

CZĘŚĆ I

Załącznik 3

AUTOREFERAT

Dr Zenon Rajfur

Instytut Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytet Jagielloński

ul. Reymonta 4

30-059 Kraków

Kraków 2013

SPIS TREŚCI

1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego
2. Prezentacja osiągnięć, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
 - 2.1. Wprowadzenie
 - 2.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego w porządku chronologicznym
 - 2.3. Najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
 - 2.4. Zwięzła prezentacja wyników stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
 - 2.4.1. Wprowadzenie
 - 2.4.2. Zwięzły opis procesu migracji komórkowej
 - 2.4.3. Mikroskopia optyczna w badaniach procesów komórkowych
 - 2.4.4. Zastosowanie metody laserowej inaktywacji białek wspomaganej przez chromofor (ang. *Chromophore Assisted Laser Inactivation – CALI*)
 - 2.4.5. Zastosowanie metody fotoaktywacji białek inaktywowanych przez związane molekuly „klatkujące” (ang. *caged compounds method*)
 - 2.4.6. Metoda fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. *Total Internal Reflection Fluorescence – TIRF*) w badaniach roli procesu fosforylacji paksyliny przez kinazę N-kończową białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinase - JNK*) w procesie migracji komórek NBTII
3. Osiągnięcia naukowe niezwiązane z tematyką badań, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
 - 3.1. Spontaniczne i indukowane oscylacje komórkowe
 - 3.2. Mikroskopia biosensorów FRET (ang. *Fluorescence/Forster Resonance Energy Transfer*)
 - 3.3. Pomiary trakcji komórkowych
4. Dalsze plany badawcze
5. Współpraca naukowa
6. Udział w projektach badawczych jako wykonawca lub główny wykonawca

7. Udział w konferencjach naukowych

7.1. Konferencje krajowe

7.2. Konferencje zagraniczne

7.3. Referaty wygłoszone na zaproszenie przez organizatorów

8. Literatura

1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego.

Studia magisterskie z fizyki ukończyłem w 1984 roku na Wydziale Matematyki i Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego obroną pracy magisterskiej zatytułowanej „Powielacze elektronowe w detekcji i identyfikacji cząstek”. W lutym 1985 roku otrzymałem etat asystenta w Zakładzie Fizyki Ciała Stałego i Biofizyki Instytutu Fizyki w ówczesnej Wyższej Szkole Pedagogicznej im. Komisji Edukacji Narodowej (aktualnie Uniwersytet Pedagogiczny) w Krakowie. Badania naukowe prowadziłem w grupie biofizycznej prof. dr hab. Janusza Sławińskiego, jednego z pionierów badań spontanicznej i indukowanej luminescencji układów biologicznych, nazywanych także ultrasłabą luminescencją (USL) bądź chemiluminescencją (CL). Dało to początek mojemu naukowemu zainteresowaniu się zastosowaniem nieinwazyjnych metod optycznych do badania układów biologicznych. Podstawowym tematem moich prac w tym okresie było określenie wpływu czynników środowiskowych na mechanizmy i parametry indukowanej i spontanicznej luminescencji z różnych systemów biologicznych, między innymi komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, komórek nowotworowych i komórek plemnikowych. W cyklu opublikowanych prac pokazaliśmy, że emisja spontaniczna oraz indukowana luminescencja są powiązane ze stanem oraz wielkością zaburzenia homeostazy badanych układów biologicznych (Ezzahir, Godlewski et al. 1990; Godlewski, Rajfur et al. 1990; Ezzahir, Rajfur et al. 1991; Ezzahir, Godlewski et al. 1992; Sławinski, Ezzahir et al. 1992; Godlewski, Rajfur et al. 1993; Rajfur 1993). Wyniki tych prac stanowiły podstawę eksperymentalną mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej „*Ultrasłaba luminescencja komórek drożdży Saccharomyces cerevisiae indukowana formaldehydem*”, którą obroniłem z wyróżnieniem w 1993 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, uzyskując stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii. W momencie uzyskania stopnia doktora byłem autorem lub współautorem 14 publikacji o sumarycznym IF 4,703. Doświadczenia zdobyte w okresie wykonywania pracy doktorskiej uzmysłowiły mi potencjalne możliwości poznawcze jakie dają w biologii metody optyczne i to zasadniczo określiło przebieg mojej kariery naukowej do chwili obecnej.

Jeszcze w trakcie wykonywania pracy doktorskiej w 1991 roku otrzymałem 9-miesięczne stypendium naukowe (*Research Fellowship*) finansowane przez Unię Europejską na odbycie stażu naukowego w Istituto di Fisica dell'Università di Catania we Włoszech. Głównym tematem, którym się wtedy zająłem było określenie korelacji między podstawowymi procesami życiowymi nasion, takich jak absorpcja wody oraz kiełkowanie, z parametrami spontanicznej ultrasłabej luminescencji w różnych temperaturach otoczenia. Badania prowadziłem przy wykorzystaniu dedykowanego zautomatyzowanego układu pomiarowego, który w tym celu tam zaprojektowałem i zbudowałem. Głównym wynikiem badań było wykazanie, że natężenie i kinetyka spontanicznej emisji fotonowej są skorelowane z żywotnością i zdolnością kiełkowania nasion soi oraz że metoda ta może być użytecznym narzędziem do selekcji najlepiej kiełkujących nasion (Triglia, Grasso et al. 1993). Badania w Katanii kontynuowałem w 1994 roku (5 miesięcy) dzięki otrzymanemu stypendium Unii

Europejskiej dla zaawansowanych badaczy (*Senior Research Fellowship*). Efektem tego pobytu było opracowanie metody wykorzystującej efekt opóźnionej indukowanej luminescencji z glonów *Acetabularia acetabulum* do detekcji obecności w wodzie cząsteczek atrazyny, jednego z popularnie stosowanych herbicydów (Scordino, Triglia et al. 1996). Wykazaliśmy, że śladowe ilości tego herbicydu, nawet w nanomolowej koncentracji, zmieniają parametry kinetyki fotoindukowanej luminescencji tego glonu. Było to jedno z pierwszych na świecie przykładów zastosowania układu biologicznego jako tzw. bioczuJNIka (biosensora) do wykrywania obecności czynników szkodliwych w środowisku naturalnym. Praca ta doczekała się już 42 cytowań (*Web of Science* 18-06-2013).

Równolegle do współpracy z grupą w Katanii kontynuowałem badania nad wpływem środowiskowych czynników stresogennych, głównie światła, temperatury oraz czynników chemicznych na mechanizmy i parametry ultrasłabej luminescencji z układów biologicznych poddanych ich działaniu. Rezultatem tych badań były 3 publikacje (Rajfur 1994; Godlewski, Rajfur et al. 1995; Godlewski, Kwiecinska et al. 1997).

Do tego spektrum projektów naukowych zaliczam również badania prowadzone we współpracy z Instytutem Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie-Balicach nad wykorzystaniem metody pomiaru parametrów spontanicznej i indukowanej USL do określania jakości nasienia zwierząt gospodarskich - buhajów, tryków i knurów - w stanie natywnym oraz po przejściu procesu kriokonserwacji. Badania te zaowocowały serią publikacji oraz doniesień konferencyjnych (Ezzahir, Kwiecińska et al. 1992; Laszczka, Ezzahir et al. 1993; Godlewski, Rajfur et al. 1995; Godlewski, Rajfur et al. 1995; Laszczka, Godlewski et al. 1995; Rajfur, Godlewski et al. 1995; Godlewski, Kwiecinska et al. 1997; Godlewski, Kwiecińska et al. 1997; Gumińska, Kędryna et al. 1997). W pracach tych pokazano, że intensywność i kinetyka USL - fotoindukowanej oraz indukowanej żelazem Fe(II) - mogą być wskaźnikiem jakości nasienia na poszczególnych etapach kriokonserwacji. Pokazano także że źródłem USL jest peroksydacja błon lipidowych nasienia występująca podczas procesów kriokonserwacji i następnie rozmrażania. Łącznie w tym okresie (1994-1997) byłem autorem lub współautorem 11 publikacji o sumarycznym IF 3,554.

W 1995 roku wygrałem konkurs na staż podoktorski w grupie prof. Karen Schaich z Department of Food Science, Rutgers-The State University of New Jersey, (USA). Realizowałem tam projekt mający na celu zastosowanie metod pomiaru spontanicznej i indukowanej USL do detekcji wczesnych produktów utleniania lipidów w próbkach żywności. Głównym osiągnięciem naukowym tego projektu było zbudowanie dedykowanego systemu do pomiarów spektralnych USL ze stałych i ciekłych próbek żywnościowych oraz opracowanie metodyki pomiaru USL produktów żywnościowych. System ten jest w dalszym ciągu w ciągłym użyciu w laboratorium prof. Karen Schaich. Projekt ten był finansowany przez US Department of Defense.

Jeszcze przed zakończeniem mojego pobytu w Rutgers University, otrzymałem propozycję współpracy od prof. Kennetha Jacobsona z Department of Cell Biology and Anatomy (obecnie Department of Cell and Developmental Biology) University of North Carolina at Chapel Hill w Chapel Hill, NC (USA). W jego zespole pracowałem w okresie od

1998 do 2011 roku sukcesywnie awansując do pozycji Research Assistant Professor (2002-2011). W ramach realizowanych tam projektów badawczych począwszy od 2001 roku uczestniczyłem jako wykonawca w grantie konsorcyjnym Cell Migration Consortium (www.cellmigration.org) fundowanym przez National Institutes of Health, Bethesda, MD, (USA). Głównym kierunkiem mojej pracy naukowej był rozwój zaawansowanych metod mikroskopii optycznej i ich zastosowanie w badaniach molekularnych mechanizmów procesów migracji komórek. Miałem bardzo istotny wkład w rozwój metody optycznej inaktywacji molekuł biologicznych tzw. *Chromophore Assisted Laser Inactivation (CALI)* (Rajfur, Roy et al. 2002; Roy, Rajfur et al. 2002; Jacobson, Rajfur et al. 2008; McLean, Rajfur et al. 2009), fotoaktywacji „klatkowanych” składników (ang. *caged compounds*) (Roy, Rajfur et al. 2001; Roy, Rajfur et al. 2002; Humphrey, Rajfur et al. 2005), metody pomiarów trakcji komórkowych z wykorzystaniem elastycznego podłoża oraz nad opracowaniem nowych genetycznych biosensorów aktywacji lub wzajemnych oddziaływań molekuł bazujących na wykorzystaniu bezpromienistego transferu energii – FRET - pomiędzy molekułami białek fluorescencyjnych (Cai, Lietha et al. 2008). Równolegle uczestniczyłem także w pracach eksperymentalnych i teoretycznych nad opracowaniem nowego podejścia do modelowania matematycznego procesów regulujących funkcje biologiczne komórki (tzw. podejście „gruboziarniste” (ang. *coarse-grain approach*)) (Pletjushkina, Rajfur et al. 2001; Kapustina, Weinreb et al. 2008; Costigliola, Kapustina et al. 2010). Prace te i osiągnięcia badawcze tego okresu są dokładniej omówione w dalszych rozdziałach mojego autoreferatu. Mój dorobek naukowy z tego okresu zawiera 21 publikacji w tym 2 artykuły przeglądowe, 1 rozdział w książce oraz 3 rozdziały w podręcznikach laboratoryjnych. Sumaryczny IF tych publikacji wynosi 165,822. Prace te były cytowane 836 razy (*Web of Science 18-06-2013*).

Krótko po zakończeniu grantu konsorcyjnego National Institutes of Health - Cell Migration Consortium powróciłem do Polski z zamiarem kontynuacji badań prowadzonych przeze mnie w Uniwersytecie Północnej Karoliny w Chapel Hill oraz przeniesienia zdobytych doświadczeń naukowych do laboratorium naukowego w Polsce. W marcu 2012 roku wygrałem konkurs na stanowisko adiunkta w Instytucie Fizyki na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego gdzie kontynuuję moje badania naukowe.

Podsumowując, mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 46 publikacji w tym 1 rozdział w książce oraz 3 rozdziały w podręcznikach laboratoryjnych. Sumaryczny dotychczasowy IF moich publikacji to 174,079. Prace te były cytowane 891 razy (bez cytowań własnych) w tym 14 prac powyżej 20 cytowań (indeks Hirscha 14) (*Web of Science 18-06-2013*).

W dalszej części mojego autoreferatu przedstawiam publikacje będące podstawą postępowania habilitacyjnego, a następnie publikacje oraz inne osiągnięcia badawcze powstałe jako rezultat odrębnych, ale istotnych dla mojego rozwoju naukowego kierunków badawczych.

2. Prezentacja osiągnięć naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

2.1. Wprowadzenie

Jednotematyczny cykl siedmiu publikacji prezentowany jako podstawa postępowania habilitacyjnego zatytułowany:

„Zaawansowane metody mikroskopii optycznej w badaniach procesów migracji komórkowej ”

powstał w większości podczas realizacji grantu konsorcyjnego Cell Migration Consortium finansowanego przez National Institutes of Health, Bethesda, MD (USA) w latach 2001-2011. W części prac jestem pierwszym autorem lub pierwszym współautorem, w pozostałych miałem wkład równy innym autorom (prace przeglądowe) lub znaczący wkład eksperymentalny i intelektualny, co zostało potwierdzone przez złożone oświadczenia współautorów.

Cykl publikacji stanowiący podstawę postępowania habilitacyjnego obejmuje 5 prac doświadczalnych przedstawiających:

- (1) rozwój i zastosowanie metody laserowej inaktywacji wspomaganej przez chromofor (ang. *Chromophore Assisted Laser Inactivation - CALI*) białka strukturalnego alfa-aktyniny w komórkach fibroblastów oraz zbadanie mechanizmów fotofizycznych odpowiedzialnych za występowanie efektu inaktywacji;
- (2) rozwój i zastosowanie metody fotoaktywacji białek uprzednio inaktywowanych przez związane molekuly tzw. molekuly „klatkowane” (ang. *caged compounds method*):
 - (a) do wyznaczenia roli tymozyny $\beta 4$ w procesie migracji rybich keratynocytów,
 - (b) do zbadania roli syntetycznego peptydu składającego się z aminokwasów 391-406 ludzkiej kinazy ogniskowo-adhezyjnej (ang. *Focal Adhesion Kinase – FAK*) z fosforylowaną tyrozyną 397 w procesach migracji komórek NBTII (Nara Bladder Tumor II, (Tucker, Boyer et al. 1990));
- (3) zastosowanie metody fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. *Total Internal Reflection Fluorescence – TIRF*) do zbadania roli procesu fosforylacji paksyliny przez kinazę N-kończową białka c-Jun (ang. *c-jun N-terminal kinase - JNK*) w procesie migracji komórek NBTII;

oraz 2 prace przeglądowe zawierające wyniki naszych prac eksperymentalnych ukazane w szerokim kontekście wykorzystania zaawansowanych metod mikroskopii optycznej w badaniach mechanizmów migracji komórkowej.

Publikacje przedstawione jako podstawa postępowania habilitacyjnego zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się na tzw. Liście Filadelfijskiej o sumarycznym IF=104,917.

2.2. Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego w porządku chronologicznym

1. Roy P., **Rajfur Z.**, Jones D., Marriott G. Loew L. and Jacobson K. (2001). "Local photorelease of caged thymosin β 4 in locomoting keratocytes causes cell turning". Journal of Cell Biology, 153:1035-1048 **IF=12.915**
2. **Rajfur Z.**, Roy P., Otey C., Romer L. and Jacobson K. (2002). "Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins". Nature Cell Biology, 4(4): 286-293 **IF=18.285**
3. Roy P., **Rajfur Z.**, Pomorski P. and Jacobson K. (2002). "Microscope-based techniques to study cell adhesion and migration". Nature Cell Biology, 4(4):. E91-E96 **IF=18.285**
4. Huang C., **Rajfur Z.**, Borchers C., Schaller M.D., and Jacobson K. (2003). "JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration". Nature, 424: 219-223 **IF=30.979**
5. Humphrey D., **Rajfur Z.**, Vazquez M.E., Scheswohl D., Schaller M.D., Jacobson K. and Imperiali B. (2005) "In situ photoactivation of a caged phosphotyrosine peptide derived from Focal Adhesion Kinase temporarily halts lamellar extension of single migrating tumor cells". Journal of Biological Chemistry, 280(23): 22091-101 **IF=5.854**
6. Jacobson K., **Rajfur Z.**, Vitriol E. and Hahn K. (2008). "Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology". Trends in Cell Biology, 18(9): 443-50 **IF=13.385**
7. McLean M.A., **Rajfur Z.**, Chen Z., Humphrey D., Yang B., Sligar S.G., Jacobson K. (2009). "Mechanism of chromophore assisted laser inactivation employing fluorescent proteins". Analytical Chemistry, 81(5): 1755-1761 **IF=5.214**

2.3. Najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z cyklu publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

- pierwsza praca eksperymentalna wykazująca, że ulepszone zielone białko fluorescencyjne (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein - EGFP*) może być wykorzystane *in vivo* jako czynnik obrazujący lokalizację białek

rekombinacyjnych oraz jednocześnie jako mediator do fotoinaktywacji tych białek (2);

- wykazanie, że białko alfa-aktynina-1 jest składnikiem kompleksu wiążącego aktywne włókna naprężeniowe z kontaktami zogniskowanymi występującymi w komórkach fibroblastów (2);
- wykazanie, że aktywne wolne rodniki tlenowe, a zwłaszcza tlen singletowy O_2^- , są tworzone podczas procesu naświetlania białek fluorescencyjnych oraz że są one odpowiedzialne za inaktywację białek rekombinacyjnych zawierających domenę fluorescencyjną (7);
- zwarte przedstawienie w pracy przeglądowej zaawansowanych, optycznych technik fotomanipulacyjnych, CALI i fotoaktywacji molekuł „klatkowanych”, w kontekście innych zaawansowanych mikroskopowych technik optycznych takich jak FRET, FRAP (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*), fluorescencyjnych technik ratiometrycznych oraz technik pomiaru trakcji komórkowych (3);
- obszerna analiza rozwoju i zastosowań techniki laserowej inaktywacji wspomaganej przez chromofor (*CALI*) w pracy przeglądowej (6);
- zastosowanie techniki fotoaktywacji białek „klatkowanych” (ang. *caged compounds*) do zbadania roli tymozyny $\beta 4$ w procesie migracji komórek rybich keratynocytów (1);
- określenie roli fosforylacji tyrozyny 397 z regionu 391-406 kinazy ogniskowo-adhezyjnej w procesie tworzenia aktywnego lamellipodium podczas migracji komórek NBTII (5);
- określenie funkcji fosforylacji paksyliny przez kinazę N-kończową białka c-Jun (*JNK*) w procesach migracji komórkowej (4).

2.4. Zwięzła prezentacja wyników, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

2.4.1. Wprowadzenie

Poznanie mechanizmów regulacji migracji komórkowej jest jednym z centralnych tematów badawczych wielu laboratoriów na świecie. Migracja komórek jest jednym z fundamentalnych procesów biologicznych, w którym ma miejsce integracja lokalnych sygnałów komórkowych z globalnymi zmianami architektury komórek. Wiele zjawisk biologicznych jest powiązanych z aktywną migracją komórek. Rozwój morfogenetyczny zarodka, gojenie ran, procesy immunologiczne czy rozwój systemu nerwowego to przykłady

takich właśnie zjawisk. Jednocześnie zaburzenia w regulacji migracji komórek odgrywają ważną rolę w wielu procesach patologicznych takich jak: choroby układu krążenia, osteoporoza, artretyzm, chroniczne procesy zapalne, stwardnienie rozsiane czy nawet choroby psychiczne. Najbardziej jednak znanym procesem patologicznym, i przez to będącym w centrum uwagi naukowców zajmujących się badaniami migracji komórkowej, są choroby nowotworowe a zwłaszcza procesy przerzutowania (metastazy) nowotworów. Komórki metastatyczne wykazują zdolność do migracji poprzez otaczające guz pierwotny tkanki oraz zdolność przedostawania się do krwiobiegu, dzięki czemu mogą być przenoszone do odległych miejsc w organizmie, gdzie mogą rozwinąć się guzy wtórne. Powyższy opis procesu przerzutu jest bardzo powierzchowny, gdyż nie uwzględnia roli zmian środowiskowych czy otaczających komórki rakowe normalnych komórek nabłonka, ale dobrze formułuje zagadnienie procesu przerzutu nowotworu w kontekście migracji komórkowej. Opis ten równocześnie sugeruje, że poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację migracji komórkowej a w rezultacie możliwość interwencji w migrację komórek nowotworowych za pomocą substancji farmakologicznych czy innych zabiegów medycznych, pozwoliłoby na zahamowanie procesów tworzenia przerzutów, odpowiedzialnych za większość zgonów mających miejsce w wyniku rozwoju tej choroby. Z tego powodu wyniki badań nad migracją komórkową są wykorzystywane do opracowywania coraz to nowych leków przeciwnowotworowych czy antymetastatycznych.

2.4.2. Zwięzły opis procesu migracji komórkowej

W biologii są znane w zasadzie dwie formy aktywnej migracji komórkowej:

- aktywne pływanie jak np. orzęski, komórki plemnikowe czy wiciowce,
- różne formy pełzania.

Klasyczny model opisujący ten drugi sposób poruszania się komórek wyróżnia kilka głównych faz:

1. Faza eksploracyjna – komórka bada swoje otoczenie za pomocą długich wypustek cytoplazmatycznych tzw. filopodiów. Wypustki te rosną i zanikają dość szybko, niektóre z nich w odpowiednich warunkach mogą przyczepić się do powierzchni i zainicjować proces kierunkowej migracji.
2. Faza polaryzacji – komórka wyodrębnia przód i tył. W części przedniej następuje wysuwanie aktywnego brzegu (ang. *leading edge*) oraz tworzenie aktywnych wypustek, np. filopodiów. Procesy te są napędzane poprzez intensywną polimeryzację aktyny.
3. Faza adhezyjna – aktywny brzeg komórki oraz lamellipodium ulegają zakotwiczeniu do podłoża poprzez tworzące się kompleksy adhezyjne. Proces ten stabilizuje wysunięte lamellipodium i brzeg aktywny komórki. Po ustabilizowaniu się brzegu

aktywnego następuje skurcz systemu aktomiozynowego co powoduje przesunięcie się ciała komórki.

4. Faza odklejania (de-adhezji) tylnej części komórki i jej przemieszczenie w kierunku centrum komórki. Faza ta nazywana jest także fazą retrakcji.

Żeby komórka mogła się aktywnie przemieszczać fazy te muszą wystąpić w regulowanej sekwencji. Zależności czasowe między tymi fazami są różne w różnych typach komórek, a nawet w tym samym typie komórek – np. retrakcja tylnej części komórki następuje w tym samym czasie, kiedy jest wysuwany brzeg aktywny w przedniej części lub występuje znaczne opóźnienie czasowe między tymi etapami. Fazy migracji regulowane są poprzez skomplikowaną sieć sygnałów komórkowych, w których znaczącą rolę odgrywają receptory powierzchniowe, zwłaszcza należące do grupy integrzyn. Jak poprzednio wspomniano, proces migracji jest kontrolowany przez lokalne, przejściowe sygnały komórkowe, które utrzymują polaryzację komórki, regulują polimeryzację aktyny, adhezję, skurcz układu aktomiozynowego i dynamikę mikrotubul. Z kolei włókna aktyny, mikrotubule i cysterny siateczki śródplazmatycznej, rozciągające się przez całą komórkę, umożliwiają integrację tych lokalnych zdarzeń w efekt globalny, którym jest przemieszczenie się komórki. Poznanie wzajemnych relacji między procesami lokalnymi i globalnymi pozwoli na pełne zrozumienie praw rządzących migracją komórkową.

2.4.3. Mikroskopia optyczna w badaniach procesów komórkowych

Jednym z głównych narzędzi badawczych wykorzystywanych w badaniach układów biologicznych jest mikroskopia optyczna. Głównymi jej zaletami są:

1. możliwość obserwacji zachowania się układu biologicznego w czasie rzeczywistym,
2. skala obserwacji odpowiada naturalnym wymiarom komórek i tkanek (0.25 μm do 1000 μm),
3. stosowany zakres długości fal świetlnych jest w większości przypadków mało szkodliwy dla obserwowanych układów np. komórek,
4. światło może być też użyte do manipulowania obserwowanymi układami biologicznymi (np. pęseta optyczna, metody fotoaktywacji lub fotoinaktywacji białek),
5. obserwowane układy biologiczne są żywe, co z jednej strony powoduje, że nie wymagają one skomplikowanych procesów preparacyjnych jak np. obserwacje w mikroskopach elektronowych, jednakże z drugiej strony wymaga stworzenia odpowiednich warunków fizjologicznych w czasie doświadczenia (temperatura, pH, CO₂ itd.).

W ostatnich latach nastąpił niezwykle intensywny rozwój zaawansowanych metod mikroskopii optycznej. Jako jeden z wielu przykładów można podać mikroskopię superrozdzielczą, która zwiększa precyzję obserwacji optycznych poniżej progu

rozdzielczości optycznej (Klar, Jakobs et al. 2000; Betzig, Patterson et al. 2006; Shtengel, Galbraith et al. 2009), mikroskopię dwufotonową zmniejszająca efekt fototoksyczności poprzez zastosowanie wzbudzenia dwufotonowego (Denk, Strickler et al. 1990) czy też tomografię optyczną (Huang, Swanson et al. 1991; Fujimoto 2003). Jednym z kierunków rozwoju mikroskopii optycznej było opracowanie metod umożliwiających nie tylko obrazowanie procesów komórkowych ale także wpływanie na ich przebieg. Są to tzw. metody fotomanipulacyjne wykorzystujące światło do wywoływania kontrolowanych zmian w procesach lub architekturze komórkowej. Prace badawcze nad rozwojem i zastosowaniem zaawansowanych metod fotomanipulacyjnych, a mianowicie laserowej inaktywacji białek wspomaganą chromoforem (*CALI*) i fotoaktywacji białek inaktywowanych przez związane molekuly „klatkujące” oraz ich zastosowanie do badań procesów migracji komórek są główną częścią mojego dorobku naukowego stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego. Są one przedstawione w następnych paragrafach.

2.4.4. Zastosowanie metody laserowej inaktywacji białek wspomaganą przez chromofor (ang. *Chromophore Assisted Laser Inactivation – CALI*)

Rajfur Z., Roy P., Otey C., Romer L. and Jacobson K. (2002). “Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins”. Nature Cell Biology, 4(4): 286-293

Roy P., Rajfur Z., Pomorski P. and Jacobson K. (2002). “Microscope-based techniques to study cell adhesion and migration”. Nature Cell Biology, 4(4): E91-E96

Jacobson K., Rajfur Z., Vitriol E. and Hahn K. (2008). “Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology”. Trends Cell Biol., 18(9): 443-50

Poznanie struktury oraz zmian w organizacji cytoszkieletu migrujących komórek jest jednym z podstawowych problemów, z którymi spotykamy się w badaniach migracji komórkowej. Jak wspomniano wcześniej, ciągła reorganizacja cytoszkieletu jest jedną z cech procesu migracji i poznanie roli poszczególnych białek w tym procesie jest niezwykle ważne dla poznania mechanizmów regulujących ten proces. Istnieje szereg metod używanych do badania roli białek w procesach biologicznych, jak np. mutacje genetyczne, wyciszające RNA czy zastosowanie przeciwciał blokujących. Metody te mają jednak ograniczone zastosowanie do badania procesów dynamicznych (a takim jest migracja) zachodzących w określonym czasie i miejscu komórki, tzn. nie posiadają one czasowej i przestrzennej rozdzielczości. Dlatego podjęliśmy badania nad rozwinięciem odpowiednich metod biofizycznych, zwłaszcza optycznych, które umożliwiałyby badanie roli poszczególnych białek i innych molekuł w dynamicznych procesach komórkowych.

Jednym z podstawowych sposobów badania roli określonego białka w danym procesie jest inaktywacja tego białka w odpowiednim miejscu komórki i obserwacja efektów komórkowych spowodowanych przez to zdarzenie. Klasyczne genetyczno-biochemiczne metody zwykle inaktywują globalnie określone białka oraz inne biomolekuly w komórce, co

pozwała tym komórkom na wypracowanie odpowiednich strategii kompensacji. W celu pokonania tych trudności rozwinięto nowatorską metodę optycznej inaktywacji białek za pomocą światła laserowego oraz odpowiedniego barwnika (chromoforu) połączonego z badaną biomolekułą. Metoda ta wykorzystuje tworzenie się reaktywnych wolnych rodników podczas naświetlania barwnika światłem o określonej długości fali. Ponieważ wolne rodniki są niezwykle aktywne chemicznie, ich średni czas życia jest bardzo krótki (10^{-6} - 10^{-12} s) (Liao, Roeder et al. 1994), co ogranicza ich efektywny promień działania. Przyjmuje się, że jest on rzędu 50 do 100 angstrémów, co powoduje, że tylko białka znakowane odpowiednim chromoforem np. EGFP są poddane ich działaniu i w rezultacie są inaktywowane. Ponieważ nie są to oddziaływania ukierunkowane, zawsze istnieje możliwość, że przypadkowe białko znajdujące się odpowiednio blisko źródła wolnych rodników może zostać inaktywowane (tzw. *bystander effect*) (Guo, Chen et al. 2006). Wymaga to przeprowadzenia wielu kontroli, które pokazują, że taki efekt nie wystąpił w danym przypadku.

Metoda ta została zaproponowana przez Jay'a i współpracowników w 1988 roku (Jay 1988). Użyli oni niefluoryzującego barwnika, zieleni malachitowej, dołączonego do specyficznych nieblokujących przeciwciał, do selektywnej inaktywacji fosfatazy alkalinowej oraz β -galaktozydazy po naświetleniu odpowiednim światłem laserowym o odpowiedniej długości fali. Metoda ta była następnie użyta do inaktywacji wielu białek, między innymi faskyliny I (Jay and Keshishian 1990), acetylocholinesterazy (Linden, Liao et al. 1992), kalcyneuryny w stożku wzrostu neuronu (Chang, Takei et al. 1995), miozyny V (Wang, Wolenski et al. 1996), taliny i winkuliny (Sydor, Su et al. 1996), radyksyny w stożkach wzrostu neuronów (Castelo and Jay 1999) oraz do zbadania roli miozyny 1c i IIB w procesach dynamicznych w lamelipodiach stożka wzrostu neuronu (Diefenbach, Latham et al. 2002). Mimo niewątpliwych zalet, jedną z wad tej metody była potrzeba użycia inwazyjnych sposobów (jak np. mikroinjekcja) wprowadzania nieblokujących przeciwciał znakowanych zielenią malachitową do wnętrza badanych komórek. W tym czasie wykorzystywano już zielone białko fluorescencyjne (ang. *Green Fluorescent Protein – GFP*) do znakowania białek w żywych komórkach. Ponieważ znakowanie białek komórkowych przez GFP odbywa się na drodze genetycznej, nie ma potrzeby wprowadzania odpowiednio znakowanych białek czy przeciwciał do komórki, dlatego GFP wydawał się naturalnym kandydatem na chromofor, który może być wykorzystany do inaktywacji biomolekuł w procesie CALI. W naszej pracy (2) wykazaliśmy jako pierwsi w świecie, że ulepszone zielone białko fluorescencyjne - EGFP - może być użyte jako chromofor do inaktywacji białek z nim sprzężonych w procesie CALI. Wykorzystaliśmy białko fuzyjne EGFP- α -aktylina aby zbadać rolę α -aktyliny w łączeniu aktynowych włókien naprężeniowych (ang. *stress fibers*) do kontaktów zogniskowanych. Wykazaliśmy, że α -aktylina jest składnikiem kompleksu łączącego włókna naprężeniowe z kontaktami zogniskowanymi. Jednocześnie wykazaliśmy, że kinaza ogniskowo-adhezyjna (lub kinaza adhezji miejscowej) (*FAK*) nie jest składnikiem tego kompleksu i pełni tylko rolę składnika sygnałowego. Praca ta stała się inspiracją dla innych grup badawczych, które zaczęły wykorzystywać laserową inaktywację białek wspomaganą białkami fluorescencyjnymi w swoich pracach badawczych (Tanabe, Oyamada et al. 2005; Vitriol, Utrecht et al. 2007; Monier, Pelissier-Monier et al. 2010; Ou, Stuurman et al. 2010; Nadar, Lin et al. 2012) oraz zainicjowała badania nad opracowaniem nowych rodzajów białek

fluorescencyjnych o lepszej zdolności inaktywacji, jak np. *Killer Red* (Bulina, Chudakov et al. 2006; Bulina, Lukyanov et al. 2006; Carpentier, Violot et al. 2009).

McLean M.A., Rajfur Z., Chen Z., Humphrey D., Yang B., Sligar S.G., Jacobson K. (2009). "Mechanism of chromophore assisted laser inactivation employing fluorescent proteins". Anal. Chem., 81(5): 1755-1761

W dalszym etapie badań podjęliśmy problem określenia mechanizmu fotochemicznego odpowiedzialnego za właściwości inaktywacyjne białka EGFP oraz innych białek fluorescencyjnych. W pracy (7) wykazaliśmy, że reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species* - ROS), których głównym składnikiem jest tlen singletowy, są tworzone podczas naświetlania molekuł białka fluorescencyjnego, np. EGFP, światłem laserowym o odpowiedniej długości fali. Następnie reakcje ROS z białkiem znakowanym przez białko fluorescencyjne powodują inaktywację białka znakowanego.

W pracy tej przeprowadziliśmy także systematyczne badania efektywności inaktywacji S-transferazy glutationowej (*GST*), użytej jako układ modelowy *in vitro*, połączonej z różnymi białkami fluorescencyjnymi takimi jak EGFP, EYFP (ang. *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), ECFP (ang. *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) oraz barwnika FAsH (ang. *Fluoresceine-based Arsenical Hairpin binder*). Wykazaliśmy, że zielone białko fluorescencyjne (*EGFP*) jest najbardziej efektywnym chromoforem inaktywującym, następnie żółte białko fluorescencyjne (*EYFP*) i cyjanowe (*ECFP*) – ich relatywna efektywność inaktywacji w przeliczeniu na jeden zaabsorbowany foton to jak 1:0,34:0,27. Barwnik FAsH wykazuje jednak dużo większą efektywność inaktywacji białka GST niż badane białka fluorescencyjne – efektywność inaktywacji z użyciem FAsH jest około 2,5 raza większa w porównaniu z EGFP. Jednakże wyższa efektywność inaktywacji poprzez FAsH może prowadzić do niespecyficznego inaktywacji molekuł sąsiednich (Guo, Chen et al. 2006). Praca ta pokazała także, że efektywność procesu inaktywacji jest złożoną reakcją, zależną od wielu parametrów, jak np. typ i stabilność chromoforu, doza naświetlania czy obecność tlenu w otoczeniu chromoforu.

2.4.5. Zastosowanie metody fotoaktywacji białek inaktywowanych przez związane molekuly „klatkujące” (ang. *caged compounds method*)

Roy P., Rajfur Z., Jones D., Marriott G. Loew L. and Jacobson K. (2001). "Local photorelease of caged thymosin β 4 in locomoting keratocytes causes cell turning". Journal of Cell Biology, 153: 1035-1048

Inną standardową metodą badania roli białek w procesach komórkowych jest zwiększenie koncentracji badanego białka ponad jego poziom fizjologiczny w komórce poprzez nadekspresję genu odpowiedzialnego za wytwarzanie danego białka. Jest to, jak wspomniano wcześniej, metoda globalna, czyli wpływająca na stan całej komórki od momentu aktywacji genów produkujących dane białka i nie mająca także żadnej

rozdzielczości przestrzennej, tzn. badane białko jest wytwarzane w całej objętości komórki. Już od dawna myślano nad opracowaniem metod, w których dane białko mogłoby być produkowane lub aktywowane w określonym miejscu komórki a także w określonym, ściśle wybranym przez eksperymentatora czasie. Jedną z takich metod jest metoda optycznej fotoaktywacji „klatkowanych” molekuł. Metoda ta polega na zablokowaniu aktywności biologicznej badanej biomolekuły poprzez przyłączenie do niej innej, chemicznie obojętnej, molekuły tzw. „klatki”. „Klatka” jest przyłączona poprzez wiązanie ulegające fotolizie, przez co za pomocą światła możemy dokonać fotolitycznego rozpadu tego wiązania, uwolnienia molekuły klatkującej i w rezultacie badana biomolekuła odzyskuje swoją biologiczną aktywność. Ponieważ aktywacja zachodzi po użyciu światła, zarówno czas jak i miejsce aktywacji mogą być łatwo kontrolowane poprzez modulację natężenia światła użytego do przeprowadzenia procesu aktywacji (Adams and Tsien 1993). Grupa prof. Kennetha Jacobsona była jedną z pierwszych grup wykorzystującą metodę fotoaktywacji „klatkowanych” molekuł w badaniach procesów migracji komórkowej (Ishihara, Gee et al. 1997). W naszej pracy (1) zastosowaliśmy metodę fotoaktywacji „klatkowanego” białka tymozyny $\beta 4$ do zbadania jego roli w procesach migracji rybich keratynocytów. Tymozyna $\beta 4$ jest jednym z białek odpowiedzialnych za regulację dostępności monomerycznej G-aktyny w procesach polimeryzacji G-aktyny do F-aktyny. Tworzy ona krótkożyciowe kompleksy z ATP-G-aktyną w stosunku 1:1 z mikromolowym powinowactwem chemicznym (Safer, Golla et al. 1990; Nachmias 1993). Tworzenie się tych kompleksów hamuje proces polimeryzacji aktyny i powoduje, że procesy depolimeryzacji F-aktyny stają się dominujące w komórce. Mechanizm ten jest wykorzystywany przez komórkę do kontrolowania szybkości polimeryzacji F-aktyny, zapobiegając natychmiastowemu spolimeryzowaniu całej dostępnej G-aktyny. Ponieważ proces migracji rybich keratynocytów bazuje głównie na polimeryzacji monomerycznej aktyny, komórki te są doskonałym układem modelowym do badania wpływu zaburzeń procesu polimeryzacji aktyny na parametry migracji komórkowej. Do innych zalet tych komórek należy to, że ich migracja jest relatywnie szybka ($\sim 10 \mu\text{m}/\text{min}$) oraz że zachowują one stały, wachlarzowaty kształt podczas ruchu. Ta ostatnia cecha jest szczególnie użyteczna do obserwacji zmian morfologii komórkowej. Z tych powodów komórki te zostały użyte w badaniach nad wpływem tymozyny $\beta 4$ na migrację tych komórek, a w szczególności nad wpływem zaburzenia lokalnej równowagi koncentracji monomerycznej G-aktyny w migrujących keratynocytach. Tymozyna $\beta 4$, „sklatkowana” przez molekułę NVOC (ang. *nitroveratryloxycarbonyl*), została wprowadzona do wnętrza migrującego keratynocyta i następnie uaktywniona krótkim impulsem laserowym światła ultrafioletowego ($\lambda = 354 \text{ nm}$) w obszarze o średnicy $\sim 3 \mu\text{m}$ na jednym z końców migrującej komórki. Aktywacja tymozyny $\beta 4$ spowodowała lokalne zmniejszenie się szybkości polimeryzacji aktyny prowadząc do zaburzenia równowagi w procesach migracyjnych między różnymi końcami keratynocyta, co w rezultacie doprowadziło do zakręcenia trajektorii migrującej komórki. Była to pierwsza praca pokazująca doświadczalnie że można zmieniać kierunek migracji keratynocytów przy użyciu metody fotoaktywacji wybranych „klatkowanych” białek/peptydów. Praca ta była także ważnym przyczynkiem do rozwoju teoretycznych prac modelujących migrację rybich keratynocytów (Rubinstein, Jacobson et al. 2005).

Humphrey D., Rajfur Z., Vazquez M.E., Scheswohl D., Schaller M.D., Jacobson K. and Imperiali B. (2005). "In situ photoactivation of a caged phosphotyrosine peptide derived from Focal Adhesion Kinase temporarily halts lamellar extension of single migrating tumor cells". *Journal of Biological Chemistry*, 280(23): 22091-101

Metoda fotoaktywacji „klatkowanych” biomolekuł została także zastosowana w pracy (5), w której określono wpływ fotoaktywacji zsyntetyzowanego i fosforylowanego na tyrozynie 397 peptydu (sekwencja VSETDDcpY³⁹⁷AEIIDEEDT gdzie c oznacza „klatkowanie” grupy fosforowej (p) na tyrozynie w pozycji 397), naśladującego region 391-406 ludzkiej kinazy ogniskowo-adhezyjnej (FAK) na migrację szczurzych komórek rakowych pęcherza moczowego – NBT II. Kinaza ogniskowo-adhezyjna jest jednym z białek zaangażowanych w regulację procesów migracji (Ilic, Furuta et al. 1995; Frame, Patel et al. 2010). Komórki NBT II migrują wolniej (~0,5 - 1,4 $\mu\text{m}/\text{min}$) niż rybie keratynocyty, jednakże większość z nich zachowuje podobny do keratynocytów wachlarzowaty kształt podczas migracji. Syntetyczny peptyd posiadał fosforylowaną tyrozinę 397, w której grupa fosforowa była jednocześnie „klatkowana” przez molekułę Fmoc (ang. *N*-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl). Dzięki temu peptyd ten nie wykazywał żadnej aktywności biologicznej po wprowadzeniu przez mikroiniekcję do migrujących komórek NBT II. Po naświetleniu dwoma krótkimi impulsami laserowymi światła UV (zakres spektralny $\lambda = 333,6 - 363,8 \text{ nm}$) najpierw lameli komórki, a później ciała komórki, zaobserwowano zatrzymanie się wiodącego brzegu lamelipodium migrującej komórki. Jednakże reszta komórki, to jest ciało komórki, przemieszczała się dalej w sposób niezakłócony. Efekt zatrzymania się brzegu wiodącego lamelli był efektem czasowym i trwał przez 20 - 40 minut po naświetleniu. Po upływie tego czasu wiodący brzeg kontynuował proces powiększania i przemieszczania się, a komórka migrowała dalej podobnie jak przed naświetleniem. W celu zbadania mechanizmu regulującego proces powiększania lamelipodium i migracji jej wiodącego brzegu zsyntetyzowano także pokrewne peptydy z podobnym składem aminokwasów - VSETADcpY³⁹⁷AEIIDEEDT, który oddziaływał tylko z białkiem Src, oraz VSETAAcpY³⁹⁷AEIIDEEDT, w przypadku których efekt zatrzymania lameli był znacznie krótszy niż w przypadku oryginalnego peptydu. Wyniki tej pracy jednoznacznie pokazują, że kinaza ogniskowo-adhezyjna (FAK) odgrywa ważną rolę w regulacji procesu powiększania i przemieszczania się brzegu wiodącego migrującej komórki.

2.4.6. Metoda fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. *Total Internal Reflection Fluorescence – TIRF*) w badaniach roli procesu fosforylacji paksyliny przez kinazę N-końcową białka c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinase - JNK*) w procesie migracji komórek NBTII

Huang C., Rajfur Z., Borchers C., Schaller M.D., and Jacobson K. (2003). "JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration". *Nature*, 424: 219-223

Kinaza N-końcowa białka c-Jun (*JNK*) jest związana z regulacją wielu procesów komórkowych, takich jak: proliferacja komórkowa, apoptoza, naprawa DNA czy migracja komórkowa. Także wiele zjawisk patologicznych, takich jak: procesy neurodegeneracji,

chronicznego zapalenia, procesy tworzenia nowotworu czy powstawanie niektórych wad wrodzonych są rezultatem zaburzenia w regulacji JNK (Ip and Davis 1998; Johnson and Nakamura 2007). Wyniki wcześniejszych prac (Riesgo-Escovar, Jenni et al. 1996; Sluss, Han et al. 1996; Xia, Makris et al. 2000; Yujiri, Ware et al. 2000) sugerowały, że JNK jest ważnym czynnikiem regulacyjnym procesów zależnych od migracji komórkowej i dlatego w pracy (4) podjęliśmy zadanie określenia roli JNK w procesach regulacji migracji komórkowej. Używając poprzednio opisanych, szybko migrujących komórek rybich keratynocytów, szczurzych komórek rakowych NBT II oraz fibroblastów Swiss 3T3 wykazaliśmy, że specyficzny inhibitor chemiczny JNK, SP600125, powoduje zatrzymanie migracji tych komórek. Podobny efekt miała nadekspresja JNK1 AF, negatywnie dominującej formy JNK1, w komórkach NBT II. Wyniki te jednoznacznie wskazują na kluczową rolę JNK w procesach migracji komórkowej. W dalszym etapie badań wykazaliśmy *in vitro* i *in vivo*, że substratem JNK1 jest paksylina. Białko to jest obecne w kontaktach zogniskowanych (podobnie jak aktywna forma JNK), gdzie odpowiada za ich organizację. Następnie wykazaliśmy, używając analizy fosforylacji aminokwasów oraz spektrometrii mas, że fosforylacja seryny 178 (Ser 178) jest jednym z głównych miejsc fosforylacji paksyliny przez JNK oraz że fosforylacja Ser 178 jest wymagana do migracji pojedynczych komórek NBT II oraz kierunkowej migracji komórek w procesach gojenia ran. Następnym etapem tej pracy było określenie mechanizmu za pomocą którego fosforylacja Ser 178 w paksylinie przez JNK wpływała na migrację komórkową. Ponieważ paksylina lokalizuje się w punktach adhezji, celowym wydawało się zbadanie punktów adhezji w migrujących komórkach. Do tego celu wykorzystaliśmy metodę fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia – TIRF. W metodzie tej używa się efektu kwantowego tworzenia się tzw. fali ewanescencyjnej (zanikającej), gdy wiązka światła o danej długości odbija się pod kątem granicznym na granicy ośrodków o większym i mniejszym współczynniku refrakcji. Natężenie powstałej fali ewanescencyjnej zanika eksponencjalnie w zależności od odległości od granicy ośrodków. W efekcie światło to jest w stanie wzbudzić fluorescencję odpowiednich molekuł tylko w bardzo cienkiej warstwie tuż nad powierzchnią graniczną tych dwóch ośrodków. Efekt ten został wykorzystany w mikroskopii optycznej do badania fluorescencji biomolekuł znajdujących się w tej cienkiej warstwie tuż nad powierzchnią szkiełka mikroskopowego. Zwykle przyjmuje się, że grubość tej warstwy to około 100 nm. Grubość efektywna tej warstwy zależy też od początkowego natężenia padającego światła. Wczesne implementacje tej techniki bazowały na wykorzystaniu odpowiedniego pryzmatu, przyczepionego do szkiełka mikroskopowego oraz zewnętrznej wiązki laserowej przechodzącej przez ten pryzmat. To powodowało, że systemy te były bardzo niewygodne w użyciu, gdyż wymagały czasochłonnego ustawiania (Wakelin and Bagshaw 2003). Dopiero wykorzystanie obiektywu mikroskopu do odpowiedniego ustawienia oświetlenia spowodowało wykorzystanie tej techniki na szerszą skalę (Stout and Axelrod 1989). Główną zaletą tej metody jest eliminacja tła fluorescencji molekuł znajdujących się w całej objętości komórkowej, które były wzbudzane w tradycyjnej mikroskopii fluorescencyjnej. Tło fluorescencyjne utrudnia lub nawet całkowicie uniemożliwia obserwacje procesów zachodzących na dolnej (wentralnej), przylegającej do szkiełka mikroskopowego, powierzchni adherentnej komórki. Kluczowy pomiar optyczny w naszej pracy, który polegał na obserwacji dynamiki kontaktów zogniskowanych znajdujących się na dolnej powierzchni komórki, był prawie niemożliwy do

przeprowadzenia za pomocą klasycznej mikroskopii fluorescencyjnej. Rozmyte tło fluorescencyjne, pochodzące z całej objętości komórki, efektywnie pokrywało sygnał pochodzący z kontaktów zogniskowanych. Jedynie zastosowanie metody TIRF pozwoliło nam na wykonanie tych eksperymentów. Wykazaliśmy, że obraz kontaktów zogniskowanych w komórkach NBT II wytwarzających EGFP-paksylinę-B jest różny od obrazu kontaktów zogniskowanych w komórkach wytwarzających zmutowaną formę EGFP-Pax_{S178A}, gdzie Ser 178 została zastąpiona przez alaninę co uniemożliwiało fosforylację paksyliny w tym miejscu. W normalnie migrujących komórkach paksylina była zlokalizowana w wielu małych strukturach adhezyjnych, tworzących równomierny, dyfuzyjny rozkład na dolnej powierzchni komórki. W komórkach wytwarzających EGFP-Pax_{S178A} zaobserwowaliśmy tworzenie wyraźnych punktowych struktur adhezyjnych, przypominających solidne kontakty zogniskowane w wolno migrujących lub stacjonarnych komórkach. Jednocześnie zaobserwowano tworzenie się licznych aktynowych włókienek stresowych pomiędzy kontaktami zogniskowanymi w komórkach wytwarzających zmutowaną formę paksyliny. Normalne komórki NBT II wytwarzają bardzo nieliczne aktynowe włókienka stresowe. Obserwacje te wykazują, że fosforylacja Ser 178 wpływa na proces migracji komórek NBTII poprzez regulację dynamiki tworzenia się kontaktów zogniskowanych w migrujących komórkach.

3. Osiągnięcia naukowe niezwiązane z tematyką badań, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

3.1. Spontaniczne i indukowane oscylacje komórkowe

Równolegle z badaniami stanowiącymi podstawę postępowania habilitacyjnego prowadziłem cykl badań nad rozwojem nowego układu komórkowego do badania oscylacji komórkowych. W pracy (Pletjushkina, Rajfur et al. 2001) po raz pierwszy pokazaliśmy, że wiele rodzajów komórek, jak np. epitelialne komórki wątroby szczura IAR-2 czy mysie fibroblasty SW 3T3, w których dokonano depolimeryzacji mikrotubul, w czasie procesu przywierania do podłoża i następnie rozplaszczania wykazują zachowanie oscylacyjne, mianowicie rytmiczne skurcze, które dotychczas były obserwowane w bardzo niewielu rodzajach komórek, głównie kardiomiocytach. Oscylacje te trwały przez wiele godzin i zwykle ustawały kiedy komórki rozprzestrzeniły się i osiągnęły stabilny, płaski kształt. Normalne komórki zwykle nie wykazywały rytmicznych skurczy lub oscylacji podczas procesu rozprzestrzeniania się. Nasze dalsze badania pokazały, że proces ten jest związany aktywnością kinazy ROCK gdyż po inhibicji aktywności tej kinazy przez specyficzny inhibitor Y 27632, komórki od razu przestawały oscylować i osiągały płaski kształt. Wskazano także, że mechanistyczne wzajemne oddziaływanie między kurczliwością regulowaną przez ścieżkę sygnałową Rho oraz regulowaną przez wapń mogą być przyczyną powstawania regularnych oscylacji komórkowych.

Kontynuacja badań, wykorzystujących opracowany system komórkowy, zaowocowała powstaniem dalszych publikacji, w których opracowano teoretyczny model tworzenia się oscylacji komórkowych poprzez antagonistyczne oddziaływanie indukowanej przez wapń kurczliwości oraz aktywacji kanałów wapniowych zależnych od naprężenia (ang. *stretch-activated channels* - SAC) (Kapustina, Weinreb et al. 2008). W dalszym etapie badań wykazaliśmy, że oprócz indukowanych oscylacji komórkowych spowodowanych depolimeryzacją mikrotubul niektóre rodzaje komórek wykazują także spontaniczne oscylacje kurczliwości podczas procesu rozprzestrzeniania się. Głównym wynikiem ostatniej pracy było wykazanie, że białko Rho jest głównie odpowiedzialne za generację oscylacji komórkowych, a wapń jest tylko podrzędnym czynnikiem w tym procesie (Costigliola, Kapustina et al. 2010). Badania te zamierzam dalej kontynuować w Instytucie Fizyki UJ we współpracy z grupą prof. Kennetha Jacobsona – UNC Chapel Hill.

3.2. Mikroskopia biosensorów FRET (ang. *Fluorescence/Forster Resonance Energy Transfer*)

Nowe metody obrazowania optycznego, wykorzystujące efekt bezpromienistego transferu energii między dwoma barwnikami, FRET, są ostatnio rozwijane jako narzędzie do bezpośredniej wizualizacji oddziaływań lub aktywności białek w żywych komórkach. Efekt ten polega w skrócie na transferze energii powstałej po wzbudzeniu jednej molekuly, donora, do innej molekuly, akceptora, bez emisji fotonu. Dwa warunki muszą być spełnione, żeby taki transfer mógł nastąpić:

- a. molekuly te muszą się znajdować dostatecznie blisko siebie (typowa odległość to 20 do 80 angstromów),
- b. widmo emisji donora musi pokrywać się częściowo z widmem wzbudzenia akceptora - im większy wspólny obszar spektralny tym większy efekt FRET.

Eksperyment typu FRET polega na obserwacji fluorescencji pochodzącej z molekuly akceptora podczas naświetlania molekuly donora światłem o odpowiedniej długości lub w komplementarnym podejściu, zmniejszeniu emisji fluorescencji donora w obecności akceptora. Ponieważ molekuly donora i akceptora muszą znajdować się bardzo blisko, przyjmuje się, że jeśli obserwujemy występowanie efektu FRET to białka te oddziałują ze sobą. W ten sposób można obserwować wzajemne oddziaływanie białek, oznaczonych odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi, w komórkach i tkankach. Opracowano wiele par barwników odpowiednich do pomiarów typu FRET jak np. barwniki cyjanowe Cy3 (zielony) - Cy5 (czerwony), czy też bardzo powszechnie używane barwniki FITC (izotiocyanian fluoresceiny) – TRITC (tetrametylorodamina). Szczególną uwagę poświęca się rozwojowi i wykorzystaniu białek fluorescencyjnych jako barwników FRET ze względu na możliwości tworzenia białek fuzyjnych. Do najbardziej popularnych należą: CFP (ang. *Cyan Fluorescent Protein*) – YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*), GFP2 (ang. *Green Fluorescent Protein2*) – YFP, czy niedawno opracowane Cerulean FP - Citrine FP (Griesbeck, Baird et al. 2001; Rizzo, Springer et al. 2004). Efekt FRET może być

wykorzystany także do określania stanu aktywności białka w komórce (Hodgson, Pertz et al. 2008; Kardash, Bandemer et al. 2011). Białka monitorujące oddziaływania lub aktywność białek są używane jako biosensory. W moich badaniach zajmowałem się także rozwojem oraz testowaniem nowych biosensorów wykorzystujących efekt FRET. We współpracy z grupami prof. Michaela Schallera oraz prof. Klaus Hahna z UNC – Chapel Hill (USA) opracowaliśmy dwa nowe biosensory bazujące na efekcie FRET. Jeden z biosensorów mierzy fosforylację tyrozyny 397 (Y397), która jest związana z rolą FAK jako elementu składowego kontaktów zogniskowanych lub ogólnie punktów adhezji komórkowej. Sensor ten należy do grupy sensorów dwu-molekularnych, tzn. akceptor jest umieszczony na jednej molekuale, a donor na innej. W tym przypadku białko fluorescencyjne Citrine jest utworzone jako białko fuzyjne z dwoma domenami SH2 białka Src, a donor, którym jest białko fluorescencyjne CFP jest białkiem fuzyjnym na końcu N białka FAK (*CFAK*). W momencie fosforylacji Tyrozyny 397 białko fuzyjne SH2-Citrine oddziałuje z białkiem fuzyjnym CFAK i wtedy obserwujemy efekt FRET. Drugi biosensor, który mierzy zmiany w stanie konformacyjnym FAK związane z jej aktywacją jest biosensorem jednomolekularnym (Cai, Lietha et al. 2008). W tym wypadku CFP znajduje się na końcu N FAK, natomiast akceptor, Citrine, jest umiejscowiony pomiędzy domenami FERM i katalitycznymi tej samej molekuły białka FAK. W konformacji nieaktywnej CFP i Citrine są blisko siebie i obserwujemy wtedy efekt FRET. Aktywacja białka FAK powoduje jego przejście do konformacji „otwartej”, i wtedy efekt FRET się zmniejsza. Praca ta skierowała moją uwagę na zastosowanie biosensorów fluorescencyjnych typu FRET jako doskonałego narzędzia do badania kaskad sygnałowych w migrujących komórkach. Planuję kontynuowanie prac badawczych z zastosowaniem biosensorów fluorescencyjnych. Badania te będą bazować na trwającej już od wielu lat mojej współpracy z laboratoriami prof. Klaus Hahna (UNC - Chapel Hill) oraz dr Louisa Hodgsona (Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University - NY).

3.3. Pomiary trakcji komórkowych

W ostatnich latach projektu Cell Migration Consortium problem poznania mechanizmów procesów mechanotransdukcji komórkowej stał się jednym z wiodących tematów badawczych. Jednym z kierunków tego tematu był problem pomiaru sił wywieranych przez migrujące komórki na podłoże. Uczestnictwo w tym projekcie dało mi możliwość pracy nad rozwojem metody pomiaru trakcji migrujących komórek wykorzystującej efekt odkształcenia elastycznego podłoża, na którym znajdują się migrujące (lub adherentne) komórki. Grupa prof. Kennetha Jacobsona była jedną z pierwszych grup, która opracowała metodę pomiarów trakcji komórkowych z wykorzystaniem elastycznego podłoża oraz przeprowadziła jedne z pierwszych pomiarów trakcji komórkowych z użyciem tej metody (Lee, Leonard et al. 1994; Oliver, Dembo et al. 1995; Dembo, Oliver et al. 1996). Dalsze prace nad rozwojem tej metody były prowadzone w tym samym laboratorium w latach 2004-2011 (Damjanovic, Lagerholm et al. 2005) przez dr Vesnę Damjanovic, a po jej odejściu przejąłem kontynuację tej pracy (<http://cellmigration.org/resource/imaging/ppt-pdf/Photoactivation-ver01-Zenon.pdf>). W skrócie, metoda ta polega na pomiarze zniekształceń jakie wytwarzają komórki migrujące (lub ogólnie adhezyjne) po podłożu

o odpowiednio dobranej elastyczności. W celu wizualizacji odkształceń podłoża, wprowadza się do niego markery fluorescencyjne, którymi są zwykle małe fluorescencyjne kulki lateksowe o średnicy około 200 nm. Typowy eksperyment polega na zrobieniu zestawu zdjęć metodą fotografii poklatkowej migrującej (lub adherentnej) komórki (zwykle w świetle przechodzącym w kontraście fazowym lub kontraście różnicowym Nomarskiego) i jednoczesnych zdjęć w trybie mikroskopii fluorescencyjnej markerów fluorescencyjnych umieszczonych w podłożu. Następnie specjalnie opracowane programy do obróbki obrazów obliczają trakcje komórkowe za pomocą odpowiednich algorytmów wykorzystując przesunięcia markerów jako miary odkształcenia (deformacji) podłoża (Sabass, Gardel et al. 2008). Metoda ta wymaga wkładu z czterech dziedzin nauki:

1. chemia polimerów – opracowanie właściwego typu podłoża elastycznego
2. chemia i fizyka powierzchni – odpowiednia aktywacja powierzchni
3. biologia komórki – obiekt badany
4. informatyka – opracowanie odpowiednich algorytmów do obliczania trakcji komórkowych.

Ponieważ program Cell Migration Consortium zakończył się w 2011 roku, nie miałem możliwości dokończenia serii badań nad rozkładem trakcji w migrujących rybach keratynocytach, które to badania prowadziłem w grupie prof. Kennetha Jacobsona. Ten kierunek badań został zakończony jako odrębny temat badań w tej grupie i przekazany dla mnie do dalszej kontynuacji. Bogaty zestaw wstępnych badań z tamtego okresu pozwolił już na zainicjowanie dalszych prac badawczych w tym kierunku w Instytucie Fizyki UJ. Badania te będą realizowane we współpracy z grupą prof. Kennetha Jacobsona – UNC-Chapel Hill, USA oraz prof. Xaviera Trepata – Institute of Bioengineering of Catalonia, Hiszpania.

4. Dalsze plany badawcze

Głównym tematem moich prac badawczych będzie poszerzenie wiedzy o szeroko rozumianym zjawisku mechanotransdukcji w układach biologicznych. Systematyczne badania będą obejmować proste układy modelowe – począwszy od pojedynczych molekuł, układów wieloskładnikowych, poprzez systemy komórkowe, ze szczególną uwagą na komórki migrujące, na tkankach kończąc. W pracach tych będę wykorzystywał nabyte przez mnie doświadczenia oraz metody poznane podczas poprzednich etapów mojej kariery naukowej. W szczególności chciałbym skupić się na następujących zagadnieniach:

- określenie roli oraz wzajemnego oddziaływania poszczególnych białek, takich jak: paksylina, kinaza ogniskowo-adhezyjna (FAK), integryny oraz alfa-aktynina, znajdujących się w punktach adhezji komórkowych, w początkowych stadiach procesów mechanotransdukcji komórkowej;

- badania procesów transformacji sygnałów mechanicznych na biochemiczne w prostych układach modelowych pojedynczych biomolekuł;
- wpływ mechanicznych i chemicznych parametrów podłoża na architekturę i migrację komórkową oraz na procesy mechanotransdukcji w tkankach – szczególny nacisk będzie położony na zaburzenia mechanotransdukcji w procesach nowotworowych;
- udział procesów wolnorodnikowych w kaskadach sygnałowych procesów mechanotransdukcji;
- rozwój nowych metod obrazowania, kwantyfikacji oraz manipulacji procesami komórkowymi ze szczególnym uwzględnieniem procesów mechanotransdukcji.

5. Współpraca naukowa

Poniższa lista przedstawia ośrodki oraz grupy naukowe, z którymi współpracowałem na różnych etapach mojej kariery naukowej wraz z krótkim opisem prowadzonych prac.

1. 1992-1998; Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy, Kraków; prof. dr hab. A. Laszczka; Badanie wpływu czynników środowiskowych i technologicznych na jakość nasienia zwierząt gospodarskich z użyciem metody pomiaru ultrasłabych emisji fotonowych.
2. 1991-1992; Istituto di Fisica, Universita di Catania, Catania, Włochy; prof. F. Musumeci, dr A. Triglia; staż przeddoktorski; Zastosowanie metody pomiaru spontanicznej ultrasłabej luminescencji do badania procesów kiełkowania nasion soi.
3. 1994; Istituto di Fisica, Universita di Catania, Catania, Włochy; prof. F. Musumeci, dr A. Triglia; stypendium UE dla zaawansowanych badaczy; Badanie wpływu herbicydu – atrazyny - na parametry fotoindukowanej luminescencji glonów *Acetabularia acetabulum*.
4. 1995-1998; Department of Food Science, Rutgers University - The State University of New Jersey, New Brunswick, USA; prof. K. Schaich; staż podoktorski; Opracowanie nowej metody pomiaru tworzenia wczesnych produktów utleniania żywności oraz zaprojektowanie i zbudowanie specjalizowanej aparatury do tego celu.
5. 1998-2002; Department of Cell and Developmental Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, Północna Karolina, USA; prof. K. Jacobson, prof. C. Otey, prof. L. Romer; staż podoktorski; Rozwinięcie i zastosowanie nowatorskich fotomanipulacyjnych metod:

- a. laserowej inaktywacji wspomaganej przez chromofor
- b. fotoaktywacji „klatkowanych” molekuł

do badania molekularnej architektury komórkowej oraz procesów migracji komórkowej.

6. 2000-2001; A.N. Biełozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University, Moskwa, Rosja; prof. J. M. Vasiliev; Opracowanie modelu komórkowego wykazującego regularne oscylacje kształtu komórki (badania wykonane w UNC-Chapel Hill, USA).
7. 2002-2011; Department of Cell and Developmental Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, Północna Karolina, USA; prof. K. Jacobson; zatrudnienie jako Research Assistant Professor; Zbadanie fotochemicznego mechanizmu laserowej inaktywacji wspomaganej chromoforem fluorescencyjnych białek - EGFP, EYFP, ECFP.
8. 2001-2008; Department of Cell and Developmental Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, Północna Karolina, USA; prof. M. Schaller; Badanie procesów fosforylacji białek, rozwój nowych biosensorów FRET.
9. 2002-2005; Massachusetts Institute of Technology, Department of Biology, Department of Chemistry, Cambridge, Massachusetts, USA; prof. B. Imperiali; Badanie roli syntetycznego peptydu cpyFAK w procesach migracji komórkowej przez zastosowanie metody fotoaktywacji „klatkowanych” molekuł.
10. 2003-2004; Department of Cell and Developmental Biology oraz Lineberger Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, Północna Karolina, USA; prof. K. Burrridge; Wpływ zaburzeń regulacji wewnętrznego napięcia mechanicznego w komórce na składniki strukturalne komórki, wykorzystanie metody FRAP.

6. Udział w projektach badawczych jako wykonawca lub główny wykonawca

1. Projekt badawczy KBN nr 5 5336 91 02 “Ocena jakości nasienia na podstawie pomiarów emisji fotonowej” 01/01/1992 – 31/12/1994.
2. Projekt badawczy KBN nr 5 PO6D 047 09 „Efekt oddziaływania czynników środowiskowych i technologicznych na status energetyczno-funkcjonalny plemników zwierząt użytkowych” 03/07/1995 – 30/06/1998 (główny wykonawca).
3. Grant NIH Fogarty Int. Ctr. TW00401 “Role of Microtubules in Regulation of Focal Contacts” 01/12/1997 - 31/01/2000.

4. Grant National Institute of Dental and Craniofacial Research P60DE013079 "Regulation of Motility and Transcription in Inflammation" 01/09/1999-31/08/2004.
5. Grant NIH Cell Migration Consortium GM064346 [GLUE grant, prof. Alan F. Horwitz, PI]; Sub project 9041:"Imaging and photomanipulation initiative", 15/09/2001-31/07/2011.
6. Grant National Heart, Lung and Blood Institute PO1HL080166 [PPG-prof. Keith Burridge, PI; prof. K. Jacobson, Co-PI] Adhesion and Migration in Inflammation, 01/07/2006-30/06/2011.

7. Udział w konferencjach naukowych

7.1. Konferencje krajowe

1. International Symposium on Photon Emission from Biological Systems. Sobótka, Wrocław, 1986.
2. International Symposium on Molecular Luminescence and Photophysics: *Half a Century of Jablonski Diagram*. Toruń, 1986.
3. 3rd International Scientific School: *Spectroscopic and Structural Studies of Materials and Systems of Fundamental Importance to Biology and Medicine - Proteins*. Ustroń, 1987.
4. 4th Interdisciplinary Scientific School: *Spectroscopic and Structural Studies of Materials and Systems of Fundamental Importance to Biology and Medicine – Biomolecular Interactions*. Ustroń, 1988.
5. 3rd European Postgraduate Symposium on Photochemistry, Jadwisin, 1988.
6. 1st International School on Biological Luminescence. Książ, Wrocław, 1989.
7. VIII Zjazd PTBF. Kraków, 1992.
8. 1st Integrated European Conference on Embryo Transfer Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding. Kraków, 1994.
9. XXXIX Szkoła Zimowa Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakopane, 2012.
10. XI Krakowsko-Katowickie Seminarium Fizyki Fazy Skondensowanej, Katowice, 2012.

7.2. Konferencje zagraniczne

1. IV International Summer School on Biophysics: *Supramolecular Structure and Functions*. Dubrownik, Jugosławia 1990.
2. 4th International Symposium on Quantitative Luminescence Spectrometry in Biomedical Sciences. Gandawa, Belgia 1991.
3. 7th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Banff, Kanada 1993.
4. Institute of Food Technologists Annual Meeting. Nowy Orlean, USA 1997.
5. 43rd Biophysical Society Annual Meeting. Baltimore, USA 1999.
6. 39th ASCB Annual Meeting. Washington DC, USA 1999.
7. 44th Biophysical Society Annual Meeting. Baltimore, USA 2000.
8. 40th ASCB Annual Meeting. San Francisco, USA 2000.
9. 45th Biophysical Society Annual Meeting, Baltimore, USA 2001.
10. 41st ASCB Annual Meeting. Washington DC, USA 2001.
11. 42th ASCB Annual Meeting, San Francisco, USA 2002.
12. 48th Biophysical Society Annual Meeting, San Francisco USA 2004.
13. 44th ASCB Annual Meeting. Washington DC, USA 2004.
14. 47th ASCB Annual Meeting. Washington DC, USA 2007.
15. Cell Migration Consortium Annual Meetings, USA 2002-2010.

7.3 Referaty wygłoszone na zaproszenie organizatorów

1. 40th ASCB Annual Meeting, San Francisco, USA 2000.

Rajfur Z., Roy P., Otey C., Romer L., Jacobson KA. "Chromophore Assisted Laser Inactivation of alpha-actinin is mediated by the EGFP molecule".
2. l'Imagerie Cellulaire Mini-colloque: Micro-CALI/FALI, Institut Curie, Paryż, Francja 2002.

Rajfur Z., Roy P., Otey C., Romer L., Jacobson KA. "The use of CALI with EGFP fusion proteins to dissect the link between stress fibres and focal adhesions".
3. 3rd International Meeting of European Light Microscopy Initiative, Barcelona, Hiszpania 2003.

Rajfur Z., Humphrey D., Vazquez E., Roy P., Imperiali B., Jacobson K. "The potential of GFP-CALI and photoactivation techniques for the study of cell migration".

4. Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN, Kraków, Polska 2008.

Rajfur Z. „Recent advances in cell migration studies”.

5. Special Research Seminar, Center for Cell Dynamics, Biomedical Engineering, Anesthesiology and Critical Care Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, USA 2011.

Rajfur Z. „Using optical tools to dissect cell motility mechanisms”.

8. Literatura

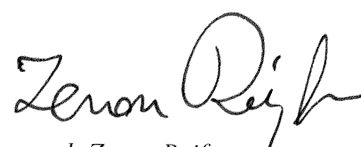
- Adams, S. R. and R. Y. Tsien (1993). "Controlling Cell Chemistry with Caged Compounds." Annual Review of Physiology **55**(1): 755-784.
- Betzig, E., G. H. Patterson, et al. (2006). "Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution." Science **313**(5793): 1642-1645.
- Bulina, M. E., D. M. Chudakov, et al. (2006). "A genetically encoded photosensitizer." Nat Biotechnol **24**(1): 95-99.
- Bulina, M. E., K. A. Lukyanov, et al. (2006). "Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed." Nat Protoc **1**(2): 947-953.
- Cai, X., D. Lietha, et al. (2008). "Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells." Mol Cell Biol **28**(1): 201-214.
- Carpentier, P., S. Violot, et al. (2009). "Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed." FEBS Lett **583**(17): 2839-2842.
- Castelo, L. and D. G. Jay (1999). "Radixin is involved in lamellipodial stability during nerve growth cone motility." Mol Biol Cell **10**(5): 1511-1520.
- Chang, H. Y., K. Takei, et al. (1995). "Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin." Nature **376**(6542): 686-690.
- Costigliola, N., M. T. Kapustina, et al. (2010). "RhoA regulates calcium-independent periodic contractions of the cell cortex." Biophys J **99**(4): 1053-1063.
- Damljanovic, V., B. C. Lagerholm, et al. (2005). "Bulk and micropatterned conjugation of extracellular matrix proteins to characterized polyacrylamide substrates for cell mechanotransduction assays." Biotechniques **39**(6): 847-851.
- Dembo, M., T. Oliver, et al. (1996). "Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method." Biophys J **70**(4): 2008-2022.
- Denk, W., J. H. Strickler, et al. (1990). "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy." Science **248**(4951): 73-76.
- Diefenbach, T. J., V. M. Latham, et al. (2002). "Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone." J Cell Biol **158**(7): 1207-1217.

- Ezzahir, A., M. Godlewski, et al. (1992). "The influence of environmental factors on the ultraweak luminescence from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Bioelectrochemistry and Bioenergetics **27**(1): 57-61.
- Ezzahir, A., M. Godlewski, et al. (1990). Photoinduced delayed luminescence from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biological Luminescence: proceedings of the first international school, Książ Castle, Wrocław, Poland, June 20-23, 1989. B. Jezowska-Trzebiatowska, B. Kochel, J. Slawinski and W. Strek, World Scientific, Singapore: 173-181.
- Ezzahir, A., T. Kwiecińska, et al. (1992). "The influence of white light on photoinduced luminescence from bull spermatozoa." Appl. Biol. Commun. **2**(3): 133-137.
- Ezzahir, A., Z. Rajfur, et al. (1991). "Photoinduced Delayed Luminescence from Yeast and Amelanoma Ascitic Cells. I. Excitation with Different Actinic Light." Zagadnienia Biofizyki Współczesnej **15**(1): 28-42.
- Frame, M. C., H. Patel, et al. (2010). "The FERM domain: organizing the structure and function of FAK." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(11): 802-814.
- Fujimoto, J. G. (2003). "Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging." Nat Biotechnol **21**(11): 1361-1367.
- Godlewski, M., T. Kwiecinska, et al. (1997). Ultraweak luminescence of domestic animals spermatozoa. Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons: proceedings of the 9th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence held at Woods Hole, Massachusetts, October 1996. J. W. Hastings, L. J. Kricka and P. E. Stanley, J. Willey and Sons Ltd., Chichester: 353-356.
- Godlewski, M., T. Kwiecinska, et al. (1997). Ultraweak photon emission of cells subjected to environmental stress. Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons: proceedings of the 9th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence held at Woods Hole, Massachusetts, October 1996. J. W. Hastings, L. J. Kricka and P. E. Stanley, J. Willey and Sons Ltd., Chichester: 357-360.
- Godlewski, M., T. Kwiecińska, et al. (1997). "Diagnostic value of ultraweak chemiluminescence of cells subjected to the oxidative stress." Current Topics in Biophysics **21**(1): 96-101.
- Godlewski, M., Z. Rajfur, et al. (1990). The influence of environmental conditions on the luminescence from *Saccharomyces cerevisiae*. Biological Luminescence: proceedings of the first international school, Książ Castle, Wrocław, Poland, June 20-23, 1989. B. Jezowska-Trzebiatowska, B. Kochel, J. Slawinski and W. Strek, World Scientific, Singapore: 182-196.
- Godlewski, M., Z. Rajfur, et al. (1995). Wpływ procesu kriokonserwacji na nasienie zwierząt gospodarskich badany metodą pomiaru emisji fotonowej. Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej: materiały IV Sympozjum Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN, Kraków 6-7 czerwca 1995. Kraków: 108-111.
- Godlewski, M., Z. Rajfur, et al. (1995). "Ultraweak luminescence from biological objects." Polish Journal of Medical Phys. and Engineering. Supp. **1**(1): 191-192.
- Godlewski, M., Z. Rajfur, et al. (1995). Photon emission from domestic animals spermatozoa cells. International Conference "Light and Biological Systems": book of abstracts, Wrocław, 3-6 July 1995: 12-13.
- Godlewski, M., Z. Rajfur, et al. (1993). "Spectra of the formaldehyde-induced ultraweak luminescence from yeast cells." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **21**(1): 29-35.

- Griesbeck, O., G. S. Baird, et al. (2001). "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications." J Biol Chem **276**(31): 29188-29194.
- Gumińska, M., T. Kędryna, et al. (1997). "Changes in ATP level and iron-induced ultra-weak photon emission in bull spermatozoa, caused by membrane peroxidation during thermal stress." Acta Biochim Pol **44**(1): 131-138.
- Guo, J., H. Chen, et al. (2006). "Fluorophore-assisted light inactivation produces both targeted and collateral effects on N-type calcium channel modulation in rat sympathetic neurons." J Physiol **576**(Pt 2): 477-492.
- Hodgson, L., O. Pertz, et al. (2008). "Design and optimization of genetically encoded fluorescent biosensors: GTPase biosensors." Methods Cell Biol **85**: 63-81.
- Huang, D., E. A. Swanson, et al. (1991). "Optical coherence tomography." Science **254**(5035): 1178-1181.
- Humphrey, D., Z. Rajfur, et al. (2005). "In situ photoactivation of a caged phosphotyrosine peptide derived from focal adhesion kinase temporarily halts lamellar extension of single migrating tumor cells." J Biol Chem **280**(23): 22091-22101.
- Ilic, D., Y. Furuta, et al. (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." Nature **377**(6549): 539-544.
- Ip, Y. T. and R. J. Davis (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." Curr Opin Cell Biol **10**(2): 205-219.
- Ishihara, A., K. Gee, et al. (1997). "Photoactivation of caged compounds in single living cells: an application to the study of cell locomotion." Biotechniques **23**(2): 268-274.
- Jacobson, K., Z. Rajfur, et al. (2008). "Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology." Trends Cell Biol **18**(9): 443-450.
- Jay, D. G. (1988). "Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5454-5458.
- Jay, D. G. and H. Keshishian (1990). "Laser inactivation of fasciclin I disrupts axon adhesion of grasshopper pioneer neurons." Nature **348**(6301): 548-550.
- Johnson, G. L. and K. Nakamura (2007). "The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1341-1348.
- Kapustina, M., G. E. Weinreb, et al. (2008). "Mechanical and biochemical modeling of cortical oscillations in spreading cells." Biophys J **94**(12): 4605-4620.
- Kardash, E., J. Bandemer, et al. (2011). "Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors." Nat Protoc **6**(12): 1835-1846.
- Klar, T. A., S. Jakobs, et al. (2000). "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8206-8210.
- Laszczka, A., A. Ezzahir, et al. (1993). Iron-induced ultraweak chemiluminescence and vitality of bull spermatozoa. Bioluminescence and Chemiluminescence: status report: proceedings of the VIIth International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Banff, March 1993. A. A. Szalay, L. J. Kricka and P. E. Stanley, J. Wiley and Sons, Chichester - New York - Brisbane - Toronto - Singapore: 523-527.
- Laszczka, A., M. Godlewski, et al. (1995). "Ultraweak luminescence of spermatozoa." Current Topics in Biophysics **19**(1): 20-31.
- Lee, J., M. Leonard, et al. (1994). "Traction forces generated by locomoting keratocytes." J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 1957-1964.
- Liao, J. C., J. Roider, et al. (1994). "Chromophore-assisted laser inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2659-2663.

- Linden, K. G., J. C. Liao, et al. (1992). "Spatial specificity of chromophore assisted laser inactivation of protein function." Biophys J **61**(4): 956-962.
- McLean, M. A., Z. Rajfur, et al. (2009). "Mechanism of chromophore assisted laser inactivation employing fluorescent proteins." Anal Chem **81**(5): 1755-1761.
- Monier, B., A. Pelissier-Monier, et al. (2010). "An actomyosin-based barrier inhibits cell mixing at compartmental boundaries in *Drosophila* embryos." Nat Cell Biol **12**(1): 60-65; sup pp 61-69.
- Nachmias, V. T. (1993). "Small actin-binding proteins: the beta-thymosin family." Curr Opin Cell Biol **5**(1): 56-62.
- Nadar, V. C., S. Lin, et al. (2012). "Microtubule Redistribution in Growth Cones Elicited by Focal Inactivation of Kinesin-5." The Journal of Neuroscience **32**(17): 5783-5794.
- Oliver, T., M. Dembo, et al. (1995). "Traction forces in locomoting cells." Cell Motil Cytoskeleton **31**(3): 225-240.
- Ou, G., N. Stuurman, et al. (2010). "Polarized Myosin Produces Unequal-Size Daughters During Asymmetric Cell Division." Science **330**(6004): 677-680.
- Pletjushkina, O. J., Z. Rajfur, et al. (2001). "Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules." Cell Motil Cytoskeleton **48**(4): 235-244.
- Rajfur, Z. (1993). Photon Emission from Chemically Perturbed Normal and SOD-Deficient Yeast Cells. Bioluminescence and Chemiluminescence: status report: proceedings of the VIIth International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Banff, March 1993. A. A. Szalay, L. J. Kricka and P. E. Stanley, J. Wiley and Sons, Chichester - New York - Brisbane - Toronto - Singapore: 486-490.
- Rajfur, Z. (1994). "Photon emission from chemically perturbed yeast cells." J Biolumin Chemilumin **9**(2): 59-63.
- Rajfur, Z., M. Godlewski, et al. (1995). Interspecies differences of photo emission intensity for domestic animals spermatozoa cells. Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej: materiały IV Sympozjum Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN, Kraków 6-7 czerwca 1995. Kraków: 272-275.
- Rajfur, Z., P. Roy, et al. (2002). "Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins." Nat Cell Biol **4**(4): 286-293.
- Riesgo-Escovar, J. R., M. Jenni, et al. (1996). "The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye." Genes Dev **10**(21): 2759-2768.
- Rizzo, M. A., G. H. Springer, et al. (2004). "An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET." Nat Biotechnol **22**(4): 445-449.
- Roy, P., Z. Rajfur, et al. (2001). "Local photorelease of caged thymosin beta4 in locomoting keratocytes causes cell turning." J Cell Biol **153**(5): 1035-1048.
- Roy, P., Z. Rajfur, et al. (2002). "Microscope-based techniques to study cell adhesion and migration." Nat Cell Biol **4**(4): E91-96.
- Rubinstein, B., K. Jacobson, et al. (2005). "MULTISCALE TWO-DIMENSIONAL MODELING OF A MOTILE SIMPLE-SHAPED CELL." Multiscale Model Simul **3**(2): 413-439.
- Sabass, B., M. L. Gardel, et al. (2008). "High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances." Biophys J **94**(1): 207-220.
- Safer, D., R. Golla, et al. (1990). "Isolation of a 5-kilodalton actin-sequestering peptide from human blood platelets." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(7): 2536-2540.
- Scordino, A., A. Triglia, et al. (1996). "Influence of the presence of atrazine in water on the in-vivo delayed luminescence of *Acetabularia acetabulum*." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **32**(1-2): 11-17.

- Shtengel, G., J. A. Galbraith, et al. (2009). "Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3125-3130.
- Slawinski, J., A. Ezzahir, et al. (1992). "Stress-induced photon emission from perturbed organisms." Experientia **48**(11-12): 1041-1058.
- Sluss, H. K., Z. Han, et al. (1996). "A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*." Genes Dev **10**(21): 2745-2758.
- Stout, A. L. and D. Axelrod (1989). "Evanescent field excitation of fluorescence by epi-illumination microscopy." Appl Opt **28**(24): 5237-5242.
- Sydor, A. M., A. L. Su, et al. (1996). "Talin and vinculin play distinct roles in filopodial motility in the neuronal growth cone." J Cell Biol **134**(5): 1197-1207.
- Tanabe, T., M. Oyamada, et al. (2005). "Multiphoton excitation-evoked chromophore-assisted laser inactivation using green fluorescent protein." Nat Methods **2**(7): 503-505.
- Triglia, A., F. Grasso, et al. (1993). "Temperature dependence of the ultraweak spontaneous photon emission from soya seeds." Il Nuovo Cimento della Società Italiana di Fisica D **15** (11): 1361-1370.
- Tucker, G. C., B. Boyer, et al. (1990). "Collagen-mediated dispersion of NBT-II rat bladder carcinoma cells." Cancer Res **50**(1): 129-137.
- Vitriol, E. A., A. C. Uetrecht, et al. (2007). "Enhanced EGFP-chromophore-assisted laser inactivation using deficient cells rescued with functional EGFP-fusion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6702-6707.
- Wakelin, S. and C. R. Bagshaw (2003). "A prism combination for near isotropic fluorescence excitation by total internal reflection." J Microsc **209**(Pt 2): 143-148.
- Wang, F. S., J. S. Wolenski, et al. (1996). "Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones." Science **273**(5275): 660-663.
- Xia, Y., C. Makris, et al. (2000). "MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5243-5248.
- Yujiri, T., M. Ware, et al. (2000). "MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7272-7277.


dr Zenon Rajfur