

Uniwersytet Jagielloński

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

**Rola dokomórkowych prostowniczych kanałów
potasowych Kir w elektrotaksji fibroblastów Swiss 3T3**

Sławomir Lasota

Rozprawa doktorska
wykonana w Zakładzie Biologii Komórki
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem Profesora dr hab. Zbigniewa Madeji

Kraków 2017

SPIS TREŚCI

Spis treści	2
Wykaz skrótów	5
Streszczenie	6
Abstract	9
1. Wstęp	11
1.1. Migracja komórek i jej znaczenie dla funkcjonowania organizmu	11
1.2. Potencjał transepitelialny i endogenne pola elektryczne	12
1.3. Oddziaływanie pól elektrycznych na komórki	15
1.4. Proponowane mechanizmy detekcji pola elektrycznego	17
1.4.1. Redystrybucja białek błonowych	18
1.4.2. Mechanizmy jonowe	20
1.4.3. Dokomórkowe prostownicze kanały potasowe Kir	23
1.4.4. Pozostałe mechanizmy detekcji pola elektrycznego	26
1.5. Dynamika reakcji elektrotaktycznej	26
1.6. Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w reakcję na pole elektryczne	27
2. Cel pracy	31
3. Materiały i metody	32
3.1. Materiały	32
3.2. Metody	34
3.2.1. Hodowla komórek	34
3.2.2. Badanie reakcji komórek na pole elektryczne	35
3.2.3. Poklatkowa rejestracja obrazu	36
3.2.4. Analiza ilościowa migracji komórek	38
3.2.5. Analiza morfologii i orientacji komórek	39
3.2.6. Analiza dynamiki reakcji elektrotaktycznej	39
3.2.7. Obrazowanie białek wewnątrzkomórkowych	40
3.2.8. Badanie udziału kanałów Kir w reakcji elektrotaktycznej	43
3.2.9. Stosowanie inhibitorów szlaków sygnałowych	49
3.2.10. Analiza udziału jonów Ca^{2+} w reakcji elektrotaktycznej	49
3.2.11. Analiza aktywacji białka RhoA w polu elektrycznym	51
3.2.12. Analiza statystyczna	53

3.2.13. Wykorzystane oprogramowanie.....	53
4. Wyniki.....	54
4.1. Charakterystyka reakcji elektrotaktycznej fibroblastów Swiss 3T3	54
4.2. Wpływ pola elektrycznego na morfologię i orientację komórek	58
4.3. Dynamika reakcji elektrotaktycznej.....	59
4.4. Rola aktywności dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir w elektrotaksji komórek Swiss 3T3	69
4.4.1. Wpływ modulacji mechanizmów regulacyjnych Kir na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3	73
4.4.2. Wpływ zahamowania ekspresji kanału Kir4.2 na reakcję elektrotaktyczną	78
4.5. Wewnątrzkomórkowe ścieżki przesyłania sygnału biorące udział w indukcji kierunkowej migracji fibroblastów 3T3 w polu elektrycznym	84
4.5.1. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy odpowiedzialne za generowanie skurczu od strony anody	84
4.5.2. Udział mechanizmów tworzenia protruzji po stronie katody w reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3	98
5. Dyskusja	101
6. Podsumowanie	124
7. Suplement.....	126
8. Bibliografia.....	127

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego 2012/07/B/NZ3/02909. Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego jest członkiem Konsorcjum, które uzyskało status Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW).

*Dziękuję mojemu promotorowi, profesorowi Zbigniewowi Madeji za wskazanie tematu badań,
nieustanną pomoc w ich realizowaniu i analizie wyników
oraz ogromną cierpliwość w trakcie całego procesu powstawania rozprawy doktorskiej.*

*Swoje podziękowania kieruję również do dr hab. Jolanty Sroki i dr Elizy Zimoląg
za okazaną pomoc w przeprowadzeniu analiz biochemicznych,
liczne dyskusje, podtrzymywanie na duchu
i owocną współpracę w ramach zespołu badawczego.*

*Dziękuję wszystkim pracownikom, doktorantom i studentom Zakładu Biologii Komórki
za codzienną współpracę i miłą atmosferę, a w szczególności
Dr Sylwii Bobis-Wozowicz za przeprowadzenie transdukcji komórek
i pomoc w analizie cytometrycznej, dr Milenie Kosińskiej i mgr Dawidowi Wnukowi
za przeprowadzenie analizy Western blot
oraz dr Monice Rak za cenne rady dotyczące transfekcji komórek.*

*Dziękuję także dr hab. Zenonowi Rajfurowi z Zakładu Fizyki Materiałów Organicznych IF UJ
za umożliwienie dostępu do komórek z ekspresją biosensora FRET
oraz mgr Tomaszowi Witko i mgr Zbigniewowi Basterowi za owocne dyskusje
na temat ich obrazowania i analizy uzyskanych wyników.*

*Przede wszystkim chcę podziękować mojej Żonie za okazaną cierpliwość
i nieustanne wsparcie oraz motywację w trakcie pisania rozprawy.*

*Dziękuję też moim Rodzicom za trud włożony w moje wychowanie, wykształcenie i nieustanne
wsparcie oraz Rodzeństwu i Przyjaciołom za to, że zawsze byli i są przy mnie.*

WYKAZ SKRÓTÓW

- BSA** – (ang. *bovine serum albumin*) – albumina bydlęca
- CME** – (ang. *coefficient of movement efficiency*) – parametr określający efektywność ruchu komórki
- dcEF** – (ang. *Direct Current Electric Field*) – stałe pole elektryczne
- DENSPM** – (ang. *N¹,N¹¹-diethylnorspermine*) – N¹,N¹¹-diethylnorsperminy tetrahydrochlorek
- DMEM** – (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*)
- DMSO** – (ang. *dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek
- EGF** – (ang. *Epidermal Growth Factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu
- EGFP/GFP** – (ang. *Enhanced/Green Fluorescent Protein*) – zielone białko fluorescencyjne
- EM-CCD** – (ang. *Electron Multiplying charge-coupled device*) – kamera CCD ze wzmocnieniem elektronowym
- EmGFP** – (ang. *Emerald Green Fluorescent Protein*)
- ERK** – (ang. *Extracellular Signal Regulated Kinase*) – kinaza regulowana czynnikami zewnątrzkomórkowymi
- FBS** – (ang. *Fetal Bovine Serum*) – płodowa surowica bydlęca
- FRET** – (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) – Försterowski (bezpromienisty) rezonansowy transfer energii
- HRP** – (ang. *HorseRadish Peroxidase*) – peroksydaza chrzanowa
- KCNJ15** – (ang. *Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15*) – gen kodujący podjednostkę kanału Kir4.2 należącego do rodziny kanałów Kir
- Kir** – (ang. *Potassium inwardly-rectifying channel*) – dkomórkowy prostowniczy kanał potasowy
- MEF** – (ang. *mouse embryonic fibroblast*) – mysi embrionalny fibroblast
- MLCK** – (ang. *Myosin light-chain kinase*) – kinaza lekkich łańcuchów miozyny
- PBS** – (ang. *Phosphate buffered saline*) – Buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej
- PE** – pole elektryczne
- PI3K** – (ang. *Phosphatidyloinositol 3-Kinase*) – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
- PIP₃** – (ang. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) – (3,4,5)-trisfosforan fosfatydyloinozytolu
- PKA** – (ang. *protein kinase A*) – kinaza białkowa A
- PKC** – (ang. *protein kinase C*) – kinaza białkowa C
- PTEN** – (ang. *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*)
- PUT** – (ang. *putrescin*) – putrescyna należąca do poliamin
- PVC** – (ang. *Polyvinyl chloride*) – polichlorek winylu
- ROCK** – (ang. *Rho-associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase*) – kinaza zależna od białka Rho
- SD** – (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe
- SEM** – (ang. *standard error of mean*) – błąd standardowy wartości średniej
- SPD** – (ang. *spermidin*) – spermidyna należąca do poliamin
- SPM** – (ang. *spermin*) – spermina należąca do poliamin
- SSAT** – (ang. *spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase*) – acetyltransferaza SPD/SPM
- TEP** – (ang. *Transepithelial Potential*) – potencjał transepitelialny
- TIRFM** – (ang. *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*) – mikroskopia fluorescencyjna całkowitego wewnętrznego odbicia
- VEGF-1** – (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor-1*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
- VGCC** – (ang. *Voltage-Gated Calcium Channel*) – kanał wapniowy bramkowany napięciem
- VGSC** – (ang. *Voltage-Gated Sodium Channel*) – kanał sodowy bramkowany napięciem

STRESZCZENIE

Endogenne pola elektryczne odgrywają istotną rolę w przebiegu wielu ważnych procesów biologicznych, takich jak embriogeneza, gojenie ran i regeneracja tkanek. Jednym z najważniejszych, odpowiedzialnych za to zjawisk jest elektrotaksja, czyli zdolność do kierunkowej migracji komórek w polu elektrycznym. Ukierunkowany ruch komórek w procesie elektrotaksji opiera się na skoordynowanej aktywacji wielu ścieżek sygnalizacyjnych, typowych dla kierunkowej migracji wywołanej innymi bodźcami fizycznymi lub chemicznymi. Jednakże, dotychczas nie poznano nadrzędnego mechanizmu detekcji pola elektrycznego przez migrujące komórki.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej badano mechanizmy odpowiadające za reakcję elektrotaktyczną mysich fibroblastów Swiss 3T3. W toku badań scharakteryzowano ich odpowiedź na pole o różnym natężeniu i zbadano dynamikę reakcji, zarówno na pierwotną aplikację pola, jak i zamianę jego biegunów. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły, że fibroblasty wykazują silną tendencję do ruchu w kierunku katody w polu elektrycznym o natężeniu zbliżonym do występujących naturalnie endogennych pól elektrycznych (1 V/cm). Wykazano, że reakcja komórek na pole jest stosunkowo szybka (rzędu 1-2 min od zadziałania pola). Obserwacja ta wskazywała, że w badanym modelu trudno jest tłumaczyć mechanizm reakcji jedynie przez wywołaną działaniem pola elektrycznego polaryzacją rozkładu białek błonowych, np. receptorów dla chemoatraktantów. Ponieważ alternatywnym mechanizmem reakcji na pola elektryczne jest aktywacja błonowych kanałów jonowych, bazując na ostatnich doniesieniach literaturowych, zbadano wpływ aktywności dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3. Kanały te są odpowiedzialne za utrzymanie potencjału błonowego na odpowiednim poziomie, co szczególnie dobrze scharakteryzowano w funkcjonowaniu układu nerwowego. Jednakże, obecność tych kanałów wykazano również w błonach komórkowych licznych innych komórek organizmów wyższych, w tym także badanych komórkach, co potwierdzono w pracy. Wykazano, że zahamowanie aktywności kanałów Kir i zahamowanie ekspresji podjednostki Kir4.2 obniża znacznie zdolność do elektrotaksji komórek Swiss 3T3 oraz wywiera wpływ na jej kinetykę. Podobny efekt otrzymano wpływając na poziom wewnątrzkomórkowych poliamin oraz jonów Mg^{2+} , fizjologicznych regulatorów aktywności kanałów Kir.

Ponieważ analiza kinetyki reakcji komórek 3T3 pozwoliła stwierdzić, że po 1-2 min od zmiany kierunku pola elektrycznego można już zaobserwować reakcję komórki polegającą na skurczu komórki od strony anody i indukcji tworzenia wypustek od strony katody, w kolejnych doświadczeniach podjęto próbę określenia mechanizmów indukcji tych zjawisk. Analiza mechanizmów leżących u podstaw generowania skurczu komórki od strony anody wykazała, że jest on uzależniony od aktywacji miozyny II (spadek wartości kosinusa kierunkowego do 38% kontroli po zadziałaniu blebbistatyny). Co ciekawe, zahamowanie aktywności kinazy MLCK (głównego aktywatora miozyny II) nie powodowało obniżenia reakcji kierunkowej w polu elektrycznym. Obserwacja ta została potwierdzona wykazaniem niewielkiej zależności elektrotaksji komórek 3T3 od obecności jonów wapnia (głównego aktywatora MLCK). Wartość kosinusa kierunkowego w pożywce bez jonów wapnia, w obecności EGTA oraz w obecności BAPTA wynosiła odpowiednio 78, 70 i 86% kontroli. Nie stwierdzono również zmian w poziomie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia pod wpływem pola elektrycznego. Obserwacje te wydają się potwierdzać doniesienia literaturowe wskazujące, że nie we wszystkich modelach obecność jonów wapnia jest niezbędna dla wydajnej elektrotaksji. Alternatywnym mechanizmem komórkowym związanym z generowaniem skurczu jest aktywacja miozyny II przez zależną od białek Rho kinazę ROCK. Spadek kierunkowości do 51% kontroli po zahamowaniu kinazy ROCK poprzez działanie inhibitora Y-27632 wskazuje, że w badanym modelu ten mechanizm może być związany z indukowaniem skurczu od strony anody. Ciekawą obserwacją było jednak stwierdzenie, że zahamowanie białek Rho nie powoduje obniżenia wydajności reakcji elektrotaktycznej komórek 3T3. Również nie stwierdzono aktywacji białek Rho pod wpływem pola elektrycznego, ani metodą G-LISA, ani badając aktywację biosensora RhoA (RhoA-FLARE.sc) działającego w oparciu o zjawisko FRET. Wskazuje to na konieczność poszukiwania alternatywnych mechanizmów aktywacji kinazy ROCK w procesie elektrotaksji.

W celu określenia mechanizmów związanych z indukcją tworzenia wypustek migracyjnych od strony katody zobrazowano dynamikę cytoszkieletu aktynowego, wykorzystując mikroskopię fluorescencyjną całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRFM) i komórki Swiss 3T3 wykazujące ekspresję białka LifeAct-GFP. Stwierdzono znaczne obniżenie kierunkowości ruchu (spadek cos kierunkowego do 48% kontroli) na skutek zahamowania aktywności białka Rac1, co sugeruje jego istotną rolę w indukowaniu powstających wypustek po stronie katody. Podobnego efektu nie

obserwowano w przypadku zahamowania aktywności formin, kompleksu Arp2/3 czy innego z małych białek G z rodzin Rho, białka Cdc42.

Podsumowując, w przedstawionej pracy stwierdzono, że fibroblasty wykazują silną reakcję elektrotaktyczną, która charakteryzuje się dużą dynamiką i jest zależna od aktywności dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir. Obserwowana w przebiegu reakcji indukcja skurczu komórki związana jest z aktywacją miozyny II za pośrednictwem kinazy ROCK. Natomiast obserwowana równolegle aktywacja tworzenia lamellipodiów jest uzależniona od aktywacji białek Rac.

ABSTRACT

Direct current electric fields (dcEFs) occur in living organisms being the part of some important physiological processes such as embryogenesis, wound healing and tissue regeneration. These naturally occurring EFs may cause directional cell migration by process known as electrotaxis. The electrotactical response is mediated by coordinated activation of multiple signalling pathways with many of them being typical for migration directed by the other physical and chemical factors. However, the primary mechanism of the response to dcEF has not been discovered yet.

In this thesis we investigated the mechanism underpinning electrotaxis of murine fibroblasts Swiss 3T3. The responsiveness of cells to dcEF of different magnitude was evaluated, as well as dynamics of the response to EF application or its reversal. The obtained results confirmed that murine fibroblasts migrate cathodally at electric fields of physiological strength (1 V/cm). We observed the immediate response of cells to the EF with first symptoms being visible after 1-2 minutes of exposure to dcEF. Such a rapid response could not be explained with the mechanism based on redistribution of membrane proteins, such as chemoattractant receptors. However, the mechanism being more likely engaged in the fast response of fibroblasts to the EF could involve the opening of membrane ion channels. In the light of recent reports, the electrotaxis of tissue cells can be connected with inwardly-rectifying potassium channels (Kir). Kir channels can be responsible for maintenance and precise regulation of the cell membrane potential. Although it is of special importance when considering cells of the nervous system, Kir channels are also expressed by many other types of cells. The conducted experiments confirmed the presence of Kir channels in murine fibroblasts. Next, we examined the involvement of those channels in the electrotaxis of Swiss 3T3 fibroblasts. It was demonstrated that the directionality of cell migration was decreased after both pharmacological inhibition of Kir channels and downregulation of Kir4.2 subunit gene. In particular, the dynamics of cell response was diminished. The similar effect was observed after the impairment of natural regulation of Kir channels by endogenous polyamines depletion or magnesium ions elevation.

The response of Swiss 3T3 to dcEF reversal was detected as early as 1-2 minutes after. The contraction at the region exposed to the “new anode” was clearly visible, together with the creation of protrusions facing the “new cathode”. Next, we decided to examine the mechanisms underlying those processes. The conducted analysis of contraction mechanisms revealed the involvement

of myosin II (decrease of directional cosine γ to the 38% of control after blebbistatin treatment). Surprisingly, the inhibition of MLCK (myosin II main activator) did not interrupt directional response to the dcEF. Additionally, although calcium ions are the main activator of MLCK, the electrotaxis of Swiss 3T3 cells was not dependent on their presence in the medium. The observed drop in directional cosine γ values in calcium-free medium, in the presence of chelators of external and internal calcium ions, EGTA and BAPTA, was not statistically significant (78, 70 and 86% of the control respectively). Moreover, calcium ions level in the cytoplasm was not elevated after exposure to the electric field of physiological magnitude. Taking together, the obtained results seems to be consistent with some previous reports indicating that calcium signalling is not obligatory for electrotaxis of all types of cells.

The alternative explanation for cell contraction may be the activation of myosin II by Rho/ROCK signalling pathway. Indeed, the suppression of ROCK activity with the Y-27632 inhibitor lead to statistically significant decrease in directionality ($\cos \gamma$ 51% of control) of cell migration, suggesting the involvement of this component in Swiss 3T3 contraction at the anodal side. Intriguingly, we did not observe the similar effects after RhoA inhibition, as well as we did not observe the activation of this small GTPase after dcEF application neither with biochemical G-LISA method, nor with FRET biosensor of RhoA activity (RhoA-FLARE.sc). The obtained data point to the alternative mechanism of ROCK kinase activation that can be involved in the directional response to the electric field.

Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) together with cells expressing LifeAct-GFP construct were used for precise analysis of cytoskeleton organization and protrusion dynamics during Swiss 3T3 electrotaxis. Finally, the inhibition of Rac1 GTPase led to the significant decrease in directionality of cell movement (drop in $\cos \gamma$ value to the 48% of control) suggesting its importance for development of lamellipodium facing the cathode. Similar effect was not observed after inhibition of formins, Arp2/3 complex or another small G-protein – Cdc42.

In conclusion, the conducted research demonstrated that Swiss 3T3 fibroblasts exhibit efficient cathodal directional migration to dcEF. The examined process is very dynamic and seems to be dependent on inwardly-rectifying potassium channels. The retraction of cell's rear facing the anode seems to be myosin II- and ROCK kinase-dependent, whereas Rac1 activity is crucial for lamellipodium formation on the cathodal side.

1. WSTĘP

1.1. MIGRACJA KOMÓREK I JEJ ZNACZENIE DLA FUNKCJONOWANIA ORGANIZMU

Zdolność komórek do aktywnego ruchu jest niezbędnym elementem wielu procesów fizjologicznych. W trakcie rozwoju zarodkowego dochodzi do przemieszczania względem siebie całych grup komórek w procesie formowania tkanek i narządów [1]. Jest to szczególnie dobrze widoczne w czasie tworzenia się układu nerwowego [2]. W dorosłym organizmie wielokomórkowym aktywna migracja jest niezbędna w procesie regeneracji tkanek, przykładowo podczas zasklepienia nieciągłości tkanek nabłonkowych różnego typu [3], a także podczas zachodzącej równolegle angiogenezy [4]. Doskonale znana jest również rola migracji komórek w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego [5]. Zdolność do aktywnego ruchu jest także wspólną cechą licznych typów komórek nowotworowych, w przypadku których stanowi niezbędny element towarzyszący tworzeniu przerzutów i naciekaniu sąsiadujących tkanek [6,7].

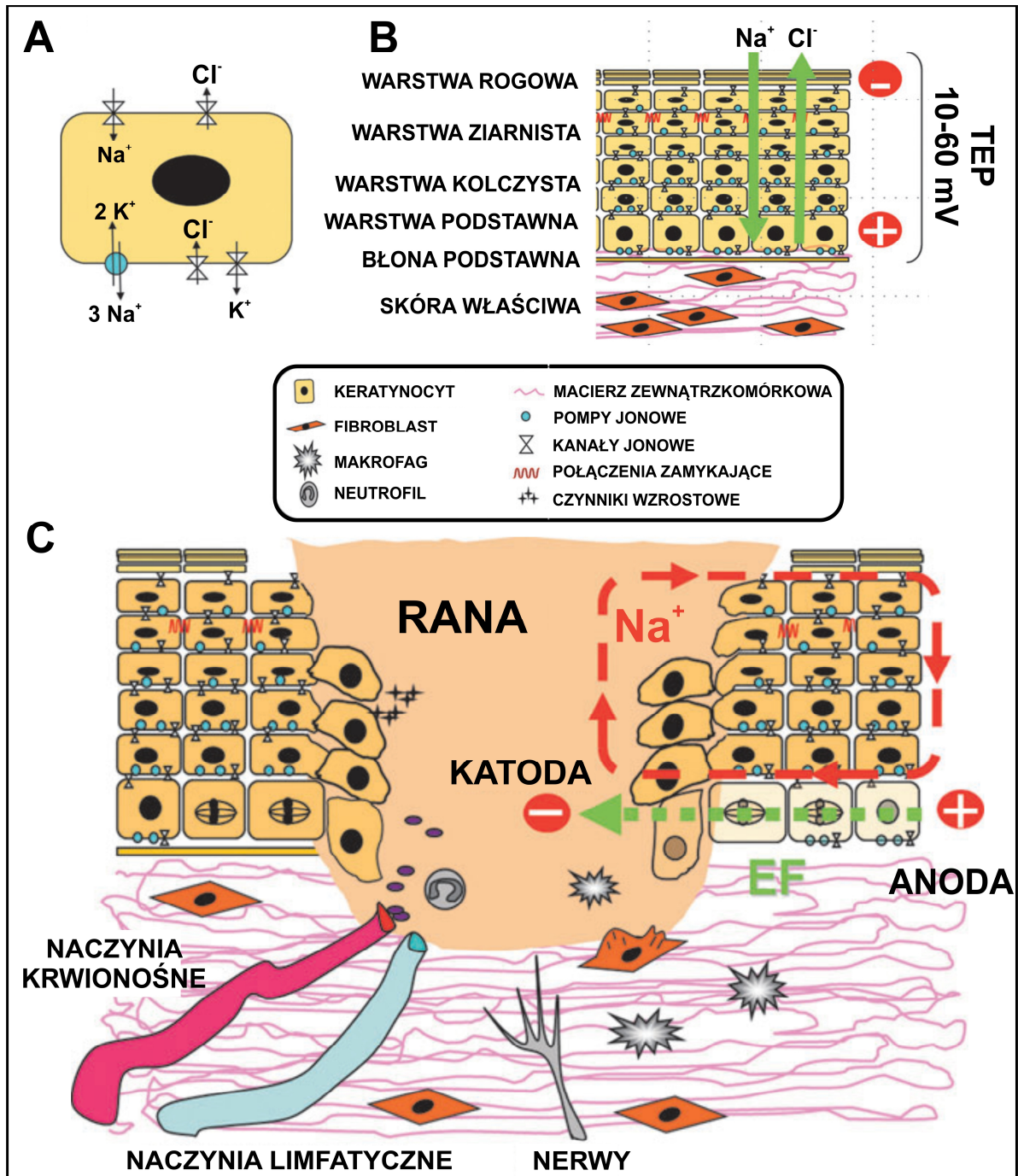
Aby migracja komórek przekładała się na realizację powyższych procesów, musi przebiegać w sposób ukierunkowany. W organizmie wielokomórkowym, każda z komórek wystawiona jest na szereg bodźców chemicznych i fizycznych docierających z otoczenia [8]. Stykające się z nią sąsiednie komórki bądź macierz zewnątrzkomórkowa, generują bodźce mechaniczne, wpływające na strukturę błony i architekturę cytoszkieletu. Sygnały te na drodze mechanotransdukcji mogą wpływać na podstawowe funkcje życiowe komórki, w tym także charakterystykę ruchu [9]. Wielokrotnie wykazywano kierunkową migrację w odpowiedzi na rzeźbę podłoża [10]. Także ograniczenie przestrzenne może diametralnie zmieniać aktywność migracyjną komórek [11]. W otoczeniu komórki znajduje się również duża ilość różnorodnych związków drobnocząsteczkowych, białek lub lipidów, które mogą regulować migrację komórki. Część z nich swobodnie przenika przez błonę komórkową oddziałując na wewnątrzkomórkowe komponenty, inne łączą się z bardziej lub mniej dedykowanymi dla nich receptorami zlokalizowanymi na błonie komórkowej. W tym przypadku odebrany sygnał również może znajdować wyraźne przełożenie na aktywność migracyjną, a w szczególnych przypadkach na ukierunkowanie ruchu. Komórki mogą odpowiadać na gradienty stężenia określonych związków (chemokin, czynników wzrostowych, nukleotydów) w procesie zwanym chemotaksją [12–14]. Proces ten leży m.in. u podstaw aktywności żernej neutrofilii i makrofagów, które w ten

sposób lokalizują patogeny wnikające do organizmu [15]. Wieloletnie badania wykazały, że dla ukierunkowania ruchu nie mniej ważne jest również oddziaływanie stałych pól elektrycznych o niewielkich natężeniach [16]. Takie pola stanowią stabilny bodziec, który może oddziaływać na relatywnie duże odległości (w skali komórkowej i tkankowej), oraz może być utrzymywany długotrwale [17]. Jak opisano w dalszej części pracy, powstawanie takich pól elektrycznych jest w pełni fizjologicznym procesem. Wykazano, że liczne typy komórek są zdolne do detekcji pola elektrycznego, co powoduje ich szybką i wydajną polaryzację, a następnie migrację w kierunku określonej elektrody – ujemnej (katody) bądź dodatniej (anody) [18].

1.2. POTENCJAŁ TRANSEPITELIALNY I ENDOGENNE POLA ELEKTRYCZNE

W organizmach wielokomórkowych powszechnie występują endogenne pola elektryczne. U ich podłoża znajduje się formowanie potencjałów transepitelialnych (TEP, ang. *transepithelial potential*), na skutek asymetrycznego transportu jonów dodatnich i ujemnych, w poprzek warstw wielowarstwowych nabłonków. Połączenia zamykające pomiędzy komórkami nabłonków pełnią dwojaką funkcję, z jednej strony zapobiegają swobodnemu przepływowi jonów pomiędzy komórkami, z drugiej odpowiadają za asymetryczny rozkład białek błonowych. W domenie wierzchołkowej (apikalnej) komórek nabłonkowych w wielu typów nabłonków przewagę mają kanały sodowe i transportery jonów chlorkowych, podczas gdy w domenie boczno-podstawnej zgromadzone są pompy sodowo-potasowe i kanały potasowe (Ryc. 1 A). Na każdy cykl pracy pompy sodowo potasowej wyrzucane są z komórki 3 jony Na^+ przy transporcie 2 jonów K^+ w kierunku przeciwnym. Wielowarstwowy układ nabłonków i wspomniany asymetryczny rozkład białek błonowych w każdej z warstw skutkuje separacją ładunków, gromadzeniem dodatnich jonów sodu po wewnętrznej stronie nabłonków i przeciwnie, akumulacją ujemnych jonów chlorkowych po ich zewnętrznej stronie [19,20]. Separacja ładunków skutkuje wytworzeniem różnicy potencjałów pomiędzy stronami nabłonków, która zależnie od ich typu może wynosić od kilku do kilkudziesięciu mV (Ryc. 1 B). Przerwanie ciągłości nabłonka skutkuje natychmiastowym zanikiem różnicy potencjałów w miejscu zranienia, podczas gdy w niewielkiej odległości od rany omówiony transport jonów zachodzi nieprzerwanie. W efekcie obserwuje się wpływ jonów dodatnich na zewnątrz (poprzez miejsce przerwania ciągłości naskórka, czyli miejsce zranienia), który jest podtrzymywany długotrwale przez ciągły transport w obrębie nieuszkodzonych rejonów nabłonka (Ryc. 1 C). Przykładowo, w przypadku skóry, powstała pętla jonowa na wysokości granicy między warstwą podstawną i skórą właściwą generuje stałe pole

elektryczne o biegunie ujemnym zlokalizowanym w centrum rany, które jest podtrzymywane do momentu zasklepienia nabłonka [20].



Rycina 1 Mechanizm powstawania endogennych pól elektrycznych w organizmie na przykładzie skóry

A. Asymetryczny rozkład pomp i kanałów jonowych w błonie komórkowej i związany z nim kierunkowy transport jonów

B. Wielowarstwowa budowa skóry i mechanizm formowania potencjału transepitelialnego.

C. Mechanizm powstawania pola elektrycznego na skutek przerwania ciągłości powłok skórnych.

Poszczególne elementy rysunku są scharakteryzowane w ramach wspólnej legendy. Szczegółowy opis przedstawionych procesów znajduje się w tekście. (Na podstawie [21] – zmienione).

Doskonale scharakteryzowano parametry powstających pól i prądów jonowych w przypadku zranienia rogówki. Co ciekawe, rejestrowane natężenie prądu elektrycznego wypływającego z rany nie jest najwyższe bezpośrednio po zranieniu rogówki, lecz ulega stopniowemu wzrostowi od 4 do 10 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ w ciągu 60 min [22]. Analogiczne zjawisko obserwowane jest w zranieniach skóry, przy czym obserwowany wzrost jest nieco wolniejszy. Prądy rejestrowane podczas regeneracji amputowanych fragmentów palców u dzieci osiągały maksymalną wartość po upływie od 6 do 8 dni od zdarzenia [23]. Jeszcze szerzej zakrojone zmiany obserwuje się w następstwie amputacji ogona kijanek, gdzie po trwającym 12-24 h wypływie prądu następuje odwrócenie jego przepływu na kolejne 7 dni, co jest niezbędne dla prawidłowej regeneracji [24]. Wspomniane zjawiska świadczą o zachodzeniu aktywnej kontroli endogennych pól elektrycznych powstałych na skutek zranienia, co sugeruje, że nie są one jedynie efektem ubocznym, lecz są istotne dla prawidłowego przebiegu regeneracji tkanek i organów. Może to przebiegać zarówno poprzez regulację funkcjonowania komponentów zaangażowanych w transport jonów, jak i zmiany ich ekspresji w odpowiedzi na zranienie [25,26]. Jako przykład może posłużyć wzrost ekspresji pompy sodowo potasowej w rejonie zranienia skóry trwający przez 7 dni. W tym samym czasie obserwuje się wysoką korelację tego procesu z rejestrowanym potencjałem transepitelialnym [27]. Ostatnie badania sugerują z kolei, że obniżona wydajność gojenia ran w procesie cukrzycy może być wynikiem zaburzenia dynamiki TEP w odpowiedzi na zranienie, prawdopodobnie w związku z wadliwym transportem jonów Cl^- [28].

Modyfikacja potencjału transepitelialnego na drodze ingerencji farmakologicznej nie jest obojętna dla procesu regeneracji tkanki. Hamowanie aktywności kanałów i transporterów jonowych, bądź modyfikacja składu płynów otaczających tkankę prowadząca do obniżenia TEP, pociąga za sobą spadek tempa zarastania ran [27]. Przeciwnie, podniesienie TEP, skutkujące wzrostem natężenia pola elektrycznego powstającego po zranieniu, przyspiesza regenerację ubytku tkanki [25]. Upatruje się szans na powszechne stosowanie w przyszłości farmakologicznych metod leczenia trudno-gojących się ran w oparciu o powyższe zjawisko. Jak się wydaje, jeszcze większy potencjał ma stosowanie metod fizycznych opartych na stymulacji polem elektrycznym. Wykorzystywana w ostatnich latach elektrostymulacja np. urządzeniem WoundEL[®] okazała się skuteczna w stymulacji zarastania trudno-gojących się ran u ponad 6 000 pacjentów, którym nie pomagały alternatywne metody leczenia [21].

Analogiczne procesy formowania potencjałów transeptitelialnych i formowania endogennych pól elektrycznych nie są właściwe wyłącznie dla powłok skórnych i ich regeneracji. W szczególności wykazano, że od zjawisk elektrycznych tego typu uzależniony jest prawidłowy przebieg rozwoju zarodkowego. W związku z przemieszczaniem całych grup komórek w czasie formowania zarodka, dochodzi do lokalnych zmian oporności nabłonków na skutek degradacji bądź przebudowy połączeń zamykających. Takie zmiany przewodnictwa jonowego mogą być również regulowane w sposób aktywny. Prowadzi to do wytwarzania lateralnych pól elektrycznych o istotnym natężeniu. Tego typu procesy są szczególnie nasilone we wstępnych etapach rozwoju układu nerwowego. Wykazano m.in., że zarodki *Aksolotla* (*Ambystoma mexicanum*) na etapie neurulacji umieszczone w zewnętrznym polu elektrycznym zaburzającym pola endogenne wykazywały poważne wady rozwojowe, obejmujące brak wykształcenia mózgowia bądź oczu. Zarodki na etapie gastrulacji wykazywały dużo mniejszą wrażliwość na aplikowane pole elektryczne [17].

Pola elektryczne nie są również obojętne dla procesu angiogenezy. Wykazano działanie stymulujące na proces tworzenia naczyń krwionośnych w oparciu o szereg mechanizmów, jak np. stymulowanie wydzielania czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF, czy ukierunkowanie wzrostu naczyń. Należy mieć na uwadze, że proces angiogenezy przebiega w organizmie na obszarach, gdzie takie endogenne pola elektryczne są generowane, zarówno w oparciu o mechanizmy wspomniane powyżej, jak i na skutek przepływu krwi w naczyniach krwionośnych [29,30]. Wiele wskazuje również, że endogenne pola elektryczne mogą nie być obojętne dla przebiegu choroby nowotworowej, zwłaszcza jej etapów obejmujących migrację komórek, a mianowicie tworzenia przerzutów i naciekania. Potencjalne mechanizmy takiego działania, jak i przykłady komórek nowotworowych reagujących na pole elektryczne przedstawiono w dalszej części pracy.

1.3. ODDZIAŁYWANIE PÓL ELEKTRYCZNYCH NA KOMÓRKI

Pole elektryczne oddziałuje na komórki wielopłaszczyznowo. Liczne badania wykazały, że może wpływać na ich proliferację i różnicowanie [31–33], modulować ekspresję wybranych genów [34,35], czy powodować przyjmowanie określonej orientacji i morfologii [36–38]. Szczególne znaczenie ma jednak oddziaływanie stałych pól elektrycznych o fizjologicznym natężeniu na aktywność ruchową komórek. Bardzo powszechna wśród komórek organizmów wyższych jest zdolność do kierunkowej migracji w polu elektrycznym bądź do zmiany prędkości

ruchu w odpowiedzi na ten bodziec fizyczny [39]. Kierunkową migrację w stronę bieguna ujemnego lub dodatniego określa się mianem galwanotaksji bądź elektrotaksji. W każdym przypadku jest to proces aktywnej migracji w oparciu o wytwarzanie wypustek migracyjnych charakterystycznych dla danego typu komórek. Przeważająca część badanych komórek odpowiada migracją w kierunku bieguna ujemnego (katody) [20]. Wśród nich wymienić można mysie fibroblasty pochodzenia embrionalnego (C3H/10T1/2, NIH/3T3 i SV101)[40–42], ludzkie keratynocyty [43] i fibroblasty skórne [44] lub komórki grzebienia nerwowego pochodzące od płazów i ptaków [45,46]. W mniejszości są komórki wykazujące tendencję do migracji w kierunku przeciwnym. Za przykład mogą posłużyć ludzkie granulocyty i makrofagi [47,48], szczurze komórki raka prostaty linii AT2 [49], bądź królicze komórki śródbłonka rogówki [50]. Poszczególne typy komórek różnią się progiem reaktywności i kinetyką prezentowanej odpowiedzi. Migrujące w przeciwnych kierunkach komórki można znaleźć w obrębie jednego organizmu czy nawet organu. Przykładem mogą być bydłące komórki nabłonkowe soczewki, które izolowane z jej poszczególnych rejonów migrują w przeciwnych kierunkach, co jak się wydaje, ma związek ze zróżnicowaniem pól elektrycznych występujących w obszarach, gdzie bytują. W stosunkowo wysokim natężeniu pola wynoszącym 1,5-2,5 V/cm komórki z obszaru centralnego i peryferycznego migrują w kierunku anody, podczas gdy słabsze pole (0,5 V/cm) powoduje migrację katodalaną komórek peryferycznych [51]. Istnieją nawet wyniki badań sugerujące, że ten sam typ komórek może wykazywać migrację kierunkową do przeciwstawnych elektrod, w zależności od warunków otoczenia. Przykładem mogą być ludzkie granulocyty, które w medium zawierającym jony wapnia w stężeniu 2,5 mM migrowały w kierunku anody, podczas gdy zmniejszenie ich stężenia do poziomu 0,1 mM skutkowało odwróceniem kierunku ruchu [52].

Opisywana odpowiedź na pola elektryczne o fizjologicznym natężeniu jest istotna dla prawidłowego przebiegu licznych procesów biologicznych, zwłaszcza omówionego już gojenia ran. Wyraźną elektrotaksję w kierunku katody przejawiają takie komórki zaangażowane w proces regeneracji skóry jak fibroblasty skórne, keratynocyty, komórki endotelialne, czy niektóre komórki układu odpornościowego [19,25]. Z kolei znaczenie pól elektrycznych w rozwoju zarodkowym również opiera się w głównej mierze na kontroli kierunkowej migracji komórek grzebienia nerwowego, fibroblastów embrionalnych bądź rosnących wypustek neuronów (w procesie zwanym galwanotropizmem). Można przypuszczać, że wady rozwojowe powstałe przez

zaburzenie tych endogennych pól są właśnie wynikiem zaburzenia procesów galwanotaksji i galwanotropizmu komórek kluczowych dla rozwoju zarodkowego [17].

Poza powyższymi procesami fizjologicznymi wielokrotnie dokumentowano reaktywność na pole elektryczne komórek nowotworowych. W połączeniu z wiedzą, że komórki te funkcjonują otoczone naturalnie występującymi polami elektrycznymi *in vivo*, można zakładać, że zjawisko elektrotaksji może również oddziaływać na przebieg choroby nowotworowej. Wydajną elektrotaksję obserwowano m.in. w przypadku szczurzych komórek raka prostaty Mat-LyLu [49] i mięsakoraka Walkera WC256 [53] lub ludzkich komórek glejaka [54]. W przeszłości postulowano, że stosunkowo wysoki potencjał transepitelialny powstający w poprzek ściany gruczołów mlekowych w piersiach i kanalików prostaty może stanowić bodziec wpływający na kierunek inwazji powstających w tych narządach komórek nowotworowych [20]. Badania różnych linii komórek nowotworowych płuc wykazały z kolei ich zdolność do reakcji elektrotaktycznej po umieszczeniu w trójwymiarowej piance naśladującej strukturę pęcherzyków płucnych [55]. Niewykluczone jest również, że odpowiednia ingerencja w endogenne pola elektryczne, bądź zdolność komórek do ich odczuwania może zostać w przyszłości wykorzystana w walce z rozwojem wybranych typów nowotworów.

1.4. PROPONOWANE MECHANIZMY DETEKcji POLA ELEKTRYCZNEGO

Pomimo, że zdolność do elektrotaksji jest cechą wspólną większości spośród badanych komórek, a także ugruntowaniu jej znaczenia w przebiegu tak wielu procesów fizjologicznych, dokładny mechanizm detekcji pola elektrycznego przez komórki i jej przełożenia na polaryzację i kierunkowość ruchu nie został ostatecznie scharakteryzowany. Prowadzone na przestrzeni lat badania wskazują na zaangażowanie licznych elementów sygnalizacyjnych, zarówno związanych z dystrybucją jonów, jak i aktywnością lub lokalizacją wielu komponentów białkowych [39]. Niestety wiele z poczynionych obserwacji sugeruje zaangażowanie mechanizmów wzajemnie się wykluczających. Inne mechanizmy wydają się być właściwe wyłącznie dla określonej, niewielkiej grupy komórek. Dziś wiadomo już, że wybrane komponenty, którym do niedawna przypisywano kluczową rolę w generowaniu kierunkowej migracji w polu elektrycznym, pełnią zaledwie wtórną funkcję, ważną dla samej aktywności migracyjnej komórek. Z tego tytułu wciąż prowadzone są badania, które mają na celu odkrycie nadrzędnego mechanizmu detekcji pola elektrycznego, wspólnego dla wszystkich, lub chociaż większości typów komórek.

W oparciu o teoretyczne obliczenia, jak i popierające wyniki pozyskane metodami doświadczalnymi, poszukiwanie detektora pola elektrycznego można zawęzić do błony komórkowej, która posiada własności izolatora. Jej oporność jest szacowana na dziesiątki kiloomów na cm^2 . W połączeniu z niewielkimi rozmiarami komórek oraz występującą polaryzacją elektryczną błony komórkowej oznacza to, że pole elektryczne aplikowane zewnętrznie jedynie w niewielkim stopniu oddziałuje na elementy zlokalizowane w cytoplazmie [56,57].

1.4.1. REDYSTRYBUCJA BIAŁEK BŁONOWYCH

Proponowane mechanizmy detekcji pola elektrycznego w zjawisku elektrotaksji można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Pierwsza z nich obejmuje mechanizmy zakładające występowanie przemieszczania białek bądź innych biocząsteczek w płaszczyźnie błony komórkowej na skutek oddziaływania pola elektrycznego.

Mechanizm oparty na redystrybucji lipidów lub białek w błonie komórkowej został zaproponowany w 1977. Zgodnie z wyliczeniami na dynamikę takiego procesu w przypadku elektroforezy ma wpływ wypadkowy ładunek cząsteczek w określonym pH, ich wielkość oraz charakterystyka błony komórkowej [58]. W przypadku elektroosmozy można spodziewać się przeciwnego kierunku gromadzenia elementów białkowych, gdyż czynnikiem, który za to odpowiada jest oddziaływanie pola elektrycznego na przeciwny towarzyszące komponentom błonowym niosącym ładunek, wraz z ich otoczką hydratacyjną [59]. W związku z ujemnym (w fizjologicznym pH) ładunkiem większości białek i lipidów błonowych (głównie związanym z skoniugowanymi z nimi grupami oligosacharydowymi), można się spodziewać, że taka warstwa wody bogata w jony dodatnie ciągnęłaby wypadkowo białka w kierunku katody [57]. Zjawisko to mogłoby tłumaczyć, dlaczego częściej obserwuje się gromadzenie istotnych dla migracji komórek białek błonowych po stronie katodalnej, nawet jeśli same niosą ładunek ujemny. Potwierdzeniem tego zjawiska może być odwrócenie tej tendencji na skutek enzymatycznego odcięcia ujemnie naładowanych grup cukrowych z białek powierzchniowych [59]. Niezależnie od podłoża, efektem takiego ruchu cząsteczek receptorowych jest ich gromadzenie na określonym biegunie komórki, prowadzące do polaryzacji ich rozkładu i docelowo asymetrycznej aktywacji wybranych kaskad sygnalizacyjnych [60].

Zwolennicy powyższej teorii powołują się każdorazowo na możliwy do zobrazowania asymetryczny rozkład białek błonowych w komórkach umieszczonych w polu elektrycznym. W przypadku ludzkich fibroblastów notowano gromadzenie receptora dla LDL (ang. *low density*

lipoprotein) po stronie katodalej w wyniku godzinnej aplikacji pola o natężeniu 10 V/cm [61]. Komórki nabłonkowe rogówki wykazywały analogiczną akumulację receptora dla EGF (ang. *epidermal growth factor*) już po 10 min stymulacji. Elektrotaksja tych komórek była również zależna od obecności surowicy lub stymulacji czynnikiem EGF, co dodatkowo wskazuje na istotność obserwowanej zależności [62]. Według licznych przesłanek asymetryczny rozkład receptorów dla czynników wzrostu leży także u podłoża reakcji galwanotropicznej komórek nerwowych [17]. W ostatnim czasie postulowano, że elektroforeza konkretnych białek błonowych jest kluczowa nawet dla reakcji szybko migrujących keratynocytów rybich. O udziale tego mechanizmu miałyby świadczyć m.in. zależność reakcji od pH środowiska, wpływającego na wypadkowy ładunek białek i przez to kierunek redystrybucji w błonie komórkowej [57]. W świetle niniejszej pracy istotne mogą wydawać się doniesienia dotyczące udziału gromadzenia po stronie katody białek adhezyjnych, receptora ConA i receptora fibronektyny, podjednostki 5 α integryny w mysich fibroblastach NIH/3T3. Autorzy pracy jako jedni z nielicznych podjęli próbę uzasadnienia, że szybka reakcja na pole elektryczne tych komórek również może być tłumaczona mechanizmem redystrybucji białek błonowych, twierdząc, że do ustalenia asymetrycznego rozkładu białek adhezyjnych wystarczy już kilka minut od zadziałania bodźca i nawet najmniejsze odchylenia od równomiernego rozkładu mogą powodować kierunkową migrację [42].

Z powyższych informacji wynika, że asymetryczny rozkład białek błonowych stanowi powszechny element towarzyszący kierunkowej migracji komórek w polu elektrycznym. Pytaniem otwartym pozostaje kwestia czy w każdym przypadku stanowi to rzeczywisty mechanizm detekcji pola elektrycznego, czy raczej wtórne zjawisko związane z polaryzacją komórki. Poważne zastrzeżenia pojawiają się również w przypadku tłumaczenia udziałem tego mechanizmu niekiedy nawet bardzo szybkiej reakcji na pole elektryczne, co omówiono w dalszej części pracy.

1.4.2. MECHANIZMY JONOWE

Alternatywnie, udział w detekcji pola elektrycznego przypisuje się mechanizmom związanym z potencjałem błonowym oraz z wpływem na transport jonów w poprzek błony komórkowej. Mechanizm taki opierałby się głównie na aktywności kanałów jonowych, preferencyjnie zależnych od napięcia bądź naprężenia, bądź na pasywnym transporcie jonów w poprzek błony komórkowej [63]. Oddziaływanie pola elektrycznego na komórkę powoduje depolaryzację błony po stronie katody i hiperpolaryzację po stronie przeciwnej – skierowanej do anody [40]. Zjawisko to może prowadzić do zmiany częstotliwości otwierania kanałów jonowych zależnych od napięcia. Dodatkowo aplikowane pole elektryczne może oddziaływać na siłę elektromotoryczną napędzającą przenikanie jonów w poprzek błony przez konstytutywnie otwarte kanały [63]. Najczęściej postulowany jest tutaj udział jonów wapnia, które w dalszej kolejności najłatwiej można powiązać ze zjawiskami ruchowymi komórki. W kontekście elektrotaksji pojawiają się jednak również doniesienia o potencjalnym znaczeniu jonów sodu, a w ostatnich latach także potasu [41,46,63–66].

Jak wspomniano, najczęściej postulowano i weryfikowano udział jonów wapnia w reakcji elektrotaktycznej. Wiele z uzyskiwanych wyników wydaje się potwierdzać stawiane hipotezy. Przykładowo, stymulacja mysich embrionalnych fibroblastów C3H/10T1/2 polem elektrycznym o stosunkowo wysokim natężeniu (10 V/cm) skutkowało ich wydłużaniem i przyjmowaniem prostopadłej orientacji względem linii pola. Wykazano, że obserwowana reakcja była znoszona przez farmakologiczne zahamowanie kanałów wapniowych bądź usuwanie zewnątrzkomórkowych jonów wapnia [67]. Kolejne badania prowadzone na tych komórkach w dłuższej skali czasowej wykazały, że również migracja w kierunku katody jest zależna od napływu jonów wapnia, który dodatkowo z powodzeniem obrazowano. Warto jednak pamiętać, że istotne wyniki w tym układzie uzyskiwano przy natężeniach pola znacznie przewyższających fizjologiczne [41].

Przyrost stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia obserwowano również w przypadku komórek raka piersi MDA-MB-231. Wyraźny skok fluorescencji barwnika Fluo-4 obserwowano po 10 min stymulacji polem elektrycznym o natężeniu od 3 V/cm. Wzrost notowano także po stymulacji różnymi stężeniami EGF, co może sugerować wtórny charakter obserwowanych zmian [68]. W przypadku anodalnej elektrotaksji mysich makroflagów zaobserwowano zależność zarówno od mechanizmów jonowych, jak i polarne gromadzenie białek

błonowych. Reakcja na pole o natężeniu 7,8 V/cm była zniesiona w obecności EGTA i przy podniesionym stężeniu jonów Mg^{2+} oraz w obecności jonów La^{3+} , hamujących napływ wapnia do komórek. Pomimo zniesienia reakcji kierunkowej na pole, wciąż obserwowano asymetryczny rozkład wybranych białek błonowych [48]. Również migracja ludzkich keratynocytów w kierunku katody jest ściśle uzależniona od obecności jonów wapnia w pożywce, przy czym wystarczające są już stężenia mikromolowe i dalszy wzrost nie powoduje nasilenia kierunkowości. Wykazano jednak, że wychwyt jonów Ca^{2+} przy udziale EGTA negatywnie wpływa zarówno na kierunkowość, jak i ruchliwość komórek. Warto zauważyć, że zależna od wapnia reakcja na pole jest w tym przypadku notowana przy natężeniach fizjologicznych, tj. 1 V/cm [69]. Obecność jonów wapnia była niezbędna do zajścia reakcji elektrotaktycznej komórek grzebienia nerwowego izolowanych z zarodków przepiórki. Komórki te reagowały migracją w kierunku katody już przy tak niskim natężeniu pola jak 0,07 V/cm. Dodatek jonów magnezu w stężeniu 10 mM jak i Gd^{3+} w stężeniu 100 μM znosił tę reakcję, a nawet dochodziło do jej odwrócenia po usunięciu jonów Ca^{2+} z pożywki [46]. Przeciwnostawne wyniki w odniesieniu do komórek tkankowych uzyskano w badaniu katodjalnej elektrotaksji mysich fibroblastów NIH/3T3 i SV101. W obu przypadkach obecność jonów wapnia nie odgrywała kluczowej roli dla kierunkowej migracji, jak i nie obserwowano wzrostu ich stężenia w cytoplazmie pod wpływem pola elektrycznego [42]. W badaniach z wykorzystaniem rybich keratocytów farmakologiczne zaburzenie przechodzenia jonów wapnia przez błonę komórkową wyraźnie hamowało proces tworzenia lamellipodiów, także podczas ekspozycji komórek na pole elektryczne. Co warto zauważyć, znaczne zmiany stężenia jonów K^+ , Na^+ i Cl^- w tym układzie nie wpływają na reakcję elektrotaktyczną badanych komórek, pomimo, że powinny wywierać wpływ na potencjał błonowy w skali całej komórki [70,71].

Galwanotropizm komórek nerwowych jest reakcją, która wykazuje liczne analogie ze zjawiskiem elektrotaksji. W przypadku embrionalnych neuronów płazów blokada kanałów wapniowych jonami Co^{2+} i La^{3+} hamowała skręcanie wypustek nerwowych w kierunku katody w polu o natężeniu 1 V/cm. Dodatkowo indukcja napływu jonów Ca^{2+} od strony anodalnej stymulowała skręcanie wypustek do elektrody dodatniej. Wyniki te sugerowały uzależnienie obserwowanej reakcji od napływu jonów wapnia [72]. Wniosek taki nie znalazł poparcia w wynikach nowszych badań na komórkach nerwowych żaby szponiastej (*Xenopus laevis*), które wykazały, że wychwyt zewnątrzkomórkowych jonów wapnia, jak i zaburzenie ich

wewnątrzkomórkowego stężenia i gradientów nie ma wpływu na kierunkowość wzrostu wypustek neuronalnych. Praca ta jest jedną z nielicznych, która wskazuje na brak zależności reakcji kierunkowej na pole elektryczne od jonów wapnia [73].

Znaczenie jonów Ca^{2+} dla reakcji elektrotaktycznej udokumentowano również w badaniach na organizmach niższych. Przykładowo obserwowano wzrost wewnątrzkomórkowego wapnia pod wpływem pola w komórkach śluzowca *Dictyostelium discoideum* w stadium ameboidalnym. Dodatkowo obserwowano zniesienie elektrotaksji po inkubacji komórek z EGTA. Jednocześnie wykazano, że napływ jonów Ca^{2+} przebiega w sposób niezależny od ścieżek związanych z chemotaksją [74]. Zawartość zewnątrzkomórkowych jonów wapnia w medium determinuje również reaktywność pełzaka odmieńca (*Amoeba proteus*) na pole elektryczne. Podmiana na jony magnezu istotnie obniża galwanotaksję tych komórek. Uzależnienie od mechanizmów jonowych pozostaje w tym przypadku w dużej zgodzie z obserwowaną dynamiką reakcji, której pierwsze objawy widoczne były w czasie 1 s od zadziałania bodźca [75].

Uzależnienie reakcji elektrotaktycznej od bramkowanych napięciem kanałów sodowych wykazano z kolei w przypadku linii komórek nowotworowych – raka prostaty MAT-LyLu. Wyraźna migracja tych komórek w kierunku katody była zaburzona przez zahamowanie VGSC (ang. *voltage gated sodium channel*) tetrodotoksyną. Przeciwnie działanie na aktywność tych kanałów weratrydyną powodowało wzmożenie reaktywności badanych komórek na pole elektryczne o fizjologicznym natężeniu. Istnieją przesłanki, że obecność wspomnianych kanałów i ich udział w reakcji elektrotaktycznej może mieć udział w wysokim potencjale metastatycznym komórek MAT-LyLu [49].

Pierwsze doniesienia o potencjalnym znaczeniu jonów potasu w reakcji na pole elektryczne pojawiły się w połowie ubiegłego wieku. Wykazano m.in., że zmiany stężenia soli potasu w otoczeniu nie były obojętne dla katodalnej reakcji śluzowca *Physarum polycephalum*, a mianowicie wzrost stężenia jonów potasu w podnosił próg reaktywności na pole elektryczne [76]. Kolejne badania z wykorzystaniem tego protista wykazały spadek poziomu jonów potasu po stronie anodalnej, któremu towarzyszyło zahamowanie tworzenia wypustek w tym kierunku [77]. W badaniach na *Dictyostelium discoideum* wzrost stężenia jonów K^+ w otoczeniu do 25 i 50 mM przekładał się na wyraźną depolaryzację błony komórkowej, co pociągało za sobą istotne obniżenie kierunkowości ruchu tych organizmów niższych. Podobny wpływ na kierunkowość w tym układzie wywołało znaczne podniesienie, bądź obniżenie kwasowości medium, które

również powodowało depolaryzację błony komórkowej [78]. Kolejne badania wykazały z kolei brak istotności wzrostu stężenia jonów potasu w pożywce na reakcję elektrotaktyczną rybiej keratocytów [57].

Interesujące wnioski płyną natomiast z pracy dotyczącej reakcji na pole elektryczne komórek linii COS-7 wyprowadzonej z małych fibroblastów nerkowych. W toku badań wykazano, że w reakcję elektrotaktyczną tych komórek zaangażowane są potasowe kanały zależne od napięcia Kv1.2. Reaktywność tych komórek była ściśle uzależniona od ekspresji wskazanych kanałów, podobnie jak od ich funkcji, gdyż ich zahamowanie farmakologiczne również obniżało kierunkowość ruchu bez wpływu na prędkość migracji. Warto zauważyć, że kanał Kv1.2 kolokalizował z kortaktyną, białkiem związanym z dynamiką cytoszkieletu aktynowego, wspólnie gromadząc się po stronie katodalej komórki. Taki kompleks może docelowo prowadzić do aktywacji Arp2/3 i nasilenia polimeryzacji aktyny. Przedstawiony model jest więc wielopłaszczyznowy i nie bazuje wyłącznie na aktywności kanału jonowego i jego aktywacji, ale też jego redystrybucji w błonie, stąd nie tłumaczy w pełni szybkich reakcji na pole elektryczne [65]. W ostatnim czasie przedstawiono również bardzo interesujące wyniki dotyczące zaangażowania w reakcję elektrotaktyczną dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych (Kir, ang. *inwardly-rectifying potassium channel*), którym więcej uwagi poświęcono w kolejnym podrozdziale [66].

1.4.3. DOKOMÓRKOWE PROSTOWNICZE KANAŁY POTASOWE KIR

Dokomórkowe prostownicze kanały potasowe Kir stanowią nadrodzinę kanałów potasowych, które łączą unikalne własności strukturalne i funkcjonalne. Kanały te występują powszechnie wśród komórek tkankowych, odpowiadając za kontrolę spoczynkowego potencjału błonowego, pośrednio wpływając na funkcjonowanie pozostałych typów kanałów potasowych [79]. Wspólną cechą wszystkich kanałów Kir jest zdolność do wypadkowego przewodzenia jonów K^+ do wnętrza komórki. Cecha ta jest zapewniana przez interakcję w obrębie poru z wewnątrzkomórkowymi poliaminami i jonami Mg^{2+} [80]. Przedstawiciele poszczególnych podrodzin Kir podlegają również kontroli ze strony wewnątrzkomórkowych protonów, określonych białek G, ATP i fosfolipidów [81,82].

Wśród dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir wyróżnia się 7 podrodzin Kir1.x - Kir7.x, z których najliczniejsze obejmują do 4 przedstawicieli. Na dzień dzisiejszy poznano 15 przedstawicieli tej rodziny białek [79]. Niezależnie od typu, funkcjonują

w błonie jako homo lub heterotetramery, przy czym w drugim przypadku, kompletny kanał zazwyczaj budują przedstawiciele jednej podrodziny, aczkolwiek występują nieliczne odstępstwa od tej reguły. Możliwość formowania heterotetramerów wynika ze stosunkowo prostej budowy i wysokiej homologii pomiędzy przedstawicielami rodziny [79]. Poszczególne podjednostki mają wspólne cechy budowy, takie jak dwie domeny transbłonowe, region formujący kanał i domeny C i N-końcowe zlokalizowane w cytoplazmie. Niezmienną cechą wspólną dla każdej konfiguracji podjednostek jest wysoka selektywność względem jonów K^+ [80].

Dokomórkowe prostownicze kanały potasowe (Kir) pełnią istotną funkcję w wielu tkankach, biorąc udział w precyzyjnym ustalaniu potencjału błony komórkowej na pożądanym poziomie [79]. W stanie spoczynkowym komórek pobudliwych i w komórkach niepobudliwych błona komórkowa posiada potencjał ujemny (ok. -70 mV) co oznacza, że przewaga ładunku ujemnego znajduje się wewnątrz komórki, natomiast na zewnątrz gromadzi się nadmiar jonów dodatnich. Za sprawą aktywności pomp sodowo-potasowych, jony potasu gromadzone są wewnątrz komórki i dążąc do wyrównania potencjału chemicznego, wypływają z cytoplazmy przez spoczynkowe, stale otwarte kanały potasowe. Generuje to wspomnianą różnicę potencjałów w poprzek błony komórkowej [83]. W przypadku kanałów Kir, sytuacja jest bardziej złożona, gdyż posiadają one specyficzny mechanizm bramkowania. W spolaryzowanej błonie komórkowej, mechanizm bramkowania nie jest pełny i teoretycznie możliwy jest transport jonów K^+ w obu kierunkach. Postępująca depolaryzacja sprawia, że od strony wewnątrzkomórkowej kanał jest blokowany przez niosące ładunek dodatni poliaminy i jony magnezu, przez co transport jonów K^+ przebiega w kierunku cytoplazmy i nie jest równoważony ich wpływem [84].

Udział poliamin i jonów magnezu w warunkowaniu funkcjonalności kanałów Kir został dobrze udokumentowany. Wykazano, że blokują one por kanału jonowego w sposób zależny od napięcia. Szczególnie podatne na tę regulację są kanały silnie rektyfikujące, takie jak Kir2.x i Kir3.x, które w jej efekcie mogą przewodzić jony K^+ praktycznie wyłącznie do wnętrza komórki. Nieco mniej podatne są kanały Kir4.x, a najmniej kanały słabo rektyfikujące (z pozostałych podrodzin), które w sposób zależny od różnicy potencjałów mogą przewodzić jony K^+ zarówno do wnętrza komórki, jak i w kierunku przeciwnym. Zdolność poliamin i jonów Mg^{2+} do bramkowania kanałów Kir jest uzależniony od liczby ładunków dodatnich, które niosą, stąd skuteczność blokowania układu się wg. poniższej hierarchii: spermina (SPM^{4+}) > spermidyna (SPD^{3+}) > putrescyna (PUT^{2+}) ~ jony magnezu (Mg^{2+}). W warunkach fizjologicznych największą

rolę w bramkowaniu kanałów Kir przypisuje się SPM i SPD, które w cytoplazmie występują w stężeniach mikromolarnych. Cząsteczki te, podobnie jak jony Mg^{2+} wchodzi w interakcję z resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi w świetle kanału oraz w obrębie domen wewnątrzkomórkowych [85]. Różnice między kanałami silnie i słabo rektyfikującymi wynikają z różnic w obsadzeniu kluczowych pozycji w białku, aminokwasami posiadającymi ładunek ujemny (kwas asparaginowy lub glutaminowy), bądź obojętnymi [80].

W ostatnim czasie wykazano, że obecność kanałów z rodziny Kir nie jest obojętna dla aktywności migracyjnej komórek tkankowych. Zahamowanie ekspresji kanału Kir4.2 obniżyło persystencję ruchu mysich embrionalnych fibroblastów (MEF, ang. *mouse embryonic fibroblasts*). Podobny efekt wywierało farmakologiczne zahamowanie funkcji tego kanału. Kolejne eksperymenty wykazały, że wysokiej persystencji ruchu tych komórek może sprzyjać wzmożony rozkład poliamin na krawędzi wiodącej, za sprawą kolokalizacji w tym rejonie enzymu SSAT (acetyltransferazy SPD/SPM) z integryną $\alpha 9\beta 1$. Obniżenie zawartości SPM i SPD w tym rejonie miałyby obniżać bramkowanie kanału Kir4.2, skutkując wzmożonym wypływem jonów K^+ , co miałyby sprzyjać podtrzymaniu procesów tworzenia lamellipodium. Dokładny mechanizm zaobserwowanej korelacji nie został poznany. W komórkach MEF ulegają ekspresji dodatkowo kanały Kir1.1, 2.1, 2.4, 3.2, 3.4, 6.1 i 6.2, które nie były zaangażowane w obserwowane zjawisko, co potwierdzono metodami farmakologicznymi [86]. Prowadzone badania dotyczyły zaangażowania kanałów Kir w spontaniczną migrację. Ich rola w elektrotaksji fibroblastów nie była badana. Szczegółowa charakterystyka wpływu zahamowania ekspresji poszczególnych kanałów z rodziny Kir na reakcję elektrotaktyczną została przeprowadzona z kolei w odniesieniu do ludzkich nieśmiertelnych komórek rogówki (hTCEpi). Korzystając ze specjalnej biblioteki siRNA zahamowano kanały należące do każdej rodziny i wyłącznie zahamowanie genu KCNJ15, kodującego podjednostkę Kir4.2, doprowadziło do niemal całkowitego zniesienia kierunkowości ruchu bez wpływu na jego prędkość. Potwierdzono również znaczenie tego kanału dla elektrotaksji komórek migrujących do anody (spontanicznie nieśmiertelnych keratynocytów ludzkich HaCaT), oraz wykazano metodami farmakologicznymi oraz molekularnymi, że dla obserwowanej reakcji kluczowa jest interakcja kanału Kir4.2 z poliaminami [66]. Powyższe informacje sprawiają, że dokomórkowe prostownicze kanały potasowe Kir mogą być uznawane za potencjalny komponent kluczowy dla reakcji elektrotaktycznej mysich fibroblastów Swiss 3T3 badanych w pracy.

1.4.4. POZOSTAŁE MECHANIZMY DETEKЦИИ POLA ELEKTRYCZNEGO

Poza omówionymi mechanizmami detekcji pola elektrycznego, które posiadają najwięcej zwolenników, proponuje się również alternatywne, które na przestrzeni lat nie uzyskały tak dużego poparcia. Postuluje się między innymi mechanizm, w którym komórki wyczuwają pole niejako wtórnie, gdyż przepływ jonów blisko naładowanego podłoża powoduje ruch pożywki. Pływ ten powstaje na drodze elektroosmozy, gdyż w pożywce znajdują się przeciwnie naładowane jony, które gromadzą się przy podłożu posiadającym określony ładunek. Ich kierunkowy przepływ w kierunku określonej elektrody pociąga za sobą ruch cząsteczek rozpuszczalnika [87]. Na przestrzeni lat sygnalizowano, że odpowiednio nasilony kierunkowy przepływ pożywki może powodować polaryzację i kierunkową migrację komórek tkankowych [88–90]. Hipoteza przypisująca temu zjawisku kluczową rolę w reakcji elektrotaktycznej została jednak zweryfikowana, chociażby przez zmianę ładunku podłoża, w efekcie czego otrzymano przeciwny kierunek przepływu pożywki. Taka manipulacja nie zaburzyła jednak kierunkowej migracji rybich keratocytów do katody. Uważa się również, że płwy generowane polem elektrycznym o fizjologicznym natężeniu mają zbyt niskie natężenie by mogły wywoływać kierunkowy ruch komórek [57].

Dopuszcza się również ewentualność, że pole elektryczne oddziałuje bezpośrednio na niosące ładunek komponenty błony będące mechanosensorymi. Siły elektrostatyczne miałyby prowadzić do odkształcania tych białek, powiązanych z cytoszkieletem bądź posiadających zdolność przenoszenia jonów przez błonę komórkową, wpływając na ich aktywność i prowadząc docelowo do rearanżacji cytoszkieletu. Taki mechanizm mógłby potencjalnie tłumaczyć występowanie szybkich reakcji na pola elektryczne, jednak obliczenia prowadzone w tym obszarze mówią, że siły generowane przez pola o fizjologicznym natężeniu nie są wystarczające do wywołania wspomnianej reakcji [57].

1.5. DYNAMIKA REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ

Nieliczne prace dotyczące reakcji elektrotaktycznej komórek są poświęcone dynamice obserwowanej reakcji. Informacja o czasie potrzebnym do wywołania zauważanej reakcji często jest pomijana lub niewystarczająco eksponowana. Dynamikę procesu bardzo dobrze charakteryzują eksperymenty obejmujące badanie odpowiedzi na zamianę biegunów pola elektrycznego. W przypadkach, gdy pochyłono się nad wspomnianym zagadnieniem, kilkukrotnie

pokazywano, że reakcja zachodząca w odpowiedzi na aplikowane pole elektryczne zachodzi z bardzo dużą dynamiką. Dotyczy to zarówno prawidłowych i nowotworowych komórek tkankowych, jak i wybranych organizmów niższych. W przypadku komórek raka prostaty MAT-LyLu pierwsze zmiany morfologiczne i kierunkowości ruchu były obserwowane w czasie 30 s od zadziałania bodźca [49]. Znaczną dynamikę reakcji zaprezentowano również dla szybko migrujących komórek mięsakoraka Walkera WC256, w przypadku których zwłaszcza komórki sublinii migrującej przez wytwarzanie pęcherzykowatych wypustek reagują na zamianę elektrod w równie krótkim czasie, jak wspomniane komórki raka prostaty [91]. W przypadku wolniej migrujących komórek na uwagę zasługuje natomiast znaczna dynamika zmiany kierunku w odpowiedzi na zamianę elektrod komórek adherentnej frakcji mysiego szpiku kostnego. Pierwsze objawy tej reakcji obserwowano już w czasie krótszym niż 1 min [92].

Jeszcze większą dynamikę procesu obserwowano w badaniach organizmów niższych, takich jak *Amoeba proteus*. W tym przypadku odpowiedź była zauważalna już w czasie 1 s od zamiany elektrod. Dokładnie scharakteryzowano również ilościowo zmiany morfologiczne tych komórek zachodzące w trakcie reakcji i wykazano, że w pierwszej kolejności dochodzi do skurczu po stronie skierowanej do nowej elektrody dodatniej, podczas gdy zmiany po stronie nowej katody zachodzą z pewnym opóźnieniem. Tego typu obserwacje są przydatne w procesie poszukiwania pierwotnego mechanizmu detekcji pola elektrycznego, gdyż pozwalają na powiązanie z potencjalnymi mechanizmami detekcji tego pola i ich lokalizacją w komórce [75].

W świetle powyższych informacji, trudno tłumaczyć występowanie reakcji elektrotaktycznej w skali kilku minut, a tym bardziej kilkudziesięciu lub kilku sekund, mechanizmami uwzględniającymi redystrybucję w płaszczyźnie błony komórkowej białek lub lipidów sygnałowych. Nie można wykluczyć udziału tych zjawisk w kontroli i podtrzymywaniu długotrwałych reakcji na pole elektryczne, jednak pierwotnych mechanizmów detekcji pola elektrycznego należy upatrywać w alternatywnych zjawiskach, przykładowo związanych z potencjałem błony komórkowej i redystrybucją jonów.

1.6. WEWNĄTRZKOMÓRKOWE SZLAKI SYGNALIZACYJNE ZAANGAŻOWANE W REAKCJĘ NA POLE ELEKTRYCZNE

Bodziec elektryczny odebrany na poziomie błony komórkowej musi zostać odpowiednio przetworzony i przesłany w głąb komórki, w celu wywołania rearanżacji cytoszkieletu

komórkowego, prowadzącego do polaryzacji komórki i w efekcie kierunkowej migracji [93]. Większość badań wskazuje na główną rolę cytoszkieletu aktynowego, jako głównego elementu efektorowego odpowiedzialnego za reakcję elektrotaktyczną [18,50,94]. Uważa się, że rola mikrotubul w tym procesie jest mniejsza, jednak z pewnymi wyjątkami. W przypadku komórek szczurzego mięsaka Walkera WC256 funkcjonalny cytoszkielet mikrotubularny sprzyja wyższej kierunkowości ruchu [53]. Dynamiczna rearanżacja mikrotubul jest również konieczna dla wydajnego skręcania stożka wzrostu neuronu w kierunku katody [95].

Powiązanie mechanizmów detekcji pola elektrycznego opartych na zjawiskach fizycznych ze szlakami przekazu sygnału przy udziale białek sygnalizacyjnych bywa kłopotliwe. W przypadku mechanizmu opartego na asymetrycznym rozkładzie białek błonowych (w tym receptorów dla chemoatraktantów), przekaz sygnału związany z kierunkową migracją można tłumaczyć dużo łatwiej. Wynika to z faktu, że zaangażowane są wówczas kaskady sygnalizacyjne typowe dla dobrze poznanej chemotaksji [12]. Zaangażowanie osi PI3K/PTEN w proces polaryzacji komórek i kierunkowej migracji, zwłaszcza na drodze chemotaksji zostało bardzo dogłębnie poznane. W przypadku chemotaksji aktywacja 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) ma miejsce na krawędzi wiodącej komórki, gdzie dochodzi do tworzenia 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₃), stanowiącego miejsce zakotwiczenia w błonie i bodziec aktywujący dla kolejnych białek sygnalizacyjnych, takich jak kinaza Akt [96]. Podobną polaryzację rozkładu PIP₃ obserwowano również w przypadku elektrotaksji. Niezależne badania wykazały gromadzenie tego komponentu po stronie elektrody do której komórka migrowała [66,97]. Kluczowe znaczenie PI3K dla elektrotaksji zostało potwierdzone w przypadku wielu typów komórek tkankowych, m.in. komórek nabłonkowych rogowki czy fibroblastów [64,97,98]. Fosfataza PTEN (ang. *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten*) przeciwdziała aktywności PI3K usuwając grupę fosforanową z pozycji 3' fosfoinozytoli [99]. Przeciwnie niż w przypadku chemotaksji, zahamowanie tej fosfatazy wzmacniało migrację w kierunku katody w przypadku komórek nabłonkowych, zarówno migrujących pojedynczo, jak i w monowarstwie [97]. W modulacji aktywności tej pary enzymów upatruje się dużą szansę w medycynie, zwłaszcza w kontekście poszukiwania metod wspomagających gojenie uciążliwych ran.

Mniej powtarzalne wyniki były prezentowane odnośnie zaangażowania licznych kinaz białkowych o aktywności sygnalizacyjnej. Poszczególne prace wskazywały na zaangażowanie PKC, PKA, ERK, p38, Src lub Akt, a także liczne powiązania między nimi [54,98,100,101].

Przykładowo, w przypadku migrujących w kierunku anody komórek włókniakomięsa HT1080, w odpowiedzi na aplikowane pole elektryczne, przy udziale zlokalizowanej produkcji reaktywnych form tlenu (konkretnie anionorodnika ponadtlenkowego) dochodzi do fosforylacji kinazy ERK i w dalszej kolejności p38 oraz Akt, co leży u podstaw wywołania kierunkowej migracji [102]. Udział wspomnianych reaktywnych form tlenu obserwowano również w katodalej reakcji elektrotaktycznej komórek glejaka oraz mysich keratynocytów [54,103].

Obserwacja zaangażowania wskazanych kinaz w reakcję elektrotaktyczną w wielu przypadkach była traktowana jako potwierdzenie postulowanego mechanizmu receptorowego, gdyż kaskady sygnalizacyjne prowadzące od receptorów błonowych do mechanizmów efektorowych są tak rozbudowane, że zwykle obejmują aktywację białek tego typu. Wyniki te często dotyczyły jednak tylko wybranego typu komórek, stąd trudno przypisywać tym białkom rolę uniwersalnych przekaźników sygnału, odpowiedzialnych za reakcję na pola elektryczne.

Dużo powszechniej wykazywano zaangażowanie białek, które znajdują się niżej w hierarchii przekazu sygnału w komórce i znajdują większe przełożenie na białka efektorowe, takie jak białka towarzyszące aktywie, modulujące dynamikę rearanżacji cytoszkieletu. Wśród tych białek szczególną rolę zajmują małe białka G z rodziny Rho, przełączniki molekularne o aktywności GTPazy, w głównej mierze odpowiedzialne za polaryzację komórki i skoordynowaną przebudowę cytoszkieletu, wywołującą migrację komórek [104,105]. Aktywacja białek tego typu przebiega pod kontrolą czynników wymiany nukleotydów – GEF (ang. *Guanine nucleotide exchange factors*), podczas gdy proces rozkładu GTP jest katalizowany przez czynniki GAP (ang. *GTPase-activating proteins*). Dokładna kontrola przez te elementy, w połączeniu z oddziaływaniem z czynnikami GDI (ang. *guanosine nucleotide dissociation inhibitor*), które utrzymują małe GTPazy w stanie nieaktywnym, pozwala na skoordynowaną aktywację i inaktywację w określonych rejonach komórki i w odpowiedzi na bodźce docierające z zewnątrz [106].

Najlepiej poznano funkcje trzech przedstawicieli tej rodziny białek - RhoA, Rac1 i Cdc42. Pierwsze z nich odpowiada w dużej mierze za skurcz tylnego rejonu komórki, prowadzący do jej translokacji. Jest to realizowane poprzez aktywowanie kinazy ROCK, która następnie oddziałuje na aktywację miozyny, co prowadzi do skurczu sieci aktomiozynowej. Klasyczne eksperymenty wykazały, że aktywacja RhoA odpowiada także za powstawanie w komórce włókien naprężeniowych [107].

Aktywacja dwóch pozostałych białek leży u podstaw tworzenia wypustek migracyjnych na przedzie komórki. Wpływając na aktywację białek towarzyszących aktynie, indukują one ukierunkowaną polimeryzację aktyny i jej usieciowanie [108]. Odpowiedni zestaw aktywowanych białek sprawia, że białko Rac1 odpowiada głównie za tworzenie szerokich, rozplaszczonych wypustek – lamellipodiów, które sunąc po podłożu stanowią podstawową siłę napędzającą ruch mezenchymalny komórek tkankowych. Szczególnie istotna wydaje się być tu aktywacja kompleksu Arp2/3, który pozwala na powstawanie bocznych rozgałęzień filamentów aktynowych i dostarcza licznych miejsc nukleacji, zwiększając dynamikę procesu polimeryzacji [109]. Aktywacja Cdc42 prowadzi z kolei do wytworzenia na przedzie komórki filopodiów, cienkich, nitkowatych wypustek, które mogą odpowiadać za badanie podłoża przed komórką i również determinować kierunek jej ruchu [110]. Najnowsze badania prowadzone z wykorzystaniem biosensorów typu FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) wskazują na występowanie bardziej skomplikowanych zależności pomiędzy poszczególnymi typami białek Rho, a także uwypuklają rolę mniej poznanych dotychczas jej przedstawicieli [111].

Kompleksowe zaangażowanie białek Rho w reakcję na pole elektryczne zostało przedstawione w pracach dotyczących kierowania neuronalnych stożków wzrostu do katody. Badania ujawniły skomplikowane zależności czasowo przestrzenne pomiędzy wszystkimi trzema białkami, aktywację Rac1 i Cdc42 po stronie katodalnej i RhoA po stronie przeciwnej, gdzie wpływa hamująco na rozwój wypustek [112]. Różnice w zaangażowaniu poszczególnych białek Rho zostały z kolei zaprezentowane w badaniach nad reakcją elektrotaktyczną dwóch sublinii mięsakeraka Walkera WC256, prezentujących odmienne strategie migracyjne. Wykazano większe znaczenie Rac1 w reakcji komórek migrujących mezenchymalnie, podczas gdy elektrotaksja komórek migrujących przez wytwarzanie pęcherzykowatych wypustek (ang. *blebbing*) była w większym stopniu zależna od aktywności białek RhoA [91].

2. CEL PRACY

Pomimo licznych badań, mechanizmy leżące u podstaw reakcji elektrotaktycznej komórek zwierzęcych pozostają niewyjaśnione. Ciągłe nieznanym jest sensor, dzięki któremu komórka reaguje na pole elektryczne i rozpoznaje jego polaryzację. W literaturze można wyodrębnić dwa zasadnicze podejścia do wyjaśnienia mechanizmu reakcji komórki na pole elektryczne. Z jednej strony są to poszukiwania białek błonowych, których aktywacja przez pole elektryczne mogłaby powodować rozpoczęcie przesyłania sygnału prowadzącego do kierunkowej migracji komórek. Jako jedną z głównych możliwości bierze się tutaj pod uwagę różnego rodzaju kanały jonowe, ze szczególnym uwzględnieniem kanałów wapniowych. Druga z głównych hipotez zakłada, że reakcja elektrotaktyczna jest wynikiem akumulacji w komórce pod wpływem pola elektrycznego receptorów chemoatraktantów od strony katody lub anody w wyniku elektroforezy lub elektroosmozy. Hipoteza ta nie zakłada zatem istnienia odrębnego sensora reagującego na pole elektryczne. Kluczowe tutaj jest niesymetryczne rozmieszczenie receptorów w wyniku działania pola elektrycznego. Podejście takie nie tłumaczy jednak obserwacji, w których pierwsze widoczne morfologicznie reakcje komórek mają miejsce w bardzo krótkim czasie od zadziałania pola elektrycznego. Z tego względu w poszukiwaniach mechanizmów reakcji elektrotaktycznej bardzo istotne wydaje się być precyzyjne określenie szybkości reakcji komórki na pojawiające się w jej otoczeniu pole elektryczne.

Głównym celem rozprawy było szczegółowe wyznaczenie parametrów opisujących dynamikę reakcji mysich fibroblastów Swiss 3T3 na pole elektryczne o natężeniu odpowiadającym polom występującym w warunkach naturalnych oraz wykazanie czy reakcja elektrotaktyczna tych komórek zależy od aktywności dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych.

W szczególności celem pracy było:

1) Zbadanie dynamiki reakcji komórek 3T3 na pole elektryczne poprzez analizę zachowania komórki niezależnie od strony zwróconej w kierunku anody i katody, w krótkim czasie po włączeniu pola i po zamianie jego biegunów.

2) Określenie roli dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir w elektrotaksji fibroblastów Swiss 3T3.

3) Zbadanie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych w regulacji obserwowanego od strony anody skurczu komórki i występującej od strony katody indukcji tworzenia lamellipodium.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. MATERIAŁY

Wykorzystywane w badaniach materiały zestawiono w poniższych tabelach z uwzględnieniem podziału na typ produktu.

Tabela 1. Płyny hodowlane i bufony

Nazwa odczynnika	Producent
DMEM z niskim stężeniem glukozy (1000 mg/L)	Sigma-Aldrich
DMEM F-12 HAM bez jonów Ca	Sigma-Aldrich
Opti-MEM™ I	Gibco
FluoroBrite™ DMEM	Gibco
Buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS)	Sigma-Aldrich
0,25% trypsyna-EDTA	Sigma-Aldrich
Penicylina/Streptomycyna	Sigma-Aldrich
Doksycykliny hykalan	Sigma-Aldrich
Puromycyna	Sigma-Aldrich
Kanamycyna	Sigma-Aldrich
Płodowa surowica bydlęca (FBS)	Gibco
EGTA	POCH
HEPES	Sigma-Aldrich
Medium LB do hodowli bakterii	A&A Biotechnology

Tabela 2. Przeciwciała i barwniki

Nazwa odczynnika	Producent
Hoechst 3328	Life-Technologies
Fluo-4, AM	ThermoFisher Scientific
Mag-Fluo-4, AM	ThermoFisher Scientific
Królicze poliklonalne przeciwciało IgG Anti-KCNJ15	Abcam(ab200397)
Kozie przeciwciało Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 568)	Abcam (ab175471)
Mysie monoklonalne przeciwciało IgG Anti-GAPDH	Sigma-Aldrich)
Przeciwciało kozie skierowane przeciwko przeciwciału króliczemu sprzęgnięte z HRP	Bio-Rad
Przeciwciało kozie skierowane przeciwko przeciwciału mysiemu sprzęgnięte z HRP	Merck Milipore

Tabela 3. Inne odczynniki

Nazwa odczynnika	Producent
Formaldehyd	POCH
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma-Aldrich
Alkohol etylowy (96% i 99,8%)	POCH
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Albumina bydlęca (BSA)	Sigma-Aldrich
Fluorescence Mounting Medium	Dako Agilent Technologies
Chlorek potasu (KCl)	POCH
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	POCH
Chlorek baru (BaCl ₂)	Sigma-Aldrich
DENSPM	Tocris
Putrescyna	Sigma-Aldrich
Agar bakteriologiczny	BTL sp. z o.o.
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Lipofectamine 3000 Reagent	Invitrogen
Polibren	Sigma-Aldrich
Jonomycyna, sól wapniowa	Life Technologies
Tris-HCl	Lab Empire
Glicyna	Lab Empire
Chlorek sodu (NaCl)	POCH
Koktajl inhibitorów proteaz	Merck Milipore
PhosSTOP	Roche
Azydek Sodiu	POCH
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Fluka Chemie
Akrylamid	Lab Empire
Bis-akrylamid	Lab Empire
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Glicerol	Sigma-Aldrich
Odczynnik Bradforda	Sigma-Aldrich
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Substrat dla HRP Luminata Crescendo Western	Merck Milipore
Plasmid Midi AX – zestaw do izolacji plazmidów	A&A Biotechnology
Colorimetric G-LISA RhoA Activation Assay Biochem Kit	Cytoskeleton, Inc, Nr kat. BK124

Tabela 4. Naczynia i plastiki do hodowli

Nazwa materiału	Producent
Butelki hodowlane 25, 75 cm ²	Corning Falcon
Płytki 6-cio, 12-to, 24-o dołkowe	Corning Falcon
Szalki petriego 100 mm	Corning Falcon
Probówki mrożeniowe	Sarstedt
Probówki plastikowe 50 ml	Corning Falcon
Probówki wirownicze 15 ml	Corning Falcon
Probówki typu eppendorf	Brand

Tabela 5. Inne materiały

Nazwa materiału	Producent
Szkiełka nakrywkowe 60 mm × 35 mm	SZP Przełom w Krakowie
Szkiełka nakrywkowe 10 mm × 60 mm	SZP Przełom w Krakowie
High vacuum grease	DowCorning
Pasta silikonowa H	AG Chemia
Pęsety	Chifa
Strzykawki insulinowe	Polfa Lublin SA
Srebro (folia o grubości 0,25 lub 0,5 mm)	Sigma-Aldrich
Membrana PVDF Immune-Blot®	Bio-Rad

Inhibitory

Wykaz inhibitorów zamieszczono w dalszej części rozdziału (Tabela 7)

3.2. METODY

3.2.1. HODOWLA KOMÓREK

Fibroblasty Swiss 3T3 z wprowadzonym systemem ekspresji Tet-Off zakupione z firmy Clontech (Cat. No. 630914) hodowano w pożywce DMEM z niskim stężeniem glukozy (1000 mg/L), zawierającej 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS) oraz dodatek penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 µg/ml). Wykorzystywano w tym celu plastikowe naczynia hodowlane o powierzchni dna wynoszącej 25 cm² z filtrem w nakrętce, umożliwiającym wymianę gazową. Pasaże wykonywano co 2-3 dni, propagując komórki w takiej liczbie, by przed kolejnym pasażem nie przekroczyły konfluencji 80%. W celu oderwania komórek od podłoża odpłukiwano pozostałości pożywki roztworem PBS bez jonów wapnia i magnezu, a następnie komórki poddawano działaniu roztworu trypsyny (0,25%) i EGTA (0,2 mg/ml) w PBS bez jonów wapnia i magnezu, przez okres 1-2 min w 37°C. Następnie trypsynę inaktywowano pełną pożywką hodowlaną, spłukując dodatkowo komórki z dna w celu ich dokładniejszego oderwania. Odpowiednią objętość zawiesiny komórek przenoszono do nowego naczynia hodowlanego i dopełniano świeżą pożywką hodowlaną, suplementowaną jak uprzednio. Hodowle prowadzono w inkubatorze zapewniającym temperaturę na poziomie 37°C, stężenie CO₂ równe 5% i wilgotność 95%.

W przypadku bankowania, po inaktywacji trypsyny zawiesinę dodatkowo przenoszono do probówek plastikowych i wirowano (5 min, 200 g), po czym pelet komórek zawieszano w medium mrozeniowym zawierającym 20% pełnej pożywki, 10% DMSO i 70% bydlęcej

surowicy płodowej. Taką zawiesinę przenoszono do probówki mrożeniowej i umieszczano w zamrażarce zapewniającej temperaturę -80°C . W celu dłuższego przechowywania, banki przenoszono do ciekłego azotu.

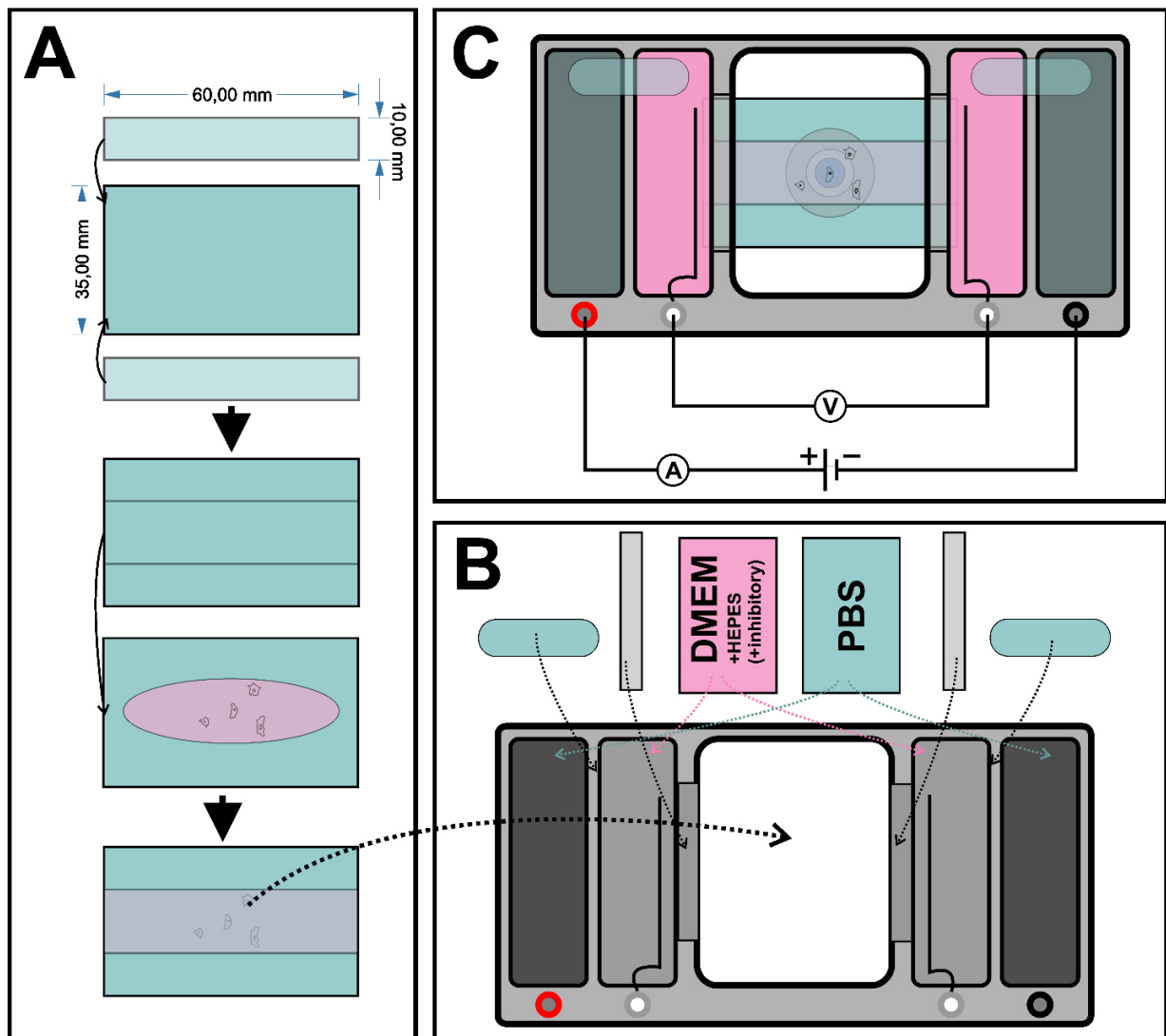
Rozpoczynanie hodowli ze sporządzonych banków obejmowało przeniesienie szybko rozmrożonej zawiesiny komórek do probówki plastikowej, wirowanie (5 min, 200 g), a następnie zawieszenie w świeżej pożywce i przeniesienie do naczynia hodowlanego, gdzie komórki dopełniano odpowiednią objętością pożywki. Po upływie 1-2 h (zależnie od kondycji komórek) pożywkę ponownie wymieniano na świeżą, pozostawiając w naczyniu komórki, które w tym czasie uległy adhezji. W ten sposób usuwano nieliczne komórki, które nie przeżyły procesu bankowania.

3.2.2. BADANIE REAKCJI KOMÓREK NA POLE ELEKTRYCZNE

Szkiełka o wymiarach $60 \times 35 \times 0,2$ mm z wyprzedzeniem czyszczono alkoholem etylowym o stężeniu 96%, po czym umieszczano w temperaturze 120°C na czas min. 2 h. Tak przygotowane szkiełka przenoszono do jałowej szalki plastikowej o średnicy 100 mm. Dzień przed planowanym eksperymentem na przygotowane uprzednio szkiełka wysiewano po 1×10^4 komórek zawieszonych w pełnej pożywce. Podłużną kroplę o objętości 400 μl nakładano na środek szkiełka. Zamkniętą szalkę ze szkiełkiem umieszczano w inkubatorze.

W dniu eksperymentu przygotowywano drugą połowę wewnętrznej komory elektrotaktycznej (pierwszą stanowiło szkiełko z wysianymi komórkami), z analogicznego, wyczyszczonego uprzednio szkiełka o wymiarach $60 \times 35 \times 0,2$ mm i dwóch szkiełek o wymiarach $60 \times 10 \times 0,2$ mm (Ryc. 2 A). Te ostatnie, węższe szkiełka oklejano z dwóch stron taśmą klejącą dwustronną i przytwierdzano do skrajów szkiełka szerokiego. Tak przygotowany element przyklejano od góry do szkiełka z wysianymi komórkami i dopełniano pełną pożywką, starannie i delikatnie, aby uniknąć uszkodzenia mechanicznego komórek i powstawania pęcherzyków powietrza.

Tak przygotowaną wewnętrzną komorę szklaną montowano w komorze zewnętrznej z PVC (Ryc. 2 B), wykorzystując w tym celu termoprzewodzącą pastę silikonową typu H. Idealnie gładką warstwę tej pasty nanoszono na szkielec komory w miejscach styku z komorą szklaną przy użyciu metalowej szpatułki. Komorę domykano grodziami z PVC, a następnie dopełniano pozostałe nieszczelności wspomnianą pastą silikonową.



Rycina 2. Budowa i proces składania układu do stymulacji komórek polem elektrycznym.

A. Elementy i proces składania wewnętrznej (szklanej) komory elektrotaktycznej.

B. Elementy i proces montowania właściwej komory elektrotaktycznej z PVC.

C. Schemat obrazujący budowę kompletnego układu do badania reakcji elektrotaktycznej komórek.

Szczegółowy opis wszystkich elementów i etapów zamieszczono w tekście. (na podstawie [113] – zmienione).

Wewnętrzne przedziały komory (połączone opisaną powyżej komorą szklaną), wypełniano pełną pożywką hodowlaną (po 7 ml), podczas gdy zewnętrzne rynienki zawierające elektrody chloro-srebrowe ($\text{Ag}|\text{AgCl}$, $7,5 \text{ cm}^2$) dopełniano roztworem PBS (po 10 ml). Łączność między kompartmentami zewnętrznymi i wewnętrznymi zapewniały zastosowane szklane klucze elektrolityczne o długości 8 cm, wypełnione agarem (2% w 0,5 M KCl), których dodatkową rolą było zatrzymywanie szkodliwych produktów ubocznych powstających w czasie pracy elektrod.

Źródło prądu stanowił zasilacz prądu stałego (Apelex), połączony przewodami miedzianymi z gniazdami zlokalizowanymi przy zewnętrznych kompartmentach (Ryc. 2 C). Parametry prądu były stale monitorowane przy użyciu dwóch multimetrów DVM1000 (Velleman), z których jeden, wpięty pomiędzy zasilaczem a komorą elektrotaktyczną służył do pomiaru natężenia prądu, podczas gdy drugi osobnymi przewodami połączony był z osobnymi elektrodami pomiarowymi w wewnętrznych kompartmentach, umożliwiając w ten sposób ciągły pomiar napięcia pomiędzy skrajnymi obszarami wewnętrznej komory elektrotaktycznej. Taki układ pozwalał na aplikację stałych pól elektrycznych o natężeniu 0,5-4 V/cm, stabilnych przez cały czas trwania eksperymentu. W razie potrzeby, możliwa była szybka zamiana orientacji elektrod poprzez odwrócenie kierunku przepływu prądu na skutek zmiany podłączenia przewodów do zasilacza.

3.2.3. POKŁATKOWA REJESTRACJA OBRAZU

W celu wykonania wszelkich analiz ruchu komórek Swiss 3T3 przeprowadzono pokłatkową rejestrację obrazu wykorzystując w tym celu układy mikroskopowe sprzęgnięte z kamerami cyfrowymi i komputerem. Większość eksperymentów przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu Leica DM IL LED wyposażonego w kamerę CMOS Moticam 3 (Motic) pracującą pod kontrolą programu do sekwencyjnej akwizycji obrazu Motic Image Plus 2.0. Układ ten umożliwiał rejestrację obrazu przy użyciu suchych obiektywów o powiększeniu 10× i 20×, przy zastosowaniu zintegrowanego kontrastu modulacyjnego (TL-IMC). Odpowiednie warunki do migracji komórek były zapewnione przez wyposażenie mikroskopu w komorę klimatyczną sprzęgniętą z układem grzewczym. Podczas eksperymentów utrzymywano temperaturę równą 37°C. Każdorazowo system grzewczy włączano z wyprzedzeniem przynajmniej 1 h, aby zapewnić możliwie dobrą stabilizację temperatury i uniknąć niepożądanych konsekwencji, wynikających z termicznego wpływu ogniskowej. Wspomniany układ nie był wyposażony w system dostarczający CO₂, stąd pożywkę wzbogacano każdorazowo w układ buforujący HEPES (15 mM).

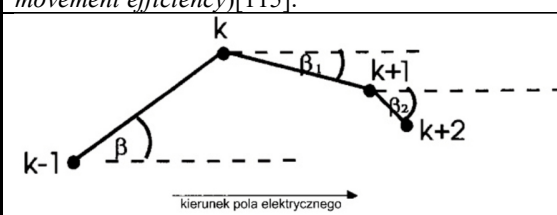
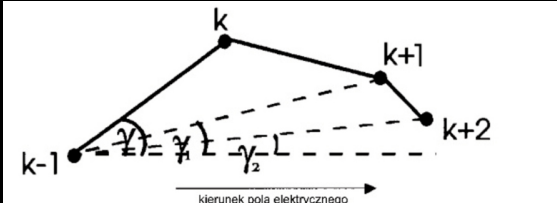
Migrację komórek rutynowo rejestrowano przez okres 4 h i 30 min z krokiem czasowym 30 s. W eksperymentach uwzględniających stymulację komórek polem elektrycznym, pierwsze 30 min poprzedzało aplikację pola, podczas gdy kolejne 4 h obejmowały okres po jego włączeniu. Poprzez odpowiednie podłączanie przewodów i ujednoczone ustawienie obrazu, każdorazowo lokalizowano biegun ujemny pola elektrycznego (katodę) po prawej stronie pola widzenia.

Uzyskane serie zdjęć były poddawane wstępnej obróbce w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114], co miało na celu wyeliminowanie dryfu obrazu wywołanego drganiami pochodzącymi z otoczenia lub wynikającymi ze zmian termicznych, dostosowanie zakresu dynamicznego uzyskanych obrazów i wyeliminowanie niejednorodnego zaciemnienia obrazu, będącego immanentną cechą zastosowanego kontrastu modulacyjnego.

3.2.4. ANALIZA ILOŚCIOWA MIGRACJI KOMÓREK

Migrację komórek analizowano w programie Hiro 1.0.0.4v (W. Czapla) wyznaczając manualnie położenie geometrycznego środka komórki z krokiem czasowym wynoszącym 5 minut. Z tak wyznaczonych punktów program tworzył trajektorie ruchu komórek, które po sprowadzeniu położenia początkowych do wspólnego punktu, uformowały przedstawione w pracy wykresy kołowe. Wprowadzone dane posłużyły również do wyznaczenia przez program parametrów charakteryzujących ilościowo ruch badanych komórek. Parametry te scharakteryzowano w Tabeli 6. Liczbę komórek analizowaną w każdym z eksperymentów zamieszczono w odpowiednich tabelach przedstawiających uśrednione wyniki.

Tabela 6. Wykaz i charakterystyka parametrów definiujących własności ruchowe badanych komórek

Parametr [jednostka]	Charakterystyka	
Prędkość migracji [$\mu\text{m}/\text{min}$]	Parametr określający rzeczywistą prędkość ruchu komórek, powstały z podzielenia całkowitej długości przebytej drogi przez czas trwania eksperymentu.	
Droga całkowita [μm]	Długość trajektorii łączącej wszystkie wyznaczone położenia geometrycznego środka komórki.	
Przemieszczenie całkowite [μm]	Długość odcinka łączącego położenie początkowe i końcowe komórki.	
Prędkość przemieszczenia [$\mu\text{m}/\text{min}$]	Wartość przemieszczenia całkowitego podzielona przez czas trwania eksperymentu.	
CME	Parametr powstały z podzielenia przemieszczenia całkowitego i drogi całkowitej, określający efektywność ruchu komórki (ang. <i>coefficient of movement efficiency</i>)[115].	
Cosinus β		<p>k – położenie komórki w punkcie czasowym; Wartość średnia dla populacji równa: 1 – oznacza wypadkową migrację w prawo, -1 – migrację w lewo, 0 – migrację w losowym kierunku [75]</p>
Cosinus γ		

3.2.5. ANALIZA MORFOLOGII I ORIENTACJI KOMÓREK

Analizę opartą na manualnych obrysach komórek sporządzonych na końcowych klatkach zarejestrowanych poklatkowo serii zdjęć w poszczególnych warunkach. W tym celu wykorzystano program Migra 1.0 i tablet graficzny Bamboo One (Wacom), co usprawniło proces wprowadzania możliwie dokładnych obrysów komórek. Na podstawie wprowadzonych danych program wyznaczył parametry charakteryzujące wydłużenie komórek (elongację) i ich orientację względem linii pola elektrycznego. Wartość elongacji przyjmuje wartość 0 dla obiektów idealnie okrągłych i wykazuje wzrost wraz z postępowaniem asymetrii między długą i krótką osią komórki [116]. Orientację przedstawiono w stopniach między długą osią komórki a liniami pola elektrycznego.

3.2.6. ANALIZA DYNAMIKI REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ

Przeprowadzono analizę dynamiki pierwotnej reakcji na aplikowane pole elektryczne oraz na zamianę elektrod wywołującą nawrót komórek. W pierwszym przypadku eksperyment wykonywano analogicznie jak opisano poprzednio (3.2.3), tj. po 30 min w warunkach izotropowych aplikowano pole elektryczne o określonym natężeniu. W przypadku badania dynamiki nawrotu, po 2 h aplikacji pola z katodą zlokalizowaną po prawej stronie pola widzenia dokonywano zamiany kierunku przepływu prądu i obraz rejestrowano przez kolejne dwie godziny. Zależnie od prezentowanego zjawiska do analizy ilościowej wybierano klatki z różnego okresu przed i po zdarzeniu, bądź analizowano całość materiału.

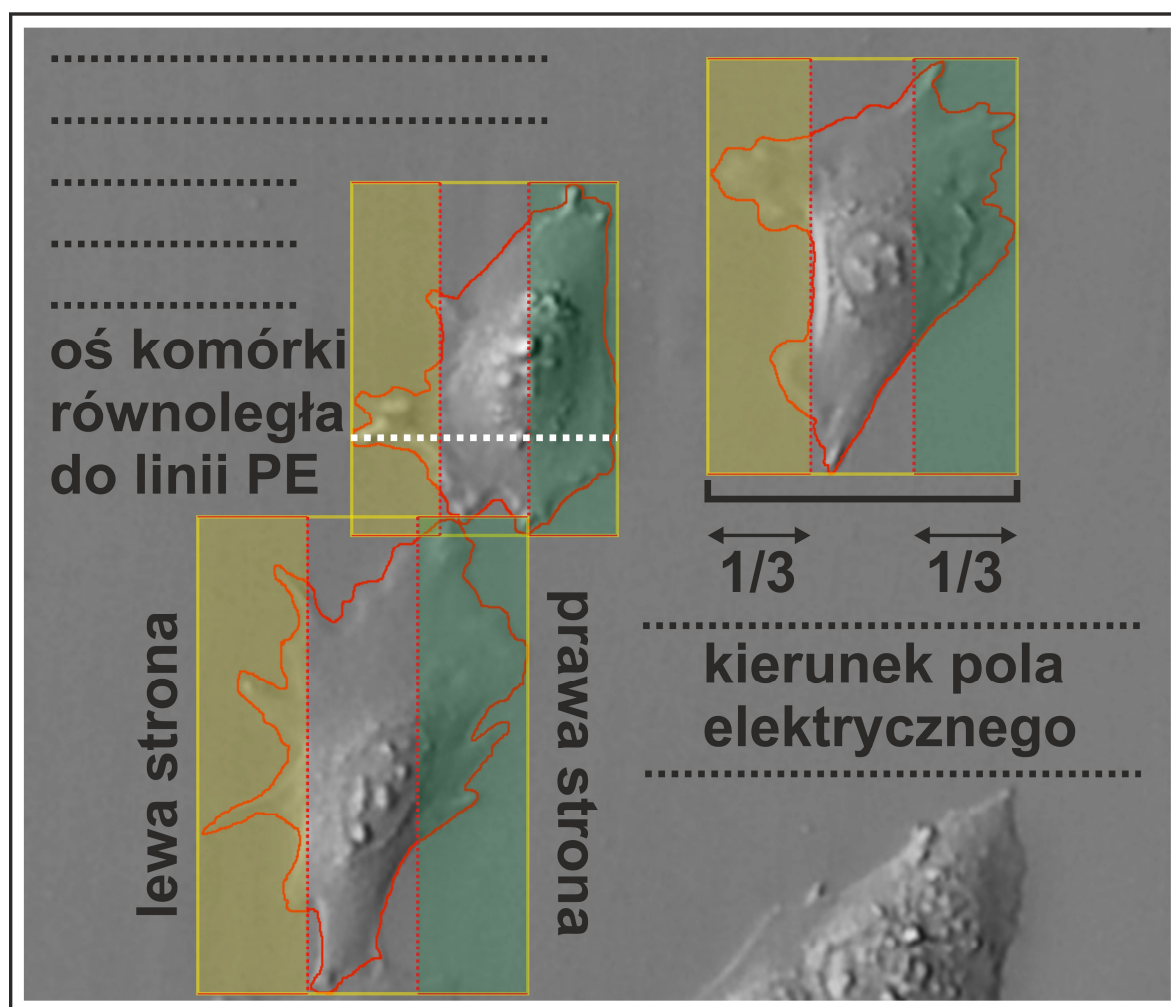
3.2.6.1. OPARTA NA ZMIANACH KOSINUSA KIERUNKOWEGO

Filmy analizowano w programie Hiro 1.0.0.4v (W. Czaplą) jak poprzednio (3.2.4), a następnie wykorzystując makro działające w programie Excel 2016 (Microsoft), wyodrębniano z uzyskanych danych liczbowych fragmenty dotyczące poszczególnych przedziałów czasu, które stanowiły obiekt zainteresowania. Z takich danych program Hiro wyznaczał parametry ilościowe charakteryzujące kierunkowość ruchu w badanym przedziale czasu. Charakterystykę długości okresów w poszczególnych eksperymentach zamieszczono w opisach rycin.

3.2.6.2. OPARTA NA ZMIANACH OBRYŚÓW KOMÓREK

Dynamikę reakcji na pole elektryczne przedstawiano graficznie, sporządzając na zdjęciach wykonanych w wybranych punktach czasowych obrysy, które następnie nakładano na siebie i wyznaczano na ich podstawie obszary podłoża, które w określonym przedziale czasu zostały

przez komórkę pokryte na skutek wytwarzania wypustek migracyjnych (zielony kolor na zdjęciach) i obszary podłoża zwolnione na skutek retrakcji (czerwony kolor na zdjęciach). Wykorzystano w tym celu zdjęcia wykonane zgodnie z opisaną procedurą (3.2.3; 3.2.6). Analizę obrazów przeprowadzono w programie Corel PaintShop Pro X9 (Corel Corporation), korzystając z tabletu graficznego Bamboo One (Wacom).



Rycina 3. Sposób podziału powierzchni komórek na potrzeby analizy ilościowej dynamiki reakcji elektrotaktycznej.

Podziału tą metodą dokonywano w punkcie czasowym właściwym dla momentu aplikacji pola elektrycznego lub zamiany elektrod. Komórki dzielono na stronę prawą i lewą, które obejmowały po 1/3 długości osi równoległej do linii pola. Analizowano niezależnie powierzchnię komórki zlokalizowaną w tych obszarach.

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej, poklatkowe serie zdjęć wykonane zgodnie z wcześniejszym opisem (3.2.3) poddawano dalszej obróbce w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114], gdzie przy użyciu specjalnie sporządzonego w tym celu makra dokonywano wyodrębnienia z uzyskanych zdjęć ich fragmentów, przedstawiających obszary komórek

stanowiące ich „prawą i lewą stronę”. Polegało to na podziale komórki wzdłuż jej osi równoległej do linii pola na podstawie punktu czasowego „0 min”, tj. moment włączenia prądu w przypadku reakcji pierwotnej i moment zamiany biegunów w przypadku analizy nawrotu. Dla każdej komórki wyodrębniano obszar obejmujący 1/3 jej osi równoległej do linii pola elektrycznego we wskazanym punkcie. Zasadę podziału komórek przedstawiono na rycinie 3. Następnie takie serie zdjęć dla okresu przed i po zdarzeniu analizowano w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114], korzystając z tabletu graficznego. W wyniku analizy uzyskiwano informację dotyczącą powierzchni badanych obszarów eksponowanych w kierunku katody i anody co pozwoliło na analizę zmian tych wielkości w czasie i ocenę dynamiki reakcji pierwotnej, jak i odpowiedzi na zamianę elektrod.

3.2.7. OBRAZOWANIE BIAŁEK WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Obrazowanie dynamiki cytoszkieletu aktynowego i winkuliny podczas odpowiedzi elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3 przeprowadzono przy użyciu metod mikroskopii fluorescencyjnej i komórek z wprowadzonymi odpowiednimi konstruktami genetycznymi.

3.2.7.1. NAMNAŻANIE PLAZMIDÓW I TRANSFEKCJA KOMÓREK

W eksperymencie wykorzystano plazmidy mEmerald-Vinculin-23 (Addgene plasmid # 54302) i pCMV LifeAct-TagGFP2 (Ibidi), które namnażano w bakteriach szczepu DH5-alpha *E. coli* w medium LB z dodatkiem kanamycyny (30 µg/ml). Plazmidy izolowano i oczyszczano przy użyciu zestawu Plasmid Midi AX (A&A BIOTECHNOLOGY), zgodnie z protokołem. Pomiaru stężenia DNA wykonano przy użyciu urządzenia pomiarowego NanoPhotometer (Implen).

Plazmidy do komórek wprowadzano przy użyciu odczynnika Lipofectamine 3000 Reagent zgodnie z dołączonym do niego protokołem. Komórki w liczbie 5×10^4 na dołek płytki 24-dołkowej wysiewano 24 h przed transfekcją. Następnie do każdego dołka aplikowano pożywkę Opti-MEM zawierającą lipopleksy uformowane z 1 µl odczynnika i 500 ng DNA. Po 6h pożywkę wymieniano na pełną pożywkę hodowlaną. Kolejną wymianę pożywki na świeżą przeprowadzono po 24 h od transfekcji, a następnie komórki przesiewano do naczyń hodowlanych oraz na szkiełka komór elektrotaktycznych. Obrazowanie rozpoczynano po 48 h od transfekcji i kontynuowano przez 3-5 kolejnych dni, kiedy ekspresja konstruktów utrzymywała się na zadowalającym poziomie.

3.2.7.2. REJESTRACJA OBRAZÓW FLUORESCENCYJNYCH – MIKROSKOPIA

EPIFLUORESCENCYJNA I TIRF

Wysiewanie komórek, montowanie komory elektrotaktycznej oraz aplikację pola elektrycznego prowadzono zgodnie z procedurami opisanymi uprzednio (3.2.2), jednakże począwszy od zmontowania szklanej komory, stosowano pożywkę DMEM FluoroBrite, wolną od czerwieni fenolowej i ograniczającą autofluorescencję. Obrazowanie komórek prowadzono przy użyciu zmotoryzowanego, odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B, wyposażonego w komorę inkubacyjną zapewniającą temperaturę 37°C i CO₂ w stężeniu 5% przez cały czas trwania eksperymentu. Zdjęcia wykonywano przy użyciu kamery CCD Leica DFC360FX lub bardzo czulej kamery EM-CCD Hammamatsu C9100-02. Mikroskop pracował pod kontrolą programu LasX 1.9. Obraz rejestrowano jednocześnie w standardowej epifluorescencji, gdzie źródło światła stanowił oświetlacz metalo-halogenkowy Leica EL6000, a także w trybie mikroskopii fluorescencyjnej całkowitego wewnętrznego odbicia TIRFM (ang. *Total Internal Reflection Microscopy*), z źródłem światła w postaci lasera diodowego. Stosowano linię lasera o długości 488 nm, co w połączeniu z wykorzystaniem obiektywu HC PL APO 100x/1.47 OIL i specjalnego olejku immersyjnego Typu F, pozwalało na selektywne wzbudzenie fluorochromów przy głębokości penetracji wynoszącej 110 nm. Każdorazowo stosowano kostkę filtrową GFP-T ET (BP 470/40; 495; BP 525/50). Obraz rejestrowano z krokiem wynoszącym 1 min. W przypadku dużych bądź bardzo ruchliwych komórek stosowano tryb obrazowania umożliwiający sekwencyjną rejestrację kilku przylegających do siebie pól widzenia i późniejsze składanie w jeden wspólny obraz.

3.2.7.3. ANALIZA DYNAMIKI CYTOSZKIELETU AKTYNOWEGO

Zarejestrowane serie zdjęć analizowano w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114], dzieląc komórki w sposób analogiczny jak poprzednio (3.2.6.2). Następnie uzyskane obrazy poddawano automatycznej analizie ilościowej przy użyciu napisanego w tym celu makra. Umożliwiało ono pomiar zmian powierzchni i średniej intensywności fluorescencji, co pozwoliło wyznaczyć całkowitą intensywność fluorescencji emitowanej przez obszar komórki eksponowany do określonej elektrody. W związku z zastosowaniem w badaniach komórek wykazujących ekspresję białka LifeAct-GFP, wartość ta jest proporcjonalna do ilości F-aktyny obecnej na danym obszarze. Analiza zmian tych wartości w czasie pozwala wyznaczyć dynamikę cytoszkieletu aktynowego po stronie skierowanej do bieguna dodatniego i ujemnego pola elektrycznego.

3.2.7.4. ANALIZA DYNAMIKI KONTAKTÓW ZOGNISKOWANYCH

W eksperymencie obrazowano komórki Swiss 3T3 wykazujące ekspresję EmGFP-winkuliny, jednocześnie w epifluorescencji i TIRF (3.2.7.2). Dla zobrazowania zachodzących w komórce zmian rozkładu kontaktów zogniskowanych wykonano serie zdjęć powstałych z nałożenia różnobarwnych zdjęć z wybranych punktów czasowych. Następnie pozyskane serie zdjęć analizowano w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114], w oparciu o obrazy epifluorescencyjne, dzieląc komórki w sposób analogiczny jak poprzednio (3.2.6.2), po czym z obrazów wyodrębniono obszar komórki zlokalizowany w paśmie 2,5 μm od jej skraju. Pozyskane maski wykorzystano do analizy obrazów wykonanych techniką TIRF, które wcześniej przetworzono w obrazy różnicowe, pokazujące względne zmiany rozkładu winkuliny pomiędzy kolejnymi punktami czasowymi. Zdjęcia te uzyskano odejmując od zdjęcia z czasu „T” poprzedzające je zdjęcie „T-1”, z utworzeniem 32-bitowych obrazów, gdzie piksele mogą przyjmować wartości zarówno dodatnie, jak i ujemne. Pomiar średniej intensywności obrazu na tak przetworzonych zdjęciach pozwolił na selektywną i bardzo czułą analizę dynamiki kontaktów zogniskowanych zlokalizowanych wyłącznie na skraju komórki w odpowiedni na aplikację pola elektrycznego i zamianę jego biegunów. Schemat przeprowadzonej analizy zamieszczono na rycinie 4.

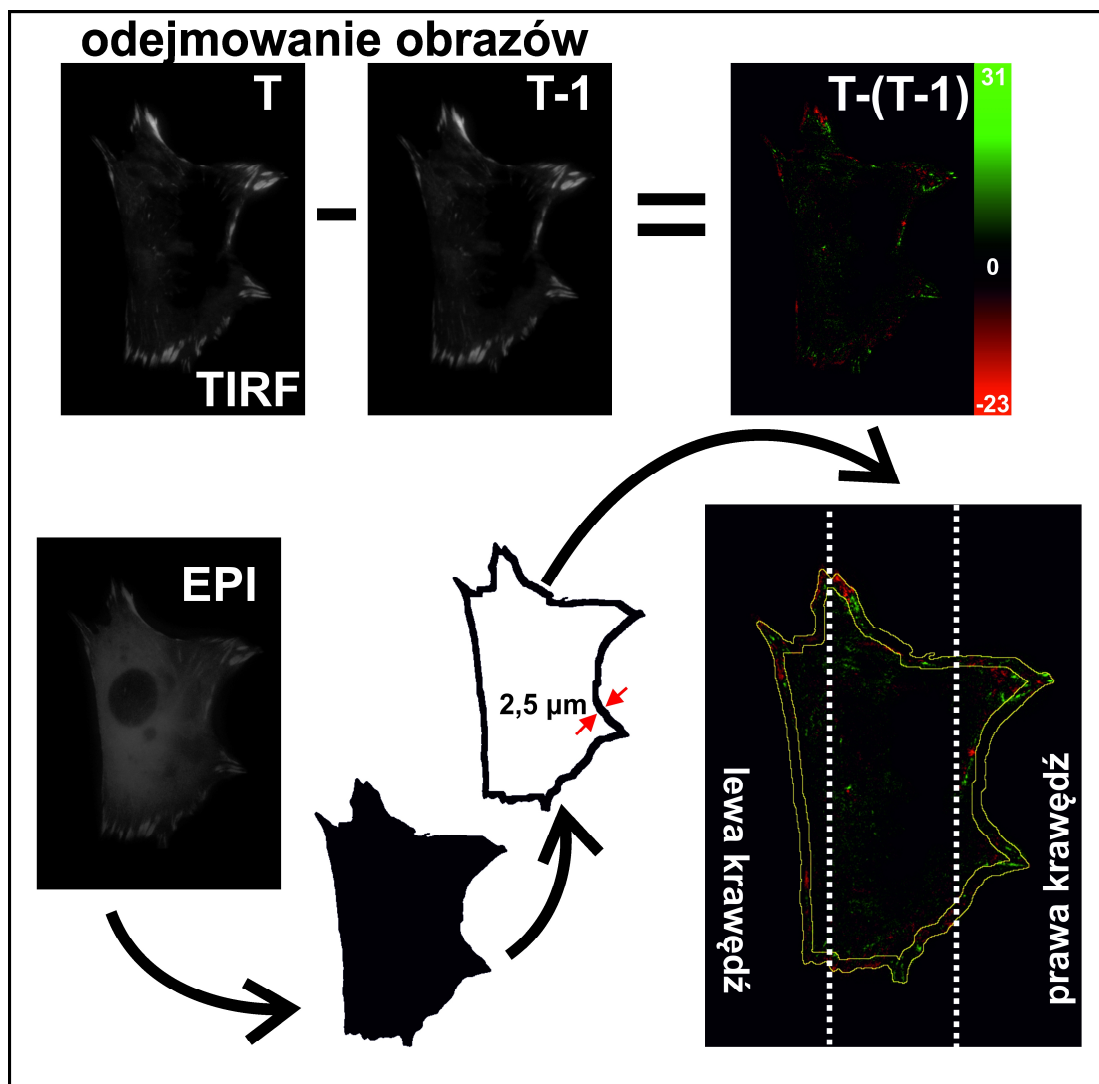
3.2.8. BADANIE UDZIAŁU KANAŁÓW KIR W REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ

W celu oceny zaangażowania dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych w reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3 wykorzystano szereg metod prowadzących do ich unieczynnienia lub zmiany funkcjonowania.

3.2.8.1. FARMAKOLOGICZNE MODYFIKACJE FUNKCJONOWANIA KANAŁÓW KIR

Funkcjonowanie całej rodziny dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir hamowano stosując chlorek baru (BaCl_2) w stężeniu 100 i 500 μM . Jony baru w tym stężeniu hamują funkcjonowanie kanałów Kir, nie wywierając wpływu na pozostałe typy kanałów potasowych [117]. Wpływ na mechanizmy regulacyjne kanałów Kir badano zmieniając zawartość wewnątrzkomórkowych poliamin. W tym celu komórki preinkubowano przez 48h ze związkiem DENSPM ($\text{N}^1, \text{N}^{11}$ -diethylnorsperminy tetrahydrochlorek) w stężeniu 25 μM , który jest wydajnym aktywatorem enzymu acetylotransferazy SPM/SPD (SAT/SSAT), prowadząc do obniżenia poziomu sperminy i spermidyny w komórkach [118]. Przeciwny efekt uzyskiwano preinkubując

komórki z putrescyną w stężeniu 100 μM . Związek ten jest prekursorem dla tworzenia sperminy i spermidyny [86]. Dalsze fazy eksperymentów, takie jak wysiewanie komórek, montowanie komory elektrotaktycznej i rejestrację poklatkową obrazu prowadzono zgodnie z opisaną procedurą (3.2.2-3.2.4).



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie kroków podjętych w trakcie analizy dynamiki kontaktów zogniskowanych.

W toku eksperymentu wytworzono obrazy różnicowe zmian rozkładu winkuliny na zdjęciach uzyskanych techniką TIRF pomiędzy kolejnymi krokami czasowymi. Obszary, w których następował spadek zawartości winkuliny na przestrzeni kroku czasowego wynoszącego 1 min przyjmowały wartości ujemne (czerwony kolor na zdjęciu). Przyrost poziomu winkuliny w danym punkcie przekładał się na wartości dodatnie (zielony kolor na zdjęciu). Analizę ilościową prowadzono w oparciu o maskę wytworzoną na bazie zdjęcia epifluorescencyjnego. Dokonywano pomiaru intensywności w prawym i lewym obszarze skrajnym komórki, w odległości 2,5 μm od jej krawędzi. Szczegółowy opis metody zamieszczono w tekście.

W ramach modyfikacji funkcjonowania kanałów Kir, komórki poddawano również działaniu podwyższonego stężenia jonów Mg^{2+} w pożywce. Jony te, wspólnie z poliaminami SPM

i SPD, biorą udział w bramkowaniu kanałów Kir [84]. W tym celu do pożywki wprowadzano bezwodny $MgCl_2$ do uzyskania finalnego stężenia jonów Mg^{2+} wynoszącego 10 mM. Taką pożywkę wprowadzano do komory elektrotaktycznej na etapie jej składania, zarówno do wnętrza szklanej komory, jak i wewnętrznych rynienek.

3.2.8.2. ANALIZA CYTOMETRYCZNA – JONY Mg^{2+}

Wpływ egzogenego podania jonów magnezu na ich stężenie w komórkach potwierdzono stosując analizę cytometryczną komórek wybarwionych wskaźnikiem poziomu tych jonów. W tym celu komórki w liczbie 1×10^5 ładowano w zawieszynie wskaźnikiem mag-fluo-4, AM (3 μM) przez 20 min w temperaturze 37°C, następnie płukano trzykrotnie w PBS bez jonów wapnia i magnezu (przez zawieszenie i odwirowanie, 3 min 200 g), a następnie zawieszono w pożywce DMEM FluoroBrite z 2% FBS oraz takiej samej pożywce z podniesioną do 10 mM zawartością jonów Mg^{2+} . Analizę cytometryczną prowadzono za pomocą cytometru przepływowego LSRFortessa (Becton Dickinson) oceniając przyrost intensywności fluorescencji w kanale zielonym. Pozyskane dane analizowano w programie Flowing Software 2.5.1 i przedstawiono w postaci histogramu.

3.2.8.3. UZYSKANIE KOMÓREK Z ZAHAMOWANĄ EKSPRESJĄ GENU KCNJ15

Wektory lentiwirusowe zawierające shRNA specyficzne dla mysiego kanału jonowego KCNJ15 oraz kodujące GFP przygotowano z użyciem linii pakującej HEK293T/17 (ATCC), do której wprowadzono plazmid ekspresyjny piLenti-siRNA-GFP (ABM Nr kat. i033064) oraz plazmidy pakujące psPAX2 i pMD2G (Addgene, odpowiednio: #12260 oraz #12259), stosując odczynnik transfekcyjny Lipofectamine2000 według procedury dołączonej przez producenta. Wektory kontrolne, wykazujące ekspresję shRNA nietargetującego lub tylko białka GFP, przygotowano z użyciem plazmidów pLKO1-shRNA-non target (Sigma-Aldrich), otrzymanego dzięki uprzejmości Pani Dr Katarzyny Miękus z Zakładu Biochemii Ogólnej, WBBiB UJ oraz plazmidu pEGIP (Addgene #26777). Supernatant zawierający infekcyjne cząstki wektorów wirusowych zbierano z komórek pakujących 36 h po transfekcji, wirowano z prędkością 300 g przez 10 min. w 4°C, w celu usunięcia fragmentów komórek, a następnie filtrowano przez filtr o wielkości porów 0,22 μm (PVDF; Millipore) i przechowywano w zamrażarce w -80 °C. W celu określenia miana wirusa, komórki linii HEK293T/17 transdukowano z użyciem 1, 10 i 100 μl supernatantu i po 24 h od transdukcji mierzono odsetek komórek GFP-pozytywnych, za pomocą cytometru przepływowego LSRFortessa (Becton Dickinson). Do obliczenia miana wirusa zastosowano wzór: % komórek GFP+ \times liczba komórek transdukowanych \times współczynnik

rozcieńczenia/ objętość wirusa użyta do transdukcji (w ml). Komórki Swiss 3T3 transdukowano wektorami lentiwirusowymi stosując 15 cząstek infekcyjnych na komórkę. W celu transdukcji, 2×10^4 komórek Swiss 3T3 wysiano na płytkę 24-dolkową i po 24 h usuwano pożywkę hodowlaną, płukano komórki roztworem PBS i dodano 400 μ l pożywki do transdukcji (DMEM z niską zawartością glukozy z dodatkiem 1% FBS), zawierającą lentiwirusy oraz polibren (10 μ g/ml). Następnie, komórki wirowano z prędkością 800 g przez 30 min w temp. 32 °C, po czym do pożywki dodano FBS do końcowego stężenia 10%. Komórki inkubowano z wirusami przez noc w 37 °C, a następnie usunięto pożywkę zawierającą wektory lentiwirusowe i komórki hodowano w standardowej pożywce. Aby uzyskać linie komórek stabilnie transdukowanych, komórki Swiss 3T3 poddano selekcji antybiotykowej, stosując 10 μ g/ml puromycyny, na której gen oporności znajdował się we wprowadzonych wektorach. Selekcję prowadzono przez 2 dni, a obecność wyłącznie GFP-pozytywnych komórek potwierdzono stosując mikroskopię fluorescencyjną.

3.2.8.4. ANALIZA WESTERN-BLOT

W celu sporządzenia lizatów na potrzeby analizy Western-blot z naczynia hodowlanego zebrano 1×10^6 komórek, które po dwukrotnym odpłukaniu w zimnym roztworze PBS bez jonów wapnia i magnezu (wirowanie 5 min, 200 g) zawieszono w schłodzonym wcześniej buforze lizującym z zawartością inhibitorów proteaz, po czym umieszczono na lodzie. Po 20 minutach inkubacji komórki homogenizowano przy użyciu strzykawki insulinowej z igłą i wirowano w probówce typu eppendorf (10 minut, 4°C, 4000 g). Środkową frakcję powstałą na skutek wirowania przenoszono do świeżej probówki i mrożono do czasu podjęcia dalszej obróbki. Niewielką objętość lizatu przeznaczano na pomiar stężenia białka metodą Bradforda. Pomiaru absorbancji światła o długości 595 nm dokonywano używając spektrofotometru Multiskan™ FC (Thermo Scientific). Dokładne stężenia białka uzyskiwano odnosząc wynik do pomiarów krzywej standardowej wykonanej dla roztworów BSA (albuminy bydlęcej, ang. *bovine serum albumin*) o znanym stężeniu.

W celu przeprowadzenia rozdziału białek przygotowano żel poliakrylamidowy - rozdzielający 10% (30% akrylamid/bisakrylamid 1,65 ml; 10% SDS 50 μ l; 1,5 M Tris-HCL pH = 8,8 1,25 ml; H₂O 2,05 ml; 0,15% błękit bromofenolowy 0,3 ml; TEMED 2,5 μ l, 10% APS 25 μ l) i zagęszczający 4,5% (30% akrylamid/bisakrylamid 325 μ l; 10% SDS 25 μ l; 0,5 M Tris-HCL pH = 6,8 625 μ l; H₂O 1,5 ml; TEMED 7,5 μ l, 10% APS 22,5 μ l). Na studzienki nakładano objętości lizatów zawierające po 50 μ g białka, zmieszane z buforem obciążającym, oraz marker białkowy.

Elektroforezę prowadzono w warunkach denaturujących (25 mM Tris, 0,2 M glicyna, 0,5% SDS), stosując stałe napięcie prądu (200 V) przez 45 minut. Następnie przeprowadzono mokry transfer białek (25 mM Tris, 0,2 M glicyna) na membranę nitrocelulozową, stosując napięcie 100 V i stałe natężenie prądu wynoszące 350 mA przez godzinę, zapewniając niską temperaturę otoczenia (4 °C). Po wypłukaniu, prowadzono 60-minutowe blokowanie niespecyficznego miejsca wiązania na membranie, inkubując z roztworem 5% odtłuszczonego mleka w buforze TBST (30 mM Tris, 75 mM NaCl, 0,1% Tween 20). Inkubację z I-rzędowym przeciwciałem króliczym IgG Anti-KCNJ15 (rozcieńczonym w stosunku 1:250 w PBS z 1% BSA i 0,02% azydkiem sodu), przez noc w temperaturze 4°C. Po kolejnych płukaniach membranę inkubowano przez 45 min na kołyszce z przeciwciałem II-rz. sprzęgniętym z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. *HorseRadish Peroxidase*, stężenie 1:3000), rozpuszczonym w TBST-mleko (1:3000). Po dokładnym odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał, aplikowano substrat chemiluminescencyjny dla HRP i wywoływano obraz w aparacie MicroChem (DNR Bio-Imaging System), zapewniając odpowiednie czasy ekspozycji.

W kolejnym kroku usuwano związane do membrany przeciwciała roztworem 0,2 M NaOH i powtarzano analogiczną procedurę z I-rzędowym przeciwciałem mysim anti-GAPDH (1:1000) i II-rz. przeciwciałem skierowanym przeciwko antygenom mysim, sprzęgniętym z HRP (1:3000). Wywoływanie prowadzono jak poprzednio.

3.2.8.5. BARWIENIE IMMUNOCYTOCHEMICZNE

Komórki poddane zahamowaniu ekspresji KCNJ15 i komórki kontrolne w liczbie $1,5 \times 10^4$ wysiewano na szkiełka nakrywkowe o wymiarach 15x15 mm umieszczone w dołkach płytki 12-dołkowej. Następnego dnia komórki były utrwalane formaldehydem 3,7% w PBS przez 20 min w temperaturze pokojowej. Permeabilizację błony prowadzono w obecności 0,01% Tritonu X-100 przez 5 min w temperaturze pokojowej. Blokowanie niespecyficznego miejsca wiązania prowadzono inkubując komórki przez 60 min w temperaturze pokojowej, z 3% roztworem BSA w PBS. Następnie szkiełka przenoszono do komory wilgotnościowej, gdzie na parafilmie były inkubowane z króliczym przeciwciałem I-rzędowym anti-KCNJ15 (Abcam, ab200397) rozcieńczonym w stosunku 1:100 w 3% BSA w PBS, przez noc, w temperaturze 4°C, bądź w przypadku próby kontrolnej, w analogicznym buforze bez przeciwciał. Następnego dnia, po dokładnym odpłukaniu, szkiełka przez 60 minut w temperaturze pokojowej inkubowano z roztworem koziego przeciwciała II-rzędowego sprzęgniętego z barwnikiem AlexaFluor-568,

skierowanego przeciwko króliczym przeciwciałom (Abcam, ab175471, 1:100) i barwnikiem Hoechst 33258 1 µg/ml w celu uwidocznienia jąder komórkowych. Do sporządzenia preparatów wykorzystano medium zamykające Fluorescent Mounting Medium. Preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B wyposażonego w obiektyw PL APO 40x/1.25 OIL i kostkę filtrową N2.1 (BP 535/44; 580; LP 590) oraz A4 (BP 360/40; 400; BP 470/40).

3.2.8.6. ANALIZA KOMÓREK O RÓŻNYM STOPNIU ZAHAMOWANIA EKSPRESJI GENU KCNJ15

Reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3 poddanych zahamowaniu ekspresji genu KCNJ15 obrazowano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B w konfiguracji opisanej uprzednio (3.2.7.2). Rejestrację poklatkową prowadzono w kontraście fazowym przy użyciu obiektywu HC PL FLUOTAR L 20x/0.40 DRY. Zastosowano schemat obrazowania i aplikacji prądu zgodny z wcześniejszym opisem (3.2.2-3.2.3). Dodatkowo przed akwizycją oraz po niej, wykonano zdjęcia fluorescencyjne, obrazując białko GFP produkowane przez komórki, za sprawą genu reporterowego obecnego w konstrukcie wyciszającym ekspresję KCNJ15. Pozyskane obrazy były analizowane w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114]. Komórki były obrysowywane manualnie na obrazach wykonanych w kontraście fazowym, natomiast pomiaru średniej intensywności fluorescencji dokonywano w odniesieniu do kanału fluorescencyjnego. Od uzyskanych wartości odejmowano wartość średniej fluorescencji tła. Otrzymane wyniki skorelowano z parametrami charakteryzującymi aktywność ruchową, uzyskanymi w sposób opisany powyżej (3.2.4). Na podstawie intensywności fluorescencji wydzielono z populacji komórki słabo i mocno świecące (średnia intensywność fluorescencji odpowiednio <40 i >40 w skali 12-bitowej). Pozwoliło to na niezależną analizę parametrów ruchu komórek, które wbudowały małą i dużą liczbę konstruktów, kodujących siRNA dla genu KCNJ15.

3.2.9. STOSOWANIE INHIBITORÓW SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH

Zaangażowanie poszczególnych białek i szlaków sygnalizacyjnych w reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3 badano hamując ich aktywność farmakologicznie. W tym celu stosowano odpowiednie inhibitory drobnocząsteczkowe, które zestawiono w Tabeli 7 wraz z wykorzystanymi stężeniami i informacją w odniesieniu, do którego komponentu były używane.

Tabela 7. Wykaz inhibitorów drobnocząsteczkowych stosowanych w pracy.

Hamowany komponent	Inhibitor	Stężenie	Producent
Miozyna II	Blebbistatyna	10 μ M, 50 μ M	Sigma-Aldrich
MLCK	ML-7	10 μ M	Sigma-Aldrich
VGCC typu L	Werapamil	50 μ M	Sigma-Aldrich
ROCK	Y27632	10 μ M	Calbiochem
RhoA	Rhosin	30 μ M	Calbiochem
Rac1	NSC23766	50 μ M	Calbiochem
Cdc42	ZCL278	50 μ M	Calbiochem
Arp2/3	CK-666	100 μ M	Calbiochem
PI3K	LY-294002	50 μ M	Calbiochem
Forminy (domena FH2)	SMIFH2	10 μ M	Sigma-Aldrich

Komórki poddawano działaniu inhibitorów na etapie montowania szklanej, wewnętrznej komory elektrotaktycznej, co miało miejsce 30 minut przed rozpoczęciem akwizycji obrazu oraz 60 minut przed aplikacją pola elektrycznego. Poszczególne inhibitory były również obecne w pożywce wypełniającej wewnętrzne kompartmenty przez cały czas trwania eksperymentu.

3.2.10. ANALIZA UDZIAŁU JONÓW Ca^{2+} W REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ

W celu weryfikacji udziału jonów Ca^{2+} w kontroli elektrotaksji komórek Swiss 3T3 wzbogacano pożywkę w związki kompleksujące, inhibitory (Tabela 7), a także obrazowano zmiany poziomu jonów Ca^{2+} w komórce.

3.2.10.1. STOSOWANE UKŁADY

Eksperymenty obejmujące weryfikację wydajności reakcji elektrotaktycznej prowadzono zgodnie z procedurami opisanymi poprzednio (3.2.2-3.2.4). Na etapie wypełniania komory elektrotaktycznej stosowano pożywkę pozbawioną jonów wapnia bądź wykorzystywano pełne medium wzbogacone dodatkowo w kwas etylenoglikol-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowy - EGTA (3 mM) lub określone inhibitory MLCK oraz kanałów wapniowych zależnych od napięcia (VGCC) (Tabela 7). W celu kompleksowania wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, komórki preinkubowano w pożywce DMEM z 0,5% BSA zawierającej

BAPTA-AM (5 μM), przez 30 min w 37°C , po czym pożywkę dokładnie odpłukiwano i kontynuowano proces montowania komory elektrotaktycznej. W trakcie eksperymentu stosowano medium pełne, bez dodatku BAPTA-AM.

3.2.10.2. OBRAZOWANIE ZMIAN POZIOMU JONÓW WAPNIA

- W SKALI CAŁEJ KOMÓRKI I LOKALNIE

W celu obrazowania zmian poziomu jonów wapniowych w odpowiedzi na aplikowane pole elektryczne, komórki Swiss 3T3 wysiewano w sposób analogiczny jak poprzednio (3.2.2). Następnie, bezpośrednio przed eksperymentem zaadherowane komórki poddawano barwieniu związkami Fluo-4-AM, specyficznym wskaźnikiem jonów Ca^{2+} . Proces barwienia prowadzono w oparciu o protokół dostarczony przez producenta z niewielkimi modyfikacjami. Komórki inkubowano przez godzinę w pełnym medium hodowlanym zawierającym Fluo-4-AM w stężeniu 2 μM , po czym komórki przepłukiwano pożywką wolną od barwnika i kontynuowano proces montowania komory elektrotaktycznej. Komórki obrazowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B w konfiguracji opisaną poprzednio (3.2.7.2). Proces obrazowania rozpoczynano niezwłocznie po umieszczeniu komory na stoliku mikroskopu, aby minimalizować szkodliwy wpływ wyciekania barwnika z komórek. Komórki poddawano działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm zgodnie z opisaną procedurą (3.2.2). Szybka rejestracja poklatkowa obrazu z krokiem czasowym 500 ms do 1 s była możliwa dzięki zastosowaniu kamery Hamamatsu C9100-02 pracującej w trybie synchronizacji sprzętowej. Na potrzeby obserwacji zmian w dłuższej skali czasowej obraz rejestrowano z krokiem 5 s. Obrazowanie prowadzono z wykorzystaniem standardowej epifluorescencji oraz mikroskopii TIRF przy głębokości penetracji 110 nm, pozwalającej na rejestrowanie z dużą czułością zmian stężenia jonów wapnia zachodzących w pobliżu błony komórkowej.

Pozyskane serie zdjęć analizowano ilościowo w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114]. Na potrzeby pomiarów stworzono makro, które automatycznie wykrywało położenie komórek i dokonywało pomiaru ich średniej intensywności fluorescencji. Zmiany tego parametru są proporcjonalne do zmian stężenia jonów wapnia w komórce. Przy pomocy tego samego programu wykonano pomiary profilu intensywności fluorescencji dla obszaru komórki, zlokalizowanego po stronie dodatniego bieguna pola elektrycznego.

W ramach pozytywnej próby kontrolnej do medium wprowadzono jonomycynę w stężeniu 10 μM , jonofor umożliwiający swobodne przenikanie jonów Ca^{2+} przez błonę komórkową, co powoduje nagły wzrost stężenia tych jonów w cytoplazmie, przekładający się na gwałtowny wzrost intensywności fluorescencji wskaźnika Fluo-4.

3.2.11. ANALIZA AKTYWACJI BIAŁKA RHOA W POLU ELEKTRYCZNYM

Analizę aktywacji białka RhoA w odpowiedzi na aplikację pola elektrycznego przeprowadzono w odniesieniu do całej populacji komórek metodą biochemiczną i w odniesieniu do pojedynczych komórek, bądź ich obszaru, przy użyciu metody mikroskopowej.

3.2.11.1. ANALIZA AKTYWACJI W SKALI CAŁEJ KOMÓRKI – G-LISA

Komórki wysiewano na duże szkiełko komory elektrotaktycznej w liczbie $1,5 \times 10^5$ w kropli 800 μl 48h przed eksperymentem, a następnie poddano głodzeniu w pożywce zawierającej 0,5% FBS, dla obniżenia wyjściowego poziomu aktywacji RhoA. W celu pozyskania lizatów komórek poddanych działaniu pola elektrycznego wprowadzono modyfikację struktury komory elektrotaktycznej. W porównaniu z budową opisaną poprzednio (3.2.2), zamiast wąskich szkiełek przytwierdzanych taśmą dwustronną stosowano paski wycinane z parafilmu (o wymiarach 60 \times 5 mm), które sklejało parami pastą silikonową typu grease, a następnie tą samą pastą wklejano pomiędzy duże szkiełko komory. Taka konstrukcja zapewniała większą powierzchnię dla wysiewu komórek i umożliwiała rozklejenie komory po przeprowadzonym eksperymencie. Aplikację pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm prowadzono zgodnie z opisaną procedurą (3.2.2) przez czas 5 min, stosując jednak pożywkę z obniżoną zawartością FBS (0,5%). Pozyskiwanie lizatów prowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym z zestawem G-LISA Activation Assays dedykowanym białku RhoA (Cytoskeleton Inc., BK124). Po rozklejeniu komory odpłukiwano resztę pożywki zimnym PBS bez jonów wapnia i magnezu, nakrapiano bufor lizujący z inhibitorami proteaz i przy pomocy skrobaczki do kultur komórkowych (Biologix) odczepiano od podłoża pozostałości komórek. Całą procedurę prowadzono na lodzie, stosując schłodzone odczynniki. Większość lizatu przenoszono do jałowej probówki typu eppendorf i wrzucano do ciekłego azotu na kilka sekund, po czym przenoszono do zamrażarki -80°C . Taka procedura miała na celu zachować stan aktywności badanego białka, właściwy dla wyjściowego materiału biologicznego. Stężenie białka w pozostałym lizacie wyznaczano przy użyciu odczynnika PrecisionRed obecnego w zestawie, na spektrofotometrze MultiskanTM FC (Thermo Scientific),

mierząc absorbancję fali o długości 595 nm. Lizaty po rozmrożeniu były poddawane dalszej procedurze, która miała na celu wychwyt i osadzenie w dołkach płytki 96-dołkowej wyłącznie RhoA w formie sprzęgniętej z GTP, za sprawą specyficznych przeciwciał, które były tam obecne. W kolejnych krokach poddawano te białka detekcji I-rzędowymi przeciwciałami specyficznymi dla RhoA i kolejnymi, II-rzędowymi przeciwciałami sprzęgniętymi z HRP. Inkubacja z substratem prowadziła do wytworzenia barwnego produktu, którego ilość była proporcjonalna do zawartości Rho-GTP w badanej próbce. Całość przeprowadzono zgodnie ze szczegółową procedurą dołączoną do zestawu. Pomiar kolorymetryczny prowadzono na spektrofotometrze VERSAmax (Molecular Devices) mierząc absorbancję fali o długości 490 nm. Uzyskane wyniki porównano z otrzymanymi dla lizatów z komórek, które nie były poddawane działaniu pola elektrycznego.

3.2.11.2. ANALIZA LOKALNEJ AKTYWACJI – KOMÓRKI Z BIOSENSOREM FRET

Ocenę wpływu pola elektrycznego na aktywację białka RhoA przeprowadzono wykorzystując mikroskopową technikę FRET, opartą na zjawisku bezpromienistego, rezonansowego transferu energii między fluorochromami. Komórki Swiss 3T3 wykazujące ekspresję jednołańcuchowego biosensora FRET – RhoA-FLARE.sc uzyskano dzięki uprzejmości Louisa Hodgsona z Albert Einstein College of Medicine. Były to identyczne komórki, jak wykorzystane w pozostałych eksperymentach, transfekowane stabilnie plazmidem pBabe-Sin-Puro-Tet-RhoA FLARE.sc Biosensor (Addgene Plasmid #12153), które produkowały biosensor pod kontrolą układu Tet-Off. W trakcie hodowli komórek stosowano procedurę opisaną powyżej (3.2.1), dodatkowo aplikując do pożywki doksycyklinę w stężeniu 10 µg/ml, w celu zahamowania ekspresji. 48 h przed eksperymentem indukowano ekspresję biosensora przez przesianie komórek do nowego naczynia hodowlanego, z jednoczesnym odpłukaniem pozostałości pożywki (w trakcie stosując wirowanie 5 min, 200 g), a następnie umieszczenie w pożywce wolnej od doksycykliny. Komórki wysiewano do eksperymentu, montowano komorę elektrotaktyczną i aplikowano pole elektryczne o natężeniu 3 V/cm wg przedstawionego protokołu (3.2.2). Obrazowanie komórek prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B, korzystając z obiektywu HCX PL APO 40x/1,25 OIL, kamery EM-CCD Hamamatsu C9100-02 i zestawu szybkich kół filtrowych, umożliwiających wzbudzenie fluorescencji białka ECFP (donora) i naprzemienną rejestrację sygnału białka ECFP (donora) i Citrine (pochodnej białka YFP, akceptora). Pozostałe elementy układu stosowano zgodnie z opisem przedstawionym poprzednio (3.2.7.2). Poklatkową rejestrację obrazu prowadzono z krokiem czasowym wynoszącym 1 min,

stosując relatywnie niską intensywność światła wzbudzającego w celu zredukowania zjawiska fototoksyczności.

Obróbkę wykonanych serii zdjęć prowadzono w programie MatLab R2012b, korzystając z pakietu analitycznego Biosensors Package 2.1 (Sébastien Besson, Chuangang Ren, Hunter Elliott). W toku obróbki zdjęć, były one odszumiane, poddawane wyrównaniu cieniowania tła i odejmowaniu tła. Następnie obrazy dla kanału donora i akceptora podlegały segmentacji i były dzielone (akceptor/donor) w celu uzyskania obrazów ratiometrycznych, przedstawiających względną aktywność białka RhoA na danym obszarze. Po zastosowaniu korekcji fotobłaknięcia, serie zdjęć były przenoszone do programu ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114], gdzie podlegały dalszej obróbce, polegającej na nałożeniu pseudokolorów i dostosowaniu zakresu dynamicznego. W tym samym programie prowadzono analizę ilościową, tworząc w tym celu dedykowane makro, które automatycznie wykrywało położenie komórek i mierzyło poziom aktywności biosensora w obrębie interesującego obszaru. Dodatkowo wykonano profile aktywności w rejonie anodalnym komórki, na linii równoległej do linii pola elektrycznego.

3.2.12. ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w programie Statistica 13.1 (Statsoft). Istotność statystyczną dla prędkości migracji, drogi całkowitej, przemieszczenia całkowitego, prędkości przemieszczania i CME oceniano testem t-Studenta. Istotność statystyczną parametrów określających kierunkowość ruchu ($\cos \beta$, $\cos \gamma$) analizowano testem nieparametrycznym U Manna-Whitneya, ze względu na charakter rozkładu uzyskiwanych wyników. W każdym przypadku wartość $p < 0,05$ uznawano za istotną statystycznie.

3.2.13. WYKORZYSTANE OPROGRAMOWANIE

Poza wyszczególnionymi w poszczególnych metodach programami komputerowymi, w każdym przypadku do sporządzenia wykresów wykorzystywano program Excel 2016 (Microsoft). Poszczególne ryciny organizowano i opisywano używając programu CorelDraw X8 (Corel Corporation). Manuskrypt pracy sporządzono w programie Word 2016 (Microsoft). Filmy załączone jako suplement montowano w programie ImageJ 1.51n w wersji Fiji [114], wyposażonym we wtyczkę do kompresji formatów wideo Save as Movie (Qingzong TSENG).

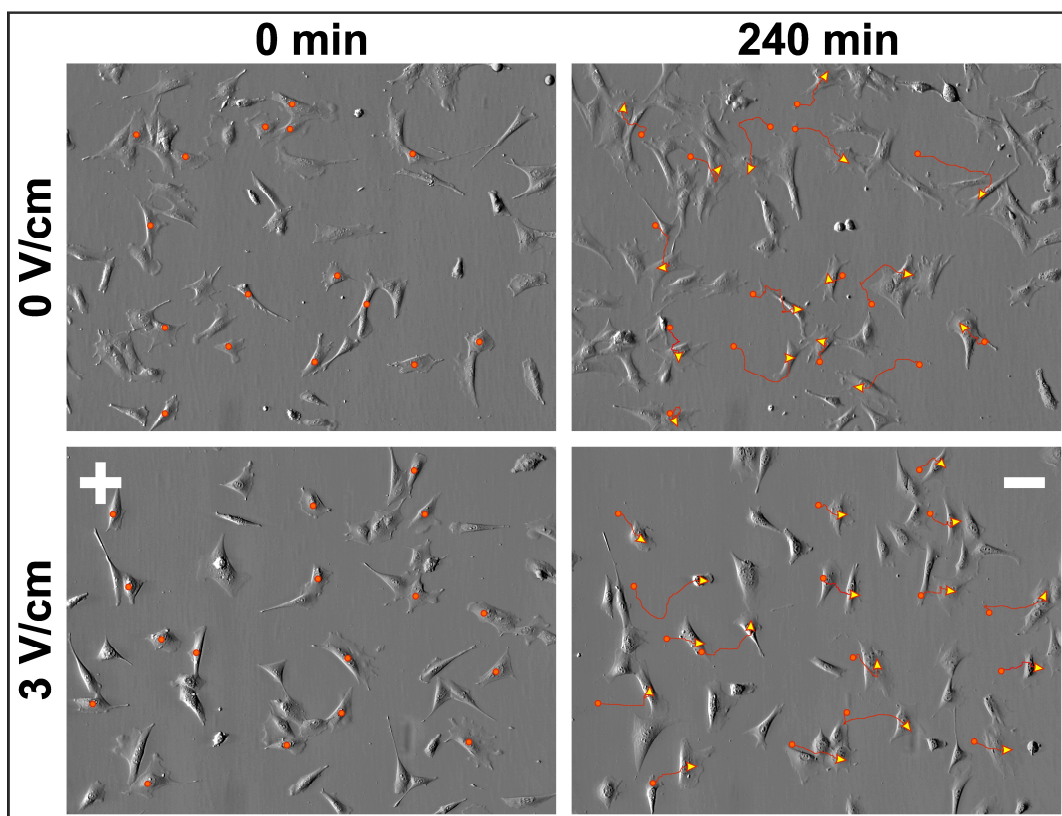
4. WYNIKI

Wiele typów komórek organizmów wyższych odpowiada kierunkową migracją na stałe pola elektryczne o fizjologicznym natężeniu. Mechanizmy powstawania takich pól, jak i postulowane drogi ich wyczuwania przez komórki zostały opisane we wstępie. Badania prowadzone na przestrzeni wielu lat wykazały bardzo zróżnicowaną reaktywność komórek na stałe pola elektryczne. Jednakże, dokładna charakterystyka reakcji elektrotaktycznej jest konieczna dla dalszego planowania badań mających na celu poznanie jej mechanizmu.

4.1. CHARAKTERYSTYKA REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ FIBROBLASTÓW SWISS 3T3

W celu scharakteryzowania aktywności elektrotaktycznej mysich fibroblastów Swiss 3T3, przeprowadzono serię eksperymentów określających wpływ stałego pola elektrycznego o różnym natężeniu na kierunkową migrację badanych komórek. Rejestracja ruchu komórek migrujących w specjalnie przygotowanej komorze elektrotaktycznej pozwoliła na wykazanie, że badane komórki pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego wydajnie przemieszczają się w kierunku katody (Ryc. 5).

Obserwację tę w pełni potwierdza analiza trajektorii ruchu komórek w warunkach kontrolnych i pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego o określonym natężeniu. Wykresy kołowe obrazujące ruch komórek w warunkach bezprądowych oraz przy natężeniu pola od 0,5 do 4 V/cm przedstawiono na rycinie 6. Wartości liczbowe charakteryzujące ruch komórek zestawiono w Tabeli 8. W suplemencie zamieszczono filmy przedstawiające migrację w warunkach bezprądowych oraz w polu elektrycznym o natężeniu 1 i 3 V/cm (Film 1-3).



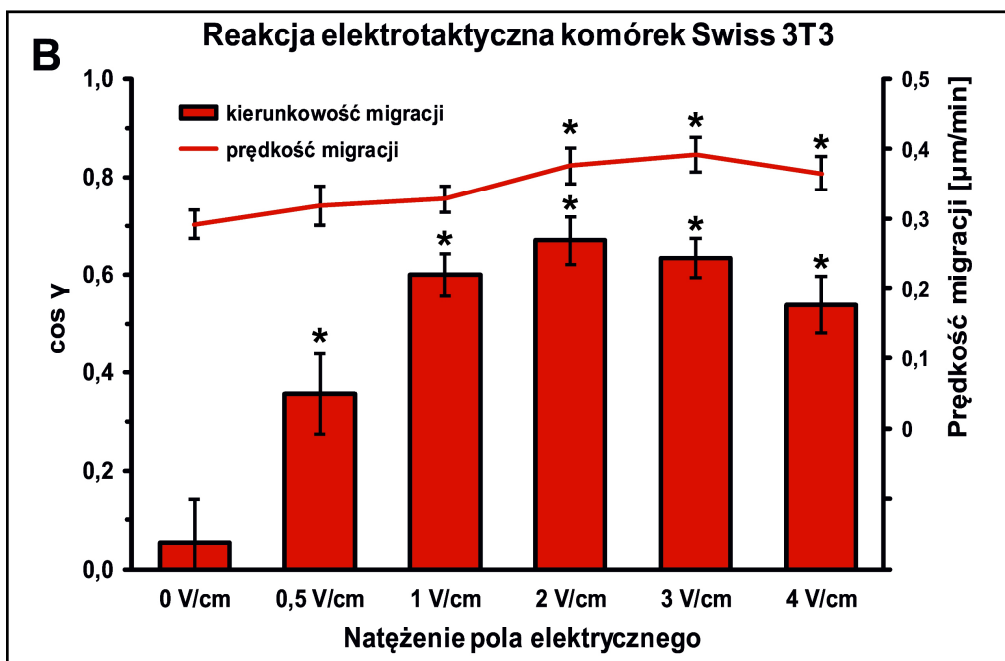
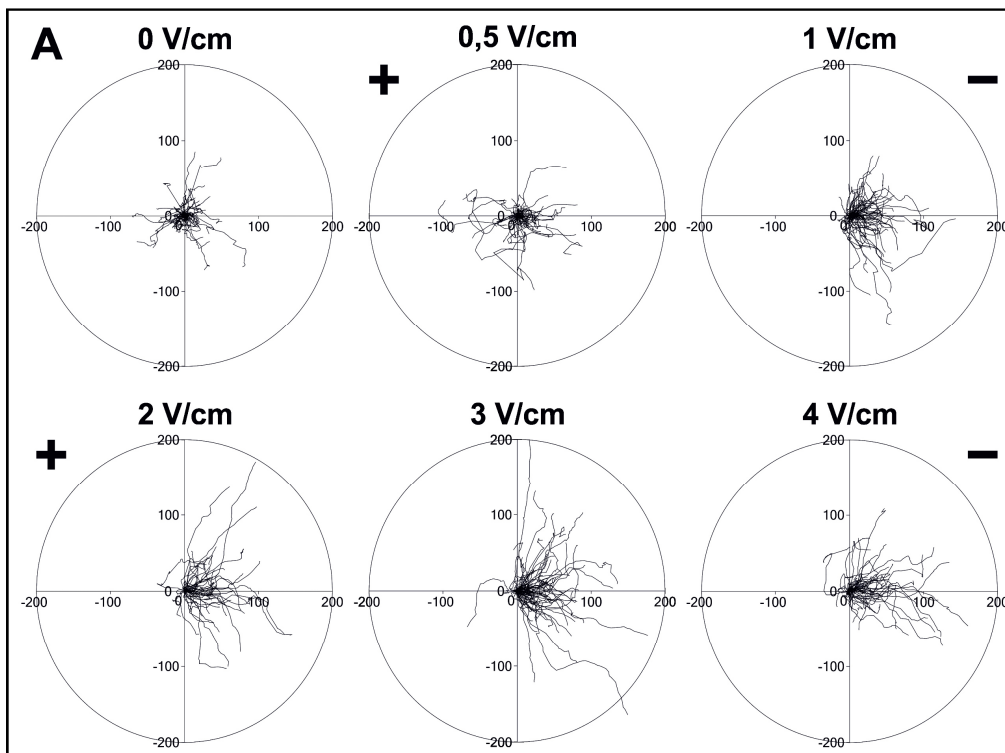
Rycina 5. Reakcja komórek Swiss 3T3 na pole elektryczne.

Trajektorie obrazujące ruch komórek w warunkach bezprądowych i w polu elektrycznym o natężeniu 3V/cm. Na zdjęciach przedstawiono komórki w położeniu początkowym i po 4h eksperymentu. Trajektorie wykonano manualnie, wyznaczając geometryczny środek komórki na zdjęciach wykonanych z krokiem czasowym wynoszącym 5 min. Początkowe położenie komórek oznaczono kropką. Strzałka oznacza końcowe położenie komórki i wskazuje kierunek ruchu w ostatnim punkcie czasowym.

Tabela 8. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o zróżnicowanym natężeniu.

Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji \pm SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

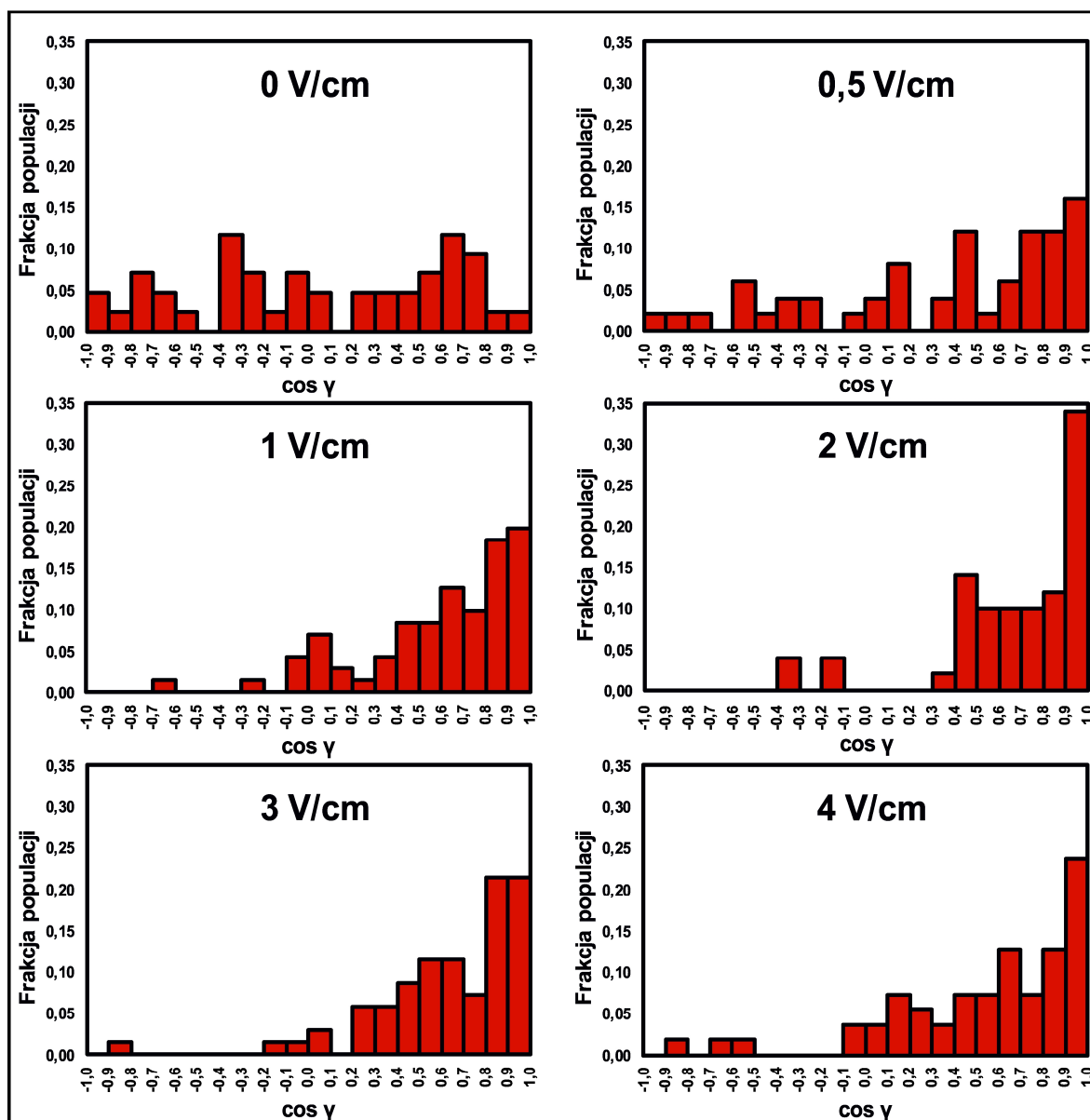
	Natężenie pola elektrycznego [V/cm]					
	0 (n = 43)	0,5 (n = 50)	1 (n = 71)	2 (n = 50)	3 (n = 70)	4 (n = 55)
Prędkość migracji [$\mu\text{m}/\text{min}$]	0,292 \pm 0,020	0,319 \pm 0,028	0,328 \pm 0,019	0,376 \pm 0,026*	0,392 \pm 0,024*	0,365 \pm 0,024*
Droga całkowita [μm]	70,067 \pm 4,716	76,485 \pm 6,629	78,62 \pm 4,629	90,204 \pm 6,311*	94,09 \pm 5,838*	87,586 \pm 5,841*
Przemieszczenie całkowite [μm]	32,477 \pm 3,963	36,83 \pm 3,949	50,52 \pm 3,832*	67,616 \pm 5,756*	68,062 \pm 5,395*	60,977 \pm 5,282*
Prędkość przemieszczenia [$\mu\text{m}/\text{min}$]	0,135 \pm 0,017	0,153 \pm 0,016	0,211 \pm 0,016*	0,282 \pm 0,024*	0,284 \pm 0,022*	0,254 \pm 0,022*
CME	0,442 \pm 0,039	0,503 \pm 0,037	0,630 \pm 0,030*	0,739 \pm 0,024*	0,696 \pm 0,022*	0,667 \pm 0,027*
Cosinus β	0,098 \pm 0,048	0,286 \pm 0,049*	0,465 \pm 0,032*	0,595 \pm 0,030*	0,483 \pm 0,030*	0,474 \pm 0,033*
Cosinus γ	0,054 \pm 0,088	0,356 \pm 0,081*	0,599 \pm 0,043*	0,669 \pm 0,049*	0,634 \pm 0,040*	0,538 \pm 0,058*



Rycina 6. Charakterystyka reakcji elektrotaktycznej w polu elektrycznym o zróżnicowanym natężeniu.

A. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek w warunkach bezprądowych i w polu elektrycznym o natężeniu od 0,5 do 4 V/cm. Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Przedstawiono skalę w μm .

B. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ , dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o określonym natężeniu. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.



Rycina 7. Histogramy obrazujące rozkład kierunkowości ruchu w obrębie analizowanej populacji komórek.

Wyniki przedstawiono jako częstotliwość występowania w populacji komórek wykazujących kosinus kierunkowy γ od -1 do 1 w przedziałach wyznaczonych co 0,1. Uwzględniono średni kosinus γ dla danej komórki na przestrzeni czterogodzinnego eksperymentu, w którym komórki poddawano działaniu pola elektrycznego o zróżnicowanym natężeniu. Liczebność komórek w poszczególnych warunkach przedstawiono w Tabeli 8.

Analiza rozkładu trajektorii ruchu komórek wskazuje jednoznacznie na wyraźną migrację komórek w kierunku katody (Ryc. 6). Wartości parametrów charakteryzujących migrację komórek (Tab. 8) w polu elektrycznym wskazują, że reakcja elektrotaktyczna miała miejsce już w polu o natężeniu 0,5 V/cm (cos γ wynoszący 0,356), a w pełni przejawia się przy natężeniach rzędu 1-3 V/cm. Dalszy wzrost natężenia nie powoduje wzrostu kierunkowości. Pojawieniu się reakcji

elektrotaktycznej towarzyszył wzrost prędkości migracji, nawet o 35% w polu o natężeniu 3 V/cm. Zarówno wzrost prędkości ruchu, jak i tendencja do kierunkowej migracji po torach bardziej prostoliniowych (wzrost wartości CME i cosinusa kierunkowego) skutkowało wyraźnym wzrostem przemieszczenia komórek w czasie doświadczenia. Przedstawione histogramy (Ryc. 7) potwierdzają wysycenie reakcji elektrotaktycznej komórek przy natężeniu przekraczającym 1 V/cm. Rozkład kierunkowości ruchu w polach o natężeniach od 1 do 4 V/cm jest bardzo zbliżony.

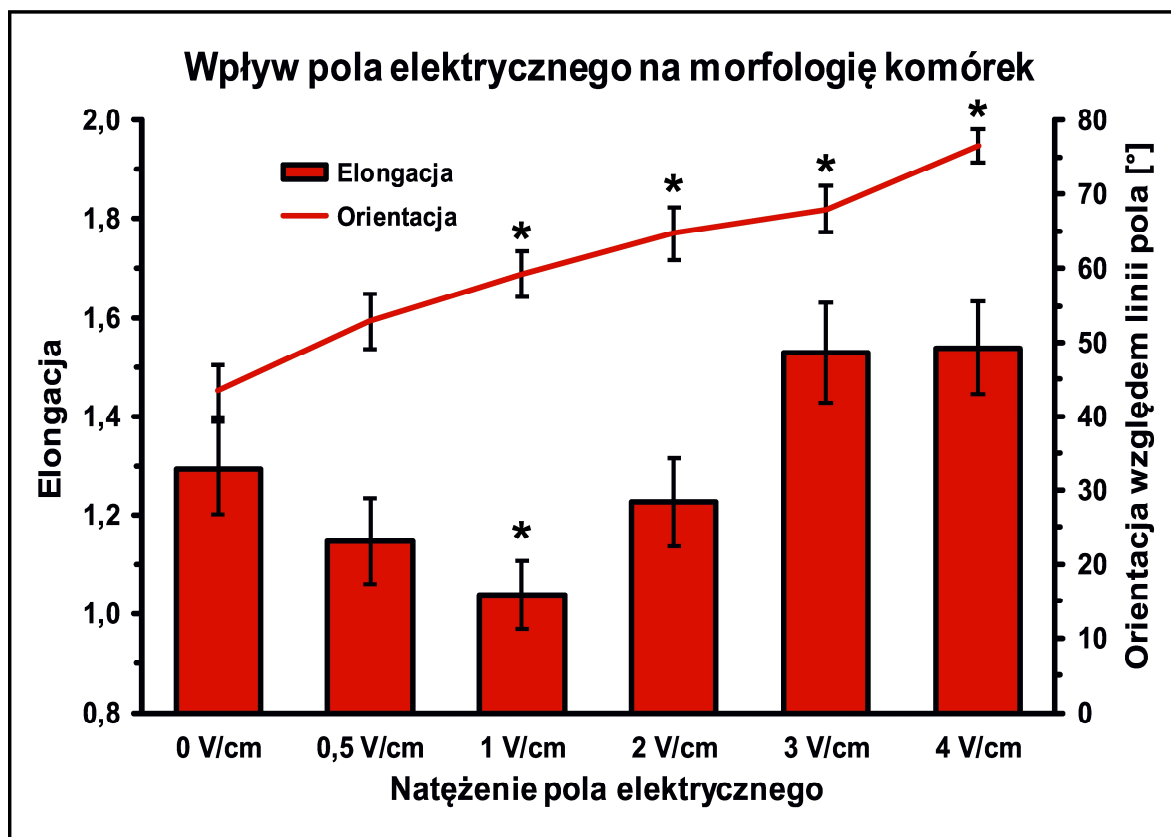
4.2. WPLYW POLA ELEKTRYCZNEGO NA MORFOLOGIĘ I ORIENTACJĘ KOMÓREK

Kierunkowej migracji komórek w polu elektrycznym mogą również towarzyszyć zmiany morfologiczne, którym komórki ulegają w czasie eksperymentu. Stopień wydłużenia komórki i/lub ich orientacja względem linii pola może wskazywać na zaangażowanie określonych mechanizmów fizycznych bądź biochemicznych zaangażowanych w detekcję pola elektrycznego. W tabeli 9 i na rycinie 8 przedstawiono, jak zmieniają się wartości parametrów charakteryzujących zmiany wydłużenia i orientacji badanych w pracy komórek, po ich czterogodzinnej ekspozycji na pole elektryczne o zróżnicowanym natężeniu.

Tabela 9. Wpływ pola elektrycznego o różnym natężeniu na stopień wydłużenia i orientację komórek względem linii pola.

Sposób wyznaczenia obu parametrów omówiono w rozdziale Materiały i metody (3.2.5). *n* – liczba komórek poddanych analizie po 4h ekspozycji na pole elektryczne. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji ± SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Natężenie pola	Elongacja	Orientacja
0 V/cm (n = 40)	1,30 ± 0,09	43,47 ± 3,54
0,5 V/cm (n = 40)	1,15 ± 0,09	52,89 ± 3,73
1 V/cm (n = 54)	1,04 ± 0,07*	59,17 ± 3,01*
2 V/cm (n = 49)	1,23 ± 0,09	64,67 ± 3,55*
3 V/cm (n = 47)	1,53 ± 0,10	67,95 ± 3,08*
4 V/cm (n = 40)	1,54 ± 0,09	76,48 ± 2,32*



Rycina 8 Wpływ pola elektrycznego o różnicowanym natężeniu na wydłużenie i orientację komórek.

Wykres obrazuje wartości liczbowe przedstawione w tabeli 9. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

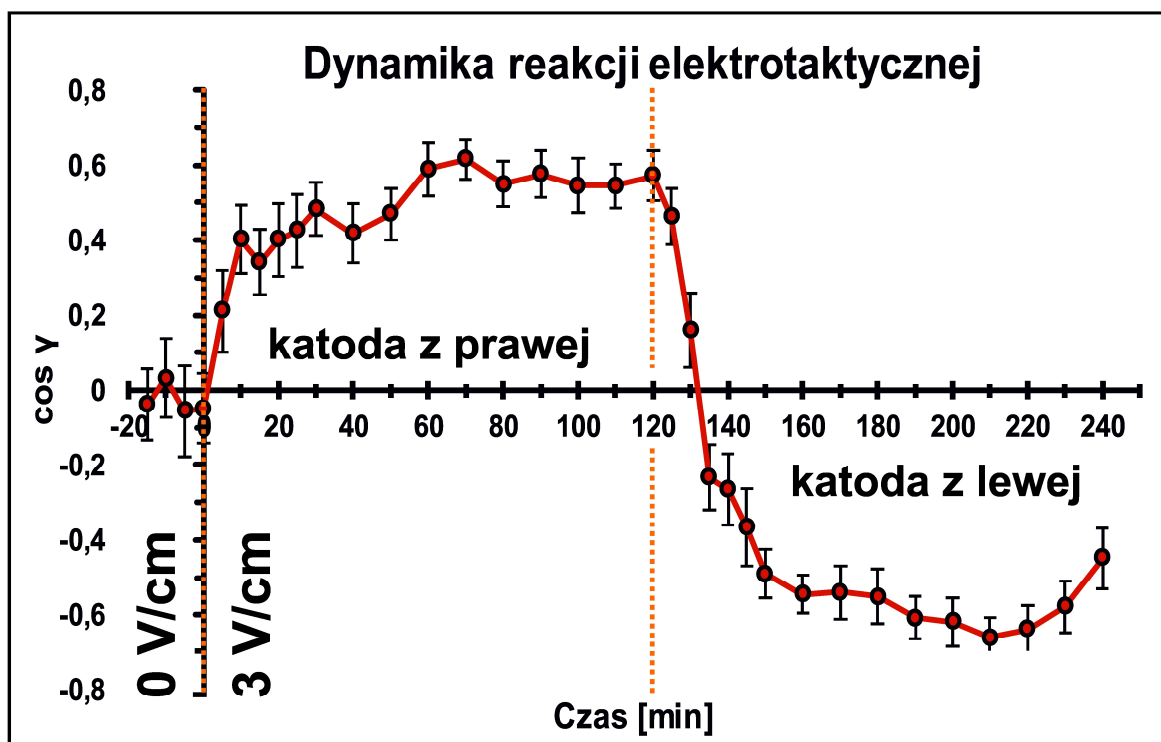
Wykazano, że pole elektryczne o niewielkim natężeniu (tj. 0,5-1V/cm) powoduje spadek wydłużenia komórek względem warunków bezprądowych, podczas gdy dalszy wzrost natężenia pola (od 2 do 4 V/cm) powoduje odwrócenie tej tendencji i stopniowy wzrost wydłużenia komórek ponad wartości kontrolne. Wraz ze wzrostem natężenia pola elektrycznego następuje z kolei sukcesywny wzrost tendencji do prostopadłej orientacji komórek względem linii pola. Wartość zbliżona do 45° obserwowana w warunkach kontrolnych wskazuje na losową orientację komórek w populacji. Wzrost do wartości ponad 75° w najwyższym ze stosowanych natężeń pola oznacza niemal prostopadłą do linii pola orientację większości spośród komórek w badanej populacji.

4.3. DYNAMIKA REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ

Spośród hipotez tłumaczących mechanizm reakcji elektrotaktycznej jedną z najczęściej wymienianych jest tzw. „teoria receptorowa”. Zgodnie z jej założeniami, u podłoża kierunkowej migracji komórek w polu elektrycznym leżą drogi sygnalizacyjne charakterystyczne dla chemotaksji. Jednakże, odmiennie od chemotaksji, w której komórka migruje w gradiencie

chemoatraktanta przy jednorodnym rozmieszczeniu receptorów powierzchniowych, w przypadku elektrotaksji komórka znajduje się w środowisku jednorodnie rozmieszczonego chemoatraktanta, a polaryzacji ulega rozkład białek błonowych będących receptorami chemoatraktantów. Polaryzacja taka miałaby zachodzić pod wpływem pola elektrycznego na skutek zjawiska elektroforezy lub elektroosmozy białek w płaszczyźnie błony. Hipoteza ta zakłada jednak konieczność odpowiednio długiego czasu działania pola elektrycznego potrzebną do zmiany lokalizacji białek błonowych.

Z tego względu, aby ocenić czy obserwowana reakcja może być tłumaczona wpływem pola elektrycznego na polaryzację rozmieszczenia białek błonowych, w kolejnym etapie pracy zbadano dynamikę reakcji elektrotaktycznej fibroblastów Swiss 3T3. Na rycinie 9 przedstawiono dynamikę zmian kosinusa kierunkowego w czasie, dla eksperymentu obejmującego pierwotną reakcję komórek na pole elektryczne, jak i na zamianę jego biegunów.



Rycina 9 Dynamika reakcji komórek Swiss 3T3 na aplikację pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm oraz na odwrócenie jego kierunku.

Wykres przedstawia zmiany średnich wartości kosinusa kierunkowego γ dla poszczególnych przedziałów czasu, sporządzone przez manualną analizę położenia centroidu 50 komórek. W czasie 0 min zaaplikowano pole elektryczne z katodą po prawej stronie. Po upływie kolejnych 120 min przeprowadzono zmianę kierunku przepływu prądu (zamiannę elektrod).

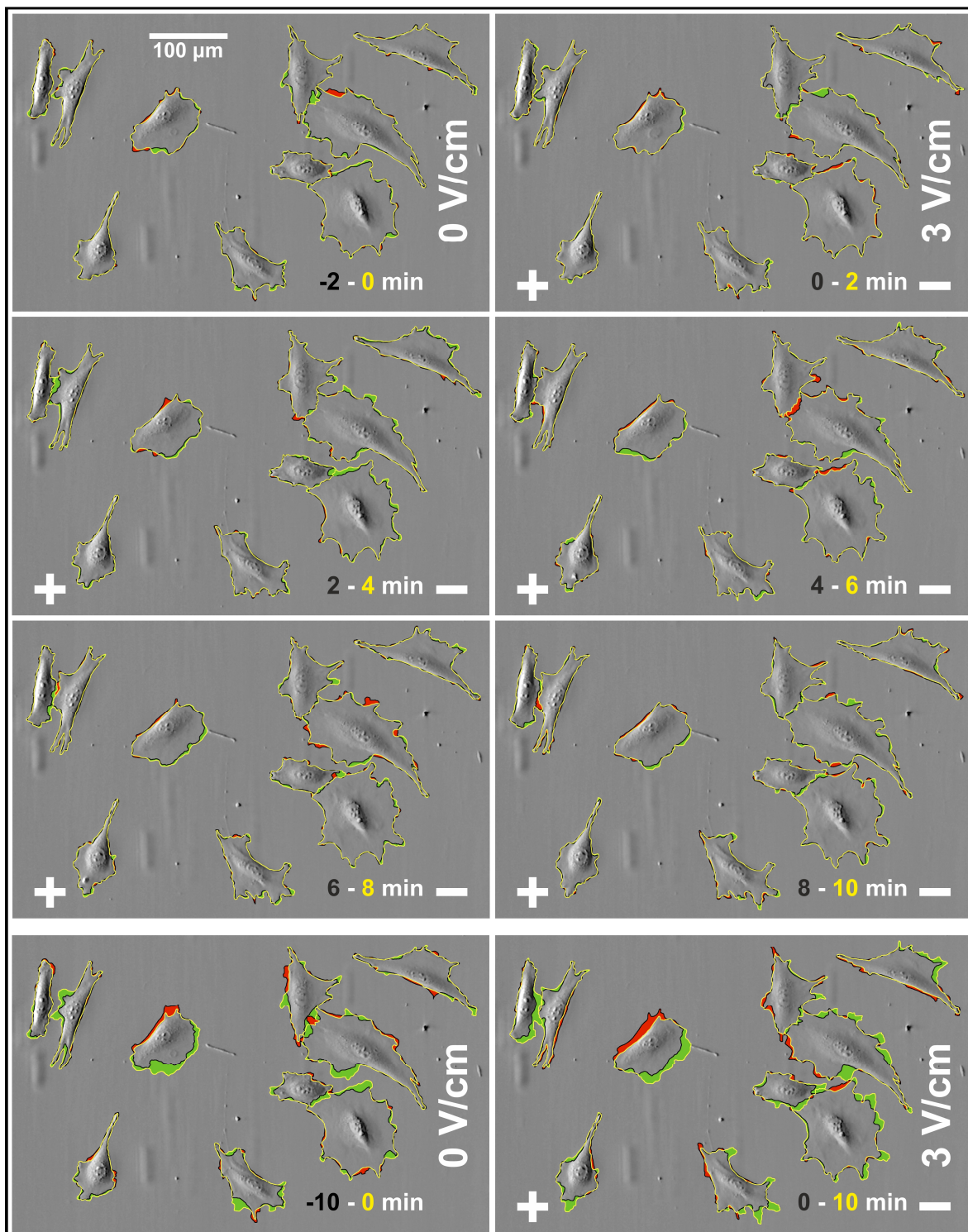
Na początku doświadczenia badano szybkość reakcji komórek na włączenie pola elektrycznego. Pierwsze objawy kierunkowej migracji komórek widoczne są już w ciągu 5 min

od aplikacji pola elektrycznego. Kosinus kierunkowy γ ulega stopniowemu zwiększaniu, osiągając wartość świadczącą o wyraźnej migracji komórek w kierunku katody już po 20-30 minutach od włączenia pola elektrycznego. Dalszy wzrost następuje przez kolejną godzinę, aż do osiągnięcia maksymalnej wartości rzędu 0,6. Zmiana kierunku ruchu spowodowana zmianą kierunku pola elektrycznego również przebiega dynamicznie. Pierwsze objawy reakcji widoczne są przed upływem 5 min od zamiany elektrod. Kosinus kierunkowy spada stopniowo w przeciągu pierwszych 10-15 min do wartości wskazującej na losową migrację. W kolejnych przedziałach czasu obserwuje się już migrację w kierunku „nowej katody” umieszczonej po stronie przeciwnej. Pełna zmiana kierunkowości ruchu jest widoczna po upływie ok. 30 minut od zamiany elektrod.

Otrzymane wyniki mogłyby zatem sugerować, że reakcja fibroblastów 3T3 na pole elektryczne przebiega w przedziale czasowym kilku do kilkunastu minut. Należy jednak pamiętać, że analiza zmian położenia centroidu komórki jest obciążona dużą bezwładnością. O ile wyznaczanie długoczasowych trajektorii ruchu komórek na podstawie zmian położenia geometrycznego środka komórki wydaje się być jedną z lepszych metod opisu aktywności ruchowej komórki [119], o tyle w badaniach dynamiki reakcji związanych z migracją komórek znaczne bardziej wiarygodne rezultaty można otrzymać stosując metody oparte o analizę zmian morfologicznych komórki (analiza kształtu).

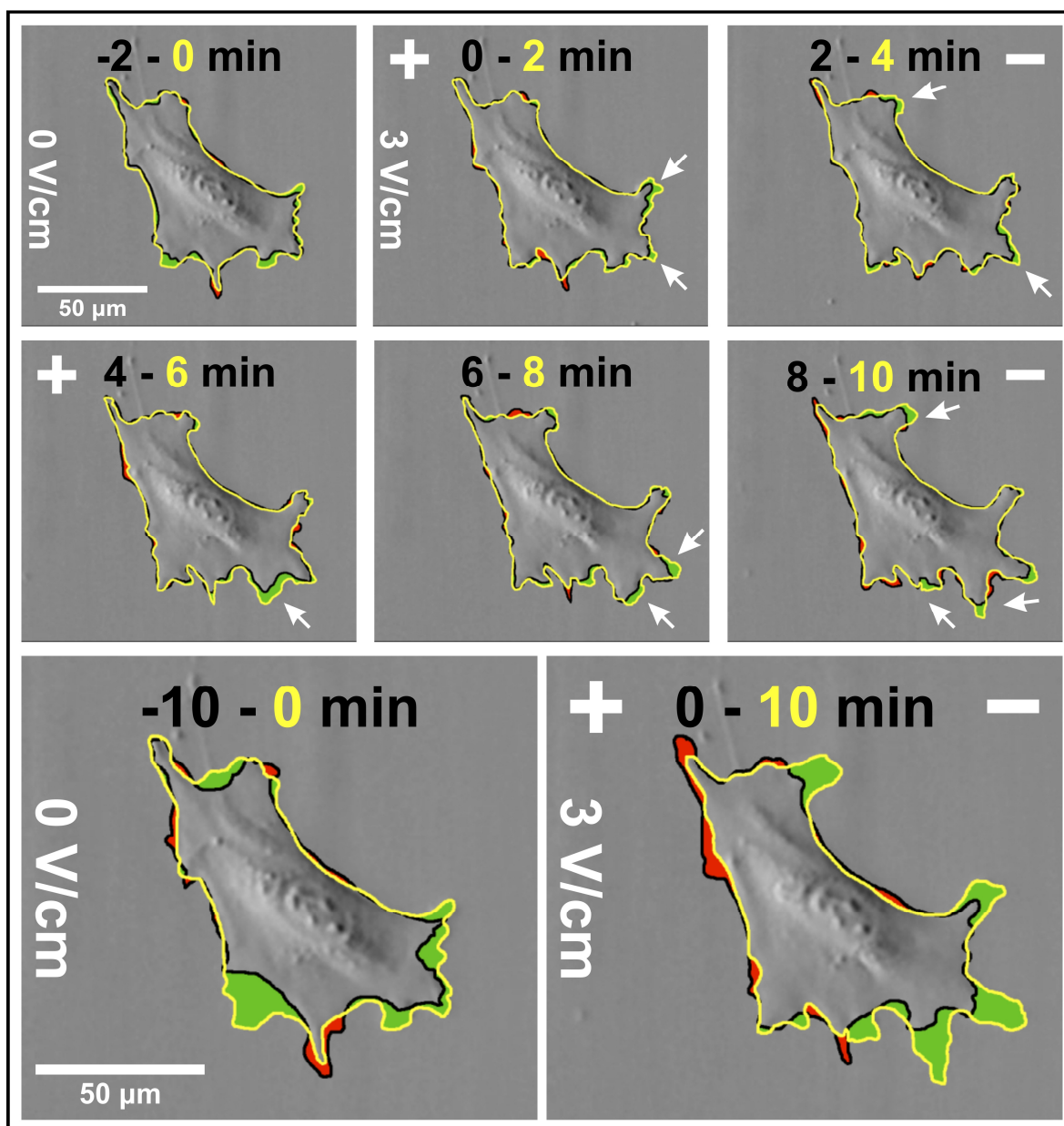
W celu oceny dynamiki ruchu z większą dokładnością, pozwalającą odpowiedzieć na postawione pytanie, zastosowano metodę opartą na pomiarach zmian powierzchni obszarów skierowanych do poszczególnych biegunów pola elektrycznego. Taka analiza pozwala z dużo większą dokładnością wyznaczyć punkt czasowy, w którym komórka reaguje na zmianę kierunku pola elektrycznego, oraz rozpoczyna proces polaryzacji i ukierunkowanej migracji do ujemnego bieguna pola.

Na rycinach 10 i 11 porównano zmiany, którym ulegają krawędzie komórek w odpowiedzi na zaaplikowane pole elektryczne. Przedstawiono obrazy różnicowe, które lokalizują powierzchnię zajętą przez nowotworzone w poszczególnych przedziałach czasu wypustki komórek, jak i powierzchnię zwolnioną przez komórki na skutek retrakcji.



Rycina 10. Pierwotna reakcja komórek Swiss 3T3 na pole elektryczne.

Sekwencja zdjęć obrazuje reakcję grupy komórek na zaaplikowane pole elektryczne o natężeniu 3 V/cm. Manualna analiza obrysów komórek pozwoliła na wyznaczenie obszarów pokrytego podłoża przez komórki we wskazanym przedziale czasu (kolor zielony), oraz obszarów zwolnionych przez te komórki (kolor czerwony). Na końcu przedstawiono analogiczne obrazy podsumowujące zmiany zachodzące w dłuższym przedziale czasu - 10 min przed i po aplikacji pola elektrycznego.

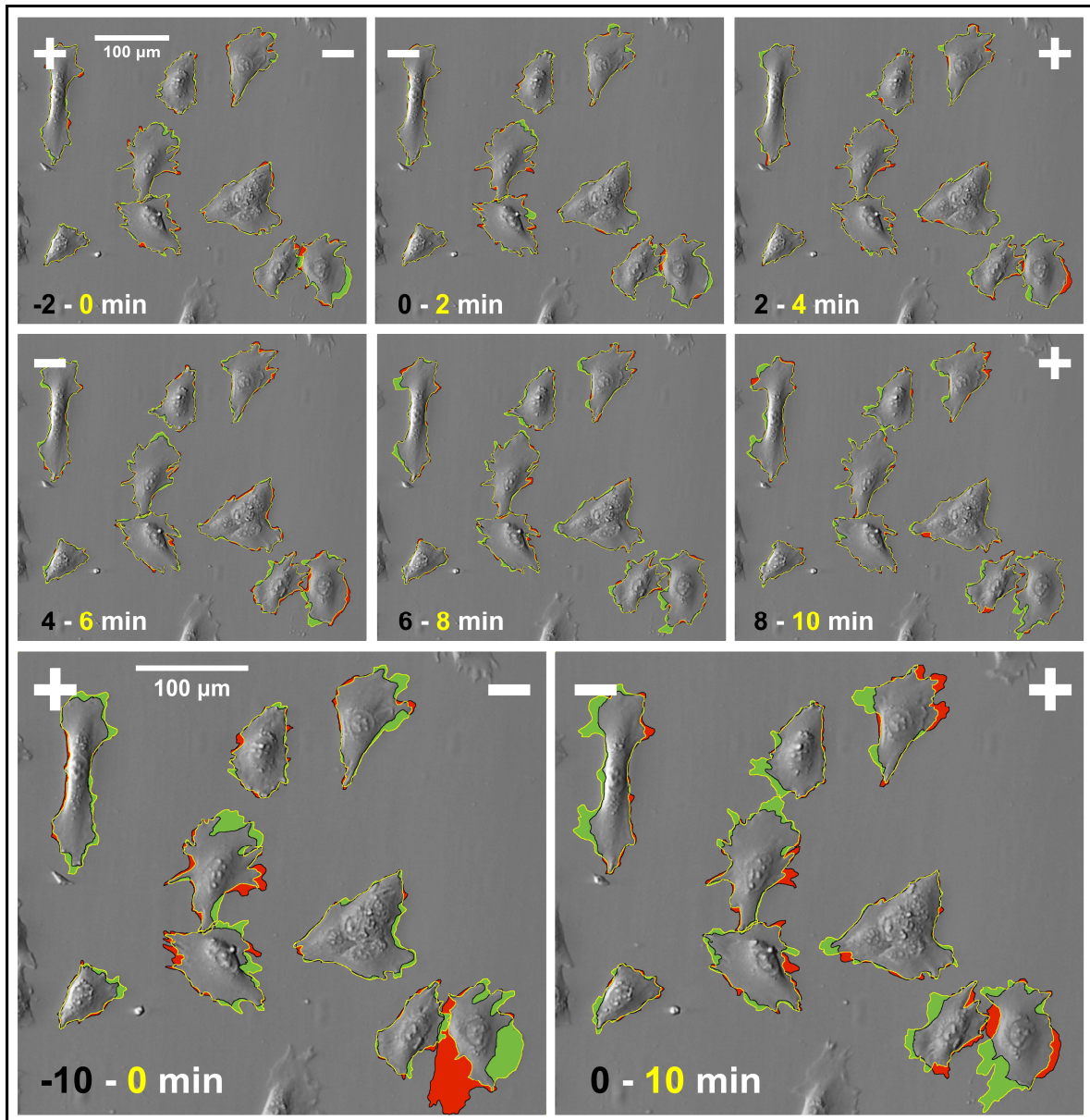


Rycina 11. Pierwotna reakcja reprezentatywnej komórki Swiss 3T3 na pole elektryczne.

Sekwencja zdjęć obrazuje w powiększeniu reprezentatywną komórkę w sposób analogiczny jak na Ryc. 10. Białe strzałki wskazują na rejony tworzenia protruzji skierowanych do katody zaaplikowanego pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm.

Stwierdzono, że przed aplikacją pola elektrycznego proces tworzenia wypustek migracyjnych i retrakcji w komórkach przebiega w sposób nieukierunkowany w skali badanej populacji. Wystawienie komórek na działanie pola elektrycznego sprawia, że w krótkim czasie rejony protruzji (kolor zielony) lokalizują się po stronie katody, natomiast przewagę obszarów ulegających retrakcji można zaobserwować po stronie skierowanej do anody (kolor czerwony).

Analogicznie przedstawiono proces zmiany kierunku migracji komórek w odpowiedzi na zamianę biegunów pola elektrycznego. Nasilenie procesu repolaryzacji jest szczególnie dobrze widoczne na obrazach podsumowujących zmiany zachodzące w dłuższym czasie (Ryc. 12). Odpowiedź na zmianę kierunku pola przedstawia również załączony do pracy film (Film 4).



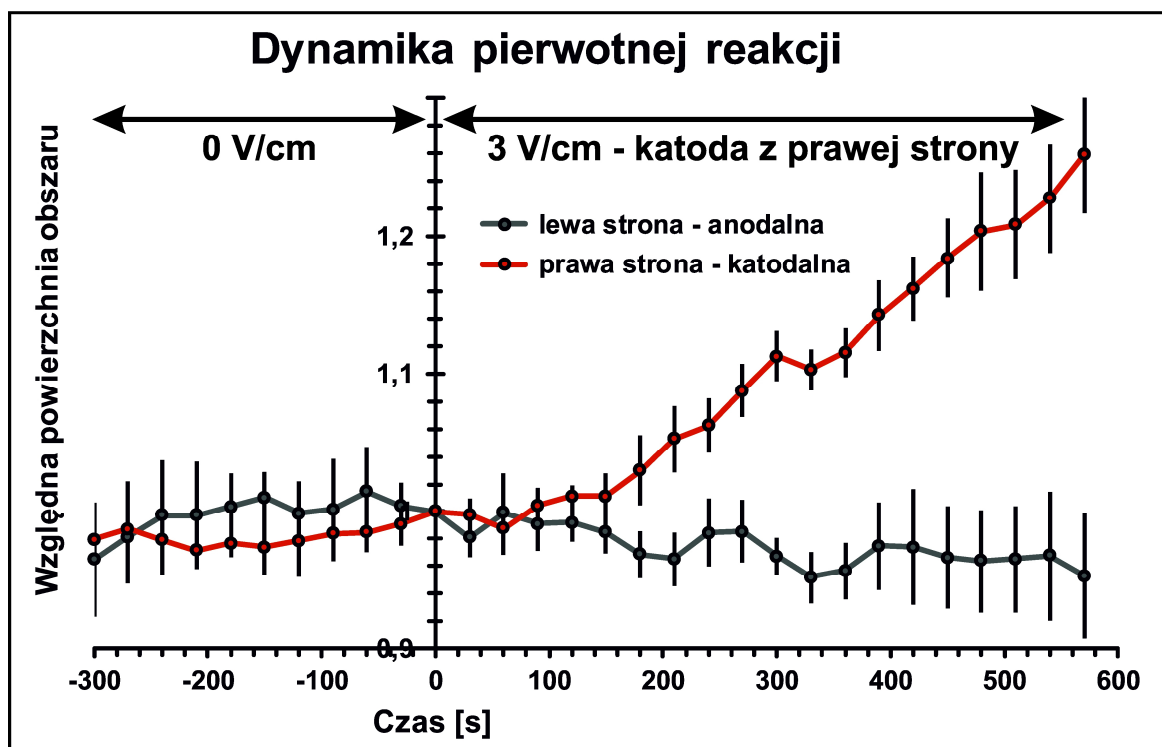
Rycina 12. Dynamika reakcji komórek Swiss 3T3 na zamianę biegunów pola elektrycznego.

Komórki poddano działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm z katodą zlokalizowaną po prawej stronie pola widzenia, po czym dokonano zamiany elektrod i przeniesienia katody na stronę lewą. Analizę wykonano analogicznie jak na Ryc. 10 i 11. Rejony protruzji oznaczono kolorem zielonym, podczas gdy obszary ulegające retrakcji we wskazanym przedziale czasu oznaczono kolorem czerwonym. Obrazy podsumowujące dłuższy okres czasu pozwalają na łatwiejszą obserwację nasilenia procesu repolaryzacji.

Repolaryzacja komórek w poszczególnych komórkach przebiega z różnym nasileniem w związku z ich zróżnicowaną morfologią i aktywnością migracyjną, jednak wspólną cechą dla wszystkich jest występowanie pierwszych zmian morfologicznych już w czasie 2 minut od zmiany kierunku pola elektrycznego.

W celu jednoznacznego przedstawienia dynamiki reakcji elektrotaktycznej przeprowadzono analizę ilościową obserwowanych zmian powierzchni. Dla uwypuklenia dynamiki procesu każdorazowo analizowano jedynie obszar leżący na długości 1/3 osi komórki, równoległej do linii pola, wyłączając z analizy centralny rejon komórki, który wykazuje stosunkowo niewielką dynamikę reakcji. Metodę pomiaru szczegółowo omówiono w rozdziale 3.2.6.2.

W pierwszej kolejności zweryfikowano pierwotną reakcję komórek w odpowiedzi na umieszczenie w polu elektrycznym. Względne zmiany powierzchni obszarów zwróconych do katody i anody przedstawiono na rycinie 13.

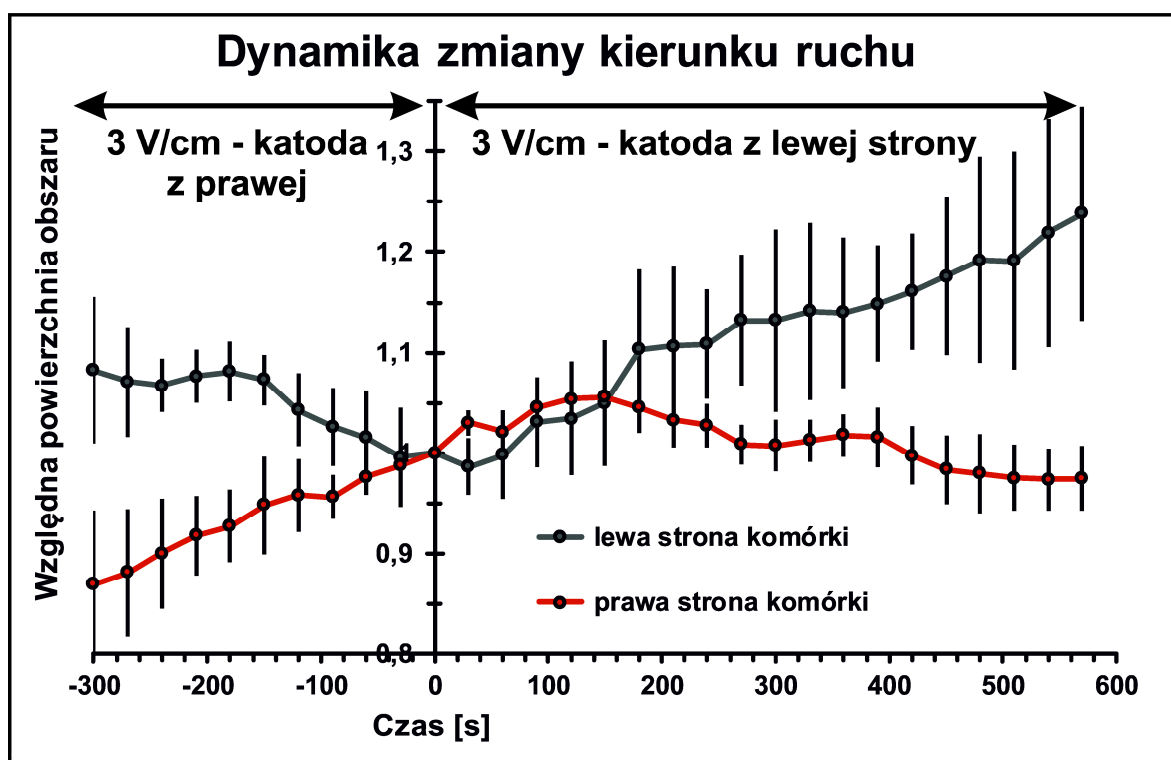


Rycina 13. Ilościowa analiza pierwotnej reakcji komórek Swiss 3T3 na pole elektryczne.

W punkcie czasowym 0 s komórki poddano działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm z katodą po prawej stronie. Wcześniej zmiany analizowanych obszarów dotyczą warunków bezprądowych. Niezależnie przedstawiono zmiany obszarów ekspozycyjnych do katody i anody. Wyniki przedstawiono jako uśrednione wartości powierzchni dla 12 komórek +/- SEM, po wcześniejszej normalizacji powierzchni w punkcie $t=0$ s do wartości 1. Powierzchnię analizowano z krokiem 30 s.

Z wykresu wynika, że przyrost powierzchni po stronie katodальной rozpoczyna się po upływie 60 sekund od aplikacji pola elektrycznego, co oznacza, że detekcja sygnału musiała nastąpić w jeszcze krótszym czasie. Wydaje się, że spadek powierzchni komórki po stronie anodalnej następuje z podobnym opóźnieniem, jednak nasilenie procesu jest mniejsze.

Kolejnym etapem było przeprowadzenie analogicznej analizy ilościowej reakcji na zmianę kierunku pola. Komórki migrujące w polu o natężeniu 3 V/cm z katodą po prawej stronie poddano zamianie elektrod. Poniższy wykres (Ryc. 14) przedstawia analizę zmian powierzchni ekspozowanej do prawej i lewej elektrody w czasie 5 min poprzedzających zamianę i 10 min po jej przeprowadzeniu.



Rycina 14. Ilościowa analiza odpowiedzi komórek Swiss 3T3 na zmianę kierunku pola elektrycznego.

Komórki migrujące w polu elektrycznym o natężeniu 3 V/cm poddano zmianie kierunku pola. Dynamikę wywołanego tym nawrotu zbadano analizując niezależnie zmiany powierzchni skierowanego do prawej i lewej strony. Przedstawione wyniki oznaczają wartości średnie dla 12 komórek +/- SEM. Analizę przeprowadzono z krokiem 30 s.

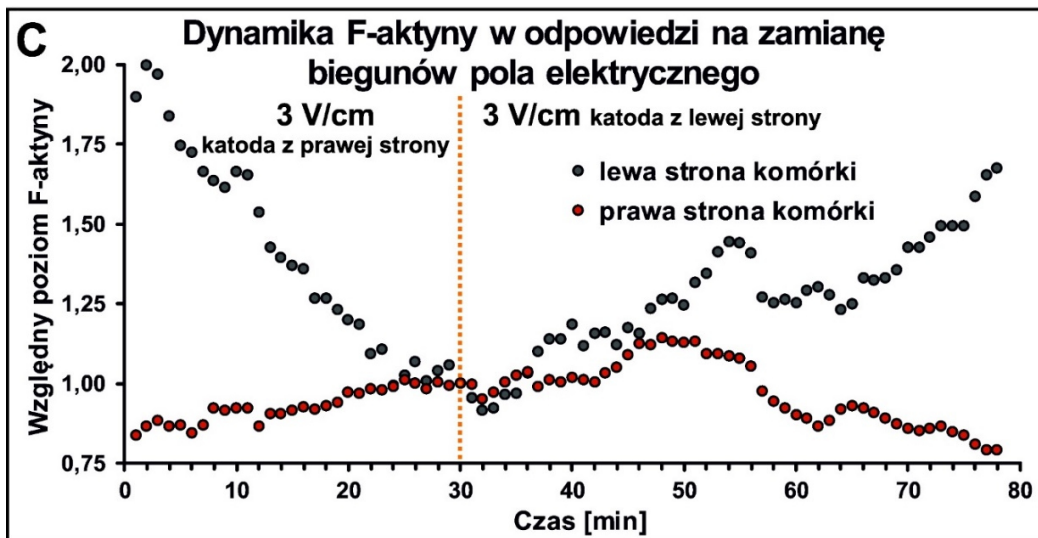
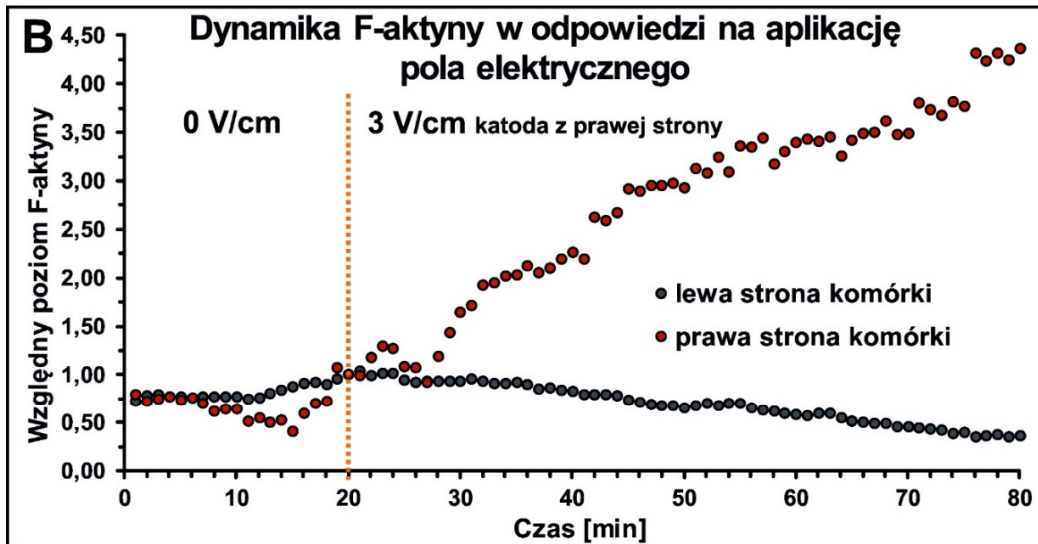
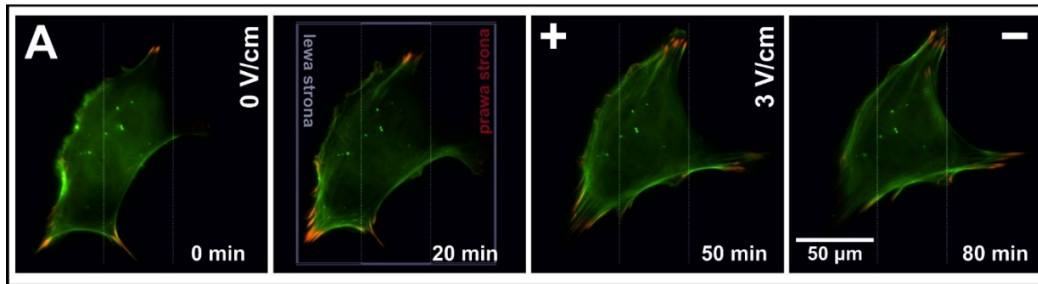
Przeprowadzona analiza pokazuje, że po lewej stronie komórki, która pierwotnie była skierowana do anody, a po zamianie elektrod do katody, przyrost powierzchni rozpoczyna się już w czasie 30-60 s od zamiany elektrod, podczas gdy proces retrakcji po przeciwnej stronie komórki rozpoczyna się z niewielkim opóźnieniem. Wydaje się jednak, że oba zjawiska,

tj. tworzenia wypustek po stronie „nowej” katody, jak i proces skurczu po stronie „nowej” anody zachodzą bardzo szybko i wspólnie mogą prowadzić do repolaryzacji komórki oraz zmiany kierunku migracji w odpowiedzi na zamianę biegunów pola elektrycznego.

Zaobserwowana bardzo duża dynamika zarówno reakcji pierwotnej, jak i odpowiedzi na odwrócenie zwrotu linii pola elektrycznego, wydaje się być w sprzeczności z proponowanym mechanizmem elektrotaksji, polegającym na spolaryzowanej redystrybucji białek błonowych. Według doniesień literaturowych, wyraźna polaryzacja rozkładu białek pod wpływem pola elektrycznego o fizjologicznym natężeniu była obserwowana co najmniej po kilku-kilkunastu minutach od zadziałania pola, w zależności od charakterystyki błony komórkowej, wielkości białka i jego ładunku [26]. Obserwacja reakcji przejawiającej się zmianą dynamiki krawędzi wiodącej i retrakcją tyłu komórki w czasie ok 1-2 min oznacza, że bodziec do tego prowadzący musiał zostać odebrany wcześniej. Dodatkowo warto zauważyć fakt, że reakcja na zamianę elektrod przebiega równie dynamicznie, jak reakcja pierwotna, co trudno tłumaczyć wspomnianą teorią, gdyż białka kluczowe dla reakcji elektrotaktycznej byłyby silnie spolaryzowane po dwugodzinnej ekspozycji komórek na pole elektryczne. Zmiana kierunku migracji wymagałaby wprawdzie zniesienia takiej polaryzacji, a następnie jej odwrócenia, co powinno rzutować na dynamikę reakcji.

Ponieważ obserwowane zmiany morfologiczne migrującej komórki trudno rozpatrywać w oderwaniu od organizacji cytoszkieletu aktynowego, w kolejnych doświadczeniach poddano analizie zmiany w organizacji aktyny w czasie reakcji komórki na aplikację i zmianę kierunku pola elektrycznego. Posłużono się w tym celu komórkami wytwarzającymi białko fluorescencyjne LifeAct-GFP, mikroskopią fluorescencyjną szerokiego pola i mikroskopią fluorescencyjną całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRFM).

Obrazowanie komórek wykazujących ekspresję białka LifeAct-GFP przy użyciu obu wspomnianych metod mikroskopowych pozwoliło na porównanie dynamiki cytoszkieletu aktynowego, zarówno w obrębie całej komórki, jak i na obszarze przylegającym do podłoża. Na rycinie 15 oraz filmie 5 przedstawiono dynamikę badanego białka w trakcie pierwotnej reakcji na pole elektryczne, oraz podczas nawrotu komórki wywołanego zamianą elektrod.



Rycina 15. Dynamika F-aktyny w czasie reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3

A. Jednoczesna rejestracja obrazu komórki wykazującej ekspresję białka Life-Act przy użyciu epifluorescencji i mikroskopii TIRF pozwala na obserwację zmian dynamiki cytoskieletu aktynowego przy podłożu (maska czerwona) i w skali całej komórki (maska zielona). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu Leica DMI 6000B. Przedstawiono wybrane klatki zarejestrowane podczas pierwotnej aplikacji pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm. Zobrazowano również metodę podziału stosowaną w analizie ilościowej. B. Analiza ilościowa dynamiki F-aktyny w czasie pierwotnej reakcji na zaaplikowane pole elektryczne o natężeniu 3 V/cm. Analizie poddano obrazy rejestrowane metodą TIRF. Niezależnie analizowano zmiany całkowitej fluorescencji w skrajnym obszarze komórki eksponowanym do prawej i lewej strony pola widzenia. Pole elektryczne przy katodzie zlokalizowanej po prawej stronie zaaplikowano w czasie $t=20$ min. Poziom fluorescencji mierzono z krokiem wynoszącym 1 min. C. Analogiczna analiza dotycząca reakcji komórek na zmianę elektrod. Niezależnie rejestrowano skrajny obszar komórki analizowany do prawej i lewej elektrody, 30 min przed i 50 min po zamianie elektrod.

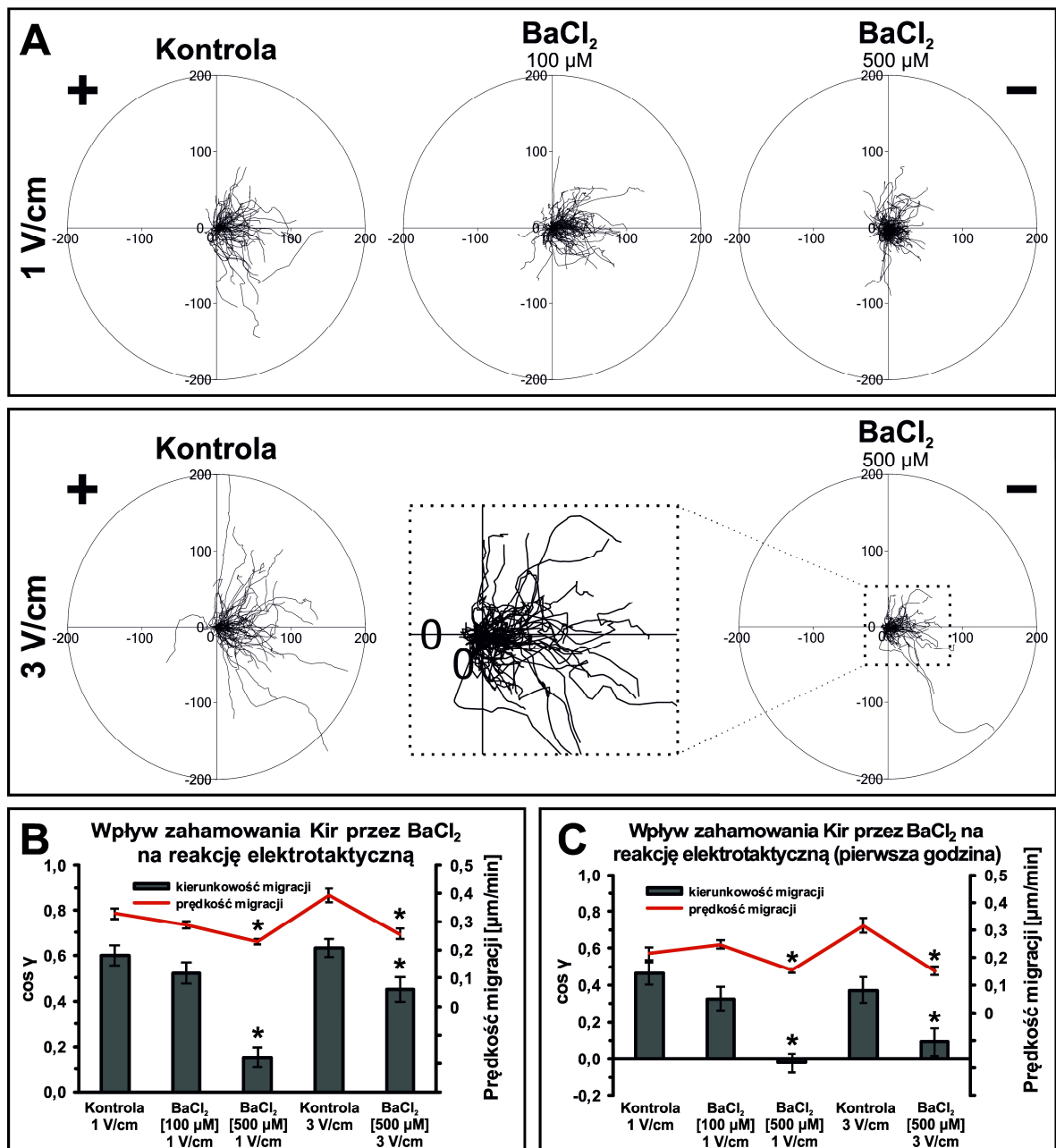
Zarejestrowane obrazy mikroskopowe pokazują dynamiczną rozbudowę wypustek migracyjnych bogatych w aktynę w kierunku katody. Proces ten jest wyraźnie widoczny zarówno w pierwotnej reakcji na przyłożone pole elektryczne, jak i w odpowiedzi na zamianę elektrod. W obu przypadkach obserwowano bardziej nasilone procesy związane z gromadzeniem F-aktyny po stronie katody, niż na przeciwległym skraju komórki.

4.4. ROLA AKTYWNOŚCI DOKOMÓRKOWYCH PROSTOWNICZYCH KANAŁÓW POTASOWYCH KIR W ELEKTROTAKSJI KOMÓREK SWISS 3T3

Otrzymane wyniki analizy dynamiki reakcji komórek Swiss 3T3 na pole elektryczne wskazują, że w przypadku tego modelu badawczego, mechanizmu elektrotaksji należałoby poszukiwać w procesach, które mogłyby tłumaczyć stosunkowo szybką reakcję komórek. Jednym z możliwych mechanizmów, który mógłby tłumaczyć obserwowaną szybkość reakcji jest proponowany mechanizm oparty o aktywację błonowych kanałów jonowych. Jedną z najczęściej rozważanych w tym kontekście możliwości jest udział w tej reakcji zależnych od napięcia kanałów wapniowych [120]. Oprócz kanałów wapniowych sugerowano również zaangażowanie w reakcję elektrotaktyczną innych kanałów jonowych [63].

Jedną z ciekawszych propozycji, która pojawiła się w ostatnim okresie, była praca zespołu Min Zhao [66] wskazująca na możliwy udział w reakcji elektrotaktycznej dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych. Kanały Kir są odpowiedzialne za utrzymanie potencjału błonowego na odpowiednim poziomie, co szczególnie dobrze scharakteryzowano w funkcjonowaniu układu nerwowego. Jednakże, obecność tych kanałów wykazano również w błonach komórkowych licznych innych komórek organizmów wyższych, w tym także badanych komórkach 3T3, co potwierdzono również w dalszej części pracy.

Z tego względu, w kolejnych doświadczeniach zbadano znaczenie dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir dla reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3. W tym celu zahamowano farmakologicznie te kanały, stosując chlorek baru $BaCl_2$ w stężeniu od 100 do 500 μM . Jony Ba^{2+} w tym stężeniu specyficznie hamują kanały Kir, nie wpływając na aktywność pozostałych typów kanałów potasowych [117]. Ocenę wpływu zahamowania kanałów Kir na wydajność elektrotaksji przeprowadzono w polach elektrycznych o natężeniu 1 i 3 V/cm (Ryc. 16 A, B; Tab. 10).



Rycina 16. Wpływ farmakologicznego zahamowania aktywności kanałów Kir na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.

A. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek w warunkach kontrolnych i w obecności BaCl₂ w stężeniu 100 i 500 μM. Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny pola elektrycznego o natężeniu 1 lub 3 V/cm w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek, wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Na osiach przedstawiono skalę w μm.

B. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ, dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o określonym natężeniu, przy braku lub w obecności BaCl₂. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy p < 0,05.

C. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ w czasie pierwszej godziny, dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o określonym natężeniu, przy braku lub w obecności BaCl₂. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy p < 0,05.

Tabela 10. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o zróżnicowanym natężeniu i przy braku lub w obecności BaCl₂.

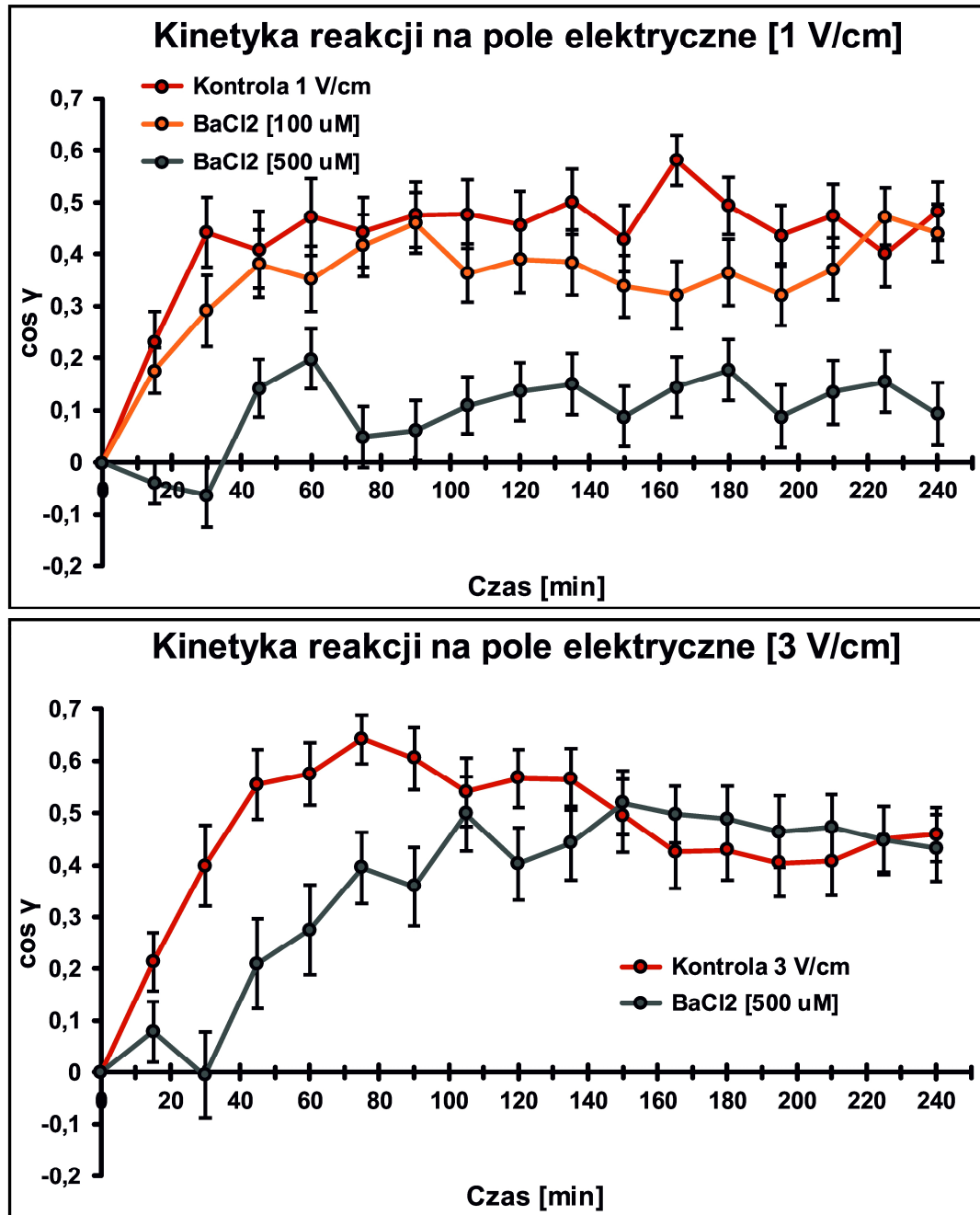
Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji ± SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

	1 V/cm			3 V/cm	
	Kontrola (n = 71)	BaCl ₂ 100 μM (n = 98)	BaCl ₂ 500 μM (n = 125)	Kontrola (n = 70)	BaCl ₂ 500 μM (n = 62)
Prędkość migracji [μm/min]	0,328 ± 0,019	0,288 ± 0,012	0,229 ± 0,009*	0,392 ± 0,024	0,255 ± 0,019*
Droga całkowita [μm]	78,62 ± 4,629	69,069 ± 2,859	54,861 ± 2,139*	94,09 ± 5,838	61,222 ± 4,486*
Przemieszczenie całkowite [μm]	50,52 ± 3,832	42,975 ± 2,670	24,931 ± 1,647*	68,062 ± 5,395	37,159 ± 3,888*
Prędkość przemieszczania [μm/min]	0,211 ± 0,016	0,179 ± 0,011	0,104 ± 0,007*	0,284 ± 0,022	0,155 ± 0,016*
CME	0,630 ± 0,030	0,591 ± 0,023	0,444 ± 0,020*	0,696 ± 0,022	0,583 ± 0,027*
Cosinus β	0,465 ± 0,032	0,369 ± 0,031	0,112 ± 0,025*	0,483 ± 0,030	0,397 ± 0,029*
Cosinus γ	0,599 ± 0,043	0,522 ± 0,047	0,152 ± 0,043*	0,634 ± 0,040	0,450 ± 0,052*

Zahamowanie aktywności kanałów Kir przy udziale BaCl₂ powoduje obniżenie kierunkowości ruchu komórek w polu o natężeniu 1 V/cm, które postępuje wraz ze wzrostem stężenia soli. W przypadku stężenia 500 μM następuje prawie zupełne zniesienie reakcji kierunkowej (spadek $\cos \gamma$ do wartości 0,152), co doskonale odzwierciedla losowość rozkładu trajektorii na wykresie kołowym. W przypadku pola o natężeniu 3 V/cm również stwierdzono statystycznie istotne zahamowanie reakcji kierunkowej komórek 3T3, ale nawet wysokie stężenie BaCl₂ nie powodowało tak wyraźnego spadku kierunkowości ruchu na przestrzeni całego eksperymentu, jak w polu o natężeniu 1 V/cm. Można jednak zauważyć, że w tych warunkach komórki odpowiadają migracją w kierunku katody z pewnym opóźnieniem, gdyż początkowe odcinki trajektorii rozłożone są losowo. Dla uwidocznienia tego zjawiska przedstawiono porównanie kierunkowości ruchu komórek poddanych hamowaniu aktywności Kir, w czasie pierwszej godziny od aplikacji pola elektrycznego (Ryc. 16 C).

Wydaje się, że komórki poddane farmakologicznemu hamowaniu kanałów Kir odpowiadają na pole elektryczne z pewnym opóźnieniem. Wyższe ze stosowanych stężeń soli powoduje istotne zniesienie kierunkowości ruchu w czasie pierwszej godziny, niezależnie od natężenia stosowanego pola elektrycznego. Dla dokładniejszego zobrazowania wpływu

obecności $BaCl_2$ na kinetykę reakcji w przekroju całego eksperymentu przeprowadzono analizę zmian kosinusa kierunkowego w czasie (Ryc. 17).



Rycina 17. Wpływ farmakologicznego zahamowania aktywności Kir na kinetykę reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3.

A. Wpływ obecności $BaCl_2$ w stężeniu 100 i 500 μM na elektrotaksję w polu o natężeniu 1 V/cm, przedstawiony przez obrazowanie zmian w czasie kosinusa γ dla kolejnych 15-minutowych przedziałów czasu. Analiza położenia centroidu została wykonana na seriach poklatkowych wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Wykresy przedstawiają wartości średnie dla całej populacji \pm SEM. B. Wpływ obecności $BaCl_2$ w stężeniu 500 μM na elektrotaksję w polu o natężeniu 3 V/cm. Analiza i przedstawienie wyników przeprowadzone jak powyżej.

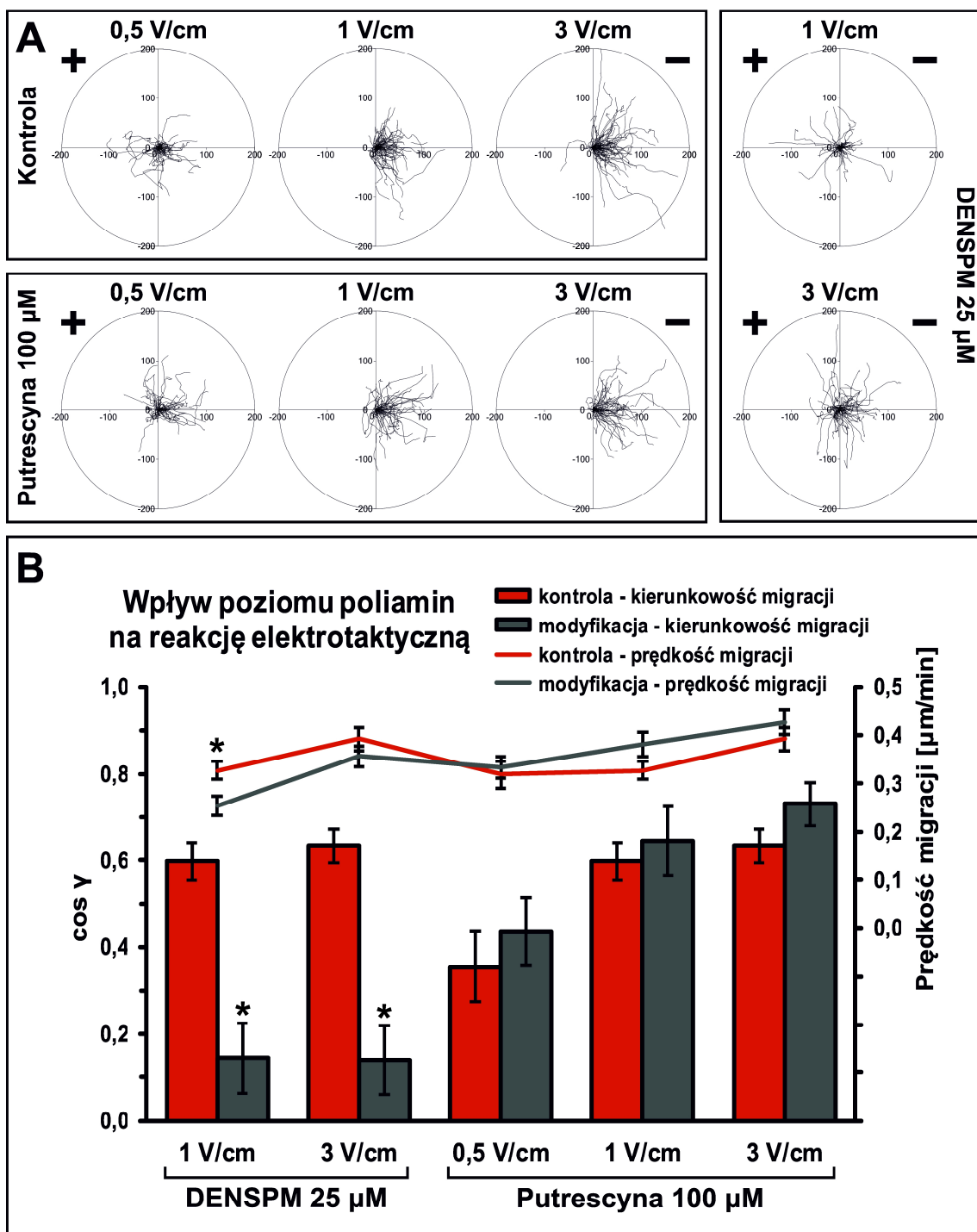
Wykazano, że w polu o natężeniu 1 V/cm, wyższe ze stosowanych stężeń BaCl₂ nie tylko zaburza szybkość pierwotnej reakcji komórek na pole elektryczne, ale niska kierunkowość ruchu utrzymuje się na przestrzeni całego eksperymentu. Dużo słabsze działanie wykazuje niższe z zastosowanych stężeń. W przypadku pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm obserwowany jest znaczny spadek dynamiki reakcji kierunkowej. Przez pierwsze 30 min ruch komórek jest zupełnie losowy, po czym komórki nabierają stopniowo zdolności do migracji w kierunku katody, jednak kierunkowość zbliżoną do warunków kontrolnych osiągają dopiero po upływie 150 minut.

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że silne zahamowanie aktywności dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych praktycznie znosi reakcję elektrotaktyczną w polu o natężeniu 1 V/cm, oraz wyraźnie wpływa na dynamikę reakcji komórek Swiss 3T3 na pole o wyższym natężeniu, wynoszącym 3 V/cm.

4.4.1. WPLYW MODULACJI MECHANIZMÓW REGULACYJNYCH KIR NA REAKCJĘ ELEKTROTAKTYCZNA KOMÓREK SWISS 3T3

Dokomórkowe prostownicze kanały potasowe Kir charakteryzują się zdolnością przewodzenia jonów potasowych do wnętrza komórki. Aktywność ta jest warunkowana obecnością wewnątrzkomórkowych poliamin, takich jak spermina (SPM) i spermidyna (SPD), dodatnio naładowanych związków drobnocząsteczkowych, które wchodzi w interakcję z ujemnie naładowanymi resztami aminokwasowymi kanałów Kir, eksponowanymi do wnętrza komórki, zapobiegając wypływowi jonów potasowych z komórki. Wykazano, że tę specyficzną aktywność Kir mogą również warunkować wewnątrzkomórkowe jony magnezu [80]. Wpływając na poziom wewnątrzkomórkowych regulatorów kanałów Kir dokonano oceny, w jakim stopniu reakcja elektrotaktyczna komórek Swiss 3T3 jest uzależniona od ich specyficznego aktywności.

Preinkubacja komórek z analogiem wewnątrzkomórkowych poliamin – DENSPM, skutkuje indukcją acetylotransferazy SPM/SPD i w następstwie obniżeniem poziomu wewnątrzkomórkowych poliamin. Przeciwny efekt wywołuje preinkubacja komórek z putrescyną – poliaminą nieznacznie regulującą aktywność Kir, jednak przetwarzaną wewnątrz komórek w sperminę i spermidynę, poliaminy o dużo większej aktywności [66]. Dla uzyskania szerszego obrazu wpływu powyższych manipulacji, zweryfikowano reakcję na pola o różnych natężeniach (Ryc. 18, Tab. 11).



Rycina 18. Wpływ modyfikacji poziomu regulatorów aktywności Kir na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.
 A. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek preinkubowanych w obecności związków wpływających na poziom endogennych poliamin. DENS PM 25 μM – związku obniżającego wypadkowy poziom endogennych poliamin oraz Putrescyny 100 μM, wywołującej efekt przeciwny. Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny pola elektrycznego o natężeniu 0,5, 1 lub 3 V/cm w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Na osiach przedstawiono skalę w μm. B. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ, dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o określonym natężeniu, co dotyczy zarówno komórek kontrolnych, jak i preinkubowanych z DENS PM lub Putrescyną. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy p < 0,05.

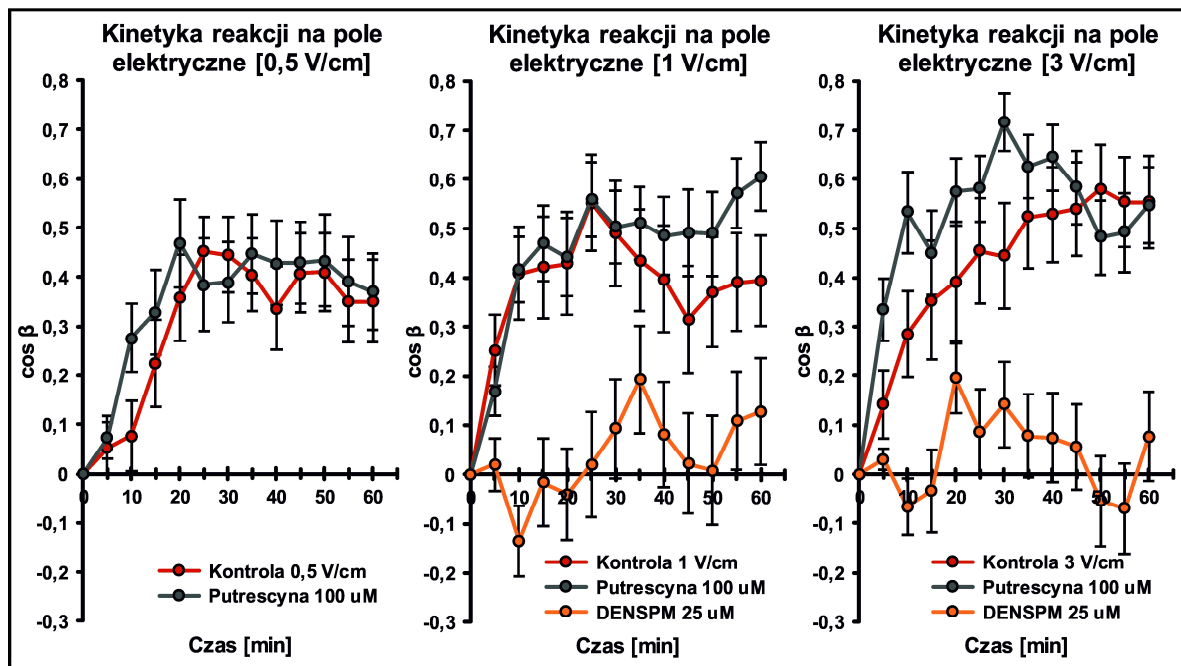
Tabela 11. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o zróżnicowanym natężeniu, preinkubowanych dodatkowo z DENSPM lub Putrescyną w celu modyfikacji poziomu endogennych poliamin.

Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji \pm SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Natężenie PE	Kontrola			DENSPM 25 μ M		Putrescyna 100 μ M		
	0,5 V/cm (n = 50)	1 V/cm (n = 71)	3 V/cm (n = 70)	1 V/cm (n = 51)	3 V/cm (n = 58)	0,5 V/cm (n = 50)	1 V/cm (n = 54)	3 V/cm (n = 50)
Prędkość migracji [μ m/min]	0,319 \pm 0,028	0,328 \pm 0,019	0,392 \pm 0,024*	0,254 \pm 0,020*	0,357 \pm 0,021	0,334 \pm 0,024	0,381 \pm 0,026	0,426 \pm 0,026
Droga całkowita [μ m]	76,485 \pm 6,629	78,62 \pm 4,629	94,09 \pm 5,838*	60,888 \pm 4,771*	85,716 \pm 4,960	80,222 \pm 5,817	91,447 \pm 6,291	102,320 \pm 6,207
Przemieszczenie całkowite [μ m]	36,83 \pm 3,949	50,52 \pm 3,832*	68,062 \pm 5,395*	40,266 \pm 4,443	53,698 \pm 4,635*	47,232 \pm 4,469	61,604 \pm 5,120	74,267 \pm 5,443
Prędkość przemieszczania [μ m/min]	0,153 \pm 0,016	0,211 \pm 0,016*	0,284 \pm 0,022*	0,168 \pm 0,019	0,224 \pm 0,019*	0,197 \pm 0,019	0,257 \pm 0,021	0,309 \pm 0,023
CME	0,503 \pm 0,037	0,630 \pm 0,030*	0,696 \pm 0,022*	0,615 \pm 0,029	0,607 \pm 0,030*	0,581 \pm 0,033	0,674 \pm 0,030	0,721 \pm 0,023
Cosinus β	0,286 \pm 0,049	0,465 \pm 0,032*	0,483 \pm 0,030*	0,136 \pm 0,062*	0,211 \pm 0,052*	0,370 \pm 0,050	0,545 \pm 0,036	0,601 \pm 0,026*
Cosinus γ	0,356 \pm 0,081*	0,599 \pm 0,043*	0,634 \pm 0,040*	0,145 \pm 0,081*	0,141 \pm 0,080*	0,437 \pm 0,080	0,645 \pm 0,049	0,731 \pm 0,035

Obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowych poliamin znacznie obniża kierunkowość migracji komórek zarówno w polu o natężeniu 1 V/cm, jak i 3 V/cm. Wpływ ten jest nawet wyraźniejszy niż w przypadku stosowanej uprzednio soli baru. Przeciwnie, podniesienie poziomu wewnątrzkomórkowych poliamin przez preinkubację z putrescyną skutkuje wzrostem kierunkowości przy każdym badanym natężeniu pola, jednakże pomimo widocznej tendencji uzyskane wyniki nie są istotne statystycznie. Wartość uzyskanych wyników dodatkowo podnosi obserwacja, że badane substancje nie wpływały hamująco na prędkość migracji, co jest częstym zjawiskiem występującym w badaniach czynników hamujących kierunkowość migracji i znacząco utrudnia interpretację wyników.

W związku z poczynionymi uprzednio obserwacjami, że farmakologiczne zahamowanie aktywności Kir wpływa na dynamikę reakcji elektrotaktycznej, aspekt ten zbadano również w przypadku mechanizmów regulujących funkcję wspomnianych kanałów. Szczegółowej analizie poddano okres pierwszej godziny po zaaplikowaniu pola elektrycznego o zróżnicowanym natężeniu (Ryc. 19).



Rycina 19. Wpływ modulacji funkcji kanałów Kir na dynamikę reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3.

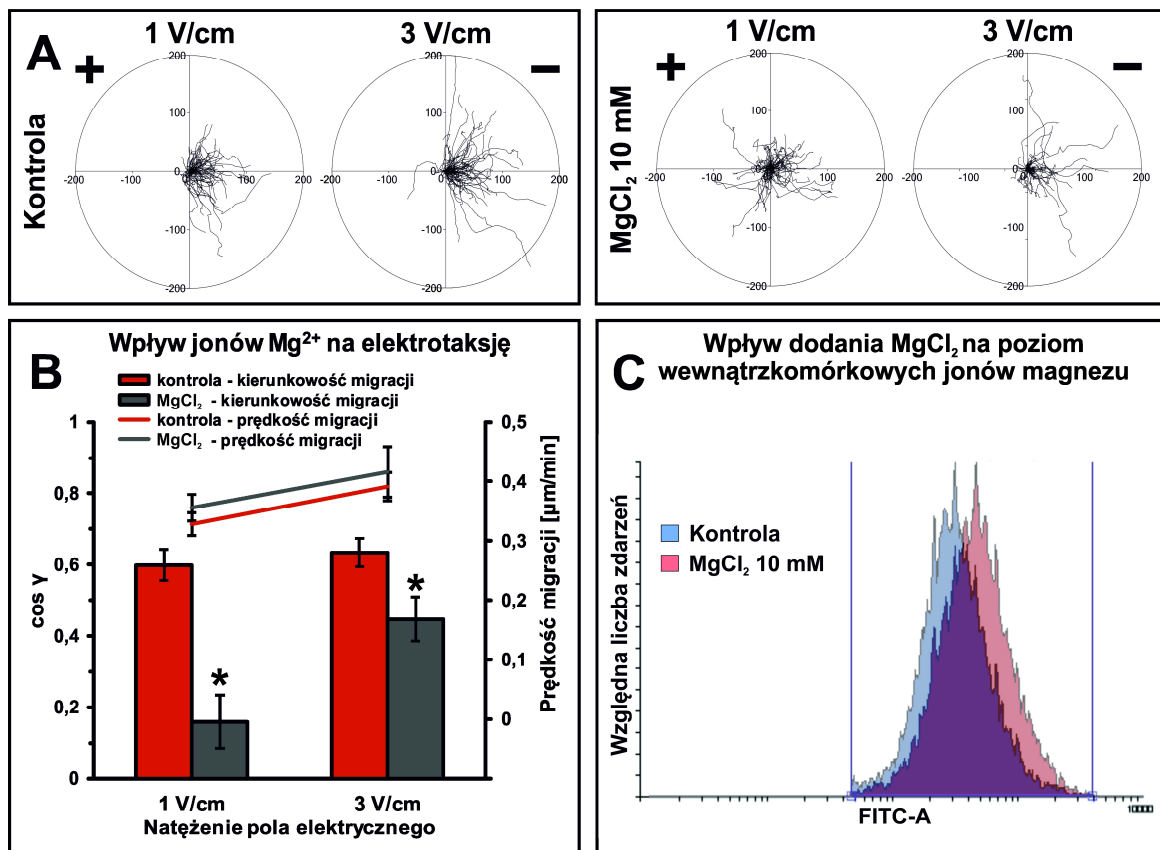
Ocena wpływu preinkubacji z putrescyną w stężeniu $100 \mu\text{M}$ na reakcję elektrotaktyczną w polu o natężeniu $0,5 \text{ V/cm}$ i dodatkowo DENS PM w stężeniu $25 \mu\text{M}$ przy natężeniu 1 V/cm i 3 V/cm . Przedstawiono zmiany kosinusa kierunkowego β w kolejnych 5 minutowych przedziałach czasu, na przestrzeni pierwszej godziny od aplikacji pola elektrycznego. Wykres przedstawia wartości średnie dla badanej populacji komórek \pm SEM. Wartości kosinusów uzyskano na drodze manualnej analizy zmian położenia środków geometrycznych komórek serii zdjęć zarejestrowanej poklatkowo z krokiem 5 min.

Przedstawione na rycinie 19 wyniki pokazują, że preinkubacja komórek Swiss 3T3 z putrescyną, prekursorem sperminy i spermidyny, sprzyja dynamicznej odpowiedzi na aplikowane pole elektryczne, zarówno o natężeniu tak niskim jak $0,5 \text{ V/cm}$, jak i w wyższym, wynoszącym 3 V/cm . Szybsze uzyskiwanie wysokiej kierunkowości ruchu rzutuje na wzrost kosinusów kierunkowych także w przekroju całego eksperymentu. Przeciwnie, dwudniowa preinkubacja komórek z DENS PM sprawia, że niezależnie od natężenia aplikowanego pola elektrycznego, komórki Swiss 3T3 nie są w stanie reagować kierunkową migracją w kierunku katody na przestrzeni pierwszej godziny, co pokazuje wartość kosinusa kierunkowego oscylująca w okolicach wartości bliskiej 0. W połączeniu z analizą trajektorii oraz wartości liczbowych

określających reakcję na przestrzeni całego eksperymentu można stwierdzić, że również dłuższa ekspozycja na pole elektryczne nie skutkuje znacznym wzrostem kierunkowości ich ruchu.

Powyższe wyniki mogą sugerować, że regulacja aktywności kanałów Kir przez wewnątrzkomórkowe poliaminy jest kluczowa dla przebiegu reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3 oraz stanowią mocne potwierdzenie znaczenia kanałów Kir w elektrotaksji tych komórek.

Poza omówionymi powyżej związkami z grupy poliamin, kanały Kir podlegają regulacji przez wewnątrzkomórkowe jony magnezu. Aby zweryfikować ich udział w badanym układzie, do komórek dodano chlorek magnezu w wysokim stężeniu 10 mM (Ryc. 20 A, B; Tab. 12).



Rycina 20. Wpływ zwiększenia stężenia jonów Mg²⁺ w pożywce na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss3T3

A. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek w warunkach kontrolnych i w obecności MgCl₂ (10 mM). Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny pola elektrycznego o natężeniu 1 lub 3 V/cm w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Na osiach przedstawiono skalę w μm .

B. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego ϕ , dla całej populacji komórek, poddanej działaniu pola elektrycznego o określonym natężeniu, co dotyczy zarówno komórek kontrolnych, jak i migrujących w obecności MgCl₂ (10 mM). Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

C. Wynik analizy cytometrycznej obrazujący wpływ egzogennego dodania MgCl₂ w stężeniu 10 mM na poziom wewnątrzkomórkowych jonów magnezu.

Tabela 12. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o zróżnicowanym natężeniu w obecności chlorku magnezu MgCl₂ (10 mM).

Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji ± SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

	Kontrola		Mg ²⁺ 10 mM	
	1 V/cm (n = 71)	3 V/cm (n = 70)	1 V/cm (n = 67)	3 V/cm (n = 44)
Prędkość migracji [μm/min]	0,328 ± 0,019	0,392 ± 0,024	0,356 ± 0,023	0,416 ± 0,042
Droga całkowita [μm]	78,62 ± 4,629	94,09 ± 5,838	85,347 ± 5,439	99,933 ± 10,034
Przemieszczenie całkowite [μm]	50,52 ± 3,832	68,062 ± 5,395	41,743 ± 3,643	61,951 ± 8,401
Prędkość przemieszczania [μm/min]	0,211 ± 0,016	0,284 ± 0,022	0,174 ± 0,015	0,258 ± 0,035
CME	0,630 ± 0,030	0,696 ± 0,022	0,495 ± 0,026*	0,565 ± 0,031*
Cosinus β	0,465 ± 0,032	0,483 ± 0,030	0,140 ± 0,043*	0,296 ± 0,039*
Cosinus γ	0,599 ± 0,043	0,634 ± 0,040	0,163 ± 0,077*	0,447 ± 0,062*

Aplikacja jonów Mg²⁺ w stężeniu 10 mM doprowadziła do wyraźnego spadku kierunkowości ruchu komórek bez wpływu na prędkość migracji. Zahamowanie reakcji po wprowadzeniu wysokiego stężenia jonów magnezu może sugerować, że wpływa on na aktywność kanałów w sposób zdelokalizowany, maskując lokalne zmiany rozkładu poliamin, konieczne dla wywołania kierunkowej migracji. W celu weryfikacji, czy wprowadzone do pożywki jony Mg²⁺ w wysokim stężeniu przekładają się na ich poziom wewnątrzkomórkowy, przeprowadzono analizę cytometryczną komórek wybarwionych wskaźnikiem jonów magnezu mag-Fluo4. Potwierdziła ona, że aplikacja do pożywki soli MgCl₂ w stężeniu 10 mM przekłada się na wyraźną zmianę poziomu jonów Mg²⁺ wewnątrz komórek (Ryc. 20 C) (rejestrowano wzrost średniej intensywności fluorescencji komórek o 40% kontroli, po 30 minutach preinkubacji).

4.4.2. WPLYW ZAHAMOWANIA EKSPRESJI KANAŁU KIR4.2 NA REAKCJĘ ELEKTROTAKTYCZNĄ

Wyniki przedstawione w poprzednim podrozdziale dostarczają istotnych przesłanek, że w grupie dkomórkowych prostowniczych kanałów potasowych można doszukiwać się komponentów kluczowych dla przebiegu reakcji elektrotaktycznej badanych komórek. Szczególnie istotne wydają się być one dla warunkowania szybkich reakcji, obserwowanych w krótkim czasie po przyłożeniu pola elektrycznego. Do grupy kanałów Kir zalicza się szereg podrodzin, których przedstawiciele wykazują różną specyficzność tkankową oraz podatność na regulację przez związki drobnocząsteczkowe, co omówiono we wstępie. Wśród rodziny

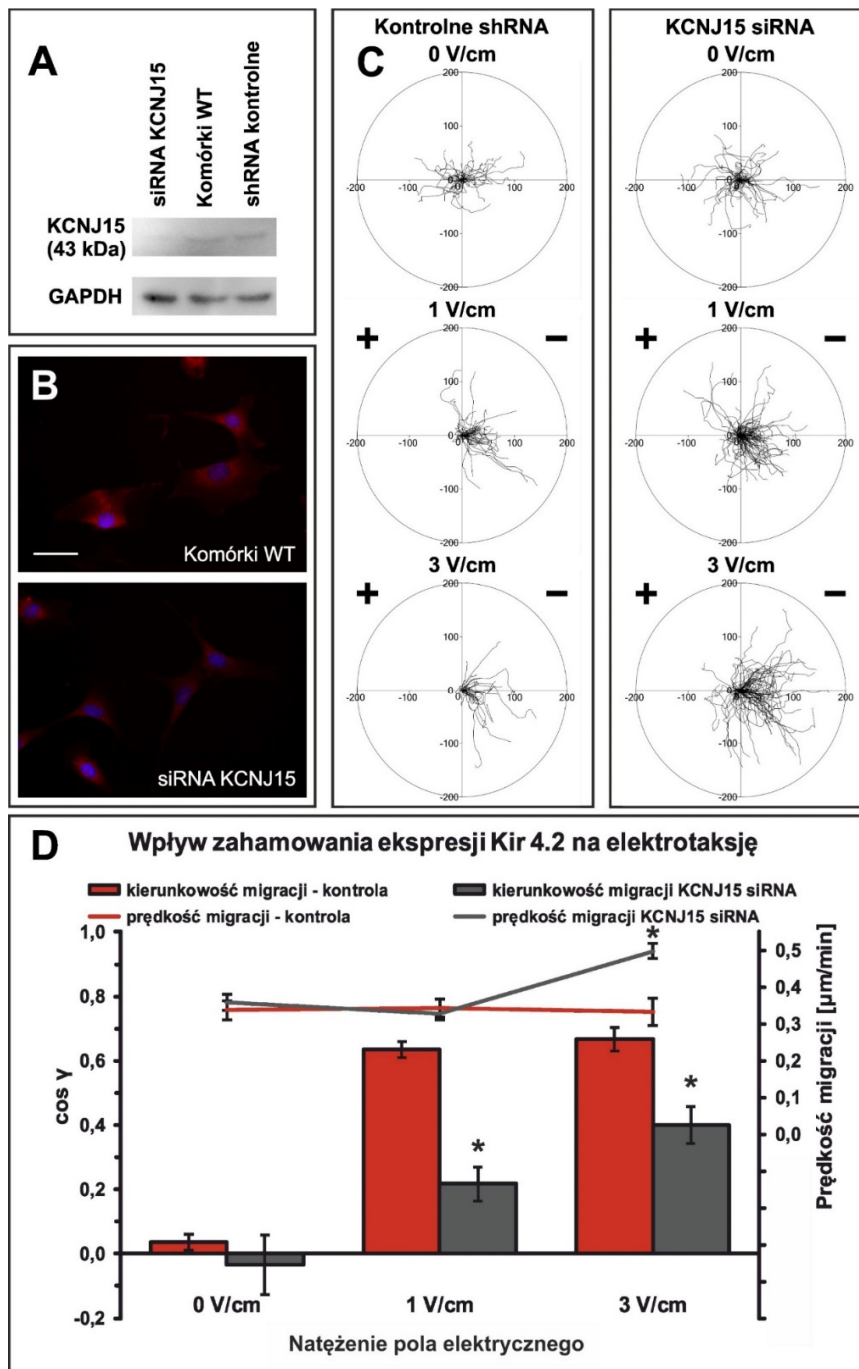
dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir szczególną rolę w kontekście prowadzonych badań zajmuje kanał Kir 4.2, kodowany przez gen KCNJ15. Jego zaangażowanie wykazano w warunkowaniu wysokiej persystencji ruchu komórek MEF, a także w ostatnim czasie sugerowano jego udział w odpowiedzi elektrotaktycznej unieśmiertelionych komórek nabłonka rogówki [66,86]. W obu tych przypadkach obserwowana funkcja była uzależniona od obecności wewnątrzkomórkowych poliamin. W związku z powyższymi informacjami podjęto decyzję o weryfikacji udziału tego konkretnego przedstawiciela rodziny w reakcji elektrotaktycznej badanych komórek Swiss 3T3. Obecność kanału Kir4.2 potwierdzono metodą biochemiczną i poprzez barwienia immunocytochemiczne (Ryc. 21 A, B). W dalszej kolejności uzyskano komórki z zahamowaną ekspresją genu KCNJ15, przez wprowadzenie do nich metodą transdukcji konstruktów kodujących specyficzne dla niego siRNA. Spadek ekspresji wspomnianego białka w całej populacji potwierdzono tymi samymi metodami (Ryc. 21 A, B), a następnie przeprowadzono szereg eksperymentów mających zweryfikować jego zaangażowanie w badany proces.

W pierwszej kolejności zbadano wydajność reakcji elektrotaktycznej uzyskanych komórek w polach o natężeniu 1 i 3 V/cm, porównując ją z komórkami transdukowanymi podobnym konstruktami, ale kodującym kontrolne shRNA (Ryc. 21 C, D; Tab. 13; Film 6).

Tabela 13. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o zróżnicowanym natężeniu.

Badaniu poddano komórki z zahamowaną ekspresją genu KCNJ15 i kontrolne. Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji \pm SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Natężenie PE	Kontrolne shRNA			KCNJ15 siRNA		
	0 V/cm (n=40)	1 V/cm (n=45)	3 V/cm (n=33)	0 V/cm (n=50)	1 V/cm (n=103)	3 V/cm (n=85)
Prędkość migracji [μ m/min]	0,337 \pm 0,025	0,343 \pm 0,025	0,333 \pm 0,037	0,359 \pm 0,022	0,328 \pm 0,017	0,498 \pm 0,021*
Droga całkowita [μ m]	80,806 \pm 6,010	82,292 \pm 5,926	79,860 \pm 8,814	86,081 \pm 5,329	78,645 \pm 4,054	119,414 \pm 5,093*
Przemieszczenie całkowite [μ m]	44,492 \pm 4,721	57,844 \pm 5,662	52,280 \pm 6,573	52,077 \pm 4,693	51,603 \pm 3,387	75,326 \pm 4,469*
Prędkość przemieszczania [μ m/min]	0,185 \pm 0,020	0,241 \pm 0,024	0,218 \pm 0,027	0,217 \pm 0,020	0,215 \pm 0,014	0,314 \pm 0,019*
CME	0,549 \pm 0,037	0,674 \pm 0,032	0,675 \pm 0,038	0,586 \pm 0,034	0,624 \pm 0,020	0,631 \pm 0,023
Cosinus β	0,078 \pm 0,058	0,504 \pm 0,032	0,498 \pm 0,040	0,089 \pm 0,056	0,227 \pm 0,034*	0,364 \pm 0,030*
Cosinus γ	0,037 \pm 0,105	0,634 \pm 0,049	0,667 \pm 0,051	-0,003 \pm 0,092	0,218 \pm 0,053*	0,400 \pm 0,057*

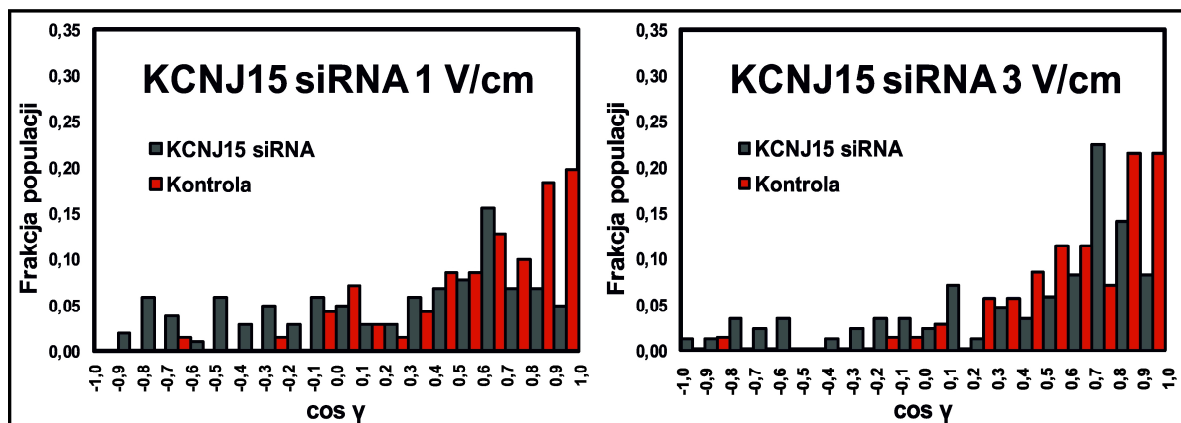


Rycina 21. Wpływ zahamowania genu KCNJ15 kodującego kanał Kir4.2 na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.

A. Analiza poziomu białka kanału Kir4.2 w komórkach kontrolnych i poddanych zahamowaniu ekspresji genu KCNJ15 – wynik analizy Western Blot. B. Zdjęcia komórek barwionych immunocytochemicznie na obecność kanału Kir4.2 w komórkach kontrolnych i poddanych zahamowaniu genu KCNJ15. Kanał czerwony – kanał Kir4.2, kanał niebieski – jądra komórkowe. Skala wynosi 50 µm. C. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek kontrolnych i wykazujących zahamowanie KCNJ15. Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny pola elektrycznego o natężeniu 1 lub 3 V/cm w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Przedstawiono również migrację w warunkach bezprądowych. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Na osiach przedstawiono skalę w µm. D. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego y, dla całej populacji komórek w warunkach bezprądowych i poddanej działaniu pola elektrycznego o określonym natężeniu, co dotyczy zarówno komórek kontrolnych, jak i wykazujących zahamowanie ekspresji genu KCNJ15. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Zahamowanie ekspresji genu KCNJ15 kodującego kanał Kir4.2 wyraźnie wpłynęło na kierunkowość migracji komórek Swiss 3T3 w polu o natężeniu 1 V/cm. Obserwowany spadek kosinusa kierunkowego γ do poziomu 0,218 jest istotny statystycznie i co ważne, nie towarzyszy mu upośledzenie aktywności migracyjnej komórek. Mniejszy, ale również istotny statystycznie efekt zniesienia kierunkowości, zaobserwowano w przypadku pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm.

W przypadku wprowadzania do komórek konstruktów genetycznych mających wpływać na ekspresję określonych genów należy liczyć się z tym, że nawet pomimo przeprowadzenia selekcji antybiotykami, uzyskuje się populację heterogenną, w której są komórki wykazujące różną liczbę wbudowanych w genom powtórzeń wprowadzonego konstruktów, lub komórki, które na skutek metylacji określonych promotorów wykazują różny stopień obniżenia wydajności ekspresji. W celu określenia jednorodności prezentowanej przez poszczególne komórki reakcji, sporządzono histogramy dla komórek z zahamowaniem KCNJ15, które zestawiono z warunkami kontrolnymi (Ryc. 22).

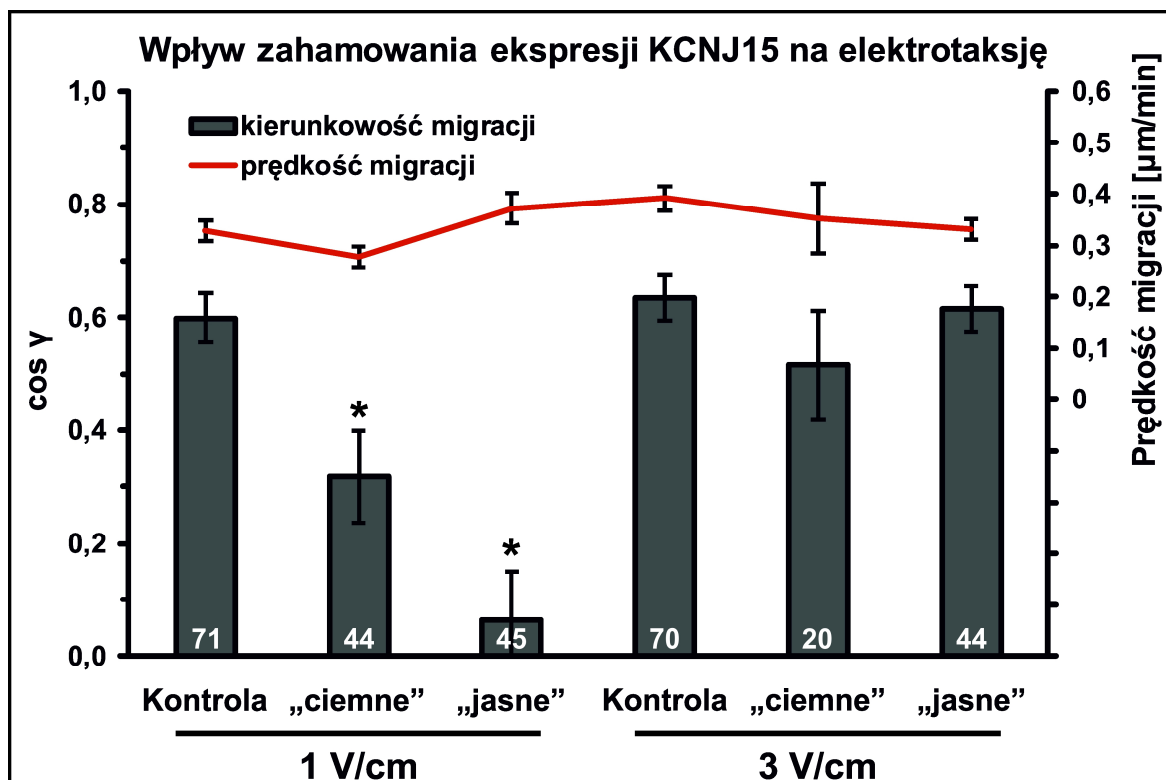


Rycina 22. Ocena jednorodności reakcji elektrotaktycznej w populacji komórek poddanych hamowaniu ekspresji KCNJ15.

Wyniki przedstawiono jako częstotliwość występowania w populacji komórek wykazujących kosinus kierunkowy γ od -1 do 1 w przedziałach wyznaczonych co 0,1. Uwzględniono średni kosinus γ dla danej komórki na przestrzeni czterogodzinnego eksperymentu, w którym komórki poddawano działaniu pola elektrycznego o natężeniu kolejno 1 i 3 V/cm. Rozkład przedstawiono dla populacji 103 i 85 komórek poddanych hamowaniu ekspresji KCNJ15, odpowiednio w 1 i 3 V/cm. Rozkłady zestawiono z komórkami kontrolnymi.

Analiza histogramów pozwala stwierdzić, że w populacji wciąż jest obecna liczna frakcja komórek, które reagują na pole elektryczne wyraźną migracją w kierunku katody. Frakcja ta ujawnia się zwłaszcza w polu elektrycznym o natężeniu 3 V/cm. W porównaniu z próbą kontrolną, wzbogaceni uległy frakcje, których kosinus kierunkowy oscyluje w okolicach wartości 0, bądź przyjmuje wartości ujemne, oznaczające migrację w kierunku anody.

W kolejnym kroku podjęto próbę zróżnicowania populacji na komórki wykazujące dużą liczbę wbudowanych powtórzeń konstruktów i komórki, które takich konstruktów nie posiadają, bądź mają ich niewiele. Wykonanie takiego eksperymentu było możliwe dzięki obecności w konstrukcie genu reporterowego, kodującego zielone białko fluorescencyjne (GFP). Prędkość migracji i kierunkowość ruchu, z uwzględnieniem rozgraniczenia na komórki „ciemne” (mała ilość konstruktów) i „jasne” (duża ilość konstruktów), porównano na rycinie 23.



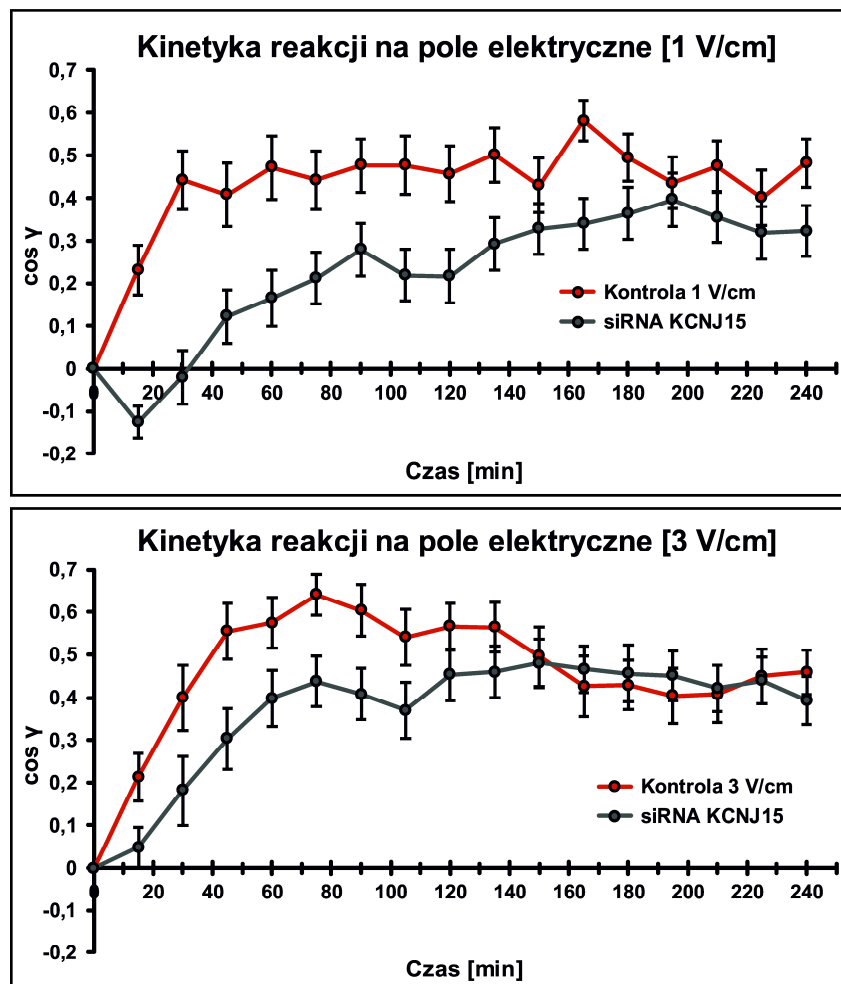
Rycina 23. Wpływ liczebności wbudowanego konstruktów prowadzącego do zahamowania genu KCNJ15 na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.

Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ , dla całej populacji komórek kontrolnych i wyodrębnionej na podstawie intensywności fluorescencji, subpopulacji komórek wykazujących zahamowanie ekspresji genu KCNJ15, poddanych działaniu pola elektrycznego o określonym natężeniu. Przyjęto założenie, że jasność komórek była proporcjonalna do liczby wbudowanych konstruktów. Słupki błędów oznaczają SEM. n – liczbę komórek dla każdego warunku przedstawiono u podstawy słupka. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Przeprowadzona analiza zakończyła się jedynie połowicznym sukcesem, gdyż spodziewaną korelację udało się zaprezentować wyłącznie w przypadku pola elektrycznego o natężeniu 1 V/cm. Zgonie z uzyskanymi wynikami można przyjąć, że komórki „ciemne”, które mają niewiele wbudowanych powtórzeń konstruktów hamującego KCNJ15, wykazują niepełne zahamowanie ekspresji tego genu, co przekłada się tylko na częściowy spadek kierunkowości ruchu. W przypadku komórek „jasnych” można założyć, że liczba wbudowanych

konstruktów była wystarczająca do pełnego zahamowania ekspresji badanego białka, co przełożyło się na zupełny brak kierunkowości ruchu w polu elektrycznym o natężeniu 1 V/cm. W przypadku natężenia pola wynoszącego 3 V/cm jasność świecenia komórek nie wykazywała związku ze stopniem zniesienia reakcji kierunkowej.

W związku z wyraźnym wpływem poprzednich modyfikacji aktywności bądź regulacji kanałów Kir na dynamikę reakcji elektrotaktycznej, aspekt ten zbadano również w odniesieniu do komórek wykazujących zahamowanie ekspresji KCN15. Wyniki analizy przedstawiono jako zmiany kosinusa kierunkowego γ na przestrzeni całego eksperymentu, zestawiając je z kontrolą (Ryc. 24).



Rycina 24. Wpływ zahamowania ekspresji genu KCN15 kodującego Kir4.2 na kinetykę reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3.

A. Dynamika reakcji elektrotaktycznej w polu o natężeniu 1 V/cm przedstawiona przez obrazowanie zmian w czasie kosinusa γ dla kolejnych 15-minutowych przedziałów czasu. Analiza położenia centroidu została wykonana na seriach poklatkowych wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Wykresy przedstawiają wartości średnie dla całej populacji \pm SEM.

B. Dynamika reakcji elektrotaktycznej w polu o natężeniu 3 V/cm. Analiza i przedstawienie wyników przeprowadzone jak powyżej.

Przeprowadzona analiza pozwoliła wykazać wyraźny wpływ zahamowania ekspresji kanału Kir4.2 na dynamikę reakcji elektrotaktycznej w obu badanych natężeniach pola elektrycznego. W przypadku natężenia 1 V/cm początkowo zaobserwowano nawet spadek do wartości ujemnych. Następnie miał miejsce stopniowy wzrost kierunkowości, która jednak stabilizuje się na poziomie niższym niż w przypadku kontroli. W przypadku wyższego natężenia wynoszącego 3 V/cm obserwowany przyrost kierunkowości ruchu jest wyraźnie opóźniony w porównaniu z warunkami kontrolnymi, jednak do zrównania wartości dochodzi po upływie 2,5h. Warto zauważyć, że wynik ten wykazuje wyraźną zbieżność z uzyskanym w przypadku farmakologicznego zahamowania kanałów Kir przy udziale BaCl₂.

4.5. WEWNĄTRZKOMÓRKOWE ŚCIEŻKI PRZESYŁANIA SYGNAŁU BIORĄCE UDZIAŁ W INDUKCJI KIERUNKOWEJ MIGRACJI FIBROBLASTÓW 3T3 W POLU ELEKTRYCZNYM

Otrzymane wyniki wskazują wyraźnie, że aktywność kanałów potasowych Kir jest istotnym czynnikiem w przebiegu reakcji elektrotaktycznej komórek 3T3. Z drugiej strony wykazano, że zmiana kierunku ruchu tych komórek po zmianie kierunku pola elektrycznego, związana jest z jednej strony z zaprzestaniem tworzenia wypustek i indukcją retrakcji od strony anody, a z drugiej, indukcją tworzenia nowych wypustek od strony katody. Z tego względu w kolejnych doświadczeniach przeprowadzono analizę wewnątrzkomórkowych mechanizmów prowadzących do wywołania skurczu komórki od strony anody i tworzenia lamellipodium od strony katody.

4.5.1. WEWNĄTRZKOMÓRKOWE MECHANIZMY ODPOWIEDZIALNE ZA GENEROWANIE SKURCZU OD STRONY ANODY

Analiza kinetyki zmiany kierunku ruchu po odwróceniu biegunów pola elektrycznego (rozdział 4.3) pozwoliła na stwierdzenie, że w pierwszej chwili po zmianie kierunku pola następuje zahamowanie tworzenia nowych wypustek od strony anody, a następnie zaobserwowano pewne zmiany morfologiczne sugerujące również rozpoczęcie od tej strony komórki aktywnej retrakcji. Dla potwierdzenia, że mamy do czynienia z tym procesem, w kolejnych eksperymentach prześledzono zmiany położenia punktów adhezji komórki do podłoża od strony anody po zmianie kierunku pola. W tym celu użyto komórek 3T3 w których ekspresji ulegało białko winkulina-EmGFP.

4.5.1.1. DYNAMIKA KONTAKTÓW ZOGNISKOWANYCH

Winkulina jest białkiem ściśle związanym z organizacją kontaktów komórki z podłożem, wchodząc w skład miejsc kontaktowych i kontaktów zogniskowanych. Obserwacja dynamiki przebudowy takich miejsc może dostarczyć cennych informacji na temat interakcji z podłożem komórek migrujących elektrotaktycznie. Podczas obrazowania tego białka szczególny nacisk położono na wykorzystanie mikroskopii TIRF, która pozwala selektywnie obserwować cząsteczki zaangażowane w proces adhezji, bez wzbudzania puli białka zgromadzonej w głębi komórki. Analizie poddano dynamikę zmian rozmieszczenia winkuliny po stronie anody w następstwie aplikacji pola elektrycznego oraz po zmianie jego kierunku. Stwierdzono, że od strony anody następuje degradacja i aktywne przesuwanie punktów przyczepu w kierunku ciała komórki, co potwierdza obserwacje dynamiki zmian morfologicznych, wskazujące, że dochodzi tutaj do aktywnego skurczu i retrakcji tej części komórki (Ryc. 25, Film 7).

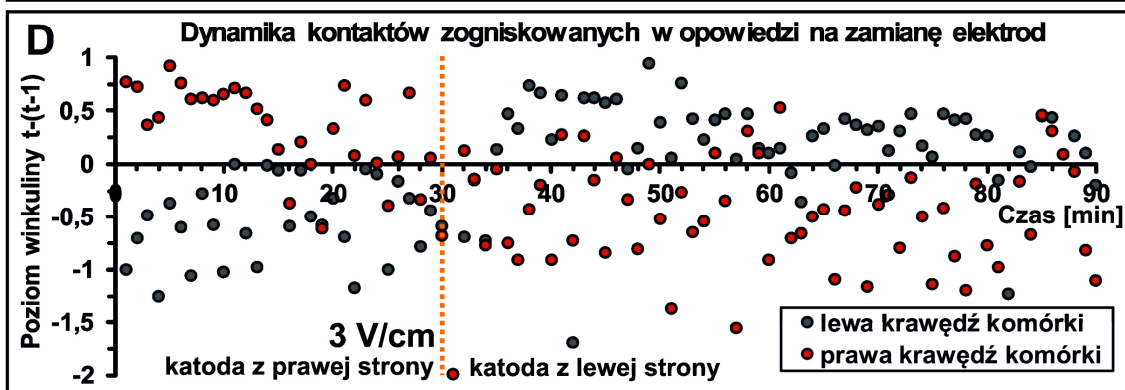
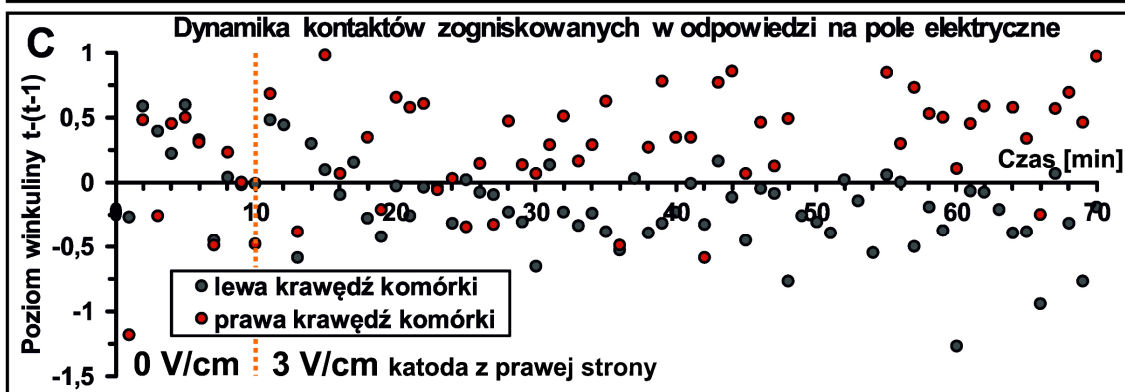
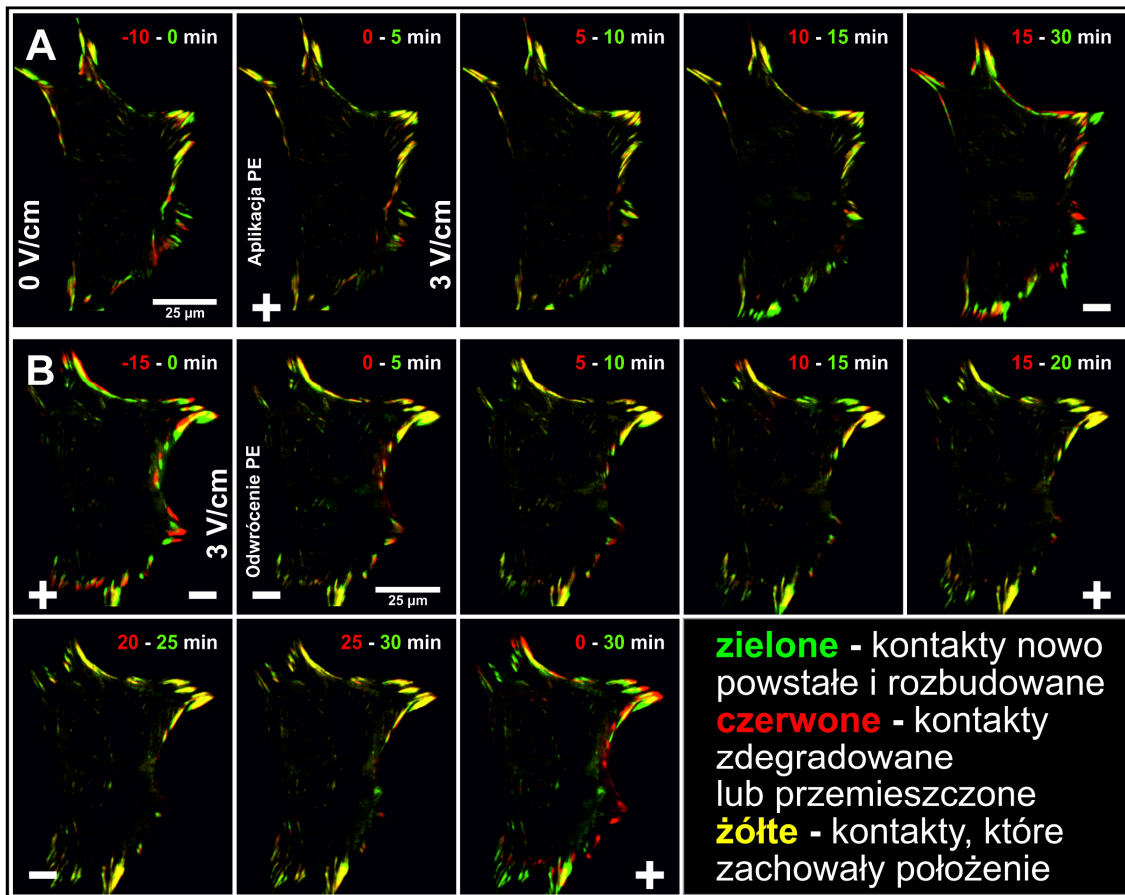
Przeprowadzona analiza ilościowa pozwala stwierdzić, że w warunkach bezprądowych zdarzenia rozbudowy i degradacji kontaktów zogniskowanych nie zachodzą w sposób zlokalizowany, natomiast umieszczenie komórki w polu elektrycznym prowadzi do separacji sygnałów i zarysowania wyraźnej tendencji do degradacji po stronie anody po upływie 5 minut od zadziałania bodźca. W przypadku reakcji na odwrócenie kierunku pola elektrycznego obserwowana reakcja jest bardziej dynamiczna i wyraźne przesunięcie równowagi ma miejsce w czasie 3-4 minut, co sugeruje, że obserwowane zmiany mogą wynikać z aktywnego skurczu po stronie „nowej anody”.

Rycina 25. (na kolejnej stronie) Dynamika kontaktów zogniskowanych w reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3

A-B. Obrazowanie rozkładu winkuliny sprzęgniętej z białkiem fluorescencyjnym, przy użyciu mikroskopii TIRF. Sekwencja zdjęć różnicowych pomiędzy wybranymi punktami czasowymi, dobranymi odpowiednio w celu wykazania wysokiej dynamiki przebudowy kontaktów zogniskowanych w odpowiedzi na aplikację pola elektrycznego i zmianę jego biegunów. Czerwone rejony oznaczają miejsca, w których doszło do degradacji lub zerwania kontaktów z podłożem w określonym przedziale czasu. Zielone rejony oznaczają kontakty rozbudowane lub nowopowstałe w określonym przedziale czasu.

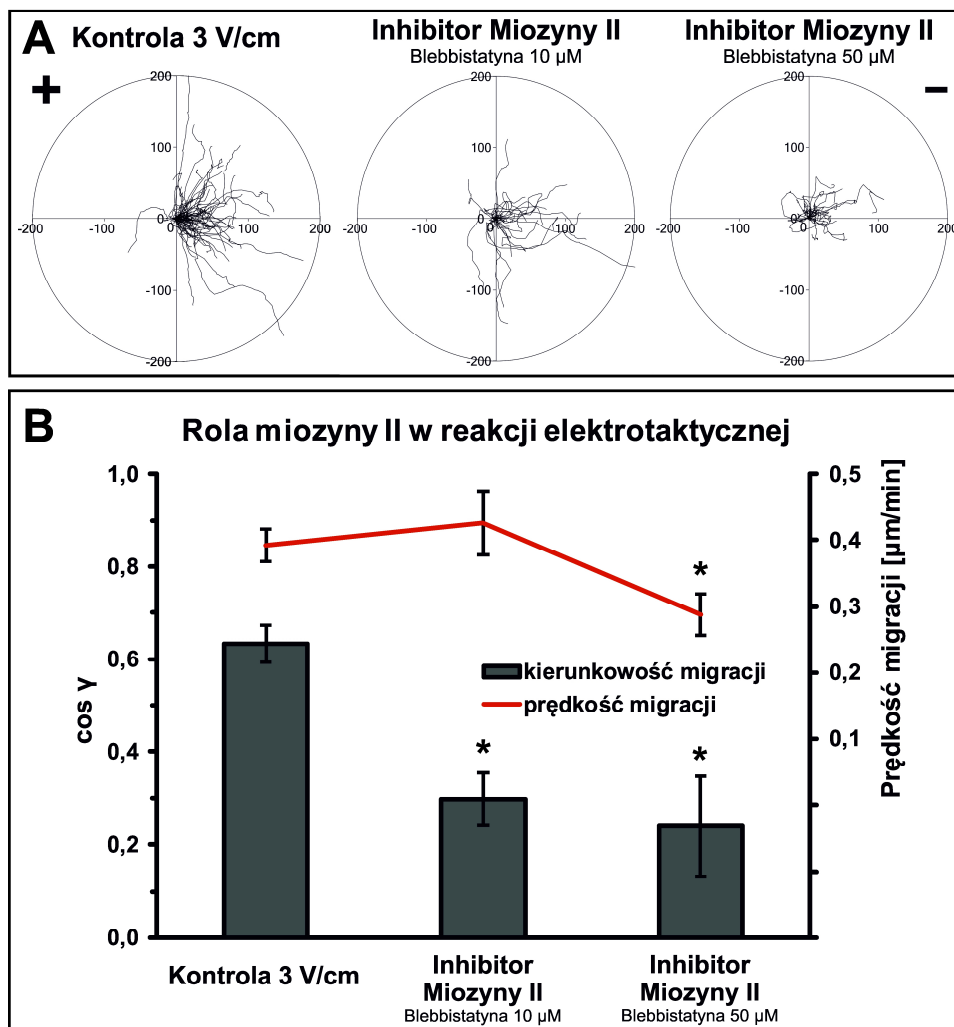
C. Analiza ilościowa dynamiki rozmieszczenia winkuliny zlokalizowanej w pobliżu podłoża w odpowiedzi na aplikację pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm. Przerzywana pomarańczowa linia oznacza moment aplikacji pola elektrycznego. Analizie poddano różnice powstałe na przestrzeni kroku czasowego wynoszącego 1 min, zlokalizowane na obszarze w odległości do 2,5 μm od krawędzi skierowanej do określonej elektrody. Wartości dodatnie oznaczają przyrost sygnału w badanym rejonie, natomiast wartości ujemne oznaczają jego ubytek.

D. Analogiczna analiza przeprowadzona dla zmiany kierunku migracji w odpowiedzi na zmianę kierunku pola elektrycznego. Przerzywana pomarańczowa linia oznacza zmianę elektrod.



4.5.1.2. ROLA MIOZINY II W REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ KOMÓREK SWISS 3T3

Ponieważ jednym z najważniejszych białek odpowiedzialnych za generowanie skurczu w komórkach niemięśniowych jest miozyna II, dla potwierdzenia, że generowanie skurczu od strony anody jest istotnym elementem reakcji elektrotaktycznej, w kolejnych doświadczeniach zbadano efekt zahamowania aktywności miozyny II na wydajność elektrotaksji komórek Swiss 3T3. W tym celu posłużono się drobnocząsteczkowym inhibitorem miozyny II – blebbistatyną (Ryc. 26, Tab. 14).



Rycina 26. Wpływ farmakologicznego zahamowania aktywności miozyny II na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.

A. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek w warunkach kontrolnych i w obecności blebbistatyny w stężeniu 10 i 50 μM. Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Na osiach przedstawiono skalę w μm. B. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ , dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm, przy braku lub w obecności blebbistatyny. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Tabela 14. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm przy braku lub w obecności blebbistatyny – inhibitora miozyny II.

Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji \pm SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$

	Kontrola 3 V/cm (n = 71)	Blebbistatyna 10 μ M (n = 30)	Blebbistatyna 50 μ M (n = 30)
Prędkość migracji [μ m/min]	0,392 \pm 0,024	0,426 \pm 0,048	0,287 \pm 0,031*
Droga całkowita [μ m]	94,09 \pm 5,838	102,232 \pm 11,441	68,858 \pm 7,548*
Przemieszczenie całkowite [μ m]	68,062 \pm 5,395	66,046 \pm 9,736	30,210 \pm 4,125*
Prędkość przemieszczania [μ m/min]	0,284 \pm 0,022	0,275 \pm 0,041	0,126 \pm 0,017*
CME	0,696 \pm 0,022	0,601 \pm 0,045	0,459 \pm 0,038*
Cosinus β	0,483 \pm 0,030	0,297 \pm 0,056*	0,184 \pm 0,043*
Cosinus γ	0,634 \pm 0,040	0,296 \pm 0,094*	0,239 \pm 0,107*

Zahamowanie miozyny wyraźnie wpływa na kierunkowość migracji komórek w polu elektrycznym, skutkując jej obniżeniem o ponad połowę. Spadek kierunkowości postępuje wraz ze wzrostem stężenia inhibitora, jednak jego wysokie stężenie wpływa dodatkowo na aktywność migracyjną i prowadzi do wyraźnych zmian morfologii komórek.

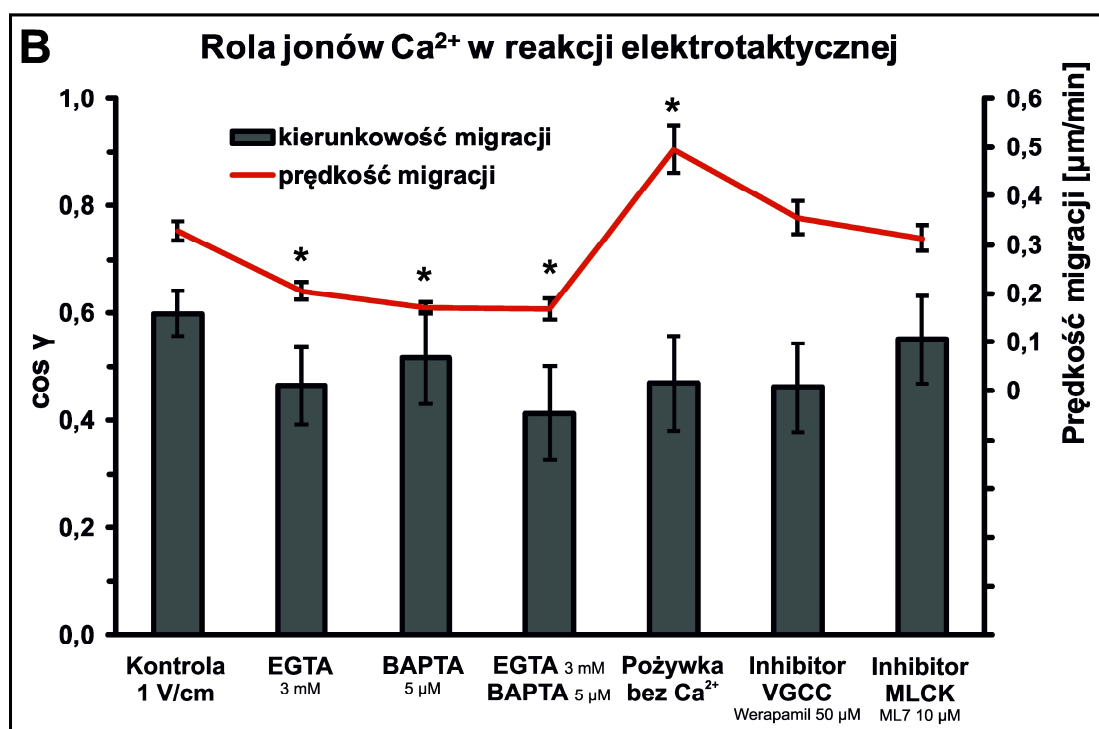
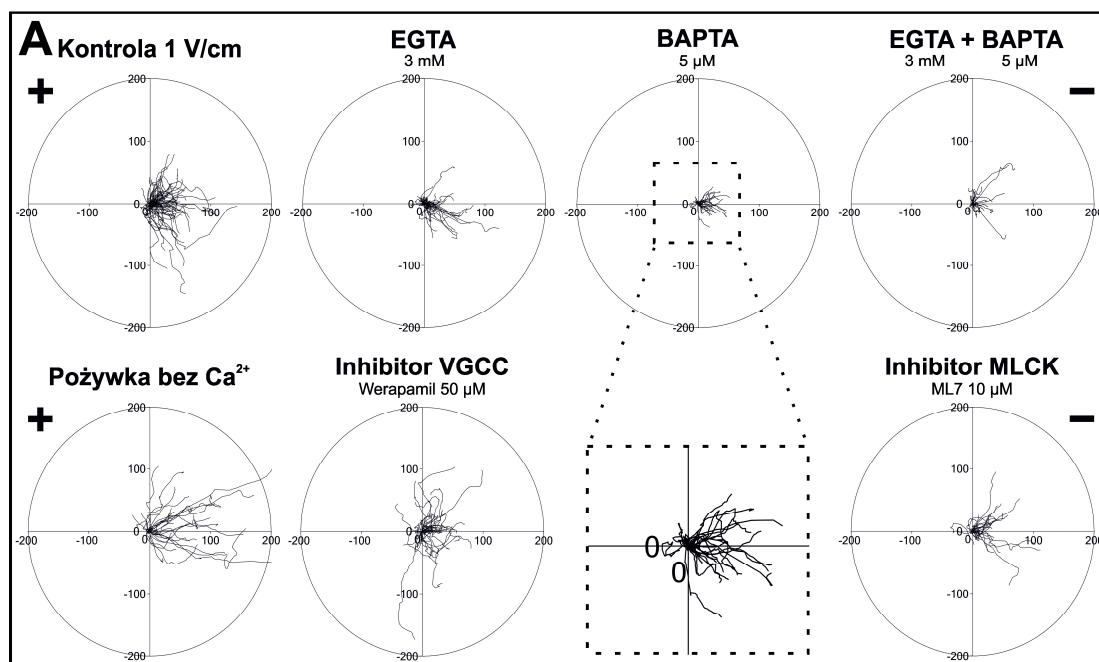
Powyższy wynik sugeruje, że jednym z kluczowych efektów działania pola elektrycznego jest indukcja skurczu komórki po stronie anody. W komórkach niemięśniowych aktywność miozyny II i jej interakcja z mikrofilamentami aktywnymi podlega ścisłej regulacji przez liczne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. Jest to niezbędne, aby reakcja skurczu szkieletu aktomiozynowego i wywołanie retrakcji, były generowane w dokładnie określonym miejscu i czasie, np. w odpowiedzi na bodźce docierające z zewnątrz komórki. W literaturze opisano szczegółowo dwa kluczowe mechanizmy nadrzędne, rzutujące na aktywność miozyny II. Pierwszy z nich opiera się na zmianach poziomu wapnia w cytoplazmie, który wiąże się z kalmoduliną, która z kolei w tej postaci aktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny – MLCK. Tak zaktywowany enzym fosforyluje specyficzne reszty aminokwasowe w cząsteczce miozyny, powodując jej aktywację i umożliwiając docelowo interakcję z filamentami aktywnymi [93,121]. Równolegle z powyższą ścieżką, w komórkach funkcjonuje inny aktywator miozyny, kinaza serynowo-treoninowa ROCK. Białko to znajduje się pod kontrolą przełącznika molekularnego RhoA, jednego z kluczowych elementów sygnalizacyjnych odpowiadających za polaryzację i kierunkową migrację komórek. Zaktywowana kinaza ROCK fosforyluje zarówno lekkie łańcuchy miozyny,

prowadząc do jej aktywacji, jak i wpływa hamująco na aktywność fosfatazy MLC – enzymu, przeciwdziałającego aktywacji miozyny II [107,122]. Obie wspomniane ścieżki mogą wykazywać kooperację w komórkach niemięśniowych, wspólnie prowadząc do wywołania lokalnego skurczu, ale też mogą funkcjonować niezależnie od siebie. W dalszej części pracy poddano weryfikacji udział kluczowych elementów obu ścieżek w kontroli reakcji elektrotaktycznej fibroblastów Swiss 3T3.

4.5.1.3. ROLA WAPNIA W GENEROWANIU SKURCZU PODCZAS ELEKTROTAKSJI KOMÓREK SWISS 3T3

Ponieważ w literaturze naukowej wielokrotnie wskazywano na zależność wydajności elektrotaksji od obecności zewnątrzkomórkowych jonów wapnia, w pierwszej kolejności sprawdzono czy elektrotaksja komórek 3T3 jest regulowana przez obecność tych jonów w środowisku. W celu oceny udziału ścieżki wapniowej w wywoływaniu retrakcji i wydajnej reakcji elektrotaktycznej zbadano przebieg reakcji elektrotaktycznej w pożywce bezwapniowej, a także w obecności wewnątrz i zewnątrzkomórkowych chelatorów jonów Ca^{2+} (odpowiednio BAPTA-AM i EGTA). Poddano również hamowaniu kanały wapniowe bramkowane napięciem (VGCC) przy użyciu ich inhibitora – werapamilu w stężeniu 50 μM . Ostatecznie, przy użyciu inhibitora ML7 (w stężeniu 10 μM) zahamowano aktywność kinazy MLCK, czyli głównego elementu sygnalizacyjnego łączącego napływ jonów wapnia do cytoplazmy z wywołaniem skurczu cytoszkieletu aktomiozynowego (Ryc. 27, Tab. 15).

Przeprowadzone eksperymenty nie potwierdzają udziału jonów wapnia w reakcji elektrotaktycznej badanych komórek. W żadnym przypadku spadek kierunkowości ruchu nie był istotny statystycznie. Zastosowanie chelatorów skutkowało również obniżeniem prędkości ruchu, co może do pewnego stopnia utrudniać interpretację wyników, jednakże jak pokazano na powiększonym fragmencie wykresu kołowego, spadek aktywności migracyjnej nie pociągał za sobą zaburzenia kierunkowości ruchu. Dodatkowym argumentem na rzecz braku bezpośredniego zaangażowania jonów wapnia w reakcji elektrotaktycznej w tym modelu jest brak wpływu zahamowania kanałów wapniowych przez werapamil na kierunkową migrację komórek Swiss 3T3.



Rycina 27. Wpływ ingerencji w gospodarkę wapniową na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.

A. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek w warunkach kontrolnych, w pożywce bezwapniowej, w obecności chelatorów jonów Ca^{2+} , werapamilu i inhibitora kinazy MLCK. Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny pola elektrycznego o natężeniu 1 V/cm w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Na osiach przedstawiono skalę w μm .

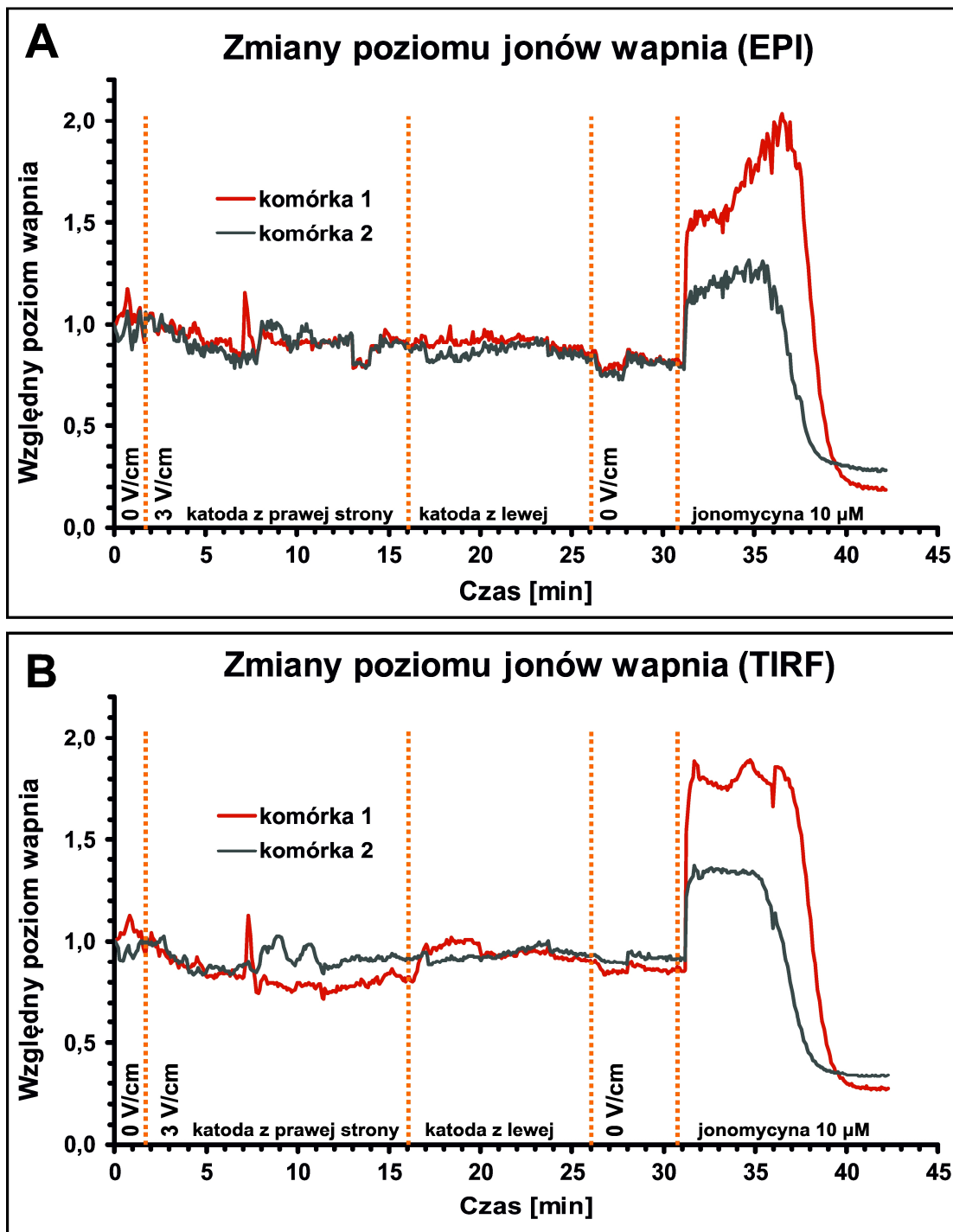
B. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ , dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o natężeniu 1 V/cm, w warunkach kontrolnych oraz przy zastosowaniu czynników opisanych uprzednio. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Tabela 15. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o natężeniu 1 V/cm. Reaktywność komórek badano w różnych warunkach wpływających na gospodarkę wapniową: pożywce bezwapniowej, w obecności chelatorów oraz inhibitorów kanałów wapniowych, a także efektorowej kinazy MLCK.

Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji \pm SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

	Kontrola 1 V/cm (n = 71)	EGTA 3 mM (n = 49)	BAPTA 5 μ M (n = 29)	EGTA 3 mM+ BAPTA 5 μ M (n = 26)	Pożywka bez Ca ²⁺ (n = 30)	Inhibitor VGCC 50 μ M (n = 37)	Inhibitor MLCK 10 μ M (n = 25)
Prędkość migracji [μ m/min]	0,328 \pm 0,019	0,205 \pm 0,018*	0,170 \pm 0,012*	0,168 \pm 0,021*	0,495 \pm 0,049*	0,355 \pm 0,034	0,314 \pm 0,025
Droga całkowita [μ m]	78,62 \pm 4,629	49,308 \pm 4,412	40,755 \pm 2,760	40,403 \pm 5,047	118,892 \pm 11,740	85,314 \pm 8,108	75,382 \pm 6,094
Przemieszczenie całkowite [μ m]	50,52 \pm 3,832	34,067 \pm 4,055*	26,427 \pm 2,705*	26,783 \pm 4,717*	90,938 \pm 10,674*	50,142 \pm 5,874	51,389 \pm 6,234
Prędkość przemieszczenia [μ m/min]	0,211 \pm 0,016	0,142 \pm 0,017*	0,110 \pm 0,011*	0,112 \pm 0,020*	0,379 \pm 0,044*	0,209 \pm 0,024	0,214 \pm 0,026
CME	0,630 \pm 0,030	0,649 \pm 0,035	0,641 \pm 0,046	0,600 \pm 0,046	0,737 \pm 0,029*	0,610 \pm 0,037	0,663 \pm 0,047
Cosinus β	0,465 \pm 0,032	0,497 \pm 0,044	0,487 \pm 0,047	0,376 \pm 0,055	0,472 \pm 0,061	0,362 \pm 0,059	0,467 \pm 0,046
Cosinus γ	0,599 \pm 0,043	0,464 \pm 0,071	0,516 \pm 0,086	0,413 \pm 0,087	0,469 \pm 0,088	0,461 \pm 0,082	0,550 \pm 0,082

W celu potwierdzenia powyższych wyników przeprowadzono obserwację zmian poziomu jonów Ca²⁺ w komórkach poddanych działaniu pola elektrycznego. Najczęściej postulowany mechanizm udziału jonów wapnia w reakcji elektrotaktycznej polega na indukcji pod wpływem pola elektrycznego napływu tych jonów z zewnątrz komórki bądź obejmuje lokalny wzrost wywołany wpływem z magazynów wewnątrzkomórkowych. Obrazowanie przeprowadzono stosując barwnik fluorescencyjny Fluo-4 i mikroskopię fluorescencyjną szerokiego pola oraz TIRF. Zwłaszcza druga z metod wykazuje wysoką czułość w zastosowaniu do powyższych pomiarów, pozwalając na selektywne obserwacje zmian poziomu jonów wapnia w płaszczyźnie bliskiej podłożu, w sposób wolny od artefaktów wynikających ze zmian morfologii komórki. Działanie metody potwierdzono przez zastosowanie jonomycyny - jonoforu zwiększającego swobodę przenikania jonów wapnia przez błonę komórkową. Zarejestrowane serie zdjęć poddano analizie ilościowej poprzez pomiary średniej intensywności fluorescencji (Ryc. 28).



Rycina 28. Zmiany poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego.

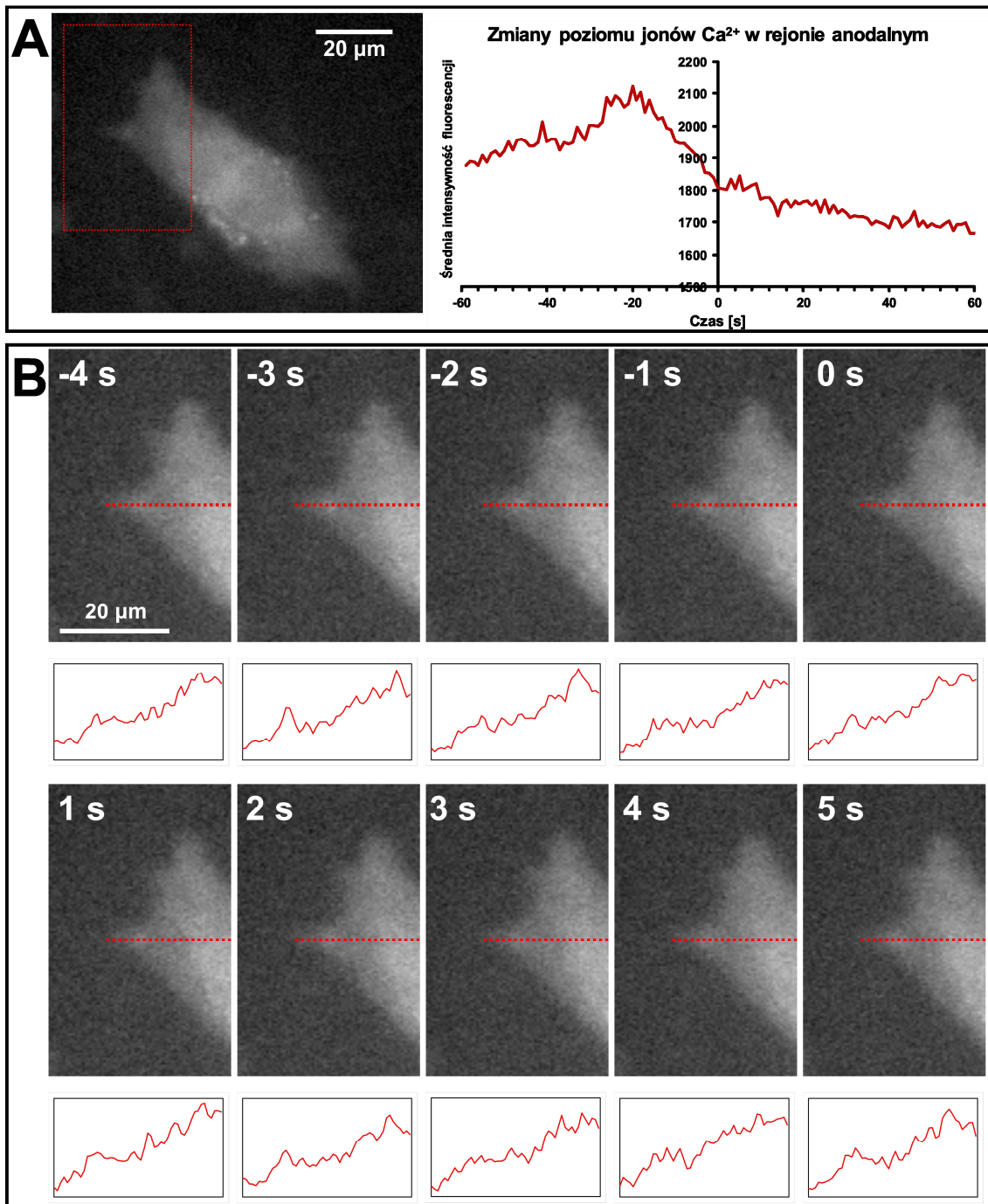
Komórki wybarwione wskaźnikiem poziomu jonów wapnia Fluo4-AM poddano sekwencji zdarzeń polegającej na aplikacji pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm, odwrócenia jego kierunku i wyłączenia. Następnie do pożywki zaaplikowano jonofor ułatwiający napływ zewnątrzkomórkowych jonów wapnia na teren cytoplazmy (jonomycynę 10 μM), co stanowiło pozytywną próbę kontrolną dla stosowanej metody. Fluorescencję komórek rejestrowano przy użyciu mikroskopii epifluorescencyjnej (A) oraz TIRF (B). Wykresy przedstawiają względne zmiany poziomu fluorescencji komórek w czasie (które są proporcjonalne do zmian poziomu jonów wapnia w badanych komórkach). Linie przedstawiają wartości dla dwóch niezależnych komórek.

Wykazano, że pole elektryczne o fizjologicznym natężeniu nie powoduje napływu jonów wapnia do badanych komórek, ani wzrostu stężenia wapnia kosztem magazynów wewnątrzkomórkowych, w sposób przekładający się na mierzalny wzrost ich stężenie w skali całej komórki. Zarówno aplikacja pola, jak i późniejsza zmiana jego polaryzacji nie powodowała zmian poziomu wapnia przewyższających spontaniczne wahania. Dopiero zastosowanie jako kontroli pozytywnej jonoforu (jonomycyny) skutkowało istotnym wzrostem fluorescencji stosowanego barwnika. Analogiczne wyniki uzyskano przy pomocy obu wykorzystanych metod obrazowania.

W celu zbadania czy napływ jonów w reakcji elektrotaktycznej nie występuje wyłącznie lokalnie po stronie anodalnej, czyli tam, gdzie mógłby bezpośrednio generować skurcz cytoszkieletu aktomiozynowego, poddano obserwacji właśnie ten rejon. Dopuszczając ewentualność, że zachodzące zmiany mogłyby być bardzo subtelne i krótkotrwałe, obraz rejestrowano przy dużym powiększeniu z gęstym krokiem czasowym. Na rycinie 29 przedstawiono zdjęcia kluczowego obszaru, wraz ze szczegółową analizą ilościową. Również w tym układzie nie zaobserwowano wzrostu stężenia wapnia w cytoplazmie komórki w odpowiedzi na zastosowane pole elektryczne. Widoczny błysk wystąpił spontanicznie i poprzedzał aplikację pola. Rozkład fluorescencji na przedstawionym profilu nie uległ zmianie co można rozumieć jako brak kierunkowego napływu jonów wapnia od strony błony komórkowej.

Kolejnym argumentem wskazującym, że indukcja skurczu komórki od strony anody nie jest związana z sygnalizacją wapniową są wyniki doświadczeń z zastosowaniem inhibitora kinazy MLCK, zależnego od wapnia enzymu aktywującego miozynę II. Zastosowanie inhibitora ML7 nie spowodowało istotnego statystycznie obniżenia reakcji kierunkowej komórek 3T3 w polu elektrycznym (Ryc. 29).

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że pod wpływem pola elektrycznego nie następuje wzrost stężenia jonów wapnia w części komórki skierowanej do anody, a więc w tej części w której obserwowano aktywną retrakcję. W powiązaniu z obserwacją, że obniżenie stężenia jonów wapniowych zarówno wewnątrz, jak i zewnątrzkomórkowych, zahamowanie kanałów wapniowych oraz zahamowanie kinazy MLCK nie wpływają na reakcję elektrotaktyczną komórek 3T3, pozwala to na stwierdzenie, że sygnalizacja wapniowa w tym modelu nie jest istotnym elementem wydajnej elektrotaksji.



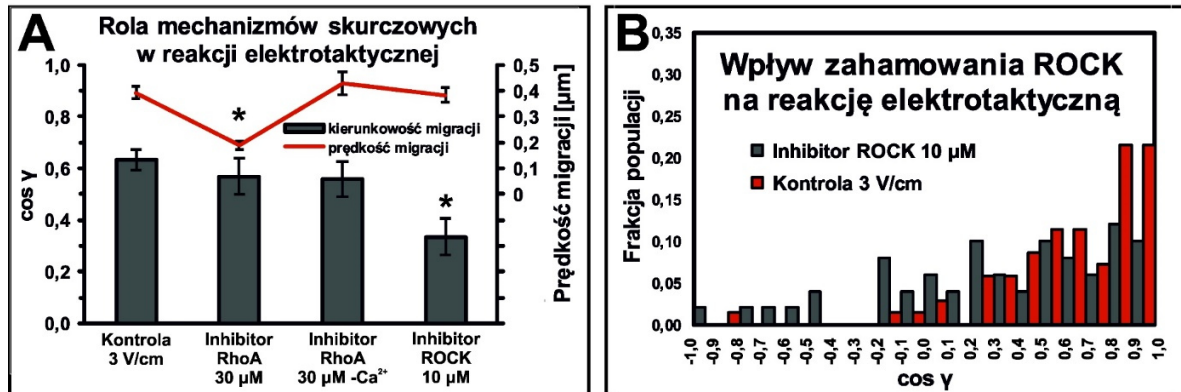
Rycina 29. Obrazowanie lokalnych zmian poziomu jonów wapnia po stronie anodalnej w odpowiedzi na umieszczenie komórki w polu elektrycznym.

A. Obraz komórki rejestrowano z krokiem wynoszącym 1 s, przy użyciu mikroskopu Leica DMI6000B, wyposażonego w obiektyw o powiększeniu 100x. Komórka wcześniej została załadowana barwnikiem Fluo4-AM. Przeprowadzono szczegółową analizę ilościową zmian poziomu fluorescencji w rejonie zlokalizowanym po stronie anody, bezpośrednio przed i po aplikacji pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm.

B. W okresie 10 sekund bezpośrednio sąsiadujących z momentem aplikacji pola elektrycznego wykonano serię profili rozkładu fluorescencji skrajnego rejonu skierowanego do anody. Czerwona przerywana linia oznacza miejsce, w którym wykonywano pomiar. Wyniki pomiaru każdorazowo zamieszczono pod zdjęciami.

4.5.1.4. UDZIAŁ KINAZY ROCK W REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ

Jak omówiono powyżej, skurcz z udziałem miozyny II jest w komórce regulowany alternatywnie przez kinazę ROCK, zależną od aktywności białka RhoA – małej GTPazy z rodziny Rho. W kolejnym etapie zweryfikowano wpływ zahamowania poszczególnych elementów powyższej ścieżki na kierunkowość ruchu badanych komórek (Ryc. 30 A, Tab. 16).



Rycina 30. Wpływ farmakologicznego zahamowania aktywności elementów sygnalizacyjnej ścieżki Rho/ROCK na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.

A. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ , dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm, przy braku lub w obecności badanych inhibitorów. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

B. Rozkład kierunkowości ruchu w polu elektrycznym komórek poddanych zahamowaniu kinazy ROCK. Wyniki przedstawiono jako częstotliwość występowania w populacji komórek wykazujących kosinus kierunkowy γ od -1 do 1 w przedziałach wyznaczanych co 0,1. Uwzględniono średni kosinus γ dla danej komórki na przestrzeni czterogodzinnego eksperymentu, w którym komórki poddawano działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm. Rozkład przedstawiono dla populacji 50 komórek poddanych hamowaniu aktywności ROCK. Rozkłady zestawiono z komórkami kontrolnymi.

Tabela 16. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm przy braku lub w obecności inhibitorów ścieżki Rho/ROCK i pożywki bezwapniowej.

Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji \pm SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

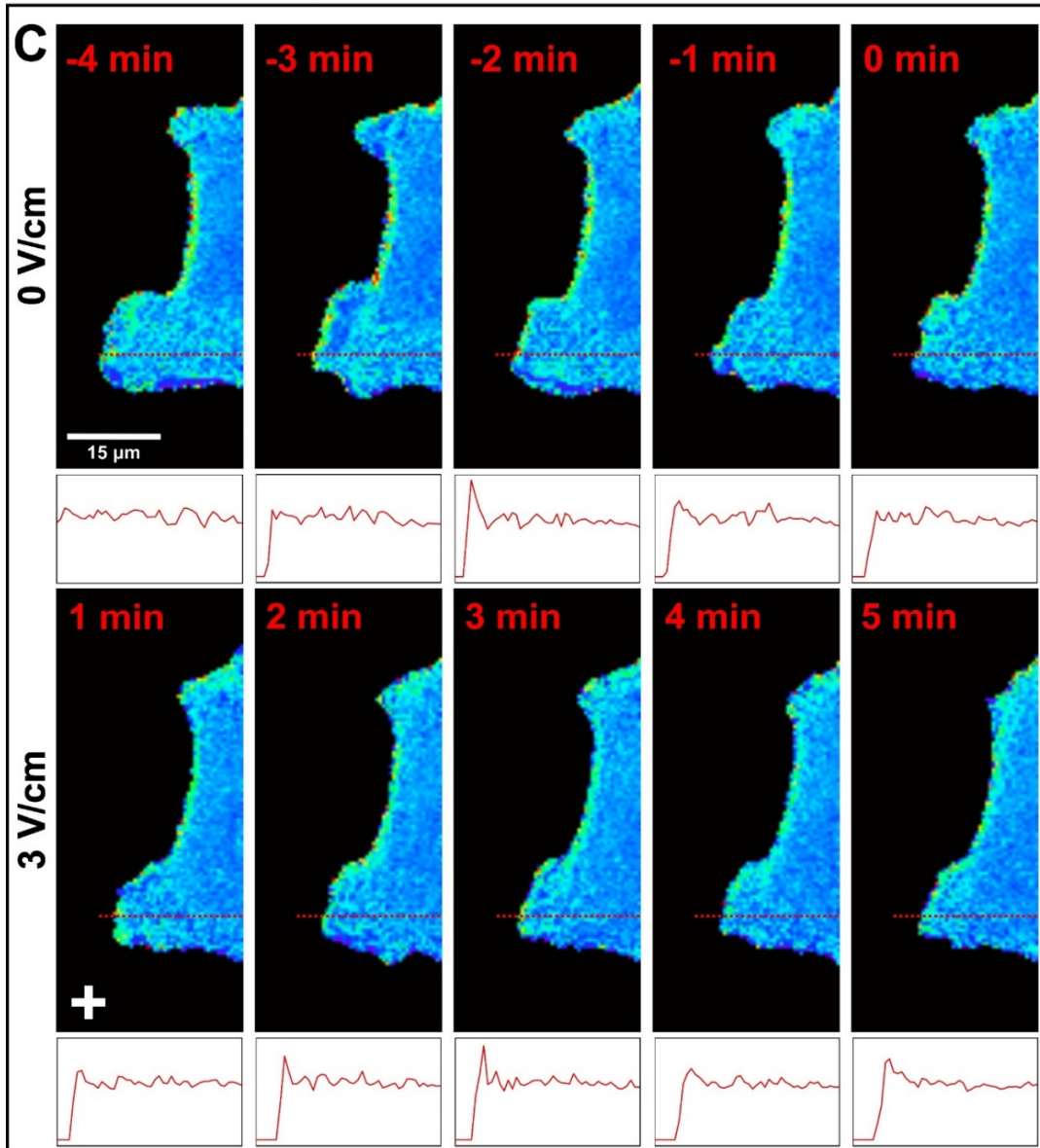
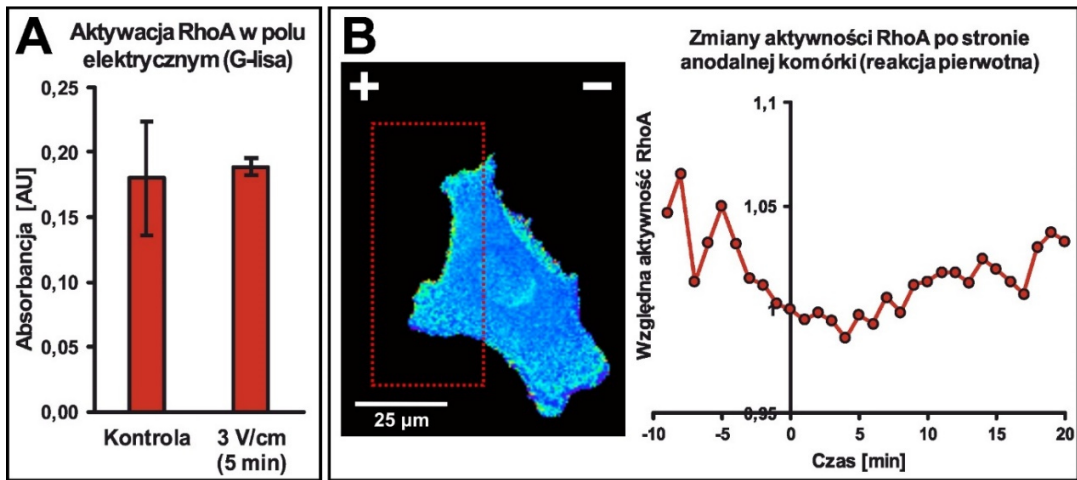
	Kontrola 3 V/cm (n = 71)	Inhibitor RhoA 30 μM (n = 30)	Inhibitor RhoA 30 μM + brak Ca ²⁺ (n = 34)	Inhibitor ROCK 10 μM (n = 50)
Prędkość migracji [μm/min]	0,392 ± 0,024	0,191 ± 0,017*	0,429 ± 0,043	0,384 ± 0,030
Droga całkowita [μm]	94,09 ± 5,838	45,913 ± 4,183*	102,947 ± 10,236	92,135 ± 7,286
Przemieszczenie całkowite [μm]	68,062 ± 5,395	32,140 ± 4,221*	85,457 ± 9,868	58,446 ± 6,373
Prędkość przemieszczania [μm/min]	0,284 ± 0,022	0,134 ± 0,018*	0,356 ± 0,041	0,244 ± 0,027
CME	0,696 ± 0,022	0,660 ± 0,040	0,772 ± 0,038	0,611 ± 0,030*
Cosinus β	0,483 ± 0,030	0,467 ± 0,038	0,555 ± 0,049	0,368 ± 0,047*
Cosinus γ	0,634 ± 0,040	0,569 ± 0,070	0,557 ± 0,067	0,334 ± 0,071*

Wykres A na rycinie 30 wyraźnie pokazuje, że największy wpływ na kierunkowość migracji komórek w polu elektrycznym wywiera zahamowanie kinazy ROCK. Histogram rozkładu kosinusów kierunkowych γ (Ryc. 30 B) sugeruje zróżnicowany wpływ zastosowanego inhibitora na komórki w populacji, jednak znaczne zniesienie kierunkowości ruchu części z nich, a co za tym idzie pojawienie się znacznej frakcji komórek migrujących w losowych kierunkach, przekłada się na istotny spadek wartości średnich dla całej populacji. Zaskakującą obserwacją było stwierdzenie, że w badanym układzie kinaza ROCK nie funkcjonuje pod kontrolą białka RhoA. Zahamowanie białka RhoA w komórkach Swiss 3T3 nie powodowało istotnego statystycznie zmniejszenia elektrotaksji. Ponadto nie stwierdzono wzrostu aktywności tego białka w komórkach stymulowanych polem elektrycznym, zarówno w skali całej komórki (Ryc. 31 A), jak i lokalnie po stronie anody, gdzie mogłoby odpowiadać za retrakcję w tym rejonie (Ryc. 31 B, C). Brak spadku kierunkowości w pożywce bezwapniowej z dodatkowo zahamowanym białkiem RhoA (Ryc. 30 A) sugeruje zaangażowanie w reakcję elektrotaktyczną alternatywnych ścieżek sygnałowych prowadzących do skurczu miozyny II, najprawdopodobniej obejmujących aktywację kinazy ROCK.

Rycina 31. (na kolejnej stronie) Wpływ pola elektrycznego na zmiany aktywności białka RhoA

*A - pomiar aktywności białka RhoA w cytoplazmie komórek kontrolnych i poddanych 5-minutowej stymulacji polem elektrycznym o natężeniu 3 V/cm. Pomiaru aktywności w lizacie dokonano biochemiczną metodą G-lisa. Słupki przedstawiają wartość średnią z dwóch powtórzeń +/- SD. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.*

B – Komórki Swiss 3T3 wykazujące ekspresję biosensora RhoA-FLARE.sc obrazowano z wykorzystaniem techniki FRET. Wykorzystano w tym celu mikroskop Leica DMI6000B wyposażony w szybkie koła filtrowe. Przedstawiono obraz ratiometryczny komórki (stosunek FRET/donor), który poddano lokalnej analizie ilościowej: B - w obrębie całej powierzchni obszaru zlokalizowanego po stronie anody, C – dokonując pomiaru profilu wzdłuż czerwonej przerywanej linii. Pomiaru dokonywano w okresie bezpośrednio sąsiadującym z momentem zaaplikowania pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm.



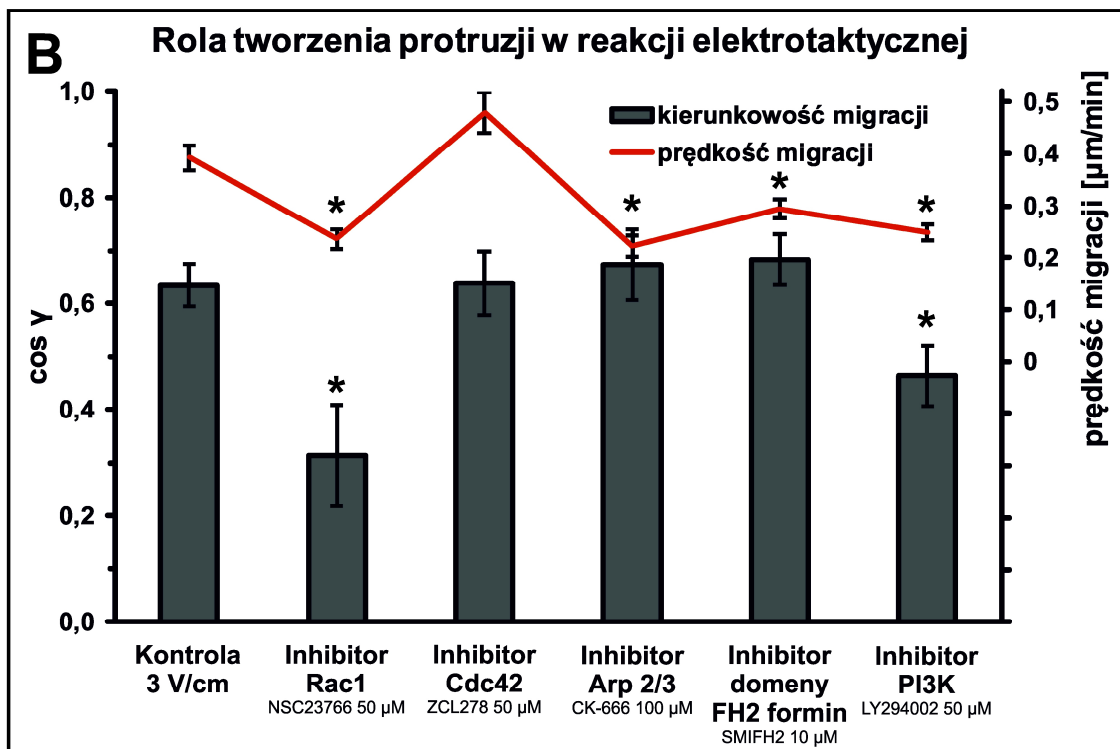
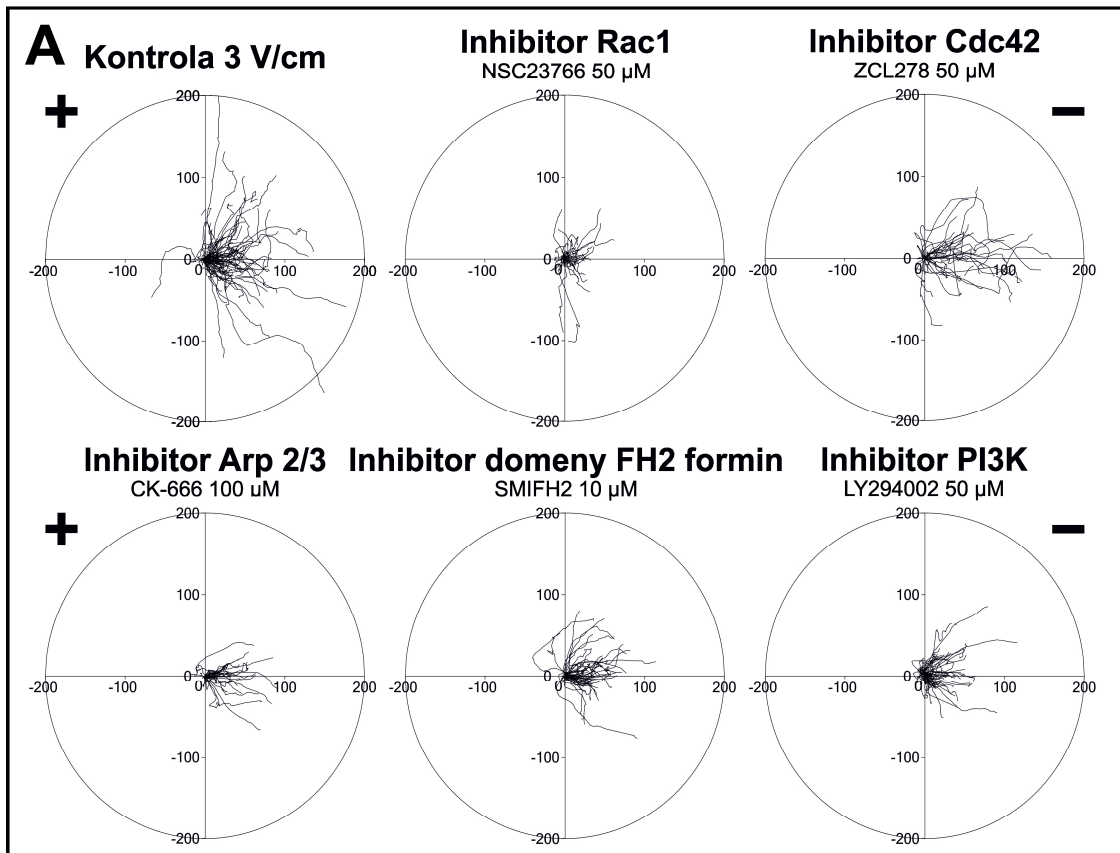
4.5.2. UDZIAŁ MECHANIZMÓW TWORZENIA PROTRUZI PO STRONIE KATODY W REAKCJI ELEKTROTAKTYCZNEJ KOMÓREK SWISS 3T3

Analiza kinetyki reakcji elektrotaktycznej oparta o pomiary zmian powierzchni poszczególnych rejonów komórki, a także obrazowanie dynamiki cytoszkieletu aktynowego, wskazuje na duże znaczenie procesów prowadzących do wytworzenia wypustek migracyjnych po stronie eksponowanej do katody. Rozbudowa takich struktur w kierunku ujemnej elektrody rozpoczyna się po upływie minuty od zaaplikowania pola elektrycznego lub zamiany jego biegunów. W kolejnym etapie zweryfikowano udział wybranych komponentów sygnalizacyjnych nadzorujących proces ukierunkowanej polimeryzacji aktyny na przodzie migrującej komórki (Ryc. 32, Tab. 17, Film 8). W centrum uwagi znalazły się m.in. małe białka G z rodziny Rho, takie jak Rac1 i Cdc42, kluczowe dla powstawania lamellipodiów i filopodiów. Zbadano również rolę formin i kompleksu Arp2/3, efektorowych białek towarzyszących aktynie. Zweryfikowano także rolę kinazy lipidowej PI3K, która odpowiada za zlokalizowane tworzenie błonowego PIP₃, co ma miejsce na krawędzi wiodącej komórek migrujących kierunkowo.

Tabela 17. Parametry charakteryzujące aktywność migracyjną i kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 poddanych działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm przy braku lub w obecności inhibitorów białek zaangażowanych w proces tworzenia protruzji, takich jak Rac1, Cdc42, Arp2/3, forminy i PI3K.

Poszczególne parametry scharakteryzowano w rozdziale Materiały i Metody (podrozdział 3.2.4). n – liczba analizowanych komórek w poszczególnych warunkach. Przedstawiono wartości średnie dla analizowanej populacji ± SEM (błąd standardowy średniej). * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

	Kontrola 3 V/cm (n = 70)	Inhibitor Rac1 50 μM (n = 30)	Inhibitor Cdc42 50 μM (n = 30)	Inhibitor Arp2/3 100 μM (n = 40)	Inhibitor formin 10 μM (n = 50)	Inhibitor PI3K 50 μM (n = 50)
Prędkość migracji [μm/min]	0,392 ± 0,024	0,236 ± 0,020*	0,479 ± 0,040	0,222 ± 0,021*	0,294 ± 0,018*	0,249 ± 0,015*
Droga całkowita [μm]	94,09 ± 5,838	56,717 ± 4,798*	114,952 ± 9,686	53,226 ± 5,011*	70,636 ± 4,386*	59,851 ± 3,712*
Przemieszczenie całkowite [μm]	68,062 ± 5,395	33,801 ± 4,677*	79,035 ± 7,188	38,809 ± 4,418*	51,834 ± 3,417*	38,951 ± 3,691*
Prędkość przemieszczania [μm/min]	0,284 ± 0,022	0,141 ± 0,019*	0,329 ± 0,030	0,162 ± 0,018*	0,216 ± 0,014*	0,162 ± 0,015*
CME	0,696 ± 0,022	0,558 ± 0,045*	0,689 ± 0,036	0,693 ± 0,037	0,740 ± 0,023	0,628 ± 0,034
Cosinus β	0,483 ± 0,030	0,308 ± 0,054*	0,513 ± 0,038	0,547 ± 0,046	0,582 ± 0,033*	0,454 ± 0,032
Cosinus γ	0,634 ± 0,040	0,313 ± 0,095*	0,638 ± 0,059	0,673 ± 0,067	0,682 ± 0,048	0,464 ± 0,057*



Rycina 32. (podpis na kolejnej stronie)

Rycina 32. Wpływ farmakologicznego zahamowania aktywności elementów sygnalizacyjnych zaangażowanych w tworzenie protruzji na reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3.

A. Wykresy kołowe przedstawiające trajektorie ruchu komórek w warunkach kontrolnych i w obecności inhibitorów, takich białek jak Rac1, Cdc42, Arp2/3, formin i PI3K. Początkowe punkty wszystkich trajektorii umieszczono w początku układu współrzędnych. Biegun ujemny pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm w każdym przypadku znajduje się po stronie prawej. Na trajektorie składają się położenia środka geometrycznego komórek wyznaczone manualnie dla 48 zdjęć wykonanych z krokiem czasowym 5 min. Na osiach przedstawiono skalę w μm .

B. Wykres obrazujący średnie wartości prędkości migracji i kosinusa kierunkowego γ , dla całej populacji komórek poddanej działaniu pola elektrycznego o natężeniu 3 V/cm, przy braku lub w obecności badanych inhibitorów. Słupki błędów oznaczają SEM. * - istotność statystyczna przy $p < 0,05$.

Kierunkowa migracja komórek Swiss 3T3 w polu elektrycznym jest w dużej mierze uwarunkowana aktywacją białka Rac1, o czym może świadczyć spadek kierunkowości o połowę po jego farmakologicznym zahamowaniu. Warto odnotować również istotny spadek kierunkowości na skutek zahamowania aktywności kinazy PI3K, której zaangażowanie w reakcję elektrotaktyczną różnych typów komórek było wielokrotnie dokumentowane. Aktywacja obu tych białek często następuje wspólnie w pobliżu krawędzi wiodącej, w odpowiedzi na sygnały docierające z zewnątrz komórki, prowadząc do polimeryzacji aktyny w obrębie powstającego lamellipodium. Jednakże, interesującą obserwacją jest stwierdzenie braku wpływu na wydajność elektrotaksji, istotnych dla regulacji procesów polimeryzacji aktyny białek Arp 2/3 i formin.

5. DYSKUSJA

Zjawisko elektrotaksji komórek tkankowych jest nieodłącznym elementem przebiegu licznych procesów fizjologicznych i patologicznych, obejmujących ukierunkowaną migrację komórek. Wykazano, że naturalnie występujące pola elektryczne stanowią istotny bodziec naprowadzający komórki zaangażowane w gojenie ran, rozwój zarodkowy (zwłaszcza obejmujący rozwój układu nerwowego) czy też tworzenie przerzutów nowotworowych. Pomimo prowadzenia wieloletnich badań nad tym zagadnieniem, wciąż nie jest znany nadrzędny mechanizm odpowiadający za detekcję pola elektrycznego o fizjologicznym natężeniu i przekładanie tego bodźca na wywołanie aktywnej migracji w określonym kierunku. Sytuację komplikuje dodatkowo występowanie komórek migrujących w kierunku bieguna ujemnego, jak i dodatniego. Zróżnicowana reaktywność jest obserwowana wśród komórek o podobnym pochodzeniu. Co więcej, dotychczasowe badania dostarczyły licznych, często wzajemnie się wykluczających wyników dotyczących potencjalnych mechanizmów odpowiedzi na stałe pola elektryczne. Wśród najczęściej postulowanych mechanizmów wyróżnić można mechanizm oparty o gromadzenie w sposób spolaryzowany białek błonowych, zwykle o charakterze receptorów dla czynników wzrostowych i chemoatraktantów, po jednej stronie migrującej komórki. Inne proponowane mechanizmy obejmują zaangażowanie ukierunkowanego napływu jonów do komórki lub ich uwalniania z przedziałów wewnątrzkomórkowych, na skutek otwierania określonych kanałów jonowych bądź wpływu pola na siłę elektromotoryczną wybranych jonów. Wśród nich najczęściej postuluje się udział jonów wapnia, które w wielu przypadkach są kluczowe dla nadzorowania kierunkowej migracji komórek. Ze względu na charakter postulowanych zmian, poszczególne mechanizmy powinny skutkować odmienną dynamiką obserwowanego procesu elektrotaksji.

W toku niniejszej pracy scharakteryzowano szczegółowo reakcję elektrotaktyczną mysich fibroblastów Swiss 3T3, analizując zarówno ich wrażliwość na pola elektryczne o różnym natężeniu, jak i dynamikę reakcji oraz potencjalne mechanizmy leżące u jej podłoża. W związku ze stwierdzoną dużą dynamiką obserwowanego procesu, zweryfikowano szczególnie udział mechanizmu uwzględniającego zaangażowanie jonów potasowych, a konkretnie rolę dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir. Ostatecznie zbadano udział wybranych ścieżek sygnalizacyjnych odpowiadających za kontrolę procesów retrakcji i tworzenia wypustek migracyjnych, gdyż jak wykazano, oba te zjawiska są kluczowe dla elektrotaksji fibroblastów Swiss 3T3.

Kluczowym etapem badań nad mechanizmami leżącymi u podstaw zjawiska elektrotaksji jest dokładne poznanie reaktywności na pole elektryczne analizowanych komórek. Szczególnie istotne jest, aby w badaniach tego typu stosować komórki, które odpowiadają kierunkową migracją na pole elektryczne o fizjologicznym natężeniu. Badania reaktywności fibroblastów Swiss 3T3 pozwoliły wykazać, że istotny statystycznie przyrost kosinusów kierunkowych ma miejsce już w polu o natężeniu 0,5 V/cm. Wzrost $\cos \gamma$ do poziomu $0,356 \pm 0,081$ oznacza, że w badanej populacji przynajmniej część komórek wyczuwa kierunek pola elektrycznego i rozpoczyna migrację do katody. Analiza histogramów i wykresów kołowych pokazuje, że w populacji zwiększa się wyraźnie frakcja komórek o wysokim, dodatnim kosinusie kierunkowym, jednakże wciąż liczne są komórki migrujące w sposób nieukierunkowany. Reakcja elektrotaktyczna ulega znacznemu nasileniu na skutek zwiększenia natężenia pola elektrycznego do wartości 1 V/cm, co objawia się niemal dwukrotnym wzrostem $\cos \gamma$ i znacznym ujednoczeniem reakcji w obrębie populacji. W tym natężeniu pola nie obserwowano prawie żadnych komórek migrujących do anody. Dalszy wzrost natężenia pola elektrycznego do poziomu 2-3 V/cm prowadzi do bardzo jednorodnej reakcji komórek Swiss 3T3 i wyraźnej elektrotaksji w kierunku elektrody ujemnej. Delikatny spadek kierunkowości po dalszym przyroście natężenia pola może oznaczać, że w skali czterogodzinnego eksperymentu takie natężenie pola elektrycznego zaczyna wywierać negatywny efekt na badane komórki.

Od momentu odkrycia zjawiska elektrotaksji zweryfikowano reaktywność na pole elektryczne szerokiej puli komórek tkankowych i organizmów niższych. Prowadzone badania różniły się w dużej mierze metodyką, stosowanymi typami komór elektrotaktycznych bądź czasem trwania eksperymentów, jednakże w pewnym zakresie publikowane wyniki można odnosić do przedstawionych tu rezultatów. Wykorzystane w badaniach komórki Swiss 3T3 wykazują niższy próg reaktywności na pole elektryczne od blisko spokrewnionych z nimi komórek NIH/3T3, które nie reagowały kierunkowo w polu o natężeniu 0,6 V/cm, natomiast reakcja pojawiała się w odpowiedzi na pole o natężeniu 1 V/cm. Optymalną elektrotaksję komórki NIH/3T3 wykazywały przy polach z zakresu 4-6 V/cm [42,123]. Wydaje się, że fibroblasty Swiss 3T3 charakteryzują się przesunięciem zakresu, w którym ich reakcja przebiega optymalnie, gdyż w przypadku 4 V/cm zanotowano już niewielki spadek wartości kosinusów kierunkowych. Nieco odmienną charakterystykę reakcji elektrotaktycznej zaprezentowano dla mysich embrionalnych fibroblastów C3H/10T1/2, które w odpowiedzi na pole o wysokim natężeniu reagowały wyraźną

zmianą morfologii, lecz mniej wyraźną translokacją w kierunku katody. W polach rzędu 1 V/cm nie wykazywały oznak reakcji elektrotaktycznej w czasie 2h od stymulacji [40,41]. Nieco niższą od badanych komórek Swiss 3T3 wrażliwość na pole elektryczne prezentowały w pożywce bez surowicy embrionalne fibroblasty przeziórki, reagując na pole elektryczne o natężeniu 1-1,5 V/cm migracją w kierunku katody, podczas gdy zamiana medium hodowlanego na pożywkę z surowicą skutkowała obniżeniem progu reaktywności do 0,1 V/cm [124,125]. Kierunkową migrację w polu elektrycznym o tak niskim natężeniu wykazywały też komórki grzebienia nerwowego żaby szponiastej [45].

Minimalny próg reakcji na poziomie 1,5 do 2 V/cm notowano w przypadku zaangażowanych w angiogenezę komórek HMEC-1 i HUVEC, a także reagujących migracją do anody fibroblastów tętnicy płucnej – BPAF [126]. Niezwykle ciekawe wnioski można wyciągnąć z eksperymentów na komórkach HT1080, które po umieszczeniu w trójwymiarowej sieci kolagenowej zaczęły reagować na pole o natężeniu 0,1 V/cm, zbyt słabe, aby powodowało ich migrację w warunkach dwuwymiarowych. Pozwala to przypuszczać, że w warunkach *in vivo*, gdzie komórki przyjmują naturalną dla siebie morfologię, reaktywność na pole elektryczne może być jeszcze wyższa. Być może w wielu z powyższych przypadków przedstawione wartości również są znacznie zawyżone, gdyż należy mieć na uwadze, że prowadzone eksperymenty obejmowały czas od 30 min do maksymalnie kilku godzin. Można przypuszczać, że w dłuższej skali czasowej poszczególne typy komórek również odpowiadałyby tendencją do migracji kierunkowej w odpowiedzi na pola o znacznie niższym natężeniu. Należy mieć na uwadze, że w procesach fizjologicznych takie pola są utrzymywane na stałym poziomie długotrwale, nawet przez okres kilku dni, jak np. w procesie gojenia ran, aż do pełnego zasklepienia przerwanych warstw tkanki. Natężenie takich pól elektrycznych waha się według różnych źródeł od 0,4 do 2 V/cm [127–130]. Oznacza to, że badane w pracy fibroblasty Swiss 3T3 odpowiadają wyraźną elektrotaksją na pola mieszczące się w zakresie fizjologicznym, podczas gdy w literaturze pojawiają się przykłady zarówno mniej, jak i bardziej wrażliwych komórek, a w niektórych pracach doświadczenia prowadzono w warunkach daleko odbiegających od tych obserwowanych *in vivo*.

Dodatkowo w toku przeprowadzonych badań wykazano, że pole elektryczne o natężeniu 2 V/cm i wyższym skutkuje wzrostem prędkości migracji fibroblastów Swiss 3T3. Zjawisko to było typowe również dla fibroblastów NIH/3T3, embrionalnych fibroblastów przeziórki oraz

króliczych osteoklastów [123,125,131], ale też nie stanowi reguły, gdyż w przypadku stromalnych fibroblastów rogówki, wzrostu prędkości migracji nie notowano w szerokim zakresie stosowanych natężeń pola [132]. Zagadnienie wpływu pola elektrycznego na aktywność migracyjną jest bardzo obszerne, jednak nie stanowiło zasadniczego elementu niniejszej pracy i nie będzie tu szczegółowo dyskutowane.

Reakcji elektrotaktycznej badanych komórek Swiss 3T3 towarzyszyły zmiany morfologii i orientacji względem linii pola elektrycznego. Analiza tych parametrów po 4 h ekspozycji na pole wykazała, że o ile w przypadku orientacji, zjawisko postępuje proporcjonalnie do zastosowanego natężenia pola elektrycznego, to zmiany wydłużenia komórek są mniej oczywiste. Reakcji na pola o natężeniu 0,5-1 V/cm towarzyszy spadek wydłużenia, a wyraźny wzrost tego parametru ma miejsce dopiero przy natężeniu 3-4 V/cm. W większości dotychczasowych badań opisywanych w literaturze oba procesy postępowały równoległe, aczkolwiek nie zawsze w najniższych polach powodujących reakcję kierunkową. Przykładowo, embrionalne fibroblasty przepiórki ustawiały się prostopadle po 90 min w polu o natężeniu 1,5 V/cm, ale wyraźne wydłużenie miało miejsce dopiero w polu o natężeniu 4 V/cm i wyższym. W polu o bardziej fizjologicznym natężeniu (1,5 V/cm) morfologia i sposób migracji był bardziej typowy dla fibroblastów (lamellipodium skierowane w kierunku ruchu i długa oś równoległa do kierunku) [125]. Komórki grzebienia nerwowego żaby szponiastej rozpoczynały proces elongacji i prostopadłej orientacji względem linii pola w krótkim czasie od jego aplikacji, aczkolwiek w przypadku części komórek takie ustawienie było przejściowe i wraz z początkiem migracji w kierunku katody, traciły takie cechy morfologii [45]. Znaczna elongacja i prostopadłe ustawienie było typowe w wysokich natężeniach dla stromalnych fibroblastów rogówki [133], mysich fibroblastów C3H/10T1/2 [40], zarodkowych komórek nabłonkowych żaby szponiastej [134], czy też komórek mięśniowych tego płaza, w przypadku których takie zjawisko wykazano po raz pierwszy [135]. Tendencję do przyjmowania takiej morfologii i orientacji w polu elektrycznym tłumaczono dążeniem komórek do minimalizowania negatywnego wpływu pola na potencjał błonowy na skutek zmniejszenia różnicy potencjałów pomiędzy jej skrajnymi końcami. Teorii tej przeczy zachowanie komórek jajnika chomika chińskiego CHO i A549 – linii komórek nowotworowych płuc, które ustawiają się równoległe do linii aplikowanego pola elektrycznego [136]. Zastanawiać mogą również wyniki badań nad migracją mysich fibroblastów NIH/3T3, które po umieszczeniu w wąskich kanalikach uniemożliwiających ustawianie prostopadle względem linii pola, prezentują dużo

wydajniejszą migrację w kierunku katody [11]. Wydaje się, że w warunkach *in vivo*, gdzie komórki są znacznie ograniczone strukturą tkanki i eksponowane na pola elektryczne nie przekraczające 3 V/cm, omówiony aspekt nie ma dużego wpływu na reakcję elektrotaktyczną komórek, ale wymaga poznania i charakterystyki, gdyż może rzutować na wyniki badań prowadzonych *in vitro* i ich interpretację.

W odpowiedzi na pole elektryczne o fizjologicznym natężeniu, liczne komórki tkankowe i niższe organizmy jednokomórkowe odpowiadają szeregiem reakcji opartych o kierunkową translokację bądź zmiany morfologiczne. Dynamika wspomnianych procesów jest bardzo zróżnicowana, co w dużej mierze wynika z różnic ruchliwości komórek będących obiektami badań, ale może też świadczyć o mechanizmie leżącym u podstaw obserwowanej reakcji. Opisywany czas potrzebny do wywołania reakcji kierunkowej wynosił w skrajnych przypadkach ponad godzinę, jak w przypadku fibroblastów skórnych [44], a niekiedy oscylował w granicach od kilku do kilkudziesięciu minut [131,132,134]. W przypadku badanych komórek Swiss 3T3 analiza zmian kosinusa kierunkowego w czasie pozwoliła wykazać, że nabieranie kierunkowości rozpoczyna się w czasie pierwszych 5 min od zadziałania pola elektrycznego, a wartości maksymalne osiąga po ok. 20 minutach. Dodatkowo zbadano reakcję na zamianę elektrod i w tym przypadku reakcja była równie dynamiczna, gdyż po 15 minutach komórki już wyraźnie przemieszczały się w kierunku przeciwnym. Nieco mniejszą dynamikę zmian kierunkowości w czasie obserwowano w przypadku fibroblastów ludzkich izolowanych z jamy nosowej [137]. Bardziej dynamiczne zmiany rejestrowano z kolei w przypadku szybko migrujących komórek nowotworowych WC256, zwłaszcza w sublinii słabo-adherentnej, migrującej przez wytwarzanie pęcherzykowatych wypustek [91], a także w badaniach nad komórkami raka prostaty MAT-LyLu [49].

Wykazywanie stosunkowo długiego czasu potrzebnego do wywołania reakcji elektrotaktycznej często jest efektem stosowania metodyki pomiaru, opartej na analizie zmian położenia geometrycznego środka komórki, co nie pozwala na precyzyjny opis dynamicznych zmian zachodzących na skraju komórki. Zastosowanie metod opartych o pomiary zmian powierzchni pozwoliło wykazać, że reakcja fibroblastów Swiss 3T3 na pole elektryczne może być już rejestrowana w czasie krótszym niż 1-2 minuty. Zwiększenie aktywności na krawędzi lamellipodium eksponowanego do katody jest już widoczne na obrazach różnicowych w pierwszych chwilach od aplikacji pola o natężeniu 3 V/cm, co znajduje swoje odzwierciedlenie

w wynikach analizy ilościowej zmian powierzchni w tym rejonie. Porównywalną dynamikę pierwotnej reakcji prezentowano w przypadku komórek NIH/3T3, które już w czasie 2-3 min odpowiadały na aplikację pola o natężeniu 4 V/cm tworzeniem wypustek migracyjnych w kierunku bieguna ujemnego [42]. Przyrost kierunkowości tych samych komórek w czasie pierwszych 5 min wykazano powtórnie w nowszej publikacji (jednak aplikując stosunkowo silne pole o natężeniu 5,5 V/cm) [11]. Można przypuszczać, że w przypadku przeprowadzenia szczegółowej analizy dynamiki reakcji w oparciu o analizę obrysów komórek, wspomniane przedziały uległyby dalszemu skróceniu, do wartości obserwowanych w niniejszej pracy, co pokazuje, że nawet stosunkowo wolno migrujące komórki, takie jak fibroblasty 3T3 są w stanie odpowiadać na aplikowane pole elektryczne w bardzo krótkim czasie. Nie jest to jednak cechą wspólną wszystkich mysich fibroblastów, gdyż w przypadku komórek C3H/10T1/2 w pierwszej kolejności obserwowano zmiany morfologiczne w odpowiedzi na pole o wysokim natężeniu, podczas gdy przy wartościach fizjologicznych reakcja była znacznie wolniejsza. Także stromalne fibroblasty rogówki odpowiadają polaryzacją dopiero po 20 min (w tym przypadku anodálną) a translokacją po upływie kolejnych 30 minut [132]. Niezwykle dużą dynamikę reakcji elektrotaktycznej prezentowano z kolei w przypadku szybko migrujących organizmów niższych, takich jak chociażby *Amoeba proteus*. W tym przypadku pierwotna reakcja na pole elektryczne była rejestrowana po stronie anody już w czasie 10 s od aplikacji pola elektrycznego [75].

Przeprowadzona analiza nawrotu w odpowiedzi na zamianę biegunów pola elektrycznego pozwoliła zaobserwować jeszcze większą dynamikę reakcji. Analiza ilościowa wskazuje na indukcję tworzenia wypustek w kierunku „nowej katody” już po upływie pierwszej minuty od zamiany elektrod, a niedługo po tym obserwowano zjawisko retrakcji po stronie przeciwnej. Takie zjawisko uwrażliwienia było obserwowane w przeszłości i zwrócili na nie uwagę między innymi autorzy pracy na komórkach grzebienia nerwowego żaby szponiastej [45], embrionalnych fibroblastach przepiórki [125], jak i w przypadku wspomnianych uprzednio badań dotyczących ameby [75]. Przeciwnie obserwacje dotyczyły z kolei osteoblastów szczurzych, które na zamianę elektrod reagowały wolniej niż na pierwotną aplikację pola elektrycznego [131]. Metoda analizy polegająca na manualnym wykonywaniu obrysów komórek w kolejnych punktach czasowych pozwoliła nam wykazać na innym modelu komórkowym, że komórki adherentnej frakcji mysiego szpiku kostnego reagują na zamianę biegunów pola elektrycznego w czasie krótszym niż 1 min

[92]. Skrajnie szybkie reakcje wykazano z kolei w przypadku *Amoeba proteus*, która wyczuwa zamianę elektrod już w czasie 1 s, reagując skurczem po stronie „nowej anody” [75].

W związku z wykazaniem, że aplikacja pola elektrycznego indukuje dynamiczny proces tworzenia wypustek migracyjnych po stronie katody, przeprowadzono obrazowanie cytoszkieletu aktynowego w tym procesie, aby ocenić jego udział w odpowiedzi elektrotaktycznej. Co ciekawe, w przeszłości wykazywano, że mysie embrionalne fibroblasty są w stanie wytwarzać wypustki skierowane do katody nawet w sposób niezależny od dynamiki cytoszkieletu aktynowego [138]. Inni autorzy prezentowali zanik aktynowych włókien naprężeniowych w embrionalnych fibroblastach myszy C3H/10T1/2, po upływie 30 min od zadziałania pola o natężeniu 10 V/cm, co zostało później potwierdzone [40,41]. Brak zaniku tych włókien lecz ich orientowanie prostopadle do linii pola prezentowano kilkakrotnie w różnorodnych komórkach [29,133,134,139]. Cytoszkielet aktynowy osteoblastów i komórek hMSC (ang. *human mesenchymal stem cells*) w czasie 60 min od aplikacji pola elektrycznego ulega natomiast częściowej degradacji, szczególnie po stronie anody [140].

Przeprowadzone obrazowanie pozwala potwierdzić, że wypustki powstające po stronie katody posiadają dużą zawartość F-aktyny, a dynamika jej gromadzenia w tym obszarze jest równie wysoka, jak obserwowana dynamika rozwoju krawędzi wiodącej badanych komórek. W komórkach Swiss 3T3 nie przybywa włókien naprężeniowych, co pozwala zachować ich stosunkowo dużą ruchliwość, pomimo postępującej elongacji. Na skutek zamiany elektrod i zmiany kierunku pola, w czasie 2 minut dochodzi do bardzo dynamicznego przeniesienia procesów polimeryzacji włókien aktynowych na stronę „nowej katody”. Przeprowadzenie obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii TIRF pozwala stwierdzić równie dużą aktywność polimeryzacji w obszarze przylegającym do podłoża na skraju katodalnym. Niestety prowadzone dotychczas przez inne grupy badania cytoszkieletu aktynowego w czasie reakcji elektrotaktycznej ograniczały się jedynie do obserwacji jego struktury w określonym, pojedynczym punkcie czasowym, stąd trudno porównać zaobserwowaną dynamikę z danymi literaturowymi.

Na przestrzeni lat, szereg zespołów badających elektrotaksję traktował problematykę dynamiki tego procesu pobieżnie bądź intencjonalnie nie pochyłano się nad bardzo dużą szybkością zachodzącego procesu. W szczególności dotyczy to grup, które przyczyny elektrotaksji upatrują w lateralnym przemieszczaniu białek błonowych, najczęściej o aktywności receptorowej, które lokalizując się po stronie określonej elektrody, miałyby indukować ruch w tym kierunku.

Wynika to z faktu, że wspomniane zjawisko wymagałoby stosunkowo dużo czasu od zadziałania bodźca do wywołania reakcji. Według różnych źródeł, czas ten oscylowałby od 2 h do przynajmniej kilkunastu minut [40,57–59,61,141]. W skrajnych przypadkach obserwowano istotną redystrybucję receptorów błonowych, np. dla czynnika wzrostu EGF, po ok. 10 min od zadziałania pola elektrycznego [142]. Oznacza to, że teoria opierająca się na redystrybucji białek błonowych w żaden sposób nie jest w stanie tłumaczyć występowania odpowiedzi elektrotaktycznej zachodzącej w czasie od kilku do kilkudziesięciu sekund, jak w przypadku *Amoeba proteus* [75], a nawet 1-2 minut, jak wykazano w niniejszej pracy. W związku z powyższym faktem, szczególny nacisk w dalszej części pracy położono na weryfikację udziału wybranych mechanizmów jonowych, które byłyby w stanie tłumaczyć tak dużą dynamikę procesu.

W ostatnim czasie zaprezentowano bardzo obiecujące wyniki dotyczące zaangażowania w reakcję elektrotaktyczną dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych (Kir) [66]. Kanały te podlegają hamowaniu przy udziale jonów Ba^{2+} w stężeniach mikromolarnych. W toku przeprowadzonych badań wykazano, że zastosowanie $BaCl_2$ w stężeniu 500 μM niemal zupełnie znosi kierunkowość ruchu komórek Swiss 3T3 w polu o natężeniu 1 V/cm, oraz w sposób istotny statystycznie hamuje również reakcję elektrotaktyczną w polu o natężeniu 3 V/cm. We wspomnianej pracy Nakajimy i wsp., analogiczne podejście doprowadziło do zupełnego zniesienia kierunkowego ruchu komórek hTCEpi (linii unieśmiertelnionych komórek nabłonkowych rogowki) do katody. Warto jednak zwrócić uwagę na istotną różnicę w metodyce prowadzonych badań, szczególnie w aspekcie czasu trwania eksperymentu. W wykorzystanym tu układzie ruch komórek każdorazowo rejestrowano przez 4h, podczas gdy w cytowanej pracy rejestrację poklatkową ruchu komórek kończono po upływie 30 min. W niniejszej pracy zaobserwowano istotne zmiany kosinusa kierunkowego w czasie eksperymentu, gdyż w czasie pierwszej godziny kierunkowość ruchu była znikoma, niezależnie od stosowanego natężenia pola elektrycznego, podczas gdy w miarę upływu czasu wyższe z zastosowanych natężeń pola (3 V/cm) prowadziło do stopniowego wzrostu kierunkowości, aż do wartości zbliżonych do kontroli bez inhibitora. W niższym natężeniu pola (1 V/cm) przedstawiony parametr utrzymywał się na relatywnie stałym, niskim poziomie w obecności $BaCl_2$ w stężeniu 500 μM , podczas gdy niższe ze stężeń (100 μM) nie było wystarczające do zniesienia kierunkowości ruchu. Obserwowany wzrost kierunkowości ruchu może sugerować wystąpienie z czasem mechanizmów kompensacyjnych, które pozwalają komórkom wyczuwać aplikowane pole elektryczne, pomimo

zahamowania działania kanałów Kir. Uzyskane wyniki sugerują jednak, że dokomórkowe prostownicze kanały potasowe (Kir) mogą być zaangażowane w pierwotną reakcję elektrotaktyczną.

Równolegle do wpływu na kierunkowość ruchu, aplikacja BaCl₂ powodowała niewielki spadek prędkości migracji komórek Swiss 3T3. Spadek ten był proporcjonalny do stosowanego stężenia soli baru. Wyniki te są spójne z literaturą, gdyż spadek aktywności migracyjnej obserwowano również w przypadku wspomnianych komórek hTCEpi [66], oraz co istotniejsze, w przypadku mysich embrionalnych fibroblastów [86]. W tym ostatnim przypadku spadek aktywności migracyjnej obserwowano już w dużo niższym stężeniu BaCl₂ (5-32 μM). Zjawisko to przypisywano zahamowaniu aktywności kanałów Kir. Postulowano występowanie kompleksowych interakcji integryny α9 z N¹-acetyltransferazą sperminy/spermidyny (SSAT) na krawędzi wiodącej migrujących komórek, gdzie miałyby dochodzić do lokalnego unieczynnienia tych poliamin (SPM i SPD) i umożliwić wypływ jonów K⁺ przez kanały Kir4.2, zlokalizowane w tym obszarze. Taka interakcja miałaby być kluczowa dla wysokiej persystencji ruchu komórek MEF. W niniejszej pracy obecność wyższych stężeń BaCl₂ również wpływała na obniżenie persystencji ruchu komórek Swiss 3T3 w polu elektrycznym, co przejawia się spadkiem współczynnika CME.

Aktywność dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych (Kir) jest uzależniona od obecności endogennych poliamin (szczególnie sperminy i spermidyny), które występując w mikromolarnych stężeniach wchodzi w interakcję z ujemnie naładowanymi grupami aminokwasów zlokalizowanymi w świetle kanału, zapobiegając wypływowi jonów K⁺ z komórki [82]. W przeprowadzonych badaniach poddano ocenie wpływ zmian poziomu wewnątrzkomórkowych poliamin (SPM i SPD) na reakcję elektrotaktyczną. Wykazano, że obniżenie ich poziomu przez stymulację rozkładu przy udziale enzymu SSAT znosi niemal całkowicie kierunkowość ruchu, niezależnie od zastosowanego natężenia pola elektrycznego. Podobna manipulacja zaburzyła katodálną elektrotaksję komórek hTCEpi [66]. Przeciwny, aczkolwiek subtelniejszy efekt wywołało dostarczenie prekursora SPM i SPD – putrescyny, co objawiło się konsekwentnym wzrostem kierunkowości ruchu badanych komórek w każdym z badanych natężeń pola elektrycznego (od 0,5 do 3 V/cm). Badania kinetyki reakcji elektrotaktycznej pozwoliły również wykazać nieco szybsze nabieranie kierunkowości ruchu po uprzednim podniesieniu poziomu wewnątrzkomórkowych poliamin i przeciwny efekt

stymulacji ich rozkładu. W przytaczanej wcześniej publikacji [66] wzrost kierunkowości ruchu po preinkubacji z putrescyną notowano zarówno w komórkach U251 migrujących katodalnie, jak i migrujących do anody komórkach HaCaT. Dodatkowo wykazano w tych komórkach (jak i w komórkach hTCEpi) tendencję do polarnego rozkładu dodatnie naładowanych poliamin po stronie katodalnej na skutek stymulacji polem elektrycznym [66]. Wyniki te wspólnie sugerują, że nie tylko funkcjonalność kanałów Kir jest istotna dla kontrolowania reakcji elektrotaktycznej komórek, ale też warunkowanie odpowiedniego kierunku przepływu jonów potasowych i być może zróżnicowanie tej aktywności w obrębie komórki. Fakt, że kierunkowość ruchu w polu elektrycznym została bardziej zaburzona po ingerencji w poziom wewnątrzkomórkowych poliamin, niż w przypadku zahamowania aktywności samych kanałów Kir solami baru, można tłumaczyć ich potencjalnym zaangażowaniem w inne szlaki sygnalizacyjne związane z aktywnością migracyjną komórek. Wykazano przykładowo, że gospodarka poliamin w komórce może w dłuższej perspektywie wpływać na poziom wapnia w komórce i ekspresję wybranych białek związanych z architekturą cytoszkieletu aktomiozynowego, adhezją komórek do podłoża oraz aktywnością małych białek G z rodziny Rho [143].

Charakterystyczna funkcjonalność kanałów Kir może również podlegać regulacji przez wewnątrzkomórkowe jony magnezu [79]. Wprowadzenie do pożywki dużego stężenia tych jonów (10 mM) spowodowało wyraźne zniesienie elektrotaksji komórek Swiss 3T3 w polu o natężeniu 1 V/cm i osłabienie reakcji przy wyższym natężeniu. Wykazano, że taki wzrost stężenia jonów Mg^{2+} przekłada się na podniesienie ich stężenia wewnątrz komórek, stąd uzyskany wynik można interpretować w kontekście regulacji kanałów Kir. Wpływ inkubacji komórek w pożywkach z podniesionym stężeniem jonów magnezowych na stężenie tych jonów wewnątrz komórki był wykazywany również przez innych badaczy [144,145]. Pomimo, że jony magnezu charakteryzują się dużo mniejszym potencjałem w regulacji badanych kanałów, ich stężenie wielokrotnie przewyższa stężenie poliamin. Można zakładać, że taka ingerencja zaburza spolaryzowaną aktywację kanałów Kir, spowodowaną wpływem pola na rozkład poliamin w komórkach, co postulowano jako potencjalny mechanizm leżący u podstaw elektrotaksji [146]. Wpływ jonów magnezowych na elektrotaksję był już opisywany wcześniej, ale nigdy nie miało to na celu weryfikacji zaangażowania kanałów Kir, a raczej ingerencję w postulowany mechanizm wapniowy. Dodanie do pożywki jonów Mg^{2+} zносиło zupełnie kierunkową reakcję na pole komórek grzebienia nerwowego przepiórki [46], natomiast w połączeniu z usunięciem jonów

wapnia wpływało na elektrotaksję makrofagów otrzewnowych [48] i komórek *Amoeba proteus* [75], jednak trudno o interpretację tych wyników w oderwaniu od mechanizmu wapniowego, o którym będzie mowa w dalszej części dyskusji.

Zaangażowanie kanału Kir4.2 kodowanego przez gen KCNJ15 w kontrolę aktywności ruchowej mysich embrionalnych fibroblastów, a także udział tego konkretnego białka w reakcję elektrotaktyczną innych komórek, skłonił do zweryfikowania jego roli w elektrotaksji komórek Swiss 3T3. W tym celu uzyskano komórki o obniżonym poziomie ekspresji kanału Kir4.2, wykorzystując zakupiony konstrukt kodujący siRNA dla genu KCNJ15, który wprowadzono do komórek metodą transdukcji. Tak uzyskaną stabilną linię poddano badaniu aktywności elektrotaktycznej w polach elektrycznych o natężeniu 1 i 3 V/cm. W skali całej populacji uzyskano spadek kierunkowości ruchu o ponad 60% w 1 V/cm i znacznie niższy przy wyższym z badanych natężeń pola elektrycznego. Analiza z rozgraniczeniem na komórki wykazujące wysoką i niską liczbę wbudowanych kopii konstruktów kodujących siRNA dla KCNJ15 pozwoliła wykazać, że komórki z wyraźnym zahamowaniem ekspresji tego genu niemal zupełnie nie reagują kierunkową migracją na pole elektryczne o natężeniu 1 V/cm. W wyższym natężeniu pola nie zaobserwowano podobnej zależności. Badania dynamiki reakcji elektrotaktycznej pozwalają jednak stwierdzić, że zahamowanie ekspresji tego kanału wywiera wpływ na pierwotną reakcję, w krótkim czasie od zadziałania pola elektrycznego, także o natężeniu 3 V/cm. Uzyskane wyniki są zbieżne z przedstawionymi dla migrujących w kierunku katody komórek hTCEpi i w kierunku anody HaCaT i MDA-MB-231, uwzględniając istotne różnice w prowadzonych badaniach, w tym przede wszystkim krótszy czas eksperymentów [66]. Nie można bowiem wykluczyć, że po wydłużeniu czasu trwania eksperymentu, badane tam komórki również wykazywałyby przyrost kierunkowości ruchu. Wydaje się, że wykazany mechanizm jest kluczowy dla pierwotnej reakcji komórek na pole elektryczne o fizjologicznym natężeniu. Nie można wykluczyć, że w miarę upływu czasu, w wyniku aplikowanego pola elektrycznego aktywowane są również alternatywne mechanizmy detekcji pola elektrycznego, odpowiedzialne za reakcję długotrwałą, jak np. postulowany mechanizm receptorowy. Nie można również zagwarantować, że pozostałe dokomórkowe prostownicze kanały potasowe Kir nie kompensują częściowo braku aktywności lub obecności kanału Kir4.2. W interpretacji uzyskanych wyników nie pomagają brak doniesień literaturowych dotyczących zaangażowania dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych w zjawiska kierunkowej migracji.

Poza wspomnianą pracą [66], w ostatnim czasie wykazano, że inny przedstawiciel tej grupy kanałów – Kir 2.1 może być zaangażowany w chemotaksję szczurzych komórek mikrogleju. Na skutek aplikacji $BaCl_2$, jak i w obecności specyficznego inhibitora tego kanału, spadała istotnie transmigracja tych komórek w kierunku chemoatraktanta. Ingerencja ta nie była jednak obojętna dla spontanicznej transmigracji, co może wskazywać na obniżenie aktywności migracyjnej komórek mikrogleju [147]. Przeciwnostawne wyniki uzyskano w przypadku komórek glejaka, u których zastosowanie $BaCl_2$ oraz zahamowanie ekspresji kanału Kir 4.1 zwiększało zdolność transmigracji przez komory Boydena, wskazując na wzrost potencjału inwazyjnego [148].

W związku z wykazaniem, że po stronie anodalnej reagujących na pole elektryczne komórek Swiss 3T3 dochodzi do stosunkowo dynamicznego procesu cofania krawędzi, przeprowadzono obrazowanie miejsc kontaktowych komórki w trakcie pierwotnej reakcji na pole elektryczne oraz po zamianie jego biegunów, aby odpowiedzieć na pytanie, czy zjawisko to ma miejsce na skutek wystąpienia aktywnego skurczu. Eksperyment pozwolił wykazać dużą dynamikę kontaktów z podłożem komórki reagującej elektrotaktycznie i szybki spadek poziomu winkuliny po stronie anodalnej oraz wyraźne przesuwanie kontaktów w kierunku ciała komórki. Obrazowanie pozwoliło wykazać dużą liczbę kontaktów z podłożem na krawędzi wiodącej i spadek ich zawartości po stronie anodalnej. Podobne gromadzenie kontaktów zogniskowanych obserwowano w przypadku stromalnych fibroblastów rogówki, migrujących w kierunku anody [133] oraz szczurzych osteoblastów Calvarial migrujących do katody i ludzkich komórek kostniakomięsaka SaOS-2, poruszających się w przeciwnym kierunku [120,149]. Brak polaryzacji rozkładu kontaktów z podłożem, wykazanej przez obrazowanie winkuliny, był z kolei typowy dla ludzkich komórek mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego (hBM-MSCs). W tym ostatnim przypadku obserwowano z kolei tendencję do spadku liczby kontaktów, kosztem wzrostu ich wielkości [150]. W żadnym z układów nie prowadzono jednak obrazowania zmian rozkładu winkuliny w sposób dynamiczny, co utrudnia porównanie uzyskanych wyników z danymi literaturowymi.

W celu oceny czy pole elektryczne powoduje wystąpienie sił trakcyjnych w krótkim czasie od zadziałania, stosowano w przeszłości odmienne podejście. Przeprowadzone dotychczas próby zobrazowania tego procesu dostarczyły wiele przeciwstawnych wyników. Badania sił wywieranych przez reagujące elektrotaktycznie embrionalne fibroblasty kurczaka

z wykorzystaniem błonek silikonowych nie dostarczyły dowodów, że stymulacja polem powoduje bezpośrednio skurcz komórek, zarówno prostopadle, jak i równoległe do gradientu napięcia. Obserwowano stopniowe osłabienie naprężenia w osi równoległej do kierunku pola, któremu towarzyszył wzrost retrakcji lamelki zlokalizowanej wzdłuż tej osi, najprawdopodobniej w wyniku osłabienia kontaktów z podłożem. W dalszym etapie komórki orientowały się prostopadle do linii pola, zwiększając kurczliwość w tej osi. Włączeniu pola nie towarzyszyła żadna nagła zmiana naprężeń wywieranych na podłoże [139]. Przeprowadzone nowszymi metodami badania sił trakcyjnych w elektrotaksji pierwotnych bydlęcych osteoblastów i ludzkich komórek kostniakomięsaka wykazały, że w czasie krótszym niż 30 s (w skrajnych przypadkach nawet 10 s) od aplikacji pola elektrycznego, pojawiają się siły trakcyjne po stronie obu elektrod. Słabsze siły trakcyjne notowane na krawędziach zorientowanych prostopadle względem linii pola mogą tłumaczyć tendencję badanych komórek do elongacji i prostopadłej orientacji na skutek stymulacji polem elektrycznym. W badaniach aplikowano stosunkowo wysokie natężenia pola elektrycznego, rzędu kilku do kilkunastu V/cm [151].

W celu wywołania kierunkowej migracji komórek w polu elektrycznym, sygnał odebrany na poziomie błony komórkowej musi zostać przetworzony przez różnorodne kaskady sygnalizacyjne i przekazany docelowo do cytoszkieletu komórki, co prowadzi do jego reorganizacji i pociąga za sobą zmiany morfologiczne i translokację komórki w kierunku określonego bieguna pola elektrycznego. W związku ze stwierdzeniem istotności mechanizmów skurczowych w obserwowanej reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3, zbadano zaangażowanie kluczowego białka odpowiadającego za skurcz szkieletu aktomiozynowego – miozyny II. Wykazano, że farmakologiczne zahamowanie tego białka istotnie obniża kierunkowość ruchu badanych komórek w sposób zależny od stężenia. W niższym ze stosowanych stężeń nie występuje istotny spadek prędkości migracji, podczas gdy kosinus kierunkowy ulega obniżeniu o ponad 50%.

Na przestrzeni ostatnich lat, udział miozyny II w determinowaniu reakcji elektrotaktycznej komórek różnego typu był kilkakrotnie weryfikowany. Znaczne obniżenie kierunkowości ruchu obserwowano w przypadku pierwotnych fibroblastów myszy, jednakże przy jednoczesnym silnym zahamowaniu migracji, co istotnie utrudnia interpretację wyników. Analogiczne wyniki zaprezentowano w przypadku komórek raka prostaty PC3 [64]. Zaangażowanie miozyny II potwierdzono w przypadku reakcji kierunkowej na pole elektryczne komórek słabo adherentnej

sublinii mięsakeraka Walkera WC256, gdzie preinkubacja z blebbistatyną obniżała istotnie kierunkowość ruchu. W przypadku sublinii adherentnej, której komórki migrują mezenchymalnie, taka zależność nie została zaobserwowana [91]. Ten sam inhibitor był również obojętny dla elektrotaksji katodalnej rybnich keratocytów [57], podczas gdy aktywność miozyny II okazała się kluczowa dla przeciwstawnej elektrotaksji fragmentów pochodzących z tych komórek [152]. Niezwykle ciekawe wyniki uzyskano w przypadku komórek inicjujących guzy mózgu (BTICs, ang. *brain tumour initiating cells*), które w warunkach 2D migrują anodalnie w sposób niezależny od miozyny II, natomiast ich migracja w warunkach 3D, po umieszczeniu w żelu z kolagenu i kwasu hialuronianowego, odbywa się w kierunku przeciwnym tj. do katody, w sposób zależny od miozyny II [153].

Powyższe wyniki sugerują, że aktywacja miozyny II i najprawdopodobniej mechanizm generowania przez nią skurczu, mogą być istotne zarówno dla komórek migrujących w kierunku anody, jak i katody, a także prezentujących różnorodne strategie migracji, włączając to układy trójwymiarowe. W świetle uzyskanych w niniejszej pracy wyników, najistotniejsze wydaje się być zaangażowanie w elektrotaksję mysich pierwotnych fibroblastów, z uwagi na ich bliskie pokrewieństwo z wykorzystanymi tu fibroblastami Swiss 3T3.

Aktywacja miozyny II w migrujących komórkach tkankowych może przebiegać pod kontrolą dwóch zasadniczych ścieżek sygnalizacyjnych, zależnej od wapnia i kinazy lekkich łańcuchów miozyny (MLCK), lub zależnej od białka RhoA i kinazy ROCK. W niniejszej pracy zweryfikowano udział obu tych mechanizmów. W przypadku wapnia, zbadano przebieg reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3 w pożywce bezwapniowej, w obecności związków kompleksujących jony wapnia na zewnątrz i wewnątrz komórek, po unieczynnieniu kanałów wapniowych zależnych od napięcia, a także przy zahamowaniu głównego mechanizmu efektorowego ścieżki wapniowej – kinazy MLCK. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić brak wpływu jonów wapnia i efektorów przez nie kontrolowanych, na kierunkowość migracji komórek Swiss 3T3, w odpowiedzi na pole elektryczne o fizjologicznym natężeniu. Zastosowanie związków chelatujących jony wapnia spowodowało obniżenie aktywności migracyjnej, podczas gdy zastosowanie pożywki wolnej od jonów wapnia zwiększyło prędkość migracji. Niezależnie od tego, w żadnym przypadku nie doszło do istotnego statystycznie spadku kosinusa kierunkowego γ .

Na tle literatury dotyczącej elektrotaksji, wynik ten znajduje się w mniejszości, gdyż w przypadku licznych typów komórek wykazywano zależność reakcji elektrotaktycznej od jonów Ca^{2+} . Sytuacja ta miała miejsce przykładowo w przypadku mysich makrofagów otrzewnowych, które w obecności EGTA (5 mM) i jonów Mg^{2+} (2,5 mM) zaprzestawały tworzenia wypustek migracyjnych w kierunku anody. Podobne znieśnienie obserwowano po zadziałaniu jonami La^{3+} , które są inhibitorem napływu jonów Ca^{2+} do komórki. W obu przypadkach zależność obserwowano w niefizjologicznym polu 7,8 V/cm [48]. Obecność jonów La^{3+} i Co^{2+} w stężeniach milimolowych blokowała również migrację reagujących w kierunku katody keratocytów rybich [70]. Podobnie na migrację tych komórek wpływał werapamil (50 μM) i nitrendipina (50 μM), będące inhibitorami kanałów wapniowych. Komórki te były z kolei niewrażliwe na wyraźne zmiany stężeń zewnątrzkomórkowych jonów Na^+ , K^+ i Cl^- , przekładające się na zaburzenie potencjału błonowego, co podważało tezę o zaangażowaniu w reakcję kanałów zależnych od napięcia [71]. Wyniki uzyskiwane w odniesieniu do rybich keratocytów nie są jednoznaczne, gdyż w nowszej pracy wykazano brak wpływu wychwytu jonów Ca^{2+} przez BAPTA-AM, jak i brak wrażliwości na zahamowanie kanałów wapniowych, przy udziale werapamilu [57].

W jednej z pierwszych prac tego typu przeprowadzonej na fibroblastach C3H/10T1/2 wykazano, że zarówno usunięcie z pożywki jonów wapnia, jak i blokowanie jego napływu do komórki jonami lantanu, obniżało reakcję komórek polegającą na wzroście elongacji i prostopadłej orientacji względem linii pola elektrycznego, podczas gdy stopniowe zwiększanie stężenia jonów wapnia do 10 mM zwiększało jej nasilenie. W tym przypadku reakcję charakteryzowano aplikując pole o wysokim natężeniu 10 V/cm. Kolejne badania na tych komórkach pozwoliły wykazać, że mechanizm wapniowy warunkował również przebudowę cytoszkieletu aktynowego w odpowiedzi na pole elektryczne [41,67]. W polu o natężeniu fizjologicznym (1 V/cm) obserwowano wapniowo-zależną reakcję galwanotropiczną komórek nerwowych, która była znoszona w obecności La^{3+} i Co^{2+} [154]. Dalsze badania potwierdziły, że galwanotropizm neuronów kolczystych zarodka żaby szponiastej, jest zależny zarówno od wapnia napływającego do komórki przez kanały zależne od napięcia, jak i od uwalniania go z kompartmentów wewnątrzkomórkowych [155]. Również elektrotaksja komórek grzebienia nerwowego przepiórki w kierunku katody ulega zaburzeniu w przypadku dodania do pożywki jonów Gd^{3+} (100 μM) lub Mg^{2+} (10 mM). Dodatkowe usunięcie jonów wapnia przy użyciu EGTA (2 mM) w tym układzie powoduje delikatne odwrócenie kierunku ruchu do anody [46].

Zaangażowanie wapnia w reakcję elektrotaktyczną potwierdzono również w przypadku sublinii słaboaderentnych komórek WC256, gdzie zarówno wprowadzenie do komórek związku chelatującego BAPTA-AM, jak i farmakologiczne zahamowanie aktywności kinazy MLCK (przy udziale inhibitora ML7), obniżało istotnie kierunkowość ruchu, co nie miało miejsca w komórkach tej linii tworzących lamellipodia. Wyniki te sugerowały, że przynajmniej w tym układzie kontrola mechanizmów skurczowych jest ważna dla elektrotaksji komórek prezentujących strategię migracji opartą na tworzeniu pęcherzykowatych wypustek, podczas gdy odgrywa mniejszą rolę w przypadku migracji blisko spokrewnionych komórek prezentujących inną strategię migracyjną [91].

Wśród prac dotyczących zjawiska elektrotaksji, w których podjęto się badania udziału mechanizmu wapniowego, istnieją jednak prace wskazujące na brak jego zaangażowania. W kontekście niniejszej pracy szczególnie warto wspomnieć o doświadczeniach dotyczących mysich fibroblastów NIH/3T3 [42]. Przeciwnie do wspomnianych fibroblastów C3H/10T1/2, a podobnie do prezentowanych tu wyników, katodalna reakcja tych komórek nie była zahamowana w obecności werapamilu. Podobnie, brak wpływu wykazano w przypadku inhibitorów D600 i nifedipiny. Istotnego spadku kierunkowości nie zaobserwowano również w buforze bezwapniowym, w obecności EGTA i po dodaniu $MgCl_2$. Analogiczne wyniki zaprezentowano w przypadku mysich fibroblastów SV101 [42]. Ludzkie keratynocyty preinkubowane z EGTA w stężeniu 2 mM, notowały wyraźny spadek kierunkowości, jednak autorzy pracy sami przyznają, że w układzie tym znacznie upośledzona była aktywność migracyjna komórek i notowane przemieszczenie, było wynikiem w większym stopniu zmian morfologicznych, niż rzeczywistej translokacji. Dodanie EGTA bezpośrednio przed eksperymentem, bez wcześniejszej preinkubacji, nie powodowało obniżenia kierunkowości ruchu [69].

Przeprowadzone niedawno badania na pierwotnych mysich fibroblastach, wykazały zahamowanie reakcji elektrotaktycznej przez jony La^{3+} , Ni^{2+} i Gd^{2+} , jednak brak wrażliwości na ładowania komórek BAPTA-AM. Istotnemu statystycznie spadkowi kierunkowości po dodaniu EGTA, towarzyszyło znaczne obniżenie aktywności migracyjnej w ogóle [64]. Kompleksowanie jonów wapnia przy udziale EGTA wywarło z kolei wpływ tylko na kierunkowość anodalnie migrujących fragmentów rybich keratocytów, a nie na całe komórki. Postulowano przy tym, że może to być jeden z mechanizmów determinujących spolaryzowaną aktywność miozyny II,

istotną dla reakcji anodalnej fragmentów komórek, o czym już wspomniano wcześniej, podczas gdy mechanizmy skurczowe nie determinują katodальной migracji całych komórek [152].

Zmiany poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie mogą zachodzić na skutek otwarcia błonowych kanałów wapniowych zależnych od napięcia lub naprężenia, w wyniku pasywnego przenikania jonów, lub w następstwie uwalniania ich z magazynów wewnątrzkomórkowych [156]. Niezależnie od przyczyny, większość mechanizmów uwzględniających zaangażowanie jonów wapnia wymaga zaistnienia przejściowego wzrostu ich stężenia w obrębie cytoplazmy, najprawdopodobniej występującego lokalnie. W niniejszej pracy rozpatrywano zaangażowanie jonów wapnia w indukcji skurczu po stronie anody, w komórkach migrujących w kierunku katody, stąd rejon anody (jako obszar, w którym następuje skurcz i retrakcja komórki) poddano szczególnej obserwacji. Zarówno pomiary poziomu wapnia w skali całej komórki, jak i na jej krańcu eksponowanym do anody, nie wykazały istotnych fluktuacji, skorelowanych z aplikowanym polem elektrycznym o fizjologicznym natężeniu. Wyzwania zobrazowania wspomnianego zjawiska podejmowano się kilkakrotnie w kontekście badań reakcji elektrotaktycznej. Zarówno przyjmowane podejście metodyczne, jak i uzyskiwane wyniki były bardzo zróżnicowane.

Obrazowanie przeprowadzone metodami chemiluminescencyjnymi w komórkach C3H/10T1/2 załadowanych białkiem akworyną, wykazało wzrost poziomu wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, który był zależny od zastosowanego natężenia pola elektrycznego. Warto zauważyć, że zmiany były widoczne w polach wyższych niż 1 V/cm i jak wykazano, zmiany te zachodziły w dużej mierze przy udziale aktywności kanałów wapniowych, a były znoszone poprzez ich hamowanie przez sole kobaltu i inhibitor D-600 [41]. Kolejne próby obrazowania podejmowano z wykorzystaniem metod fluorescencyjnych. W komórkach NIH/3T3 przy użyciu Fura-2 nie obserwowano zmian poziomu wapnia na skutek farmakologicznej depolaryzacji błony komórkowej, jak również brak było istotnych zmian poziomu skorelowanych ze stymulacją polem o natężeniu 4 V/cm, zarówno w skali całej komórki, jak i formowania gradientu wzdłuż linii pola. Po dłuższej stymulacji obserwowano nieznaczny wzrost sygnału, ale przypisywany był on fotouszkodzeniu komórek używanym światłem UV. W tym przypadku prowadzono również szybkie obserwacje z częstotliwością 30 klatek na sekundę, używając Fluo-3. W polu o wysokim natężeniu (10 V/cm) obserwowano spadek sygnału po stronie katody, ale jak wykazano, był on wynikiem zmian objętości w tym obszarze. Nagłych zmian skorelowanych z aplikacją pola elektrycznego nie obserwowano też w ciągu 60 s

przy użyciu Fura-2 [42]. Wyniki te są zgodne z obserwacjami przedstawionymi w niniejszej pracy, gdzie również prowadzono analogiczne obserwacje w dłuższej skali czasowej, jak i bezpośrednio po aplikacji pola elektrycznego i nie stwierdzono zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia.

Podobne obserwacje zmian stężenia jonów Ca^{2+} przeprowadzono w ostatnim okresie na pierwotnych fibroblastach mysich, wykorzystując w tym celu Fluo-4. W tym przypadku również nie obserwowano wzrostu sygnału, jednakże autorzy pracy nie zrażeni tym faktem zaproponowali mechanizm elektrotaksji oparty o przepływ jonów wapnia przez cytoplazmę komórki, zależny od aktywności kanałów SOC (ang. *store-operated calcium channel*), bazując na osłabieniu reakcji po hamowaniu tych kanałów farmakologicznie. Warto jednak mieć na uwadze wykorzystanie нефизjologicznego natężenia pola elektrycznego, wynoszącego 5 V/cm i brak wyraźnego wpływu na kierunkowość ruchu w przypadku większości ze stosowanych inhibitorów [64]. W poszukiwaniu mechanizmu odpowiedzialnego za szybkie reakcje na pole elektryczne (w skali sekundowej) poddano obserwacji również komórki pierwotnych bydlęcych osteoblastów i ludzkiego kostniakomięsaka. Jak już wspomniano, w przypadku tych komórek, w czasie krótszym niż 30 s (w skrajnych przypadkach nawet 10 s) od aplikacji pola elektrycznego, rejestrowano siły trakcyjne po stronie obu elektrod. Obserwowanej reakcji nie udało się skorelować ze zmianami poziomu wapnia w komórkach. Rejestrowany przy użyciu Fura-2 wzrost stężenia jonów był znacznie opóźniony względem obserwowanego skurczu [151]. Wśród prac obejmujących obrazowanie zmian poziomu wapnia w odpowiedzi na pole elektryczne, szczególną uwagę należy poświęcić pracy przeprowadzonej na szczurzych osteoblastach Calvarial migrujących do katody i ludzkich komórkach kostniakomięsaka SaOS-2, migrujących w przeciwnym kierunku. Przy użyciu Fura-2AM wykazano w tych komórkach napływ jonów wapnia przebiegający od strony anodalnej do katodalnej w przypadku komórek migrujących do katody i przeciwny kierunek przepływu, w komórkach anodalnych. Wzrost sygnału miał miejsce w skali sekundowej od zadziałania pola o wysokim natężeniu 14 V/cm. Niskie pola nie powodowały tego typu zmian. Napływ był zahamowany na skutek blokowania kanałów VGCC przez CdCl_2 i był zależny od obecności jonów Ca^{2+} w otoczeniu komórek [120]. Przedstawione obserwacje świadczą, że w wielu modelach komórkowych nie stwierdzono, podobnie jak w niniejszej pracy, zmian w sygnalizacji wapniowej pod wpływem pola elektrycznego o fizjologicznym natężeniu.

Jak wspomniano powyżej, w komórkach niemięśniowych funkcjonuje również alternatywna droga prowadząca do indukcji skurczu cytoszkieletu aktomiozynowego. W tym modelu centralnym elementem sygnalizacyjnym prowadzącym do aktywacji miozyny II i generowania skurczu w tylnym rejonie migrującej komórki jest kinaza ROCK. Białko to pełni swoją funkcję najczęściej jako mechanizm efektorowy białka RhoA, należącego do małych białek G z rodziny Rho. W niniejszej pracy zweryfikowano udział tej osi sygnalizacyjnej w manifestowaniu reakcji elektrotaktycznej komórek Swiss 3T3. W związku z wykazaniem braku zaangażowania mechanizmów wapniowych postulowano, że może być to główny mechanizm prowadzący do aktywacji miozyny II, której istotność w przebiegu badanej reakcji wykazano. Badania z wykorzystaniem inhibitorów drobnocząsteczkowych potwierdziły statystycznie istotny spadek wartości kosinusa kierunkowego γ po zahamowaniu kinazy ROCK. Jednakże, co interesujące, wpływu takiego nie zaobserwowano na skutek zahamowania białka RhoA. Dalsze badania potwierdziły, że aplikacja pola elektrycznego o fizjologicznym natężeniu nie powoduje wzrostu aktywności białka RhoA w skali całej komórki ani lokalnie, po stronie eksponowanej do anody.

Udział ścieżki RhoA/ROCK jako centralnej osi sygnalizacyjnej wykorzystywanej w generowaniu skurczu cytoszkieletu aktomiozynowego, był wielokrotnie badany w toku poszukiwania mechanizmów determinujących polaryzację i kierunkową migrację w polu elektrycznym. Badania te najczęściej opierały się na podobnym podejściu, jak w niniejszej pracy, tj. farmakologicznym hamowaniu białek RhoA i przede wszystkim ROCK. Zahamowanie kinazy ROCK obniżało istotnie prostopadłą orientację reagujących anodalnie komórek HUVEC w polu elektrycznym. Obserwowany efekt był proporcjonalny do stężenia inhibitora, jednak nie obejmował pełnego zniesienia reakcji, co sugeruje zaangażowane również innych ścieżek w badany proces [29]. W badaniach nad linią aktywnie tworzących przerzuty komórek raka płuc CL1-5 wykazano, że anodalna reakcja elektrotaktyczna ulega zniesieniu po zahamowaniu ROCK, w stopniu proporcjonalnym do stężenia inhibitora. Nie znosił on jednak prostopadłej orientacji względem linii pola, co sugeruje odrębne mechanizmy tych zjawisk w tym przypadku [157]. Inhibitor ROCK wyraźnie znosił również migrację w kierunku anody komórek hiPS (ang. *human induced pluripotent stem cells*), wpływając jednocześnie stymulująco na prędkość ruchu [158]. W przypadku rybich keratocytów obserwowano podobną zależność jak dla miozyny II – zahamowanie kinazy ROCK powodowało zniesienie kierunkowości ruchu fragmentów tych

komórek (w pracy tej, jak wspomniano wcześniej, wykazano, że fragmenty tych komórek zachowują zdolność do kierunkowej migracji w polu elektrycznym, migrując jednakże w kierunku anody), co sugeruje, że w tym układzie kinaza ROCK wspólnie z mechanizmami wapniowymi może determinować aktywność miozyny II i anodalną reakcję kierunkową w polu elektrycznym [57,152]. Odmienne, reakcja pierwotnych fibroblastów myszy, zależna od miozyny II, nie angażuje aktywności kinazy ROCK. Analogiczne wyniki zaprezentowano w przypadku komórek raka prostaty PC3 [64]. Badania wykazały również, że zahamowanie ROCK nie wpływa na katodalną reakcję ludzkich keratynocytów [159], komórek hNSCs (ang. *human neural stem cells*) [160] oraz bydlęcych komórek nabłonkowych rogówki CEC (ang. *corneal epithelium cells*) [161].

Z powyższych informacji, można wyciągnąć wniosek, że zaangażowanie kinazy ROCK jest typowe wyłącznie dla migracji w kierunku dodatniego bieguna pola elektrycznego, jednak nie jest to regułą, gdyż inhibitor ROCK wpływa także na zahamowanie katodalnej reakcji neuronów hipokampu, w sposób zależny od stężenia. Jednocześnie obniża też prędkość migracji badanych komórek [162]. Inhibicja ROCK częściowo znosi również polaryzację aparatu Golgiego wywołaną polem elektrycznym i w pewnym stopniu wpływa także na katodalną reakcję komórek CHO [136]. Z kolei w przypadku wspomnianych już komórek inicjujących guzy mózgu (BTICs), które w warunkach 2D migrują anodalnie, zahamowanie ROCK podnosi istotnie kierunkowość migracji [153]. Jeszcze wyższy wzrost kierunkowości ruchu notowano w przypadku zahamowania ROCK w komórkach anodalnych adherentnej frakcji mysiego szpiku kostnego (A-BMAC), co przejawiało się zwłaszcza w czasie pierwszej godziny od aplikacji pola elektrycznego [92]. W przypadku katodalnej reakcji galwanotropicznej wypustek neuronów żaby szponiastej, kinaza ROCK pod kontrolą białka RhoA może odpowiadać za hamowanie wzrostu w kierunku anody. Na zjawisko takie wskazują zarówno efekty hamowania farmakologicznego tych białek, jak i gromadzenie RhoA po stronie anody. Funkcja ta wydaje się być sprawowana wspólnie z kinazą MLCK [112]. Farmakologiczne zahamowanie ROCK oraz nadrzędnego dla tej kinazy białka RhoA, skutkuje istotnym spadkiem katodalnej elektrotaksji komórek WC256 migrujących przez wytwarzanie pęcherzykowatych wypustek. W przypadku komórek wytwarzających lamellipodia, wyłącznie hamowanie RhoA powodowało taki efekt, lecz w mniejszym stopniu [91]. Stymulacja komórek WC256 polem elektrycznym o fizjologicznym natężeniu nie powoduje wzrostu aktywacji

białka RhoA w skali całej komórki, nawet pomimo zaangażowania tego białka w reakcję elektrotaktyczną. Można przypuszczać, że w tym przypadku aktywacja zachodzi lokalnie [91].

Badane w pracy komórki Swiss 3T3 odpowiadają na aplikację pola elektrycznego oraz zamianę elektrod, przebiegającym dynamicznie procesem tworzenia wypustek migracyjnych w kierunku katody. Proces tworzenia lamellipodium, opiera się na ukierunkowanej polimeryzacji i stabilizacji cytoszkieletu aktynowego, i przebiega pod kontrolą licznych ścieżek sygnalizacyjnych, w obrębie których centralną rolę pełnią takie małe białka G, jak Rac1 i Cdc42, oraz elementy efektorowe, wśród których warto wymienić m.in. Arp2/3, forminy i pozostałe białka związane z cytoszkieletem aktynowym [163]. W proces polaryzacji komórek i determinowania ich krawędzi wiodącej często zaangażowana jest kinaza PI3K, która stanowi łącznik między błonowymi receptorami, a m.in. małymi białkami G [93]. W ostatnim etapie pracy zweryfikowano udział tych kluczowych dla tworzenia protruzji komponentów sygnalizacyjnych, w reakcję elektrotaktyczną komórek Swiss 3T3. Farmakologiczne hamowanie ich funkcji wykazało, że katodalna migracja w odpowiedzi na pole elektryczne jest uzależniona od aktywności białka Rac1 i w mniejszym stopniu PI3K. Aktywność Cdc42, Arp2/3 i formin nie jest z kolei konieczna dla badanej reakcji. Obniżenie aktywności migracyjnej na skutek zahamowania wszystkich białek poza Cdc42 wskazuje na ich udział w generowaniu ruchu komórek Swiss 3T3.

Dotychczas wykazywano, że poszczególne białka związane z tworzeniem wypustek migracyjnych są w różnym stopniu zaangażowane w proces elektrotaksji komórek tkankowych. Szereg badań dotyczył reaktywności na pole elektryczne komórek neuronalnych różnego typu bądź odpowiadających im komórek progenitorowych i macierzystych. Wykazano m.in., że aktywność Cdc42 oraz Rac jest kluczowa dla skręcania wypustek neuronów żaby szponiastej w kierunku katody, podczas gdy farmakologiczne zahamowanie aktywności PI3K nie potwierdziło zaangażowania tego enzymu we wspomniany proces [112]. Inhibitor PI3K wpływa z kolei na zahamowanie katodalnej reakcji neuronów hipokampu, w sposób zależny od stężenia. Jednocześnie obniża też prędkość migracji badanych komórek [162]. Korzystając z metod koimmunoprecypitacji wykazano, że stymulacja polem elektrycznym powoduje nasilenie interakcji receptorów NMDAR (ang. *N-methyl-D-aspartate receptors*) z białkami nadrzędnymi i podrzędnymi dla Rac1, co sugeruje, że ścieżka ta może odpowiadać za dynamikę cytoszkieletu aktynowego w katodalnej elektrotaksji komórek NSPC (ang. *neuronal stem/progenitor cells*) [164]. Pozbawienie genu ARPC2 kodującego element kompleksu Arp2/3 przeciwdziało

elektrotaksji mysich komórek wywodzących się z neuronalnych komórek macierzystych (NSC-OPCs ang. *neural stem cell-derived oligodendrocyte precursor cells*) [165].

Udział badanych mechanizmów tworzenia protruzji, co zrozumiałe, nie ogranicza się wyłącznie do komórek typu neuronalnego. Migracja katodalna bydłących komórek nabłonkowych rogówki CEC (ang. *corneal epithelium cells*) odbywa się z udziałem aktywacji białka Cdc42, ale niezależnie od Rac [161]. Zahamowanie PI3K z kolei obniża istotnie prostopadłą orientację endotelialnych komórek HUVEC w polu elektrycznym [29]. Bardziej skomplikowany obiekt badań stanowią komórki inicjujące guzy mózgu (BTICs, ang. *brain tumour initiating cells*), które w warunkach 2D migrują anodalnie w sposób zależny od aktywności PI3K, ale bez udziału Rac i Cdc42. Migracja tych komórek w trójwymiarowym żelu z kolagenu i kwasu hialuronianowego odbywa się w kierunku przeciwnym, do katody. Hamowanie PI3K w tych warunkach sprzyja wyższej kierunkowości ruchu [153]. W przypadku komórek nowotworowych płuc CL1-5 wykazano, że anodalna reakcja elektrotaktyczna ulega zniesieniu po zahamowaniu PI3K, jednak przy jednoczesnym znacznym obniżeniu prędkości migracji [157]. Wpływ zahamowania PI3K na osłabienie reakcji kierunkowej wykazano również w odniesieniu do pierwotnych fibroblastach myszy, a także w przypadku komórek raka prostaty PC3 [64].

Przeprowadzone niedawno badania na ludzkich keratynocytach wykazały, że zahamowanie Arp2/3 nie wpływa na ich katodalną reakcję elektrotaktyczną, podobnie jak hamowanie farmakologiczne Cdc42 i Rac1. Farmakologiczne zahamowanie PI3K przy użyciu PIK-90 z kolei doprowadziło nawet do odwrócenia kierunku migracji części z badanych komórek [159]. Wynik ten pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami, gdzie wyeliminowanie podjednostki katalitycznej PI3K γ powodowało wyraźne uniewrażliwienie mysich komórek nabłonkowych na pole elektryczne [159,166]. Stosunkowo ciekawe obserwacje poczyniono wykorzystując wspomniany wcześniej układ, obejmujący rybie keratocyty i ich fragmenty o skłonności do przeciwstawnej reakcji elektrotaktycznej. Zahamowanie PI3K powodowało osłabienie katodalnej reakcji kierunkowej całych komórek w słabym polu elektrycznym (1 V/cm) i jej odwrócenie do anody przy wysokim natężeniu (5 V/cm) [57]. Ta sama manipulacja nie wpływała z kolei na anodalną migrację fragmentów keratocytów [152]. Co więcej, zahamowanie PI3K wpływało korzystnie na reakcję elektrotaktyczną fragmentów, która była uprzednio zniesiona przez aktywację szlaków zależnych od cAMP i cGMP [98]. Zahamowanie Arp2/3

przy udziale CK-666 nie wpływa, wbrew oczekiwaniom, na kierunkowość ruchu całych keratocytów rybich, lecz osłabia anodalną reakcję ich fragmentów [152]. Na uzyskanie równie interesujących wyników pozwoliło także porównanie mechanizmów kluczowych dla tworzenia wypustek w komórkach WC256 wykorzystujących odrębne strategie migracyjne. Ingerencja w aktywność Rac1 wpływa w dużo większym stopniu na elektrotaksję komórek sublinii mocno-adherentnej, tworzącej lamellipodia, niż na komórki słabo-adherentne, migrujące przez wytwarzanie pęcherzykowatych wypustek. Zahamowanie aktywności Cdc42 z kolei wywiera większy wpływ na elektrotaksję drugiej wspomnianej sublinii [91].

Wszystkie te obserwacje wskazują, że mechanizmy reakcji elektrotaktycznej mogą być wysoce zróżnicowane w zależności o typu komórek oraz ich strategii migracyjnej. Możliwe jest jednak również, że istnieje jeden nadrzędny, dotychczas nieznan, mechanizm detekcji pola elektrycznego przez migrujące komórki, a obserwowane różnice związane są jedynie z odmiennymi ścieżkami sygnalizacyjnymi, wykorzystywanymi w regulacji ruchu i polaryzacji różnych typów komórek.

6. PODSUMOWANIE

W toku przeprowadzonych badań wykazano, że mysie fibroblasty Swiss 3T3 prezentują reakcję elektrotaktyczną w polach elektrycznych o fizjologicznym natężeniu, migrując w kierunku katody. Taki kierunek migracji może być istotny dla komórek tego typu w procesie gojenia ran, gdyż biegun ujemny endogenego pola elektrycznego w tym procesie lokalizuje się w centrum rany. W polu elektrycznym o wysokim natężeniu, komórki te przyjmują również morfologię i orientację typową dla większości reagujących elektrotaktycznie komórek, wydłużając się znacznie i orientując prostopadle do linii pola elektrycznego. Pomimo, że cechy takie nie są typowe dla migrujących w innych okolicznościach fibroblastów, nie stanowi to jednak czynnika, który przeszkadzałby im wydajnie się przemieszczać, gdyż umieszczenie w polu elektrycznym skutkowało nawet wzrostem aktywności migracyjnej badanych komórek.

W pracy przedstawiono szczegółową charakterystykę ilościową dynamiki reakcji elektrotaktycznej, jak i porównanie pierwotnej reakcji na pole z dynamiką nawrotu w odpowiedzi na zamianę jego biegunów, co w odniesieniu do komórek tkankowych nie miało wcześniej miejsca. Wykazano, że pierwsze symptomy reakcji na pole elektryczne mają miejsce w czasie 1-2 min od jego aplikacji. Reakcja na zamianę kierunku pola elektrycznego wykazuje jeszcze większą dynamikę. Obserwacje te wskazują na funkcjonowanie w badanych komórkach mechanizmu pozwalającego na szybką detekcję pola elektrycznego. Tak dynamicznej reakcji na pole elektryczne nie można tłumaczyć bardzo często w ostatnich latach proponowanym mechanizmem odpowiedzi opartym na redystrybucji białek błonowych, o charakterze receptorowym, a raczej skłania do poszukiwania innych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko.

W toku przeprowadzonych badań przede wszystkim potwierdzono ostatnie doniesienia, że w mechanizm detekcji pola elektrycznego o fizjologicznym natężeniu mogą być zaangażowane dkomórkowe prostownicze kanały potasowe (Kir), w połączeniu z poliaminami, a w szczególności kanał Kir4.2, którego zahamowanie ekspresji wywierało podobny efekt, jak farmakologiczne zahamowanie całej rodziny kanałów. Pierwszy raz wykazano jednak, że mechanizm ten może być właściwy dla fibroblastów, jak i poddano analizie znaczenie tych kanałów w kontekście dynamiki reakcji. Uzyskane wyniki sugerują, że funkcja kanałów Kir jest szczególnie istotna w pierwotnej, szybkiej odpowiedzi na pole elektryczne, aczkolwiek wzrost kierunkowości ruchu komórek z zahamowaną funkcją tych kanałów w czasie dłuższej ekspozycji

na pole może wskazywać, że z czasem uaktywniają się inne mechanizmy, które są w stanie kompensować brak funkcjonalnych kanałów Kir. Warto zwrócić również uwagę, że takie zjawisko jest nasilone szczególnie w wyższych natężeniach pola elektrycznego, co może wskazywać, że w takich natężeniach aktywacji ulegają inne, być może mniej istotne w warunkach *in vivo* mechanizmy.

Farmakologiczne hamowanie funkcji wybranych białek sygnalizacyjnych pozwoliło potwierdzić, że sprawny przebieg reakcji elektrotaktycznej jest wypadkową skoordynowanej aktywności na obu biegunach migrującej komórki. Uzyskane wyniki sugerują, że dla generowania skurczu po stronie anody jest istotna aktywność miozyny II pod kontrolą kinazy ROCK. Wydaje się, że w proces ten nie są zaangażowane jony wapnia, co potwierdzono licznymi metodami. Tak kompleksowe porównanie obu tych osi sygnałowych prowadzących do skurczu komórki również przeprowadzono po raz pierwszy w kontekście badań reakcji elektrotaktycznej. Dynamiczny proces tworzenia wypustek migracyjnych po stronie katody przebiega z kolei pod kontrolą białka Rac1, z prawdopodobnym udziałem kinazy PI3K.

Podsumowując, obserwacje te mogą sugerować, że w reakcję elektrotaktyczną komórek tkankowych są zaangażowane różne mechanizmy, które ulegają aktywacji w różnym natężeniu pola elektrycznego, jak i z różnym opóźnieniem od momentu aplikacji pola elektrycznego. Ogromna złożoność badanego zagadnienia znajduje również odzwierciedlenie w literaturze, gdzie na przestrzeni ostatnich 40 lat zaproponowano szereg pozornie wykluczających się mechanizmów leżących u podstaw elektrotaksji. Sytuacji nie ułatwia również brak standaryzacji aparatury badawczej, jak i stosowanie szerokiego zakresu natężeń pola elektrycznego oraz prowadzenia obserwacji w zróżnicowanej skali czasowej. W przeprowadzonych badaniach poddano obserwacji szereg aspektów dotyczących reakcji na pole elektryczne, zwłaszcza dynamikę tej odpowiedzi, co pozwala na szersze spojrzenie na badany proces i wyciąganie wielopłaszczyznowych wniosków.

Przedstawione wyniki stanowią doskonały punkt wyjściowy do dalszych badań. Szczególnie interesujące jest, w jaki sposób dkomórkowe prostownicze kanały potasowe wpływają na proces detekcji bodźca elektrycznego i jak ten sygnał jest przekazywany do szlaków sygnalizacyjnych, których istotność w pracy wykazano. Dalsze badania z pewnością również warto prowadzić z uwzględnieniem dynamiki reakcji elektrotaktycznej, mając na uwadze potencjalną złożoność badanego procesu.

7. SUPLEMENT

Film 1. Migracja fibroblastów Swiss 3T3 w warunkach kontrolnych – bezprądowych.

Czas nagrania 4 h 30 min, krok czasowy 30 s, tempo odtwarzania 40 fps. Skala 100 μm . Natężenie pola elektrycznego 0 V/cm.

Film 2. Migracja fibroblastów Swiss 3T3 w polu elektrycznym o natężeniu 1 V/cm.

Czas nagrania 4 h 30 min, krok czasowy 30 s, tempo odtwarzania 40 fps. Skala 100 μm . Natężenie pola elektrycznego 1 V/cm, od 30 minuty – katoda po prawej stronie pola widzenia.

Film 3. Migracja fibroblastów Swiss 3T3 w polu elektrycznym o natężeniu 3 V/cm.

Czas nagrania 4 h 30 min, krok czasowy 30 s, tempo odtwarzania 40 fps. Skala 100 μm . Natężenie pola elektrycznego 3 V/cm, od 30 minuty – katoda po prawej stronie pola widzenia.

Film 4. Dynamika reakcji fibroblastów Swiss 3T3 na zmianę kierunku pola elektrycznego.

Czas nagrania 4 h, krok czasowy 1 min, tempo odtwarzania 20 fps. Skala 100 μm . Natężenie pola elektrycznego 3 V/cm, 0-120 minuty – katoda po prawej stronie pola widzenia, 120-240 minuty – katoda po lewej stronie pola widzenia.

Film 5. Dynamika cytoszkieletu aktynowego podczas reakcji elektrotaktycznej fibroblastów Swiss 3T3 – reakcja na aplikację i zmianę kierunku pola elektrycznego.

Czas nagrania 3 h 20 min, krok czasowy 1 min, tempo odtwarzania 10 fps. Natężenie pola elektrycznego 3 V/cm, 11-70 min – katoda po prawej stronie pola widzenia, 71-150 min – katoda po lewej stronie pola widzenia, 151-200 min – katoda po prawej stronie pola widzenia.

Obrazowana F-aktyna; kanał zielony – epifluorescencja, kanał czerwony – mikroskopia TIRF.

Film 6. Reakcja elektrotaktyczna fibroblastów Swiss 3T3 wykazujących zahamowanie genu KCNJ15, kodującego kanał Kir4.2.

Czas nagrania 4 h 30 min, krok czasowy 30 s, tempo odtwarzania 40 fps. Skala 100 μm . Natężenie pola elektrycznego 1 V/cm, od 30 minuty – katoda po prawej stronie pola widzenia.

Film 7. Dynamika kontaktów zogniskowanych podczas reakcji elektrotaktycznej fibroblastów Swiss 3T3 – reakcja na aplikację i zmianę kierunku pola elektrycznego.

Czas nagrania 2 h 30 min, krok czasowy 1 min, tempo odtwarzania 10 fps. Natężenie pola elektrycznego 3 V/cm, 12-109 min – katoda po prawej stronie pola widzenia, 110-150 min – katoda po lewej stronie pola widzenia. Skala 25 μm Obrazowana winkulina; widoczne nałożenie kanałów: kanał zielony – epifluorescencja, kanał czerwony – mikroskopia TIRF.

Film 8. Reakcja elektrotaktyczna fibroblastów Swiss 3T3 poddanych zahamowaniu aktywności białka Rac1.

Czas nagrania 4 h 30 min, krok czasowy 30 s, tempo odtwarzania 40 fps. Skala 100 μm . Natężenie pola elektrycznego 3 V/cm, od 30 minuty – katoda po prawej stronie pola widzenia.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Scarpa E, Mayor R. Collective cell migration in development. *J Cell Biol.* 2016;212: 143–155. doi:10.1083/jcb.201508047
2. Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Development.* 2013;140: 2247–2251. doi:10.1242/dev.091751
3. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 2015;173: 370–378. doi:10.1111/bjd.13954
4. Michaelis UR. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71: 4131–4148. doi:10.1007/s00018-014-1678-0
5. Biro M, Munoz MA, Weninger W. Targeting Rho-GTPases in immune cell migration and inflammation. *Br J Pharmacol.* 2014;171: 5491–5506. doi:10.1111/bph.12658
6. Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24: 277–283. doi:10.1016/j.ceb.2011.12.004
7. Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol.* 2014;171: 5507–5523. doi:10.1111/bph.12704
8. Lara Rodriguez L, Schneider IC, Rodriguez LL, Schneider IC, Lara Rodriguez L, Schneider IC, et al. Directed cell migration in multi-cue environments. *Integr Biol. Royal Society of Chemistry;* 2013;5: 1306–23. doi:10.1039/c3ib40137e
9. Lange JR, Fabry B. Cell and tissue mechanics in cell migration. *Exp Cell Res.* 2013;319: 2418–2423. doi:10.1016/j.yexcr.2013.04.023
10. Sander LM. Modeling Contact Guidance and Invasion by Cancer Cells. *Cancer Res.* 2014;74: 4588–4596. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3294
11. Huang Y-J, Samorajski J, Kreimer R, Searson PC. The influence of electric field and confinement on cell motility. Kabla AJ, editor. *PLoS One.* 2013;8: e59447. doi:10.1371/journal.pone.0059447
12. Graziano BR, Weiner OD. Self-organization of protrusions and polarity during eukaryotic chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;30: 60–67. doi:10.1016/j.ceb.2014.06.007
13. Maritzen T, Schachtner H, Legler DF. On the move: endocytic trafficking in cell migration. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72: 2119–2134. doi:10.1007/s00018-015-1855-9
14. Roca-Cusachs P, Sunyer R, Trepat X. Mechanical guidance of cell migration: lessons from chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25: 543–549. doi:10.1016/j.ceb.2013.04.010

15. Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol.* 2014;14: 232–246. doi:10.1038/nri3641
16. Funk RHW. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration. *Front Physiol.* Frontiers Research Foundation; 2015;6: 143. doi:10.3389/fphys.2015.00143
17. McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev.* 2005;85: 943–978. doi:10.1152/physrev.00020.2004.
18. Campetelli A, Bonazzi D, Minc N. Electrochemical regulation of cell polarity and the cytoskeleton. *Cytoskeleton.* 2012;69: 601–612. doi:10.1002/cm.21047
19. Nuccitelli R. A role for endogenous electric fields in wound healing. *Curr Top Dev Biol.* 2003;58: 1–26.
20. McCaig CD, Song B, Rajnicek AM. Electrical dimensions in cell science. *J Cell Sci.* 2009;122: 4267–4276. doi:10.1242/jcs.023564
21. Martin-Granados C, McCaig CD. Harnessing the Electric Spark of Life to Cure Skin Wounds. *Adv Wound Care.* 2013;3: 127–138. doi:10.1089/wound.2013.0451
22. Reid B, Song B, McCaig CD, Zhao M. Wound healing in rat cornea: the role of electric currents. *FASEB J.* 2005;19: 379–86. doi:10.1096/fj.04-2325com
23. Illingworth CM, Barker AT. Measurement of electrical currents emerging during the regeneration of amputated finger tips in children. *Clin Phys Physiol Meas.* 1980;1: 87–89. doi:10.1088/0143-0815/1/1/007
24. Reid B, Song B, Zhao M. Electric currents in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev Biol.* 2009;335: 198–207. doi:10.1016/j.ydbio.2009.08.028
25. Zhao M. Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20: 674–82. doi:10.1016/j.semcdb.2008.12.009
26. Zhao M, Chalmers L, Cao L, Vieira AC, Mannis M, Reid B. Electrical signaling in control of ocular cell behaviors. *Prog Retin Eye Res.* Elsevier Ltd; 2012;31: 65–88. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.10.001
27. Dubé J, Rochette-Drouin O, Lévesque P, Gauvin R, Roberge CJ, Auger FA, et al. Restoration of the transepithelial potential within tissue-engineered human skin in vitro and during the wound healing process in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2010;16: 3055–3063. doi:10.1089/ten.tea.2010.0030

28. Shen Y, Pfluger T, Ferreira F, Liang J, Navedo MF, Zeng Q, et al. Diabetic cornea wounds produce significantly weaker electric signals that may contribute to impaired healing. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6: 26525. doi:10.1038/srep26525
29. Zhao M, Bai H, Wang E, Forrester J V, McCaig CD. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci*. 2004;117: 397–405. doi:10.1242/jcs.00868
30. Trivedi DP, Hallock KJ, Bergethon PR. Electric fields caused by blood flow modulate vascular endothelial electrophysiology and nitric oxide production. *Bioelectromagnetics*. NIH Public Access; 2013;34: 22–30. doi:10.1002/bem.21741
31. Arai KY, Nakamura Y, Hachiya Y, Tsuchiya H, Akimoto R, Hosoki K, et al. Pulsed electric current induces the differentiation of human keratinocytes. *Mol Cell Biochem*. 2013;379: 235–241. doi:10.1007/s11010-013-1645-3
32. Miao X, Yin S, Shao Z, Zhang Y, Chen X. Nanosecond pulsed electric field inhibits proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma. *J Orthop Surg Res*. 2015;10: 104. doi:10.1186/s13018-015-0247-z
33. Korraah A, Odenthal M, Kopp M, Vigneswaran N, Sacks PG, Dienes HP, et al. Induction of apoptosis and up-regulation of cellular proliferation in oral leukoplakia cell lines inside electric field. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113: 644–654. doi:10.1016/j.oooo.2011.11.016
34. Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res*. 2004; 30–7.
35. Huang C-W, Chen H-Y, Yen M-H, Chen JJW, Young T-H, Cheng J-Y. Gene expression of human lung cancer cell line CL1-5 in response to a direct current electric field. Ben-Jacob E, editor. *PLoS One*. 2011;6: e25928. doi:10.1371/journal.pone.0025928
36. Cooper MS, Keller RE. Perpendicular orientation and directional migration of amphibian neural crest cells in dc electrical fields. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81: 160–4. doi:10.1073/pnas.81.1.160
37. Sulik GL, Soong HK, Chang PC, Parkinson WC, Elnor SG, Elnor VM. Effects of steady electric fields on human retinal pigment epithelial cell orientation and migration in culture. *Acta Ophthalmol*. 1992;70: 115–22.
38. Zhao M, Agius-Fernandez A, Forrester J V., McCaig CD. Orientation and directed

- migration of cultured corneal epithelial cells in small electric fields are serum dependent. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 6: 1405–14.
39. Cortese B, Palamà IE, D'Amone S, Gigli G. Influence of electrotaxis on cell behaviour. *Integr Biol (Camb)*. Royal Society of Chemistry; 2014;6: 817–30. doi:10.1039/c4ib00142g
 40. Yang W-P, Onuma EK, Hui S-W. Response of C3H/10T1/2 fibroblasts to an external steady electric field stimulation. *Exp Cell Res.* 1984;155: 92–104. doi:10.1016/0014-4827(84)90770-5
 41. Onuma EK, Hui SW. Electric field-directed cell shape changes, displacement, and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. *J Cell Biol.* 1988;106: 2067–75. doi:10.1083/jcb.106.6.2067
 42. Brown MJ, Loew LM. Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *J Cell Biol.* 1994;127: 117–28.
 43. Trollinger DR, Isseroff RR, Nuccitelli R. Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes. *J Cell Physiol.* 2002;193: 1–9. doi:10.1002/jcp.10144
 44. Guo A, Song B, Reid B, Gu Y, Forrester J V, Jahoda CAB, et al. Effects of physiological electric fields on migration of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2010;130: 2320–7. doi:10.1038/jid.2010.96
 45. Stump RF, Robinson KR. *Xenopus* neural crest cell migration in an applied electrical field. *J Cell Biol.* 1983;97: 1226–33.
 46. Nuccitelli R, Smart T. Extracellular Calcium Levels Strongly Influence Neural Crest Cell Galvanotaxis. *Biol Bull.* 1989;176: 130–135. doi:10.2307/1541662
 47. Rapp B, de Boisfleury-Chevance A, Gruler H. Galvanotaxis of human granulocytes. Dose-response curve. *Eur Biophys J.* 1988;16: 313–9.
 48. Orida N, Feldman JD. Directional protrusive pseudopodial activity and motility in macrophages induced by extracellular electric fields. *Cell Motil.* 1982;2: 243–55. doi:10.1002/cm.970020305
 49. Djamgoz MBA, Mycielska M, Madeja Z, Fraser SP, Korohoda W. Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na⁺ channel activity. *J Cell Sci.* 2001;114: 2697–705.
 50. Chang PCT, Sulik GLI, Soong HK, Parkinson WC. Galvanotropic and galvanotoxic responses of corneal endothelial cells. *J Formos Med Assoc.* 1996;95: 623–627.

51. Wang E, Zhao M, Forrester J V., McCaig CD. Bi-directional migration of lens epithelial cells in a physiological electrical field. *Exp Eye Res.* 2003;76: 29–37. doi:10.1016/S0014-4835(02)00257-9
52. Franke K, Gruler H. Galvanotaxis of human granulocytes: electric field jump studies. *Eur Biophys J.* Springer-Verlag; 1990;18: 334–346. doi:10.1007/BF00196924
53. Krecioch I, Madeja Z, Lasota S, Zimolag E, Sroka J. The role of microtubules in electrotaxis of rat Walker carcinosarcoma WC256 cells. *Acta Biochim Pol. Polskie Towarzystwo Biochemiczne;* 2015;62: 401–6. doi:10.18388/abp.2015_1019
54. Li F, Chen T, Hu S, Lin J, Hu R, Feng H. Superoxide mediates direct current electric field-induced directional migration of glioma cells through the activation of AKT and ERK. Rao J, editor. *PLoS One.* 2013;8: e61195. doi:10.1371/journal.pone.0061195
55. Sun Y-S, Peng S-W, Lin K-H, Cheng J-Y. Electrotaxis of lung cancer cells in ordered three-dimensional scaffolds. *Biomicrofluidics.* 2012;6: 14102–1410214. doi:10.1063/1.3671399
56. Mossop BJ, Barr RC, Zaharoff DA, Yuan F. Electric fields within cells as a function of membrane resistivity--a model study. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2004;3: 225–31. doi:10.1109/TNB.2004.833703
57. Allen GM, Mogilner A, Theriot JA. Electrophoresis of cellular membrane components creates the directional cue guiding keratocyte galvanotaxis. *Curr Biol.* Elsevier Ltd; 2013;23: 560–568. doi:10.1016/j.cub.2013.02.047
58. Jaffe LF. Electrophoresis along cell membranes. *Nature.* 1977;265: 600–602. doi:10.1038/265600a0
59. McLaughlin S, Poo MM. The role of electro-osmosis in the electric-field-induced movement of charged macromolecules on the surfaces of cells. *Biophys J.* 1981;34: 85–93. doi:10.1016/S0006-3495(81)84838-2
60. Zhao M, Pu J, Forrester J V, McCaig CD. Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *FASEB J.* 2002;16: 857–9. doi:10.1096/fj.01-0811fje
61. Tank DW, Fredericks WJ, Barak LS, Webb WW. Electric field-induced redistribution and postfield relaxation of low density lipoprotein receptors on cultured human fibroblasts. *J Cell Biol.* 1985;101: 148–57.

62. Zhao M, Dick A, Forrester J V, McCaig CD. Electric field-directed cell motility involves up-regulated expression and asymmetric redistribution of the epidermal growth factor receptors and is enhanced by fibronectin and laminin. *Mol Biol Cell*. 1999;10: 1259–76.
63. Mycielska ME, Djamgoz MBA. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *J Cell Sci*. 2004;117: 1631–1639. doi:10.1242/jcs.01125
64. Guo L, Xu C, Li D, Zheng X, Tang J, Bu J, et al. Calcium Ion Flow Permeates Cells through SOCs to Promote Cathode-Directed Galvanotaxis. Guerrero-Hernandez A, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2015;10: e0139865. doi:10.1371/journal.pone.0139865
65. Zhang G, Edmundson M, Telezhkin V, Gu Y, Wei X, Kemp PJ, et al. The Role of Kv1.2 Channel in Electrotaxis Cell Migration. *J Cell Physiol*. Wiley-Liss Inc.; 2016;231: 1375–1384. doi:10.1002/jcp.25259
66. Nakajima K, Zhu K, Sun Y-H, Hegyi B, Zeng Q, Murphy CJ, et al. KCNJ15/Kir4.2 couples with polyamines to sense weak extracellular electric fields in galvanotaxis. *Nat Commun*. Nature Publishing Group; 2015;6: 8532. doi:10.1038/ncomms9532
67. Onuma EK, Hui SW. A calcium requirement for electric field-induced cell shape changes and preferential orientation. *Cell Calcium*. 1985;6: 281–92. doi:10.1016/0143-4160(85)90012-0
68. Wu D, Ma X, Lin F. DC Electric Fields Direct Breast Cancer Cell Migration, Induce EGFR Polarization, and Increase the Intracellular Level of Calcium Ions. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67: 1115–1125. doi:10.1007/s12013-013-9615-7
69. Fang KS, Farboud B, Nuccitelli R, Isseroff RR. Migration of Human Keratinocytes in Electric Fields Requires Growth Factors and Extracellular Calcium. *J Invest Dermatol*. 1998;111: 751–756. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00366.x
70. Cooper MS, Schliwa M. Electrical and ionic controls of tissue cell locomotion in DC electric fields. *J Neurosci Res*. 1985;13: 223–244. doi:10.1002/jnr.490130116
71. Cooper MS, Schliwa M. Motility of cultured fish epidermal cells in the presence and absence of direct current electric fields. *J Cell Biol*. 1986;102: 1384–99.
72. McCaig CD. Studies on the mechanism of embryonic frog nerve orientation in a small applied electric field. *J Cell Sci*. 1989;93 (Pt 4): 723–30.

73. Palmer AM, Messerli MA, Robinson KR. Neuronal galvanotropism is independent of external Ca²⁺ entry or internal Ca²⁺ gradients. *J Neurobiol.* 2000;45: 30–38. doi:10.1002/1097-4695(200010)45:1<30::AID-NEU3>3.0.CO;2-3
74. Shanley LJ, Walczysko P, Bain M, MacEwan DJ, Zhao M. Influx of extracellular Ca²⁺ is necessary for electrotaxis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* 2006;119: 4741–4748. doi:10.1242/jcs.03248
75. Korohoda W, Mycielska M, Janda E, Madeja Z. Immediate and long-term galvanotactic responses of *Amoeba proteus* to dc electric fields. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2000;45: 10–26. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(200001)45:1<10::AID-CM2>3.0.CO;2-T
76. Anderson JD. Galvanotaxis of slime mold. *J Gen Physiol.* 1951;35: 1–16.
77. Anderson JD. Potassium loss during galvanotaxis of slime mold. *J Gen Physiol.* 1962;45: 567–74.
78. Gao R-C chi, Zhang X-D dong, Sun Y-H hui, Kamimura Y, Mogilner A, Devreotes PN, et al. Different roles of membrane potentials in electrotaxis and chemotaxis of *dictyostelium* cells. *Eukaryot Cell.* 2011;10: 1251–6. doi:10.1128/EC.05066-11
79. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol Rev.* 2010;90: 291–366. doi:10.1152/physrev.00021.2009
80. Baronas VA, Kurata HT. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front Physiol.* 2014;5 AUG: 1–14. doi:10.3389/fphys.2014.00325
81. Oliver D, Baukrowitz T, Fakler B. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem.* 2000;267: 5824–5829. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01669.x
82. Wang J, Huang Y, Ning Q. Review on regulation of inwardly rectifying potassium channels. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2011;21: 303–311.
83. Adams DS, Levin M. Endogenous voltage gradients as mediators of cell-cell communication: strategies for investigating bioelectrical signals during pattern formation. *Cell Tissue Res.* 2013;352: 95–122. doi:10.1007/s00441-012-1329-4
84. Lu Z. Mechanism of Rectification in Inward-Rectifier K⁺ Channels. *Annu Rev Physiol.* 2004;66: 103–129. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.150822
85. Kurata HT, Akrouh A, Li JBW, Marton LJ, Nichols CG. Scanning the topography of polyamine blocker binding in an inwardly rectifying potassium channel. *J Biol Chem.*

- 2013;288: 6591–6601. doi:10.1074/jbc.M112.383794
86. deHart GW, Jin T, McCloskey DE, Pegg AE, Sheppard D. The alpha9beta1 integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 7188–7193. doi:10.1073/pnas.0708044105
 87. Huang L, Cormie P, Messerli MA, Robinson KR. The involvement of Ca²⁺ and integrins in directional responses of zebrafish keratocytes to electric fields. *J Cell Physiol*. 2009;219: 162–72. doi:10.1002/jcp.21660
 88. Hu YL, Li S, Miao H, Tsou TC, Del Pozo MA, Chien S. Roles of microtubule dynamics and small GTPase Rac in endothelial cell migration and lamellipodium formation under flow. *Journal of Vascular Research*. 2002. pp. 465–476. doi:10.1159/000067202
 89. James JL, Cartwright JE, Whitley GS, Greenhill DR, Hoppe A. The regulation of trophoblast migration across endothelial cells by low shear stress: consequences for vascular remodelling in pregnancy. *Cardiovasc Res*. 2012;93: 152–161. doi:10.1093/cvr/cvr276
 90. Simmers MB, Pryor AW, Blackman BR. Arterial shear stress regulates endothelial cell-directed migration, polarity, and morphology in confluent monolayers. *AJP Hear Circ Physiol*. 2007;293: H1937–H1946. doi:10.1152/ajpheart.00534.2007
 91. Sroka J, Krecioch I, Zimolag E, Lasota S, Rak M, Kedracka-Krok S, et al. Lamellipodia and Membrane Blebs Drive Efficient Electrotactic Migration of Rat Walker Carcinosarcoma Cells WC 256. *PLoS One*. Public Library of Science; 2016;11: e0149133. doi:10.1371/journal.pone.0149133
 92. Zimolag E, Borowczyk-Michalowska J, Kedracka-Krok S, Skupien-Rabian B, Karnas E, Lasota S, et al. Electric field as a potential directional cue in homing of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to cutaneous wounds. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. The Authors; 2017;1864: 267–279. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.011
 93. Devreotes P, Horwitz AR. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7: a005959. doi:10.1101/cshperspect.a005959
 94. Au HTH, Cheng I, Chowdhury MF, Radisic M. Interactive effects of surface topography and pulsatile electrical field stimulation on orientation and elongation of fibroblasts and cardiomyocytes. *Biomaterials*. 2007;28: 4277–93. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.001

95. Rajnicek AM, Foubister LE, McCaig CD. Growth cone steering by a physiological electric field requires dynamic microtubules, microfilaments and Rac-mediated filopodial asymmetry. *J Cell Sci.* 2006;119: 1736–45. doi:10.1242/jcs.02897
96. Saarikangas J, Zhao H, Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev.* 2010;90: 259–289. doi:10.1152/physrev.00036.2009
97. Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN. *Nature.* 2006;442: 457–460. doi:10.1038/nature04925
98. Zhu K, Sun Y, Miu A, Yen M, Liu B, Zeng Q, et al. cAMP and cGMP Play an Essential Role in Galvanotaxis of Cell Fragments. *J Cell Physiol.* Wiley-Liss Inc.; 2016;231: 1291–1300. doi:10.1002/jcp.25229
99. Worby CA, Dixon JE. Pten. *Annu Rev Biochem.* 2014;83: 641–669. doi:10.1146/annurev-biochem-082411-113907
100. Zhang HL, Peng HB. Mechanism of acetylcholine receptor cluster formation induced by DC electric field. Pant H, editor. *PLoS One.* 2011;6: e26805. doi:10.1371/journal.pone.0026805
101. Özkucur N, Song B, Bola S, Zhang L, Reid B, Fu G, et al. NHE3 phosphorylation via PKC η marks the polarity and orientation of directionally migrating cells. *Cell Mol Life Sci.* Birkhauser Verlag AG; 2014;71: 4653–4663. doi:10.1007/s00018-014-1632-1
102. Li F, Wang H, Li L, Huang C, Lin J, Zhu G, et al. Superoxide plays critical roles in electrotaxis of fibrosarcoma cells via activation of ERK and reorganization of the cytoskeleton. *Free Radic Biol Med.* 2012;52: 1888–1896. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.047
103. Guo X, Jiang X, Ren X, Sun H, Zhang D, Zhang Q, et al. The Galvanotactic Migration of Keratinocytes is Enhanced by Hypoxic Preconditioning. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2015;5: 10289. doi:10.1038/srep10289
104. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9: 690–701. doi:10.1038/nrm2476
105. Jaffe AB, Hall A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21: 247–269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721

106. Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2016;17: 496–510. doi:10.1038/nrm.2016.67
107. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton.* 2010;67: 545–554. doi:10.1002/cm.20472
108. Martin K, Reimann A, Fritz RD, Ryu H, Jeon NL, Pertz O. Spatio-temporal co-ordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2016;6: 21901. doi:10.1038/srep21901
109. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell.* Elsevier Inc.; 2011;145: 1012–1022. doi:10.1016/j.cell.2011.06.010
110. Farhan H, Hsu VW. Cdc42 and Cellular Polarity: Emerging Roles at the Golgi. *Trends Cell Biol.* Elsevier Ltd; 2016;26: 241–248. doi:10.1016/j.tcb.2015.11.003
111. Fritz RD, Pertz O. The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns. *F1000Research.* 2016;5: 749–761. doi:10.12688/f1000research.7370.1
112. Rajnicek AM, Foubister LE, McCaig CD. Temporally and spatially coordinated roles for Rho, Rac, Cdc42 and their effectors in growth cone guidance by a physiological electric field. *J Cell Sci.* 2006;119: 1723–35. doi:10.1242/jcs.02896
113. Lasota S. Charakterystyka reakcji mysich embrjonalnych fibroblastów na pole elektryczne o fizjologicznym natężeniu. Uniwersytet Jagielloński. 2015.
114. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9: 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
115. Friedl P, Noble PB, Zänker KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J Immunol Methods.* 1993;165: 157–65.
116. Dunn GA, Brown AF. Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation. *J Cell Sci.* 1986;83: 313–40.
117. Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1993;265: C1363-70.
118. Chen Y, Alm K, Vujcic S, Kramer DL, Kee K, Diegelman P, et al. The role of mitogen-activated protein kinase activation in determining cellular outcomes in polyamine

- analogue-treated human melanoma cells. *Cancer Res.* 2003;63: 3619–25.
119. Madeja Z, Korohoda W. Niektóre zastosowania metod komputerowej analizy obrazu [cytometrii obrazowej] w biologii komórki. *Postępy Biol Komórki.* [Państwowe Wydawn. Naukowe, Oddz. Wrocław]; 1996;23: 457–476.
 120. Ozkucur N, Monsees TK, Perike S, Do HQ, Funk RHW. Local calcium elevation and cell elongation initiate guided motility in electrically stimulated osteoblast-like cells. *PLoS One.* 2009;4: e6131. doi:10.1371/journal.pone.0006131
 121. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* (80-). 2003;302: 1704–1709. doi:10.1126/science.1092053
 122. Murali A, Rajalingam K. Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71: 1703–1721. doi:10.1007/s00018-013-1519-6
 123. Finkelstein E, Chang W, Chao P-HG, Gruber D, Minden A, Hung CT, et al. Roles of microtubules, cell polarity and adhesion in electric-field-mediated motility of 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci.* 2004;117: 1533–45. doi:10.1242/jcs.00986
 124. Nuccitelli R, Erickson CA. Embryonic cell motility can be guided by physiological electric fields. *Exp Cell Res.* 1983;147: 195–201. doi:10.1016/0014-4827(83)90284-7
 125. Erickson CA, Nuccitelli R. Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields. *J Cell Biol.* 1984;98: 296–307.
 126. Bai H, McCaig CD, Forrester J V., Zhao M. DC electric fields induce distinct preangiogenic responses in microvascular and macrovascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24: 1234–9. doi:10.1161/01.ATV.0000131265.76828.8a
 127. Barker AT, Jaffe LF, Venable JW. The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am J Physiol.* 1982;242: R358-66.
 128. Chiang MC, Cragoe EJ, Venable JW. Intrinsic electric fields promote epithelization of wounds in the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Dev Biol.* 1991;146: 377–85.
 129. Chiang M, Robinson KR, Venable JW. Electrical fields in the vicinity of epithelial wounds in the isolated bovine eye. *Exp Eye Res.* 1992;54: 999–1003.
 130. Sta IDD, Cragoe EJ, Venable JW. Electric field strength and epithelization in the newt (*Notophthalmus viridescens*). *J Exp Zool.* 1996;274: 56–62.
 131. Ferrier J, Ross SM, Kanehisa J, Aubin JE. Osteoclasts and osteoblasts migrate in opposite

- directions in response to a constant electrical field. *J Cell Physiol.* 1986;129: 283–288.
doi:10.1002/jcp.1041290303
132. Soong HK, Parkinson WC, Bafna S, Sulik GL, Huang SC. Movements of cultured corneal epithelial cells and stromal fibroblasts in electric fields. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31: 2278–82.
 133. Soong HK, Parkinson WC, Sulik GL, Bafna S. Effects of electric fields on cytoskeleton of corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res.* 1990;9: 893–901.
 134. Luther PW, Peng HB, Lin JJ. Changes in cell shape and actin distribution induced by constant electric fields. *Nature.* 1983;303: 61–4. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 135. Hinkle L, McCaig CD, Robinson KR. The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field. *J Physiol.* 1981;314: 121–35.
 136. Pu J, Zhao M. Golgi polarization in a strong electric field. *J Cell Sci.* 2005;118: 1117–28. doi:10.1242/jcs.01646
 137. Choi H, Cho J-S, Park IH, Yoon HG, Lee H-M. Effects of microelectrical current on migration of nasal fibroblasts. *Am J Rhinol Allergy.* 2011;25: 157–62. doi:10.2500/ajra.2011.25.3633
 138. Popov S V., Svitkina TM, Margolis LB, Tsong TY. Mechanism of cell protrusion formation in electrical field: the role of actin. *BBA - Biomembr.* 1991;1066: 151–158. doi:10.1016/0005-2736(91)90181-7
 139. Harris AK, Pryer NK, Paydarfar D. Effects of electric fields on fibroblast contractility and cytoskeleton. *J Exp Zool.* 1990;253: 163–76. doi:10.1002/jez.1402530206
 140. Titushkin I, Cho M. Regulation of cell cytoskeleton and membrane mechanics by electric field: role of linker proteins. *Biophys J.* 2009;96: 717–28. doi:10.1016/j.bpj.2008.09.035
 141. Lin-Liu S, Adey WR, Poo MM. Migration of cell surface concanavalin A receptors in pulsed electric fields. *Biophys J.* 1984;45: 1211–1217. doi:10.1016/S0006-3495(84)84270-8
 142. Zhao M, Dick A, Forrester J V., McCaig CD. Electric field-directed cell motility involves up-regulated expression and asymmetric redistribution of the epidermal growth factor receptors and is enhanced by fibronectin and laminin. *Mol Biol Cell.* 1999;10: 1259–76.
 143. McCormack SA, Johnson LR. Polyamines and cell migration. *Journal of Physiology and Pharmacology.* 2001. pp. 327–349.

144. Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 2007;458: 90–102. doi:10.1016/j.abb.2006.07.012
145. Zhang A, Altura BT, Altura BM. Elevation of extracellular magnesium rapidly raises intracellular free Mg²⁺ in human aortic endothelial cells: is extracellular Mg²⁺ a regulatory cation? *Front Biosci.* 1997;2: a13-7.
146. Nakajima KI, Zhao M. Concerted action of KCNJ15/Kir4.2 and intracellular polyamines in sensing physiological electric fields for galvanotaxis. *Channels.* Taylor and Francis Inc.; 2016. pp. 264–266. doi:10.1080/19336950.2016.1165375
147. Lam D, Schlichter LC. Expression and contributions of the Kir2.1 inward-rectifier K⁺ channel to proliferation, migration and chemotaxis of microglia in unstimulated and anti-inflammatory states. *Front Cell Neurosci.* Frontiers Media SA; 2015;9: 1–12. doi:10.3389/fncel.2015.00185
148. Thuringer D, Chanteloup G, Boucher J, Pernet N, Boudesco C, Jegou G, et al. Modulation of the inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 by the pro-invasive miR-5096 in glioblastoma cells. *Oncotarget.* 2017;8: 37681–37693. doi:10.18632/oncotarget.16949
149. Ozkucur N, Perike S, Sharma P, Funk RHW. Persistent directional cell migration requires ion transport proteins as direction sensors and membrane potential differences in order to maintain directedness. *BMC Cell Biol.* 2011;12: 4. doi:10.1186/1471-2121-12-4
150. Banks TA, Luckman PSB, Frith JE, Cooper-White JJ. Effects of electric fields on human mesenchymal stem cell behaviour and morphology using a novel multichannel device. *Integr Biol (Camb).* Royal Society of Chemistry; 2015;7: 693–712. doi:10.1039/c4ib00297k
151. Curtze S, Dembo M, Miron M, Jones DB. Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. *J Cell Sci.* 2004;117: 2721–9. doi:10.1242/jcs.01119
152. Sun Y, Do H, Gao J, Zhao R, Zhao M, Mogilner A. Keratocyte fragments and cells utilize competing pathways to move in opposite directions in an electric field. *Curr Biol.* Elsevier Ltd; 2013;23: 569–574. doi:10.1016/j.cub.2013.02.026
153. Huang Y-JJ, Hoffmann G, Wheeler B, Schiapparelli P, Quinones-Hinojosa A, Searson P. Cellular microenvironment modulates the galvanotaxis of brain tumor initiating cells. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2016;6: 21583. doi:10.1038/srep21583
154. McCaig CD. Studies on the mechanism of embryonic frog nerve orientation in a small

- applied electric field. *J Cell Sci.* 1989;93 (Pt 4): 723–730.
155. Stewart R, Erskine L, McCaig CD. Calcium channel subtypes and intracellular calcium stores modulate electric field-stimulated and -oriented nerve growth. *Dev Biol.* 1995;171: 340–51. doi:10.1006/dbio.1995.1286
 156. Thul R, Bellamy TC, Roderick HL, Bootman MD, Coombes S. Calcium oscillations. *Adv Exp Med Biol.* 2008;641: 1–27.
 157. Hou H-SS, Tsai H-FF, Chiu H-TT, Cheng J-YY. Simultaneous chemical and electrical stimulation on lung cancer cells using a multichannel-dual-electric-field chip. *Biomicrofluidics.* American Institute of Physics Inc.; 2014;8: 0–15. doi:10.1063/1.4896296
 158. Zhang J, Calafiore M, Zeng Q, Zhang X, Huang Y, Li RA, et al. Electrically guiding migration of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011;7: 987–96. doi:10.1007/s12015-011-9247-5
 159. Saltukoglu D, Grunewald J, Strohmeyer N, Bensch R, Ulbrich MH, Ronneberger O, et al. Spontaneous and electric field-controlled front-rear polarization of human keratinocytes. *Mol Biol Cell.* American Society for Cell Biology; 2015;26: 4373–4386. doi:10.1091/mbc.E14-12-1580
 160. Feng J-F, Liu J, Zhang X-Z, Zhang L, Jiang J-Y, Nolte J, et al. Guided migration of neural stem cells derived from human embryonic stem cells by an electric field. *Stem Cells.* 2012;30: 349–55. doi:10.1002/stem.779
 161. Rajnicek AM, Foubister LE, McCaig CD. Prioritising guidance cues: directional migration induced by substratum contours and electrical gradients is controlled by a rho/cdc42 switch. *Dev Biol.* 2007;312: 448–60. doi:10.1016/j.ydbio.2007.09.051
 162. Yao L, Shanley L, Mccaig C, Zhao M. Small applied electric fields guide migration of hippocampal neurons. *J Cell Physiol.* 2008;216. doi:10.1002/jcp.21431
 163. Krause M, Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15: 577–590. doi:10.1038/nrm3861
 164. Li LL, El-Hayek YH, Liu B, Chen Y, Gomez E, Wu X, et al. Direct-Current Electrical Field Guides Neuronal Stem/Progenitor Cell Migration. *Stem Cells.* 2008;26: 2193–2200. doi:10.1634/stemcells.2007-1022

165. Li Y, Wang P-S, Lucas G, Li R, Yao L. ARP2/3 complex is required for directional migration of neural stem cell-derived oligodendrocyte precursors in electric fields. *Stem Cell Res Ther. BioMed Central Ltd.*; 2015;6: 41. doi:10.1186/s13287-015-0042-0
166. Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature. Nature Publishing Group*; 2006;442: 457–60. doi:10.1038/nature04925