

STRESZCZENIE

Mikrotubule pełnią kluczową rolę w podziale, utrzymaniu kształtu, ruchu komórki oraz transporcie wewnątrzkomórkowym. Regulacja ich funkcji możliwa jest dzięki zróżnicowaniu dynamiki polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul. Stabilność włókien mikrotubularnych zależy od składu budujących ją podjednostek tubulin klasy alfa i beta, ich modyfikacji potranslacyjnych oraz oddziaływania mikrotubul z białkami stabilizującymi ich strukturę. Zakłócenie tych procesów może prowadzić do powstania szeregu stanów patologicznych jak rozwój nowotworów, chorób układu krążenia czy zmian o charakterze zwłóknieniowym. Poniższy artykuł podsumowuje obecny stan wiedzy na temat nowoczesnych metod analizy polimeryzacji mikrotubul pozwalających na jeszcze lepsze poznanie struktury i mechanizmów pełnionych przez mikrotubule ich funkcji fizjologicznych, jak i rozwój stanów chorobowych wynikających z ich zaburzenia.

WPROWADZENIE

Mikrotubule (MTs) wraz z mikrofilamentami i filamentami pośrednimi tworzą cytoszkielet komórek eukariotycznych. Złożone są one zwykle z 13 protofilamentów zbudowanych z połączonych wiązaniem niekowalencyjnym heterodimerów alfa- i beta-tubuliny w taki sposób, że beta-tubulina jednego heterodimeru oddziałuje z alfa-tubuliną następnego. Poszczególne protofilamenty mogą łączyć się ze sobą dzięki oddziaływaniom bocznym pomiędzy heterodimerami. Polaryzacja dimeru uzyskana dzięki zróżnicowaniu struktury chemicznej podjednostek oraz sposób ich łączenia w protofilamenty zapewnia polaryzację mikrotubuli. Biegunowość ma krytyczne znaczenie w montażu i demontażu mikrotubul oraz w prawidłowym określaniu kierunku transportu wewnątrzkomórkowego [1].

Nowo powstające mikrotubule zakotwiczone są w centrum organizacji mikrotubul (MTOC, ang. *microtubule-organizing center*) i inicjują nukleację dzięki tworzącej tzw. pierścień nukleacji gamma-tubulinie (kompleks γ -TuRC) oraz pericentynie i ninetynie. Do kompleksu przyłączają się kolejne heterodimery tubuliny, a koniec do którego się podłączają nazywany jest końcem rosnącym lub „końcem plus”. W obrębie beta-tubuliny znajdują się 2 cząsteczki GTP, które po pewnym czasie ulegają hydrolizie do GDP. Nagromadzenie GDP w mikrotubuli skutkuje jej niestabilnością i rozpadem struktury (depolimeryzacja). Zjawisko naprzemiennej polimeryzacji i depolimeryzacji MTs jest określana mianem „dynamicznej niestabilności” [2]. Należy zwrócić uwagę, że mikrotubule nie zawsze tworzą się w połączeniu z kompleksem γ -TuRC centrosomu, co obserwowane jest np. w aksonach czy dendrytach, a centra nukleacji mogą powstać w sposób spontaniczny w różnych obszarach komórki [3].

Mikrotubule tworzą w komórce: centriole, wrzeciono podziałowe, sieć interfazową, a także aksony rzęsek i wici. W cytoplazmie komórki interfazowej występują one w postaci pojedynczych lub rozproszonych wiązek, ułożonych wzdłuż długiej osi komórki. MTs zaangażowane są w wiele kluczowych dla komórki procesów fizjologicznych. Biorą udział w segregacji chromosomów podczas podziału komórki, ruchu komórki, tworzeniu rusztowania do transportu wewnątrzkomórkowego poprzez dyneiny i kinezyiny oraz utrzymaniu prawidłowego kształtu komórek [4]. Są one także zaangażowane w przekazywanie sygnału. Zakłócenie struktury lub funkcji prowadzi do rozwoju szeregu chorób. Wśród stanów patologicznych możemy wyróżnić choroby nowotworowe, zwłóknieniowe, neuropatologie oraz choroby układu krążenia [58]. Mikrotubule, a w szczególności tubuliny klasy beta zdają się być najbardziej podatnymi na uszkodzenia i oddziaływania biologiczne strukturami. W niniejszej pracy skupiliśmy się na prezentacji metod i możliwości przyżyciowych badań mikrotubul z zastosowaniem mikroskopii wysokorozdzielczej.

Marta Ewelina Wawro¹

Katarzyna Wieczorek^{1,2}

Katarzyna Sobierajska^{1,✉}

¹Zakład Molekularnych Mechanizmów Komórkowych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Klinika Endokrynologii i Chorób Metabolicznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

✉Zakład Molekularnych Mechanizmów Komórkowych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8 Łódź, 92-215 Łódź; tel.: (42) 272 57 28; e-mail: katarzyna.sobierajska@umed.lodz.pl

Artykuł otrzymano 18 lutego 2017 r.

Artykuł zaakceptowano 22 lutego 2017 r.

Słowa kluczowe: mikrotubule, mikroskopia wysokorozdzielcza, STED, STORM, PALM

Zaangażowanie w tak różnorodne funkcje, powoduje że poszczególne rodzaje mikrotubul muszą różnić się zdolnością do reorganizacji. Podczas gdy niektóre z nich są bardziej dynamiczne, jak np. mikrotubule cytoplazmatyczne lub wrzeczona podziałowego, inne jak te budujące ruszowanie centrioli, ciałek podstawowych i rzęsek wykazują większą stabilność struktury [9]. Właściwości mikrotubul w tym dynamika ich polimeryzacji regulowane są poprzez trzy czynniki: (i) rodzaj podjednostek klasy alfa- i beta-tubuliny wchodzących w skład poszczególnych mikrotubul, (ii) rodzaj i poziom potranslacyjnych modyfikacji izoform tubuliny budujących mikrotubule, a także (iii) oddziaływania mikrotubul z białkami towarzyszącymi mikrotubulom (MAP, ang. *microtubule associated proteins*) [10,11]. Jedną z możliwości analizy dynamiki reorganizacji MTs jest obrazowanie w czasie rzeczywistym. Chęć lepszego poznania molekularnych mechanizmów odpowiadających za prawidłowość polimeryzacji i depolimeryzacji struktury MTs w stanach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych spowodowała, że do badań zaczęto stosować wysokorozdzielczą mikroskopię 4D.

OBRAZOWANIE STRUKTURY MIKROTUBUL

Różnice w strukturze końca mikrotubul zależą nie tylko od tego czy jest ona w fazie wzrostu lub rozpadu, ale także od prędkości tych procesów. Dzięki metodom obrazowania w mikroskopii elektronowej wykazano różnice w kształcie wolno i szybko rosnących końców mikrotubul. Pierwsze z nich są tępo zakończone natomiast szybko rosnące mają stożkowe zakończenia [12]. Mikrotubule kurczą się zazwyczaj w znacznie szybszym tempie niż rosną. Sygnałem do ich gwałtownej depolimeryzacji jest hydroliza stabilizującej strukturę cząsteczki GTP znajdującej się na końcu plus do GDP. Włókna rozpadają się na tworzące go dimery alfa i beta tubuliny, a proces ten nazywany jest „katastrofą”.

Pierwsze prace sugerujące zmiany długości mikrotubul przedstawili Mitchson i Kirchen w 1984 roku [13]. Jednakże dopiero przeprowadzone obserwacje wzrostu i skrócenia pojedynczego włókna przy zastosowaniu mikroskopii w ciemnym polu dowiodła dynamicznej zmiany mikrotubul [14]. Rezultaty te potwierdzono w analizie przyżyciowej pojedynczych mikrotubul w mikroskopie z oświetleniem kontrastowo-fazowym (VE-DIC) [14]. Zarówno analizy w mikroskopie w ciemnym polu jak i mikroskopia kontrastowo-fazowa mają jednak szereg ograniczeń. Pierwsze z nich wymaga wyjątkowej staranności przygotowania preparatu. Jakikolwiek zanieczyszczenia na powierzchni szkła czy też powstanie agregatów w próbce prowadzi do dodatkowego rozproszenia światła i znacząco utrudnia obserwację obrazu. Optyka stosowana w kontraście fazowym mimo ciągłego rozwoju pozostaje nadal problematyczna, ponieważ zgodnie z zasadą oświetlenia Kohlera wymaga on źródła bardzo jasnego oświetlenia. Ponadto obie metody cechuje niska rozdzielczość uzyskanych obrazów, co bardzo utrudnia rozróżnienie pojedynczych włókien. Należy także pamiętać, że w analizie DIC współczynnik załamania światła zależy od ułożenia włókna, co skutkuje tym, że najlepiej widoczne są mikrotubule ułożone równolegle do kierunku światła. Pomimo tych ograniczeń obie metody są nadal sto-

sowane ze względu na brak efektu fotoszkodzenia preparatu występującego przy zastosowaniu innych metod.

ZNAKOWANIE MIKROTUBUL

Konwencjonalna analiza wewnątrzkomórkowej dynamiki MTs obejmuje homogenne oznakowanie całej sieci MTs. Początkowo, w tego typu badaniach stosowano mikroiniekcje tubuliny, w której grupa aminokwasów wyeksponowana na powierzchni polimeryzujących MT była oznaczona chemicznie za pomocą fluorescencyjnych barwników będących pochodnymi N-hydroksysukcynimidu. Opublikowano wiele protokołów opisujących oznakowanie tubuliny oraz mikroiniekcje [15-17]. Niestety, metoda mikroiniekcji posiada szereg ograniczeń. Ta czasochłonna procedura pozwala na uzyskanie jedynie niewielkiego odsetka komórek, w których poziom znakowanych mikrotubul jest wystarczający do przeprowadzenia badań. Z tego względu jest ona często zastępowana przez zastosowanie egzogennej formy tubuliny znakowanej białkami zielonej fluorescencji (GFP) lub jej pochodnymi. Należy jednak zauważyć, iż tubulina połączona z fluorescencyjnym barwnikiem ma kilka zalet w stosunku do tej połączonej z białkami fluorescencyjnymi. Syntetyczne barwniki fluorescencyjne dają zwykle silniejszy sygnał. Mniejszy rozmiar barwnika powoduje ponadto, że koniugowane z nim izoformy tubuliny są bardziej wydajnie włączane do MTs. Wszystkie te czynniki skutkują intensywniejszym wyznakowaniem MTs w stosunku do koniugowanych z FP podjednostek tubuliny. W końcu, wygaszanie syntetycznych fluoroforów jest w dużej mierze zależne od obecności i stężenia tlenu [17,18].

Rozwój mikroskopii konfokalnej pozwalającej na uzyskanie wysokorozdzielczych obrazów analizowanych prób wraz z rozwojem technik znakowania białek pozwolił na bardziej precyzyjne poznanie struktury i zrozumienie funkcji mikrotubul i związanych z nimi molekuł.

MIKROSKOPIA KONFOKALNA W PRZYŻYCIOWYM BADANIU MIKROTUBUL

Rozwój mikroskopii fluorescencyjnej związany z zastosowaniem coraz doskonalszej optyki i punktowego skanowania preparatu pozwolił na powstanie mikroskopu konfokalnego. Uzyskane w nim obrazy cechuje wyższa rozdzielczość (poniżej progu rozdzielczości mikroskopii świetlnej, zwanej limitem Abbego) i znacząco lepszy kontrast w stosunku do klasycznego mikroskopu fluorescencyjnego. Pierwotnym krokiem w uzyskaniu ostrych, trójwymiarowych obrazów analizowanych preparatów było zastosowanie w mikroskopii konfokalnej jedynie światła pochodzącego z płaszczyzny ostrości obrazu.

Możliwość uzyskania trójwymiarowych obrazów w czasie (mikroskopia 4D) pozwoliła na prowadzenie badań przyżyciowych z niespotykaną dotychczas rozdzielczością. Dzięki połączeniu rozwoju samego urządzenia z coraz lepszymi metodami znakowania białek możliwa stała się nie tylko analiza zmian ich położenia w komórce, ale także określenie dynamiki tych procesów.

Zastosowanie odpowiedniego układu detekcyjnego, w którym wycięto sygnał z płaszczyzn znajdujących się poza ogniskową pozwoliło na znaczącą poprawę zdolności rozdzielczej mikroskopu i przyczyniło się do powstania pierwszego mikroskopu konfokalnego [19]. Następne udoskonalenia pozwoliły na podwyższanie rozdzielczości obrazu poprzez przełamywanie ograniczeń dyfrakcyjnych. Przyczyniło się do tego zastosowanie fali ewanescencyjnej na granicy ośrodków (TIRF, ang. *Total Internal Reflection Fluorescence microscopy*) [20,21], wykorzystanie efektów nieliniowych (mikroskopia wielofotonowa) [22,23] czy użycie algorytmów dekonwolucyjnych do przetwarzania obrazów [24-26].

Ciągłe dążenie do uzyskania coraz dokładniejszych obrazów spowodowało, że prace nad rozwojem mikroskopu konfokalnego skupiły się na opracowaniu metody pozwalającej na uzyskanie obrazów przedstawiających położenie pojedynczych świecących cząsteczek fluorochromu lub uzyskania takiego układu gdzie obserwowany obraz będzie pochodził z obszaru próby znacznie mniejszego niż zdolność rozdzielcza mikroskopu. Niezależne obie grupy badaczy Erica Betziga oraz Williama E. Moerner i Stefana W. Hella w wyniku swoich prac uzyskały obrazy pokazujące położenie pojedynczej molekuly, a ich badania zostały docenione przez Komisję Noblowską w 2014 roku.

Pierwszy super rozdzielczy mikroskop, wykorzystujący powyższe możliwości, nazwany PALM (ang. *photoactivated localization microscopy*, mikroskopia lokalizacji fotoaktywacyjnej) został skonstruowany przez Erica Betziga w 2006 roku [27]. Kolejny STORM (ang. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*, stochastyczna mikroskopia rekonstrukcyjna) [28] powstał niedługo później. Działanie obu maszyn opiera się na metodzie stochastycznej polegającej na selektywnym wzbudzeniu fluoroforu związanego z analizowaną molekułą. Zastosowanie tego rodzaju analizy do uzyskania wysokorozdzielczych obrazów możliwe było dzięki skonstruowaniu nowego białka fluorescencyjnego, którego wzbudzenie (włączane i wyłączane) regulowane jest optycznie przez światło laserów, nazwanego PA-FP (ang. *photoactivated fluorescent proteins*) [29].

Mikroskopia PALM oparta jest o aktywowane światłem białka fluorescencyjne, natomiast w STORM fotoprzełączalne pary drobnocząsteczkowych fluoroforów. Kluczowym zjawiskiem wykorzystanym w tego typu mikroskopach jest zastosowanie wysokorozdzielczej metody mikroskopii całkowitego odbicia wewnętrznego, TIRF. Polega ona na wzbudzaniu fluorescencji światłem wzbudzającym, które oświetla preparat pod takim kątem (kąt graniczny), by padające światło uległo całkowitemu wewnętrznemu odbiciu w szkiełku nakrywającym próbkę. Powstała w ten sposób na granicy szkła fala ewanescencyjna, może na bardzo małym (około 100 nm) dystansie wzbudzać fluorochrom. Należy jednak pamiętać, że metoda daje możliwość uzyskania ostrego obrazu jedynie tuż pod powierzchnią szkiełka co pozwala na obserwacje zjawisk zachodzących w błonie komórkowej lub jej bezpośrednim sąsiedztwie. Ograniczenie to wyeliminowano stosując technikę fPALM, która jest połączeniem PALM z mikroskopią konfokalną oraz

dSTORM (ang. *direct STORM*) wykorzystującą w odróżnieniu od STORM pojedynczą cząsteczkę drobnocząsteczkowego fluorochromu, która może ulegać utlenianiu i redukcji pod wpływem światła.

Równocześnie z powyższą metodą rozwijała się mikroskopia bliskiego pola. Dzięki zastosowaniu źródła bardzo intensywnego oświetlenia na małym obszarze i umieszczeniu badanej próbki bardzo blisko takiego źródła światła (w odległości mniejszej niż długość fali) otrzymano obraz o wysokiej rozdzielczości [30]. Pierwsze mikroskopy oparte o tę własność pojawiły się w 1976 roku. Ograniczeniem tej metody jest głębokość preparatu jaki możemy obserwować. Kolejną grupą technik subdyfrakcyjnych są techniki RESOLFT (ang. *REversible Saturable Optical Fluorescence Transition*). Opierają się one na wygaszeniu znacznika fluorescencyjnego na brzegu wzbudzonego punktu i na takim kształtowaniu wiązki wygaszającej by minimum jej natężenia znajdowało się w środku. Pierwszą stosowaną techniką opartą o tą zasadę jest mikroskopia STED (ang. *STimulated Emission Depletion microscopy*), wynaleziona przez Stefana Hella [31,32]. Nasylenie przejścia optycznego uzyskano przez proces emisji wymuszonej. Zastosowanie prócz wiązki wzbudzającej dodatkową wiązkę pierścieniową, selektywnie wygaszającą fluorescencję, uzyskano rozdzielczość obrazów wahającą się od 20 do 100 nm. Oba typy metod są z powodzeniem stosowane w analizach przyżyciowych budowy, dynamiki i oddziaływania z innymi białkami struktur mikrotubularnych. Przykłady ich wykorzystania zostaną przedstawione poniżej

MIKROSKOPIA STORM I PALM

Mikroskopy STORM i PALM, oferujące bardzo wysoką rozdzielczość uzyskanych obrazów, pozwoliły na odkrycie nowych szczegółów dotyczących funkcji i organizacji mikrotubul.

Migracja komórek jest kluczowym zjawiskiem dla różnych procesów biologicznych, w tym embriogenezy, naprawy i regeneracji tkanek, chemotaksji czy powstawania przerzutów nowotworów. Dzięki swej dynamice mikrotubule modulują właściwości fizyczne i funkcjonalną plastyczność migrującej komórki [33]. Dynamiczna niestabilność mikrotubul regulowana jest przez grupę białek specjalnie zlokalizowanych na rosnącym plus końcu włókna (ang. *plus end-tracking proteins, TIP protein*) [34-37]. Jednakże, zobrazowanie czasowej i przestrzennej dynamiki na plus końcu mikrotubul podczas migracji komórek pozostaje nieuchwytnie. Mikrotubularne białka wiążące koniec plus (+TIPs) kontrolują dynamikę i oddziaływanie mikrotubul, między innymi z mitotycznymi kinetochorami, cytoszkieletem aktynowym i częścią korową cytoplazmy. Wyspecjalizowanymi grupami czynników związanych z mikrotubulami, które wiążą rosnące końce mikrotubul i regulują ich funkcje są białka +TIP. Najważniejszymi białkami sieci oddziaływań +TIP są białka EB. Pomagają one w przyłączaniu innych białek +TIP do rosnących końców plus mikrotubul [38]. Białka rodziny EB obejmują EB1, EB2 i EB3, a dzięki obecnej na C-końcu domenie EBC łączą się ze sobą, tworząc sieć, do której przyłączają się inne białka. Z tego względu wysokorozdzielcza wizualizacja łączących się z cytoszkieletem cząsteczek i ich

oddziaływanie z mikrotubulami w czasie rzeczywistym jest niezbędna do określenia sposobu regulacji przez nie plastyczności kształtu komórki. Odkrycie aktywowanych światłem białek fluorescencyjnych oraz wykorzystanie ich w wysokorozdzielczej mikroskopii [39,40] pozwoliło na wizualizację dimeryzacji białka w nanoskali w czasie rzeczywistym *in vivo*. Badania te oparto o zastosowanie komplementarnie fotoaktywowanych białek fluorescencyjnych (PACF) połączonych z białkiem EB1 [41]. Dzięki temu poznano precyzyjną lokalizację dynamicznie rosnącego końca plus mikrotubule oraz położonych na końcach mikrotubul dimerów EB1. Zaobserwowano zróżnicowanie lokalizacji pomiędzy mikrotubulami zlokalizowanymi we froncie wiodącym i w ciele komórki. Nieoczekiwanie, analizy z udziałem mutantów białka EB1 wskazały na krytyczną rolę nie scharakteryzowanego dotychczas regionu łącznikowego białek EB1 w przyłączeniu tych białek do struktury mikrotubul.

Wyniki prowadzonych badań dowiodły, że mikroskopia PALM umożliwiła wizualizację FtsZ, bakteryjnego homologu eukariotycznej tubuliny w komórkach prokariotów. W większości komórek bakteryjnych podział komórki jest zależny od polimeryzacji białka FtsZ, tworzącego strukturę pierścieniową (Z-ring) pośrodku komórki. Mimo swej istotnej roli, struktura przestrzenna Z-ring pozostaje niejasna. Buss i wsp. [42], korzystając z mikroskopii PALM, badali funkcje białek związanych z FtsZ – ZAPA i ZApB w regulacji dynamiki zmian i strukturze Z-ring w komórkach *Escherichia coli*. Badania na mutantach pozbawionych jednego z białek wykazały zaburzenia w tworzeniu przegrody, co było wynikiem zaburzenia klastrowego ułożenia FtsZ. Analiza ilościowa pokazała, że klastry mutantów są większe i zawierają więcej cząsteczek niż jeden protofilament. Uzyskane wyniki sugerują, że główną funkcją ZAPA i ZapB *in vivo* nie jest promowanie włączenia poszczególnych protofilamentów, ale regulacja klastrów FtsZ, które składają się z wielu protofilamentów. Badania nad rolą FtsZ w funkcjonowaniu pierścienia Z w *Caulobacter crescentus* [43] wykazały, że białko ułożone jest losowo w obszarze pierścienia, co jest niezbędne do prawidłowego podziału komórki. Autorzy dowiedli, że uszkodzenie DNA powodujące powstanie gęsto upakowanych przez FtsZ pierścieni-Z prowadzi do hamowania cytokinezy.

Skaner SIM pozwala na wizualizację i analizę szybkich zmian zachodzących w materiale biologicznym. Dzięki dużej rozdzielczości i wydajności system umożliwia wielowymiarowe obrazowanie (3D, 4D) struktur komórkowych na poziomie nanoskali. SIM jest jedną z najmniej fototoksycznych i najszybszych metod otrzymywania obrazów o wysokiej rozdzielczości i jest szeroko stosowany w badaniach żywych komórek. Trójwymiarowa wersja struktury oświetlenia pozwala na lepszą rozdzielczość w kierunku Z i dzięki temu jest wykorzystywana do wizualizacji struktury cytoszkieletu w trzech wymiarach.

Bazując na tej metodzie badacze poznali role wielu białek oddziałujących z mikrotubulami lub też zmian potranslacyjnych w obrębie tubulin budujących mikrotubule w regulacji procesów związanych z utrzymaniem lub zmianą kształtu komórki. W płytkach krwi wykazano zarówno istotność

acetytacji w regulacji struktury mikrotubul spoczynkowych, jak i koordynacji reorganizacji cytoszkieletu w trakcie agregacji płytek [44].

Prawidłowa organizacja mikrotubul w interfazie jest krytyczna dla funkcjonowania komórki i utrzymania jej kształtu, a także budowania przez nią tkanki. Badania na muszce *Drosophila* wykazały, że w trakcie rozwoju embrionalnego wydłużanie komórek naskórka koreluje z wydłużaniem mikrotubul. Uzyskane wyniki sugerują jednak, że to kształt komórki narzuca wydłużanie mikrotubuli, a wydłużanie włókien nie skutkuje wydłużeniem komórki [45]. Oddziaływanie filamentów aktyny z systemem mikrotubul odgrywa ważną rolę w utrzymaniu i regulacji struktury komórek. Autorzy pokazują, że w komórkach nabłonka dystrybucja cytoplazmatycznej aktyny jest odmienna od położenia mikrotubul. Analizy w mikroskopie 3D-SIM mutantów z wyciszoną ekspresją genów β - i γ -tubuliny wskazują, że jedynie pierwsza z nich może selektywnie oddziaływać z mikrotubulami poprzez białko EB1 [46].

MIKROSKOPIA BLISKIEGO POLA W BADANIACH MIKROTUBUL

Rozwój mikroskopii bliskiego pola (STED) stał się możliwy dzięki zastosowaniu fotostabilnych barwników, które nie ulegają fotoutlenianiu w trakcie wykonywania analiz.

Jednym z nich jest barwnik Sir, którego wysoka fotostabilność i mały rozmiar czyni go również dobrze użytocznym w analizie STED, prowadzonej w czasie rzeczywistym *in vivo*. [47]. Przyżyciowe barwienie ludzkich fibroblastów SiR-tubuliny, a następnie obrazowanie metodą STED wykazało, że mikrotubule obwodowe i mikrotubule centrosomu, mają średnicę mikrotubul około 40 nm, natomiast znakowane znacznie większym fluoroforem SNAP, poprzez wiążące się do mikrotubul białko CEP41 – 80 nm. Wyniki te w bardzo przejrzysty sposób pokazują jak istotny wpływ na uzyskany obraz ma rodzaj, a przede wszystkim wielkość zastosowanego barwnika. Należy także podkreślić, że metoda ta pozwoliła po raz pierwszy pokazać budowę i wyliczyć średnicę mikrotubul z tak dużą rozdzielczością i dokładnością. Analogiczne wyniki uzyskano w obserwacji przyżyciowej ludzkich centrosomów. Także tutaj zastosowanie barwników opartych o Sir, bezpośrednio znakujących mikrotubule dawało znacznie lepszy efekt uzyskanych obrazów niż barwienie pośrednie poprzez białka związane ze strukturami mikrotubularnymi przy zastosowaniu barwnika o znacznie większych rozmiarach.

Jedną z funkcji mikrotubul jest tworzenie szlaków, po których przemieszczają się białka motoryczne (kinezyzna, dyneina), biorące udział w transporcie wewnątrzkomórkowym.

Aby osiągnąć swój cel, białko motoryczne związane ze swoim ładunkiem musi pokonać przeszkody, jakie napotka w trakcie swojej wędrówki, takie jak punkty przecięcia między mikrotubulami. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za efektywność transportu wewnątrzkomórkowego stało się możliwe dzięki zastosowaniu metody wizualizacji opartej o mikroskopię STED [48]. W tym celu badacze transfekowali komórki plazmidem z konstruktem

tubuliny połączonej z białkiem GFP. Prowadzona w czasie rzeczywistym analiza poruszających się po mikrotubulach lizosomów pozwoliła na obserwację ich zachowania w trakcie przechodzenia przez skrzyżowanie mikrotubul. Użyte wyniki pokazują, że sytuacja taka stanowi znaczną przeszkodę prowadzącą do długich przerw w transporcie jedynie wtedy, gdy odstęp jest mniejszy niż 100 nm. Jednakże lizozymy pokonują przeszkodę albo poprzez przejście po mikrotubuli przecinającej, albo bezpośrednio pokonanie przerwy w ciągłości mikrotubuli. Co ciekawe, zaobserwowano wysoki współczynnik polaryzacji wybranego kierunku ruchu po mikrotubuli. Zwykle po pokonaniu skrzyżowania mikrotubul lizosomy poruszały się nadal w tym samym kierunku, co wskazuje na istnienie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację ukierunkowania transportu.

Spolaryzowany transport pęcherzykowy pełni kluczową rolę w tworzeniu splotów neuronalnych. Kinezyzna-1 rozpoznaje końce mikrotubuli aksonalnych, wzbogaconych w domeny łączące EB1. Natomiast mechanizm tego preferencyjnego łączenia się kinezyzny z końcami aksonów nie był znany. Nakata i współautorzy [49] w oparciu o mikroskopię STED wykazali istotność wiązania kinezyzny-1 (KIF5) z bogatymi w GTP cząsteczkami tubuliny w aksonalnych mikrotubulach w celu zapewnienia spolaryzowanego transportu pęcherzykowego. W swoich badaniach wykorzystali przeciwciała hMB11, specyficznie łączące się z tubuliną z przyłączoną cząsteczką GTP (GTP-tubulina). Dzięki zastosowaniu metody wysokorozdzielczej mikroskopii wykazano, że użyte przeciwciała łączą się z aksonalnymi mikrotubulami w miejscach przyłączenia się kinezyzny-1, utrudniając jej selektywną kumulację na końcach aksonów. Dodatkowo, badacze zaobserwowali, że łączące się preferencyjnie z mikrotubulami z przyłączonymi GMPCCP, białko EB1 rozpoznaje miejsca przyczepu przeciwciała hMB11. Jednocześnie badania *in vitro* pokazały, że kinezyzna-1 łączy się 3-krotnie silniej z mikrotubulami z GMPCCP niż z GDP. Wszystkie uzyskane wyniki wskazują więc na kluczową rolę kinezyzny-1 w regulacji procesu transportu pęcherzykowego po mikrotubulach w aksonach komórek neuronalnych.

PODSUMOWANIE

Chociaż potencjał i rezultaty uzyskane dzięki zastosowaniu metod mikroskopii wysokorozdzielczej są niepodważalne, należy pamiętać że wiąże się ona z szeregiem problemów od pozyskania zadowalająco ostrych obrazów, możliwości ich przechowywania po zdolności do ich interpretacji. Zmiana rozdzielczości dwuwymiarowego obrazu o jeden rząd wielkości przy zachowaniu stałego obszaru analizy powoduje 100-krotne zwiększenie jego rozmiaru. Dodanie dodatkowo trzeciego wymiaru – głębi preparatu oraz czasu w jakich dany proces się odbywa wymaga dalszego zwielokrotnienia potrzebnej do przechowywania danych pamięci, komputerów o ogromnych możliwościach przeliczenia danych. Dodatkowo metody te opierają się na zastosowaniu odpornych na fotouszkodzenie barwników, których pozyskanie nadal wiąże się z ogromnymi kosztami. Pomimo ciągłego rozwijania technik mikroskopii oparta o znaczniki fluorescencyjne nadal nie osiąga możliwości rozdzielczych mikroskopów elektronowych.

Niemniej jednak, jesteśmy świadkami rozwoju aparatury, metod obliczeniowych, sond fluorescencyjnych oraz nowych metod w tempie tak szybkim, że pozostająca w sferze marzeń chęć analizy poszczególnych kompleksów białkowych i ich partnerów funkcjonujących w żywych komórkach organizmu wydaje się coraz bardziej realna.

PIŚMIENNICTWO

1. Amos LA (2000) Focusing-in on microtubules. *Curr Opin Struct Biol* 10: 236-241
2. Nogales E, Zhang R (2016) Visualizing microtubule structural transitions and interactions with associated proteins. *Curr Opin Struct Biol* 37: 90-96
3. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA (2011) Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 709-721
4. Borisy G, Heald R, Howard J, Janke C, Musacchio A, Nogales E (2016) Microtubules: 50 years on from the discovery of tubulin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 322-328
5. Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA (2014) Microtubules and Their Role in Cellular Stress in Cancer *Front Oncol* 4: 153
6. Han SJ, Kim JH, Kim JI, Park KM (2016) Inhibition of microtubule dynamics impedes repair of kidney ischemia/reperfusion injury and increases fibrosis. *Sci Rep* 6: 27775
7. Sequeira V, Nijenkamp LLAM, Regan JA, van der Velden J (2014) Reciprocal influences between cell cytoskeleton and membrane channels, receptors and transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembrane* 1838: 700-722
8. Dubey J, Ratnakaan N, Koushida SP (2015) Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. *Front Cell Neurosci* 9: 343
9. Berbari NF, Sharma N, Malarkey EB, Pieczynski JN, Boddu R, Gaertig J, Guay-Woodford L, Yoder BK (2013) Microtubule modifications and stability are altered by cilia perturbation and in cystic kidney disease. *Cytoskeleton (Hoboken)* 70: 24-31
10. Lyle K, Kumar P, Wittmann T (2009) SnapShot: Microtubule Regulators I. *Cell* 136: 380, 380.e1
11. Lyle K, Kumar P, Wittmann T (2009) SnapShot: Microtubule regulators II. *Cell* 136: 566, 566.e1
12. Simor JR, Slamon ED (1990) The structure of microtubule ends during the elongation and shortening phases of dynamic instability examined by negative-stain electron microscopy. *J Cell Sci* 96: 571-582
13. Mitchison T, Kirchner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-242
14. Horio T, Hotani H (1986) Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321: 605-607
15. Sammak PJ, Borisy GG (1988) Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* 233: 724-726
16. Shelden E, Wadsworth P (1993) Observation and quantification of individual microtubule behavior in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific. *J Cell Biol* 120: 935-945
17. Wittmann T, Littlefield R, Waterman-Storer CM (2004) Fluorescent speckle microscopy of cytoskeletal dynamics in living cells. w Spector DL, Goldman RD, editors. *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press 187-204
18. Wittmann T, Bokoch GM, Waterman-Storer CM (2003) Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J Cell Biol* 161: 845-851
19. Minsky M, *Microscopy apparatus*, 1961, US Patent 3,013,467
20. Axelrod D (1981) Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J Cell Biol* 89: 141-145
21. Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, Saito K, Yanagida T (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* 374: 555-559
22. Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248: 73-76

23. Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW (1997) In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385: 161-165
24. Agard, DA Sedat JW (1983) Three-dimensional architecture of a polystyrene nucleus. *Nature* 302: 676-681
25. Carrington WA, Lynch RM, Morre ED, Isenberg Gm Fogarty JEm Fay FS (1995) Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure. *Science* 268: 1483-1487
26. Wallace W, Schaefer LH, Swedlow JR (2001) A working person's guide to deconvolution in light microscopy. *BioTechniques* 3: 1076-1078
27. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313: 1642-1645
28. Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* 3: 793-795
29. Nienhaus K, Nienhaus GU (2014) Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chem Soc Rev* 43: 1088-1106
30. Syngge E (1928) A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *Philosophical Magazine* 6: 356
31. Hell SW, Wichmann J (1994) Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19: 780-782
32. Klar TA, Hell SW (1999) Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt Lett* 24: 954-956
33. Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K (2005) Roles of IQGAP1 in cell polarization and migration. *Novartis Found Symp* 269: 92-101
34. Honnappa S, John CM, Kostrewa D, Winkler FK, Steinmetz Mo (2005) Structural insights into the EB1-APC interaction. *EMBO J* 24: 261-269
35. Slep KC, Vale RD (2007) Structural basis of microtubule plus end tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol Cell* 27: 976-991
36. Steinmatz MO, Akhmanova A (2008) Capturing protein tails by CAP-Gly domains. *Trends Biochem Sci* 33: 535-545
37. Komarova Y, De Groot CO, Grigoriev I, Gouveia SM, Munteanu EL, Schober JM, Honnappa S, Buey RM, Hoogenraad CC, Dogterom M, Borisy GG, Steinmetz MO, Akhmanova A (2009) Mammalian end-binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol* 184: 691-706
38. Vaughan KT (2005) TIP maker and TIP marker; EB1 as a master controller of microtubule plus ends. *J Cell Biol* 171: 197-200
39. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J (2002) A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297: 1873-1877.
40. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313: 1642-1645
41. Xia P, Liu X, Wu B, Zhang S, Song X, Yao PY, Lippincott-Schwartz J, Yao X (2014) Superresolution imaging reveals structural features of EB1 in microtubule plus-end tracking. *Mol Biol Cell* 25: 4166-4173
42. Buss J, Coltharp C, Xiao J (2013) Super-resolution imaging of the bacterial division machinery. *J Vis Exp* 21: 71
43. Holden SJ, Pengo T, Meibom KL, Fernandez Fernandez C, Collier J, Manley S (2014) High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* *in vivo* Z-ring organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 4566-4571
44. Aslan JE, Phillips KG, Healy LD, Itakura A, Pang J, McCarty OJ (2013) Histone deacetylase 6-mediated deacetylation of α -tubulin coordinates cytoskeletal and signaling events during platelet activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 305: C1230-C1239
45. Gomez JM, Chumakova L, Bulgakova NA, Brown NH (2016) Microtubule organization is determined by the shape of epithelial cells. *Nat Commun* 7: 13172
46. Dugina V, Alieva I, Khromova N, Kireev I, Gunning PW, Kopnin P (2016) Interaction of microtubules with the actin cytoskeleton via cross-talk of EB1-containing +TIPs and γ -actin in epithelial cells. *Oncotarget* 7: 72699-72715
47. Lukinavičius G, Reymond L, D'Este E, Masharina A, Göttfert F, Ta H, Güther A, Fournier M, Rizzo S, Waldmann H, Blaukopf C, Sommer C, Gerlich DW, Arndt HD, Hell SW, Johnsson K (2014) Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods* 11: 731-733

Modern methods in analysis of microtubules dynamic *in vivo*

Marta Ewelina Wawro¹, Katarzyna Wieczorek^{1,2}, Katarzyna Sobierajska^{1,✉}

¹Medical University of Lodz; Department of Molecular Cell Mechanisms, 6/8 Mazowiecka St., 92-215 Lodz, Poland

²Medical University of Lodz; Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, 281/289 Rzgowska St., 93-338 Lodz, Poland

✉e-mail: katarzyna.sobierajska@umed.lodz.pl

Key words: microtubuls, high resolution microscopy, STED, STORM, PALM

SUMMARY

Microtubules are involved in any vital cellular activities, including the maintenance of cell shape, division, migration and intracellular transport. Microtubule dynamics is regulated by the balance between their polymerization and depolymerization. Microtubule stability is dependent on their alpha and beta subunits composition, tubulin post-translational modifications and interaction of microtubules with *microtubule-associated proteins* (MAPs). Disruption of these processes can lead to a number of pathological conditions such as cancer, cardiovascular disease, or the fibrosis development. This review summarizes the current knowledge of the modern methods of microtubule polymerization analysis. This allows a better understanding of the structure and mechanisms played by microtubules in their physiological functions and the development of pathological conditions resulting from their disorder.