

PAWEŁ POMORSKI

*Zakład Biochemii
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: p.pomorski@nencki.gov.pl*

RUCH POD MIKROSKOPEM – WSPÓŁCZESNE TECHNIKI BADANIA ADHEZJI I RUCHLIWOŚCI KOMÓREK

WPROWADZENIE

Tradycyjny obraz biologa pochylonego nad mikroskopem w ostatnim półwieczu odszedł w przeszłość. Dziś nauki o życiu rozwijają się wraz z udoskonalaniem technik chemicznych i fizycznych, pozwalających na badanie funkcji życiowych schodząc do poziomu pojedynczych cząsteczek białka czy kwasu nukleinowego. Oszołomieni ogromnym sukcesem biologii molekularnej musimy jednak pamiętać o podstawowym założeniu, leżącym u podstaw większości technik *in vitro*: badana funkcja musi występować w sposób zsynchronizowany w dużej, spójnej populacji komórek czy też organizmów. Badanie procesów niesynchronicznych i spontanicznych stanowi z tego punktu widzenia poważne wyzwanie.

Badania ruchliwości komórek stawiają badaczom właśnie takie wymagania, zmuszając do sprowadzenia współczesnych technik molekularnych na poziom pojedynczej komórki, poprzez zastosowanie ich łącznie z użyciem najnowszych zdobyczy

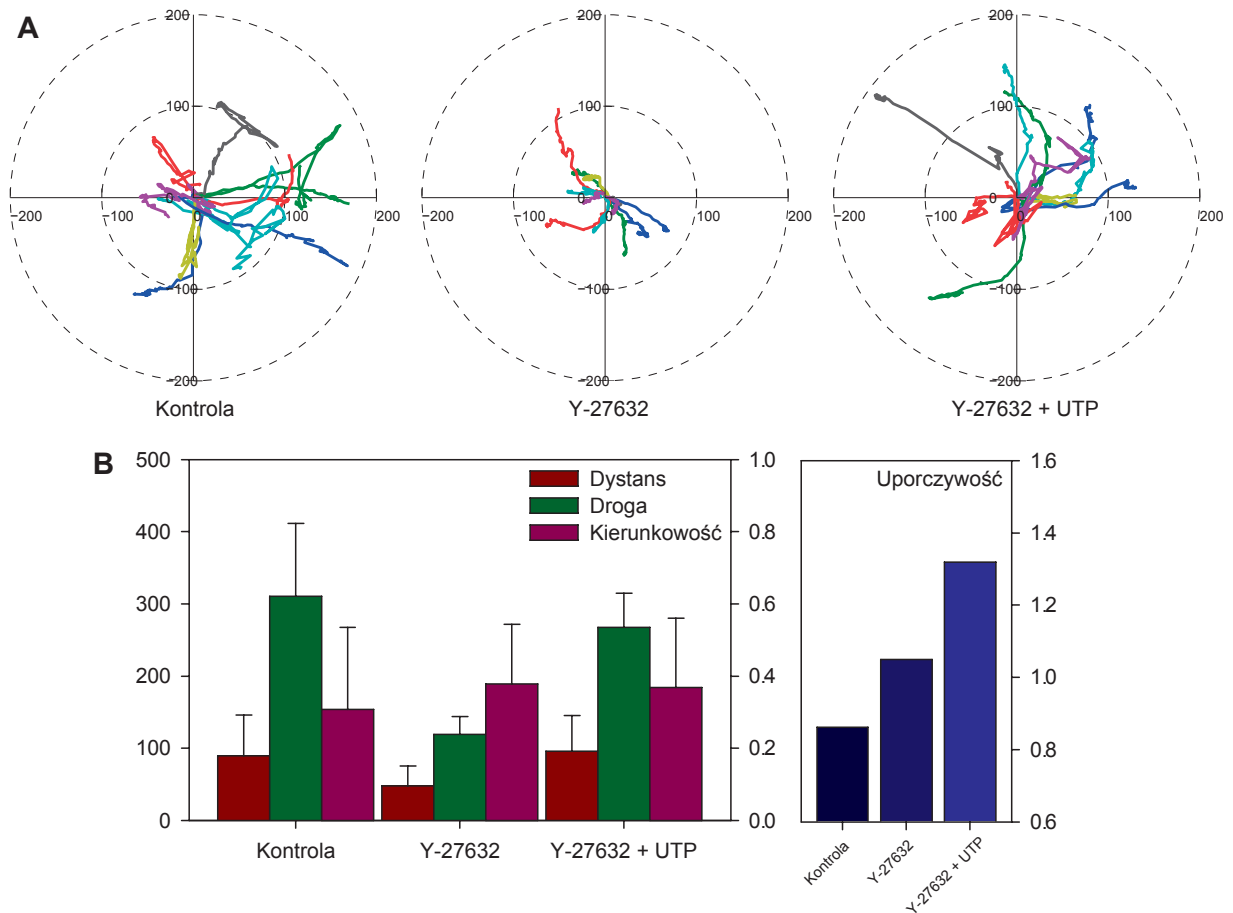
mikroskopii. Artykuł ten jest próbą systematycznego przeglądu technik mikroskopowych, które są używane w badaniach ruchliwości komórek.

Przegląd ten zaczniemy od obecnych metod śledzenia komórek i analizy parametrów ich ruchliwości oraz metod pomiaru mikroskopowego sił przylegania komórek do podłoża. Następnie przedstawimy krótki przegląd metod mikroskopii strukturalnej i jej wkład w badania ruchu komórek. Zasadniczą częścią pracy będą jednak metody stanowiące próbę przeniesienia siły biologii molekularnej na poziom pojedynczej komórki, metody prowadzące do przeniesienia biochemii pod obiektyw mikroskopu. Na zakończenie zostaną przedstawione pokrótce perspektywy dalszego rozwoju technik mikroskopowych stosowanych w badaniach ruchu i adhezji komórek, ze szczególnym naciskiem na rozwój badań ruchu w środowiskach trójwymiarowych i badań mikroskopowych *in vivo*.

ŚLEDZĄC KOMÓRKĘ

Współczesna nauka opiera się na metodologii doświadczalnej; każda teza jaką stawiamy musi być doświadczalnie zweryfikowana zanim uznamy ją za prawdziwą. W przypadku systemów tak złożonych jak organizmy żywe, weryfikacja ma zazwyczaj charakter statystyczny: wynik ingerencji ba-

dacza musi być istotnie różny od zachowania układu kontrolnego. Takie podejście zakłada wykonywanie pomiarów: każdy proces musi być opisany parametrami, które z kolei powinny dać się zmierzyć i przedstawić w możliwie prostej postaci liczbowej.



Ryc. 1. Analiza trajektorii ruchu komórek.

A: Wykresy przedstawiające rzeczywiste trajektorie komórek glejaka C6, sprowadzone do wspólnego początku. Od lewej: komórki kontrolne; komórki, w których zahamowano aktywność kinazy ROCK, przy pomocy specyficznego inhibitora (Y-27632), hamując jednocześnie kurczliwość aktomiozyny; komórki, w których blokada ROCK jest częściowo zniesiona przez pobudzenie receptora nukleotydowego P2Y₂ przy pomocy UTP i wywołanie sygnału wapniowego w cytoplazmie. B: Parametryzacja powyższych trajektorii. Proszę zwrócić uwagę, że nie wszystkie opisywane w treści artykułu parametry zmieniają się znacząco w trakcie doświadczenia, nawet jeśli trajektorie różnią się na pierwszy rzut oka. Uporczywość jest liczona dla całego doświadczenia, a nie każdej trajektorii z osobna, stąd brak odchyłeń standardowych.

Z punktu widzenia badań mikroskopowych musimy zmierzyć się w tym celu z dwoma zagadnieniami: obserwować i śledzić komórki w ruchu, a następnie określić syntetyczne parametry, pozwalające nam scharakteryzować jedną liczbą ruch w układach doświadczalnych (Ryc. 1).

MIKROSKOPIA POKLATKOWA

Materiałem wyjściowym do śledzenia ruchu komórek jest zazwyczaj wynik mikroskopowej rejestracji poklatkowej (zwanej z ang. rejestracją time-lapse), czyli sekwencją obrazów wykonanych w równym odstępie czasowym, na których komórki znajdują się

w różnych położeniach (w Polsce pierwszy taki system został uruchomiony w laboratorium Włodzimierza Korohody w Krakowie, w połowie lat 90. ubiegłego wieku; KORHODA i współaut. 1997). Chcąc śledzić komórkę w ruchu badacz musi w pierwszym rzędzie określić gdzie komórka się znajduje. To zadanie, na pierwszy rzut oka proste, może w praktyce nastęrczać wiele trudności. Komórki tkankowe są zazwyczaj przejrzyste i w mikroskopie świetlnym słabo widoczne. Aby je zobaczyć stosuje się jedno z dwóch podejść: można komórki barwić, jak to czyniono od XIX w. lub użyć metod kontrastu optycznego takich jak kontrast

fazowy, kontrast różniczkowy-interferencyjny (DIC) Nomarskiego czy kontrast modulacyjny Hoffmana, używany do obserwacji komórek w plastikowych szalkach Petriego.

WIZUALIZACJA I WYKRYWANIE KOMÓREK

Wybór pomiędzy użyciem barwnika a odpowiedniego kontrastu optycznego nie jest prosty i pociąga za sobą pewne konsekwencje. Barwienie komórek jest stosunkowo proste, ale wprowadzanie dużych ilości obcych związków do cytoplazmy nie jest obojętne, a często cytotoksyczne. Aby zminimalizować ilość barwnika, konieczną do zabarwienia komórki, używa się dziś barwników fluorescencyjnych. Są one powszechnie dostępne na rynku i określane jako cytotrakery. Największą wadą cytotrakerów jest konieczność ich wizualizacji przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej, a intensywne światło wzbudzące barwnik nie jest dla komórki obojętne, zwłaszcza jeśli cytotraker jest wizualizowany przy użyciu mikroskopu konfokalnego, a żywe komórki są regularnie omiatane wiązką lasera. Nie znaczy to, że użycie barwników fluorescencyjnych jest pozbawione zalet. Otrzymywany obraz komórek jest kontrastowy, a rozróżnienie między obszarem zajmowanym przez komórkę i tłem proste. Wystarczy prosta operacja progowania obrazu, aby odróżnić komórkę od obszaru ją otaczającego. Poznajemy w ten sposób dokładny obrys komórki i możemy śledzić zarówno jej przemieszczanie, jak też zmiany kształtu.

Fakt, że komórki obserwowane w świetle przechodzącym są prawie niewidoczne wynika z ich słabej zdolności do pochłaniania światła. Kontrast optyczny polega na wykorzystaniu do obrazowania innych własności optycznych preparatu niż sama zdolność do pochłaniania światła. Może być to zdolność do przesuwania światła w fazie, różnice własności polaryzacyjnych czy zmiany współczynnika załamania światła (zainteresowanych działaniem kontrastu optycznego odsyłam do ogólnej literatury dotyczącej mikroskopii optycznej np. PLUTA 1982, DAVIDSON i ABRAMOWITZ 2002). Kontrast optyczny nie wymaga wprowadzania do komórki żadnych obcych, potencjalnie szkodliwych, związków. Obrazowanie można prowadzić przy niskiej intensywności oświetlenia, a długość fali może być swobodnie wybierana, co może z kolei mieć znaczenie, jeśli komórki są wrażliwe na światło (jak to ma miejsce w przypadku licznych, jednokomórkowych organizmów wolnożyjących, takich jak np.

Amoeba proteus). Niestety, w przypadku kontrastów optycznych wykrywanie kształtu komórek jest znacznie trudniejsze. Obiekty obrazowane w kontraście fazowym posiadają charakterystyczną aureolę, utrudniającą określenie ich granicy. Obrazy otrzymywane przy pomocy kontrastu DIC mają ostre krawędzie, niestety nie są łatwe do analizowania, gdyż wykrywane obiekty zawierają obszary zarówno jaśniejsze, jak i ciemniejsze od tła, które zazwyczaj ma wartość zbliżoną do średniej jasności dla całego obrazu. Powstał cały szereg algorytmów do wykrywania brzegów obiektów obrazowanych w optyce DIC Nomarskiego, żaden z nich nie jest jednak łatwo dostępny w szeroko rozpowszechnionych, komercyjnych programach do analizy obrazu mikroskopowego. Wszystkie one są oparte na lokalnej analizie parametrów obrazu, takich jak lokalny kontrast określany przez odchylenie standardowe z jasności pikseli (SOLL i współaut. 2000), czy też lokalny pomiar entropii obrazu (HAMAHASHI i współaut. 2005). Alternatywną metodą wykrywania ruchliwych komórek w preparacie jest ich śledzenie bez określania kształtu komórki. Jest to możliwe dzięki analizie podobieństwa fragmentów obrazu przy pomocy funkcji korelacji wzajemnej (ang. cross-correlation) pomiędzy kolejnymi obrazami. W praktyce odbywa się to tak, że wskazujemy na obrazie możliwie mały obszar, w którym znajduje się komórka i na następnym obrazie w serii czasowej poszukujemy w pobliżu możliwie najbardziej podobnego obszaru o tym samym kształcie. Gdy go znajdziemy zakładamy, że przesunięcie komórki jest równe przesunięciu obszaru (PLETJUSHKINA i współaut. 2001). Zaletą tego podejścia jest ominięcie procedury wykrywania krawędzi komórki i fakt, że przynajmniej jeden z komercyjnie dostępnych pakietów do obróbki obrazu mikroskopowego ma tę opcję wbudowaną (MetaMorph, Molecular Devices, USA).

PARAMETRIZACJA TRAJEKTORII

Pomiarem ruchu komórki można nazwać sekwencję punktów stanowiących położenie środka ciężkości obliczonego z wykrytego kształtu komórki lub środków obszarów wykrywanych metodą największych podobieństw. Łącząc te punkty otrzymujemy trajektorię ruchu. Sama trajektoria nie może jednak być traktowana jako ostateczny wynik pomiaru i wymaga dalszej parametryzacji. Najprostszym i jednocześnie bezwzględnie dokładnym pomiarem jaki możemy wykonać przy użyciu

trajektorii komórki, to odległość przebyta w trakcie doświadczenia. Jest to odległość przebyta przez komórkę w linii prostej. Śledzenie toru migracji jest konieczne, aby mieć pewności, że analizujemy ruch tej samej komórki. Drugim, prostym parametrem jest droga przebyta przez komórkę, czyli suma odległości między kolejnymi, rejestrowanymi pozycjami. Ta droga będzie jednak liczona zawsze z pewnym błędem. Jeśli punkty rejestracyjne będą się znajdować zbyt daleko siebie, nie wszystkie zmiany kierunku mogą zostać wykryte i długość drogi będzie zanizona. Z kolei, jeśli punkty będą bardzo gęsto rozmieszczone w czasie, istotny wpływ na wynik mogą mieć zmiany kształtu komórki, o czym jeszcze będzie mowa. Na podstawie tych dwóch wartości: przebytego dystansu i przebytej całkowitej drogi można policzyć pierwszy parametr syntetyczny, czyli współczynnik skuteczności ruchu (ang. coefficient of movement efficiency, CME) (FRIEDL i współaut. 1993), pokazujący czy komórka błądzi czy też dokądś zdąża.

MODEL RUCHLIWOŚCI KOMÓREK OPARTY O BŁĄDZENIE LOSOWE

Bardziej złożona ocena parametryczna ruchu wymaga pewnych założeń co do jego charakteru. Użytecznym modelem ruchu komórek jest tzw. błądzenie losowe (ang. random walk). Jest to model, w którym trajektoria podzielona jest na dyskretne kroki, a kierunek następnego kroku jest wybierany losowo. Pojęcie błądzenia losowego zostało wprowadzone przez PEARSONA w 1905 r., a w 1953 r. zostało uzupełnione o współczynnik bezwładności (ang. persistence coefficient), określający skłonność poruszającego się obiektu do zachowania dotychczasowego kierunku w następnym kroku (PATLAK 1953). Określenie współczynnika bezwładności dla ruchu komórek jest dość złożoną procedurą i wymaga określenia zależności średniego kwadratu przesunięcia komórki od czasu pomiaru ruchu. Znajomość tej zależności pozwala na określenie współczynnika bezwładności ruchu przez dopasowanie do znanego wzoru na błądzenie losowe z bezwładnością (DICKINSON i TRANQUILLO 1993). Jako że określenie „bezwładność” źle oddaje tendencję ruchu komórki w stałym kierunku, parametr ten nazywa się również „uporczywością”. Szerszy przegląd zagadnień z zakresu analizy ruchu komórek przez model błądzenia losowego można znaleźć w pracy przeglądowej CODLINGA i współaut. (2008).

Wszystkie powyższe metody opierają się na zapisie trajektorii, będących zbiorami

punktów, podczas gdy musimy być świadomi, iż zmiany kształtu komórki i jej ruch nie są tak naprawdę całkowicie odrębnymi i niezależnymi procesami. Próba całościowej analizy zmian kształtu i ruchu komórek przy pomocy analizy fourierowskiej pojawiła się już ponad 20 lat temu. Prowadzi ona do tworzenia map zachowania komórki, a nie naliczania pojedynczych parametrów, będąc jednocześnie metodą trudną koncepcyjnie dla użytkownika. Fakt ten spowodował brak popularyzacji tego bardzo ciekawego podejścia do analizy ruchu komórek (PARTIN i współaut. 1989).

RUCH KOMÓREK W 3 WYMIARACH

Wbrew pozorom, analiza ruchliwości komórek w dwóch i trzech wymiarach nie różni się tak bardzo. Trajektorie komórki można wyznaczać w przestrzeni trójwymiarowej równie dobrze, jak w dwuwymiarowej. Do wizualizacji barwników fluorescencyjnych trzeba w tym przypadku użyć mikroskopu konfokalnego, najczęściej dwufotonowego, ze względu na większą głębię widzenia i mniejszą fitotoksyczność przy niewielkich wymaganiach co do rozdzielczości obrazu. Pamiętać trzeba jednak, że ilość obrabianych danych znacznie wzrasta, większe stają się wymagania dotyczące algorytmów segmentacji, służących do określania gdzie znajduje się komórka, oraz wymagania dotyczące sprzętu rejestrującego ruch (XIAO i współaut. 2010). Alternatywą jest tu wykorzystanie kontrastu optycznego DIC Nomarskiego, który daje bardzo małą głębię ostrości i pozwala na odtworzenie trójwymiarowego obrazu komórek w prosty i szybki sposób, pod warunkiem, że opanujemy problemy z segmentacją obrazów otrzymywanych w tej optyce (SOLL i VOSS 1998). Przejście od dwóch do trzech wymiarów stanowi zatem raczej techniczny problem niż poważne wyzwanie. Upowszechnienie śledzenia komórek w trzech wymiarach będzie się prawdopodobnie wiązało z rozwojem badań ruchu komórek *in vivo*.

IN VIVO CZY IN VITRO

Do tej pory zdecydowana większość badań nad ruchem komórek dotyczyła modeli *in vitro*. Niezależnie od tego czy komórki były badane na szkle, sztucznych podłożach czy w trójwymiarowych żelach, były to komórki z linii hodowlanych lub izolowane komórki pierwotne badane pozaustrojowo. Podejście takie ma swoje zalety: powierzchnia może być pokrywana określonymi biał-

kami (BAHNSON i współaut. 2005), można też wytwarzać ściśle kontrolowane gradienty w środowisku, używając w tym celu całego szeregu specjalnie konstruowanych komór, których opisy można znaleźć w literaturze (bardziej skomplikowanych, jak opisana w pracy KOROHODA i współaut. 1997, czy też skrajnie prostych, jak te zalecane w publikacji SOON i współaut. 2005), czy wreszcie coraz popularniejsze ostatnio jednorazowe komory dostępne komercyjnie (SURANENI i współaut. 2012). Wszystkie te badania odbywają się jednak w warunkach dalece odbiegających od tych, w jakich normalnie funkcjonują komórki i pojawienie się możliwości badania ich ruchu *in vivo* daje nowe, bezprecedensowe możliwości. Śledzenie całych grup komórek w rozwijającym się organizmie może odbywać się za pomocą metod fluorescencyjnych (jak w przypadku komórek rozwijającego się mózgu *Danio* przegowanego, *Danio rerio*, znane również jako ang. zebrafish, LANGENBERG i współaut. 2006), czy z użyciem kontrastu DIC Nomarskiego (jak w badaniach wczesnego rozwoju larwy nicienia *Caenorhabditis elegans*, HEID i współaut. 2002). Niektóre z wyżej opisanych algorytmów segmentacji, używanych do śledzenia komórek, zostały już stworzone z myślą o doświadczeniach *in vivo* (XIAO i współaut. 2010).

Z drugiej strony trzeba pamiętać, że badania *in vitro* pozwalają na znacznie większą kontrolę warunków eksperymentu niż

doświadczenia *in vivo*. Najlepszym przykładem mogą być tu specjalnie projektowane podłoża, po których poruszają się komórki. Powierzchnie mogą być zarówno pokrywane trójwymiarowym wzorem przestrzennym (CURTIS i WILKINSON 1997), jak i selektywnie spłaszczane chemicznie, co tworzy ścieżki ruchu i pozwala badać chemiczną determinację ruchu i wzrostu tkanek (BRITLAND i współaut. 1996). Powierzchnie, po których poruszają się komórki mogą być również projektowane tak, by badać wpływ sztywności podłoża na ruch (SOCHOL i współaut. 2011). Bogaty przegląd tej dziedziny, zwanej z angielska „micropatterning”, można znaleźć w pracy przeglądowej autorstwa THERY (2010). Mikroskopia optyczna daje nam też szansę na badanie wpływu oświetlenia na ruch komórki, wpływu bardzo istotnego w przypadku organizmów wolnożyjących (GREBECKI i KLOPOCKA 1981). Ten ostatni przykład pokazuje również, że nieostrożnie używane, nawet tak mało inwazyjne metody jak mikroskopia świetlna, mogą prowadzić do powstawania poważnych artefaktów i błędów badawczych.

Ostatnio przełomem stało się zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego do śledzenia ruchu komórek *in vivo* (WACZIES i współaut. 2013). Mimo że MRI nie jest techniką mikroskopową, to uzyskiwane przy jego użyciu rozdzielczości zaczynają być porównywalne do tych, osiągalnych dla mikroskopii *in vivo*.

DAJCIE MI PUNKT PODPARCIA...

Archimedes niegdyś powiedział: „dajcie mi punkt podparcia, a poruszę ziemię”. Bez adhezji, tworzącej punkty podparcia dla ruchu komórki, jej przemieszczanie się byłoby niemożliwe. Dość wcześniej jednak okazało się, że zależność między ruchem a adhezją jest bardziej złożona i o tempie migracji komórki decyduje stosunek pomiędzy siłą, którą komórka jest w stanie wygenerować, a jej przyleganiem do podłoża. Co więcej, okazało się, że stosunek ten nie może być ani za duży ani za mały. Optymalne warunki do ruchu komórek powstają dla średnich wartości stosunku siła/adhezja (DIMILLA i współaut. 1991, 1993). Jednocześnie liczne dane pokazują, że tempo migracji komórek nie jest proporcjonalne do siły, którą są w stanie wygenerować, a wręcz odwrotnie: efektywna siła przenoszona na podłoża dla fibroblastów wynosi 2 μ N (HARRIS i współaut. 1980), podczas

gdzie dla rybich keratynocytów 200 nN (LEE i współaut. 1994). Jednocześnie keratynocyty poruszają się znacznie szybciej niż fibroblasty. Zjawisko odwrotnej korelacji między siłą generowaną przez skurcz komórki a jej szybkością migracji zostało opisane przez zespół Jacobsona w latach 90. ubiegłego wieku (OLIVER i współaut. 1994). Jeśli dodamy do tego obserwację, że w trakcie ruchu komórki adhezja nie jest parametrem stałym i potrafi się zmieniać w czasie (POMORSKI i współaut. 2004), to pojawia się potrzeba opracowania metody wizualizacji sił pochodzących z adhezji na poziomie mikroskopowym.

Mimo że określenie siły przylegania komórki do podłoża możliwe było od dawna, dopiero wykorzystanie przez Harrisa elastycznych substratów na przełomie lat 70. i 80. ubiegłego wieku umożliwiło badanie rozkładu sił między komórką a otoczeniem (HARRIS

i współaut. 1980). Metoda ta polega na przygotowaniu bardzo delikatnego, elastycznego podłoża, na które następnie wysiewa się komórki. Oryginalnie, Harris i współpracownicy obserwowali tworzące się pod wpływem siły wytwarzanej przez komórkę zmarszczki podłoża i z ich wielkości oraz kierunku mogli oceniać siły trakcyjne powstające między cytoszkieletem komórki a podłożem. W latach 90. ubiegłego stulecia, dzięki rozwojowi metod rejestracji obrazu i dostępności mocnych systemów obliczeniowych wykonano znaczący krok na przód. Używając nieco sztywniejszego podłoża z zatopionymi fluorescencyjnymi koralikami otrzymano macierz punktów referencyjnych, których przesunięcie było proporcjonalne do wywieranej siły. Takie podłoże podlegało kalibracji i za jego pomocą można było obliczać rozkład sił wywieranych przez komórkę i wizualizować w formie mapy (dogłębny opis metodologii obliczania sił wywieranych przez komórkę można znaleźć w fundamentalnej pracy DEMBO i współaut. 1996). Od tego czasu software służący do mapowania sił trakcyjnych komórki wciąż się rozwija i staje się przyjaźniejszy, dostępny w bezpłatnej licencji badawczej od Micaha Dembo (Biomedical Engineering, Boston University), aczkolwiek istnieją dziś rozwiązania alternatywne, np. software Xavier Trepata, pozwalający na badanie sił pod wielokomórkowymi skrawkami tkanek (SER-

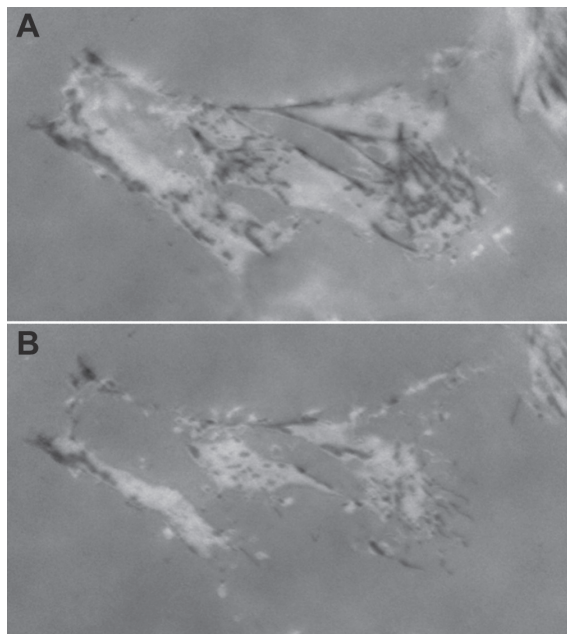
RA-PICAMAL i współaut. 2012). Rozwiązano też wiele problemów związanych z tworzeniem elastycznych podłoży, czyniąc ten proces bardziej powtarzalnym, umożliwiając pokrywanie podłoży białkami macierzy pozakomórkowej (DAMLJANOVIC i współaut. 2005). Wadą dotychczasowego podejścia do pomiaru naprężeń między podłożem a komórką była dwuwymiarowość tego pomiaru. Warstwa elastyczna była cienka, a wszystko co obserwowano, to dwuwymiarowy rzut trójwymiarowego rozkładu sił. Krokiem naprzód jest tu metodyka opisana przez grupę badaczy z CalTech, pozwalająca na trójwymiarowe obrazowanie komórek wędrujących po grubej warstwie żelu poliakrylamidowego, zawierającego zawiesinę 500 nanometrowych drobin fluorescencyjnych. Dzięki zastosowaniu tej metody autorzy byli w stanie pokazać, w których miejscach komórki „ciągną” podłoże, a w których „wpychają” je pod siebie (FRANCK i współaut. 2011). Trzeba jednak pamiętać, że mimo sukcesu w postaci trójwymiarowej wizualizacji sił, komórki wciąż przemieszczają się w dwóch wymiarach po powierzchni żelu. Do tego, by zobrazować siły pojawiające się w warunkach fizjologicznych, gdy komórki przemieszczają się w trójwymiarowej sieci macierzy zewnątrzkomórkowej, potrzebny jest jeszcze jeden jakościowy krok metodologiczny.

ZOBACZYĆ ZAMIAST MIERZYĆ. IRM I ADHEZJA KOMÓREK

Alternatywnym podejściem do przyżyciowych badań nad adhezją komórki do podłoża jest pomiar odległości pomiędzy wentralną błoną komórki a powierzchnią substratu. Taki pomiar umożliwiła wprowadzona w latach 60. ubiegłego wieku interferencyjna mikroskopia odbiciowa (od ang. interference reflection microscopy, IRM) (Ryc. 2). Technika ta jest adaptacją metody interferometrycznego pomiaru cienkich warstw dla potrzeb mikroskopii fluorescencyjnej (CURTIS 1964) i polega na interferencji monochromatycznego światła odbitego od szklanego substratu i błony komórkowej. Metoda ta pozwala na precyzyjny pomiar odległości w zakresie od 5 do 100 nm, co doskonale pozwala obrazować przyleganie komórek do podłoża. Jej podstawową zaletą jest łatwość łączenia z innymi technikami mikroskopowymi, jak na

przykład obrazowanie poziomych wolnych jonów wapnia i ich wpływy na adhezję i ruch komórek (POMORSKI i współaut. 2004). IRM może też służyć do obrazowania zdarzeń bardzo szybkich, takich jak przejściowe odklejanie się wentralnej błony komórkowej od podłoża na skutek fuzji pęcherzyków egzocytotycznych (WU i współaut. 2009). W tym ostatnim przypadku IRM jest używany w połączeniu z mikroskopią TIRF, co pokazuje, jak elastyczna jest ta technika.

Podstawową wadą IRM jest fakt, że nie jest to *sensu stricte* pomiar adhezji, a jedynie obrazowanie obszarów błony komórkowej położonych bliżej podłoża niż inne. Mimo że istnieje wiele dowodów, iż obiekty widoczne w mikroskopii interferencyjnej są zaiste strukturami adhezyjnymi (Singer pokazał to już w latach 80. ubiegłego wieku metodami mikroskopii fluorescencyj-



Ryc. 2. Obrazowanie adhezji przy użyciu mikroskopii IRM.

A: Komórki glejaka C6 na szkle. B: Te same komórki widziane po 20 minutach inkubacji w środowisku bezwapniowym. Widać rozpad struktur adhezyjnych.

nej i skaningowej mikroskopii elektronicznej, SINGER i współaut. 1989), i powszechna jest zgoda, że każda struktura adhezyjna da obraz w IRM, to nie ma powszechnego zaufania do tego, że każde zaciemnienie w obrazie IRM będzie odpowiadało strukturze adhezyjnej. Mimo oporu części recenzentów wobec określania mikroskopii interferencyjnej jako metody obrazowania adhezji komórek, wygoda tej metody, zwłaszcza w odniesieniu do dających duży kontrast

struktur takich jak kontakty zogniskowane w połączeniu z rozwojem wspierającego ją oprogramowania analizy obrazu (HOLT i współaut. 2008), powoduje, że IRM jest poręczną alternatywą wobec takich metod wykrywania struktur adhezyjnych, jak użycie fluorescencyjnych białek fuzyjnych (EVANS i współaut. 2003), która to technika jest znacznie bardziej inwazyjna i bardzo trudna do wykorzystania w przypadku linii pierwotnych.

MIKROSKOPIA STRUKTURALNA

Podczas gdy pierwsza część tej pracy miała zapoznać czytelnika z metodami mikroskopowymi, specyficznymi dla badania ruchu i adhezji komórek, to część druga jest poświęcona tym technikom obserwacyjnym i eksperymentalnym, bez których nasza współczesna wiedza o ruchu komórek by nie powstała. Nie rości sobie zatem autor pretensji do kompletności materiału, a raczej chce pokazać jak bardzo badania ruchu i adhezji komórkowej stanowią integralny fragment współczesnej biologii komórki.

Po pierwsze, musimy zdawać sobie sprawę, że najpierw trzeba było poznać strukturę i lokalizację maszynerii ruchowej komórki, by móc zrozumieć jej działanie. Mikroskopia strukturalna oddała wielkie usługi w ustaleniu budowy lamellipodium i mechanizmu jego wysuwania, podstawowego motoru napędzającego ruch większości komórek tkankowych, ujawniając rolę i miejsce dzia-

łania takich białek, jak kompleks Arp2/3 czy kofilina (SVITKINA i BORISY 1999), wspólnie podsumowanym przez POLLARDA i współaut. (2001). Bez mikroskopii strukturalnej i znakowania przeciwciałami nie znalibyśmy roli włókien naprężeniowych w ruchu i adhezji komórek, głównych struktur kurczliwych w większości komórek tkankowych (TOJKANDER i współaut. 2012). Badania z zastosowaniem mikroskopii strukturalnej położyły również podwaliny pod zrozumienie budowy i dynamiki kontaktów komórki ze środowiskiem. Prace nad dynamiką struktur adhezyjnych pokazują zalety użycia fluorescencyjnych białek fuzyjnych do badania struktur związanych z ruchem komórek. Prace z grupy Geigera na temat dojrzewania i zmian składu struktur adhezyjnych stanowią prawdziwe *tour de force* mikroskopii fluorescencyjnej (WOLFENSON i współaut. 2011, 2013).

MIKROSKOPIA 2.0 CZYLI SONDY MOLEKULARNE

Powyższy przegląd może stanowić doskonały wstęp do użycia zaawansowanej mikroskopii fluorescencyjnej nie w celu śledzenia struktury, lecz funkcji komórki. Fakt, że zjawiska ruchowe są zazwyczaj niesynchroniczne i zachodzą na poziomie pojedynczych komórek skazuje nas na użycie mikroskopu do obserwacji skutków tych zjawisk w czasie na poziomie pojedynczej komórki. Przedsmak dynamicznego obrazowania dają już prace Geigera o dojrzewaniu struktur adhezyjnych wykonane przy pomocy białek fluorescencyjnych (WOLFENSON i współaut. 2011).

Do nieinwazyjnej obserwacji funkcji w skali mikro służy kategoria wyspecjalizowanych cząsteczek zwanych sondami molekularnymi (ang. molecular probes). Pierwszym zjawiskiem badanym tą metodą w komórkach ruchliwych było stężenie wolnych jonów wapnia w cytoplazmie i jego rola w ruchliwości komórek. Grupa Jacobsona jako pierwsza pokazała, że napływ jonów wapnia ze środowiska odgrywa kluczową rolę w ruchu fibroblastów (LEE i współaut. 1999). Później pokazano, że jest to mechanizm powszechny, a napływy są periodyczne i związane z cyklem adhezji-deadhezji komórki (na monocytach człowieka, POMORSKI i współaut. 2004). Później Lee połączyła obrazowanie wapnia w komórkach keratynocytów z obrazowaniem naprężeń w podłożu (DOYLE i LEE 2005). Prace te pokazały jak można łączyć obrazowanie samego ruchu z obrazowaniem aktywności regulujących ten ruch szlaków sygnałowych.

Badanie sygnału wapniowego było oczywistym wyborem, gdyż nie tylko wiemy, że uczestniczy on w procesach związanych z kurczliwością aktomiozyny w komórkach, ale też dysponujemy szerokim spektrum doskonałych narzędzi do obrazowania poziomu wolnych jonów wapnia w roztworze (patrz POMORSKI 2012). Istnieje jednak technika mikroskopowa ułatwiająca obrazowanie wielu zjawisk sygnałowych w komórce bez konieczności konstruowania wielu osobnych sond molekularnych. Tą metodą jest mikroskopia TIRF (ang. total internal reflection microscopy). Mikroskopia TIRF oparta jest o zjawisko fali ewanescencyjnej. Ten byt kwantowy pozwala wzbudzać fluorofory w pobliżu powierzchni, na której następuje całkowite wewnętrzne odbicie światła. Wzbudzenie to następuje,

mimo że z klasycznego punktu widzenia do fluoroforu w ogóle nie dociera światło, a wydajność wzbudzenia bardzo szybko spada wraz z odległością od powierzchni odbicia. W praktyce mikroskopia TIRF pozwala wzbudzać fluorofory w odległości 100-150 nm od szkiełka, na którym umieszczamy preparat. Dziś używa się na ogół konstrukcji TIRF opartej o mikroskop epifluorescencyjny z obiektywem o dużej aperturze numerycznej (ang. numerical aperture, NA). Pozwala to wprowadzić światło do preparatu pod tak dużym kątem, że ulegnie ono całkowitemu odbiciu w szkiełku, na którym przygotowano preparat. Z punktu widzenia badań ruchu nie jest to optymalne rozwiązanie. Tak duża NA by doprowadzić do całkowitego wewnętrznego odbicia w szkle dostępna jest tylko dla obiektywów o dużych powiększeniach (60-100x), co daje małe pole widzenia i nie specjalnie nadaje się do badania ruchliwych komórek. Na szczęście istnieją alternatywne rozwiązania, pozwalające na wprowadzanie światła wzbudzającego w sposób niezależny od obiektywu mikroskopowego (aby dowiedzieć się więcej o technice TIRF patrz AXELROD 2001).

Zastosowanie mikroskopii TIRF pozwala na obserwację praktycznie samej wentralnej błony komórki. Pozwala to na przyżyciową obserwację wchodzenia białek fluorescencyjnych do błony komórkowej, co jest częstym zjawiskiem w ścieżkach sygnałowych. Pierwsze obrazowanie funkcji sygnałowej przy pomocy TIRF dotyczyło aktywności kinazy fosfatydyloinozytoli (PI3K), a jako sondy użyto domeny homologii plextrynowej kinazy Akt koniugowanej z białkiem fluorescencyjnym. Domena ta ma zdolność wchodzenia do błony, gdy jest ona bogata w trifosforan fosfatydyloinozytoli (PIP₃), produkt PI3K. Wejście białka fluorescencyjnego do błony było obrazowane w mikroskopie TIRF przez WEIGERA i współaut. (2009). Sukces tej pracy skłonił do kontynuacji prac, pokazując działanie sygnałowania od PI3K w chemotaksji fibroblastów (MELVIN i współaut. 2011), by w końcu opracować model obliczeniowy pozwalający przewidzieć kierunek ruchu na podstawie obrazu rozkładu aktywności kinazy fosfatydyloinozytoli w błonie (WELF i współaut. 2012). Te pierwsze wyniki są niezwykle obiecujące, jeśli uświadomimy sobie, że najważniejsze białka sygnałowe, regulujące ruch

komórki (małe białka G: Rac1, RhoA i cdc42), w trakcie aktywacji ulegają przemieszczeniu z cytoplazmy do błony komórkowej. Pozwala to

przypuszczać, że prędzej czy później będziemy mogli „ogłądać” obraz aktywności sygnałowej regulującej ruch obserwowanej komórki.

EKSPERYMENT W MIKRO SKALI

To, co opisaliśmy powyżej, to były bardziej lub mniej skomplikowane obserwacje. Biologia jest jednak nauką doświadczalną i sama obserwacja przyrody nie wystarczy, by ją zrozumieć. Wiele prac doświadczalnych z dziedziny ruchu komórek używa makroskopowej perturbacji i jedynie śledzi jej mikroskopowe skutki, nie znaczy to jednak, że nie pojawiają się ściśle mikroskopowe techniki doświadczalne, pozwalające na dokonywanie eksperymentów na poziomie komórkowym.

FOTOAKTYWACJA

Fotoaktywacja wymaga przygotowania związku, który będzie fotoaktywowany i wprowadzenia go do komórki. Białko do fotoaktywacji przygotowuje się przez jego reakcję z foto-niestabilnymi grupami bocznymi, które maskują jego naturalne własności, tworząc związek zwany po angielsku „caged”. Do takich reakcji używa się na przykład NVOC (chloromrówczan 6-nitroveratrylu), który rozpada się pod wpływem światła UV 360 nm. Przykładem użycia w badaniach związków fotoaktywowanych może być praca z grupy Jacobsona, w której fotoaktywacji ulegała tymozyna b4 (Tb4), białko silnie buforujące monomery aktyny. Tb4 unieczynniona przez NVOC była wstrzykiwana do keratynocytów,

a następnie komórki lokalnie oświetlano laserem UV. NVOC ulegał fotolizie, uwalniając Tb4, a ta z kolei prowadziła do lokalnej depolimeryzacji aktyny. W odpowiedzi komórki zakreślały, obracając się wokół oświetlonego rejonu (ROY i współaut. 2001).

Eksperymenty przy pomocy fotoaktywacji mogą dotyczyć także związków drobnocząsteczkowych, czego przykładem jest NP-EG-TA, foto-niestabilny chelator wapnia. W tym wypadku lokalne oświetlenie komórki może wywołać lokalne uwolnienie wolnych jonów wapnia (BROWN i współaut. 1999). Fotochemia związków fotolabilnych w biologii jest omówiona szerzej w pracy przeglądowej LEE i współaut. (2009).

CALI¹ CZYLI FOTODEZAKTYWACJA

Odwrotnością fotoaktywacji jest dezaktywacja cząsteczek skoniugowanych z fluoroforem przy pomocy światła lasera. Rajfur udowodnił, że tą metodą można przecinać pojedyncze włókna naprężeniowe inkrustowane α -aktyniną koniugowaną z GFP (RAJFUR i współaut. 2002). Szerszy przegląd zastosowań fotodezaktywacji w biologii komórki można znaleźć w pracy JACOBSONA i współaut. (2008).

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Powyższy przegląd jest oczywiście niekompletny i arbitralny. Badania ruchu i adhezji komórek stanowią integralny fragment biologii komórki i nie można wytyczyć jasnej granicy, gdzie zaczyna się badanie adhezji, a kończy badanie organogenezy. W badaniach ruchu i adhezji używa się całego spektrum metodologii biochemicznej, biofizycznej i biologicznej. Mikroskopia nie jest jedyną techniką wykorzystywaną do tych badań i nigdy nie będzie, jakkolwiek wielkie by były postępy tej technologii. Zawsze jednak mikroskop będzie podstawowym i niezbędnym narzędziem badacza ruchu pojedynczych komórek.

Wybiegając w przyszłość trzeba podkreślić, że wciąż mało wiemy na temat funkcjonowania poznanych mechanizmów w trójwymiarowym świecie organów i tkanek. Ten kierunek na pewno będzie się rozwijał dynamicznie, wraz z rozwojem mikroskopii konfokalnej i wzrostem dostępności tej techniki dla biologów komórki. W badaniach ruchu *in vivo* coraz większą rolę będzie odgrywała mikroskopia dwufotonowa, w dużym stopniu dzięki wykorzystaniu w niej światła podczerwonego, mniej fototoksycznego niż światło zakresu widzialnego, pozwalająca jednocześnie zagłądać dalej w

¹CALI – (ang.) Chromophore-Assisted Light Inactivation

głąb organów, tkanek czy też całych organizmów.

Badania *in vivo* stawiają wiele nowych wyzwań i można się spodziewać wykorzystania w badaniach ruchu komórek takich metod jak optogenetyka czy fotoaktywacja siRNA w organizmie. Nie będą to jednak w żadnym razie metody specyficzne dla badań nad ruchem i adhezją. Podobnie, wiele badania te będą zawdzięczać możliwemu rozwojowi sond molekularnych, tworzonych do pomiaru aktywności ścieżek sygnałowych, i można mieć nadzieję, że tu inicjatywa wyjdzie

ze środowiska badaczy ruchu z wielkim pożytkiem dla reszty biologii komórki.

Jak wynika z tego krótkiego podsumowania, perspektywy badań ruchu i adhezji komórek są ekscytujące i na pewno ta dziedzina będzie się aktywnie rozwijać. Musimy przecież pamiętać, że od rozwoju embrionalnego osobników, przez komórki układu odpornościowego czy wreszcie metastazujące komórki nowotworowe, nasze organizmy są wciąż pełne pracowicie przemierzających je małych wędrowców, zdążających dokądś dla naszego pożytku czy też na naszą zgubę.

RUCH POD MIKROSKOPEM – WSPÓŁCZESNE TECHNIKI BADANIA ADHEZJI I RUCHLIWOŚCI KOMÓREK

Streszczenie

Ruch komórek jest jedną z ich fundamentalnych cech. To dzięki niemu organizm może się rozwijać, układ odpornościowy działać, organy regenerować, a rany goić się. Badanie mechanizmów ruchu jest jednak jedną z trudniejszych metodycznie dziedzin biologii komórki. Procesy biochemiczne zachodzą bowiem w ruchliwych komórkach niesynchronicznie, a często takich komórek jest niewiele. Niniejszy artykuł poświęcono metodom mikroskopowym stworzonym by rozwiązać ten problem. Omawiane

są metody pomiaru parametrów ruchu i adhezji do podłoża. Omawiane są również podstawy zastosowania klasycznych metod mikroskopowych do badania procesów ruchowych. Pokrótce wspominamy też o wykorzystaniu sond molekularnych do badania procesów sygnalizacji w komórkach ruchliwych, a także o mikroskopowych metodach eksperymentalnych, umożliwiających doświadczenia na pojedynczych komórkach.

MOTION UNDER THE MICROSCOPE – MODERN TECHNIQUES FOR STUDYING CELL ADHESION AND MOTILITY

Summary

Ability to move is one of the fundamental functions of the living cells. It is due to the motility that organism develops, immune system can work, organs are able to regenerate and wound heal. In the same time motility studies are among methodologically most difficult ones. Biochemical processes underlying motility are notoriously unsynchronized and motile cells are usually not very numerous. Current paper reviews microscope techniques de-

veloped to solve those problems. We discuss basic measurements, parameterizing motility and substratum adhesion. Classical, structural microscopy used for motility studies are also sketched shortly. We describe also use of molecular probes for signaling studies in motile cells as well as we mention about microscopic experimental techniques, allowing experiments on single cells.

LITERATURA

- AXELROD D., 2001. *Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology*. Traffic 2, 764–774.
- BAHNSON A., ATHANASSIOU C., KOEBLER D., QIAN L., SHUN T., SHIELDS D., YU H., WANG H., GOFF J., CHENG T., HOUCK R., COWSERT L., 2005. *Automated measurement of cell motility and proliferation*. BMC Cell Biol. 6, 19.
- BRITLAND S., MORGAN H., WOJIAK-STODART B., RIEHLE M., CURTIS A., WILKINSON C., 1996. *Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells*. Exp. Cell Res. 228, 313–325.
- BROWN E. B., SHEAR J. B., ADAMS S. R., TSIEN R. Y., WEBB W. W., 1999. *Photolysis of caged calcium in femtoliter volumes using two-photon excitation*. Biophys. J. 76, 489–499.
- CODLING E. A., PLANK M. J., BENHAMOU S., 2008. *Random walk models in biology*. J. R. Soc. Interface 5, 813–834.
- CURTIS A. S., 1964. *The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy*. J. Cell Biol. 20, 199–215.
- CURTIS A., WILKINSON C., 1997. *Topographical control of cells*. Biomaterials 18, 1573–1583.
- DAMLJANOVIC V., LAGERHOLM B. C., JACOBSON K., 2005. *Bulk and micropatterned conjugation of extracellular matrix proteins to characterized polyacrylamide substrates for cell mechanotransduction assays*. Biotechniques 39, 847–851.

- DAVIDSON M., ABRAMOWITZ M., 2002. *Optical microscopy*. [W] *Encyclopedia of imaging science and technology*. HORNACK J. (red.). Wiley-Interscience, New York, 1106–1141.
- DEMO M., OLIVER T., ISHIHARA A., JACOBSON K., 1996. *Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method*. *Biophys. J.* 70, 2008–2022.
- DICKINSON R. B., TRANQUILLO R. T., 1993. *Optimal estimation of cell movement indices from the statistical analysis of cell tracking data*. *AICHE J.* 39, 1995–2010.
- DIMILLA P. A., BARBEE K., LAUFFENBURGER D. A., 1991. *Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed*. *Biophys. J.* 60, 15–37.
- DIMILLA P. A., STONE J. A., QUINN J. A., ALBELDA S. M., LAUFFENBURGER D. A., 1993. *Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength*. *J. Cell Biol.* 122, 729–737.
- DOYLE A. D., LEE J., 2005. *Cyclic changes in keratocyte speed and traction stress arise from Ca²⁺-dependent regulation of cell adhesiveness*. *J. Cell Sci.* 118, 369–379.
- EVANS J. G., CORREIA I., KRASAVINA O., WATSON N., MATSUDAIRA P., 2003. *Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation*. *J. Cell Biol.* 161, 697–705.
- FRANCK C., MASKARINEC S. A., TIRRELL D. A., RAVICHANDRAN G., 2011. *Three-dimensional traction force microscopy: a new tool for quantifying cell-matrix interactions*. *PLoS One* 6, e17833.
- FRIEDL P., NOBLE P. B., ZANKER K. S., 1993. *Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories*. *J. Immunol. Methods* 165, 157–165.
- GREBECKI A., KLOPOCKA W., 1981. *Functional interdependence of pseudopodia in Amoeba proteus stimulated by light-shade difference*. *J. Cell Sci.* 50, 245–258.
- HAMAHASHI S., ONAMI S., KITANO H., 2005. *Detection of nuclei in 4D Nomarski DIC microscope images of early Caenorhabditis elegans embryos using local image entropy and object tracking*. *BMC Bioinform.* 6, 125.
- HARRIS A. K., WILD P., STOPAK D., 1980. *Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion*. *Science* 208, 177–179.
- HEID P. J., VOSS E., SOLL D. R., 2002. *3D-DIASemb: a computer-assisted system for reconstructing and motion analyzing in 4D every cell and nucleus in a developing embryo*. *Dev. Biol.* 245, 329–347.
- HOLT M. R., CALLE Y., SUTTON D. H., CRITCHLEY D. R., JONES G. E., DUNN G. A., 2008. *Quantifying cell-matrix adhesion dynamics in living cells using interference reflection microscopy*. *J. Microsc.* 232, 73–81.
- JACOBSON K., RAJFUR Z., VITRIOL E., HAHN K., 2008. *Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology*. *Trends Cell Biol.* 18, 443–450.
- KOROHODA W., GOLDA J., SROKA J., WOJNAROWICZ A., JOCHYM P., MADEJA Z., 1997. *Chemotaxis of Amoeba proteus in the developing pH gradient within a pocket-like chamber studied with the computer assisted method*. *Cell Motil. Cytoskel.* 38, 38–53.
- LANGENBERG T., DRACZ T., OATES A. C., HEISENBERG C. P., BRAND M., 2006. *Analysis and visualization of cell movement in the developing zebrafish brain*. *Dev. Dyn.* 235, 928–933.
- LEE H. M., LARSON D. R., LAWRENCE D. S., 2009. *Illuminating the chemistry of life: design, synthesis, and applications of “caged” and related photo-responsive compounds*. *ACS Chem. Biol.* 4, 409–427.
- LEE J., LEONARD M., OLIVER T., ISHIHARA A., JACOBSON K., 1994. *Traction forces generated by locomoting keratocytes*. *J. Cell Biol.* 127, 1957–1964.
- LEE J., ISHIHARA A., OXFORD G., JOHNSON B., JACOBSON K., 1999. *Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels*. *Nature* 400, 382–386.
- MELVIN A. T., WELF E. S., WANG Y., IRVINE D. J., HAUGH J. M., 2011. *In chemotaxing fibroblasts, both high-fidelity and weakly biased cell movements track the localization of PI3K signaling*. *Biophys. J.* 100, 1893–1901.
- OLIVER T., LEE J., JACOBSON K., 1994. *Forces exerted by locomoting cells*. *Semin. Cell Biol.* 5, 139–147.
- PARTIN A. W., SCHOENIGER J. S., MOHLER J. L., COFFEY D. S., 1989. *Fourier analysis of cell motility: correlation of motility with metastatic potential*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1254–1258.
- PATLAK C. S., 1953. *Random walk with persistence and external bias*. *Bull. Math. Biophys.* 15, 311–338.
- PEARSON K., 1905. *The problem of the random walk*. *Nature* 72, 294.
- PLETJUSHKINA O. J., RAJFUR Z., POMORSKI P., OLIVER T. N., VASILIEV J. M., JACOBSON K. A., 2001. *Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules*. *Cell Motil. Cytoskel.* 48, 235–244.
- PLUTA M., 1982. *Mikroskopia optyczna*. PWN, Warszawa.
- POLLARD T. D., BLANCHON L., MULLINS R. D., 2001. *Actin dynamics*. *J. Cell Sci.* 114, 3–4.
- POMORSKI P., 2012. *Zobaczyć sygnał – metody obrazowania zmian stężenia jonów wapnia w komórce*. *Postepy Biochem.* 58, 465–473.
- POMORSKI P., WATSON J. M., HASKILL S., JACOBSON K. A., 2004. *How adhesion, migration, and cytoplasmic calcium transients influence interleukin-1beta mRNA stabilization in human monocytes*. *Cell Motil. Cytoskel.* 57, 143–157.
- RAJFUR Z., ROY P., OTEY C., ROMER L., JACOBSON K., 2002. *Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins*. *Nat. Cell Biol.* 4, 286–293.
- ROY P., RAJFUR Z., JONES D., MARRIOTT G., LOEW L., JACOBSON K., 2001. *Local photorelease of caged thymosin beta4 in locomoting keratocytes causes cell turning*. *J. Cell Biol.* 153, 1035–1048.
- SERRA-PICAMAL X., CONTE V., VINCENT R., ANON E., TAMBE D. T., BAZELLIERES E., BUTLER J. P., FREDBERG J. J., TREPAT X., 2012. *Mechanical waves during tissue expansion*. *Nature Physics* 8, 628–634.
- SINGER I. I., KAZAZIS D. M., SCOTT S., 1989. *Scanning electron microscopy of focal contacts on the substratum attachment surface of fibroblasts adherent to fibronectin*. *J. Cell Sci.* 93, 147–154.
- SOCHOL R. D., HIGA A. T., JANAIRO R. R. R., LIB S., LINA L., 2011. *Unidirectional mechanical cellular stimuli via micropost array gradients*. *Soft Matter* 7, 4606–4609.
- SOLL D. R., VOSS E., 1998. *Two and three-dimensional computer systems for analyzing how cells crawl*. [W] *Motion Analysis of Living Cells*. SOLL D. R., WESSELS D. (red.). Wiley-Liss, New York, 25–52.
- SOLL D. R., VOSS E., JOHNSON O., WESSELS D., 2000. *Three-dimensional reconstruction and motion analysis of living, crawling cells*. *Scanning* 22, 249–257.
- SOON L., MOUNEIMNE G., SEGALL J., WYCKOFF J., CONDEELIS J., 2005. *Description and characterization of a chamber for viewing and quantifying cancer cell chemotaxis*. *Cell Motil. Cytoskel.* 62, 27–34.

- SURANENI P., RUBINSTEIN B., UNRUH J. R., DURNIN M., HANEIN D., LI R., 2012. *The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration*. J. Cell Biol. 197, 239–251.
- SVITKINA T. M., BORISY G. G., 1999. *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia*. J. Cell Biol. 145, 1009–1026.
- THERY M., 2010. *Micro patterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions*. J. Cell Sci. 123, 4201–4213.
- TOJKANDER S., GATEVA G., LAPPALAINEN P., 2012. *Actin stress fibers-assembly, dynamics and biological roles*. J. Cell Sci. 125, 1855–1864.
- WAICZIES H., GUENTHER M., SKODOWSKI J., LEPORE S., POHLMANN A., NIENDORF T., WAICZIES S., 2013. *Monitoring dendritic cell migration using 19F/1H magnetic resonance imaging*. J. Vis. Exp. e50251.
- WEIGER M. C., WANG C. C., KRAJCOVIC M., MELVIN A. T., RHODEN J. J., HAUGH J. M., 2009. *Spontaneous phosphoinositide 3-kinase signaling dynamics drive spreading and random migration of fibroblasts*. J. Cell Sci. 122, 313–323.
- WELF E. S., AHMED S., JOHNSON H. E., MELVIN A. T., HAUGH J. M., 2012. *Migrating fibroblasts reorient directionality by a metastable, PI3K-dependent mechanism*. J. Cell Biol. 197, 105–114.
- WOLFENSON H., BERSHADSKY A., HENIS Y. I., GEIGER B., 2011. *Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions*. J. Cell Sci. 124, 1425–1432.
- WOLFENSON H., LAVELIN I., GEIGER B., 2013. *Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions*. Dev. Cell 24, 447–458.
- WU M. M., LLOBET A., LAGNADO L., 2009. *Loose coupling between calcium channels and sites of exocytosis in chromaffin cells*. J. Physiol. 587, 5377–5391.
- XIAO H., LI Y., DU J., MOSIG A., 2010. *Ct3d: tracking microglia motility in 3D using a novel cosegmentation approach*. Bioinformatics 27, 564–571.