

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Iva Švecová

Metody sledování buněčných procesů v reálném čase

Real-time monitoring of cellular processes – current approaches

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 25. 4. 2021

Iva Švecová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli MUDr. Zdeňku Hodnému, CSc. za čas, který mi věnoval při psaní této práce, za jeho odborné rady a skvělý přístup.

Abstrakt

Cílem této práce je poskytnout přehled metod využívaných ke sledování procesů v živých buňkách v reálném čase se zaměřením na sledování signálních drah. První, neobsáhlejší část práce se zabývá metodami využívajícími fluorescenci, poté se zmíníme také o bioluminiscenčních metodách a metodách nevyžadujících značení. V sekci o fluorescenčních metodách si nejprve představíme typy fluoroforů a příslušné způsoby značení. Následně se podíváme na jednotlivé přístupy. Začneme dvěma způsoby designu biosenzorů, následovat budou tři metody umožňující sledování kinetiky molekul, poté se seznámíme s metodou FLIM využívanou ke sledování prostředí kolem fluoroforu a skončíme s dvěma technikami vylepšujícími rozlišení. U každé techniky si vysvětlíme její princip a uvedeme si příklady využití. Na závěr se podíváme na příklad sledování signální dráhy.

Klíčová slova

fluorescence, bioluminiscence, biosenzory, FRET, fotobělicí techniky, FCS, FLIM, TIRF, superrezoluční mikroskopie, signální dráhy

Abstract

This thesis aims to provide an overview of real-time live-cell imaging methods with a focus on the signalling pathways. The first, most thorough section is about fluorescence methods and is followed by sections about bioluminescence and label-free methods. In the fluorescence section, we will at first introduce the types of fluorophores and respective labelling approaches. Subsequently, we will go through the individual techniques, starting with single-fluorophore and FRET biosensors, continuing with kinetic modelling approaches, a FLIM method used to detect changes in the cellular environment, and ending with two methods used to improve the resolution. With each technique, we will shortly explain the working principle and look at the examples at which this method was used. Finally, we will look at the example of live-cell imaging of one signalling cascade.

Key words

fluorescence, bioluminescence, biosensors, FRET, photobleaching techniques, FCS, FLIM, TIRF, superresolution microscopy, signalling pathways

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Metody využívající fluorescenci	2
2.1	Druhy fluoroforů	2
2.1.1	Fluorescenční proteiny	3
2.1.2	Organické fluorofory	4
2.1.3	Anorganické fluorofory – kvantové tečky.....	6
2.2	Přehled metod využívajících fluorescenci	6
2.2.1	Biosenzory založené na jediném fluoroforu	6
2.2.2	Metody využívající Försterův rezonanční přenos energie (FRET)	9
2.2.3	Obnovení fluorescence po fotovybělení (FRAP)	12
2.2.4	Ztráta fluorescence při fotobělení (FLIP).....	13
2.2.5	Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS).....	14
2.2.6	Mikroskopie doby života fluorescence (FLIM).....	15
2.2.7	Fluorescence s úplným vnitřním odrazem (TIRF).....	16
2.2.8	Superrezoluční mikroskopie	17
3	Metody využívající bioluminiscenci	20
4	Zobrazovací techniky nevyužívající značení.....	22
4.1	Metody zvyšující kontrast	22
4.2	Koherentní anti-Stokesův Ramanův rozptyl (CARS).....	22
4.3	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS).....	23
5	Signalizace pomocí růstových faktorů – příklad sledování signální dráhy	23
6	Závěr.....	24
7	Seznam literatury.....	26

1 Úvod

Sledování buněčných procesů tvoří neodmyslitelnou součást vědeckého výzkumu. Pokud chceme lépe pochopit, jak fungují živé organismy, je užitečné prozkoumat jejich základní stavební kameny – buňky. Na rozdíl od organismů samotných, z nichž mnohé jsou pozorovatelné pouhým okem, jsou ovšem buňky příliš malé, a proto potřebujeme speciální přístroje a přístupy, které nám umožní překonat rozlišení lidského oka a nahlédnout do tajů buněčného světa. Důležitost těchto technik v buněčné biologii ilustruje i studie Reigoto et al., kde autoři analýzou článků publikovaných v roce 2018 ve vybraných vědeckých časopisech zjistili, že zhruba 90 % prací v buněčně biologických časopisech zahrnovalo použití mikroskopie (Reigoto et al. 2021).

Mikroskopické techniky můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny podle toho, v jakém stavu buňky sledují. První skupina technik pracuje s buňkami, které prošly fixací. Takovéto buňky jsou již mrtvé, přičemž fixace umožňuje buňku a její obsah ‚zamrazit‘ v čase – při pozorování tak vidíme moment, ve kterém se buňka nacházela v okamžik fixace. Fixované buňky jsou následně upravovány tak, aby bylo možné vizualizovat struktury zájmu. Tento typ metod je možné použít pro sledování tkáňových řezů v histologii, využívá se pro detekci lokalizace cílového proteinu pomocí imunohistochemie, a díky metodám elektronové mikroskopie, které místo světla využívají elektrony, nám umožňuje nahlédnout téměř až na rozlišení jednotlivých atomů (Smith 2008).

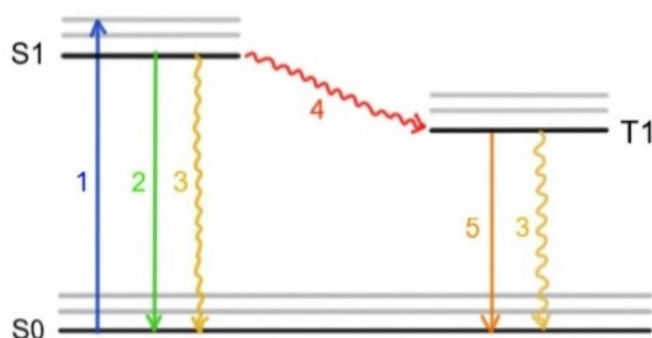
Cílem této práce je představit druhou skupinu metod, a to techniky, jejichž objektem sledování jsou živé buňky. Tyto metody mají oproti první jmenované skupině dvě výhody – umožňují pozorovat dynamické děje a mají menší sklon ke vzniku artefaktů. Techniky zobrazující fixované buňky, a především pak elektronová mikroskopie, nám můžou přinést informace o struktuře buněčných struktur, jako je například jaderný pór. Pokud ovšem chceme sledovat proces odehrávající se v určitém časovém rozmezí, poskytuje nám pozorování fixovaných buněk pouze omezené informace. Je to jako přirovnávat divadelní představení k fotografii z divadelního programu – fotografie nám může mnohé napovědět o obsahu představení, a pokud budeme mít k dispozici fotografie více, můžeme do jisté míry zrekonstruovat průběh hry, nikdy ale z fotografií nezískáme tak ucelený obrázek, jako je zhlédnutí celé hry. Druhou výhodou sledování živých buněk oproti buňkám fixovaným je menší pravděpodobnost tvorby tzv. artefaktů. Artefakty jsou struktury pozorovatelné na fixovaných buňkách, které ovšem nejsou buněčného původu a v buňce se objevily až arteficiálně vlivem fixace – jako příklad můžeme uvést tvorbu krystalků z média. Hlavním problémem artefaktů je to, že může dojít k jejich označení za strukturu buňce vlastní, z čehož mohou být následně vyvozovány mylné závěry. Jelikož při fixaci jsou buňky vystaveny mnoha chemickým činidlům, je pravděpodobnost, že v buňkách dojde k nějaké změně, větší než u živých buněk, které jsou udržovány v optimálním prostředí.

Jak již bylo řečeno, metody sledování procesů v živých buňkách jsou užitečné především pro zkoumání dynamických dějů odehrávajících se v buňce či mezi buňkami. Mezi tyto děje patří signalizace a obecně interakce mezi buňkami, pohyb buněk a jejich metabolismus. Jelikož studií, které se zabývají sledováním buněčných procesů na živých buňkách v reálném čase, je velké množství, zaměříme se v rešerši především na práce studující signální kaskády.

V první části této práce se seznámíme s přístupy, které ke sledování buněčných procesů využívají fluorescenci. Jelikož se jedná o nejrozsáhlejší oblast, věnujeme jí nejvíce prostoru. V dalších dvou částech se zaměříme na metody využívající bioluminiscenci a metody nevyžadující značení, jako jsou mikroskopie s fázovým kontrastem či mikroskopie využívající koherentní anti-Stokesův Ramanův rozptyl.

2 Metody využívající fluorescenci

Fluorescence je děj, ke kterému dochází při interakci elektromagnetického záření s elektrony v molekulách. Tento děj lze vysvětlit pomocí Jablonského diagramu znázorněného na obr. 1 (Jabłoński 1933).



Obr. 1 Jablonského diagram (S0, S1, T1 – energetické hladiny, 1 – absorpce, 2 – fluorescence, 3 – nezářivý přechod, 4 – mezisystémový přechod, 5 – fosforescence)

Elektrony v molekulách jsou umístěny do energetických hladin, jejichž rozestupy závisí na charakteru dané molekuly. Na diagramu jsou zakreslené tři energetické hladiny – S0, S1 a T1, přičemž čím výše je daná hladina, tím vyšší energii má elektron na této hladině. Pokud na molekulu dopadá elektromagnetické záření o vhodné energii, může dojít k absorpci fotonu elektronem z valenční vrstvy (označené S0) a k přesunu elektronu do vyšší energetické hladiny (na obrázku označena S1). Tento proces se označuje jako absorpce (obr. 1 – děj 1).

Po čase dojde k návratu elektronu zpět do původní energetické hladiny (S0). K tomu může dojít různými způsoby. První možností je vyzáření fotonu o vlnové délce odpovídající rozdílu energie mezi hladinami S1 a S0 – tento jev se označuje jako fluorescence (obr. 1 – děj 2).

Kromě fluorescence může dojít i k jiným, konkurenčním procesům. Elektron může energii předat nezářivými přechody, kdy nedojde k emisi fotonu, ale energie je disipována ve formě tepla (obr. 1 – děj 3). Tohoto se využívá při zhašení fluorescence pomocí tzv. zhašečů (v anglické literatuře označeno jako quenchers). Další možností je mezisystémový přechod (obr. 1 – děj 4), kdy se změní vzájemná orientace spinů elektronů, což vede ke změně energie dané hladiny (S1 má vyšší energii než T1). Následovat může vyzáření fotonu (tzv. fosforescence, obr. 1 – děj 5), případně nezářivý přechod. Přechod do tripletového stavu je u fluoroforů často nežádoucí, jelikož elektron v tomto stavu setrvává násobně déle než při fluorescenci, a během této doby fluorofor nemůže svítit.

2.1 Druhy fluoroforů

Jako fluorofory se obvykle využívají látky, pro které vlnová délka fotonu vyzářeného při fluorescenci (energetický rozdíl mezi S1 a S0) odpovídá viditelnému světlu. Pro zobrazování živých buněk je preferováno, aby excitační vlnová délka spadala do červené části viditelného spektra, protože tyto vlnové délky mají menší energii a jsou tak méně destruktivní. Vhodný fluorofor by měl dále mít co největší poměr fluorescence vůči nezářivým relaxacím (tento údaj je vyjádřen kvantovým výtěžkem), malou tendenci k mezisystémovému přechodu a dobrou stabilitu (Herman et al. nedatováno).

Fluorofory používané pro sledování buněčných dějů v reálném čase můžeme rozdělit do tří kategorií podle charakteru fluoroforu – fluorescenční proteiny, organické fluorofory a anorganické fluorofory, kam spadají především tzv. kvantové tečky (quantum dots).

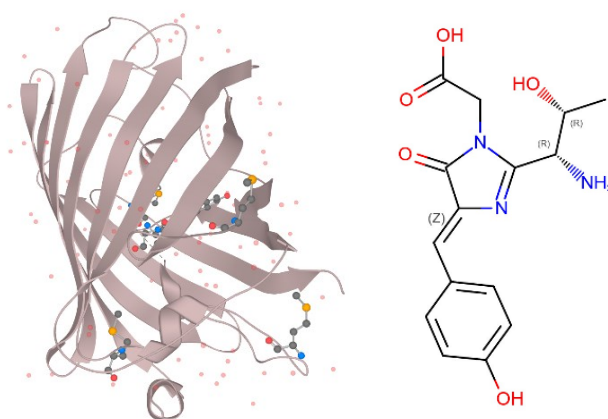
2.1.1 Fluorescenční proteiny

První významnou skupinou fluroforů jsou fluorescenční proteiny. Jedná se o proteiny, které mají schopnost fluoreskovat samy o sobě bez přidání dalšího fluoroforu.

Prvním objeveným a pravděpodobně i nejznámějším fluorescenčním proteinem je zelený fluorescenční protein (anglicky green fluorescent protein – GFP). GFP byl objeven skupinou Shimomury et al. při analýze bioluminiscenčního proteinu aequorinu z medúzy *Aequorea victoria*. Ve studii z roku 1962 autoři zmiňují, že spolu s aequorinem z medúzy izolovali i protein s výraznou zelenou fluorescencí při osvětlení UV (Shimomura et al. 1962). Důležitý průlom pro využití GFP nastal v 90. letech, kdy Prasher et al. naklonovali gen pro GFP a odhalili primární strukturu produktu (Prasher et al. 1992). Zároveň byly publikovány studie ukazující, že exprese GFP je možná i v jiných organismech a nevyžaduje přidání žádné další složky. Inouye & Tsuji et al. exprimovali GFP v *Escherichia coli* (Inouye a Tsuji 1994) a Chalfie et al. využili jak *E. coli*, tak *Caenorhabditis elegans* jako eukaryotický model (Chalfie et al. 1994; informace o GFP shrnuty v Tsien 1998). Tento objev ukázal, že GFP je možné exprimovat v jiných organismech, než ze kterého původně pochází, a lze ho tak použít ke sledování buněk a buněčných procesů.

V následujících letech došlo jak k objevu nových fluorescenčních proteinů z jiných organismů, např. DsRed z žahavce *Discosoma striata* (Matz et al. 1999), tak k vývoji nových variant odvozených od již známých fluorescenčních proteinů. K optimalizaci GFP pro fluorescenční značení a vytvoření tzv. vylepšeného GFP (enhanced GFP – EGFP) vedly např. mutace umožňující lepší skládání GFP při 37 °C, optimalizaci využití kodonů pro expresi v savčích buňkách či mutace způsobující redukci dvou excitačních maxim na jedno (Cormack et al. 1996).

Velké množství fluorescenčních proteinů včetně GFP má strukturu β -barelu (občas označována i jako β -can, jelikož tvarem připomíná plechovku), přičemž část zodpovědná za fluorescenci je složena z několika aminokyselin a nachází se ve středu β -barelu. Struktura GFP je vyobrazena na obr. 2A. Fluorescenční část GFP – p-hydroxybenzylidenimidazolinon (obr. 2B) – je složena ze tří aminokyselin – Ser65, Tyr66 a Gly67.



Obr. 2 (A) Terciární struktura zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a (B) vlastní fluorofor GFP p-hydroxybenzylidenimidazolinon (oboje převzato z <https://www.fpbases.org/protein/avgfp/> 1. 4. 2020)

Proteiny s podobnou strukturou se řadí do superrodiny proteinů podobných GFP (GFP-like superfamily), do které patří mimo jiné i DsRed a od něj odvozené fluorescenční proteiny (Shagin et al. 2004).

Existují ale i fluorescenční proteiny, které nesdílejí obvyklou strukturu β -barelu. Mezi ně patří např. některé z proteinů pokrývajících červenou a infračervenou část spektra, jako jsou například iFP2.0 nebo smURF (malý ultračervený fluorescenční protein – small ultra red fluorescent protein). Tyto proteiny ovšem nejsou plně autonomní, jelikož vyžadují vazbu žlučového barviva biliverdinu (Rodriguez et al. 2017).

V současné době jsou známy stovky až tisíce fluorescenčních proteinů pokrývající velkou část viditelného spektra. Informace o známých fluorescenčních proteinech jsou dostupné v otevřené databázi FPBase (www.fpbases.org), kterou lze zároveň využít k navrhování experimentů.

Fluorescenční proteiny jsou v současnosti velmi využívaným nástrojem. Jejich velkou výhodou oproti jiným skupinám fluoroforů je to, že je možné je produkovat v buňce vnesením genu pro daný fluorescenční protein. U takto geneticky upravených buněk tak odpadá potřeba vpravování externích fluoroforů a s tím i problém, jak dostat fluorofor přes buněčnou membránu, aniž by to buňky poškodilo.

Geneticky kódované fluorescenční proteiny je možné využít ke sledování genové exprese. Tato myšlenka byla nadnesena už ve studii Chalfieho et al., kde autoři zdůrazňovali fakt, že použití GFP na rozdíl od ostatních v té době používaných metod nevyžaduje vpravování substrátu do buňky (Chalfie et al. 1994). Gen pro GFP je možné umístit pod kontrolu promotoru zájmu a tím sledovat jeho aktivitu. Toho bylo využito např. ve studii Sunga et al., kde autoři zkoumali dynamiku NF- κ B v makrofázích po expozici bakteriálním lipopolysacharidem (LPS). K tomu využili fluorescenční protein mCherry spojený s proteinovým motivem PEST způsobujícím rychlejší degradaci, který umístili pod kontrolu promotoru TNF- α (Sung et al. 2014).

Fluorescenční proteiny je dále možné využívat ke sledování pohybů a interakcí proteinů. Do buňky je vpraven genetický konstrukt, který obsahuje gen pro fluorescenční protein spojený s genem pro protein zájmu. Po translaci se tak vytvoří fúzní protein, který lze sledovat sledováním fluorescenčního signálu. O metodách využívajících fluorescenční proteiny k sledování dynamiky proteinů bude více pojednáno v další části práce.

Přestože mnohé fúzní proteiny si zachovávají svou funkci, fluorescenční protein může ovlivnit skládání a fungování proteinu zájmu. Zde může hrát roli i to, do jaké oblasti proteinu zájmu je fluorescenční protein vnesen. Dalším problémem při používání fluorescenčních proteinů může představovat i tendence k oligomerizaci, která může dále ovlivnit fungování proteinu zájmu.

Jedním z možných řešení, které napomáhá zachování funkce proteinu zájmu, je použití tzv. rozdělených fluorescenčních proteinů (split fluorescence proteins). Jak název napovídá, fluorescenční protein je rozdělen na dvě části, přičemž jedna část je připojena k proteinu zájmu, a zbytek je exprimován nezávisle. Část připojená k proteinu zájmu je tak menší a představuje menší překážku ke složení do nativní konformace. Aby mohl být detekován fluorescenční signál, musí dojít ke spojení obou částí a vytvoření funkčního fluoroforu. Toho je možné využít i ke sledování interakcí proteinů, kdy je každá část připojena k jinému proteinu a až při interakci těchto dvou proteinů dochází k produkci fluorescence (Kamiyama et al. 2016).

Dalším problémem při využívání fluorescenčních proteinů je doba, po kterou dochází ke skládání fluorescenčního proteinu a protein ještě není fluorescenční. Tato doba může ovlivnit například sledování exprese z konkrétního promotoru, přes který se exprimuje fluorescenční protein.

Používání fluorescenčních proteinů s sebou nese několik dalších problémů – mnohé z fluorescenčních proteinů jsou málo jasné, mají malou fotostabilitu, jsou závislé na pH a potřebují kyslík, což zabraňuje jejich využití v anaerobních podmínkách. Tyto parametry jsou stále vylepšovány vývojem nových fluorescenčních proteinů. Při navrhování experimentů je ovšem třeba brát na tyto aspekty ohled (Specht et al. 2017; Rodriguez et al. 2017; Jensen 2012).

2.1.2 Organické fluorofory

Druhou využívanou skupinou jsou organické fluorofory. Jedná se o molekuly se systémem konjugovaných dvojných vazeb, který posouvá jejich absorpční a emisní maxima do viditelné části spektra. V současné době

existuje velké množství organických fluoroforů, z nichž mnohé jsou komerčně dostupné. Jako příklad uveďme řadu Alexa Fluor od firmy Invitrogen.

Výhodou organických fluoroforů oproti fluorescenčním proteinům je jejich velikost, která se pohybuje kolem 1 nm, oproti 2 – 5 nm u průměrného fluorescenčního proteinu (van de Linde et al. 2013). Mnohé organické fluorofory jsou také jasnější a stabilnější v porovnání s fluorescenčními proteiny.

Nevýhodou organických fluoroforů je nutnost dopravovat je do buňky z vnějšku, jelikož buňka není schopna si je sama vyrobit. Pokud chceme organické fluorofory využít k vizualizaci konkrétních struktur, je nutné je připojit k dané molekule a ideálně zajistit, aby nepřipojené fluorofory nebyly fluorescenční, a tudíž nevytvářely světelné pozadí, které by kazilo vyhodnocování.

Během let bylo vyvinuto velké množství metod, jak připojit fluorescenční značku k molekule zájmu. Tyto metody můžeme rozdělit do několika skupin – enzymatické značení, značení využívající peptidové tagy, chemické značení a značení využívající nepřirozených aminokyselin.

Enzymatické značení můžeme dále dělit na dvě podskupiny, a to na tzv. sebeznačící ‚self-labelling‘ značky a značení pomocí externího enzymu.

Mezi sebeznačící značky patří mimo jiné SNAP-tag, CLIP-tag, TMP-tag či Halo-tag. U tohoto typu značení je na protein zájmu geneticky připojen protein (například halogen dehydrogenáza u Halo-tag), který je schopen reagovat s fluoroforem a připojit ho sám na sebe – po přidání fluoroforu tak dojde k označení proteinu a tím i proteinu zájmu. Výhodou této metody v porovnání s jinými způsoby připojování organických fluoroforů je velikost proteinu fúzovaného k proteinu zájmu, která podobně jako u fluorescenčních proteinů může interferovat se správným skládáním či funkcí daného proteinu. Výhodou je poměrně velká rychlost a selektivita značení.

Na rozdíl od sebeznačících značek není u značení pomocí externího enzymu enzym připojen k proteinu zájmu. K proteinu zájmu je připojen pouze krátký peptid, který slouží pro rozpoznání externím enzymem. Mezi tento typ značení patří například využití bakteriální biotin ligázy, která připojuje biotin na 15 aminokyselin dlouhou peptidovou sekvenci. Takto značené místo lze následně vizualizovat pomocí streptavidinu fúzovaného s fluorescenční značkou. Výhodou tohoto přístupu je malá velikost fúzní značky, nevýhodou velké množství komponent podílejících se na značení, a v případě biotin ligázy i potenciální pozadí vzniklé značením endogenně biotinylovaných proteinů.

Do skupiny využívající peptidové tagy patří tetracysteinové a tetraserinové tagy. Tyto peptidové sekvence jsou geneticky připojeny k proteinu zájmu a nekovalentně váží fluorescenční značky. K peptidu obsahující tetracysteinovou sekvenci se připojují značky na bázi arsenu, např. FiAsH, zatímco tetraserinová sekvence se váže k značkám obsahujícím bor, jako je např. RhoBo. Výhodou tohoto typu značení je malá velikost fúzní značky a potenciálně malá míra fluorescenčního pozadí, jelikož nenavázané značky nejsou fluorescenční. Problém může představovat nespecifické značení podobných sekvencí endogenně se vyskytujících v proteinech a potenciálně toxické účinky arsenu obsaženého ve značkách.

Chemické značení využívá reakci reaktivní skupiny umístěné na fluoroforu se skupinou obsaženou v molekule zájmu. K chemickému značení lze využít například aminové či thiolové skupiny. Jelikož se ale v buňce vyskytuje velké množství molekul obsahujících tyto skupiny, je toto značení značně nespecifické, a tudíž nevhodné pro použití v buňkách. Skupinou reakcí relevantních pro značení molekul v živých buňkách je tzv. klik chemie (v angličtině ‚click chemistry‘), skupina chemických reakcí probíhajících s vysokým výtěžkem a stereospecifitou v mírných reakčních podmínkách (Kolb et al. 2001). Příkladem budiž cykloadice cyklooktynu

s azidoskupinou, která byla použita ke sledování dynamiky glykanu (Baskin et al. 2007). Jak je patrné z příkladu, výhodou těchto metod může být sledování molekul neproteinového charakteru, dále také malá velikost značky.

Poslední skupinou diskutovanou v této práci jsou metody využívající nepřirozených aminokyselin. Fluorescenční aminokyselina je do proteinu vpravena přeměnou amber stop kodonu (UAG) na kodon kódující danou aminokyselinu, přičemž v buňce musí být přítomna tRNA s příslušným antikodonem a navázanou fluorescenční aminokyselinou. Tuto metodu je možné využít i pro nepřímé značení, kdy je do proteinu vpravena aminokyselina s vhodnou reaktivní skupinou, ke které je až postranslačně připojena fluorescenční značka (Hilderbrand 2010; Lavis a Raines 2014; Sahoo 2012; Specht et al. 2017; Wysocki a Lavis 2011).

2.1.3 Anorganické fluorofory – kvantové tečky

Třetí skupina fluoroforů je anorganického původu – jedná se o tzv. kvantové tečky (v angličtině „quantum dots“). Kvantové tečky jsou nanočástice složené z polovodičového jádra, které je obaleno slupkou z jiného polovodičového materiálu, která chrání jádro před degradací či oxidací. Povrch nanočástice je pokryt vrstvou napomáhající rozpustnosti ve vodě a umožňující navázání na vizualizovanou strukturu. Povrch kvantové tečky je možné upravit např. pomocí protilátek či streptavidinu vázajícího se na biotinylované proteiny.

Původcem fluorescence kvantových teček je polovodičové jádro, kde dochází k přechodu elektronu mezi vodivostním a valenčním pásem. Vlnová délka emitovaného záření je závislá na velikosti jádra – větší jádro odpovídá delším vlnovým délkám. Velkou výhodou kvantových teček oproti jiným druhům fluoroforů je široký pás vlnových délek, ve kterém je možné kvantovou tečku excitovat, a zároveň úzké emisní spektrum. Dalšími výhodami jsou velká jasnost, uniformní intenzita fluorescence ve všech směrech a malá tendence k fotobělení („fotobleaching“) umožňující vizualizaci v řádech desítek sekund.

Nevýhodou kvantových teček je jejich velikost v řádu jednotek až desítek nanometrů (se zahrnutím hydratačního obalu), která zároveň znesnadňuje jejich intracelulární použití. Druhým problémem je obsah těžkých kovů, jako jsou kadmium nebo olovo. Tyto prvky jsou obsaženy v jádru kvantové tečky, nejsou tak v přímém kontaktu s obsahem buňky. Potenciálně ovšem může dojít k jejich uniknutí z kvantové tečky a toxickému působení na buňku (Resch-genger et al. 2008; Walling et al. 2009; Jensen 2013).

2.2 Přehled metod využívajících fluorescenci

2.2.1 Biosenzory založené na jediném fluoroforu

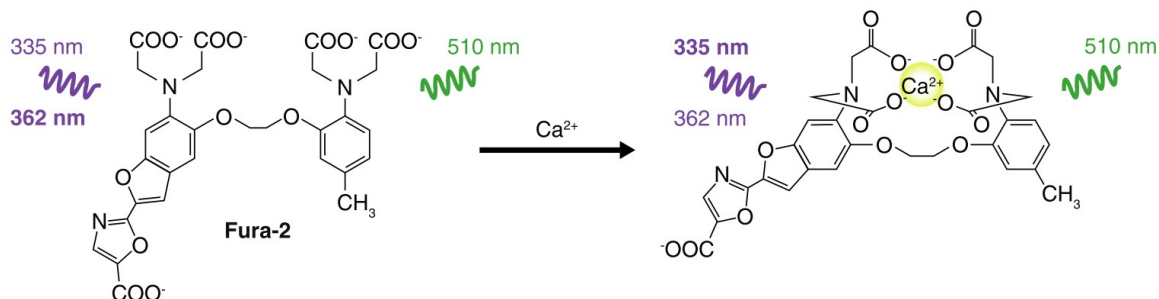
První skupina metod, kterou se budeme zabývat, využívá ke sledování procesů v buňkách jediného fluoroforu.

Nejjednodušší možností, jak sledovat pohyb molekuly v buňce, je opatřit molekulu zájmu fluoroforem, ať už genetickou fúzí s fluorescenčním proteinem či připojením fluoroforu jednou z metod diskutovaných v předchozích oddílech. Toho bylo využito např. pro sledování dynamiky cytoskeletu (Mimori-Kiyosue et al. 2000).

Pro sledování dynamických změn v buňce, např. při studiu signalizačních drah, je ovšem lepší využít biosenzor, sestávající se z části reportérové a části detekční. Detekční část je schopna zaznamenat změnu sledovaného jevu, např. zvýšení koncentrace Ca^{2+} , a předat tuto informaci reportérové části, která ji převede v zaznamatelný signál (Ni et al. 2018). V této části se zabýváme případy, kdy reportérovou část představuje jediný fluorofor. V takovém případě je většinou změna zaznamenána jako nárůst fluorescence.

Jednou z prvních součástí signálních kaskád studovaných pomocí fluorescenční mikroskopie byly vápenaté kationty – důležitý druhý posel. Tato oblast se pojí se jménem nobelisty Rogera Y. Tsiena, s nímž jsme se už setkali u počátků studia GFP. V 80. letech představil sérii syntetických vápenatých indikátorů založených na

chelatačním činidlem EGTA (ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina) (Tsien 1980; 1981). Přestože se jednalo o velký průlom ve sledování vápenatých kationtů, takto vyvinuté biosenzory měly několik limitací, jako například krátkou excitační vlnovou délku či nízký kvantový výtěžek a afinitu k jiným iontům. V roce 1985 bylo proto publikováno šest vylepšených biosenzorů, mezi nimi i dodnes populární Fura-2, znázorněna na obr. 3.

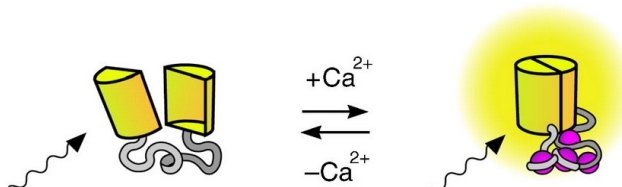


Obr. 3 Biosenzor Ca^{2+} Fura-2 (Ni et al. 2018)

Oproti předchozí generaci poskytovaly tyto biosenzory silnější signál a menší afinitu k ostatním iontům. Další výhodou byl posun excitační vlnové délky po vazbě vápenatého kationtu. Jak je ukázáno na obr. 3, volný biosenzor Fura-2 má excitační maximum 362 nm, přičemž po vazbě Ca^{2+} dojde k posunu maxima do 335 nm (Grynkiewicz et al. 1985).

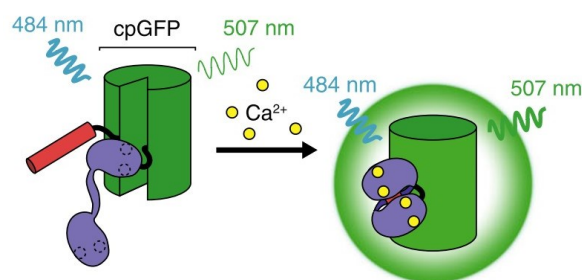
Další průlom ve sledování vápenatých iontů nastal s vývojem fluorescenčních proteinů a vytvořením geneticky kódovaných vápenatých indikátorů (GECI – genetically encoded calcium indicators). Jedny z prvních GECI byly založeny na použití dvou fluorescenčních proteinů a Försterově rezonančním přenosu energie (FRET) – touto skupinou se budeme zabývat v další sekci. Mezi první biosenzory používající jediný fluorescenční protein patří Camgaroo1 (Baird et al. 1999), pericam (Nagai et al. 2001) a G-CaMP (Nakai et al. 2001). Tyto senzory jsou založeny na tzv. kruhově permutovaném fluorescenčním proteinu (cpFP – circularly permuted fluorescent protein). To znamená, že původní N- a C-konec fluorescenčního proteinu jsou spojeny, a proteinové vlákno je přestřiženo na jiném konci, čímž dojde k vytvoření nových konců.

U biosenzoru Camgaroo1 byl do EYFP vložen kalmmodulin, který slouží jako detektor Ca^{2+} a zároveň ve volném stavu omezuje fluorescenci EYFP změnou konformace fluorescenčního proteinu. Jak je zobrazeno na obr. 4, vazba Ca^{2+} na kalmmodulin vede ke správnému složení EYFP a k 7- až 8-násobnému vzrůstu fluorescence (Baird et al. 1999).



Obr. 4 Biosenzor Ca^{2+} Camgaroo1 (Pérez Koldenkova a Nagai 2013)

Biosenzory pericam a G-CaMP jsou založeny na stejném principu, liší se akorát využitím jiného fluorescenčního proteinu. Do cpFP je vložen kalmmodulin a peptid M13, který je odvozen od CaM-vazebné oblasti kinázy lehkého řetězce myosinu. Po vazbě Ca^{2+} na kalmmodulin dochází k vazbě M13 kalmmodulinem a následně k správnému uspořádání fluoroforu a ke zvýšení fluorescence (Nagai et al. 2001; Nakai et al. 2001). Fungování G-CaMP, který obsahuje GFP, je ukázáno na obr. 5.



Obr. 5 Biosenzor Ca^{2+} G-CaMP (Ni et al. 2018)

Během následujících let byly biosenzory dále vylepšovány a upravovány pro využití v různých buněčných kompartmentech (Depaoli et al. 2019).

Dalším důležitým druhým poslem je cAMP. První vyvinuté biosenzory cAMP fungovaly pomocí FRET, proto se jim budeme věnovat až v další sekci. Později byly vyvinuty i biosenzory založené na jediném fluoroforu – jejich výhodou je to, že oproti ratiometrickým FRET biosenzorům, kde je potřeba současně sledovat dvě vlnové délky, stačí pro intenzimetrické jednofluoroforové biosenzory pozorovat pouze jedinou vlnovou délku. To umožňuje sledovat více molekul svítících v různých vlnových délkách zároveň. Biosenzory pro cAMP mohou být založeny na inzerci některého z cAMP receptorů. Například EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) byl využit mimo jiné pro konstrukci senzorů (Pink) Flamingo (Kitaguchi et al. 2013; Odaoka et al. 2014; Harada et al. 2017), zatímco proteinkináza A (PKA) je součástí R-Flnca (Ohta et al. 2018) či cAMPr (Hackley et al. 2018).

Podobné biosenzory byly vytvořeny i pro cGMP připojením regulační části proteinkinázy G (PKG), která váže cGMP ke kruhově permutovanému EGFP (Nausch et al. 2008).

Diacylglycerol (DAG) je druhým poslem způsobujícím aktivaci proteinkinázy C (PKC). Podobně jako u cAMP a cGMP, u biosenzorů DAG byla příslušná kináza – zde PKC – připojena k fluorescenčnímu proteinu a využita k detekci DAG (Oancea a Meyer 1998; Oancea et al. 1998; Dries et al. 2007; Tewson et al. 2012).

Inozitol 1,4,5-trifosfát (IP3) je druhý posel, jehož role v signálních drahách je propojena s Ca^{2+} . Na rozdíl od Ca^{2+} je ovšem vývoj biosenzorů pro IP3 méně pokročilý. Velká část biosenzorů funguje na principu FRET. Biosenzory využívající jediný fluorescenční protein obsahují pleckstrin-homologní doménu (PH) fosfolipázy C, která váže IP3 (Hirose et al. 1999).

Důležitou roli v signálních kaskádách hrají kinázy. Většina biosenzorů kinázové aktivity využívá FRET. Realizovány byly ovšem i systémy využívající jediného fluoroforu – do cirkulárně permutovaného fluorescenčního proteinu byl vložen substrát pro studovanou kinázu a FHA1 – vazebnou doménu pro fosforylovaný peptid. Podobně jako u biosenzoru G-CaMP i zde detekce probíhala konformační změnou, která upravila fluorescenční protein do správného tvaru a způsobila nárůst fluorescence. Důvodem konformační změny je zde fosforylace substrátu sledovanou kinázou a následná vazba domény FHA1 na fosforylovaný substrát. Tímto způsobem bylo detekováno fungování několika kináz – konkrétně PKA, PKC a PKB (proteinkináza B, také označovaná jako Akt) (Mehta et al. 2018). Jiný typ receptorů kinázové aktivity využitý např. u Janus kinázy (JNK), p38, PKA, či ERK využívá transport fluoroforu mezi cytoplazmou a jádrem – k fluorescenčnímu proteinu je připojena sekvence s jaderným exportním signálem (NES) a jaderným lokalizačním signálem (NLS). Fosforylace biosenzoru vede k potlačení vlivu NLS a zvýšení vlivu NES, čímž dojde k dočasnému navýšení obsahu biosenzoru v cytoplazmě (Regot et al. 2014).

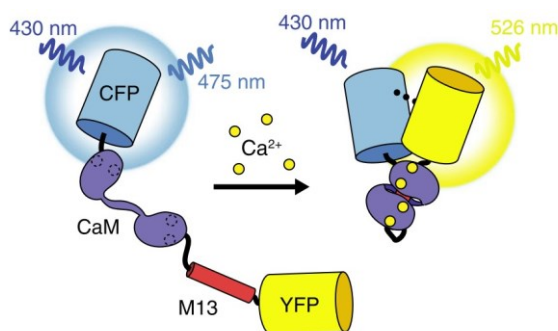
Důležitou efektorovou součástí signálních kaskád je i změna genové exprese. Tu je možné sledovat pomocí fluorescenčních proteinů umístěných pod vliv příslušného promotoru. Toto nastavení bylo použito v již diskutovaném experimentu sledujícím dynamiku signalizace NF- κ B, kdy byl fluorescenční protein mCherry umístěn pod kontrolu promotoru TNF- α (Sung et al. 2014). Tento postup byl využit i pro sledování dynamiky nádorového supresorového proteinu p53, kdy byl do jedné alely genu *TP53* vložen gen pro fluorescenční protein Venus, a následně byla sledována úroveň fluorescence v jádrech buněk opůsobených cis-platinou (Paek et al. 2016). Ke sledování dynamiky transkripčního faktoru NF- κ B byl také použit fúzní protein RelA-GFP, kde RelA je jedna z podjednotek NF- κ B. Buňky byly vystaveny působení LPS (Sung et al. 2014), resp. TNF- α (Lee et al. 2016), načež byl zaznamenáván transport značeného RelA do jádra.

2.2.2 Metody využívající Försterův rezonanční přenos energie (FRET)

V předchozí sekci o biosenzorech využívajících jediný fluorofor bylo několikrát zmíněno, že velká část biosenzorů pro danou molekulu či proces využívá Försterův rezonanční přenos energie (FRET). Nyní si vysvětlíme, jak FRET funguje, a podíváme se na biosenzory, ve kterých je aplikován.

Försterův rezonanční přenos energie (Förster resonance energy transfer – FRET) je nezářivý přenos energie mezi excitovaným stavem donorového fluoroforu a základním stavem akceptorového fluoroforu. Účinnost FRET mezi dvěma fluorofory závisí mimo jiné na jejich orientaci a vzdálenosti mezi donorem a akceptorem, přičemž klesá se šestou mocninou vzdálenosti. Proto FRET efektivně funguje jen na velmi krátké vzdálenosti, zhruba do 10 nm.

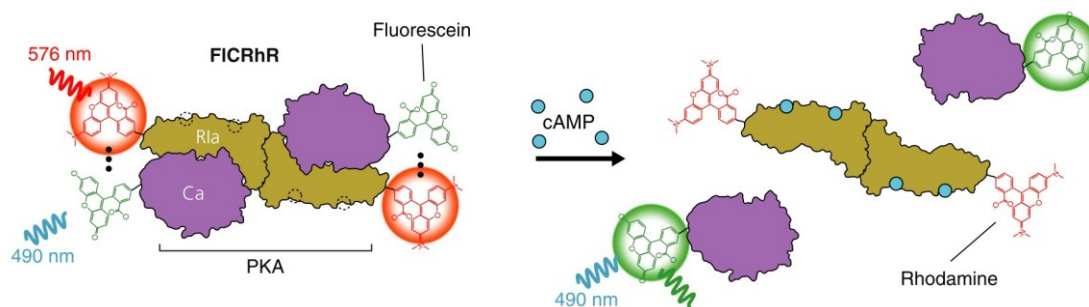
Této vlastnosti se v praxi využívá právě u metod využívajících FRET. Během experimentu jsou sledovány dva fluorofory, přičemž je vzorek excitován vlnovou délkou odpovídající excitačnímu maximu donoru. Pokud jsou fluorofory od sebe daleko, je zaznamenáván pouze signál odpovídající emisní vlnové délce donoru. V okamžiku, kdy se k sobě fluorofory dostanou dostatečně blízko (kvůli interakci dvou sledovaných proteinů či změně konformace biosenzoru), dojde k poklesu fluorescence donoru a nárůstu fluorescence akceptoru (Jares-Erijman a Jovin 2003). Tato změna je ukázána na obr. 6, kde je vyobrazen biosenzor Ca²⁺ cameleon.



Obr. 6 Biosenzor Ca²⁺ cameleon (Ni et al. 2018)

I v této sekci začneme s biosenzory vápenatých iontů. Prvními z biosenzorů Ca²⁺ využívajících FRET byly FIP-CB_{SM}, sestávající se ze dvou fluorescenčních proteinů odvozených od GFP (červeného a modrého) propojených CaM-vazebnou doménou z kinázy lehkého řetězce myosinu z hladkého svalů (Romoser et al. 1997), a indikátory cameleon, obsahující modrý/tyrkysový fluorescenční protein, kalmodulin, kalmodulin vázící peptid M13 a zelený/žlutý fluorescenční protein (Miyawaki et al. 1997). U FIP-CB_{SM} dochází po zvýšení koncentrace Ca²⁺ k vazbě kalmodulinu na CaM-vazebnou doménu, čímž dojde k oddálení dvou fluorescenčních proteinů a k přerušení FRET. U cameleon se Ca²⁺ váže na kalmodulin obsažený v biosenzoru, což naopak vede k přiblížení fluoroforů a zvýšení FRET, jak je ukázáno na obr. 6.

Později byly vyvinuty nové, vylepšené biosenzory Ca^{2+} , např. biosenzory TN využívající místo kalmodulinu troponin C, Ca^{2+} vazebný protein ze srdeční a příčně pruhované svaloviny. Výhodou biosenzorů založených na troponinu C je to, že tento protein má na rozdíl od kalmodulinu, zapojeného do velkého množství regulačních drah, funkci jen při svalové kontrakci. Tudíž je mnohem méně pravděpodobné, že fungování příslušného biosenzoru bude ovlivněno regulačními mechanismy buňky, čímž by mohlo dojít ke zkreslení výsledků experimentu (Heim a Griesbeck 2004). Prováděly se však i optimalizace již existujících biosenzorů (např. skupiny cameleon) pomocí počítačového modelování a následné cílené úpravy detekční části biosenzoru (Palmer et al. 2006).



Obr. 7 Biosenzor cAMP FICRHR (Ni et al. 2018)

Jak již bylo zmíněno, první biosenzory pro cAMP využívaly FRET. Jedním z nich byl biosenzor FICRHR (podle autorů vyslovováno jako ‚flicker‘), zobrazený na obr. 7. FICRHR byl založen na struktuře PKA a dvou organických fluoroforech – rhodaminu a fluoresceinu. Rhodamin byl připojen k regulačním podjednotkám PKA, fluorescein ke katalytickým podjednotkám PKA a vzorek byl excitován vlnovou délkou odpovídající absorpci fluoresceinu. Ve volném stavu jsou oba druhy podjednotek spojené, fluorofory jsou tak blízko u sebe a dochází k FRET od fluoresceinu k rhodaminu – zaznamenáván je červený signál rhodaminu. Po vazbě cAMP na regulační podjednotky dojde k uvolnění katalytických podjednotek, čímž dojde k přerušení FRET a signál se změní z červeného na zelený, jak je zobrazeno na obr. 7 (Adams et al. 1991). S objevem GFP následoval vývoj geneticky kódovaných biosenzorů. I zde byl využit stejný přístup jako při konstrukci FICRHR, ovšem organické fluorofory byly nahrazeny fluorescenčními proteiny odvozenými od GFP (Zaccolo et al. 2000). Výhodou použití fluorescenčních proteinů oproti organickým fluoroforům byla snadnost provedení experimentu, jelikož FICRHR bylo nutné syntetizovat chemicky in vitro a dopravovat do buňky mikroinjekcí, zatímco biosenzory využívající fluorescenční proteiny si upravená buňka již vyráběla sama.

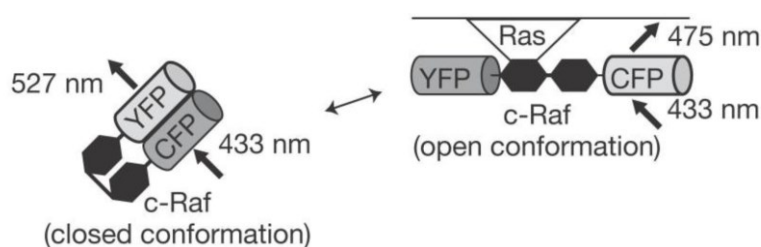
Podobně jako u biosenzorů využívajících jediného fluoroforu, i u biosenzorů FRET byl pro detekci cAMP použit EPAC (DiPilato et al. 2004; Nikolaev et al. 2004; Ponsioen et al. 2004). Tyto biosenzory byly dále upravovány a optimalizovány (Klarenbeek et al. 2015). cAMP je možné sledovat i nepřímo pozorováním aktivity PKA, která je aktivována cAMP (Nagai et al. 2000).

FRET biosenzory existují i pro cGMP. Mezi první vyvinuté biosenzory patří CGY (Sato et al. 2000) a cygnet (Honda et al. 2001), přičemž v obou případech tvoří detekční část cGMP-dependentní proteinkináza (cGPK). Později byly vyvinuté optimalizované biosenzory cGMP využívající pouze část kinázy cGPK, respektive fosfodiesterázy (Nikolaev et al. 2006; Niino et al. 2009).

Biosenzory využívající FRET byly vyvinuty i pro diacylglycerol (DAG). Stejně jako u biosenzorů s jediným fluoroforem, i zde byla využita část PKC vážící DAG (Sato et al. 2006).

Mezi biosenzory FRET pro inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) patří LIBRA (Tanimura et al. 2004; 2009), fretino (Sato et al. 2005) a IRIS (Matsu-ura et al. 2006). Tyto biosenzory využívají části IP3-receptoru (IP3R) s afinitou k IP3.

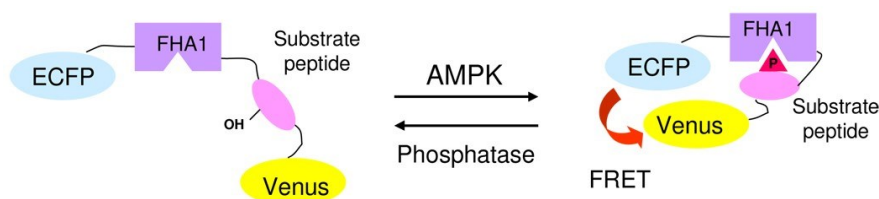
Nyní se podívejme na biosenzory kináz. Ty můžeme rozdělit do dvou kategorií – biosenzory aktivace a biosenzory aktivity. Biosenzory aktivace obsahují část detekující proces, který aktivuje sledovanou kinázu (např. vazba ,upstream‘ kinázy). Pokud jsou tyto biosenzory aktivovány, znamená to, že byla pravděpodobně aktivována i sledovaná kináza. Druhou skupinou jsou biosenzory aktivity, které jsou samy fosforylovány sledovanou kinázou, a tak signalizují její aktivitu (Depaoli et al. 2019). Mezi biosenzory aktivace patří např. Prin-C-Raf detekující aktivaci kinázy C-Raf. Tento sensor obsahuje dva fluorescenční proteiny YFP a CFP, mezi kterými je umístěna C- a N-koncová část c-Raf. Na obr. 8 je ukázána konformační změna po vazbě Ras na membráně (Terai a Matsuda 2005).



Obr. 8 Biosenzor aktivace c-Raf Prin-C-Raf (Terai a Matsuda 2005)

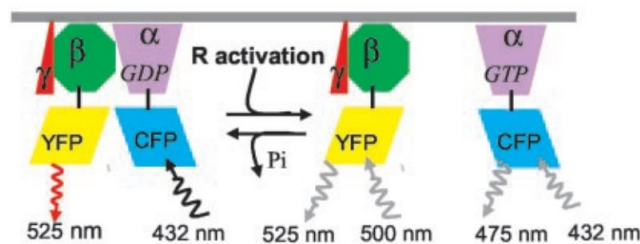
Dalším příkladem aktivačního biosenzoru je Miu2 detekující aktivaci ERK. Tento biosenzor má podobné složení jako Prin-C-Raf, přičemž místo části c-Raf obsahuje ERK. Po vazbě ,upstream‘ kinázy MEK dochází ke konformační změně a ke zvýšení FRET (Fujioka et al. 2006).

Mezi aktivní biosenzory patří např. AMPKAR detekující fungování AMP-dependentní proteinkinázy spojené s energetickým stresem. Detekční část AMPKAR tvoří substrát této kinázy a FHA1 vázící fosforylovaný peptid. Jak je ukázáno na obr. 9, po fosforylaci dojde ke konformační změně a zvýšení FRET (Tsou et al. 2011). Dalším biosenzorem je AKAR detekující aktivitu PKA. Jeho struktura je podobná AMPKAR, ovšem místo FHA1 využívá jinou doménu vázící fosforylovaný peptid, a to 14-3-3 τ (Zhang et al. 2001). Přehled existujících biosenzorů obou druhů je uveden ve studii Oldacha a Zhanga (Oldach a Zhang 2014).



Obr. 9 Biosenzor aktivity AMPK AMPKAR (Tsou et al. 2011)

FRET byl použit i ke sledování aktivace receptorů. U receptorů spojených s G-proteiny byla různými fluorescenčními proteiny označena α , resp. $\beta\gamma$ podjednotka. Po aktivaci receptoru došlo k disociaci α podjednotky od $\beta\gamma$, čímž se od sebe oddálily fluorescenční proteiny a došlo k přerušení FRET, jak je ukázáno na obr. 10 (Azpiazu a Gautam 2004).



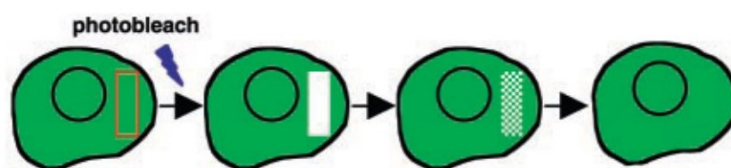
Obr. 10 Sledování aktivace receptorů sprážených s G-proteiny (Azpiazu a Gautam 2004)

Pomocí FRET byla sledována i dimerizace receptoru pro receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor – EGF, EGF receptor – EGFR). K buňkám byla přidána směs EGF značeného dvěma různými organickými fluorofory (Cy3 a Cy5). Při dimerizaci mohlo dojít k přiblížení dvou částí EGFR, kde každá část EGFR měla připojený jinak značený EGF. To bylo zaznamenáno jako nárůst FRET od Cy3-EGF k Cy5-EGF. Tato studie používala zároveň i metodu fluorescence totálního vnitřního odrazu (TIRF), o které bude pojednáno v jedné z následujících sekcí (Sako et al. 2000).

V následujících třech sekcích se budeme zabývat metodami určenými ke sledování kinetiky buněčných dějů. Jedná se o metody obnovení fluorescence po fotovybělení (fluorescence recovery after photobleaching – FRAP), ztráta fluorescence při fotobělení (fluorescence loss in photobleaching – FLIP) a fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy – FCS).

2.2.3 Obnovení fluorescence po fotovybělení (FRAP)

Obnovení fluorescence po fotovybělení (fluorescence recovery after photobleaching – FRAP) je první metoda využívaná ke sledování kinetiky buněčných dějů a komponent. Fotovybělení znamená nevratné poškození fluoroforu vlivem chemické přeměny a tím způsobenou ztrátu fluorescence (poznámka k pojmosloví – jako fotovybělení označujeme v této práci situaci, kdy je kompletně potlačena fluorescence vybrané části, zatímco jako fotobělení nazýváme proces, kterým k tomu dochází). Principem FRAP je fotovybělení malé části buňky laserovým pulsem o vysoké intenzitě, což vede k dočasné ztrátě fluorescence dané oblasti. Následně je sledována kinetika obnovení fluorescence, což je způsobeno přesunem stále fungujících fluoroforů do původně vybělené oblasti (Phair a Misteli 2001) – znázorněno na obr. 11.



Obr. 11 Schéma experimentu FRAP (Lippincott-Schwartz a Patterson 2003)

Podle rychlosti obnovení fluorescence v dané oblasti jsou následně vyhodnocovány kinetické parametry sledované molekuly, především difúzní koeficient a procento mobilních fluoroforů. Difúzní koeficient kvantifikuje tendenci pohybu sledované molekuly bez započtení toku či aktivního transportu. Vyvozování závěrů o kinetice dané molekuly ovšem není přímočaré, jelikož naměřené parametry může ovlivnit více faktorů, např. viskozita prostředí daná teplotou či aktivní transport (Lippincott-Schwartz et al. 2001).

Metoda FRAP byla vyvinuta pro studium laterální difúze lipidů a proteinů v membráně (Axelrod et al. 1976). První experimenty využívaly ke značení membránových proteinů organické fluorofory, např. fluorescein (Edidin et al. 1976). Po objevu GFP došlo k širokému využití tohoto fluorescenčního proteinu v experimentech FRAP. FRAP bylo následně užito pro studium vnitrobuněčného membránového systému a

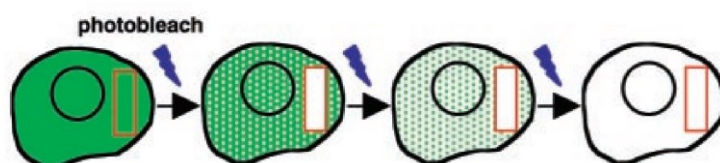
sekrečních drah (Cole et al. 1996; Wu et al. 2001; Nikonov et al. 2002). FRAP byl dále uplatněn ke studiu mobility jaderných proteinů (Phair a Misteli 2001).

FRAP byl použit i ke studiu receptorů, a to jak povrchových, tak intracelulárních. Glukokortikoidový receptor patří mezi intracelulární receptory a působí v jádře, kde interaguje s transkripčními faktory a rekrutuje některé koaktivátory a korepresory. Cílem studie McNally et al. 2000 bylo zjistit, zdali receptor zůstává připojený na rozpoznávané místo po celou dobu přítomnosti ligandu, či zda s ním interaguje pouze přechodně mechanismem označeným jako ‚uhod‘ a ‚běž‘ (anglicky ‚hit and run‘). Použitím FRAP na glukokortikoidový receptor značený GFP autoři zjistili, že fluorescence se ve vyběleném místě rychle obnovuje, a tudíž dochází k rychlé výměně obsazeného receptoru mezi vazebným místem a nukleoplazmou (McNally et al. 2000).

FRAP byl dále využit ke sledování dynamiky G-proteinů a receptorů spřažených s G-proteiny. Azpiazu a Gautam sledováním těchto molekul pomocí FRAP usoudili, že během signalizace spolu G-proteiny a příslušné receptory volně kolidují, přičemž nedochází k tvorbě multimolekulárních komplexů (Azpiazu a Gautam 2004). Toto pozorování bylo dalšími studii rozporováno, nicméně další experimenty FRAP podpořily teorii, že většina receptorů a G-proteinů není asociovaná (Qin et al. 2008).

2.2.4 Ztráta fluorescence při fotobělení (FLIP)

Ztráta fluorescence při fotobělení (fluorescence loss in photobleaching – FLIP) je příbuzná metoda k FRAP. Při FLIP dochází k opakovanému fotobělení jedné oblasti, přičemž ztráta fluorescence je sledována mimo tuto oblast. Schéma experimentu je ukázáno na obr. 12. Toho je možné použít jak ke sledování dynamiky molekul (podobně jako u FRAP), tak ke zkoumání kontinuity buněčných kompartmentů (Phair a Misteli 2001; Lippincott-Schwartz et al. 2001).



Obr. 12 Schéma FLIP experimentu (Lippincott-Schwartz a Patterson 2003)

Tato metoda byla představena ve studii Coleho et al. v roce 1996 pro sledování kontinuity membrán Golgiho aparátu (GA), respektive endoplazmatického retikula (ER). Autoři v experimentu opakovaně působili silným laserovým pulzem na část GA, resp. ER, obsahujících β -1,4-galaktosyltransferázu značenou GFP, a ukázali, že po několika minutách dojde k vybělení celé organely, u ER včetně jaderné membrány. To ukazuje, že značená β -1,4-galaktosyltransferáza se může volně laterálně pohybovat po celém GA, resp. ER včetně jaderné membrány. U GA byla ovšem pozorována odlišná rychlost bělení různých oblastí, což může být způsobeno rozdílnou prostupností různých částí GA pro sledovaný enzym.

Metoda FLIP byla ke studiu ER a GA využita i v dalších pracích, např. pro studium změn těchto organel během mitózy. Autoři zjistili, že během mitózy se proteiny rezidentní v GA nachází v ER, čímž podpořili teorii, že během mitózy dochází k absorpci GA do membránového systému ER (Zaal et al. 1999).

Metoda FLIP spolu s FRAP našla dále využití např. pro studium špatně sbalených proteinů v membránách ER (Nehls et al. 2000) či mobility proteinů v jádře, jak bylo již zmiňováno v sekci o FRAP (Phair a Misteli 2000).

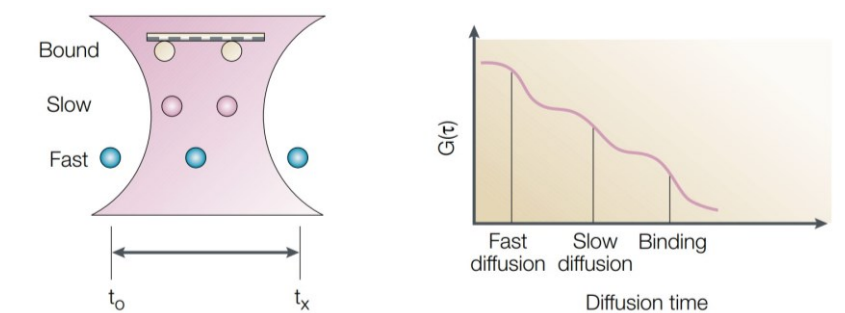
Ve studii Birbacha et al. byly fotobělicí techniky FLIP a FRAP použity ke studiu NF- κ B indukující kinázy (NIK), což je kináza fosforylující I- κ B zapojená do signalizační kaskády NF- κ B. Tato kináza se konstitutivně pohybuje mezi cytoplazmou, jádrem a jadérkem. Autoři pomocí FLIP sledovali zastoupení NIK

v jednotlivých kompartmentech a testovali vliv delece jaderného lokalizačního signálu (NES) na toto rozložení. Pomocí FRAP bylo navíc zkoumán podíl imobilních NIK v jednotlivých kompartmentech (Birbach et al. 2004).

2.2.5 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy – FCS) je třetí a poslední z metod sledujících kinetiku buněčných procesů, na které se v této práci zaměříme. Na rozdíl od předchozích dvou metod není u FCS využíváno fotobělení. To je u FCS dokonce nežádoucí, jelikož může vést ke zkreslení výsledků (Jensen 2013).

Při FCS je měřena fluorescence ve velmi malém objemu (obvykle v řádu femtolitrů), přičemž jsou zaznamenány fluktuace signálu. Ty jsou ovlivněny jak množstvím fluorescenčně značených molekul přecházejících přes sledovaný objem, tak jejich difúzním koeficientem, který odpovídá době zdržení v daném objemu. Phair a Misteli přirovnávají toto měření ke sledování části rušné silnice – z něj můžeme zjistit např. vytíženost dané komunikace či povolenou rychlost v daném úseku. Z FCS experimentu získáme koncentraci a také, podobně jako u metody FRAP, kinetické parametry dané molekuly, jako jsou difúzní koeficient či vazebná konstanta. Pomocí FCS lze též určit molekulové interakce – jak je ukázáno na obr. 13A, neinteragující (modré) molekuly difundují přes sledovaný objem rychleji než (žluté) molekuly vázající se na makromolekulu (např. na cytoskelet) nacházející se v daném objemu. Tyto dvě populace lze rozeznat na autokorelační křivce (obr. 13B) podle odlišných difúzních časů (Lippincott-Schwartz et al. 2001; Phair a Misteli 2001).



Obr. 13 (A) Schéma experimentu FCS s třemi typy molekul o různých difúzních koeficientech, (B) příslušná autokorelační křivka (Phair a Misteli 2001)

Metoda FCS byla vyvinuta v 70. letech pro výzkum kinetiky chemických reakcí (Magde et al. 1972), nicméně kvůli experimentální náročnosti sledování malého objemu byly upřednostňovány fotobělicí techniky a větší rozvoj FCS nastal až s nástupem konfokální mikroskopie (Dittrich et al. 2001).

FCS byla použita pro sledování difúzních vlastností membránových i intracelulárních molekul, např. oligodeoxynukleotidů v jádře (Politz et al. 1998) či receptoru EGF fúzovaného s GFP (EGFR-GFP) v porovnání s volným GFP (Brock et al. 1999).

Ve výzkumu signalizačních kaskád našla FCS využití při sledování interakcí receptoru a ligandu. FCS byla použita např. pro zkoumání vazby inzulinu na příslušný receptor (Zhong et al. 2001), sledování interakce psychoaktivního alkaloidu muscimolu s receptorem GABA_A (Meissner a Häberlein 2003) či pro hledání membránového glukokortikoidového receptoru pomocí syntetického glukokortikoidu dexamethazonu (Maier et al. 2005). FCS byla dále využita pro výzkum lokalizace adenylátkinázy (Ruan et al. 2002) a varianty PKC (Saito et al. 2003) v buňce.

V průběhu let bylo vyvinuto více variant FCS, mezi nimi i fluorescenční vzájemně korelační spektroskopie (FCCS) využívající dvou různě barevných fluoroforů. Při FCCS jsou sledovány oba fluorofory a podle podobnosti jejich chování je následně usuzováno, zda spolu značené molekuly interagují (Chudakov et al. 2010). Toho bylo využito např. ke sledování dynamiky vazby mezi kalmodulinem a kalmodulinkinázou (Kim et al. 2004). Dále byla pomocí FCCS sledována interakce mezi protilátkou IgE, příslušným receptorem FcεRI a tyrozinkinázou Lyn z rodiny Src (Larson et al. 2005).

V novějších publikacích byla metoda FCS použita současně se superrezoluční mikroskopií (Eggeling et al. 2009) – o těchto pracích se zmíníme v jedné z dalších sekcí, která bude zaměřena právě na superrezoluční mikroskopii.

2.2.6 Mikroskopie doby života fluorescence (FLIM)

Všechny doposud diskutované metody jsou založeny na zaznamenávání a vyhodnocování okamžité intenzity ve sledované části buňky. Mikroskopie doby života fluorescence (fluorescence lifetime imaging microscopy – FLIM) se od těchto metod liší tím, že místo intenzity pracuje s dobou života fluorescence. Doba života fluorescence je definována jako průměrná doba, po kterou fluorofor vydrží v excitovaném stavu, a odpovídá okamžiku, kdy fluorescence poklesne na 36,8 % počáteční intenzity. Po absorpci fotonu elektronem a excitaci ze základní (S0) do vyšší energetické (S1) hladiny chvíli trvá, než dojde k přechodu zpět do základní energetické hladiny. Pro fluorescenci se tato doba pohybuje v řádu nanosekund a je ovlivněna prostředím, ve kterém se fluorofor nachází, jakožto i případnými interakcemi, které způsobují zhášení fluorescence (Datta et al. 2020).

První experimenty FLIM využívaly autofluorescenci buňkám vlastních molekul. Mezi autofluorescenční molekuly patří např. flaviny, NAD(P)H, volné porfyriny či složky extracelulární matrix, jako např. keratin, elastin či kolagen. Jedna z prvních studií využívajících FLIM sledovala kolagen v kůži a zkoumala změny v autofluorescenci způsobené kožními chorobami (Koenig a Riemann 2003). K biomedicínskému výzkumu byla metoda FLIM sledující autofluorescenci použita i při sledování hypoxických podmínek u keratinocytů (Pouli et al. 2016).

Kromě autofluorescenčních molekul je u FLIM možné sledovat i buňce nepůvodní fluorofor. Metoda FLIM byla např. použita pro výzkum transportu chemoterapeutika doxorubicinu konjugovaného s fosfatidylcholinem, přičemž byla měřena doba života jeho fluorescence (Maji et al. 2018).

Velice využívanou metodou je spojení FLIM s biosenzory FRET, tzv. FRET-FLIM. Interakce donoru a akceptoru FRET se totiž projeví na době života fluorescence donoru (Datta et al. 2020). Tohoto kombinovaného přístupu bylo využito pro charakterizaci dimerizace transkripčního faktoru C/EBPα (Elangovan et al. 2002). Další studie využila FLIM ke sledování metabolického stavu buněk sledováním aktivity AMP-dependentní proteinkinázy (AMPK). V této práci byl vylepšen již diskutovaný biosenzor AMPKAR pro použití při FLIM nahrazením jednoho z fluorescenčních proteinů (Chennell et al. 2016). Pro FLIM-FRET byly optimalizovány i biosenzory Ca²⁺ (Wilms a Eilers 2007) či cAMP (Klarenbeek et al. 2011).

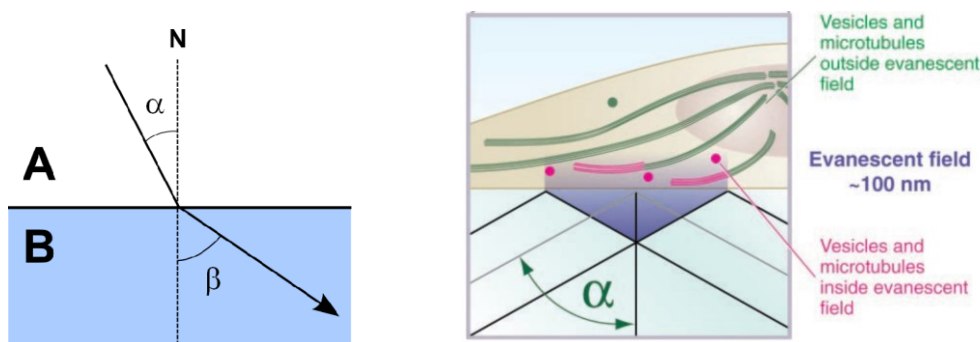
Velké množství prací využívá metodu FLIM v živých systémech. Výše byla zmiňována publikace využívající FLIM pro zkoumání lidské kůže a kožních chorob (Koenig a Riemann 2003). Další práce se zabývala sledováním aktivity malé GTPázy RhoA v invazivních nádorových buňkách pankreatu s mutovaným genem pro TP53 (Timpson et al. 2011).

Jelikož je doba života fluorescence závislá na prostředí, ve kterém se fluorofor nachází, je možné FLIM použít i ke sledování intracelulárních podmínek, jako jsou např. teplota (Okabe et al. 2012) či pH (Ogikubo et al. 2011).

Výhodou FLIM oproti metodám založeným na sledování intenzity je především nezávislost na absolutní intenzitě signálu a možnost odlišit fluktuační změny v signálu způsobené buď zhasením fluorescence nebo lokálními změnami koncentrace (Datta et al. 2020). Možnost identifikace rozdílů v mikroprostředí buňky navíc předurčuje FLIM pro biomedicínské použití, jako je výzkum rakovinných buněk, jak je poznat i z prací zmiňovaných v této sekci. V následujících sekcích se budeme zabývat dvěma metodami, které zvětšují rozlišení mikroskopického pozorování a umožňují tak lépe vizualizovat buněčné struktury a procesy. Jedná se o fluorescenci s totálním vnitřním odrazem a superrezoluční mikroskopii.

2.2.7 Fluorescence s úplným vnitřním odrazem (TIRF)

Fluorescence s úplným vnitřním odrazem (total internal reflection fluorescence – TIRF) je založena na evanescentní vlně vznikající při úplném odrazu světla na rozhraní dvou prostředí. Vysvětleme si nejprve princip tohoto fyzikálního jevu. Jak je ukázáno na obr. 14A, při přechodu světla z prostředí opticky hustšího (A) do opticky řidšího (B), např. ze skla do vody, nastává lom od kolmice – úhel α je menší než úhel β .



Obr. 14 (A) Lom světla při přechodu z opticky hustšího prostředí (označeno A) do opticky řidšího prostředí (označeno B) (převzato z https://www.wikiskripta.eu/w/Snell%C5%AFv_z%C3%A1kon#/media/File:Snells_law_simple_schematic.png 17. 4. 2021), (B) Schéma experimentu TIRF (Stephens 2003)

Pokud budeme dále zvětšovat úhel α , v určitém bodě dojdeme do momentu, kdy je úhel β roven 90° . V tento okamžik už nedochází k lomu, ale pouze k odrazu světla zpět do prostředí A. Tomuto ději se říká úplný odraz.

Při úplném odrazu ve skutečnosti nedojde k náhlému „utnutí“ světelné vlny na rozhraní prostředí, ale světlo proniká ještě kousek za rozhraní formou tzv. evanescentní („mizivé“) vlny. Intenzita této vlny exponenciálně klesá a její dosah je pouze desítky až stovky nm za rozhraní.

Evanescentní vlna je základem pro TIRF – jak je ukázáno na obr. 14B, světlo přichází skrz podložní sklo a na rozhraní skla a vzorku dochází k úplnému odrazu. Vzorek je tak ozařován pouze evanescentní vlnou, a díky jejímu krátkému dosahu jsou excitovány pouze fluorofory nacházející se v bezprostřední blízkosti podložního skla. To umožňuje minimalizovat fluorescenční pozadí, což v důsledku vede k lepšímu rozlišení (Ross et al. nedatováno; Stephens 2003).

Metoda TIRF byla představena v roce 1981. Autor demonstruje použití TIRF na myoblastech a fibroblastech a zároveň komentuje vhodnost TIRF pro studium membrán a procesů s nimi souvisejících (Axelrod 1981).

TIRF byla od té doby aplikována mimo jiné na studium membránových receptorů, endocytických a exocytických dějů včetně výlevu neurotransmiterů, kontaktů buňky s podkladem, či členů signálních kaskád, jako jsou např. vápenaté ionty či PKC.

Pomocí TIRF byl studována interakce EGF a příslušného receptoru (Hellen a Axelrod 1991; Sako et al. 2000) či inzulinového receptoru a inzulinu značeného pomocí kvantové tečky (Fan a Jin 2007). TIRF byla dále použita ke studiu vkládání β 2-adrenergního receptoru, patřícího do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny, do plazmatické membrány (Yudowski et al. 2006). TIRF v kombinaci s FRET byla uplatněna pro výzkum stavby nikotinových acetylcholinových receptorů (Drenan et al. 2008) či draselných kanálů spřažených s G-proteiny (Riven et al. 2006; Fowler et al. 2007). S TIRF byly propojeny i jiné již diskutované techniky, např. FRAP ve studii Hellen a Axelrod 1991.

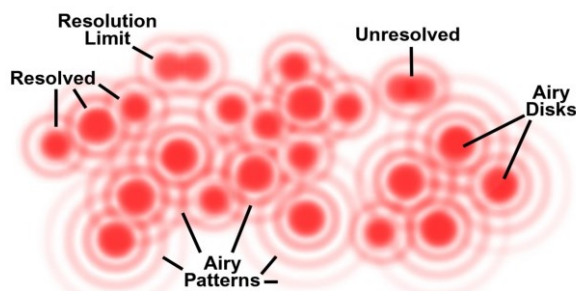
Ve studiích Codazziho et al. 2001 a Teruela a Meyera 2002 byla sledována translokace PKC k plazmatické membráně v závislosti na změnách v koncentraci Ca^{2+} . Haugh et al. využili TIRF ke studiu migrace fibroblastů podle gradientu růstového faktoru odvozeného z destiček (PDGF) pomocí polarizované produkce fosfatidylinozitolů (Haugh et al. 2000).

Velké množství publikací využívajících TIRF se zabývá studiem exocytózy. Byl sledován transport váčků, jejich dokování u membrány a výlev obsahu jak u regulované (Oheim et al. 1998; Steyer a Almers 1999; Oheim a Stuhmer 2000), tak i konstitutivní exocytózy (Toomre et al. 2000; Schmoranzer et al. 2000). Další studie se zabývaly vlivem Ca^{2+} na exocytózu váčků s ATP u astrocytů (Pangršič et al. 2007; Pryazhnikov a Khiroug 2008) či dynamikou synaptických váčků po uvolnění neurotransmiteru (Zenisek et al. 2002).

Pomocí metody TIRF byl studován i fenomén endocytózy. Byla zkoumána např. dynamika klatrinu u plazmatické membrány (Keyel et al. 2004) či role cytoskeletu a dalších proteinů při odškrcování váčků (Merrifield et al. 2002). Existují též studie zabývající se endocytózou různých molekul, např. receptorů spřažených s G-proteiny (Soohoo et al. 2014).

2.2.8 Superrezoluční mikroskopie

Jak jsme viděli v předchozích sekcích této práce, do dnešní doby bylo vyvinuto velké množství technik a biosenzorů umožňujících lépe pochopit fungování buněčných procesů. Klasické mikroskopické metody ovšem naráží na problém s rozlišením způsobený difrakcí a interferencí světla. V důsledku těchto jevů nevidíme jednotlivé fluorofory jako body, ale jako světelné skvrny, jak je ukázáno na obr. 15.



Obr. 15 Schématické znázornění omezení způsobeného difrakčním limitem (převzato z <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/resolution> 18.4.2021)

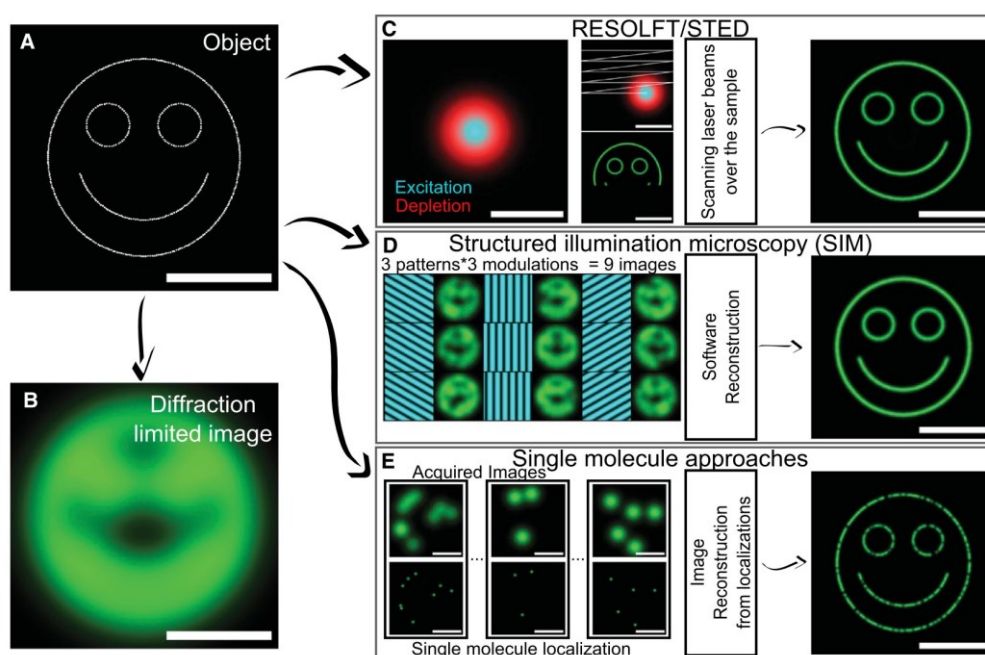
Problém nastává, pokud je více molekul blízko u sebe. Tehdy dochází k překrývání jejich signálů a není tak poznat, jestli výsledná skvrna náleží jednomu, nebo více fluoroforům. Například signál v pravém horním rohu obr. 15 označený ‚unresolved‘ odpovídá dvěma fluoroforům (či skupinám fluoroforů), rozlišení použitého mikroskopu je ovšem příliš nízké na to, aby šlo od sebe tyto dva signály rozeznat.

Hranice rozlišení dvou signálů je dána tzv. Abbého difrakčním limitem $d = \lambda / (2 \cdot (n \cdot \sin(\alpha)))$, kde λ je vlnová délka světla (pro světelnou mikroskopii cca 400 – 700 nm) a $n \cdot \sin(\alpha)$ je numerická apertura používaného objektivu, která závisí na indexu lomu prostředí mezi objektivem a vzorkem, vzdálenosti objektivu od vzorku

a šířce objektivu. V praxi je tato hranice zhruba 200 – 300 nm, což znamená, že fluorofory, které jsou k sobě blíže než cca 200 – 300 nm, nelze rozeznat a jsou vnímány jako jeden signál. Tento limit značně ztěžuje pozorování buněčných dějů a struktur (Bianchini et al. 2015; Davidson nedatováno).

V této sekci si představíme techniky umožňující překonat tento limit, přičemž se zaměříme na metody používané pro vizualizaci živých buněk. Postupně projdeme tři hlavní skupiny, představíme si stručně jejich princip a zmíníme některé ze studií, které tyto techniky využívají. Podrobnější rozbor bohužel dalece přesahuje rozsah této práce.

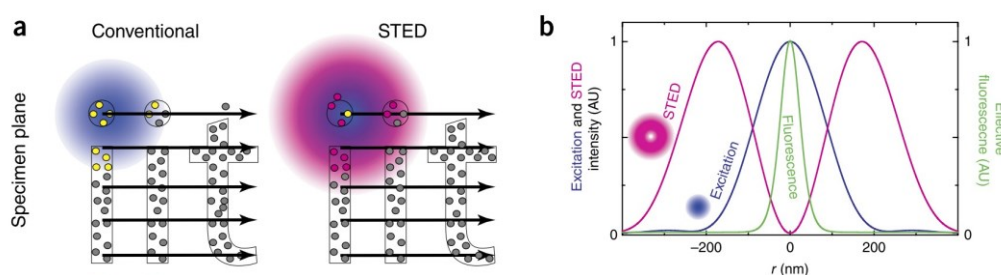
Superrezoluční techniky používané pro zobrazování živých buněk můžeme rozdělit do tří skupin – metody založené na přesné lokalizaci fluoreskující části vzorku, metody založené na strukturovaném ozařování vzorku a metody lokalizující jednotlivé molekuly (Godin et al. 2014). Schématické fungování jednotlivých skupin je ukázáno na obr. 16.



Obr. 16 Principy jednotlivých skupin metod (Godin et al. 2014)

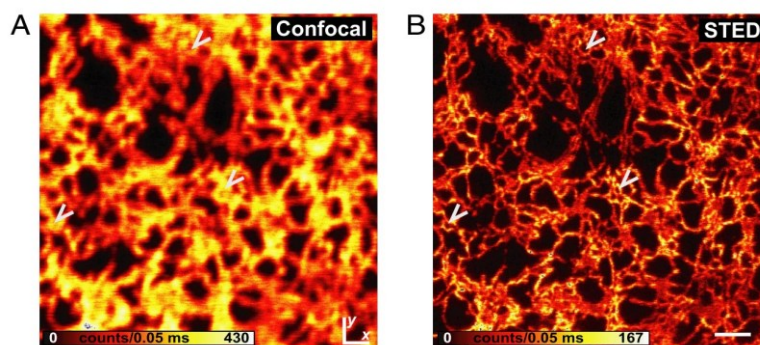
Metody založené na přesné lokalizaci fluoreskující části vzorku využívají optických technik, které umožní emisi fluorescence pouze fluoroforům v prostoru menším, než je difrakční limit. Do této skupiny patří mimo jiné vyčerpání stimulovanou emisí (stimulated emission depletion – STED).

Při STED je část vzorku osvětlena laserem s vlnovou délkou odpovídající excitačnímu maximu fluoroforu – na obr. 17 označen modře. Zároveň je přidán další laser s vyšší vlnovou délkou ozařující kruhovou oblast kolem centra excitačního laseru – na obr. 17 znázorněn růžově.



Obr. 17 (A) Porovnání konvenční fluorescenční mikroskopie a STED, (B) graf záření při STED (Vicidomini et al. 2018)

Přídavný laser způsobí stimulovanou emisi fluoroforů v jiné vlnové délce, než je standardní emisní vlnová délka. Signál od těchto fluoroforů je odfiltrován, takže zůstane pouze signál z centra osvětlení, který je tak lépe lokalizován, jak je ukázáno na grafu v obr. 17B – místo širšího, modrého píku odpovídajícího excitačnímu laseru dostaneme pouze užší, zelený pík. Na obr. 17A je fluorofor, jehož signál je zaznamenáván, vyobrazen žlutě – STED umožňuje lokalizovat menší množství fluoroforů (jeden žlutý bod u STED oproti většímu množství u konvenční mikroskopie), a tím zlepšuje rozlišení. Pro získání celého snímku dochází k postupnému přesunování laseru a skenování vzorku bod po bodu, jak je ukázáno na obr. 16C (Godin et al. 2014). Výhodou STED je relativně vysoká rychlost zaznamenávání. Nevýhodou je velká intenzita záření nutná k ozařování vzorku, která může poškodit fungování živých buněk, případně zvýšit fotobělení fluoroforů a tím způsobit zkreslení výsledků (Cox 2015).



Obr. 18 Porovnání snímku ER získaného pomocí konfokální mikroskopie a STED (Hein et al. 2008)

Metoda STED byla použita pro vizualizaci organel, jako např. endoplazmatické retikulum (Hein et al. 2008) či mitochondrie (Stephan et al. 2019). Na obr. 18 je porovnání snímku ER získaného pomocí konfokální mikroskopie (A) oproti STED (B). Další studie aplikovaly STED např. na vizualizaci neuronů (Nägerl et al. 2008; Tønnesen et al. 2014), pohybu váčků v neuronech (Westphal et al. 2008) či cytoskeletu (Lukinavičius et al. 2014). STED byla také zkombinována s FCS a použita pro studium membránových lipidů (Eggeling et al. 2009; Mueller et al. 2011).

Další skupinou superrezolučních technik jsou metody založené na strukturovaném ozařování vzorku, kam patří mikroskopie se strukturovaným ozařováním (structured illumination microscopy – SIM). Jak je ukázáno na obr. 16D, při SIM je vzorek postupně ozařován různě orientovanými světelnými vzory (např. pruhy) s různými fázovými posuny. Interferencí světelného vzoru se signálem od fluoroforů vzniká difrakční obrazec a následnou počítačovou analýzou více různých difrakčních obrazců je možné odvodit rozmístění fluoroforů ve vzorku (Godin et al. 2014). SIM umožňuje rychlé zaznamenávání signálu z velké plochy vzorku a nevyžaduje fluorofory se speciálními vlastnostmi, na rozdíl od ostatních superrezolučních metod poskytuje však jen malé, zhruba dvojnásobné zlepšení oproti limitu klasické světelné mikroskopie. SIM je také náchylná vůči fotobělení a pohybu vzorku během měření (Cox 2015).

SIM byla uplatněna především pro studium cytoskeletu (Rego et al. 2012), a to i v kombinaci s TIRF (Li et al. 2015; Carisey et al. 2018). Další studie se zaměřily na roli cytoskeletu při pohybu buňky (Burnette et al. 2014), či na vizualizaci dalších buněčných struktur, jako jsou mitochondrie či klatrinové váčky (Fiolka et al. 2012). SIM byla použita také *in vivo* pro zobrazování neuronů v mozku myši a larvy dánie (Turcotte et al. 2019)

Poslední skupinou diskutovanou v této práci jsou metody lokalizující jednotlivé molekuly. Sem patří mimo jiné PALM (photoactivation localization microscopy), STORM (stochastic optical reconstruction microscopy)

či uPAINT (universal point accumulation imaging in the nanoscale topography). Tyto metody jsou založeny na rekonstrukci obrazu postupným nasnímáním umístění jednotlivých fluoroforů. Využívají při tom přepínání mezi dvěma různými stavy fluoroforu – ‚zapnutým‘ (on, bright) a ‚vypnutým‘ (off, dark) stavem. V každém momentu je v ‚zapnutém‘ stavu pouze malé množství fluoroforů. Signál od těchto fluoroforů je snímán, dokud nedojde k jejich vybělení, a následně je aktivovaná nová skupina fluoroforů. Signály od jednotlivých molekul jsou poté proloženy Gaussovou či jinou podobnou funkcí a pro každý signál je určen střed, ve kterém se nachází fluorofor. Široké skvrny jsou tak zredukovány na body, jak je ukázáno na obr. 16E. Jednotlivé metody se liší typem využívaných fluoroforů a způsobem jejich přepínání mezi ‚vypnutým‘ a ‚zapnutým‘ stavem (Godin et al. 2014). Tato skupina metod vyžaduje pečlivý výběr fluoroforů, které musí umožňovat přepínání mezi ‚vypnutým‘ a ‚zapnutým‘ stavem a současně ‚zapnutí‘ pouze malé části fluoroforů.

Fluoroforem využívaným při PALM jsou fotoaktivovatelné fluorescenční proteiny. Toho bylo použito např. ke sledování pohybu proteinů v membráně (Manley et al. 2008; Gudheti et al. 2013), organizace fokálních adhezí (Rossier et al. 2012) či ke studiu interakce signálních proteinů Ras a Raf (Nickerson et al. 2014).

STORM využívá stochastické ‚zapínání‘ a ‚vypínání‘ organických fluoroforů ovlivněné použitým pufrům, který má obvykle redukční účinky. Nutnost specifického pufru, který může mít toxické účinky na buňky, znesnadňuje použití těchto technik pro zobrazování živých buněk (Godin et al. 2014). Byly však publikovány i studie, které tento problém překonávají, např. pro vizualizaci DNA v jádře (Benke a Manley 2012).

Třetí technikou lokalizující jednotlivé molekuly je uPAINT. Při uPAINT je vzorek ozařován tzv. šikmým světlem, které efektivně excituje pouze fluorofory vázané na membránové receptory. Tato metoda je velice užitečná pro mikroskopování živých buněk, jelikož umožňuje studium ligand-receptorových interakcí (Giannone et al. 2010; Godin et al. 2014). Toho bylo využito např. pro sledování glutamátového receptoru AMPA na neuronech (Giannone et al. 2010; Nair et al. 2013) nebo EGFR pomocí FRET (Winckler et al. 2013).

Na závěr se zmíníme o SOFI (super-resolution optical fluctuation imaging) a odvozených metodách. SOFI nepatří do žádné ze tří zmiňovaných kategorií, ale stejně jako metody lokalizující jednotlivé molekuly využívá přepínání fluoroforů mezi ‚vypnutým‘ a ‚zapnutým‘ stavem. Předpokladem pro SOFI je, že přepínání jednotlivých fluoroforů mezi dvěma stavy (‚blinking‘) je nekorelované. To způsobuje, že pokud jeden zaznamenaný signál patří více fluoroforům, časový průběh přepínání mezi ‚zapnutým‘ a ‚vypnutým‘ stavem se bude lišit od průběhu signálu od jediného fluoroforu. Zaznamenaný signál je počítačově zpracováván a pomocí matematických kalkulací dojde k zaostření signálů, a tudíž k vylepšení rozlišení (Dertinger et al. 2009).

Metoda SOFI byla použita např. k studiu proteinových interakcí (Hertel et al. 2016) či kinázové aktivity (Mo et al. 2017).

3 Metody využívající bioluminiscenci

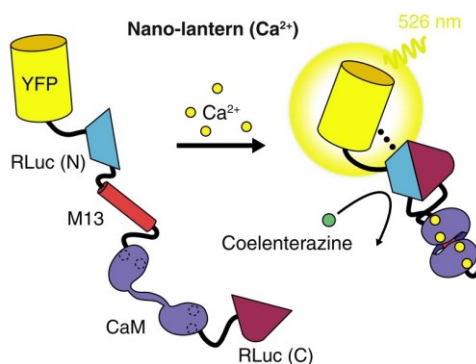
Až doposud jsme se v této práci zabývali metodami využívajícími fluorescenci k vizualizaci buněčných struktur a procesů. Tento způsob vizualizace je v současnosti nejpoužívanější, proto jsme těmto metodám věnovali nejvíce prostoru. Kromě fluorescenčních biosenzorů však existují i biosenzory založené na bioluminiscenci a o těch nyní krátce pojednáme.

Bioluminescence je proces přeměny chemické energie na světelné záření využívaný mnoha organismy, např. medúzou *Aequorea victoria*, ze které byl izolován GFP. Protein aequorin, při jehož studiu byl GFP objeven, produkuje modré bioluminiscenční záření (Shimomura et al. 1962).

Výhodou bioluminiscenčních biosenzorů oproti fluorescenčním je především to, že zdrojem energie je chemická reakce a vzorek tak není potřeba ozařovat externím zdrojem záření pro excitaci elektronů. Jak již bylo diskutováno dříve, ozařování vzorku může vést k poškození buněk a také k fotobělení fluoroforů, což může způsobit zkreslení výsledků. U bioluminiscenčních metod tento problém odpadá a mikroskopování je tak k buňkám šetrnější. Při luminiscenčních metodách je také menší problém se světelným pozadím. Bioluminescence sledovaných buněk je obvykle zanedbatelná, a tudíž je u bioluminiscenčních metod vyšší poměr signálu k šumu v porovnání s fluorescenčními technikami, kde je zároveň zaznamenávána autofluorescence vzorku.

Nevýhodou bioluminiscenčních metod je to, že signál bioluminiscenčních biosenzorů je v porovnání s fluorescenčními protějšky obvykle slabší a tlumenější, což zhoršuje rozlišení. Tento signál navíc není možné modulovat pomocí intenzity excitačního laseru. Tento problém je částečně řešen použitím specializovaných bioluminiscenčních mikroskopů. Druhou nevýhodou je nutnost dopravovat z vnější do buňky substrát pro bioluminiscenční enzym, např. luciferin (Tung et al. 2016). Snahou výzkumu je tyto problémy minimalizovat. Jsou vyvíjeny zářivější bioluminiscenční biosenzory a existují i práce řešící problém externího dopravování substrátu vytvořením buněk, které jsou schopny si substrát samy syntetizovat (Gregor et al. 2019).

První studie sledující změny Ca^{2+} v buňkách využívaly již zmiňovaný aequorin, jehož bioluminescence je závislá právě na přítomnosti Ca^{2+} (Ridgway a Ashley 1967). Většina nových biosenzorů využívá tzv. BRET (bioluminescence resonance energy transfer). BRET je analog FRET, kde donorem není fluorofor, ale bioluminiscenční molekula.



Obr. 19 Biosenzor Ca^{2+} Nano-lantern využívající BRET (Ni et al. 2018)

Mezi senzory využívající BRET patří skupina biosenzorů Nano-lantern. Tyto biosenzory jsou tvořeny dvěma rozpojenými částmi *Renilla* luciferázy (bioluminiscenční protein), detekční částí a fluorescenčním proteinem. Po vazbě detekované molekuly dojde ke složení luciferázy a k přenosu energie od bioluminiscenčního k fluorescenčnímu proteinu, jak je ukázáno na obr. 19 pro detekci Ca^{2+} . Různé verze původní Nano-lantern umí detekovat Ca^{2+} , cAMP a ATP (Saito et al. 2012). Následující práce upravily Nano-lantern pro detekci genové exprese a značení buněčných struktur (Takai et al. 2015).

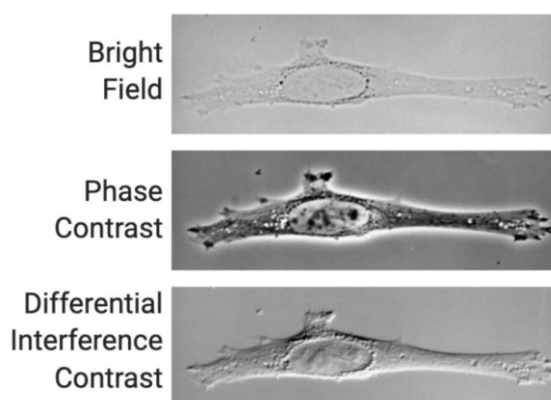
Dalším biosenzorem pro Ca^{2+} založeným na BRET je BRAC, který na rozdíl od Nano-lantern obsahuje luciferázu vcelku (Saito et al. 2010). Biosenzory využívající bioluminiscenci byly dále vyvinuty pro detekci kinázové aktivity (Zhang et al. 2007; Herbst et al. 2011) a bioluminiscenční luciferáza byla použita jako reportérový gen pro sledování aktivity NF- κ B (Birbach et al. 2004).

4 Zobrazovací techniky nevyužívající značení

Doposud jsme se zabývali metodami využívajícími fluorescenci či luminiscenci. Tyto techniky hrají v buněčné biologii nezastupitelnou roli, jejich problémem je však nutnost značit buněčné struktury příslušnými fluorescenčními či bioluminiscenčními značkami, což může být značně komplikované a zdlouhavé. Nyní se krátce podíváme na metody nevyužívající značení.

4.1 Metody zvyšující kontrast

Při světelné mikroskopii živých buněk prochází většina světla skrz buňku bez pohlcení – buňky se tak jeví jako bezbarvé a není na nich vidět příliš mnoho detailů, jak je ukázáno na obr. 20 u popisku ‚bright field‘. Z toho důvodu byly vyvinuty metody, které zvyšují kontrast vzorku a umožňují tak lépe zviditelnit pozorované buňky a buněčné struktury. Mezi ně patří mimo jiné metody fázového a diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), které se liší především způsobem tvorby kontrastu.



Obr. 20 Porovnání klasické světelné mikroskopie, mikroskopie s fázovým kontrastem a DIC (převzato z <https://cytosmart.com/resources/label-free-imaging> 20. 4. 2021)

Při průchodu světla buňkou dochází k rozptylu světla a k fázovému posunu světelné vlny vlivem rozdílů v optické hustotě vzorku a prostředí. U mikroskopie fázového kontrastu dochází k posunutí fáze přímého vlnění procházejícího vzorkem beze změny oproti vlnění, které je na vzorku rozptýleno. Tmavost části vzorku tak závisí na tloušťce a optické hustotě v daném místě. U DIC je světlo v každém místě rozděleno na dva paprsky, které prochází vzorkem vedle sebe a následně se znovu skládají. Výsledný jas daného místa tak závisí na lokálním gradientu tloušťky či optické hustoty (Frohlich 2008; Murphy et al. nedatováno).

Metody zvyšující kontrast lze použít především pro sledování buněčné morfologie, motility či dělení.

4.2 Koherentní anti-Stokesův Ramanův rozptyl (CARS)

CARS je neinvazivní metoda nevyžadující značení, která na rozdíl od metod zvyšujících kontrast umožňuje selektivně pozorovat vybraný typ molekul. Při CARS je využíváno tzv. Ramanova rozptylu, což je neelastický rozptyl světla na molekulách, ke kterému dochází při interakci světla s vibračními a rotačními stavy molekul. Neelastický rozptyl znamená, že energie přicházejícího světla se liší od energie světla rozptýleného – rozdíl těchto energií je charakteristický pro každou chemickou skupinu a typ vibrace/rotace. Z naměřeného spektra je tedy možné zjistit, jaké molekule patří.

CARS je vhodný především pro studium dynamiky lipidů, jelikož tento typ molekul dává silný signál. Dalším důvodem je to, že lipidy je těžké analyzovat pomocí fluorescenčních metod kvůli nedostatku vhodných sond (Pope et al. 2012).

4.3 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Poslední metoda, o které se zmíníme, je také založena na Ramanově rozptylu. Nevýhodou klasické Ramanovy spektroskopie je to, že signál, který poskytuje, je velice slabý, protože jen velmi malé množství fotonů se rozptyluje neelasticky (až 1 z 10^{18}), zatímco u většiny fotonů dochází k elastickému Rayleighovu rozptylu. Z toho důvodu je klasická Ramanova spektroskopie použitelná pouze pro vzorky s vysokou koncentrací sledovaných molekul. Zastoupení Ramanova rozptylu je ovšem možné zvýšit o mnoho řádů blízkostí k nanostruktuře kovu. Tento postup, který se využívá právě při SERS, tak zlepšuje detekční limit o několik řádů a v některých případech může umožnit i detekci samostatných molekul (Pope et al. 2012).

SERS je díky své vysoké citlivosti vhodným kandidátem pro sledování buněčných procesů. Existují studie snažící se tuto techniku adaptovat pro použití v mikroskopii živých buněk. Jako kovový povrch sloužící k zesílení signálu jsou obvykle využívány nanočástice zlata či stříbra, které jsou endocytovány sledovanou buňkou. Díky tomu je možné sledovat složení okolí pohlcené částice (Huang et al. 2014; Kim et al. 2019). Metoda SERS byla použita např. pro sledování dějů v jádře při apoptóze použitím kovových nanočástic s jaderným lokalizačním signálem (Kang et al. 2014). Nanočásticemi používanými při SERS je také potenciálně možné manipulovat pomocí laserové pinzety pro cílené zkoumání buněčného prostředí (Steciura et al. 2015).

5 Signalizace pomocí růstových faktorů – příklad sledování signální dráhy

Než se dostaneme k závěru práce a finálnímu shrnutí, podívejme se krátce na jednu ze signálních drah a na použití metod probíraných v této práci při jejím studiu. Růstové faktory, jako např. EGF či IGF, a jimi spouštěné signální kaskády hrají v buněčném fungování důležitou roli, proto se zaměříme právě na ně.

Růstové faktory působí na buňku přes membránové tyrozinkinázové receptory. Z těch je signál předáván dále do buňky mimo jiné přes sérii fosforylačních reakcí, konkrétně přes MAP kinázovou či kaskádu PI3K-Akt. Tyto kaskády mají mnoho finálních projevů, např. transkripci cílových genů (Gross a Rotwein 2017).

O studiu některých členů těchto drah jsme se již zmiňovali, především v souvislosti se signalizací epidermálního růstového faktoru (EGF). Metoda TIRF v kombinaci s FRET byla použita ke sledování dimerizace receptoru EGF, přičemž tato dimerizace je nezbytná k přenosu signálu přes daný receptor (Sako et al. 2000). EGFR byl také studován pomocí FCS (Brock et al. 1999). Dále jsme diskutovali několik příkladů sledování kináz a kinázové aktivity. Ve studii Fujioka et al. byla zkoumány čtyři hlavní součásti MAP kinázové kaskády – Ras, Raf, MEK a ERK. Autoři se za použití biosenzoru FRET Miu2 pro ERK a metody FRAP snažili zjistit parametry pro vytvoření počítačového modelu této dráhy (Fujioka et al. 2006). Biosenzory FRET byly použity i v další studii pro sledování přenosu signálu od Ras k MEK (Terai a Matsuda 2005). Bioluminiscenční biosenzor byl použit ke studiu aktivity kinázy Akt – autoři ukázali nárůst bioluminiscence po přidání EGF ke sledovaným buňkám (Zhang et al. 2007).

Nevýhodou biosenzorů FRET je zhoršená možnost sledování více faktorů zároveň – v této práci jsme proto zmiňovali studie, které se tento problém snaží vyřešit vytvořením biosenzorů založených na jediném fluoroforu. Mehta et al. vytvořili biosenzory obsahující kruhově permutovaný fluorescenční protein pro Akt a další kinázy. Tyto biosenzory byly zároveň použity pro současné sledování aktivit více různých kináz, např. PKA, PKC a ERK (biosenzor pro ERK využíval mechanismus závislý na dimerizaci dvou fluorescenčních proteinů) (Mehta et al. 2018). Regot et al. zkonstruovali biosenzory založené na přesunech mezi cytoplazmou

a jádrem a následně je využili pro současné sledování aktivity ERK a dalších kináz po přidání EGF (Regot et al. 2014).

Některé signální molekuly, jako např. MAP kinázová kaskáda, která je součástí signalizace růstových faktorů, mají velké množství různých vstupů a výstupů. Abychom mohli lépe porozumět buněčné signalizaci a buněčnému fungování obecně, je důležité pochopit, jak je možné, že jednomu vstupu odpovídají konkrétní výstupy a nedojde k promíchání. Ukazuje se, že velkou roli může hrát časový průběh aktivace jednotlivých členů (Albeck et al. 2013). Důležitou roli hraje také propojení jednotlivých signálních drah, jak je vidět i u signalizace pomocí růstových faktorů. Abychom však tuto komplexní síť interakcí mohli studovat, je nutné zároveň sledovat více různých členů a zaznamenávat jejich interakce.

Objasnit propojení signálních kaskád při působení růstových faktorů se snažila studie Grosseho a Rotweina, kde autoři použili aktivační biosenzor pro ERK a aktivní biosenzor pro Akt, oba založené na principu translokace mezi jádrem a cytoplazmou. Autoři sledovali aktivaci jednotlivých drah a trvání odpovědi po přidání různých růstových faktorů. Ukázali, že jednotlivé růstové faktory způsobily různě silné odpovědi s různým časovým průběhem, přičemž se lišila poměrná aktivace dvou sledovaných signálních kaskád (Gross a Rotwein 2017).

Tato práce je krokem vpřed ke studiu signálních kaskád a jejich propojenosti v reálném čase, nicméně v sobě stále nese několik limitací. Biosenzory signalizující pomocí transportu do jádra či z něj jsou sice použitelné k detekci celkové aktivity sledovaného faktoru v buňce, nicméně neumožňují lokální sledování jednotlivých signálních molekul, jejich pohybu a interakce s jinými molekulami. Signál byl navíc snímán v rozestupu 2,5 minuty, což je příliš hrubý časový úsek neumožňující sledovat průběh signalizace okamžitě po vazbě růstového faktoru. V signalizaci způsobené růstovými faktory hrají navíc roli i další signální molekuly, jejichž vliv nejde takto zkoumat. Podle autorů je budoucnost studia signálních kaskád v současném sledování několika faktorů v kombinaci s dalšími molekulárními a biochemickými metodami upravenými pro použití na úrovni jednotlivých buněk (Gross a Rotwein 2017).

6 Závěr

V této práci jsme se zabývali metodami umožňujícími pozorování živých buněk a buněčných procesů v nich probíhajících v reálném čase, přičemž jsme se zaměřili na sledování signálních drah. Nejvíce prostoru jsme věnovali fluorescenčním technikám, které jsou v současnosti nejvyužívanější, ale zmínili jsme i bioluminiscenční techniky a techniky nevyžadující značení. Doposud bylo provedeno již obrovské množství studií využívajících tyto metody, mnohé potřebné chemikálie (např. fluorofory) a přístroje jsou navíc již komerčně dostupné. Vývoj v této oblasti však čeká ještě dlouhá cesta.

Konkrétně sledování aktivity signálních drah je teprve v počátcích. Jak bylo ilustrováno na příkladu signalizace pomocí růstových faktorů, byly již vyvinuty biosenzory pro některé členy signálních drah, jejich fungování však často neumožňuje sledovat proces lokálně (např. u biosenzorů založených na transportu mezi cytoplazmou a jádrem, kde signál vypovídá pouze o stavu celé buňky), navíc je obtížné sledovat více členů či procesů zároveň. Dalším problémem je kvantitativní sledování dynamiky signálních drah. To jsme viděli u studie Grosse a Rotweina, kde byla sledována aktivita ERK a Akt, časový rozestup mezi měřeními v řádu minut ovšem umožňoval pouze zaznamenávání dlouhodobého vývoje aktivity těchto kináz, nikoliv dynamiky okamžitých změn a lokálních fluktuací.

V posledních několika desetiletích velmi narostl počet dostupných fluoroforů, jak geneticky kódovaných, tak dodávaných do buňky zvnějšku, a také biosenzorů založených na bioluminiscenci. Značení cílové struktury

ale stále skýtá velké množství nástrah – značka může interferovat s funkcí dané molekuly a exprese značených proteinů vedle endogenních může ovlivnit celkové fungování daného proteinu. Z toho důvodu je nezbytné ověřovat, zda pozorovaný signál opravdu odpovídá normálnímu chování sledované molekuly, např. pomocí imunohistochemických technik při kontrole lokalizace signálu. Pro mnoho členů signálních kaskád navíc stále ještě nebyly vyvinuty biosenzory, které by byly uspokojivě schopny sledovat jejich lokalizaci či aktivitu.

Chování molekuly zájmu může být ovlivněno nejen použitou značkou či biosenzorem, ale také samotným mikroskopováním – excitační záření, obzvláště kratších vlnových délek, může způsobit fotopoškození buněčných struktur a oxidační stres v buňce, což může narušit sledovaný proces. Kvůli minimalizaci vlivu záření jsou vyvíjeny fluorofory absorbující v červené části spektra. Mnohé původnější červené fluorescenční proteiny mají bohužel slabý signál a tendenci k oligomeraci. Řešením tohoto problému může být vývoj bioluminiscenčních metod, které na rozdíl od fluorescence nevyžadují externí zdroj záření, který způsobuje fotopoškození.

Dalším problémem mikroskopických technik je rozlišení nedostatečné ke sledování detailnějších buněčných procesů. Potenciální řešení tohoto nedostatku spočívá v superrezolučních technikách. Ty jsou ovšem zatím vhodné především pro sledování fixovaných buněk a jejich použití pro sledování živých buněk stojí v cestě několik překážek, např. záření o vysoké intenzitě způsobující fotopoškození, dlouhá doba zaznamenávání signálu či nedostatek fluoroforů vhodných pro použití v živých buňkách. Kvůli těmto nedostatkům byly fluorescenční techniky doposud používány preferenčně pro zobrazení méně dynamických a snadněji vizualizovatelných struktur, jako je např. cytoskelet.

Kromě nízkého rozlišení zhoršuje mikroskopii i autofluorescence sledovaných buněk. Ta může v určitých případech být natolik silná, že znemožňuje odlišení signálu samotného fluoroforu. Problém autofluorescence může být vyřešen použitím bioluminiscenčních biosenzorů, navíc jsou vyvíjeny postupy umožňující odfiltrovat autofluorescenci v případě použití fluorescenčních metod.

Abychom mohli získat vypovídající data o buněčných procesech, je potřeba použít dostatečně velký vzorek a ideálně provádět experiment v prostředí co nejbližším původním životním podmínkám. Mnohé diskutované metody však sledují buňky *in vivo* a jsou náročné na škálování. Vývoj (automatizovaných) metod umožňujících sledovat velké množství vzorků či buňky *in vivo* bude tak potřebný pro získání lepší představy o buněčných procesech a jejich variabilitě.

7 Seznam literatury

Přehledové články jsou označeny *.

ADAMS, Stephen R., Alec T. HAROOTUNIAN, Ying Ji BUECHLER, Susan S. TAYLOR a Roger Y. TSIEN, 1991. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* [online]. **349**(6311), 694–697 [vid. 2021-04-04]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/349694a0

ALBECK, John G., Gordon B. MILLS a Joan S. BRUGGE, 2013. Frequency-Modulated Pulses of ERK Activity Transmit Quantitative Proliferation Signals. *Molecular Cell* [online]. **49**(2), 249–261 [vid. 2021-04-25]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2012.11.002

AXELROD, D., 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *Journal of Cell Biology* [online]. **89**(1), 141–145 [vid. 2021-04-16]. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.89.1.141

AXELROD, D., D.E. KOPPEL, J. SCHLESSINGER, E. ELSON a W.W. WEBB, 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal* [online]. **16**(9), 1055–1069 [vid. 2021-04-09]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(76)85755-4

AZPIAZU, Inaki a N. GAUTAM, 2004. A Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Sensor Indicates that Receptor Access to a G Protein Is Unrestricted in a Living Mammalian Cell. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(26), 27709–27718 [vid. 2021-04-09]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M403712200

BAIRD, Geoffrey S., David A. ZACHARIAS a Roger Y. TSIEN, 1999. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **96**(20), 11241–11246 [vid. 2021-04-04]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.20.11241

BASKIN, Jeremy M., Jennifer A. PRESCHER, Scott T. LAUGHLIN, Nicholas J. AGARD, Pamela V. CHANG, Isaac A. MILLER, Anderson LO, Julian A. CODELLI a Carolyn R. BERTOZZI, 2007. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **104**(43), 16793–16797 [vid. 2021-04-03]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0707090104

BENKE, Alexander a Suliana MANLEY, 2012. Live-Cell dSTORM of Cellular DNA Based on Direct DNA Labeling. *ChemBioChem* [online]. **13**(2), 298–301. ISSN 14394227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.201100679

*BIANCHINI, Paolo, Chiara PERES, Michele ONETO, Silvia GALIANI, Giuseppe VICIDOMINI a Alberto DIASPRO, 2015. *STED nanoscopy: a glimpse into the future* [online]. 1. duben 2015. B.m.: Springer Verlag. ISSN 14320878. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-015-2146-3

BIRBACH, Andreas, Shannon T. BAILEY, Sankar GHOSH a Johannes A. SCHMID, 2004. Cytosolic, nuclear and nucleolar localization signals determine subcellular distribution and activity of the NF- κ B inducing kinase NIK. *Journal of Cell Science* [online]. **117**(16), 3615–3624. ISSN 00219533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.01224

BROCK, Roland, György VAMOSI, György VEREB a Thomas M. JOVIN, 1999. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **96**(18), 10123–10128 [vid. 2021-04-13]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.18.10123

BURNETTE, Dylan T., Lin SHAO, Carolyn OTT, Ana M. PASAPERA, Robert S. FISCHER, Michelle A. BAIRD, Christelle DER LOUGHIAN, Helene DELANOE-AYARI, Matthew J. PASZEK, Michael W. DAVIDSON, Eric BETZIG a Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2014. A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells. *Journal of Cell Biology* [online]. **205**(1), 83–96 [vid. 2021-04-19]. ISSN 15408140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201311104

CARISEY, Alexandre F., Emily M. MACE, Mezida B. SAEED, Daniel M. DAVIS a Jordan S. ORANGE, 2018. Nanoscale Dynamism of Actin Enables Secretory Function in Cytolytic Cells. *Current Biology* [online]. **28**(4), 489–502 [vid. 2021-04-19]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2017.12.044

CHALFIE, Martin, Yuan TU, Ghia EUSKIRCHEN, William W. WARD a Douglas C. PRASHER, 1994.

- Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* [online]. **263**(5148), 802–805 [vid. 2021-03-30]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.8303295
- CHENNEL, George, Robin WILLOWS, Sean WARREN, David CARLING, Paul FRENCH, Chris DUNSBY a Alessandro SARDINI, 2016. Imaging of Metabolic Status in 3D Cultures with an Improved AMPK FRET Biosensor for FLIM. *Sensors* [online]. **16**(8), 1312 [vid. 2021-04-14]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16081312
- *CHUDAKOV, Dmitriy M., Mikhail V. MATZ, Sergey LUKYANOV a Konstantin A. LUKYANOV, 2010. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews* [online]. **90**(3), 1103–1163 [vid. 2021-04-02]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00038.2009
- CODAZZI, Franca, Mary N. TERUEL a Tobias MEYER, 2001. Control of astrocyte Ca²⁺ oscillations and waves by oscillating translocation and activation of protein kinase C. *Current Biology* [online]. **11**(14), 1089–1097 [vid. 2021-04-16]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-9822(01)00326-8
- COLE, Nelson B., Carolyn L. SMITH, Noah SCIAKY, Mark TERASAKI, Michael EDIDIN a Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 1996. Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* [online]. **273**(5276), 797–801 [vid. 2021-04-09]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.273.5276.797
- CORMACK, Brendan P., Raphael H. VALDIVIA a Stanley FALKOW, 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* [online]. **173**(1), 33–38. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(95)00685-0
- *COX, Susan, 2015. Super-resolution imaging in live cells. *Developmental Biology* [online]. **401**(1), 175–181 [vid. 2021-04-17]. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2014.11.025
- *DATTA, Rupsa, Tiffany M. HEASTER, Joe T. SHARICK, Amani A. GILLETTE a Melissa C. SKALA, 2020. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *Journal of Biomedical Optics* [online]. **25**(07), 1 [vid. 2021-03-14]. ISSN 1560-2281. Dostupné z: doi:10.1117/1.jbo.25.7.071203
- *DAVIDSON, Michael W., nedatováno. *Resolution | Nikon's MicroscopyU* [online] [vid. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/resolution>
- *DEPAOLI, Maria R., Helmut BISCHOF, Emrah EROGLU, Sandra BURGSTALLER, Jeta RAMADANI-MUJA, Thomas RAUTER, Maximilian SCHINAGL, Markus WALDECK-WEIERMAIR, Jesse C. HAY, Wolfgang F. GRAIER a Roland MALLI, 2019. Live cell imaging of signaling and metabolic activities. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **202**, 98–119 [vid. 2020-11-12]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2019.06.003
- DERTINGER, T., R. COLYERA, G. IYER, S. WEISS a J. ENDERLEIN, 2009. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **106**(52), 22287–22292 [vid. 2021-04-20]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0907866106
- DIPILATO, Lisa M., Xiaodong CHENG a Jin ZHANG, 2004. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **101**(47), 16513–16518 [vid. 2021-04-08]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0405973101
- *DITTRICH, P., F. MALVEZZI-CAMPEGGI, M. JAHNZ a P. SCHWILLE, 2001. Accessing molecular dynamics in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biological Chemistry* [online]. **382**(3), 491–494. ISSN 14316730. Dostupné z: doi:10.1515/BC.2001.061
- DRENAN, Ryan M., Raad NASHMI, Princess IMOUKHUEDE, Herwig JUST, Sheri MCKINNEY a Henry A. LESTER, 2008. Subcellular trafficking, pentameric assembly, and subunit stoichiometry of neuronal nicotinic acetylcholine receptors containing fluorescently labeled $\alpha 6$ and $\beta 3$ subunits. *Molecular Pharmacology* [online]. **73**(1), 27–41 [vid. 2021-04-17]. ISSN 0026895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.107.039180
- DRIES, Daniel R., Lisa L. GALLEGOS a Alexandra C. NEWTON, 2007. A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. *Journal of Biological*

Chemistry [online]. **282**(2), 826–830 [vid. 2021-04-05]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C600268200

EDIDIN, M., Y. ZAGYANSKY a T. J. LARDNER, 1976. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* [online]. **191**(4226), 466–468. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1246629

EGGELING, Christian, Christian RINGEMANN, Rebecca MEDDA, Günter SCHWARZMANN, Konrad SANDHOFF, Svetlana POLYAKOVA, Vladimir N. BELOV, Birka HEIN, Claas VON MIDDENDORFF, Andreas SCHÖNLE a Stefan W. HELL, 2009. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* [online]. **457**(7233), 1159–1162. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/nature07596

ELANGOVA, M., R. N. DAY a A. PERIASAMY, 2002. Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell. *Journal of Microscopy* [online]. **205**(1), 3–14. ISSN 00222720. Dostupné z: doi:10.1046/j.0022-2720.2001.00984.x

FAN, Zilin a Wenrui JIN, 2007. A method for visualization of biomolecules labeled by a single quantum dot in living cells by a combination of total internal reflection fluorescence microscopy and intracellular fluorescence microscopy. *Talanta* [online]. **72**(3), 1114–1122. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2007.01.004

FIOLKA, Reto, Lin SHAO, E. HESPER REGO, Michael W. DAVIDSON a Mats G.L. GUSTAFSSON, 2012. Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **109**(14), 5311–5315 [vid. 2021-04-19]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1119262109

FOWLER, Catherine E., Prafulla ARYAL, Ka Fai SUEN a Paul A. SLESINGER, 2007. Evidence for association of GABAB receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. *Journal of Physiology* [online]. **580**(1), 51–65 [vid. 2021-04-17]. ISSN 00223751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2006.123216

*FROHLICH, Victoria Centonze, 2008. Phase contrast and differential interference contrast (DIC) microscopy. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (18), 844 [vid. 2021-04-20]. ISSN 1940087X. Dostupné z: doi:10.3791/844

FUJIOKA, Aki, Kenta TERAJ, Reina E. ITOH, Kazuhiro AOKI, Takeshi NAKAMURA, Shinya KURODA, Eisuke NISHIDA a Michiyuki MATSUDA, 2006. Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **281**(13), 8917–8926 [vid. 2021-04-09]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M509344200

GIANNONE, Gregory, Eric HOSY, Florian LEVET, Audrey CONSTALS, Katrin SCHULZE, Alexander I. SOBOLEVSKY, Michael P. ROSCONI, Eric GOUAUX, Robert TAMPE, Daniel CHOQUET a Laurent COGNET, 2010. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophysical Journal* [online]. **99**(4), 1303–1310 [vid. 2021-04-19]. ISSN 15420086. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2010.06.005

*GODIN, Antoine G., Brahim LOUNIS a Laurent COGNET, 2014. Super-resolution Microscopy Approaches for Live Cell Imaging. *Biophysical Journal* [online]. **107**(8), 1777–1784 [vid. 2021-04-17]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2014.08.028

GREGOR, Carola, Jasmin K. PAPE, Klaus C. GWOSCH, Tanja GILAT, Steffen J. SAHL a Stefan W. HELL, 2019. Autonomous bioluminescence imaging of single mammalian cells with the bacterial bioluminescence system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **116**(52), 26491–26496 [vid. 2021-03-14]. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1913616116

GROSS, Sean M. a Peter ROTWEIN, 2017. Quantification of growth factor signaling and pathway cross talk by live-cell imaging. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* [online]. **312**(3), C328–C340 [vid. 2021-04-04]. ISSN 15221563. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.00312.2016

GRYNKIEWICZ, Grzegorz, Martin POENIE a Roger Y. TSIEN, 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **260**(6), 3440–3450. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)83641-4

GUDHETI, Manasa V., Nikki M. CURTHOYS, Travis J. GOULD, Dahan KIM, Mudalige S. GUNewardene, Kristin A. GABOR, Julie A. GOSSE, Carol H. KIM, Joshua ZIMMERBERG a Samuel T. HESS, 2013. Actin mediates the nanoscale membrane organization of the clustered membrane protein influenza hemagglutinin. *Biophysical Journal* [online]. **104**(10), 2182–2192 [vid. 2021-04-19]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2013.03.054

HACKLEY, Christopher R., Esteban O. MAZZONI a Justin BLAU, 2018. cAMPr: A single-wavelength fluorescent sensor for cyclic AMP. *Science Signaling* [online]. **11**(520). ISSN 19379145. Dostupné z: doi:10.1126/scisignal.aah3738

HARADA, Kazuki, Motoki ITO, Xiaowen WANG, Mika TANAKA, Devina WONGSO, Ayumu KONNO, Hirokazu HIRAI, Hajime HIRASE, Takashi Tsuboi a Tetsuya KITAGUCHI, 2017. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 1–9 [vid. 2021-04-05]. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-07820-6

HAUGH, Jason M., Franca CODAZZI, Mary TERUEL a Tobias MEYER, 2000. Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *Journal of Cell Biology* [online]. **151**(6), 1269–1279 [vid. 2021-04-16]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.151.6.1269

HEIM, Nicola a Oliver GRIESBECK, 2004. Genetically Encoded Indicators of Cellular Calcium Dynamics Based on Troponin C and Green Fluorescent Protein. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(14), 14280–14286 [vid. 2021-04-07]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M312751200

HEIN, Birka, Katrin I. WILLIG a Stefan W. HELL, 2008. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **105**(38), 14271–14276 [vid. 2021-03-14]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0807705105

HELLEN, Edward H. a Daniel AXELROD, 1991. Kinetics of epidermal growth factor/receptor binding on cells measured by total internal reflection/fluorescence recovery after photobleaching. *Journal of Fluorescence* [online]. **1**(2), 113–128. ISSN 10530509. Dostupné z: doi:10.1007/BF00865207

HERBST, Katie J., Michael D. ALLEN a Jin ZHANG, 2011. Luminescent kinase activity biosensors based on a versatile bimolecular switch. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **133**(15), 5676–5679. ISSN 00027863. Dostupné z: doi:10.1021/ja1117396

*HERMAN, Brian, Victoria E. Centonze FROHLICH, Joseph R. LAKOWICZ, Douglas B. MURPHY, Kenneth R. SPRING a Michael W. DAVIDSON, nedatováno. *Fluorescence Microscopy - Basic Concepts in Fluorescence | Olympus LS* [online] [vid. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro/>

HERTEL, Fabian, Gary C.H. MO, Sam DUWÉ, Peter DEDECKER a Jin ZHANG, 2016. RefSOFI for Mapping Nanoscale Organization of Protein-Protein Interactions in Living Cells. *Cell Reports* [online]. **14**(2), 390–400. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2015.12.036

*HILDERBRAND, Scott A., 2010. Labels and probes for live cell imaging: overview and selection guide. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **591**(2), 17–45. ISSN 19406029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-404-3_2

HIROSE, Kenzo, Shiro KADOWAKI, Mao TANABE, Hiroshi TAKESHIMA a Masamitsu IINO, 1999. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns. *Science* [online]. **284**(5419), 1527–1530 [vid. 2021-04-06]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.284.5419.1527

HONDA, Akira, Stephen R. ADAMS, Carolyn L. SAWYER, Varda LEV-RAM, Roger Y. TSIEN a Wolfgang R.G. DOSTMANN, 2001. Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **98**(5), 2437–2442 [vid. 2021-04-08]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.051631298

HUANG, Kai Chih, Kazuki BANDO, Jun ANDO, Nicholas I. SMITH, Katsumasa FUJITA a Satoshi KAWATA, 2014. 3D SERS (surface enhanced Raman scattering) imaging of intracellular pathways. *Methods* [online]. **68**(2), 348–353. ISSN 10959130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2014.02.007

- INOUE, Satoshi a Frederick I. TSUJI, 1994. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* [online]. **341**(2–3), 277–280 [vid. 2021-03-30]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(94)80472-9
- JABŁOŃSTSKI, A., 1933. Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes. *Nature* [online]. **131**(3319), 839–840. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/131839b0
- JARES-ERIJMAN, Elizabeth A. a Thomas M. JOVIN, 2003. *FRET imaging* [online]. listopad 2003. B.m.: Nature Publishing Group. [vid. 2021-04-04]. ISSN 10870156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt896
- *JENSEN, Ellen C., 2012. Use of Fluorescent Probes: Their Effect on Cell Biology and Limitations. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [online]. **295**(12), 2031–2036 [vid. 2021-04-02]. ISSN 19328486. Dostupné z: doi:10.1002/ar.22602
- *JENSEN, Ellen C., 2013. Overview of Live-Cell Imaging: Requirements and Methods Used. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [online]. **296**(1), 1–8 [vid. 2021-02-26]. ISSN 19328486. Dostupné z: doi:10.1002/ar.22554
- KAMIYAMA, Daichi, Sayaka SEKINE, Benjamin BARSIRHYNE, Jeffrey HU, Baohui CHEN, Luke A. GILBERT, Hiroaki ISHIKAWA, Manuel D. LEONETTI, Wallace F. MARSHALL, Jonathan S. WEISSMAN a Bo HUANG, 2016. Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein. *Nature Communications* [online]. **7**(1), 1–9 [vid. 2021-04-02]. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms11046
- KANG, Bin, Lauren A. AUSTIN a Mostafa A. EL-SAYED, 2014. Observing real-time molecular event dynamics of apoptosis in living cancer cells using nuclear-targeted plasmonically enhanced Raman nanoprobes. *ACS Nano* [online]. **8**(5), 4883–4892. ISSN 1936086X. Dostupné z: doi:10.1021/nn500840x
- KEYEL, Peter A., Simon C. WATKINS a Linton M. TRAUB, 2004. Endocytic Adaptor Molecules Reveal an Endosomal Population of Clathrin by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(13), 13190–13204 [vid. 2021-04-17]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M312717200
- KIM, Jongwoo, Sang Hwan NAM, Dong-Kwon LIM a Yung Doug SUH, 2019. SERS-based particle tracking and molecular imaging in live cells: toward the monitoring of intracellular dynamics. *Nanoscale* [online]. **11**(45), 21724–21727. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/C9NR05159G
- KIM, Sally A., Katrin G. HEINZET, M. Neal WAXHAM a Petra SCHWILLE, 2004. Intracellular calmodulin availability accessed with two-photon cross-correlation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **101**(1), 105–110 [vid. 2021-04-13]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2436461100
- KITAGUCHI, Tetsuya, Manami OYA, Yoshiko WADA, Takashi TSUBOI a Atsushi MIYAWAKI, 2013. Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells. *Biochemical Journal* [online]. **450**(2), 365–373 [vid. 2021-04-05]. ISSN 14708728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20121022
- KLARENBECK, Jeffrey B., Joachim GOEDHART, Mark A. HINK, Theodorus W. J. GADELLA a Kees JALINK, 2011. A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range. *PLoS ONE* [online]. **6**(4), e19170 [vid. 2021-04-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0019170
- KLARENBECK, Jeffrey, Joachim GOEDHART, Aernoud VAN BATENBURG, Daniella GROENEWALD a Kees JALINK, 2015. Fourth-Generation Epac-Based FRET Sensors for cAMP Feature Exceptional Brightness, Photostability and Dynamic Range: Characterization of Dedicated Sensors for FLIM, for Ratiometry and with High Affinity. *PLoS ONE* [online]. **10**(4), e0122513 [vid. 2021-04-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0122513
- KOENIG, Karsten a Iris RIEMANN, 2003. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of Biomedical Optics* [online]. **8**(3), 432 [vid. 2021-04-14]. ISSN 10833668. Dostupné z: doi:10.1117/1.1577349
- KOLB, Hartmuth C., M. G. FINN a K. Barry SHARPLESS, 2001. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. **40**(11), 2004–2021 [vid. 2021-04-03]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-

- LARSON, Daniel R., Julie A. GOSSE, David A. HOLOWKA, Barbara A. BAIRD a Watt W. WEBB, 2005. Temporally resolved interactions between antigen-stimulated IgE receptors and Lyn kinase on living cells. *Journal of Cell Biology* [online]. **171**(3), 527–536 [vid. 2021-04-13]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200503110
- *LAVIS, Luke D. a Ronald T. RAINES, 2014. Bright building blocks for chemical biology. *ACS Chemical Biology* [online]. **9**(4), 855–866 [vid. 2021-04-03]. ISSN 15548937. Dostupné z: doi:10.1021/cb500078u
- LEE, Robin E.C., Mohammad A. QASAIMAH, Xianfang XIA, David JUNCKER a Suzanne GAUDET, 2016. NF- κ B signalling and cell fate decisions in response to a short pulse of tumour necrosis factor. *Scientific Reports* [online]. **6**(1), 1–12 [vid. 2021-04-06]. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep39519
- LI, D., L. SHAO, B.-C. CHEN, X. ZHANG, M. ZHANG, B. MOSES, D. E. MILKIE, J. R. BEACH, J. A. HAMMER, M. PASHAM, T. KIRCHHAUSEN, M. A. BAIRD, M. W. DAVIDSON, P. XU a E. BETZIG, 2015. Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science* [online]. **349**(6251), aa3500 [vid. 2021-04-19]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aab3500
- *LIPPINCOTT-SCHWARTZ, Jennifer, 2003. Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells. *Science* [online]. **300**(5616), 87–91 [vid. 2021-02-19]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1082520
- *LIPPINCOTT-SCHWARTZ, Jennifer, Erik SNAPP a Anne KENWORTHY, 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **2**(6), 444–456 [vid. 2021-02-19]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/35073068
- LUKINAVIČIUS, Gražvydas, Luc REYMOND, Elisa D'ESTE, Anastasiya MASHARINA, Fabian GÖTTFERT, Haisen TA, Angelika GÜTHER, Mathias FOURNIER, Stefano RIZZO, Herbert WALDMANN, Claudia BLAUKOPF, Christoph SOMMER, Daniel W. GERLICH, Hans Dieter ARNDT, Stefan W. HELL a Kai JOHNSSON, 2014. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods* [online]. **11**(7), 731–733 [vid. 2021-03-14]. ISSN 15487105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.2972
- MAGDE, Douglas, Elliot ELSON a W. W. WEBB, 1972. Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters* [online]. **29**(11), 705–708 [vid. 2021-04-13]. ISSN 00319007. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevLett.29.705
- MAIER, Christina, Dominik RÜNZLER, Julia SCHINDELAR, Gottfried GRABNER, Werner WALDHÄUSL, Gottfried KÖHLER a Anton LUGER, 2005. G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *Journal of Cell Science* [online]. **118**(15), 3353–3361 [vid. 2021-04-13]. ISSN 00219533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.02462
- MAJI, Dolonchampa, Jin LU, Pinaki SARDER, Anne H SCHMIEDER, Grace CUI, Xiaoxia YANG, Dipanjan PAN, Samuel ACHILEFU a Gregory M LANZA, 2018. Cellular Trafficking of Sn-2 Phosphatidylcholine Prodrugs Studied with Fluorescence Lifetime Imaging and Super-resolution Microscopy. *Precision Nanomedicine* [online]. **1**(2), 128–145 [vid. 2021-04-14]. Dostupné z: doi:10.33218/prnano1(2).180724.1
- MANLEY, Suliana, Jennifer M. GILLETTE, George H. PATTERSON, Hari SHROFF, Harald F. HESS, Eric BETZIG a Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2008. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods* [online]. **5**(2), 155–157. ISSN 15487091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1176
- MATSU-URA, Toru, Takayuki MICHIKAWA, Takafumi INOUE, Atsushi MIYAWAKI, Manabu YOSHIDA a Katsuhiko MIKOSHIBA, 2006. Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *Journal of Cell Biology* [online]. **173**(5), 755–765 [vid. 2021-04-08]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200512141
- MATZ, Mikhail V., Arkady F. FRADKOV, Yulii A. LABAS, Aleksandr P. SAVITSKY, Andrey G. ZARAIKY, Mikhail L. MARKELOV a Sergey A. LUKYANOV, 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology* [online]. **17**(10), 969–973. ISSN 10870156. Dostupné z: doi:10.1038/13657
- MCNALLY, James C., Waltraud G. MÜLLER, Dawn WALKER, Ronald WOLFORD a Gordon L. HAGER,

2000. The glucocorticoid receptor: Rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* [online]. **287**(5456), 1262–1265 [vid. 2021-04-09]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.287.5456.1262
- MEHTA, Sohum, Yong ZHANG, Richard H. ROTH, Jin fan ZHANG, Albert MO, Brian TENNER, Richard L. HUGANIR a Jin ZHANG, 2018. Single-fluorophore biosensors for sensitive and multiplexed detection of signalling activities. *Nature Cell Biology* [online]. **20**(10), 1215–1225 [vid. 2021-04-06]. ISSN 14764679. Dostupné z: doi:10.1038/s41556-018-0200-6
- MEISSNER, Oliver a Hanns HÄBERLEIN, 2003. Lateral mobility and specific binding to GABAA receptors on hippocampal neurons monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* [online]. **42**(6), 1667–1672. ISSN 00062960. Dostupné z: doi:10.1021/bi0263356
- MERRIFIELD, Christen J., Morris E. FELDMAN, Lei WAN a Wolfhard ALMERS, 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nature Cell Biology* [online]. **4**(9), 691–698. ISSN 14657392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb837
- MIMORI-KIYOSUE, Yuko, Nobuyuki SHIINA a Shoichiro TSUKITA, 2000. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Current Biology* [online]. **10**(14), 865–868 [vid. 2021-04-06]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-9822(00)00600-X
- MIYAWAKI, Atsushi, Juan LLOPIS, Roger HEIM, J. MICHAEL MCCAFFERY, Joseph A. ADAMS, Mitsuhiko IKURA a Roger Y. TSIEN, 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* [online]. **388**(6645), 882–887 [vid. 2021-02-19]. ISSN 00280836. Dostupné z: doi:10.1038/42264
- MO, Gary C.H., Brian ROSS, Fabian HERTEL, Premashis MANNA, Xinxing YANG, Eric GREENWALD, Chris BOOTH, Ashlee M. PLUMMER, Brian TENNER, Zan CHEN, Yuxiao WANG, Eileen J. KENNEDY, Philip A. COLE, Karen G. FLEMING, Amy PALMER, Ralph JIMENEZ, Jie XIAO, Peter DEDECKER a Jin ZHANG, 2017. Genetically encoded biosensors for visualizing live-cell biochemical activity at super-resolution. *Nature Methods* [online]. **14**(4), 427–434 [vid. 2021-04-04]. ISSN 15487105. Dostupné z: doi:10.1038/nMeth.4221
- MUELLER, V., C. RINGEMANN, A. HONIGMANN, G. SCHWARZMANN, R. MEDDA, M. LEUTENEGGER, S. POLYAKOVA, V. N. BELOV, S. W. HELL a C. EGGELING, 2011. STED nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells. *Biophysical Journal* [online]. **101**(7), 1651–1660 [vid. 2021-04-19]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2011.09.006
- *MURPHY, Douglas B., Ron OLDFIELD, Stanley SCHWARTZ a Michael W. DAVIDSON, nedatováno. *Introduction to Phase Contrast Microscopy | Nikon's MicroscopyU* [online] [vid. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>
- NAGAI, T., A. SAWANO, EUN SUN PARK a A. MIYAWAKI, 2001. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **98**(6), 3197–3202 [vid. 2021-04-04]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.051636098
- NAGAI, Yasuo, Masami MIYAZAKI, Ryoko AOKI, Takeru ZAMA, Satoshi INOUE, Kenzo HIROSE, Masamitsu IINO a Masatoshi HAGIWARA, 2000. A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo. *Nature Biotechnology* [online]. **18**(3), 313–316. ISSN 10870156. Dostupné z: doi:10.1038/73767
- NÄGERL, U. Valentin, Katrin I. WILLIG, Birka HEIN, Stefan W. HELL a Tobias BONHOEFFER, 2008. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **105**(48), 18982–18987. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0810028105
- NAIR, Deepak, Eric HOSY, Jennifer D. PETERSEN, Audrey CONSTALS, Gregory GIANNONE, Daniel CHOQUET a Jean Baptiste SIBARITA, 2013. Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *Journal of Neuroscience* [online]. **33**(32), 13204–13224 [vid. 2021-04-19]. ISSN 02706474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013
- NAKAI, J., M. OHKURA a K. IMOTO, 2001. A high signal-to-noise ca²⁺ probe composed of a single green

fluorescent protein. *Nature Biotechnology* [online]. **19**(2), 137–141 [vid. 2021-04-04]. ISSN 10870156. Dostupné z: doi:10.1038/84397

NAUSCH, Lydia W.M., Jonathan LEDOUX, Adrian D. BONEV, Mark T. NELSON a Wolfgang R. DOSTMANN, 2008. Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **105**(1), 365–370 [vid. 2021-04-05]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0710387105

NEHLS, Sarah, Erik L. SNAPP, Nelson B. COLE, Kristien J.M. ZAAL, Anne K. KENWORTHY, Theresa H. ROBERTS, Jan ELLENBERG, John F. PRESLEY, Eric SIGGIA a Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2000. Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nature Cell Biology* [online]. **2**(5), 288–295. ISSN 14657392. Dostupné z: doi:10.1038/35010558

*NI, Qiang, Sohum MEHTA a Jin ZHANG, 2018. Live-cell imaging of cell signaling using genetically encoded fluorescent reporters. *The FEBS Journal* [online]. **285**(2), 203–219 [vid. 2021-03-28]. ISSN 1742-464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.14134

NICKERSON, Andrew, Tao HUANG, Li Jung LIN a Xiaolin NAN, 2014. Photoactivated localization microscopy with Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC-PALM) for nanoscale imaging of protein-protein interactions in cells. *PLoS ONE* [online]. **9**(6) [vid. 2021-04-04]. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0100589

NIINO, Yusuke, Kohji HOTTA a Kotaro OKA, 2009. Simultaneous Live Cell Imaging Using Dual FRET Sensors with a Single Excitation Light. *PLoS ONE* [online]. **4**(6), e6036 [vid. 2021-04-08]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0006036

NIKOLAEV, Viacheslav O., Moritz BÜNEMANN, Lutz HEIN, Annette HANNAWACKER a Martin J. LOHSE, 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(36), 37215–37218 [vid. 2021-04-08]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C400302200

NIKOLAEV, Viacheslav O., Stepan GAMBARYAN a Martin J. LOHSE, 2006. Fluorescent sensors for rapid monitoring of intracellular cGMP. *Nature Methods* [online]. **3**(1), 23–25. ISSN 15487091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth816

NIKONOV, Andrei V., Erik SNAPP, Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ a Gert KREIBICH, 2002. Active translocon complexes labeled with GFP-Dad1 diffuse slowly as large polysome arrays in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* [online]. **158**(3), 497–506 [vid. 2021-04-09]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200201116

OANCEA, Elena a Tobias MEYER, 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* [online]. **95**(3), 307–318 [vid. 2021-04-05]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81763-8

OANCEA, Elena, Mary N. TERUEL, Andrew F.G. QUEST a Tobias MEYER, 1998. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *Journal of Cell Biology* [online]. **140**(3), 485–498 [vid. 2021-04-05]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.140.3.485

ODAKA, Haruki, Satoshi ARAI, Takafumi INOUE a Tetsuya KITAGUCHI, 2014. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS ONE* [online]. **9**(6) [vid. 2021-04-05]. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0100252

OGIKUBO, Shinya, Takakazu NAKABAYASHI, Takashi ADACHI, Md Serajul ISLAM, Tomokazu YOSHIZAWA, Masataka KINJO a Nobuhiro OHTA, 2011. Intracellular pH sensing using autofluorescence lifetime microscopy. *Journal of Physical Chemistry B* [online]. **115**(34), 10385–10390. ISSN 15205207. Dostupné z: doi:10.1021/jp2058904

OHEIM, M., Dinah LOERKE, Walter STÜHMER a Robert H. CHOW, 1998. The last few milliseconds in the life of a secretory granule. *European Biophysics Journal* [online]. **27**(2), 83–98. ISSN 0175-7571. Dostupné z: doi:10.1007/s002490050114

OHEIM, M. a W. STUHMER, 2000. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *European Biophysics Journal* [online]. **29**(2), 67–89. ISSN 01757571. Dostupné

z: doi:10.1007/s002490050253

OHTA, Yusaku, Toshiaki FURUTA, Takeharu NAGAI a Kazuki HORIKAWA, 2018. Red fluorescent cAMP indicator with increased affinity and expanded dynamic range. *Scientific Reports* [online]. **8**(1) [vid. 2021-04-05]. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-20251-1

OKABE, Kohki, Noriko INADA, Chie GOTA, Yoshie HARADA, Takashi FUNATSU a Seiichi UCHIYAMA, 2012. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Communications* [online]. **3**(1), 1–9 [vid. 2021-04-14]. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms1714

*OLDACH, Laurel a Jin ZHANG, 2014. Genetically Encoded Fluorescent Biosensors for Live-Cell Visualization of Protein Phosphorylation. *Chemistry & Biology* [online]. **21**(2), 186–197 [vid. 2021-02-17]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.012

PAEK, Andrew L., Julia C. LIU, Alexander LOEWER, William C. FORRESTER a Galit LAHAV, 2016. Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing. *Cell* [online]. **165**(3), 631–642. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2016.03.025

PALMER, Amy E., Marta GIACOMELLO, Tanja KORTEMME, S. Andrew HIRE, Varda LEV-RAM, David BAKER a Roger Y. TSIEN, 2006. Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chemistry and Biology* [online]. **13**(5), 521–530 [vid. 2021-04-07]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2006.03.007

PANGRŠIČ, Tina, Maja POTOKAR, Matjaž STENOVEC, Marko KREFT, Elsa FABBRETTI, Andrea NISTRI, Evgeny PRYAZHNIKOV, Leonard KHIROUG, Rashid GINIATULLIN a Robert ZOREC, 2007. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **282**(39), 28749–28758 [vid. 2021-04-17]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M700290200

*PÉREZ KOLDENKOVA, Vadim a Takeharu NAGAI, 2013. Genetically encoded Ca²⁺ indicators: Properties and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* [online]. **1833**(7), 1787–1797. ISSN 01674889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2013.01.011

*PHAIR, Robert D. a Tom MISTELI, 2001. Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **2**(12), 898–907. ISSN 14710072. Dostupné z: doi:10.1038/35103000

PHAIR, Robert D a Tom MISTELI, 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* [online]. **404**(6778), 604–609. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35007077

POLITZ, Joan C., Elizabeth S. BROWNE, David E. WOLF a Thoru PEDERSON, 1998. Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **95**(11), 6043–6048 [vid. 2021-04-13]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.11.6043

PONSIOEN, Bas, Jun ZHAO, Jurgen RIEDL, Fried ZWARTKRUIS, Gerard VAN DER KROGT, Manuela ZACCOLO, Wouter H. MOOLENAAR, Johannes L. BOS a Kees JALINK, 2004. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Reports* [online]. **5**(12), 1176–1180 [vid. 2021-04-05]. ISSN 1469221X. Dostupné z: doi:10.1038/sj.embor.7400290

*POPE, Iestyn, Wolfgang LANGBEIN, Paola BORRI a Peter WATSON, 2012. Live Cell Imaging with Chemical Specificity Using Dual Frequency CARS Microscopy. In: *Methods in Enzymology* [online]. 1. vyd. B.m.: Elsevier Inc., s. 273–291. ISBN 9780123918574. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-391857-4.00014-8

POULI, Dimitra, Mihaela BALU, Carlo A. ALONZO, Zhiyi LIU, Kyle P. QUINN, Francisca RIUS-DIAZ, Ronald M. HARRIS, Kristen M. KELLY, Bruce J. TROMBERG a Irene GEORGAKOUDI, 2016. Imaging mitochondrial dynamics in human skin reveals depth-dependent hypoxia and malignant potential for diagnosis. *Science Translational Medicine* [online]. **8**(367), 367ra169 [vid. 2021-04-14]. ISSN 19466242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aag2202

PRASHER, Douglas C., Virginia K. ECKENRODE, William W. WARD, Frank G. PRENDERGAST a Milton J. CORMIER, 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* [online]. **111**(2), 229–233. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(92)90691-H

- PRYAZHNIKOV, Evgeny a Leonard KHIROUG, 2008. Sub-micromolar increase in $[Ca^{2+}]_i$ triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *GLIA* [online]. **56**(1), 38–49 [vid. 2021-04-17]. ISSN 08941491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.20590
- QIN, Kou, Pooja R. SETHI a Nevin A. LAMBERT, 2008. Abundance and stability of complexes containing inactive G protein-coupled receptors and G proteins. *The FASEB Journal* [online]. **22**(8), 2920–2927 [vid. 2021-04-09]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.08-105775
- REGO, E. Hesper, Lin SHAO, John J. MACKLIN, Lukman WINOTO, Göran A. JOHANSSON, Nicholas KAMPS-HUGHES, Michael W. DAVIDSON a Mats G.L. GUSTAFSSON, 2012. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **109**(3) [vid. 2021-04-19]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1107547108
- REGOT, Sergi, Jacob J. HUGHEY, Bryce T. BAJAR, Silvia CARRASCO a Markus W. COVERT, 2014. High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell* [online]. **157**(7), 1724–1734 [vid. 2021-04-06]. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2014.04.039
- REIGOTO, Agatha M., Sarah A. ANDRADE, Marianna C.R.R. SEIXAS, Manoel L. COSTA a Claudia MERMELSTEIN, 2021. A comparative study on the use of microscopy in pharmacology and cell biology research. *PLoS ONE* [online]. **16**(1), e0245795 [vid. 2021-03-20]. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0245795
- *RESCH-GENGER, Ute, Markus GRABOLLE, Sara CAVALIERE-JARICOT a Roland NITSCHKE, 2008. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods* [online]. **5**(9), 763–775. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1248
- RIDGWAY, E. B. a C. C. ASHLEY, 1967. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **29**(2), 229–234. ISSN 10902104. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(67)90592-X
- RIVEN, Inbal, Shachar IWANIR a Eitan REUVENY, 2006. GIRK Channel Activation Involves a Local Rearrangement of a Preformed G Protein Channel Complex. *Neuron* [online]. **51**(5), 561–573 [vid. 2021-04-17]. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2006.08.017
- *RODRIGUEZ, Erik A., Robert E. CAMPBELL, John Y. LIN, Michael Z. LIN, Atsushi MIYAWAKI, Amy E. PALMER, Xiaokun SHU, Jin ZHANG a Roger Y. TSIEN, 2017. The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. **42**(2), 111–129. ISSN 13624326. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2016.09.010
- ROMOSER, Valerie A., Patricia M. HINKLE a Anthony PERSECHINI, 1997. Detection in living cells of Ca^{2+} -dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(20), 13270–13274 [vid. 2021-04-07]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.20.13270
- *ROSS, Stephen T., Stanley SCHWARTZ, Thomas J. FELLERS a Michael W. DAVIDSON, nedatováno. *Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy | Nikon's MicroscopyU* [online] [vid. 2021-04-17]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/total-internal-reflection-fluorescence-tirf-microscopy>
- ROSSIER, Olivier, Vivien OCTEAU, Jean Baptiste SIBARITA, Cécile LEDUC, Béatrice TESSIER, Deepak NAIR, Volker GATTERDAM, Olivier DESTAING, Corinne ALBIGÈS-RIZO, Robert TAMPÉ, Laurent COGNET, Daniel CHOQUET, Brahim LOUNIS a Grégory GIANNONE, 2012. Integrins β 1 and β 3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature Cell Biology* [online]. **14**(10), 1057–1067. ISSN 14657392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb2588
- RUAN, Qiaoqiao, Yan CHEN, Enrico GRATTON, Michael GLASER a William W. MANTULIN, 2002. Cellular characterization of adenylate kinase and its isoform: Two-photon excitation fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal* [online]. **83**(6), 3177–3187. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(02)75320-4
- *SAHOO, Harekrushna, 2012. Fluorescent labeling techniques in biomolecules: A flashback. *RSC Advances* [online]. **2**(18), 7017–7029. ISSN 20462069. Dostupné z: doi:10.1039/c2ra20389h

- SAITO, Kenta, Y. F. CHANG, Kazuki HORIKAWA, Noriyuki HATSUGAI, Yuriko HIGUCHI, Mitsuru HASHIDA, Yu YOSHIDA, Tomoki MATSUDA, Yoshiyuki ARAI a Takeharu NAGAI, 2012. Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nature Communications* [online]. **3**(1), 1–9 [vid. 2021-04-20]. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2248
- SAITO, Kenta, Noriyuki HATSUGAI, Kazuki HORIKAWA, Kentaro KOBAYASHI, Toru MATSU-URA, Katsuhiko MIKOSHIBA a Takeharu NAGAI, 2010. Auto-Luminescent Genetically-Encoded Ratiometric Indicator for Real-Time Ca²⁺ Imaging at the Single Cell Level. *PLoS ONE* [online]. **5**(4), e9935 [vid. 2021-04-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0009935
- SAITO, Kenta, Eiko ITO, Yuichi TAKAKUWA, Mamoru TAMURA a Masataka KINJO, 2003. In situ observation of mobility and anchoring of PKCβI in plasma membrane. *FEBS Letters* [online]. **541**(1–3), 126–131 [vid. 2021-04-13]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(03)00324-7
- SAKO, Yasushi, Shigeru MINOGHCHI a Toshio YANAGIDA, 2000. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nature Cell Biology* [online]. **2**(3), 168–172. ISSN 14657392. Dostupné z: doi:10.1038/35004044
- SATO, M., N. HIDA, T. OZAWA a Y. UMEZAWA, 2000. Fluorescent indicators for cyclic GMP based on cyclic GMP-dependent protein kinase Iα and green fluorescent proteins. *Analytical Chemistry* [online]. **72**(24), 5918–5924 [vid. 2021-04-08]. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/ac0006167
- SATO, Moritoshi, Yoshibumi UEDA, Masabumi SHIBUYA a Yoshio UMEZAWA, 2005. Locating inositol 1,4,5-trisphosphate in the nucleus and neuronal dendrites with genetically encoded fluorescent indicators. *Analytical Chemistry* [online]. **77**(15), 4751–4758. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/ac040195j
- SATO, Moritoshi, Yoshibumi UEDA a Yoshio UMEZAWA, 2006. Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes. *Nature Methods* [online]. **3**(10), 797–799. ISSN 15487091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth930
- SCHMORANZER, Jan, Mark GOULIAN, Dan AXELROD a Sanford M. SIMON, 2000. Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology* [online]. **149**(1), 23–31 [vid. 2021-04-17]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.149.1.23
- SHAGIN, Dmitry A., Ekaterina V. BARSOVA, Yurii G. YANUSHEVICH, Arkady F. FRADKOV, Konstantin A. LUKYANOV, Yulii A. LABAS, Tatiana N. SEMENOVA, Juan A. UGALDE, Ann MEYERS, Jose M. NUNEZ, Edith A. WIDDER, Sergey A. LUKYANOV a Mikhail V. MATZ, 2004. GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **21**(5), 841–850 [vid. 2021-04-02]. ISSN 1537-1719. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msh079
- SHIMOMURA, Osamu, Frank H. JOHNSON a Yo SAIGA, 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* [online]. **59**(3), 223–239. ISSN 0095-9898. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.1030590302
- *SMITH, David J., 2008. Ultimate resolution in the electron microscope? *Materials Today* [online]. **11**(SUPPL.), 30–38 [vid. 2021-03-22]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(09)70005-7
- SOOHOO, Amanda L., Shanna L. BOWERSOX a Manojkumar A. PUTHENVEEDU, 2014. Visualizing Clathrin-mediated Endocytosis of G Protein-coupled Receptors at Single-event Resolution via TIRF Microscopy. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (92), e51805 [vid. 2021-04-17]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/51805
- *SPECHT, Elizabeth A., Esther BRASELMANN a Amy E. PALMER, 2017. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annual Review of Physiology* [online]. **79**, 93–117. ISSN 15451585. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034055
- STEPHAN, Till, Axel ROESCH, Dietmar RIEDEL a Stefan JAKOBS, 2019. Live-cell STED nanoscopy of mitochondrial cristae. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 1–6 [vid. 2021-04-19]. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-48838-2
- *STEPHENS, David J., 2003. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* [online]. **300**(5616), 82–86 [vid. 2021-02-19]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1082160

- STETCIURA, Inna Y., Alexey YASHCHENOK, Admir MASIC, Evgeny V. LYUBIN, Olga A. INOZEMTSEVA, Maria G. DROZDOVA, Elena A. MARKVICHKOVA, Boris N. KHLEBTSOV, Andrey A. FEDYANIN, Gleb B. SUKHORUKOV, Dmitry A. GORIN a Dmitry VOLODKIN, 2015. Composite SERS-based satellites navigated by optical tweezers for single cell analysis. *Analyst* [online]. **140**(15), 4981–4986. ISSN 13645528. Dostupné z: doi:10.1039/c5an00392j
- STEYER, J. A. a Wolfhard ALMERS, 1999. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* [online]. **76**(4), 2262–2271. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(99)77382-0
- SUNG, Myong Hee, Ning LI, Qizong LAO, Rachel A. GOTTSCHALK, Gordon L. HAGER a Iain D.C. FRASER, 2014. Switching of the relative dominance between feedback mechanisms in lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling. *Science Signaling* [online]. **7**(308), ra6 [vid. 2021-04-02]. ISSN 19450877. Dostupné z: doi:10.1126/scisignal.2004764
- TAKAI, Akira, Masahiro NAKANO, Kenta SAITO, Remi HARUNO, Tomonobu M. WATANABE, Tatsuya OHYANAGI, Takashi JIN, Yasushi OKADA a Takeharu NAGAI, 2015. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **112**(14), 4352–4356 [vid. 2021-04-20]. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1418468112
- TANIMURA, Akihiko, Takao MORITA, Akihiro NEZU, Akiko SHITARA, Noboru HASHIMOTO a Yosuke TOJYO, 2009. Use of fluorescence resonance energy transfer-based biosensors for the quantitative analysis of inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics in calcium oscillations. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **284**(13), 8910–8917 [vid. 2021-04-08]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M805865200
- TANIMURA, Akihiko, Akihiro NEZU, Takao MORITA, R. James TURNER a Yosuke TOJYO, 2004. Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5-trisphosphate in single living cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(37), 38095–38098 [vid. 2021-04-08]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C400312200
- TERAI, Kenta a Michiyuki MATSUDA, 2005. Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Reports* [online]. **6**(3), 251–255 [vid. 2021-04-09]. ISSN 1469221X. Dostupné z: doi:10.1038/sj.embor.7400349
- TERUEL, Mary N. a Tobias MEYER, 2002. Parallel single-cell monitoring of receptor-triggered membrane translocation of a calcium-sensing protein module. *Science* [online]. **295**(5561), 1910–1912 [vid. 2021-04-16]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1065028
- TEWSON, Paul, Mara WESTENBERG, Yongxin ZHAO, Robert E. CAMPBELL, Anne Marie QUINN a Thomas E. HUGHES, 2012. Simultaneous Detection of Ca²⁺ and Diacylglycerol Signaling in Living Cells. *PLoS ONE* [online]. **7**(8), e42791 [vid. 2021-04-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0042791
- TIMPSON, Paul, Ewan J. MCGHEE, Jennifer P. MORTON, Alex VON KRIEGSHEIM, Juliane P. SCHWARZ, Saadia A. KARIM, Brendan DOYLE, Jean A. QUINN, Neil O. CARRAGHER, Mike EDWARD, Michael F. OLSON, Margaret C. FRAME, Valerie G. BRUNTON, Owen J. SANSOM a Kurt I. ANDERSON, 2011. Spatial regulation of RhoA activity during pancreatic cancer cell invasion driven by mutant p53. *Cancer Research* [online]. **71**(3), 747–757 [vid. 2021-04-14]. ISSN 00085472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2267
- TØNNESEN, Jan, Gergely KATONA, Balázs RÓZSA a U. Valentin NÄGERL, 2014. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience* [online]. **17**(5), 678–685. ISSN 15461726. Dostupné z: doi:10.1038/nn.3682
- TOOMRE, Derek, Jürgen A. STEYER, Patrick KELLER, Wolfhard ALMERS a Kai SIMONS, 2000. Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy. *Journal of Cell Biology* [online]. **149**(1), 33–40 [vid. 2021-04-17]. ISSN 00219252. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.149.1.33
- TSIEN, Roger Y., 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* [online]. **290**(5806), 527–528 [vid. 2021-04-05]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/290527a0
- *TSIEN, Roger Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **67**(1), 509–

544 [vid. 2021-03-28]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509

TSIEN, Roger Y, 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* [online]. **19**(11), 2396–2404. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00552a018

TSOU, Peiling, Bin ZHENG, Chia Hsien HSU, Atsuo T. SASAKI a Lewis C. CANTLEY, 2011. A fluorescent reporter of AMPK activity and cellular energy stress. *Cell Metabolism* [online]. **13**(4), 476–486. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2011.03.006

TUNG, Jack K., Ken BERGLUND, Claire-Anne GUTEKUNST, Ute HOCHGESCHWENDER a Robert E. GROSS, 2016. Bioluminescence imaging in live cells and animals. *Neurophotonics* [online]. **3**(02), 1 [vid. 2021-03-14]. ISSN 2329-423X. Dostupné z: doi:10.1117/1.nph.3.2.025001

TURCOTTE, Raphaël, Yajie LIANG, Masashi TANIMOTO, Qinrong ZHANG, Ziwei LI, Minoru KOYAMA, Eric BETZIG a Na JI, 2019. Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the living brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **116**(19), 9586–9591. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1819965116

*VAN DE LINDE, Sebastian, Sarah AUFMKOLK, Christian FRANKE, Thorge HOLM, Teresa KLEIN, Anna LÖSCHBERGER, Sven PROPPERT, Steve WOLTER a Markus SAUER, 2013. Investigating Cellular Structures at the Nanoscale with Organic Fluorophores. *Chemistry & Biology* [online]. **20**(1), 8–18 [vid. 2021-04-03]. ISSN 10745521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2012.11.004

*VICIDOMINI, Giuseppe, Paolo BIANCHINI a Alberto DIASPRO, 2018. STED super-resolved microscopy. *Nature Methods* [online]. **15**(3), 173–182 [vid. 2021-03-14]. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.4593

*WALLING, Maureen, Jennifer NOVAK a Jason R. E. SHEPARD, 2009. Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **10**(2), 441–491 [vid. 2021-04-02]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms10020441

WESTPHAL, Volker, Silvio O. RIZZOLI, Marcel A. LAUTERBACH, Dirk KAMIN, Reinhard JAHN a Stefan W. HELL, 2008. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science* [online]. **320**(5873), 246–249 [vid. 2021-04-19]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1154228

WILMS, Christian D. a Jens EILERS, 2007. Photo-physical properties of Ca²⁺-indicator dyes suitable for two-photon fluorescence-lifetime recordings. *Journal of Microscopy* [online]. **225**(3), 209–213. ISSN 00222720. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01746.x

WINCKLER, Pascale, Lydia LARTIGUE, Gregory GIANNONE, Francesca DE GIORGI, François ICHAS, Jean Baptiste SIBARITA, Brahim LOUNIS a Laurent COGNET, 2013. Identification and super-resolution imaging of ligand-activated receptor dimers in live cells. *Scientific Reports* [online]. **3**(1), 1–5 [vid. 2021-04-19]. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep02387

WU, Xufeng, Xiaohong ZHAO, Lauren BAYLOR, Shivani KAUSHAL, Evan EISENBERG a Lois E. GREENE, 2001. Clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology* [online]. **155**(2), 291–300 [vid. 2021-04-09]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200104085

*WYSOCKI, Laura M. a Luke D. LAVIS, 2011. Advances in the chemistry of small molecule fluorescent probes. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. **15**(6), 752–759. ISSN 18790402. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2011.10.013

YUDOWSKI, Guillermo A., Manojkumar A. PUTHENVEEDU a Mark VON ZASTROW, 2006. Distinct modes of regulated receptor insertion to the somatodendritic plasma membrane. *Nature Neuroscience* [online]. **9**(5), 622–627 [vid. 2021-04-17]. ISSN 10976256. Dostupné z: doi:10.1038/nn1679

ZAAL, Kristien J.M., Carolyn L. SMITH, Roman S. POLISHCHUK, Nihal ALTAN, Nelson B. COLE, Jan ELLENBERG, Koret HIRSCHBERG, John F. PRESLEY, Theresa H. ROBERTS, Eric SIGGIA, Robert D. PHAIR a Jennifer LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 1999. Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis. *Cell* [online]. **99**(6), 589–601. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81548-2

ZACCOLO, Manuela, Francesca DE GIORGI, Charles Y. CHO, Luxin FENG, Tom KNAPP, Paul A. NEGULESCU, Susan S. TAYLOR, Roger Y. TSIEN a Tullio POZZAN, 2000. A genetically encoded,

fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nature Cell Biology* [online]. **2**(1), 25–29. ISSN 14657392. Dostupné z: doi:10.1038/71345

ZENISEK, David, Jürgen A. STEYER, Morris E. FELDMAN a Wolhard ALMERS, 2002. A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron* [online]. **35**(6), 1085–1097 [vid. 2021-04-17]. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/S0896-6273(02)00896-6

ZHANG, Jin, Yuliang MA, Susan S. TAYLOR a Roger Y. TSIEN, 2001. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **98**(26), 14997–15002 [vid. 2021-04-06]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.211566798

ZHANG, Limin, Kuei C. LEE, Mahaveer S. BHOJANI, Amjad P. KHAN, Alla SHILMAN, Eric C. HOLLAND, Brian D. ROSS a Alnawaz REHEMTULLA, 2007. Molecular imaging of Akt kinase activity. *Nature Medicine* [online]. **13**(9), 1114–1119 [vid. 2021-04-06]. ISSN 10788956. Dostupné z: doi:10.1038/nm1608

ZHONG, Z-H., A. PRAMANIK, K. EKBERG, O. T. JANSSON, H. JÖRNVALL, J. WAHREN a R. RIGLER, 2001. Insulin binding monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Diabetologia* [online]. **44**(9), 1184–1188 [vid. 2021-04-13]. ISSN 0012-186X. Dostupné z: doi:10.1007/s001250100608