fluorescencyjnymi [45]. Twórcy konstruktów pokazali następnie, że podmieniając jego kluczowe elementy można otrzymać analogiczne biosensory dla spokrewnionych białek, otrzymując w ten sposób narzędzia do badania aktywności Rac1 i Cdc42 (Ryc. 2A). Uzyskano to wprowadzając domenę CRIB białka Pak1 i odpowiednio Rac1 lub Cdc42 pomiędzy białka fluorescencyjne. C-końiec białka został dodatkowo wyposażony w motyw CAAX białka K-Ras, przytwierdzający biosensor do błony komórkowej. Takie podejście pozwoliło obrazować zmiany wydajności FRET w odpowiedzi na zmiany równowagi pomiędzy aktywnością poszczególnych białek GEF i GAP przy błonie komórkowej. Zastosowanie tej metody pozwoliło wykazać wysoką aktywność Rac1 i Cdc42 w lamellipodium migrującej komórki linii ludzkiego włókniakomięsaka HT1080, przy czym najwyższą aktywność Cdc42 obserwowano na samej krawędzi tej struktury [46]. Opracowany później biosensor Raichu-RhoA zawiera pochodzącą z PKN (ang. *Protein Kinase N*) domenę wiążącą RhoA (RBD) w miejscu domeny CRIB omówionych poprzedników, a także skróconą wersję białka RhoA. Uzyskany biosensor, wspólnie z poprzednimi, został wykorzystany do scharakteryzowania aktywności białek z rodziny Rho w czasie podziału komórek linii ludzkiego raka szyjki macicy HeLa [47]. Zastosowanie sensorów tej generacji miało też wkład w badania nad migracją komórek. Wykazano np., że w pojedynczo migrujących komórkach HeLa aktywacja RhoA zachodzi zarówno na przedzie komórki, jak i w jej tylnej części, podczas gdy w migrujących kolektywnie komórkach nabłonka psiej nerki MDCK, aktywacja była obserwowana tylko w pobliżu krawędzi wiodącej. W komórkach małych fibroblastów Cos1 i mysich embrionalnych fibroblastów NIH3T3 wykazano z kolei kooperację białek RhoA, Rac1 i Cdc42 w tworzeniu fałd błonowych (ang. *membrane ruffles*), w sposób zależny od rekrutowania mDia [72]. Wyniki te jednoznacznie wskazywały, że kwestia aktywacji poszczególnych białek z rodziny Rho

w różnych częściach migrującej komórki może być znacznie bardziej złożona, niż początkowo przypuszczano.

BIOSENSORY BIAŁEK Rho PODLEGAJĄCE PEŁNEJ REGULACJI

Wszystkie biosensory typu Raichu łączy wspólna wada, wiążąca się z brakiem naturalnego C-końca białka Rho, który warunkuje interakcję z regulatorowymi białkami GDI i w razie aktywacji, z błoną komórkową. Stałe zakotwiczenie w błonie nie odpowiada fizjologicznemu stanowi, w którym białka Rho przemieszczają się płynnie pomiędzy błoną komórkową (w stanie aktywacji) a cytoplazmą, gdzie związane z GDP są zatrzymywane przez białka GDI [69]. Krokiem do wyeliminowania tego problemu było opracowanie biosensora RhoA nowej generacji (Ryc. 2B), w którym białka fluorescencyjne zostały przeniesione do centrum konstruktów, a domeny efektorowe zostały zlokalizowane terminalnie. Biosensor dedykowany RhoA zawierał na N-końcu domenę wiążącą Rho (RBD) pochodzącą z białka efektorowego (ang. *Rhotekin*), następnie białka fluorescencyjne – CFP i niewrażliwą na pH formę białka YFP, przedzielone nieustrukturyzowanym łącznikiem o zoptymalizowanej długości, a także kompletne białko RhoA na C-końcu. Wolny, natywny C-końiec umożliwił interakcję z odpowiednimi białkami RhoGDI i odwracalną interakcją z aktywowanym białkiem z błoną komórkową. Ta niewątpliwa zaleta została uzyskana kosztem częściowej redukcji zakresu dynamicznego, ze względu na większe prawdopodobieństwo spontanicznego transferu energii pomiędzy blisko zlokalizowanymi białkami akceptora i donora, także w stanie nieaktywnym. Dodatkowo, w celu przeprowadzenia wiarygodnych badań, niezbędne było uzyskanie linii komórkowej wykazującej ekspresję biosensora na umiarkowanym poziomie, aby uniknąć wysycenia całej puli cytoplazmatycznej RhoGDI, co skutkowało by zaburzeniem równowagi i niefizjologicznym zachowaniem komórek. Przy użyciu biosensora wykazano akumulację zaktywowanej formy RhoA na krawędzi wiodącej spontanicznie migrującej komórki Swiss-3T3. Potwierdzono również kolokalizację z powstającymi obwodowo fałdami błonowymi i pęcherzykami pinocytarnymi. Zgodnie z oczekiwaniami gwałtowna aktywacja towarzyszyła również sporadycznej retrakcji tyłu komórki. Odmienny wzór aktywności w obrębie lamellipodium zaobserwowano z kolei po stymulacji czynnikiem PDGF, co przypisano aktywacji białka Rac1, prowadzącej do zahamowania w tym rejonie RhoA [29]. Późniejsze badania z użyciem biosensora RhoA potwierdziły zaangażowanie tego białka w tworzeniu wypustek na krawędzi wiodącej wysoce inwazyjnych komórek szczerzego gruczolakoraka piersi MTLn3 [73]. Obserwacja udziału białka RhoA w tak zróżnicowanych etapach migracji sugeruje funkcjonowanie jego różnych puli, pod kontrolą odmiennych czynników GEF/GAP, a opracowanie biosensora podlegającego regulacji przez te elementy daje nadzieję na stopniowe odkrywanie tych subtelnych zależności [74]. Przykładowym osiągnięciem na tym polu jest wykazanie korelacji między fosforylacją RhoA przy udziale kinazy białkowej A (PKA), a cyklem

tworzenia wypustek przez komórki nabłonkowe, w sposób zależny od regulacji przez RhoGDI [75].

Stosowane podejście do tworzenia biosensorów typu FRET pozwala również na niezależną obserwację aktywności silnie spokrewnionych białek, co pokazało opracowanie konstruktów dla białka RhoC, wykazującego podobieństwo sekwencji aminokwasowej z białkiem RhoA, sięgające 92% [48]. Biosensor RhoC FLARE został utworzony w oparciu o domenę RBD białka ROCK1 wiążącą RhoC, monomeryczne białko fluorescencyjne Cerulean (mCerulean), nieustrukturyzowany łącznik o optymalnej długości, monomeryczne białko fluorescencyjne Venus (mVenus) i kompletne białko RhoC. Aktywacja biosensora RhoC FLARE poprzedzała aktywację RhoA z przodu komórki i następowała w sposób mniej zlokalizowany, obejmując obszary bardziej oddalone od krawędzi [48]. Wykazano również, że aktywacja RhoC zachodząca pod kontrolą czynników p190RhoGEF/GAP, może warunkować proces wysuwania wypustek na krawędzi wiodącej komórki w sposób zależny od poziomu fosforylacji kofiliny [76]. Podobny mechanizm odpowiada za wzmożoną aktywację RhoC u podstawy inwadopodiów – wypustek tworzących się na komórkach MTLn3 po stymulacji czynnikiem wzrostu naskórka (EGF ang. *epidermal growth factor*), którym przypisuje się rolę w tworzeniu przerzutów nowotworowych [77].

Opracowanie biosensora Rac1 posiadającego natywny C-końiec (Ryc. 2C) pozwoliło na zweryfikowanie jego roli w niektórych procesach, m.in w tworzeniu inwadopodiów. W skład biosensora weszło kolejno od N-końca białko fluorescencyjne mCerulean, dwie tandemowo ułożone domeny PBD (ang. *p21-binding domains*) z białka Pak1, przedzielone zoptymalizowanym strukturalnie łącznikiem, białko mVenus i kompletne białko Rac1. Umieszczone w konstrukcie domeny PBD posiadały odmienną funkcję, gdyż pierwsza, PBD1 odpowiada za wiązanie z GTPazą, podczas gdy PBD2 posiada odpowiednie mutacje zapewniające autoinhibicję biosensora w przypadku braku aktywacji białka Rac1 oraz ochronę przed niespecyficznym wiązaniem do innych GTPaz. Korzystając z tego biosensora wykazano, że tworzeniu inwadopodiów przez komórki MTLn3 towarzyszy spadek aktywności Rac1, która pojawia się ponownie w momencie rozkładu tych wypustek, w sposób zależny od aktywności czynnika TrioGEF [49]. Na podobnej zasadzie skonstruowano biosensor Cdc42 posiadający natywny C-końiec. Posiada on analogiczną budowę do omawianego wcześniej biosensora Rac1, co również zapewnia mu prawidłową kontrolę aktywności i translokację do błony komórkowej. Jego użycie potwierdziło aktywację Cdc42 na krawędzi wiodącej migrujących fibroblastów. Obserwowano również wcześniej postulowaną przejściową aktywację tego białka w trakcie formowania podosomów (niewielkich struktur adhezyjno-migracyjnych, powstających w oparciu o cytoskielet aktynowy) w tych komórkach. Pomimo bogatej charakterystyki wzoru aktywacji w różnych okolicznościach, mechanizmy regulacji Cdc42 wymagają dalszych badań [30].

Niestety, pomimo licznych prób optymalizacji, czułość wielu opracowanych biosensorów typu FRET jest ciągle bardzo ograniczona. Ze względu na jednołańcuchową budowę, różnica między wydajnością FRET w stanie podstawowym i zaktywowanym nie jest bardzo duża, co przekłada się na niewielki zakres dynamiczny. W połączeniu z często niską ekspresją konstruktów oraz niewielką jasnością fluorescencji, może to znacznie utrudniać precyzyjną obserwację szybkich zmian aktywności, które są postulowane m.in. w przypadku białka RhoA. Obserwacja takich mało wydajnych biosensorów wymusza stosowanie wysokoaperturowych obiektywów, długich czasów ekspozycji i dużej intensywności światła wzbudzenia, co skutkuje wyświecaniem fluoroforów i efektem fototoksycznym. Stworzyło to potrzebę dalszego doskonalenia dostępnych biosensorów z wykorzystaniem najnowszych metod biologii molekularnej [78]. Szczególny nacisk położono na optymalizację budowy łączników i właściwości białek fluorescencyjnych, co przekłada się na szereg parametrów, takich jak odległość między fluorochromami, względną orientację białek i topologię domen, pozwalając uzyskać możliwie najwyższy zakres dynamiczny biosensora. W ostatnim czasie została udostępniona biblioteka zoptymalizowanych elementów, ułatwiająca poszukiwanie kombinacji o najlepszych właściwościach. Jest ona dostępna pod nazwą cpFRET i umożliwia tworzenie konstruktów o wolnych natywnych końcach C i N, co w wielu przypadkach jest konieczne dla prawidłowej regulacji. Biblioteka posłużyła już do wytworzenia m.in. doskonalszych biosensorów dla Cdc42 i ERK [50,79].

Wiedza zawarta w omówionej bibliotece pozwoliła także na wytworzenie biosensora RhoA nowej generacji, poprzez dobranie optymalnej kombinacji odpowiednich wersji permutowanych kołowo białek fluorescencyjnych, specyficznych łączników o odpowiedniej długości i elastyczności oraz zapewnienie optymalnej topologii tworzonego konstruktów białkowego. Pozwoliło to zaobserwować subtelny wzór aktywacji tego białka w obrębie filopodiów migrujących fibroblastów. Było to możliwe dzięki większej jasności i poszerzeniu zakresu dynamicznego tego biosensora. Dodatkowe korzyści wynikają z redukcji wyświecania i fototoksyczności na skutek obniżenia wymaganej intensywności światła wzbudzającego. Aktywacja RhoA na zakończeniach wiązek aktywny w filopodiach była raczej niespodziewana, gdyż rolę w powstawaniu tych struktur przypisuje się przede wszystkim białku Cdc42. Jego aktywację obserwowano jednak bliżej podstawy filopodiów, co stanowi kolejny przykład precyzyjnej kontroli czasowo-przestrzennej aktywacji małych GTPaz w obrębie struktur związanych z migracją [79]. Biosensor RhoA nowej generacji pomógł również wykazać zdelokalizowaną aktywację tego białka w obrębie stożka wzrostu mysiej neuroblastomy, ulegającego retrakcji. Jednocześnie wykazano inny wzorzec aktywacji tego białka w stożkach wzrostu neuronów, niż przy użyciu Raichu-RhoA, co można przypisywać doskonalszej regulacji biosensora nowego typu przy udziale RhoGDI [79].

W celu uzyskania pełnego obrazu szlaków sygnałowych warunkujących ruch komórki, bardzo pożądane jest opracowanie metod jednoczesnej obserwacji aktywności kilku ścieżek sygnalizacyjnych. Jedną z możliwości otrzymania takich danych jest zastosowanie zaawansowanych metod obliczeniowych. Metodę tę zastosowano do określenia sekwencji aktywacji białek Rac1, RhoA i Cdc42, z wykorzystaniem algorytmów komputerowych, precyzyjnie śledzących krawędź wiodącą komórki i korelujących poziom aktywacji poszczególnych biosensorów z lokalnymi zmianami szybkości tworzenia lamellipodium. Przeprowadzona analiza zwana obliczeniowym multipleksowaniem polegała na komputerowym przyporządkowaniu zmian aktywności poszczególnych GTPaz zachodzących w czasie, do poszczególnych obszarów zlokalizowanych w lamellipodium ulegającym wysuwaniu i retrakcji. Pozwoliło to porównać ze sobą aktywności rejestrowane w niezależnych eksperymentach z wykorzystaniem komórek mysich embrionalnych fibroblastów linii Swiss-3T3. Aktywacja RhoA została zlokalizowana przy samej krawędzi wiodącej komórki, na samym początku jej progresji, podczas gdy aktywacja Cdc42 i Rac1 była obserwowana w odległości ok. 2 μm od krawędzi, z wyraźnym opóźnieniem wynoszącym ok. 40 s [80]. Przestrzenna separacja Rac1 i RhoA potwierdza postulowaną wcześniej przeciwstawną regulację tych białek. Natychmiastowa aktywacja na skraju rozwijanego lamellipodium może sugerować, że aktywacja ścieżki RhoA/ROCK/mDia prowadząca do polimeryzacji aktyny jest kluczowym inicjatorem wysuwania wypustki. Opóźniona aktywacja Rac1 i Cdc42 może z kolei wskazywać na większą rolę tych komponentów w stabilizacji lamellipodium i warunkowaniu utrzymania wysuwania tej struktury, co jest konieczne dla nadania kierunkowości ruchu [6].

Eksperyment został powtórzony na szczurzych embrionalnych fibroblastach linii REF52, w bardziej złożonym układzie, z wykorzystaniem specjalnej mikrokomory przepływowej, co pozwoliło na naprzemienną ekspozycję komórek na płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF ang. *platelet-derived growth factor*) i inhibitor ROCK Y-27632, stymulując tworzenie wypustki o odmiennej dynamice. W badaniach wykorzystano biosensory bazujące na zoptymalizowanych, permutowanych kołowo białkach, korzystając z opisanego wcześniej zestawu cpFRET [50,79]. Działają one w oparciu o permutowane kołowo białko mTFP1 w roli donora, charakterystyką spektralną przypominającą CFP, jednak wykazujące trzykrotnie wyższą wydajność fluorescencji niż ECFP i dwukrotnie wyższą niż mCerulean. Wraz z odpowiednim wariantem białka mVenus, pełniącym funkcję akceptora, stanowią doskonałą parę FRET, wykazując przy tym niską wrażliwość na zmiany pH i wysoką fotostabilność [50,81]. Biosensor Cdc42-2G zawiera domenę CRIB białka WASP i kompletne białko Cdc42 na C-końcu. Całość dopełniają zoptymalizowane łączniki, zapewniające możliwie szeroki zakres dynamiczny biosensora. Zmiany aktywności biosensorów skorelowano z dynamiką zmian krawędzi

wiodącej, wyznaczoną automatycznie przy użyciu specjalistycznego oprogramowania [82]. Ten kompleksowy eksperyment potwierdził precyzyjną kontrolę dynamiki krawędzi wiodącej komórki, a także ustalenie specyficznych wzorców aktywności towarzyszących okresom progresji i retrakcji [50].

BIOSENSORY BIAŁEK Rho W BADANIACH *IN VIVO*

Kolejnym krokiem do pełnego poznania funkcji GTPaz z rodziny Rho i ich zaangażowania w kontrolę migracji komórek jest obserwacja ich aktywności w warunkach *in vivo*. Na przestrzeni lat, kilkakrotnie podejmowano próby wykorzystania w tym celu biosensorów różnej generacji. W pierwszych badaniach tego typu wykazano, że syndekan warunkuje kierunkowość migracji komórek grzebienia nerwowego żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) i danio pręgowanego (*Danio rerio*), w sposób zależny od GTPaz z rodziny Rho [83]. Niedługo później wykazano wzrost aktywności Rac1 i RhoA na przedzie komórek migrujących w obrębie zarodka danio pręgowanego [84]. Podobnie, wzrost aktywności Rac1 zaobserwowano w kierunkowo migrujących komórkach zarodka muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) [85]. Spore nadzieje wiąże się również z użyciem biosensorów typu FRET w badaniach aktywności migracyjnej komórek nowotworowych *in vivo*, wierząc, że dokładne poznanie mechanizmów sygnalizacyjnych w tym procesie pozwoli skuteczniej przeciwdziałać procesom tworzenia przerzutów. Bardzo ciekawych informacji dostarczył eksperyment wykorzystujący komórki mysiego raka trzustki PDAC wykazujące ekspresję biosensora Raichu-RhoA, umieszczone w modelu organotypowym naśladującym warunki *in vivo*. Obrazowanie przy użyciu techniki FLIM wykazało nie tylko wzrost aktywności RhoA w porównaniu do obserwacji w hodowli *in vitro*, ale też pozwoliło skorelować wzmoczoną aktywność RhoA z potencjałem inwazyjnym tych komórek, a także wykazać obniżenie tej aktywności po zastosowaniu leku hamującego przerzutowanie, Dasatynibu [86]. Spore nadzieje wiąże się również z wytwarzaniem całych organizmów wykazujących ekspresję biosensorów typu FRET. W ostatnich latach udało się otrzymać szczep myszy, wytwarzający w swoich tkankach biosensor Raichu-Rac1, co pozwoliło na obserwację aktywności tego białka w komórkach różnego typu [87]. Przy całym optymizmie związanym z badaniami szlaków sygnalizacyjnych *in vivo*, należy jednak pamiętać o wielu trudnościach technicznych, które muszą być pokonane w celu uzyskania wiarygodnych i wartościowych wyników, począwszy od zróżnicowanego pochłaniania przez tkanki światła o różnej charakterystyce spektralnej, przez liczne aberracje obrazu, po utrudnione obrazowanie tkanek żywego, w pewnym stopniu ruchliwego organizmu [88]. Mając jednak na uwadze systematyczny postęp w rozwijaniu biosensorów typu FRET, ich większą reaktywność względem mechanizmów regulacyjnych, wykorzystywanie jaśniejszych białek fluorescencyjnych, a także wyraźny wzrost ich zakresu dynamicznego, nawet tak skomplikowane zabiegi, jak obserwacje w warunkach *in vivo*, wydają się możliwe.

BIOSENSORY POZIOMU JONÓW WAPNIA

Poza omówionymi małymi GTPazami z rodziny Rho, również szereg innych komponentów sygnalizacyjnych bierze udział w koordynowaniu migracji komórkowej. Bardzo dobrze udokumentowano rolę jonów wapnia w tym procesie. Wykazano m.in., że naprężenie generowane w tylnej części migrującej komórki może prowadzić do otwierania zlokalizowanych w błonie komórkowej mechanowrażliwych kanałów wapniowych. Napływ jonów wapnia w tym rejonie komórki może warunkować zarówno mechanizmy skurczowe zależne od kinazy lekkich łańcuchów miozyny (MLCK), jak i wpływać na dynamikę kontaktów zogniskowanych. Ma to miejsce przez modulację aktywności fosfatazy kalcyneuryny i aktywację wspólnie z ERK kalpajny, enzymu proteolitycznego zdolnego do cięcia kilku białek kontaktów zogniskowanych, w tym integryn, taliny czy winkuliny [89]. Istnieją również dowody na rolę wapnia w kontroli tworzenia lamellipodium migrujących kierunkowo komórek czy w naprowadzaniu stożka wzrostu neuronów [90]. Tak różnorodny charakter w jakim jony Ca^{2+} funkcjonują w regulacji migracji stwarza potrzebę przyżyciowego monitorowania zmian jego poziomu w komórkach, co od wielu lat jest czynione przy użyciu drobnocząsteczkowych wskaźników. Rozwijanie genetycznie kodowanych biosensorów białkowych jest jednak równie ważne, gdyż oferują one odmienne spektrum możliwości.

Historia biosensorów typu FRET dla wewnątrzkomórkowego wapnia jest jeszcze dłuższa niż w przypadku małych GTPaz i sięga 1997 roku, kiedy to opracowano konstrukt o nazwie Cameleon (Ryc. 3A). Składał się on z pary białek fluorescencyjnych (CFP i YFP lub BFP i GFP), połączonych z kalmoduliną (CaM) i peptydem wiążącym CaM, pochodzącym z kinazy lekkich łańcuchów miozyny (M13). Łączność pomiędzy CaM a M13 zapewnił giętki łącznik peptydowy w postaci glicyloglicyny. Związanie wapnia przez kalmodulinę pociąga za sobą interakcję z domeną M13 i w efekcie dużą zmianę konformacyjną, umożliwiającą transfer energii między białkami fluorescencyjnymi. Substytucja E104Q w kalmodulinie dodatkowo zwiększyła powinowactwo do jonów Ca^{2+} . W efekcie uzyskane warianty biosensora Cameleon pozwalały na wyznaczanie zmian stężenia wapnia w zakresie 10^{-2} – 10^{-8} M i posłużyły np. do obserwacji zmian poziomu tych jonów w cytoplazmie, jądrze komórkowym i retikulum endoplazmatycznym komórek HeLa [51]. Dwie kolejne mutacje w obrębie akceptorowego białka fluorescencyjnego YFP obniżyły wrażliwość biosensora na zmiany pH [91], a z kolei zamiana YFP na permutowane kołowo białko Venus (cpVenus) zwiększyła znacznie stabilność fluorochromu i wpłynęła na sześciokrotny wzrost zakresu dynamicznego, zapewniając większą czułość biosensora, co wykazano zarówno na migrujących *in vitro* komórkach HeLa, jak i podczas obserwacji skrawków mózgu transgenicznego myszy [43]. Późniejsze modyfikacje długości łącznika między CaM i M13 pozwoliły na dalsze zmiany zakresu dynamicznego biosensora Ca^{2+} pod nową nazwą Cameleon-Nano. Tak czuły biosensor pozwolił m.in. na prowadzenie obserwacji aktywności neuronalnej i mię-

śniowej w rozwijającym się zarodku danio pęgowanego [92,93]. Potrzeba rejestracji zmian poziomu wapnia w komórkach z dużą produkcją CaM, stworzyła konieczność uzyskania biosensora opartego o inne białko. W tym celu całkowicie przebudowano strukturę biosensora Cameleon, pomiędzy cpCerulean a cpCitrine wprowadzono zmodyfikowaną Troponinę C (TnC), białko pochodzenia mięśniowego wiążące jony Ca^{2+} . Taki biosensor nazwany TN-XL wykazywał bardzo szeroki zakres dynamiczny i krótki czas reakcji [52]. Zarówno kalmodulina, jak i tropoina C posiadają po dwie globularne domeny, z dwoma miejscami wiązania jonów Ca^{2+} na każdej z nich. Sprawia to, że utworzone na ich bazie biosensory nie wykazują liniowej odpowiedzi na zmiany stężenia jonów wapnia, a dodatkowo przy wysokiej, długotrwałej ekspresji mogą znacząco zaburzać ich równowagę w komórce. Niedawno utworzona grupa biosensorów Ca^{2+} Twitch jest reprezentowana przez kilka konstruktów posiadających zredukowaną liczbę wiązań i wykazujących różną czułość i kinetykę reakcji. W skrajnym przypadku jest to jedno miejsce, zapewnione przez obecność C-końcowej domeny TnC z ryby *Opsanus tau*. Zależnie od wariantu, do domeny czulej na zmiany wapnia dołączono różne wersje permutowanych kołowo białek fluorescencyjnych (np. mCerulean3 i cpVenusCD w przypadku Twitch-2B), co zapewniło bardzo dużą jasność i zakres dynamiczny tych biosensorów. Wykazano, że nadają się one do obserwacji *in vivo* zmian zachodzących w limfocytach T, migrujących w obrębie węzłów chłonnych myszy [53]. Powyższe informacje pokazują, że także w przypadku biosensorów typu FRET dedykowanych pomiarom jonów wapnia, stopniowo eliminowane są niedoskonałości i konstrukty takie posiadają coraz więcej zalet w porównaniu z drobnocząsteczkowymi wskaźnikami, szczególnie oferując wiele w kontekście obserwacji prowadzonych *in vivo*.

BIOSENSORY LOKALIZACJI LIPIDÓW SYGNAŁOWYCH

Lipidy pełnią istotną rolę w procesach sygnalizacyjnych kontrolujących adhezję do podłoża i migrację komórek. Ich odpowiednie modyfikacje zachodzące w odpowiedzi na sygnał docierający do komórki mogą stanowić bodziec warunkujący spolaryzowaną aktywację specyficznych ścieżek sygnalizacyjnych. Najczęściej ma to miejsce poprzez utworzenie specyficznego miejsca dokującego odpowiednie kinazy lub fosfatazy, posiadające domeny wchodzące w interakcję z poszczególnymi lipidami błonowymi. Proces ten jest bardzo dynamiczny, przez co jego obserwacja przysparza wielu trudności. Także w tym przypadku, z pomocą przychodzą biosensory oparte o zjawisko FRET [55].

Kluczowym dla polaryzacji migrującej komórki komponentem jest 3,4,5-trisfosforan inozytoli (PIP_3), fosfolipid generowany w komórce w wyniku lokalnego działania kinazy PI3K. Takie białka jak Akt i Grp1 wchodzi z tym lipidem w interakcję dzięki obecności domeny PH (ang. *pleckstrin homology domain*). Nie dziwi więc, że ten element sprzęgnięty z GFP został wykorzystany w celu lokalizacji obszarów gromadzenia PIP_3 . To proste podejście wydawałoby się wystarczające, jednakże przy braku

pomiaru ratiometrycznego, ta metoda okazała się bardzo wrażliwa na lokalne zmiany grubości lamellipodium w wyniku fałdowania błony komórkowej [94]. Doskonalszą metodę opracowano poprzez wytworzenie biosensora typu FRET zawierającego domenę LBD (ang. *lipid-binding domain*) pochodzącą z białka Grp1, oskrzydloną białkami CFP i YFP (Ryc. 3B). Dodatkowo wiązanie do błony komórkowej zostało zapewnione przez wprowadzenie motywu CAAX-box pochodzącego z K-Ras. Wykorzystanie sztywnych połączeń α -helikalnych sąsiadujących z glicyloglicynowym motywem wprowadziło do konstruktów strukturę przypominającą zawias. W efekcie, biosensor w kontakcie z PIP_3 zmieniał konformację zbliżając do siebie białka fluorescencyjne i powodując wzrost wydajności FRET. Taka forma biosensora pod nazwą flip-pm pozwala na określenie zmian poziomu PIP_3 w błonie komórkowej. Modyfikacja motywu CAAX pozwoliła na lokalizację PIP_3 w błonach wewnątrzkomórkowych, co pozwoliło na uzyskanie alternatywnej formy biosensora pod nazwą flip-em. Zastosowanie obu konstruktów pozwoliło wykazać wzrost poziomu PIP_3 w odpowiedzi na stymulację komórek czynnikiem wzrostowym PDGF [54].

Biosensor InPAkt z kolei zawiera domenę PH pochodzącą z kinazy Akt, która przy braku PIP_3 jest związana z pseudoligandem. Obecny w błonie PIP_3 posiada do niej większe powinowactwo, przez co efektywnie ją wypiera, prowadząc do związania biosensora i w efekcie do zmiany konformacyjnej, indukującej wewnątrzcząsteczkowy FRET. Przy jego użyciu wykazano, że pewien podstawowy poziom PIP_3 jest stale utrzymywany w błonie komórkowej dzięki równowadze między aktywnością PI3K i PTEN, podczas gdy w błonie jądra komórkowego nie stwierdzono obecności tego lipidu [55].

Stosunkowo niewielka modyfikacja biosensora flip-pm, polegająca na podmianie domeny PH białka Grp1 na pochodzącą z białka TAPP1, pozwoliła na uwrażliwienie tego biosensora względem innej pochodnej lipidowej – 3,4-bisfosforanu fosfoinozytoli ($\text{PI}(3,4)\text{P}_2$) [56].

Jak wspomniano, biosensory typu FRET umożliwiające pomiary ratiometryczne eliminują liczne niedoskonałości klasycznej detekcji PIP_3 przez domenę PH sprzęgniętą z białkiem fluorescencyjnym. W tym przypadku uzyskiwany sygnał nie jest fałszowany przez ruch komórki, fotobłaknięcie czy lokalne zmiany grubości. Możliwość kierowania konstruktów do poszczególnych przedziałów komórkowych dostarcza ponadto informacji na temat kinetyki i lokalizacji wytwarzania tych wtórnych przekazników [55].

BIOSENSORY AKTYWNOŚCI KINAZ BIAŁKOWYCH

Biosensory typu FRET zostały również zaprojektowane do obrazowania aktywacji kinaz sygnalizacyjnych koordynujących proces migracji. Takie kinazy jak PKA, Akt czy PKC pośredniczą między receptorami czynników wzrostowych lub chemokin a aktywacją poszczególnych GTPaz sterujących dynamiką cytoszkieletu, fosforylując specyficzne dla nich czynniki GEF i GAP. Elementem, który może warunkować spolaryzowaną aktywację ki-

naz sygnalizacyjnych jest asymetryczny rozkład lipidów sygnałowych, co omówiono powyżej. Takie kinazy jak FAK, czy Src są z kolei odpowiedzialne za koordynację tworzenia i degradacji miejsc kontaktu komórki z podłożem.

KINAZA BIAŁKOWA A

Kinaza białkowa A zależna od cAMP (PKA, ang. *protein kinase A*) odgrywa istotną rolę zarówno w migracji, jak i adhezji komórek do podłoża. Na przestrzeni lat powstała cała grupa jednołańcuchowych biosensorów typu FRET dla oceny aktywności tego enzymu. Konstrukty AKAR składają się z pary białek fluorescencyjnych ECFP i Citrine, a także sekwencji ulegającej specyficznej fosforylacji przy udziale PKA i specyficznej domeny, która wykazuje powinowactwo do takiej ufosforylowanej sekwencji i wiążąc się do niej powoduje zmianę konformacyjną, co rzutuje na wydajność FRET. Poszczególne domeny połączone są łącznikami o optymalnej długości i giętkości, zapewniającymi wydajną interakcję między nimi. Konstrukcja biosensora pierwszej generacji AKAR1 została uzupełniona o domenę z białka 14-3-3, która wchodziła z ufosforylowaną sekwencją w tak mocną interakcję, że skutecznie uniemożliwiała jej defosforylację. W efekcie uniemożliwiała ciągłą obserwację poziomu aktywności PKA, gdyż reakcja fosforylacji nie była odwracalna. W celu udoskonalenia biosensora, w konstrukcie AKAR2 kłopotliwą domenę zamieniono na FHA1 (ang. *forkhead-associated 1*), która słabiej wiązała ufosforylowaną grupę [57]. W kolejnej generacji AKAR3 podmieniono białka fluorescencyjne na CyPet i YPet, a także wytworzono formy kierowane do różnych przedziałów komórkowych [58]. Badania z wykorzystaniem różnych generacji i izoform pozwoliły m.in. wykazać wzmożoną aktywację PKA w pobliżu krawędzi wiodącej w trakcie migracji i inwazji komórek raka jajnika [71].

KINAZA BIAŁKOWA C - PKC

Rodzina serynowo-treoninowych kinaz białkowych C (PKC ang. *protein kinase C*) składa się z jedenastu izoform zaliczanych do trzech klas. Przedstawiciele poszczególnych klas różnią się strukturą domen, co warunkuje mechanizm ich aktywacji. Liczne badania wykazały wpływ aktywacji PKC na aktywność migracyjną, niekiedy przeciwną w komórkach różnego typu [55]. Poznanie dokładnej roli w regulacji migracji komórek może być ułatwione dzięki opracowaniu nowych metod obrazowania aktywności PKC. W procesie tworzenia biosensorów typu FRET dla PKC wykorzystano specyficzność ich działania. Jeden z tych biosensorów o nazwie CKAR, składa się z sekwencji stanowiącej specyficzny substrat dla tej kinazy i domeny FHA2, wiążącej się do ufosforylowanej treoniny. Oskrzydlające tę parę białka fluorescencyjne zbliżają się do siebie w wyniku zmiany konformacyjnej powodowanej fosforylacją biosensora. Odwracalność tej zmiany pozwala monitorować zmiany aktywności PKC w czasie [59]. Także w tym przypadku wykorzystano możliwość kierowania biosensora do specyficznych przedziałów komórkowych, dzięki czemu wykazano różnice w kinetyce aktywności PKC stymulowanej przy użyciu urydyno-5'-

-trifosforanu (UTP) pomiędzy frakcją obecną w aparacie Golgiego i rezydującą w cytozolu, jądrze komórkowym i mitochondriach [95]. Alternatywny biosensor dla kinaz PKC - KCPI1 (Ryc. 3C) opiera się na skróconej plekstrynie, która posiada w swej budowie dwie seryny i treoninę, specyficznym fosforylowane przez tę kinazę. W swojej budowie nie zawiera on domeny wiążącej ufosforylowane grupy, jak poprzedni konstrukt, gdyż zmiana konformacyjna między domenami plekstryny, zachodząca na skutek fosforylacji, jest wystarczająca dla zapewnienia istotnej zmiany wydajności FRET. W konstrukcie zastosowano również nietypową parę białek fluorescencyjnych, gdyż funkcję donora pełni białko GFP², które dobrze współpracuje z akceptorem EYFP [60]. Wspólne zastosowanie biosensorów dla białkowych kinaz sygnalizacyjnych i metod obrazowania poziomu jonów Ca²⁺ pozwoliło zaobserwować korelację między zmianami stężenia tych jonów a aktywnością PKA i PKC, co stanowi dobry przykład łączenia najnowszych metod obrazowania mikroskopowego w celu rozwikłania złożonych zależności sygnalizacyjnych [96].

KINAZA SERYNOWO-TREONINOWA Akt

Kinaza serynowo-treoninowa Akt (alt. PKB, ang. *protein kinase B*) odgrywa główną rolę w ścieżce sygnalizacyjnej PI3K. Wiąże się ona do tworzonego w błonie PIP₃ przy udziale dedykowanej do tego domeny PH. O ile aktywacja tego białka została dość dobrze scharakteryzowana, to wiedza na temat precyzyjnej lokalizacji tej aktywacji w komórce była do niedawna uboga. Zmieniło się to dzięki opracowaniu odpowiednich narzędzi wykorzystujących zjawisko FRET. Biosensor dedykowany monitorowaniu aktywności kinazy Akt - Akind, posiada w swojej strukturze domenę katalityczną tej kinazy i domenę PH, przedzielone białkiem YFP, a także białko CFP zlokalizowane na C-końcu konstruktów. W stanie nieaktywnym przyjmuje on zamkniętą konformację, gdzie oba białka fluorescencyjne są odizolowane. W wyniku aktywacji domena PH ulega wyeksponowaniu i po translokacji do błony komórkowej wiąże się do odpowiednich lipidów błonowych. Procesowi temu towarzyszy również zmiana konformacyjna zbliżająca oba białka fluorescencyjne, prowadząca do wzrostu wydajności FRET [56]. Jego wspólne zastosowanie z biosensorem dla 3,4-bisfosforanu fosfoinozytolu (PI(3,4)P₂) omówionym powyżej, pozwoliło zaobserwować aktywację kinazy Akt, skorelowaną ze wzrostem obecności fosfolipidu w obrębie lamellipodium, w odpowiedzi na stymulację małych fibroblastów linii Cos7 czynnikiem wzrostowym EGF. W połączeniu z zastosowaniem biosensora dla PIP₃ i Raichu-RalA, wykazano skoordynowaną aktywację komponentów lipidowych, kinaz sygnalizacyjnych i małych GTPaz w obrębie krawędzi wiodącej komórki, na skutek stymulacji czynnikiem wzrostowym [56,97].

Alternatywę dla Akind może stanowić opracowany niedawno biosensor Akt o bardzo dużej specyficzności zwany Eevee-iAkt, który może być kierowany do wybranych przedziałów wewnątrzkomórkowych. Biosensor zawiera kolejno od N-końca białko YPet, drożdżową domenę FHA1, zoptymalizowaną sekwencję substratową dla

Akt, ECFP, połączone odpowiednimi łącznikami. Seria eksperymentów polegających na określeniu jego lokalizacji w błonie komórkowej, w obrębie tratw lipidowych i poza nimi, a także w cytoplazmie, mitochondriach oraz jądrze komórkowym, pozwoliła na wyznaczenie zróżnicowanego wzorca i kinetyki aktywacji w komórkach HeLa i Cos7 po stymulacji czynnikiem EGF [61].

Podejście opierające się na aktywności kinazy Akt wykorzystano także w tworzeniu takich biosensorów, jak Aktus, AktAr i BKAR. Wszystkie zawierają syntetyczny substrat dla Akt i ulegają zmianom konformacyjnym na skutek fosforylacji. Różnią się one czułością, która w przypadku Aktus jest niska, co wymaga nadprodukcji Akt, podczas gdy BKAR i AktAR są wystarczająco czułe dla obserwacji endogennej aktywności tej kinazy. Wykorzystanie BKAR lokalizowanego w poszczególnych przedziałach komórkowych pozwoliło wykazać zróżnicowaną aktywność mechanizmów hamujących i przeciwdziałających Akt w obrębie błony komórkowej, cytoplazmy oraz jądra komórkowego. Wysoki zakres dynamiczny AktAR pozwolił z kolei na obserwacje lokalizacji Akt w błonie komórkowej, z rozróżnieniem na poszczególne jej mikrodomeny [98-100]. Wykorzystanie obu powyższych strategii pozwala badać zarówno aktywność, jak i translokację kinazy Akt do błony. Obecność domeny katalitycznej w pierwszym typie biosensorów niesie jednak ryzyko zaburzenia fizjologicznego rozkładu aktywności tego białka i wyciągnięcia z eksperymentów błędnych wniosków [55].

KINAZA KONTAKTÓW ZOGNISKOWANYCH FAK

Kinaza kontaktów zogniskowanych FAK (ang. *focal adhesion kinase*) kontroluje adhezję komórek do podłoża oraz ich aktywność migracyjną w wyniku pośredniego oddziaływania na interakcję integryn z białkami macierzy międzykomórkowej [101]. Obrazowanie dynamiki aktywacji tej kinazy możliwe jest przy użyciu biosensorów typu FRET. W projektowaniu jednego z nich wykorzystano zmiany konformacyjne, jakim ulega domena regulatorkowa FERM kinazy FAK w trakcie tworzenia miejsc adhezyjnych. Biosensor utworzono oskrzydłając białkami fluorescencyjnymi (ECFP i EYFP) domenę FERM, podczas gdy w dalszej części znalazły się pozostałe domeny – KD o aktywności kinazowej i regulatorowa FAT. Zmiany poziomu aktywności rejestrowano metodą fotoaktywacji akceptora. Obserwowano je zwłaszcza w obrębie kontaktów zogniskowanych i w mniejszym stopniu w cytoplazmie, zarówno na etapie wstępnego rozplaszczania, jak i późniejszym rozrastaniu i bocznym przesuwaniu kontaktów zogniskowanych. Dalsze badania dostarczyły informacji na temat sposobu regulacji aktywności FAK i odpowiedzi na siły trakcyjne [62]. Odmienną strategię zastosowano w przypadku alternatywnego biosensora FAK, w którym transfer energii następuje w stanie zahamowania, natomiast aktywacja kinazy powoduje oddalenie białek fluorescencyjnych zlokalizowanych wewnątrz konstruktu i obniżenie wydajności FRET (Ryc. 3D). Wykorzystanie tego konstruktów potwierdziło zachodzenie zmian konformacyjnych warunkowanych obecnością domeny FERM

oraz wykazało aktywację w odpowiedzi na zamiany poziomu PIP₂ [63].

KINAZA TYROZYNOWA Src

Kinaza tyrozynowa Src jest ściśle powiązana funkcjonalnie z omówioną powyżej kinazą FAK. Biosensor typu FRET dedykowany pomiarom jej aktywności zawiera domenę SH2 (ang. *src homology domain*) białka Src i syntetyczny substrat, które to elementy przedzielono elastycznym łącznikiem. Konstrukcję dopełnia tradycyjny zestaw białek fluorescencyjnych ECFP i EYFP, zlokalizowanych odpowiednio na N i C-końcu. Aktywacja pociągająca za sobą wiązanie domeny SH2 do substratu, skutkuje zmianą konformacyjną i zbliżeniem fluorochromów, co powoduje wzrost wydajności FRET. Biosensor posłużył do charakterystyki aktywacji tej kinazy w sposób zależny od cytoszkieletu aktynowego i mikrotubul w trakcie stymulacji szczypcami optycznymi ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC. Obszernie scharakteryzowano również aktywację tej kinazy w trakcie adhezji i migracji wielu typów komórek [64,71].

BIOSENSORY NAPRĘŻENIOWE

Zastosowane w ostatnich latach nowe podejście do tworzenia biosensorów FRET umożliwia badanie sił fizycznych oddziałujących na białka. Tego typu konstrukty nadają się doskonale do badania naprężeń w białkach strukturalnych i pełniących funkcję mechanosensorów.

α -Aktynina jest homodimerem przeciwrównolegle ułożonych białek, które wiążą się do równolegle ułożonych włókien aktynowych, uczestnicząc pośrednio w przytwierdzeniu wiązek włókien aktynowych do błony komórkowej. Konstrukt sstFRET zawierający białka Cerulean i Venus połączone łącznikiem spektrynowym, w stanie zrelaksowanym wykazuje wysoką wydajność FRET. Wbudowany w strukturę α -aktyniny jest wystawiony na działanie sił mechanicznych, co skutkuje wzrostem naprężenia i oddaleniem od siebie białek fluorescencyjnych. Przy użyciu biosensora tego typu wykazano mniejszy spadek FRET (oznaczający mniejsze naprężenie) w krawędzi wiodącej migrujących komórek. Co ciekawe, obserwowane zmiany naprężeń często nie były dobrze skorelowane ze zmianami kształtu komórek [65].

Podobnie winkulina, która łączy zaktywowane integryny w kontaktach zogniskowanych z filamentami aktynowymi, jest poddawana działaniu sił mechanicznych. Do badania tego białka posłużyła np. inna generacja biosensorów typu FRET – TSMoD (Ryc. 3E), które wykorzystują podobny mechanizm działania jak sstFRET, aczkolwiek w swojej budowie zawierają parę białek mTFP-Venus, połączoną elastycznym łącznikiem zbudowanym z 40 reszt aminokwasowych, pochodzącym z białka budującego pajęczkę sieci. Taki moduł został wbudowany pomiędzy domenę winkuliny wiążącą talinę, a domenę wykazującą powinowactwo dla aktyny. Kalibracja pozwoliła wyznaczyć czułość biosensora na siły od 1 do 6 pN. Jego zastosowanie potwierdziło występowanie naprężeń w winkulinie komórek zaadherowanych do podłoża pokry-

tego fibronektyną, co objawiało się spadkiem wydajności FRET. Korzystając z techniki FLIM, wyznaczono średnie napięcie w obrębie stabilnych kontaktów zogniskowanych na ok. 2,5 pN. Wykazano również wysokie siły przyłożone do winkuliny w obrębie małych miejsc kontaktowych z przodu migrującej komórki, zwłaszcza na etapie ich tworzenia i rozrastania, podczas gdy to samo białko w obrębie dużych kontaktów zogniskowanych i w momencie ich degradacji czy przesuwania, było bardziej zrelaksowane. Takie podejście metodyczne pozwala z dużą dokładnością wyznaczać siły przyłożone do białek o potencjalnej funkcji mechanosensorów i wykazuje duży potencjał w monitorowaniu takich sił w czasie rzeczywistym, z wysoką rozdzielczością przestrzenną [66,71].

BIOSENSORY AKTYWNOŚCI ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH

Migracja komórek w warunkach *in vivo* jest zwykle uzależniona również od obecności enzymów o aktywności proteolitycznej. Enzymy te, odpowiadające za trawienie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, są niezbędne dla wielu komórek w procesie migracji przez strukturę tkanki. Dobrze poznana grupa enzymów o takim charakterze są metaloproteinazy macierzy międzykomórkowej (MMP) zależne od jonów cynku. W skład rodziny MMP wchodzi zarówno enzymy wydzielane przez komórkę, jak i zakotwiczone w błonie komórkowej. Kluczową proteazą w tym procesie wydaje się być zakotwiczona w błonie MT1-MMP (ang. *membrane type 1 matrix metalloproteinase*), często wiązana z potencjałem metastatycznym komórek nowotworowych [44,71].

Badanie lokalnej aktywności tego enzymu jest możliwe przy użyciu litycznego biosensora typu FRET, składającego się z peptydu o sekwencji podatnej na proteolizę prowadzoną przez MT1-MMP, oskrzydłonego parą białek fluorescencyjnych ECFP-YPet (Ryc. 3F). Potrzeba zbadania aktywności enzymu posiadającego domenę katalityczną po zewnętrznej stronie błony komórkowej wymusiła wprowadzenie konstruktów do wektora kierującego białko na drogę wydzielania oraz zawarcia na C-końcu domeny transbłonowej receptora PDGF, w celu zakotwiczenia biosensora w błonie. Jego zastosowanie pozwoliło wykazać selektywnie wzmoczoną aktywność MT1-MMP na krawędzi wiodącej komórek linii HeLa stymulowanych EGF. Aktywność MT1-MMP była wysocze skorelowana z obecnością EGFR, a proces akumulacji był zależny od sieci cytoszkieletarnej [67]. Zmodyfikowany biosensor o wysokiej czułości, zawierający Orange2 i Cherry, również wykorzystano do zobrazowania aktywności tej proteazy na krawędzi komórek linii HT1080 przy użyciu techniki FLIM [102]. Wykorzystanie białek fluorescencyjnych o widmach przesuniętych w kierunku fal dłuższych pozwoliło także na równoległą obserwację biosensora dla kinazy Src, opartego o białka ECFP i Citrine. Jednoczesna obserwacja aktywności obu komponentów wykazała zbieżny rozkład przestrzenny aktywacji na krawędzi wiodącej, jednak z wyraźnym opóźnieniem w przypadku MT-MMP1. Dalsze badania oparte na hamowaniu poszczególnych elementów sygnalizacyjnych wykazały udział Src w późniejszej aktywacji metalo-

proteiny, w odpowiedzi na stymulację komórek HeLa czynnikiem EGF [68]. Bardzo wyraźny wzrost czułości pierwotnej wersji biosensora spowodowała z kolei podmiana trawionej sekwencji na sekwencję AHLR, oskrzydloną giętkimi łącznikami. Ten układ pozwolił wykazać wysoką korelację między aktywnością MT1-MMP, a potencjałem inwazyjnym kilku linii raka piersi [103]. Z tego typu konstruktami wiąże się spore nadzieje w procesie wysokoprzepustowego, przesiewowego badania komórek nowotworowych pod kątem ich złośliwości [44,104].

PODSUMOWANIE

Migracja komórek zwierzęcych następuje w oparciu o cykl ściśle koordynowanych w czasie zdarzeń, będących pod kontrolą złożonych mechanizmów sygnalizacyjnych. Ze względu na jej kluczową rolę w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych, od wielu dekad znajduje się ona w centrum zainteresowania biologów komórkowych. Ogromny postęp w doskonaleniu obserwacji migracji i zjawisk jej towarzyszących, który dokonał się szczególnie w ciągu ostatnich 15 lat, daje nadzieję na szczegółowe i dogłębne poznanie wszystkich tajników tej aktywności komórek. Bardzo dużą rolę w tych badaniach odgrywa opracowanie i systematyczne doskonalenie jednolitańcuchowych biosensorów typu FRET. Połączenie metod fizyki, biologii molekularnej i najnowszych metod mikroskopowych dostarczyło potężnego narzędzia do monitorowania w czasie rzeczywistym subtelnych zmian aktywności wielu elementów o bardzo zróżnicowanym charakterze, od białkowych przełączników molekularnych, przez lipidowe składniki błon biologicznych, białka o różnorodnej aktywności katalitycznej, po zmiany poziomu wybranych jonów. Konieczność wykorzystania skrajnie odmiennych podejść metodycznych przy tworzeniu poszczególnych biosensorów sprawia, że omawiane zagadnienie jest bardzo interesujące. Choć przedstawiony postęp w projektowaniu nowych generacji sensorów dla poszczególnych białek pozwolił na ominiecie wielu problemów metodycznych, sensory starszych generacji wciąż znajdują zastosowanie lub stanowią punkt wyjścia do opracowywania nowych rozwiązań. Prowadzone coraz szerzej badania uświadamiają, że mnogość i złożoność oddziaływań pomiędzy poszczególnymi składnikami jest dużo większa niż się spodziewano. Schemat funkcjonowania poszczególnych GTPaz w rodziny Rho, jeszcze przed dwoma dekadami wydawał się relatywnie jasny i logiczny. W dniu dzisiejszym, dzięki badaniom przeprowadzonym z wykorzystaniem biosensorów typu FRET wiadomo, że poszczególne białka mogą być aktywowane w różnych obszarach komórki, wykazując zaangażowanie w pozornie skrajnie różne etapy migracji. Dodatkowo, obserwowany schemat ich aktywacji może być diametralnie różny w odmiennych typach komórek i w odpowiedzi na zróżnicowane bodźce. Także rosnąca liczba znanych interakcji z kinazami sygnalizacyjnymi nie ułatwia interpretacji obserwowanych zjawisk. Szczęśliwie, rozwijane równoległe metody komputerowej analizy obrazów mikroskopowych, pozwalają na korelowanie uzyskiwanych wyników i wyciąganie z nich konstruktywnych wniosków. Systematyczny postęp na każdym omawianym polu, pozwala również na zastosowanie

biosensorów typu FRET w badaniach *in vivo*, co jest kluczowe dla zrozumienia, jak te wszystkie skomplikowane interakcje funkcjonują w jeszcze bardziej złożonym środowisku naturalnym komórek. Zwłaszcza postęp na tym ostatnim polu daje nadzieję, że rosnący zasób wiedzy dotyczącej migracji komórkowej, przyniesie w przyszłości korzyści w postaci opracowania nowych metod walki z tworzeniem przerzutów przez nowotwory lub innymi schorzeniami, w których istotną rolę odgrywają ruchy komórkowe.

PIŚMIENNICTWO

- Devreotes P, Horwitz AR (2015) Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a005959
- Ridley AJ (2015) Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 36: 103-112
- Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 690-701
- Schaefer A, Reinhard NR, Hordijk PL (2014) Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases* 5: 1-11
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K (2010) Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* 67: 545-554
- Spiering D, Hodgson L (2011) Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhes Migr* 5: 170-180
- Yilmaz M, Christofori G (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28: 15-33
- Zadran S, Standley S, Wong K, Otiniano E, Amighi A, Baudry M (2012) Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: Visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl Microbiol Biotechnol* 96: 895-902
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 437: 55-75
- Stryer L, Haugland RP (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci* 58: 719-726
- Haas E, Wilchek M, Katchalski-Katzir E, Steinberg IZ (1975) Distribution of end-to-end distances of oligopeptides in solution as estimated by energy transfer. *Proc Natl Acad Sci* 72: 1807-1811
- Förster T, Theodor (1949) Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischemolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Zeitschrift für Naturforsch A* 4: 321-327
- Dale RE, Eisinger J (1974) Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor. *Biopolymers* 13: 1573-1605
- Dale RE, Eisinger J, Blumberg WE (1979) The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys J* 26: 161-193
- Latt SA, Cheung HT, Blout ER (1965) Energy transfer. A system with relatively fixed donor-acceptor separation. *J Am Chem Soc* 87: 995-1003
- Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy principles of fluorescence spectroscopy. 362 p
- Tsienlab (2017) Spectra of various fluorescent proteins. Available: <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Documents.htm>. Accessed 25 January 2017
- Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GPC (2012) Advanced Fluorescence Microscopy Techniques - FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 17: 4047-4132
- Venetta BD (1959) Microscope phase fluorometer for determining the fluorescence lifetimes of fluorochromes. *Rev Sci Instrum* 30: 450-457
- Wang XF, Uchida T, Minami S (1989) A Fluorescence lifetime distribution measurement system based on phase-resolved detection using an image dissector tube. *Appl Spectrosc* 43: 840-845
- Oida T, Sako Y, Kusumi A (1993) Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys J* 64: 676-685
- Chen Y, Mills JD, Periasamy A (2003) Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation* 71: 528-541
- Albrecht C (2008) Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition. *Anal Bioanal Chem* 390: 1223-1224
- Bugiel I, König K, Wabnitz H (1989) Investigations of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution. *Lasers Life Sci* 3: 47-53
- Böhmer M, Pampaloni F, Wahl M, Rahn H-J, Erdmann R, Enderlein J (2001) Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection. *Rev Sci Instrum* 72: 4145-4152
- Becker W, Bergmann A, Weiss G (2002) Lifetime imaging with the Zeiss LSM-510. In Periasamy A, So PTC, editors. International Society for Optics and Photonics 30-35
- Salthammer T (1992) Numerical simulation of pile-up distorted time-correlated single photon counting (TCSPC) data. *J Fluoresc* 2: 23-27
- Klos-Witkowska A (2015) Biosensors. *Pomiary Autom Robot*: 37-40
- Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, Hahn KM (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440: 1069-1072
- 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
- Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB (2008) GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1778: 1091-1099
- Nishioka T, Aoki K, Hikake K, Yoshizaki H, Kiyokawa E, Matsuda M (2008) Rapid turnover rate of phosphoinositides at the front of migrating MDCK Cells. *Mol Biol Cell* 19: 4213-4223
- Imamura H, Huynh Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci* 106: 15651-15656
- Lindenburg LH, Vinkenburg JL, Oortwijn J, Aper SJA, Merckx M (2013) MagFRET: The First Genetically Encoded Fluorescent Mg²⁺ Sensor. *PLoS One* 8: e82009
- Sakai R, Repunte-Canonigo V, Raj CD, Knöpfel T (2001) Design and characterization of a DNA-encoded, voltage-sensitive fluorescent protein. *Eur J Neurosci* 13: 2314-2318
- Bamford RA, Zhao Z, Hotchin NA, Styles IB, Nash GB, Tucker JH, Bicknell R (2014) Electroporation and microinjection successfully deliver single-stranded and duplex DNA into live cells as detected by FRET Measurements. *PLoS One* 9: e95097
- Mitra RD, Silva CM, Youvan DC (1996) Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* 173: 13-17
- Merckx M, Golynskiy M V., Lindenburg LH, Vinkenburg JL (2013) Rational design of FRET sensor proteins based on mutually exclusive domain interactions. *Biochem Soc Trans* 41: 1201-1205
- Ivanova E, Figueroa R, Gatsinzi T, Hallberg E, Iverfeldt K (2016) Anchoring of FRET Sensors—a requirement for spatiotemporal resolution. *Sensors* 16: 703
- Markwardt ML, Kremers G-J, Kraft CA, Ray K, Cranfill PJC, Wilson KA, Day RN, Wachter RM, Davidson MW, Rizzo MA (2011) An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible Photoswitching. *PLoS One* 6: e17896
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-909
- Zapata-Hommer O, Griesbeck O (2003) Efficiently folding and circularly permuted variants of the sapphire mutant of GFP. *BMC Biotechnol* 3: 5
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10554-10559

44. Hochreiter B, Garcia AP, Schmid JA (2015) Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Switzerland)* 15: 26281-26314
45. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M (2001) Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068
46. Itoh RE, 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-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 22: 6582-6591
47. Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, Nagashima K, Matsuda M (2003) Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol* 162: 223-232
48. Zawistowski JS, Sabouri-Ghomi M, Danuser G, Hahn KM, Hodgson L (2013) A RhoC biosensor reveals differences in the activation kinetics of RhoA and RhoC in migrating cells. *PLoS One* 8: e79877
49. Moshfegh Y, Bravo-Cordero JJ, Miskolci V, Condeelis J, Hodgson L (2014) A Trio-Rac1-Pak1 signalling axis drives invadopodia disassembly. *Nat Cell Biol* 16: 574-586
50. Martin K, Reimann A, Fritz RD, Ryu H, Jeon NL, Pertz O (2016) Spatio-temporal co-ordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Sci Rep* 6: 21901.
51. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882-887
52. Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A, Griesbeck O (2006) A FRET-Based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J* 90: 1790-1796
53. Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomäus I, Mues M, Russo L, Dana H, Kovalchuk Y, Liang Y, Kalamakis G, Laukat Y, Becker S, Witte G, Geiger A, Allen T, Rome LC, Chen TW, Kim DS, Garaschuk O, Griesinger C, Griesbeck O (2014) Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Methods* 11: 175-182
54. Sato M, Ueda Y, Takagi T, Umezawa Y (2003) Production of PtdInsP3 at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 5: 1016-1022
55. Antal CE, Newton AC (2013) Spatiotemporal dynamics of phosphorylation in lipid second messenger signaling. *Mol Cell Proteomics* 12: 3498-3508
56. Yoshizaki H, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M (2006) Regulation of RalA GTPase by phosphatidylinositol 3-kinase as visualized by FRET probes. *Biochem Soc Trans* 34: 851-854
57. Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, Olefsky JM, Tsien RY (2005) Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* 437: 569-573
58. Allen MD, Zhang J (2006) Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 716-721
59. Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC (2003) A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol* 161: 899-909
60. Schleifenbaum A, Stier G, Gasch A, Sattler M, Schultz C (2004) Genetically Encoded FRET Probe for PKC Activity Based on Pleckstrin. *J Am Chem Soc* 126: 11786-11787
61. Miura H, Matsuda M, Aoki K (2014) Development of a FRET biosensor with high specificity for Akt. *Cell Struct Funct* 39: 9-20
62. Papusheva E, Mello de Queiroz F, Dalous J, Han Y, Esposito A, et al. (2009) Dynamic conformational changes in the FERM domain of FAK are involved in focal-adhesion behavior during cell spreading and motility. *J Cell Sci* 122: 656-666
63. Cai X, Lietha D, Ceccarelli DF, Karginov A V, Rajfur Z, Jacobson K, Hahn KM, Eck MJ, Schaller MD (2008) Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol Cell Biol* 28: 201-214
64. Wang Y, Botvinick EL, Zhao Y, Berns MW, Usami S, Tsien RY, Chien S (2005) Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434: 1040-1045
65. Meng F, Sachs F (2011) Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliance-matched FRET sensor. *J Cell Sci* 124: 261-269
66. Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, Zhou R, Parsons M, Yang MT, McLean MA, Sligar SG, Chen CS, Ha T, Schwartz MA (2010) Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 466: 263-266
67. Ouyang M, Lu S, Li X-Y, Xu J, Seong J, et al. (2008) Visualization of polarized membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in live cells by fluorescence resonance energy transfer imaging. *J Biol Chem* 283: 17740-17748
68. Ouyang M, Huang H, Shaner NC, Remacle AG, Shiryaev SA, Strongin AY, Tsien RY, Wang Y (2010) Simultaneous visualization of protumorigenic Src and MT1-MMP activities with fluorescence resonance energy transfer. *Cancer Res* 70: 2204-2212
69. Pertz O, Hahn KM (2004) Designing biosensors for Rho family proteins-deciphering the dynamics of Rho family GTPase activation in living cells. *J Cell Sci* 117: 1313-1318
70. LaCroix AS, Rothenberg KE, Berginski ME, Urs AN, Hoffman BD (2015) Construction, imaging, and analysis of FRET-based tension sensors in living cells. Elsevier Ltd. 161-186 p
71. Kemp-O'Brien K, Parsons M (2013) Using FRET to analyse signals controlling cell adhesion and migration. *J Microsc* 251: 270-278
72. Kurokawa K, Matsuda M (2005) Localized RhoA activation as a requirement for the induction of membrane ruffling. *Mol Biol Cell* 16: 4294-4303
73. El-Sibai M, Pertz O, Pang H, Yip S-C, Lorenz M, Symons M, Condeelis JS, Hahn KM, Backer JM (2008) RhoA/ROCK-mediated switching between Cdc42- and Rac1-dependent protrusion in MTLn3 carcinoma cells. *Exp Cell Res* 314: 1540-1552
74. Pertz O (2010) Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci* 123: 1841-1850
75. Tkachenko E, Sabouri-Ghomi M, Pertz O, Kim C, Gutierrez E, Machacek M, Groisman A, Danuser G, Ginsberg MH (2011) Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nat Cell Biol* 13: 660-667
76. Bravo-Cordero JJ, Sharma VP, Roh-Johnson M, Chen X, Eddy R, Condeelis J, Hodgson L (2013) Spatial regulation of RhoC activity defines protrusion formation in migrating cells. *J Cell Sci* 126: 3356-3369
77. Bravo-Cordero JJ, Oser M, Chen X, Eddy R, Hodgson L, Condeelis J (2011) A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr Biol* 21: 635-644
78. Fritz RD, Pertz O (2016) The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Research* 5: 749-761
79. Fritz RD, Letzelter M, Reimann A, Martin K, Fusco L, Ritsma L, Ponsioen B, Fluri E, Schulte-Merker S, van Rhenen J, Pertz O (2013) A versatile toolkit to produce sensitive FRET biosensors to visualize signaling in time and space. *Sci Signal* 6: rs12
80. Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, Abell A, Johnson GL, Hahn KM, Danuser G (2009) Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461: 99-103
81. Higuchi-Sanabria R, Garcia EJ, Tomoiaga D, Munteanu EL, Feinstein P, Pon LA (2016) Characterization of Fluorescent Proteins for Three- and Four-Color Live-Cell Imaging in *S. cerevisiae*. *PLoS One* 11: e0146120
82. Barry DJ, Durkin CH, Abella JV, Way M (2015) Open source software for quantification of cell migration, protrusions, and fluorescence intensities - Analysis of cell morphodynamics using ADAPT - Supplemental Material. *J Cell Biol* 209. Available: <http://jcb.rupress.org.gate1.inist.fr/content/suppl/2015/04/02/jcb.201501081.DC1>. Accessed 9 December 2016
83. Matthews HK, Marchant L, Carmona-Fontaine C, Kuriyama S, Larraín J, Holt MR, Parsons M, Mayor R (2008) Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* 135: 1771-1780

84. Kardash E, Reichman-Fried M, Maître J-L, Boldajipour B, Papsusheva E, Messerschmidt E-M, Heisenberg C-P, Raz E (2010) A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nat Cell Biol* 12: 47-53-11
85. Wang X, He L, Wu YI, Hahn KM, Montell DJ (2010) Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nat Cell Biol* 12: 591-597
86. Timpson P, McGhee EJ, Morton JP, von Kriegsheim A, Schwarz JP, Karim SA, Doyle B, Quinn JA, Carragher NO, Edward M, Olson MF, Frame MC, Brunton VG, Sansom OJ, Anderson KI (2011) Spatial regulation of RhoA activity during pancreatic cancer cell invasion driven by mutant p53. *Cancer Res* 71: 747-757
87. Johnsson A-KE, Dai Y, Nobis M, Baker MJ, McGhee EJ, Walker S, Schwarz JP, Kadir S, Morton JP, Myant KB, Huels DJ, Segonds-Pichon A, Sansom OJ, Anderson KL, Timpson P, Welch HCE (2014) The Rac-FRET Mouse reveals tight spatiotemporal control of rac activity in primary cells and tissues. *Cell Rep* 6: 1153-1164
88. Hirata E, Kiyokawa E (2015) Future perspective of single-molecule FRET Biosensors and intravital FRET microscopy. *Biophys J* 111: 1-9
89. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709
90. Graham DM, Huang L, Robinson KR, Messerli MA (2013) Epidermal keratinocyte polarity and motility require Ca²⁺ influx through TRPV1. *J Cell Sci* 126: 4602-4613
91. Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2135-2140
92. Germond A, Fujita H, Ichimura T, Watanabe TM (2016) Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters. *Biophys Rev* 8: 121-138
93. Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsu-ura T, Miyawaki A, Michikawa T, Mikoshiba K, Nagai T (2010) Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* 7: 729-732
94. Venkateswarlu K, Oatey PB, Tavaré JM, Cullen PJ (1998) Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. 463-466 p
95. Gallegos LL, Kunkel MT, Newton AC (2006) Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* 281: 30947-30956
96. Newman RH, Fosbrink MD, Zhang J (2011) Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chem Rev* 111: 3614-3666
97. Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, Matsuda M (2006) Akt-PDK1 Complex Mediates Epidermal Growth Factor-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. *Mol Biol Cell* 18: 119-128
98. Sasaki K, Sato M, Umezawa Y (2003) Fluorescent indicators for Akt/protein kinase B and dynamics of Akt activity visualized in living cells. *J Biol Chem* 278: 30945-30951
99. Kunkel MT, Ni Q, Tsien RY, Zhang J, Newton AC (2005) Spatiotemporal Dynamics of Protein Kinase B/Akt Signaling Revealed by a Genetically Encoded Fluorescent Reporter. *J Biol Chem* 280: 5581-5587
100. Gao X, Zhang J (2008) Spatiotemporal Analysis of Differential Akt Regulation in Plasma Membrane Microdomains. *Mol Biol Cell* 19: 4366-4373
101. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 633-643
102. Eichorst JP, Clegg RM, Wang Y (2012) Red-shifted fluorescent proteins monitor enzymatic activity in live HT-1080 cells with fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *J Microsc* 248: 77-89
103. Lu S, Wang Y, Huang H, Pan Y, Chaney EJ, Boppart SA, Ozer H, Strongin AY, Wang Y (2013) Quantitative FRET Imaging to Visualize the Invasiveness of Live Breast Cancer Cells. *PLoS One* 8: e58569
104. Yang J, Zhang Z, Lin J, Lu J, Liu B, Zeng S, Luo Q (2007) Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1773: 400-407

FRET-based biosensors in cell migration research

Sławomir Lasota¹, Zbigniew Baster², Tomasz Witko², Eliza Zimoląg¹, Jolanta Sroka¹, Zenon Rajfur²✉, Zbigniew Madeja¹✉

¹Department of Cell Biology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, 7 Gronostajowa St, 30-387, Krakow, Poland

²Department of Complex Biosystems Physics, Faculty of Physics, Astronomy and Applied Computer Science, Jagiellonian University, 11 Łojasiewicza St, 30-348, Krakow, Poland

✉Z.M.: z.madeja@uj.edu.pl; Z.R.: zenon.rajfur@uj.edu.pl

Key words: Cell migration, Rho GTPases, FRET-based biosensors, fluorescence microscopy, cell signalling

ABSTRACT

Cell migration is a complicated process, which is crucial for functioning of multicellular organisms. Multiple signalling pathways are deeply involved in the precise control of consecutive cell migration stages based on remodelling of the actin cytoskeleton. Small Rho GTPases (RhoA, Rac1 and Cdc42) as well as multiple protein and lipid kinases, calcium ions and mechanosensors are crucial components in this process. Exploration of those complicated correlations is possible with constant advancement of fluorescence microscopy. A significant progress in this field has been achieved since discovery of fluorescent proteins and subsequently FRET-based biosensors. Such protein constructs react with a change of FRET efficiency in response to the particular protein activity change. Properly designed and regularly improved biosensors offer the possibility of real-time imaging of signalling pathways dynamics in migrating cells. The perception of Rho GTPases involvement and some other signalling pathways connected with cell migration have been clarified with multiple experiments already carried out with such FRET-based biosensors.