

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ ПРОЦЕССОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

© 2022 г. Е. В. Панферов¹*, А. Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: panferov.aux@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2022 г.

После доработки 13.04.2022 г.

Принята к публикации 15.04.2022 г.

В обзоре рассмотрены основные современные методики и подходы флуоресцентной микроскопии, применяющиеся в исследовании внутриклеточных сигнальных каскадов. Обсуждаются методики анализа фиксированных препаратов и прижизненной визуализации, отдельное внимание уделено методам сверхразрешающей микроскопии. Анализируются границы применения и ограничения методов, представлены научные достижения последних лет, полученные при помощи описываемых методик.

Ключевые слова: световая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, внутриклеточная сигнализация, прижизненная визуализация, иммунофлуоресценция, сверхразрешающая микроскопия

DOI: 10.31857/S0041377122040058

Клетки многоклеточных организмов способны воспринимать и отвечать на широкий набор внеклеточных и внутриклеточных факторов. Этот процесс называется внутриклеточной сигнализацией и является ключевым как в процессе развития организма, так и в поддержании гомеостаза в дифференцированных тканях. В связи с этим, изучение процессов внутриклеточной сигнализации представляет большой интерес для современной биологии. Для декодирования сигнальных каскадов, лежащих в основе этих процессов, необходимо получить информацию о локализации и транслокации участвующих в них молекул, измерить, где и когда они активны, как меняется их функциональное состояние, как и в каком порядке они взаимодействуют между собой. В настоящем обзоре мы рассмотрим, как на эти вопросы возможно ответить при помощи современных методик световой микроскопии, а также проиллюстри-

руем их примерами экспериментальных работ последних лет.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА СВЕТООПТИЧЕСКОМ УРОВНЕ

Современная флуоресцентная микроскопия является важным инструментом в области экспериментальной биологии. Несмотря на то, что методики молекулярной биологии хорошо позволяют ответить на вопросы “что и как?” происходит в клетке, они, как правило, не дают возможности оценить временные и пространственные особенности этих процессов, то есть ответить на вопросы “где и когда?”. Оптическая микроскопия, в частности флуоресцентная, предоставляет широкий спектр возможностей для решения таких экспериментальных задач. Другой точкой расхождения молекулярных методов и микроскопии является их статистический аспект. Методы молекулярной биологии, как правило, анализируют клеточные популяции целиком, с одной стороны достигая большой статистической мощности, но с другой – теряя возможность отследить изменчивость на уровне индивидуальных клеток. Безусловно, существуют методы так называемого single-cell анализа, позволяющие отследить такие изменения (Lun, Bodenmiller, 2020), но их едва ли можно назвать рутинными. В то же время микроскопия в любом своем проявлении несколько менее эффективна для анализа популяций, что компенсируется отсутствием их статистической гомогенизации.

Принятые сокращения: FCS – флуоресцентная корреляционная спектроскопия (Fluorescence Correlation Spectroscopy); FCCS – флуоресцентная кросс-корреляционная спектроскопия (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy); FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ* (Fluorescent *in situ* Hybridization); FLIM – микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy); FRAP – восстановление флуоресценции после фотовыцветания (Fluorescence Recovery After Photobleaching), FRET – Форстерский резонансный перенос энергии (Forster Resonance Energy Transfer); SIM – микроскопия структурированного освещения (Structured Illumination Microscopy); SMLM – микроскопия локализации одиночных молекул (Single Molecule Localization Microscopy); STED – подавление спонтанного испускания (Stimulated Emission-Depletion).

Это позволяет выявлять отдельные события, которые могли бы быть оставлены незамеченными при использовании исключительно молекулярно-биологического анализа. Из сказанного выше очевидно, что современная оптическая микроскопия не является неким противопоставлением молекулярной биологии, а наоборот, является комплементарной ей набором методик, позволяющим при совместном использовании намного более точно описывать биологические системы, нежели каждый из этих подходов способен по отдельности.

Одним из наиболее ярких примеров такого взаимодействия является изучение внутриклеточной сигнализации. Для процессов внутриклеточной сигнализации характерно значительное количество последовательно активирующихся компонентов, причем время и место их активации играют большую биологическую роль (Nair et al., 2019). В изучении сигнальных процессов важно не только охарактеризовать этот каскад, но и отследить клеточный ответ на него. В рамках данного обзора последний аспект затронут не будет, поскольку разнообразие таких процессов столь велико, что в рамках одной обзорной статьи их уместить было бы невозможно. Вместо этого мы сосредоточимся на описании методических подходов, используемых для анализа протекания собственно сигнальных каскадов, хотя все описываемые методы могут быть применены более широко.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Наиболее распространенным методом микроскопического исследования является визуализация компонентов сигнальных путей на фиксированных препаратах. Это связано с несколькими факторами: во-первых, для пробоподготовки может быть необходима жесткая обработка образца, несовместимая с жизнедеятельностью клеток; во-вторых, момент получения образца и его анализ могут быть значительно разнесены во времени. Наконец, фиксированные препараты не претерпевают физиологических изменений при длительном воздействии яркого возбуждающего света, что позволяет получать микрофотографии более высокого качества, чем в случае прижизненной визуализации, за счет увеличения выдержки и яркости источника освещения (Hobro, Smith, 2017). В качестве фиксированных препаратов могут выступать как клеточные культуры, так и гистологические срезы, и в отдельных случаях даже оптически просветленные цельные органы лабораторных животных (Matryba et al., 2019).

Одним из примеров жесткой обработки является использование пермеабелизирующих клеточные мембраны химических агентов, что позволяет применять антитела для иммунофлуоресцентной визуализации внутриклеточных антигенов. Серьезным ограничени-

ем этого метода является отсутствие коммерческих антител на некоторые сигнальные молекулы, а также сложности с визуализацией меток, связанных со структурами, плохо сохраняющимися при фиксации (Meyer, Teruel, 2003).

Наиболее распространенным в изучении внутриклеточной сигнализации подходом является подтверждение активации сигнального пути путем иммунофлуоресцентного выявления одного из его компонентов и дальнейшее сравнение интенсивности и локализации флуоресцентного сигнала между экспериментальными группами. Важно отметить, что получаемые таким образом данные достаточно сложно интерпретировать количественно. Стохастическая природа конъюгации антител с молекулами красителя приводит к наличию даже в моноклональных стоковых растворах нескольких подвидов антител с разной плотностью связанных конъюгатов. Этот феномен не только влияет на аффинность самого антитела, но и может приводить к концентрационному тушению флуоресценции за счет формирования эксимеров из конъюгированных к одному и тому же антителу флуоресцентных молекул (Szabó et al., 2018). Следовательно, использование антител для оценки сравнительной интенсивности флуоресценции в количественных биофизических экспериментах, например, с использованием метода Форстерского резонансного переноса энергии, нежелательно. Тем не менее, поскольку распределение плотности конъюгатов соответствует распределению Пуассона (Vira et al., 2010), для менее точных измерений иммунофлуоресцентная окраска вполне допустима. Примерами таких экспериментальных работ может быть подтверждение активации сигнального пути Wnt путем визуализации кластеризации лиганда Frizzled и транслокации β -катенина в ходе искусственно индуцированной локализации MCK (Rotherham et al., 2018), демонстрация ядерной транслокации YAP и TAZ после обработки клеток MCF7 экзосомами, выделяемыми полученными из MCK адипоцитами (Wang et al., 2019), или подтверждение увеличения уровня экспрессии компонентов пути Notch при эпителиально-мезенхимном переходе (Wang et al., 2009).

Одним из преимуществ иммунофлуоресцентного мечения является возможность использования для визуализации антител, выработанных против определенных доменов белковой молекулы или даже против белков в определенных функциональных состояниях. Поскольку в процессах внутриклеточной сигнализации процессы посттрансляционной модификации белков играют ключевую роль, возможность зафиксировать их представляет большой интерес. Так, визуализация фосфорилирования белка позволяет зафиксировать активацию того или иного сигнального пути. Таким образом была показана активация фосфорилированной формой α -синуклеина пути JNK и отдельных компонентов MAPK-каскада при помощи визуализации их фосфорилированных форм в нейронах при болезни Паркинсона,

что в свою очередь приводит к фрагментации митохондрий и является одним из механизмов патогенетических факторов этого заболевания (Grassi et al., 2019). В качестве другого примера можно привести работу, демонстрирующую активацию посредством фосфорилирования JAK2–STAT3 каскада в астроцитах при хронической чесотке (Du et al., 2019). Существуют также работы, демонстрирующие ацетилирование белков, например белков микротрубочек в результате активации пути Shh, который контролирует таким образом процессы внутриклеточного транспорта и миграции клеток (Singh et al., 2019). В тех случаях, когда при активации сигнального пути происходит протеолиз одного из участвующих белков, для отслеживания дальнейшей судьбы отделенной части удобно использовать антитела, распознающие только такой фрагмент. К таким белкам относятся, например, каспазы, активирующиеся после протеолиза своих проферментных форм. Визуализация активности каспаз в период развития волосных фолликулов показала, что каспазы являются не только индукторами апоптоза, но и принимают участие в регуляции пролиферативной активности клеток, контролируя таким образом размер органов (Yosefzon et al., 2018).

Визуализация синтеза и локализации нуклеиновых кислот в клетках или тканях возможна при помощи метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), в котором интересующие экспериментатора последовательности в образце гибридизуются с флуоресцентно мечеными комплементарными зондами. В контексте изучения внутриклеточной сигнализации это может быть интересно для визуализации РНК, принимающих участие в сигнальных процессах. Например, показано, что микроРНК-181a в клетках колоректального рака подавляет экспрессию ингибитора SRC-киназы SRCIN1, приводя к активации SRC/VEGF каскада, запускающего процесс ангиогенеза, а, значит, потенциально может служить терапевтической мишенью (Sun et al., 2018). В другой работе было показано, что увеличение уровня микроРНК-146a-5p в клетках дорсальных ганглиев подавляет сигнальный путь IRAK1/TRAF6, способствуя снижению боли (Wang et al., 2018). Кольцевые РНК также могут служить целью FISH-визуализации. Показано, что кольцевая РНК circPVT1 в клетках легочной карциномы способствует росту и инвазии опухоли за счет взаимодействия с транскрипционным фактором E2F2 (Li et al., 2018). Кроме того, с использованием методик гибридизации с повышенной чувствительностью, возможна локализация транскрипционных изоформ, отличающихся одиночными нуклеотидами, на уровне отдельных клеток. Таким образом была визуализирована дифференциальная экспрессия четырех транскрипционных изоформ рецептора нейрегулина ErbB4 (Erben et al., 2018).

Как было указано выше, современные методики оптической микроскопии также являются компле-

ментарными и методам молекулярной биологии. В этом контексте особый интерес представляет возможность контролируемой изоляции отдельных участков интереса непосредственно с микропрепарата для дальнейшего анализа молекулярно-биологическими методами (Bevilacqua, Ducos, 2018). Такой подход называется микродиссекцией, и может быть реализован как при помощи механического отсечения определенных участков препарата при помощи микроманипуляторов, так и бесконтактно, с использованием ультрафиолетового лазера высокой мощности. Изолированные участки препарата, в качестве которого могут выступать как клеточная культура, так и гистологический срез, автоматизированным способом собираются в микропробирки, после чего могут быть подвергнуты дальнейшему анализу. Примером применения такой методики является изоляция из препарата сетчатки отдельных кровеносных сосудов для изучения влияния пути Wnt на прохождение в них процессов транскрипции путем постановки qPCR с выделенной РНК (Wang et al., 2020). Полученный материал можно также анализировать и на протеомном уровне. Таким образом было выявлено, что метастазирующие сквамозно-клеточные карциномы отличаются от неметастазирующих повышенный уровень компонентов сигнального пути KEGG (Shapanis et al., 2021).

ПРИЖИЗНЕННАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Флуоресцентная визуализация белков прижизненно возможна во многом благодаря использованию репортерных флуоресцентных белков. Такой подход связан с определенными ограничениями: искусственное добавление к сигнальному белку флуоресцентного домена может привести к нарушению его функциональной активности, и требует проверки на предмет возможных нарушений в физиологии клетки перед началом эксперимента. Кроме того, неравномерная доставка генно-инженерных конструкций, индуцирующих такую экспрессию, затрудняет прямую оценку уровня экспрессии по интенсивности флуоресценции введенных в клетку меток (Meyer, Teruel, 2003). Тем не менее, на данный момент этот метод является оптимальным для визуализации динамики белковых сигнальных молекул в живой клетке. Например, отследить в динамике активацию пути Wnt возможно при помощи репортеров TOP-GFP, что в частности было использовано для описания активации этого сигнального пути в раковых клетках лигандом Wnt3 (Le et al., 2019). Другим примером может послужить отслеживание формирования эпителиальных клеточных контактов в культуре MCF10A, показавшее, что FMNL2, регулирующий состояние актинового цитоскелета, рекрутируется в места формирования контактов без участия Cdc42 (Grobe et al., 2018).

Использование лазерных сканирующих систем позволяет реализовывать специальные методы исследования для получения информации о тех или иных физических параметрах используемых молекул, которые совокупно называют F-методами (рис. 1). В методе восстановления флуоресценции после фото-выцветания (FRAP) флуоресцентная метка в регионе интереса препарата выжигается лазером, после чего измеряется скорость диффузии оставшихся меченых молекул в эту область. Этот метод наиболее полезен для описания характеристик транспорта молекул между различными клеточными компартментами. Так, отслеживание фактора CSL, являющегося эффекторной молекулой пути Notch, показало, что он обладает достаточно сложным поведением: после выжигания случайных участков в ядре было зафиксировано, что в отсутствие активации Notch CSL скоротечно связывается с ДНК, в то время как при активации Notch время связывания в целевых локусах существенно возрастает за счет взаимодействия с коактиватором Mastermind и возможного локального ремоделирования хроматина (Gomez-Lamarca et al., 2018). В другой работе путем оценки изменений подвижности SOX9 и корреляционного анализа таковых данных с данными ChIP-qPCR, авторы делали вывод о транскрипционной активности фактора при индукции различных сигнальных путей (Govindaraj et al., 2019).

Более точными способами анализа динамики молекул являются методы флуоресцентной корреляционной (FCS) и кросскорреляционной (FCCS) спектроскопии, позволяющие оценить параметры кинетики диффузии молекул в фокальном объеме конфокальной системы путем продолжительной съемки фиксированной точки в образце и измерения флуктуаций флуоресценции в ней. Это дает возможность измерить скорость диффузии и концентрацию меченых молекул в случае FCS, а также оценить, диффундируют ли две меченые молекулы совместно в случае FCCS. Так, при помощи FCS была охарактеризована кластеризация GPCR Smog в ответ на лиганд Fog, являющаяся ключевым процессом в формировании сигнальных комплексов, ответственных за формирование клеточных контактов во время выпячивания эктодермы *Drosophila melanogaster* (Jha et al., 2018). При помощи адекватных калибровочных стандартов измерять можно концентрацию не только меченых белков, но и других веществ, принимающих участие в сигнальных путях. Например, возможно измерение концентрации газов в клетках путем использования соответствующих индикаторных молекул, флуоресцирующих в присутствии того или иного газа, таких как DAF2-DA, реагирующего на NO (Markiewicz et al., 2022). Кросс-корреляционная спектроскопия особенно полезна для изучения механизмов димеризации, поскольку позволяет оценить не только сам факт наличия взаимодействия, но и некоторые его параметры, такие как константа диссоциации образовавшегося комплек-

са. Примером такого исследования является оценка взаимодействия Wnt3 с Fzd1, в ходе которого было показано, что большую роль в этом процессе играет липидирование Wnt3 по S212 (Dhasmana et al., 2021).

Метод Форстерской (или флуоресцентной) резонансной передачи энергии (FRET) позволяет определить наличие или отсутствие взаимодействия между двумя флуоресцентно мечеными молекулами. Физическая основа этого метода заключается в безызлучательном переносе энергии от молекулы-донора к молекуле-акцептору при близком перекрытии спектра испускания флуоресценции первой со спектром возбуждения второй. Такие молекулы называются FRET-парой. Этот феномен возможен только при нахождении молекул на расстоянии не более 10 нм друг от друга (Chen et al., 2006), что позволяет говорить об их непосредственном взаимодействии. FRET также позволяет отследить конформационные изменения, если FRET-парой мечены разные домены одного и того же белка (Lohse et al., 2007). Так, при помощи FRET-пары, присоединенной к С-концевым доменам белков LRRC8, формирующих при гетерогексамеризации ответственные за регуляцию объема клетки анионные каналы VRAC, было показано, что активация этих каналов происходит в ответ на стимуляцию DAG, а не в ответ на изменение ионной силы, как считалось ранее (König et al., 2019). В последние годы начинают появляться и более сложные FRET-системы, в которых излучение одного донора передается на один из нескольких возможных акцепторов (Bunt, Wouters, 2017). Примером FRET с использованием сразу нескольких молекул может выступить анализ активации сигнальной системы Hyal-2/WWOX/Smad4 гиалуроновой кислотой. С помощью трехмолекулярного FRET с участием всех белков комплекса было показано, что гиалуроновая кислота сначала взаимодействует со Smad4, который затем взаимодействует с WWOX и Hyal-2, после чего WWOX взаимодействует с p53, а Hyal-2 – с WWOX (Hsu et al., 2017). Стоит отметить, что метод FRET при необходимости может также использоваться и на фиксированных препаратах, но в связи с отсутствием временной динамики и особенностями стехиометрии антител, целесообразнее его использование прижизненно.

Феномен FRET также лежит в основе репортерной активности многих флуоресцентных белковых комплексов. Принцип действия этих FRET-биосенсоров заключается в изменении конформации в ответ на связывание искомой молекулы таким образом, что разнесенные в пространстве при ее отсутствии донор и акцептор сближаются, что можно детектировать как FRET-взаимодействие (Zhang et al., 2019). Такие комплексы позволяют детектировать молекулы, получить зонды на которые иным образом чаще всего невозможно, что является одной из причин активного развития этой сферы в последние годы. К примеру, получены и применяются экспериментально сенсоры как на “популярные” молекулы, та-

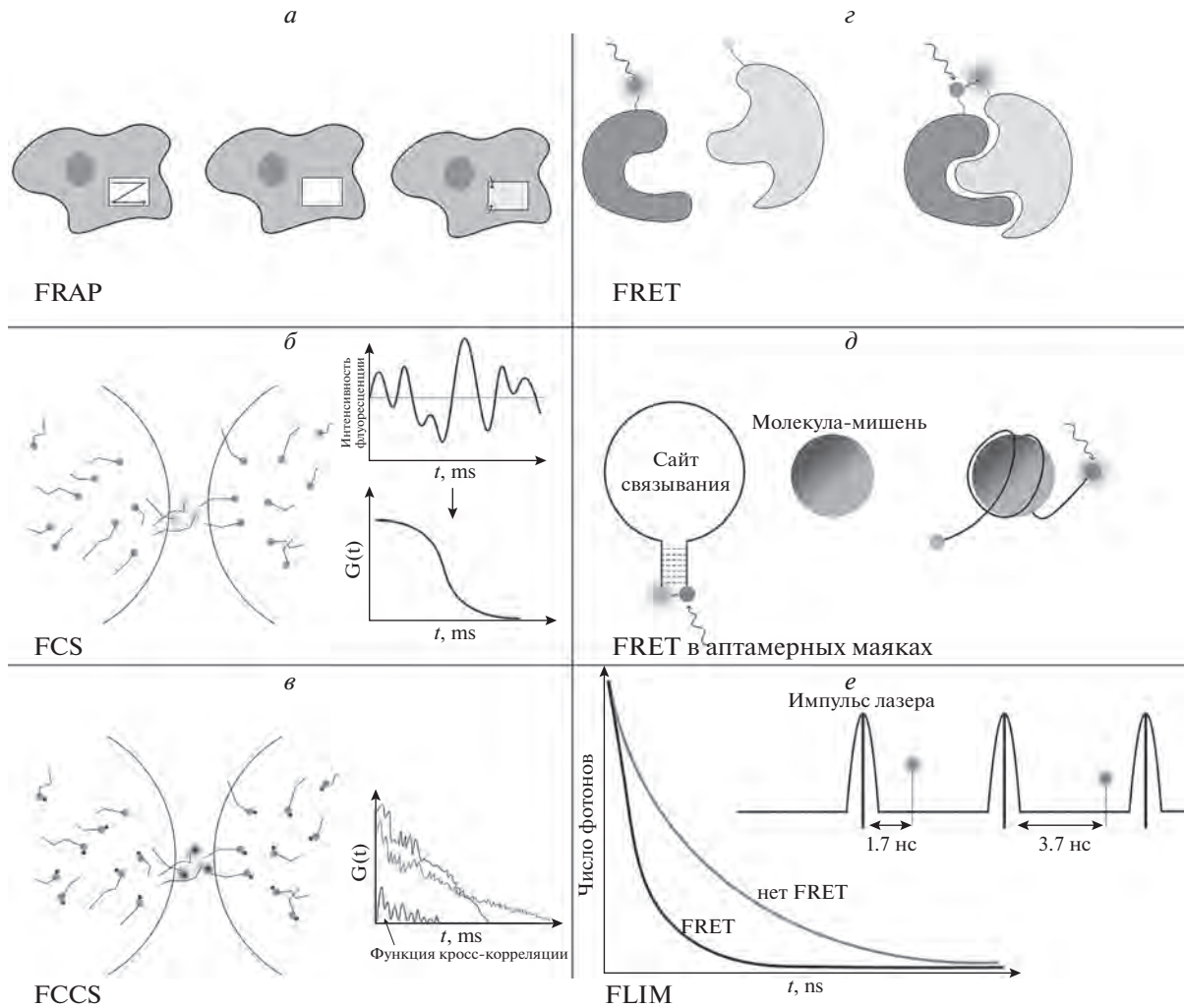


Рис. 1. F-методы, применяемые для прижизненной визуализации клеточных процессов. *a* – Метод FRAP: участок клетки выжигается лазером, после чего постепенно происходит восстановление окраски; *б* – метод FCS: проходящие через фокальный объем конфокальной системы меченые молекулы регистрируются в виде флуктуаций интенсивности флуоресценции, на основе которых затем выводится анализируемая функция автокорреляции $G(t)$; *в* – метод FCCS, отличающийся от FCS анализом двух меток; за счет функции автокорреляции можно оценить, движутся ли две молекулы совместно; *г* – метод FRET: когда две меченые молекулы находятся на расстоянии, при возбуждении флуоресценции метки первой молекулы светится только она; при сближении происходит безызлучательный переход энергии на вторую метку, и начинает светиться уже она; *д* – применение метода FRET в аптамерных маяках: когда зонд не связан с целью, феномен FRET наблюдается; при связывании, за счет изменения конформации, метки разносятся в пространстве и эффект пропадает; *е* – метод FLIM: системная электроника засекает, сколько времени проходит между импульсом лазера и попаданием на детектор фотона, составляется гистограмма распределения плотности фотонов с разным временем попадания на детектор для каждой точки изображения, математически высчитывается кривая затухания флуоресценции; на рисунке показан пример различия кривых затухания для одного и того же флуорохрома в условиях наличия или отсутствия феномена FRET.

кие, как cGMP, CaMKII, cAMP и PKA (Reddy et al., 2018), так и на более экзотические соединения, например ионы свинца (Yang et al., 2020). Отдельным подвидом FRET-биосенсоров являются аптамерные молекулярные маяки. В данном случае FRET-пара находится на концах замкнутой в подковоподобную структуру нуклеотидной последовательности, которая при связывании с целевой молекулой за счет сложной системы Ван-дер-Ваальсовых, электростатических и диполь-дипольных взаимодействий закручивается вокруг мишени, нарушая FRET-вза-

модействие и позволяя фиксировать флуоресценцию донора (Moutsiorpoulou et al., 2019).

Одним из наиболее технически сложных методов оптической микроскопии является метод FLIM, позволяющий с помощью четко синхронизированной системы из импульсного лазера, высокочувствительного лавинного или гибридного фотоэлектронного умножителя и управляющей электроники отслеживать, какое время каждый тип флуорохромов в образце находится в возбужденном состоянии

после одиночного импульса лазера. Это время, τ , не зависит от яркости или спектральных характеристик флуорохрома, но зависит от многих физико-химических параметров среды, в которой он находится. В области изучения внутриклеточной сигнализации этот феномен наиболее широко используется для количественной оценки феномена FRET (Grant et al., 2007). Несмотря на то, что обычный FRET может указать на факт наличия взаимодействия между двумя мечеными молекулами, он не позволяет оценить свойства этого взаимодействия. Поскольку τ донора и акцептора при взаимодействии меняется, на ее основе можно делать количественные выводы о некоторых параметрах. К примеру, в работе, описывающей прижизненную структуру механосенсорного комплекса Src, Fyk2 и MBD2 в остеоцитах, с помощью информации о τ флуоресцентных меток этих белков был сделан вывод, что Src и MBD2 не взаимодействуют между собой напрямую, что не было очевидно только по данным FRET (Day et al., 2021). Добавление τ -компоненты также позволяет повысить чувствительность FRET-биосенсоров. К примеру, FRET-сенсор на cAMP может быть использован не только для визуализации самого факта наличия вторичного мессенджера в клетке, но и для оценки эффективности его деградации фосфоэстеразами, поскольку этот процесс изменяет кинетику затухания флуоресценции сенсора (Harkes et al., 2021).

Помимо уже упомянутых FRET-биосенсоров, существуют и другие способы детектировать небелковые сигнальные молекулы. Интересным примером такого сенсорного белка является кальциевый сенсор GCaMP, основанный на кальмодулин-зависимой киназе легких цепей миозина. При связывании иона кальция конформация этого белка меняется таким образом, что связанный флуоресцентный белок конвертируется в анионную форму и начинает флуоресцировать (Mao et al., 2008). Наиболее активно визуализация кальциевой сигнализации используется для отслеживания активности возбуждаемых клеток, таких как нейроны (Stringer, Pachitariu, 2019) или кардиомиоциты (Kretzner et al., 2020). Помимо этого, кальциевая визуализация также полезна для визуализации процессов апоптоза и нарушения баланса АФК в митохондриях (Bertero, Maack, 2018; Humeau et al., 2018). Например, таким образом было подтверждено что чувствительный к оксидативному стрессу кальциевый канал TRPM2 непосредственно участвует в индукции апоптоза в условиях оксидативного стресса (Kang et al., 2018). Другим примером подобной работы является установление того, что нарушения в нейронах контактного взаимодействия эндоплазматического ретикула с митохондриями приводит к нарушению в последних кальциевого гомеостаза, в конечном итоге приводя к процессам нейродегенерации (Lee et al., 2018). Существуют сенсоры и для других ионов, работающие по схожему принципу. Так, получены сенсоры на ионы меди (Fu et al., 2019), которые, по-видимому, принимают

участие в сигнальном каскаде, обеспечивающем метаболическое взаимодействие астроглии с нейронами (Kardos et al., 2018). Существуют также зонды и на ионы железа, принимающие участие в регуляции широкого круга процессов роста и развития (Senthil Murugan et al., 2018), цинка (Yang et al., 2018).

Современная оптическая микроскопия позволяет не только охарактеризовать процессы внутриклеточной сигнализации, но и непосредственно влиять на них при помощи подходов оптогенетики. Оптогенетика в широком смысле слова представляет собой введение в клетку генетических конструкций, кодирующих фоточувствительные белки, меняющие свое поведение в ответ на свет определенной длины волны, как правило, за счет изменения конформации специального фоточувствительного домена. В настоящее время наработан обширный арсенал таких конструкций: в случае индуцированной светом димеризации, энергия фотонов заставляет фоточувствительный домен изменить конформацию белка таким образом, что он приобретает способность связываться с другим белком. В другом случае, называемом фотовысвобождением (uncaging), при воздействии света на фоточувствительный домен конформация белка изменяется таким образом, что белок “разворачивается” в активную форму. Фотовысвобождение как правило применяется для белков, для которых характерно аллостерическое автоингибирование (Farahani et al., 2021).

Так, метод индуцированной димеризации может применяться для рекрутирования меченого белка в конкретную область клетки, в зависимости от белка-партнера, с которым димеризация происходит. Этот метод может быть применен также и для секвестрирования белка из его “родного” компартмента, кластеризации белков, и даже регуляции транскрипции (например, рекрутированием определенного транскрипционного фактора в нужное время в нужное место). С другой стороны, фотовысвобождение может применяться для прямого контроля активности белков, например, путем перевода модифицированных ферментов в рабочую конформацию (Kolar, Weber, 2017).

Наглядной иллюстрацией пользы такого подхода в изучении сигнальных каскадов является управление сигнальным путем BMP. Созданный в рамках одной из таких работ оптогенетический индуктор BMP представляет собой рецептор BMP с присоединенным к цитоплазматическому домену фоточувствительным димеризационным доменом. При облучении синим светом этот домен димеризуется, запуская каскад BMP. Впоследствии авторам удалось оценить изменение уровня экспрессии NANOG Oct4 и фосфорилированного SMAD 1/5 при помощи иммунофлуоресцентного мечения, а также применить широкий набор молекулярных методов для изучения клеток, в которых осуществлялась индукция. Как отмечают авторы, такой подход проще и

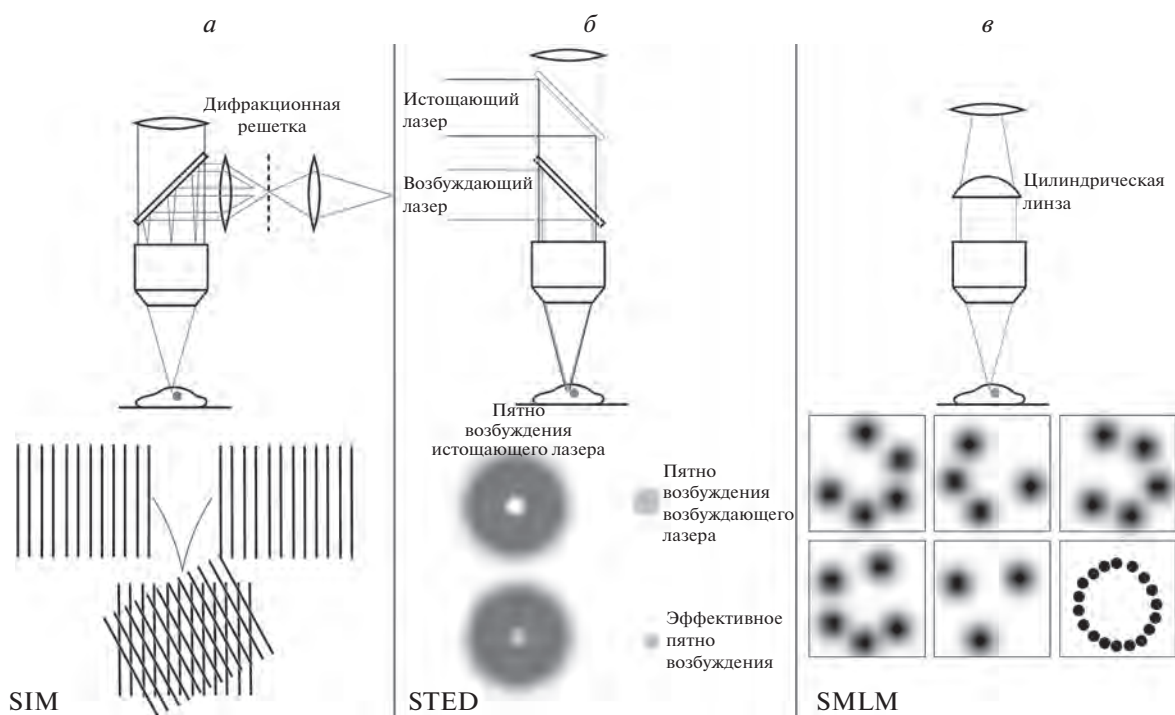


Рис. 2. Основные современные методики сверхразрешающей микроскопии. *а* – SIM: возбуждающий свет перед попаданием на образец разделяется дифракционной решеткой на упорядоченный паттерн, поворачивая который при съемке можно получить высокочастотную информацию для последующей математической реконструкции структуры образца; *б* – STED: два лазера соосно проходят в сканирующую систему конфокального микроскопа и одновременно попадают на препарат, где тороидально сфокусированный истошающий лазер подавляет флуоресценцию, вызванную возбуждающим лазером в участках, отличных от центральной области своего возбуждающего пятна, что и определяет эффективное пятно возбуждения таких систем; *в* – SMLM: одновременно в образце возбуждается только часть флуорохромов, что при циклической съемке позволяет с течением времени точно определить позиции всех флуоресцентных меток в образце на основе их функции рассеяния точки; введение в оптический путь дополнительной цилиндрической линзы позволяет проводить такую реконструкцию и по глубине, за счет характерных изменений, вносимых ею в характер функции рассеяния.

надежнее использования рекомбинантных активирующих конструкций (Humphreys et al., 2020). Еще более интересными являются случаи, когда после оптогенетического запуска сигнального пути начинается прижизненное наблюдение за клетками с использованием заблаговременно введенной репортерной конструкции. Например, отслеживание при помощи флуоресцентного биосенсора поведения фосфатидной кислоты, являющейся важным вторичным мессенджером, после оптогенетической индукции ее синтеза в разных органеллах позволило показать, что фосфатидная кислота, синтезируемая в разных органеллах имеет разный тропизм (Tei, Baskin, 2020).

СВЕРХРАЗРЕШАЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ

Разрешение световой микроскопии фундаментально ограничено волновой природой света, что было впервые математически описано Эрнстом Аббе в 1873 г. В связи с дифракцией электромагнитных волн минимальное расстояние, на котором два флуоресцирующих объекта можно различить как отдельные (разрешение), примерно равно половине

длины волны возбуждающего света. Это расстояние называют дифракционным пределом, и указанная закономерность на практике сводится к невозможности получить разрешение лучше ~200 нм на обычном световом микроскопе. Однако существуют подходы, в совокупности получившие название сверхразрешающей световой микроскопии, позволяющие путем ряда технических ухищрений этот предел обойти (Sigal et al., 2018). В области изучения внутриклеточной сигнализации этот арсенал методов имеет большое значение в связи с тем, что многие события, важные для понимания сигнальных каскадов, происходят в масштабах меньших, чем возможно визуализировать при помощи классических методов световой микроскопии. Несмотря на крайне широкое разнообразие существующих сверхразрешающих методик, большая часть применяющихся в настоящее время коммерческих систем имеет в своей основе один из трех основных методов, которые коротко охарактеризованы далее (рис 2.).

В основе метода структурированного освещения (SIM) лежит освещение образца не по всему полю зрения, а решетчатым паттерном. Изображение захватывается 3–6 раз, с каждым кадром паттерн освещения

поворачивается таким образом, чтобы в местах пересечения происходила интерференция. Регистрируемая при этом высокочастотная информация в дальнейшем используется для математического восстановления структуры образца (Gustafsson, 2000). Интересно, что происходит этот феномен только в фокальной плоскости, поэтому при последовательной съемке образца с движением по оси Z возможна трехмерная реконструкция. Разрешение SIM обычно колеблется в пределах 100 нм, хотя некоторые современные системы могут достигать даже до 65 нм. Этот метод не имеет ограничений по подбору флуорохромов, наименее фототоксичен из трех основных подходов, и, как правило, именно он используется для съемки живых клеток. Однако для визуализации фиксированных препаратов он также пригоден. В качестве примера такой работы можно привести изучение тропизма сигнальных молекул к первичной ресничке, в которой было показано, что полиглутаминирование аксонымы играет в этом процессе ключевую роль. Размер исследуемых структур не позволил бы различить исследуемые структуры с использованием обычного конфокального микроскопа (He et al., 2018). Прижизненную визуализацию при помощи SIM можно проиллюстрировать работой, количественно характеризующей роль кофилинового сигнального пути в процессах роста аксонального конуса за счет колокализации кофилина и коакстатина с актиновым цитоскелетом с точностью, недоступной для дифракционно-ограниченных методов (Hou et al., 2021).

В методе STED улучшение разрешения достигается за счет тушения флуоресценции от возбуждающего лазера конфокального микроскопа коллимированным с ним лазером, сфокусированного тороидально. Диаметр отверстия этого тороуса дифракционно ограничен, и именно им определяется реальное пятно возбуждения (Hell, Wichmann, 1994). STED достигает разрешения в 85–30 нм в зависимости от модели, умеренно фототоксичен и умеренно быстр по скорости съемки, что делает его использование в живых клетках возможным, хотя и не оптимальным. Число меток также ограничено, поскольку они не должны возбуждаться истощающим лазером. Например, с помощью STED-микроскопии было показано, что форма STAT3, фосфорилированная в ответ на взаимодействие FAK с $\alpha 6$ -интегрином, в ядре клеток глиомы колокализуется с TET3, конвертирующей 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин. Вместе STAT3 и TET3 способствуют повышению экспрессии генов, отвечающих за поддержание глиомы (Herrmann et al., 2020). Другим примером использования STED является описание распределения EGFR, подавляющего процесс дифференцировки эпендимных клеток нейрогенной ниши латеральной вентрикулярной зоны с точностью до отдельных кластеров (Abdi et al., 2019). Интересным примером прижизненного использования STED является регистрация кальциевой сигнализации в пре-

синапсах клеток внутреннего уха живой мыши, что позволило авторам описать эту систему с большей точностью, нежели это удавалось им при помощи конфокальной микроскопии (Neef et al., 2018).

Наконец, методы локализационной микроскопии (SMLM) основаны на циклическом возбуждении небольших групп флуорохромов в образце импульсами лазера, после чего на основании функции рассеивания одиночного источника света позиция этих флуорохромов может быть реконструирована математически. Как именно достигается попеременная активация флуорохромов зависит от конкретного метода, но, как правило, для этого нужен тот или иной буфер сложного состава. Из-за циклической съемки метод отличается длительностью и фототоксичностью, а также требует серьезного внимания к условиям съемки, таким как тепловой дрейф объектива, микровибрации, и даже размер молекул антигена. При этом возможно относительно рутинное получение разрешения в 25–10 нм (Shivanandan et al., 2014). При помощи этого метода была детально описана причина подавления сигнального пути Hippo при механическом напряжении. С помощью двойной окраски на YAP и F-актин было показано, что YAP при механическом напряжении выходит из ядра в цитоплазму, за счет растягивания ядерных порочных комплексов актиновыми стресс-фибриллами (Gao et al., 2020). Высокое разрешение локализационной микроскопии позволяет не просто предсказать расстояния между молекулами на основе феномена FRET или колокализации, а непосредственно их увидеть. Примером такой работы является использование активной стабилизации столика микроскопа и его оптических компонентов для повышения точности локализации флуоресцентных меток до нескольких нанометров, что позволило авторам детально описать изменения, происходящие с иммунологическим синапсом в процессе T-клеточной сигнализации. В частности, авторы показали, что расстояние между TCR и CD45 в активных и покоящихся T-клетках отличается на 4–7 нм (Coelho et al., 2020). Наконец, несмотря на техническую сложность исполнения, прижизненная локализационная визуализация технически осуществима. Особенный интерес она представляет для отслеживания поведения одиночных молекул, что позволяет с большой точностью описывать кинетику их движения. В качестве примера такой работы можно привести описание кинетики димеризации ключевых факторов плюрипотентности Sox2 и Oct4 в эмбриональных стволовых клетках. Показано, что сначала с ДНК связывается Sox2, к которому затем присоединяется Oct4. Интересно, что успешное присоединение к ДНК этого комплекса происходит не сразу: Sox2 линейно перемещается по ДНК и каждые несколько секунд производит короткие неспецифические связывания, после чего вместе с Oct4 собирается в нужном локусе (Chen et al., 2014).

Серьезным ограничением описанных выше методов является необходимость наличия дорогостоящего и сложного в освоении оборудования. В тех случаях, когда прижизненная визуализация не требуется, возможно использование альтернативного подхода, в котором сама клетка искусственно расширяется при помощи гидрогеля с сохранением пространственного взаиморасположения белковых молекул. Этот метод, получивший название экспансионной микроскопии (ExM), позволяет увеличивать размеры клетки до 10 раз, с соответствующим увеличением эффективного разрешения. Еще большего разрешения можно достичь при визуализации таких расширенных образцов с помощью “настоящих” методов сверхразрешающей микроскопии, вплоть до молекулярного (Zwettler et al., 2020). Примером экспериментального применения методики ExM является визуализация кластеризации рибонуклеопротеиновых рецепторов с получением эффективного разрешения в 15 нм при помощи обычного конфокального микроскопа (Sheard et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методики флуоресцентной микроскопии являются многофункциональным инструментом, позволяющим исследователям отследить и охарактеризовать поведение практически любых сигнальных молекул, в том числе прижизненно, что, несомненно, делает их важнейшим инструментом для изучения внутриклеточных сигнальных каскадов.

При этом развитие данной области не стоит на месте. Регулярно публикуются новые экспериментальные методики, представляющие собой как доработанные старые, так и принципиально новые подходы. Появляются все менее фототоксичные методики прижизненной съемки (Chen et al., 2014), растет предел достижимого разрешения в сверхразрешающей микроскопии, приближаясь к молекулярному (Gwosch et al., 2020), появляются стратегии корреляции данных с криоэлектронной микроскопией (Wolff et al., 2016). Эти и другие методики, несомненно, в будущем сыграют большую роль в изучении в том числе и процессов внутриклеточной сигнализации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-4664.2022.1.4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abdi K., Neves G., Pyun J., Kiziltug E., Ahrens A., Kuo C.T. 2019. EGFR signaling termination via numb trafficking in ependymal progenitors controls postnatal neurogenic niche differentiation. *Cell Rep.* V. 28. P. 2012.
- Bertero E., Maack C. 2018. Calcium signaling, reactive oxygen species in Mitochondria. *Circ. Res.* V. 122. P. 1460.
- Bevilacqua C., Ducos B. 2018. Laser microdissection: a powerful tool for genomics at cell level. *Mol. Aspects Med.* V. 59. P. 5.
- Bunt G., Wouters F.S. 2017. FRET from single to multiplexed signaling events. *Biophys. Rev.* V. 9. P. 119.
- Chen B.C., Legant W.R., Wang K., Shao L., Milkie D.E., Davidson M.W., Janetopoulos C., Wu X.S., Hammer J.A. 3rd, Liu Z., English B.P., Mimori-Kiyosue Y., Romero D.P., Ritter A.T., Lippincott-Schwartz J., et al. 2014. Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science.* V. 346. P. 1257998.
- Chen H., Puhl H.L., Koushik S.V., Vogel S.S., Ikeda S.R. 2006. Measurement of FRET efficiency, ratio of donor to acceptor concentration in living cells. *Biophys. J.* V. 91. P. 39.
- Chen J., Zhang Z., Li L., Chen B.C., Revyakin A., Hajj B., Legant W., Dahan M., Lionnet T., Betzig E., Tjian R., Liu Z. 2014. Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells. *Cell.* V. 156. P. 1274.
- Coelho S., Baek J., Graus M.S., Halstead J.M., Nicovich P.R., Feher K., Gandhi H., Gooding J.J., Gaus K. 2020. Ultraprecise single-molecule localization microscopy enables in situ distance measurements in intact cells. *Sci. Adv.* V. 6: eaay8271.
- Day R.N., Day K.H., Pavalko F.M. 2021. Direct visualization by FRET-FLIM of a putative mechanosome complex involving Src, Pyk2, MBD2 in living MLO-Y4 cells. *PLoS One.* V. 16: e0261660.
- Dhasmana D., Veerapathiran S., Azbazdar Y., Nelanuthala A.V.S., Teh C., Ozhan G., Wohland T. 2021. Wnt3 is lipidated at conserved cysteine, serine residues in zebrafish neural tissue. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9: 671218.
- Du L., Hu X., Yang W., Yasheng H., Liu S., Zhang W., Zhou Y., Cui W., Zhu J., Qiao Z., Maoying Q., Chu Y., Zhou H., Wang Y., Mi W. 2019. Spinal IL-33/ST2 signaling mediates chronic itch in mice through the astrocytic JAK2-STAT3 cascade. *Glia.* V. 67. P. 1680.
- Erben L., He M.X., Laeremans A., Park E., Buonanno A. 2018. A novel ultrasensitive in situ hybridization approach to detect short sequences, splice variants with cellular resolution. *Mol. Neurobiol.* V. 55. P. 6169.
- Farahani P.E., Reed E.H., Underhill E.J., Aoki K., Toettcher J.E. 2021. Signaling, deconstructed: using optogenetics to dissect, direct information flow in biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* V. 23. P. 61.
- Fu Y., Pang X.X., Wang Z. Q., Chai Q., Ye F. 2019. A highly sensitive, selective fluorescent probe for determination of Cu(II), application in live cell imaging. *Spectrochim. Acta. Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* V. 208. P. 198.
- Gao J., He L., Zhou L., Jing Y., Wang F., Shi Y., Cai M., Sun J., Xu H., Jiang J., Zhang L., Wang H. 2020. Mechanical force

- regulation of YAP by F-actin, GPCR revealed by super-resolution imaging. *Nanoscale*. V. 12. P. 2703.
- Gomez-Lamarca M.J., Falo-Sanjuan J., Stojnic R., Abdul Rehman S., Muresan L., Jones M.L., Pillidge Z., Cerda-Moya G., Yuan Z., Baloul S., Valenti P., Bystricky K., Payre F., O'Holleran K., Kovall R., Bray S. J. 2018. Activation of the Notch signaling pathway in vivo elicits changes in CSL nuclear dynamics. *Dev. Cell*. V. 44. P. 611.
- Govindaraj K., Hendriks J., Lidke D.S., Karperien M., Post J.N. 2019. Changes in fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) as an indicator of SOX9 transcription factor activity. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech*. V. 1862. P. 107.
- Grant D.M., McGinty J., McGhee E.J., Bunney T.D., Owen D.M., Talbot C.B., Zhang W., Kumar S., Munro I., Lanigan P.M., Kennedy G.T., Dunsby C., Magee A.I., Courtney P., Katan M., Neil M.A.A., French P.M.W. 2007. High speed optically sectioned fluorescence lifetime imaging permits study of live cell signaling events. *Opt. Express*. V. 15. P. 15656.
- Grassi D., Diaz-Perez N., Volpicelli-Daley L.A., Lasmézas C.I. 2019. P α -syn* mitotoxicity is linked to MAPK activation, involves tau phosphorylation, aggregation at the mitochondria. *Neurobiol. Dis.* V. 124. P. 248.
- Grobe H., Wüstenhagen A., Baarlink C., Grosse R., Grikscheit K. 2018. A Rac1-FMNL2 signaling module affects cell-cell contact formation independent of Cdc42, membrane protrusions. *PLoS One*. V. 13. e0194716.
- Gustafsson M.G.L. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* V. 198. P. 82.
- Gwosch K.C., Pape J.K., Balzarotti F., Hoess P., Ellenberg J., Ries J., Hell S.W. 2020. MINIFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. *Nat. Methods*. V. 17. P. 217.
- Harkes R., Kukk O., Mukherjee S., Klarenbeek J., van den Broek B., Jalink K. 2021. Dynamic FRET-FLIM based screening of signal transduction pathways. *Sci. Rep.* V. 11: 20711.
- He K., Ma X., Xu T., Li Y., Hodge A., Zhang Q., Torline J., Huang Y., Zhao J., Ling K., Hu J. 2018. Axoneme polyglutamylation regulated by Joubert syndrome protein ARL13B controls ciliary targeting of signaling molecules. *Nat. Commun.* V. 9: 3310.
- Hell S.W., Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* V. 19. P. 780.
- Herrmann A., Lahtz C., Song J., Aftabizadeh M., Cherryholmes G.A., Xin H., Adamus T., Lee H., Grunert D., Armstrong B., Chu P., Brown C., Lim M., Forman S., Yu H. 2020. Integrin $\alpha 6$ signaling induces STAT3-TET3-mediated hydroxymethylation of genes critical for maintenance of glioma stem cells. *Oncogene*. V. 39. P. 2156.
- Hobro A.J., Smith N.I. 2017. An evaluation of fixation methods: spatial, compositional cellular changes observed by raman imaging. *Vib. Spectrosc.* V. 91. P. 31.
- Hou X., Nozumi M., Nakamura H., Igarashi M., Sugiyama S. 2021. Coactosin promotes F-actin protrusion in growth cones under cofilin-related signaling pathway. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9: 660349.
- Hsu L.J., Hong Q., Chen S.T., Kuo H.L., Schultz L., Heath J., Lin S.R., Lee M.H., Li D.Z., Li Z.L., Cheng H.C., Armand G., Chang N.S. 2017. Hyaluronan activates Hyal-2/WWOX/Smad4 signaling, causes bubbling cell death when the signaling complex is overexpressed. *Oncotarget*. V. 8. P. 19137.
- Humeau J., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Nuñez L., Villalobos C., Kroemer G., Senovilla L. 2018. Calcium signaling, cell cycle: progression or death. *Cell Calcium*. V. 70. P. 3.
- Humphreys P.A., Woods S., Smith C.A., Bates N., Cain S.A., Lucas R., Kimber S.J. 2020. Optogenetic control of the BMP signaling pathway. *ACS Synth. Biol.* V. 9. P. 3067.
- Jha A., van Zanten T.S., Philippe J.M., Mayor S., Lecuit T. 2018. Quantitative control of GPCR organization, signaling by endocytosis in epithelial morphogenesis. *Curr. Biol.* V. 28. P. 1570.
- Kang P., Zhang W., Chen X., Yi X., Song P., Chang Y., Zhang S., Gao T., Li C., Li S. 2018. TRPM2 mediates mitochondria-dependent apoptosis of melanocytes under oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* V. 126. P. 259.
- Kardos J., Héja L., Simon Á., Jablonkai I., Kovács R., Jemnitz K. 2018. Copper signalling: causes, consequences. *Cell Commun. Signal.* V. 16: 71.
- Kolar K., Weber W. 2017. Synthetic biological approaches to optogenetically control cell signaling. *Curr. Opin. Biotechnol.* V. 47. P. 112.
- König B., Hao Y., Schwartz S., Plested A.J.R., Stauber T. 2019. A FRET sensor of C-terminal movement reveals VRAC activation by plasma membrane DAG signaling rather than ionic strength. *Elife*. V. 8. e45421.
- Kreutzer J., Viehrig M., Pölönen R.P., Zhao F., Ojala M., Aalto-Setälä K., Kallio P. 2020. Pneumatic unidirectional cell stretching device for mechanobiological studies of cardiomyocytes. *Biomech. Model. Mechanobiol.* V. 19. P. 291.
- Le P.N., Keysar S.B., Miller B., Eagles J.R., Chimed T.S., Reisinger J., Gomez K.E., Nieto C., Jackson B.C., Somerset H.L., Morton J.J., Wang X.J., Jimeno A. 2019. Wnt signaling dynamics in head, neck squamous cell cancer tumor-stroma interactions. *Mol. Carcinog.* V. 58. P. 398.
- Lee K.S., Huh S., Lee S., Wu Z., Kim A.K., Kang H.Y., Lu B. 2018. Altered ER-mitochondria contact impacts mitochondria calcium homeostasis, contributes to neurodegeneration in vivo in disease models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V. 115. P. E8844.
- Li X., Zhang Z., Jiang H., Li Q., Wang R., Pan H., Niu Y., Liu F., Gu H., Fan X., Gao J. 2018. Circular RNA circPVT1 promotes proliferation, invasion through sponging miR-125b, activating E2F2 signaling in non-small cell lung cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* V. 51. P. 2324.
- Lohse M.J., Bünemann M., Hoffmann C., Vilardaga J.P., Nikolaev V.O. 2007. Monitoring receptor signaling by intramolecular FRET. *Curr. Opin. Pharmacol.* V. 7. P. 547.
- Lun X.K., Bodenmiller B. 2020. Profiling cell signaling networks at single-cell resolution. *Mol. Cell. Proteomics.* V. 19. P. 744.
- Mao T., O'Connor D.H., Scheuss V., Nakai J., Svoboda K. 2008. Characterization, subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. *PLoS One*. V. 3. e1796.

- Markiewicz R., Litowczenko J., Gapiński J., Woźniak A., Jurga S., Patkowski A. 2022. Nanomolar nitric oxide concentrations in living cells measured by means of fluorescence correlation spectroscopy. *Molecules*. V. 27. P. 1010.
- Matryba P., Kaczmarek L., Gołąb J. 2019. Advances in ex situ tissue optical clearing. *Laser Photonics Rev.* V. 13: 1800292.
- Meyer T., Teruel M.N. 2003. Fluorescence imaging of signaling networks. *Trends Cell Biol.* V. 13. P. 101.
- Nair A., Chauhan P., Saha B., Kubatzky K.F. 2019. Conceptual evolution of cell signaling. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20: 3292.
- Neef J., Urban N.T., Ohn T.L., Frank T., Jean P., Hell S.W., Wilig K.I., Moser T. 2018. Quantitative optical nanophysiology of Ca²⁺ signaling at inner hair cell active zones. *Nat. Commun.* V. 9: 290.
- Reddy G.R., West T.M., Jian Z., Jaradeh M., Shi Q., Wang Y., Chen-Izu Y., Xiang Y.K. 2018. Illuminating cell signaling with genetically encoded FRET biosensors in adult mouse cardiomyocytes. *J. Gen. Physiol.* V. 150. P. 1567.
- Rotherham M., Henstock J.R., Qutachi O., El Haj A.J. 2018. Remote regulation of magnetic particle targeted Wnt signaling for bone tissue engineering. *Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med.* V. 14. P. 173.
- Senthil Murugan A., Vidhyalakshmi N., Ramesh U., Annaraj J. 2018. In vivo bio-imaging studies of highly selective, sensitive rhodamine based fluorescent chemosensor for the detection of Cu²⁺/Fe³⁺ ions. *Sensors Actuators, B Chem.* V. 274. P. 22.
- Shapanis A., Lai C., Smith S., Coltart G., Sommerlad M., Schofield J., Parkinson E., Skipp P., Healy E. 2021. Identification of proteins associated with development of metastasis from cutaneous squamous cell carcinomas (cSCCs) via proteomic analysis of primary cSCCs. *Br. J. Dermatol.* V. 184. P. 709.
- Sheard T.M.D., Hurley M.E., Colyer J., White E., Norman R., Pervolaraki E., Narayanasamy K. K., Hou Y., Kirton H.M., Yang Z., Hunter L., Shim J.U., Clowsley A.H., Smith A.J., Baddeley D., Soeller C., Colman M.A., Jayasinghe I. 2019. Three-dimensional, chemical mapping of intracellular signaling nanodomains in health, disease with enhanced expansion microscopy. *ACS Nano*. V. 13. P. 2143.
- Shivanandan A., Deschout H., Scarselli M., Radenovic A. 2014. Challenges in quantitative single molecule localization microscopy. *FEBS Lett.* V. 588. P. 3595.
- Sigal Y.M., Zhou R., Zhuang X. 2018. Visualizing, discovering cellular structures with super-resolution microscopy. *Science*. V. 361. P. 880.
- Singh R., Holz P.S., Roth K., Hupfer A., Meissner W., Müller R., Buchholz M., Gress T.M., Elsässer H.P., Jacob R., Lauth M. 2019. DYRK1B regulates Hedgehog-induced microtubule acetylation. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 76. P. 193.
- Stringer C., Pachitariu M. 2019. Computational processing of neural recordings from calcium imaging data. *Curr. Opin. Neurobiol.* V. 55. P. 22.
- Sun W., Wang X., Li J., You C., Lu P., Feng H., Kong Y., Zhang H., Liu Y., Jiao R., Chen X., Ba Y. 2018. MicroRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting SRCIN1 to promote the SRC/VEGF signaling pathway. *Cell Death Dis.* V. 9: 438.
- Szabó Á., Szendi-Szatmári T., Ujlaky-Nagy L., Rádi I., Vereb G., Szöllösi J., Nagy P. 2018. The effect of fluorophore conjugation on antibody affinity, the photophysical properties of dyes. *Biophys. J.* V. 114. P. 688.
- Tei R., Baskin J.M. 2020. Spatiotemporal control of phosphatidic acid signaling with optogenetic, engineered phospholipase Ds. *J. Cell Biol.* V. 219: e201907013.
- Vira S., Mekhedov E., Humphrey G., Blank P. S. 2010. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality, degree of labeling. *Anal. Biochem.* V. 402. P. 146.
- Wang S., Su X., Xu M., Xiao X., Li X., Li H., Keating A., Zhao R.C. 2019. Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.* V. 10: 117.
- Wang Z., Li Y., Kong D., Banerjee S., Ahmad A., Azmi A. S., Ali S., Abbruzzese J.L., Gallick G.E., Sarkarr F.H. 2009. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res.* V. 69. P. 2400.
- Wang Z., Liu F., Wei M., Qiu Y., Ma C., Shen L., Huang Y. 2018. Chronic constriction injury-induced microRNA-146a-5p alleviates neuropathic pain through suppression of IRAK1/TRAF6 signaling pathway. *J. Neuroinflammation.* V. 15: 179.
- Wang Z., Liu C.H., Huang S., Fu Z., Tomita Y., Britton W.R., Cho S.S., Chen C.T., Sun Y., Ma J.X., He X., Chen J. 2020. Wnt signaling activates MFSD2A to suppress vascular endothelial transcytosis, maintain blood-retinal barrier. *Sci. Adv.* V. 6: eaba7457.
- Wolff G., Hagen C., Grünewald K. 2016. Towards correlative super-resolution fluorescence, electron cryo-microscopy. *Biol. Cell.* V. 108. P. 245.
- Yang D.M., Fu T.F., Lin C.S., Chiu T.Y., Huang C.C., Huang H.Y., Chung M.W., Lin Y.S., Manurung R.V., Nguyen P.N.N., Chang Y.F. 2020. High-performance FRET biosensors for single-cell, in vivo lead detection. *Biosens. Bioelectron.* V. 168. P. 112571.
- Yang Y.S., Ma C.M., Zhang Y.P., Xue Q.H., Ru J.X., Liu X.Y., Guo H.C. 2018. A highly selective 'turn-on' fluorescent sensor for zinc ion based on a cinnamyl pyrazoline derivative, its imaging in live cells. *Anal. Methods.* V. 10. P. 1833.
- Yosefzon Y., Soteriou D., Feldman A., Kostic L., Koren E., Brown S., Ankawa R., Sedov E., Glaser F., Fuchs Y. 2018. Caspase-3 regulates YAP-dependent cell proliferation, organ size. *Mol. Cell.* V. 70. P. 573.
- Zhang X., Hu Y., Yang X., Tang Y., Han S., Kang A., Deng H., Chi Y., Zhu D., Lu Y. 2019. Forster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications. *Biosens. Bioelectron.* V. 138: 111314.
- Zwettler F.U., Reinhard S., Gambarotto D., Bell T.D.M., Hamel V., Guichard P., Sauer M. 2020. Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM). *Nat. Commun.* V. 11: 3388.

Fluorescence Imaging of Signal Transduction Pathways

E. V. Panferov^{a,*} and A. B. Malashicheva^a

^a*Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: panferov.aux@gmail.com*

The review article details the main methods, approaches currently used in fluorescence microscopy to visualize intracellular signal transduction pathways. Both fixed samples, live-cell imaging are discussed, with particular attention being placed on super-resolution microscopy. Practical applications, limitations are given for each technique, illustrated by the selected recent scientific advancements.

Keywords: light microscopy, fluorescence microscopy, cellular signaling, live-cell imaging, immunofluorescence, super-resolution microscopy