

**Justyna Małgorzata Sekretarska**

**Białka rzęskowe potencjalnego szlaku kinaz MAP  
powiązane z aparatem centralnym rzęski ruchomej  
*Tetrahymena***

Praca doktorska  
wykonana w **Pracowni**  
**Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek**  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**  
**dr hab. Ewa Joachimiak**

Warszawa, 2024



## **Podziękowania**

*Dziękuję mojej promotor dr hab. Ewie Joachimiak za opiekę merytoryczną, poświęcony czas oraz nieocenione wsparcie.*

*Dziękuję dr hab. Dorocie Włodze, prof. IBD za przekazaną wiedzę, cenne wskazówki a także serdeczność i wyrozumiałość.*

*Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Pracowni Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek z którymi miałam okazję współpracować, a w szczególności Zuzannie Samsel za wspólne rozwiązywanie problemów, pomoc w doświadczeniach oraz za to, że zawsze mogłam na nią liczyć.*

*Dziękuję moim Przyjaciołom za wsparcie i za to, że zawsze wysłuchali mnie w trudnych chwilach.*

*Dziękuję Moim Rodzicom, bez których ta praca by nie powstała – za to, że zawsze we mnie wierzą i mnie wspierają.*

*Dziękuję mojej Najukochańszej Babci, której dedykuję tę pracę, bo to ona nauczyła mnie miłości i szacunku do Nauki i książek, od dzieciństwa zaszczepiając we mnie ciekawość Świata.*

*Dziękuję też sobie – za wytrwałość.*

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych dr hab. Ewie Joachimiak, na podstawie decyzji numer:

OPUS 15 2018/29/B/NZ3/02443, „Identyfikacja białek aparatu centralnego i analiza ich roli w regulacji ruchu rzęsek”



NARODOWE CENTRUM NAUKI

## SPIS TREŚCI

Streszczenie .....	10
Abstract .....	12
Wykaz skrótów .....	14
1. Wstęp.....	16
1.1 Rzęski i wici - wprowadzenie .....	16
1.2 Budowa rzęsek .....	18
1.2.1 Makrokompleksy mikrotubul obwodowych .....	20
1.2.2 Aparat centralny .....	23
1.3 Rola aparatu centralnego .....	28
1.4 Kinazy MAP w rzęsce ruchomej.....	30
1.5 Organizm modelowy – orzęsek <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	32
2. Cel pracy.....	35
3. Materiały .....	37
3.1 Odczynniki i roztwory stosowane do hodowli bakterii .....	37
3.2 Roztwory do oczyszczania plazmidowego DNA z bakterii metodą lizy alkalicznej.....	37
3.3 Komercyjne zestawy stosowane do oczyszczania DNA, plazmidów, produktów reakcji PCR .....	37
3.4 Bufory stosowane do elektroforezy DNA .....	38
3.5 Enzymy stosowane w metodach biologii molekularnej .....	38
3.6 Pożywki i roztwory stosowane do hodowli orzęska <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	38
3.7 Odczynniki i bufory stosowane do odrzężania komórek <i>Tetrahymena</i> .....	39
3.8 Zestaw stosowany do pomiaru białka .....	39
3.9 Roztwory stosowane do elektroforezy w żelu poliakryloamidowym i metody Western blot	39
3.10 Zestaw stosowany do wykrywania fosforylowanych białek .....	40

3.11	Odczynniki i bufor	stosowane w metodzie BioID (ang. <i>proximity-dependent biotin identification</i> ) .....	40
3.12	Odczynniki i bufor	stosowane w metodzie koimmunoprecypitacji .....	40
3.13	Odczynniki i bufor	stosowane w metodzie typu <i>pull-down</i> .....	41
3.14	Odczynniki i roztwory	stosowane w immunocytochemii .....	41
3.13	Stosowane przeciwciała	.....	42
3.14	Szczepy komórek <i>Tetrahymena</i>	.....	43
4.	Metody.....		50
4.1	Metody bioinformatyczne	.....	50
4.2	Hodowla komórek <i>Tetrahymena thermophila</i>	.....	51
4.3	Hodowla bakterii <i>Escherichia coli</i>	.....	51
4.3.1	Przygotowanie bakterii kompetentnych	.....	51
4.3.2	Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego	.....	52
4.3.3	Mrożenie transformowanych bakterii	.....	52
4.4	Metody biologii molekularnej	.....	52
4.4.1	Oczyszczanie genomowego DNA z komórek <i>Tetrahymena thermophila</i>	.....	52
4.4.2	Łącuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	.....	53
4.4.3	Oczyszczanie produktów reakcji PCR	.....	55
4.4.4	Trawienie enzymami restrykcyjnymi	.....	55
4.4.5	Elektroforeza i oczyszczanie DNA z żelu agarozowego	.....	55
4.4.6	Pomiar stężenia DNA	.....	55
4.4.7	Ligacja fragmentów DNA	.....	56
4.4.8	Oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej (wg Birnboim i Doly, 1979)	.....	56
4.4.9	Oczyszczanie plazmidowego DNA z zastosowaniem komercyjnego zestawu	.....	56
4.5	Przygotowanie konstruktów/plazmidów do transformacji komórek <i>Tetrahymena</i>	.....	57

4.5.1 Przygotowanie plazmidów umożliwiających produkcję białek fuzyjnych w natywnych <i>loci</i> pod kontrolą natywnego promotora z metką dodaną na końcu karboksylowym białka .....	57
4.5.2 Przygotowanie plazmidów umożliwiających nadprodukcję białek z przyłączoną na końcu karboksylowym białka metką HA lub GFP w <i>locus</i> BTU1 .....	59
4.5.3 Przygotowanie plazmidu umożliwiającego usunięcie fragmentu genu (ang. germline Knock-Out, KO) (wg Cassidy-Hanley i wsp., 1997) .....	60
4.6 Wytwarzanie mutantów <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	61
4.6.1 Transformacja somatyczna komórek <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	61
4.6.1.1 Selekcja mutantów <i>Tetrahymena thermophila</i> z konstruktem wprowadzonym do genomu makronuklearnego do natywnego <i>locus</i> genu .....	61
4.6.1.2 Selekcja mutantów <i>Tetrahymena thermophila</i> zdolnych do nadprodukcji białek .....	62
4.6.2 Transformacja i selekcja komórek <i>Tetrahymena thermophila</i> z delecją badanego genu w genomie mikronuklearnym i makronuklearnym .....	62
4.6.3 Otrzymanie mutantów z delecją badanego genu w genomie mikronuklearnym i makronuklearnym – krzyżówki genetyczne .....	63
4.6.4 Weryfikacja delecji fragmentu genu w mutantach knock-out .....	66
4.6.5 Doświadczenie typu <i>rescue</i> .....	66
4.7 Analiza fenotypu mutantów <i>Tetrahymena</i> .....	66
4.7.1 Tempo proliferacji .....	66
4.7.2 Tempo fagocytozy .....	67
4.7.3 Rejestracja torów ruchu komórek .....	67
4.7.4 Pomiar długości rzęsek .....	67
4.7.5 Tempo regeneracji rzęsek .....	68
4.7.6 Rejestracja ruchu rzęsek .....	68
4.8 Metody biochemiczne .....	68
4.8.1 Oczyszczanie białek rzęskowych .....	68
4.8.2 Pomiar stężenia białka z wykorzystaniem kwasu bis-cynchoniniowego (BCA) ....	69

4.8.3	Elektroforeza SDS-PAGE – rozdział białek w warunkach denaturujących.....	69
4.8.4	Detekcja białek metodą Western blot.....	70
4.8.5	Detekcja białek z wykorzystaniem azotanu srebra.....	70
4.8.6	Detekcja fosforylowanych białek w żelu poliakryloamidowym.....	71
4.9	Badanie oddziaływań między białkami.....	71
4.9.1	Identyfikacja białek zlokalizowanych w pobliżu badanego białka (ang. proximity labeling assay), metoda BioID .....	71
4.9.2	Modyfikacja metody BioID.....	72
4.8.3	Identyfikacja białek koprecypitujących z wybranymi białkami (koimmunoprecypitacja) .....	73
4.8.4	Analiza oddziaływań pomiędzy wybranymi białkami (ang. <i>pull-down</i> ) .....	73
4.10	Metody obrazowania immunocytochemicznego.....	74
4.10.1	Immunocytochemiczne znakowanie komórek <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	74
4.10.2	Analiza preparatów immunocytochemicznych przy użyciu mikroskopu konfokalnego .....	75
5.	Wyniki.....	76
	CZEŚĆ I .....	76
	Analiza filogenetyczna i domenowa potencjalnych białek szlaku MAP kinaz rzęsek ruchomych oraz określenie ich wzajemnych oddziaływań .....	76
5.1	Analiza filogenetyczna i domenowa potencjalnych elementów i regulatorów szlaku MAP kinaz.....	76
5.2	Analiza budowy i sekwencji białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Dups5, Pp2c i Kif9... 92	
5.3	Lokalizacja badanych białek w komórkach <i>Tetrahymena</i> szczepu dzikiego.....	98
5.4	Weryfikacja oddziaływania badanych białek z białkiem Spef2A.....	101
5.5	Identyfikacja białek znajdujących się w najbliższym sąsiedztwie białka Dusp5 i tworzących z nim stabilny kompleks .....	108
5.7.1	Analiza fenotypu mutantów typu knock-out: KIF9-KO oraz DUSP5-KO.....	124
5.7.1.1	Analiza fenotypu mutantów Kif9-KO.....	124



5.7.1.2 Analiza fenotypu mutantów DUSP5-KO.....	128
5. Dyskusja.....	134
6. Podsumowanie i wnioski.....	143
7. Spis literatury .....	145
Spis publikacji doktorantki.....	165

## Streszczenie

Rzęski i homologiczne pod względem budowy wici to bardzo dobrze zachowane w toku ewolucji struktury, tworzone na powierzchni komórek eukariotycznych od pierwotniaków do człowieka. Podstawowo można wyróżnić rzęski ruchome oraz rzęski pierwotne. U ssaków rzęski ruchome tworzone są zazwyczaj na apikalnej powierzchni komórek nabłonka – m.in. nabłonka wyściełającego górne drogi oddechowe. Specjalny rodzaj rzęski ruchomej stanowi również wic plemników. Nieprawidłowe funkcjonowanie bądź brak rzęsek ruchomych prowadzi zwykle do tzw. pierwotnej dyskinezy rzęsek, która objawia się m.in. przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych i bezpłodnością u mężczyzn. Szkielet rzęsek ruchomych tzw. aksonema zbudowana jest z 9 par mikrotubul obwodowych, którym towarzyszą kompleksy białkowe odpowiedzialne za generowanie ruchu rzęski. W centralnej części aksonemy znajduje się tzw. aparat centralny, zbudowany z dwóch mikrotubul oraz makrokompleksów białkowych tworzących tzw. wyrostki. Do tej pory dokładny skład białkowy wyrostków pary centralnej nie został scharakteryzowany, a co za tym idzie, rola aparatu centralnego w generowaniu ruchu rzęski jest tylko częściowo poznana. Postuluje się, że sygnał niezbędny do generacji ruchu rzęski inicjowany jest w aparacie centralnym. Niewykluczone jest, że w regulacji funkcjonowania aparatu centralnego biorą również udział białka enzymatyczne bądź motoryczne, jednak dotychczas dane na ten temat są fragmentaryczne.

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono badania nad niescharakteryzowanymi do tej pory białkami rzęskowymi związanymi z aparatem centralnym i potencjalnie stanowiącymi elementy i regulatory wspólnego szlaku regulatorowego kinaz aktywowanych mitogenami, MAP. Co istotne dotychczas nie opisano białek biorących udział w regulacji szlaku MAP kinaz w aparacie centralnym rzęsek ruchomych w żadnym organizmie. Badania przeprowadzono na modelowym organizmie jednokomórkowym – orzęsku *Tetrahymena thermophila*. Do badań wytypowano trzy kinazy: Mapk3, Map2k7, Nek6, dwie fosfatazy: Dusp5, Pp2c oraz budującą wyrostek C2c kinezynę Kif9. Białka te charakteryzowały się zmienionym poziomem w mutantach *Tetrahymena* pozbawionych wyrostka C1b (SPEF2A-CoDel).

Analiza sekwencji aminokwasowych wytypowanych białek wykazała, że są one dobrze zachowane w toku ewolucji. Badane kinazy Mapk3, Map2k7 oraz Nek6 a także fosfataza Pp2c posiadają zachowane w toku ewolucji motywy warunkujące aktywność katalityczną. Kinaza Kif9 *Tetrahymena*, również posiada motywy takie jak Walker A, Switch I oraz Switch II co sugeruje, że jest to nie tylko białko strukturalne aparatu centralnego, ale może mieć również

zachowaną aktywność motoryczną. Natomiast fosfataza o podwójnej specyficzności Dusp5 jest najprawdopodobniej pseudofosfatazą ze względu na brak cysteiny w dobrze zachowanym w toku ewolucji motywie centrum aktywnego, co nie wyklucza jednak udziału tego białka w regulacji szlaku kinaz MAP.

W toku badań potwierdzono, że wszystkie badane białka znajdują się w rzęskach *Tetrahymena*, a nadprodukowane lokalizują się w rzęskach oraz ciele komórki. W przypadku kinezy Kif9 nadprodukowane białko tworzy w ciele komórki charakterystyczne włókniste struktury przypominające układ mikrotubul w cytoplazmie, co sugeruje, że białko to może wiązać mikrotubule.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń BioID oraz koimmunoprecypitacji potwierdzono, że białko Dusp5 znajduje się w bliskiej odległości oraz jednocześnie tworzy trwałe kompleksy z białkami wypustki C1b aparatu centralnego *Tetrahymena* tj. m.in. z białkami Spef2A, Cfp69, Androglobiną i Cfp246/Lrguk. Wykazano również, że pozostałe z badanych białek najprawdopodobniej nie lokalizują się w pobliżu białka Spef2A. Niewykluczone, że lokalizują się one w bardziej peryferycznej części wypustki C1b bądź oddziałują jedynie przejściowo z tym kompleksem.

Analiza BioID oraz wyniki doświadczeń typu pull-down wykazały, że zarówno białko Dusp5 jak i Kif9 oddziałują bezpośrednio ze wszystkimi badanymi kinazami tj. Mapk3, Map2k7 oraz Nek6. Natomiast żadne z badanych białek nie oddziaływało z fosfatazą Pp2c. Wyniki tych badań umożliwiły zaproponowanie modelu sieci wzajemnych oddziaływań tych białek.

Przeprowadzone badania obejmowały również analizę funkcji badanych białek – białka Dusp5 oraz kinezy Kif9 poprzez przygotowanie mutantów typu knock-out *Tetrahymena*. Zarówno brak białka Dusp5 jak i białka Kif9 powodował obniżenie tempa ruchu komórek. Co ciekawe, w przypadku obu mutantów zaobserwowano również znaczne obniżenie tempa regeneracji rzęsek po eksperymentalnym odrzęśieniu, co sugeruje, że białka te mogą pełnić rolę w transporcie wewnątrzrzęskowym. Nie zaobserwowano natomiast zmian w tempie proliferacji, fagocytozy oraz długości rzęsek mutantów z delecją genu białka Dusp5 oraz białka Kif9.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły zidentyfikować i przynajmniej częściowo scharakteryzować nowe potencjalne regulatory funkcji aparatu centralnego rzęski ruchomej.

## Abstract

Cilia and flagella are evolutionary conserved structures which protrude from the apical surface of the eukaryotic cells in both unicellular organisms and humans. There are two major types of cilia – motile and non-motile cilia (also called primary cilia). In mammals, motile cilia are formed on the apical surface of epithelial cells lining e.g. respiratory tract. Sperm cells possess special type of cilium called flagellum. Lack or defects in motile cilia lead to primary ciliary dyskinesia that involves e.g. chronic airway diseases and defects in fertility. Motile cilia axoneme consists of nine outer microtubule doublets which are accompanied by protein complexes responsible for generation of cilia movement. In the central part of the axoneme localizes structure called central apparatus which comprises two single microtubules surrounded by multiprotein complexes called projections. Up to now, exact protein composition of these protein complexes remains unknown, therefore the function of central apparatus and its role in generation of cilia movement is only partially resolved. One of the hypotheses suggests that the signal needed for cilia beating is initiated in central apparatus. However, it cannot be excluded that functions of central apparatus are regulated by enzymatic proteins. Nevertheless, the available data are only fragmentary.

This thesis focuses on so-far uncharacterized central apparatus proteins, potentially being part of ciliary MAP kinases-regulatory pathway. Experiments presented in this thesis were conducted with use of well established, unicellular model organism – *Tetrahymena thermophila*. Based on analysis of previously obtained ciliomes from mutants that lack C1b projection (SPEF2A-CoDel), three kinases– Mapk3, Map2k7, Nek6, two phosphatases: Pp2c and Dusp5 and kinesin Kif9 which build C2c projection were selected for further research. All of these proteins were downregulated in *Tetrahymena* mutants lacking C1b projection.

Amino acid sequence analysis of studied proteins revealed that all of them are evolutionary conserved. Examined kinases Mapk3, Map2k7, Nek6 and phosphatase Pp2c have evolutionary conserved motifs required for their catalytic activity. Kinesin Kif9 possess motifs such as Walker A, Switch I and Switch II which are involved in ATP binding, suggesting that this protein can be not only central apparatus structural protein but also protein with preserved motor activity. Dual specificity phosphatase Dusp5 is most probably pseudophosphatase due to lack of evolutionary conserved cysteine in active site motif. Nevertheless, this protein can take part in regulation of ciliary map kinases pathway.

Conducted research allowed to confirm that all examined proteins localize in *Tetrahymena* cilia and when overexpressed are present in both cilia and cell body. In case of

kinesin Kif9, overexpressed protein forms thread-like structures inside of the cell body resembling microtubule arrangement in the cytoplasm suggesting that Kif9 is able to bind microtubules.

BioID and coimmunoprecipitation experiments showed that Dusp5 not only localizes in close proximity but also forms stable complex with C1b projection proteins in *Tetrahymena* - that is with Spef2A, Cfap69, Androglobin and Cfap246/Lrguk. No other examined protein localized in close proximity to Spef2A. It is probable that these proteins are positioned on the outer surfaces of C1b projection or their contact with the projection is only transient.

BioID and pull-down experiments results showed that both Dusp5 and kinesin Kif9 directly interact with Mapk3, Map2k7 and Nek6 – that is with all examined kinases. None of them interacted with Pp2c phosphatase. These results allowed to propose a model of interaction network between these proteins.

Moreover, functional analysis of Dusp5 and Kif9 was also performed. For this, *Tetrahymena* knock-out mutants lacking Dusp5 or Kif9 were prepared. Lack of Dusp5 or Kif9 resulted in reduced cell swimming speed. Interestingly, both mutants had slower cilia regeneration rate after experimental deciliation which suggest that both of them can participate in ciliary intraflagellar transport. Additionally, no changes in cell proliferation, phagocytosis or cilia length have been observed.

To sum up, conducted experiments allowed to identify and at least partly characterize novel potential regulators of the central apparatus functions.

## Wykaz skrótów

<b>6-MP</b>	6-metylpuryna
<b>BSA</b>	(ang. <i>Bovine Serum Albumin</i> ) albumina surowicy bydłej
<b>CHX</b>	cykloheksymid
<b>CP</b>	(ang. <i>Central Pair</i> ) kompleks pary centralnej aksonemy
<b>CVPs</b>	(ang. <i>Contractile Vacuole Pores</i> ) pory wodniczki tętniącej
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek
<b>DTT</b>	ditiotreitol
<b>EDTA</b>	kwasy (etylenodinitrylo)tetraoctowy
<b>EGTA</b>	kwasy etylenoglikol-bis(2-aminoetyl)-tetraoctowy
<b>FAP</b>	(ang. <i>Flagellar Associated Protein</i> ) białko wici
<b>GFP</b>	(ang. <i>Green Fluorescent Protein</i> ) białko zielonej fluorescencji
<b>HA</b>	(ang. <i>HemAgglutinin</i> ) hemaglutynina
<b>HEPES</b>	kwasy N-2-hydroksyetylo-piperazyno-N'-2-etanosulfonowy
<b>HRP</b>	(ang. <i>horseradish peroxidase</i> ) peroksydaza chrzanowa
<b>IDA</b>	(ang. <i>Inner Dynein Arm</i> ) wewnętrzne ramię dyneinowe
<b>IFT</b>	(ang. <i>IntraFlagellar Transport</i> ) transport wewnątrzrzęskowy
<b>LB</b>	(ang. <i>Lysogeny Broth</i> ) pożywka Luria-Bertani do hodowli bakterii
<b>LC</b>	(ang. <i>Light Chain</i> ) łańcuch lekki ramion dyneinowych
<b>MEPP</b>	(ang. <i>Minimally Enriched Proteose Peptone</i> ) pożywka do hodowli komórek orzęska <i>Tetrahymena</i>
<b>N-DRC</b>	(ang. <i>Nexin-Dynein Regulatory Complex</i> ) kompleks neksynowo-dyneinowy
<b>NP-40</b>	Nonidet 40- fenoksy-polietoksyoktanol
<b>OA</b>	(ang. <i>Oral Apparatus</i> ) aparat gębowy
<b>ODA</b>	(ang. <i>Outer Dynein Arm</i> ) zewnętrzne ramię dyneinowe
<b>PBS</b>	(ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i> ) roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym
<b>PCD</b>	(ang. <i>Primary Ciliary Dyskinesia</i> ) pierwotna dyskineza rzęsek
<b>PFA</b>	paraformaldehyd
<b>PIPES</b>	kwasy piperazyno-1,4-bis(2-etanosulfonowy)
<b>PM</b>	paromomycyna
<b>RS</b>	(ang. <i>Radial Spoke</i> ) promień łączący
<b>RSP</b>	(ang. <i>Radial Spoke Protein</i> ) białko promienia łączącego

<b>SB</b>	(ang. <i>Sample Buffer</i> ) bufor obciążający do elektroforezy białek
<b>SDS</b>	dodecylosiarczan sodu
<b>SDS-PAGE</b>	elektroforeza białkowa w żelu denaturującym
<b>SOC</b>	(ang. <i>Super Optimal Catabolite repression</i> ) kompletna, bogata pożywka do hodowli bakterii
<b>SPP</b>	(ang. <i>Sequestrene Proteose-Peptide</i> ) pożywka do hodowli komórek orzęska <i>Tetrahymena</i>
<b>TBS</b>	roztwór soli, buforowany za pomocą Tris-HCl
<b>TBST</b>	roztwór soli, buforowany za pomocą Tris-HCl z dodatkiem 0,1% Tween 20
<b>TGD</b>	(ang. <i>Tetrahymena Genome Database</i> ) baza danych genomowych <i>Tetrahymena</i>
<b>TZ</b>	(ang. <i>Transition Zone</i> ) strefa przejściowa

# 1. Wstęp

## 1.1 Rzęski i wici - wprowadzenie

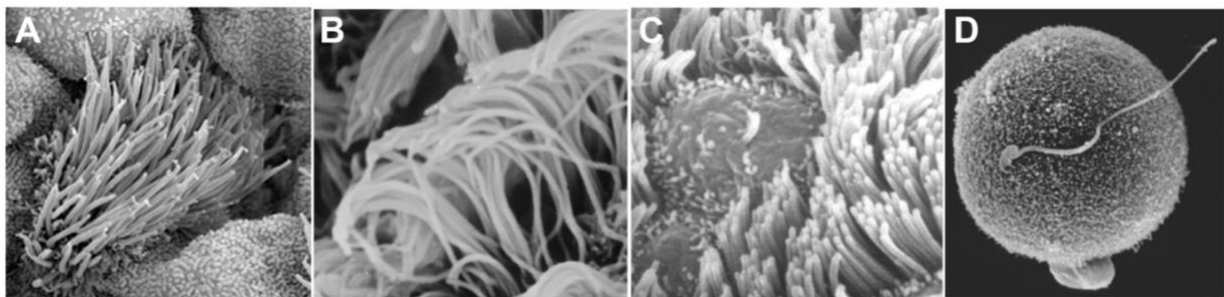
Rzęski i homologiczne pod względem budowy wici to cylindryczne wypustki o długości od kilku do kilkudziesięciu mikrometrów, które tworzone są na powierzchni komórek eukariotycznych od pierwotniaków do człowieka. Wyjątek stanowi większość roślin nasiennych (plemniki miłorzębów i sagowców tworzą wici) oraz niektóre rodzaje grzybów, czyli organizmy, które w wyniku uniezależnienia rozmnażania od wody utraciły zdolność do wytwarzania rzęsek (Heath i in., 1986; Hodges i in., 2012). Historycznie są to najwcześniej odkryte organella komórkowe, które po raz pierwszy zostały zaobserwowane około 1674 roku przez konstruktora pierwszych mikroskopów świetlnych Antoniego van Leeuwenhoek'a (Dobell, 1932). Rzęski ruchome i wici są strukturami bardzo dobrze zachowanymi w toku ewolucji i najprawdopodobniej były obecne u ostatniego wspólnego przodka komórek eukariotycznych (LECA, ang. *Last Eukaryotic Common Ancestor*) (Mitchell, 2017). Prócz rzęsek ruchomych i wici, u *Metazoa* występują również nieruchome rzęski czuciowe (inaczej rzęski pierwotne) oraz ruchome rzęski nodalne pojawiające się w ściśle określonych strukturach na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego kręgowców (Wagner i Yost, 2000). Choć poszczególne typy rzęsek różni się pełnioną funkcją, zrąb ich struktury a także skład białkowy (minimum kilkaset białek) jest zbliżony (Carvalho-Santos i in., 2011; Pazour i in., 2005).

U człowieka rzęski pierwotne wytwarzane są jako pojedyncze struktury przez niemal wszystkie komórki znajdujące się w fazie G1/G0 cyklu komórkowego (Pedersen i in., 2008). Stanowią one dla komórek swoistą „antnę” umożliwiając odbieranie i przekazywanie sygnałów komórkowych, przez co pełnią ważną rolę w prawidłowym różnicowaniu komórek i tkanek jak również w utrzymaniu homeostazy organizmu (Malicki i Johnson, 2017). Z kolei rzęski nodalne (również wytwarzane pojedynczo) występują na zarodkowym węźle pierwotnym w okresie gastrulacji i odgrywają zasadniczą rolę w wytworzeniu lewo-prawostronnej asymetrii ciała (Dasgupta i Amack, 2016; Grimes & Burdine, 2017; Wagner i Yost, 2000)

W przeciwieństwie do rzęsek pierwotnych i nodalnych, rzęski ruchome tworzone są zazwyczaj na apikalnej powierzchni komórek nabłonka jako liczne struktury (Ryc.1), a każda z komórek może wytworzyć od 200 do 300 rzęsek (Tilley i in., 2015). Są to m.in. komórki nabłonka wyściełającego górne drogi oddechowe tj. jamę nosową, zatoki przynosowe, tchawicę i oskrzela. Skoordynowany ruch rzęsek umożliwia usuwanie śluzu zawierającego m.in.



bakterie, kurz oraz inne cząsteczki, które dostały się do układu oddechowego. Rzęski ruchome tworzone są również przez komórki ependymy wyściełające kanał środkowy rdzenia kręgowego i komory mózgu, gdzie umożliwiają przepływ płynu mózgowo-rdzeniowego. Ponadto znajdują się na powierzchni komórek nabłonka jajowodów, gdzie wspomagają transport oocyta bądź rozwijającego się zarodka do macicy (Satir i Christensen, 2008). Specjalny rodzaj rzęski ruchomej stanowi wić plemników, która umożliwia ich ruch w kierunku oocyta oraz zapłodnienie. W męskim układzie rozrodczym rzęski ruchome występują również w kanalikach łączących jądro z najądrzem tzw. kanalikach odprowadzających jądra. (Aprea i in., 2021).



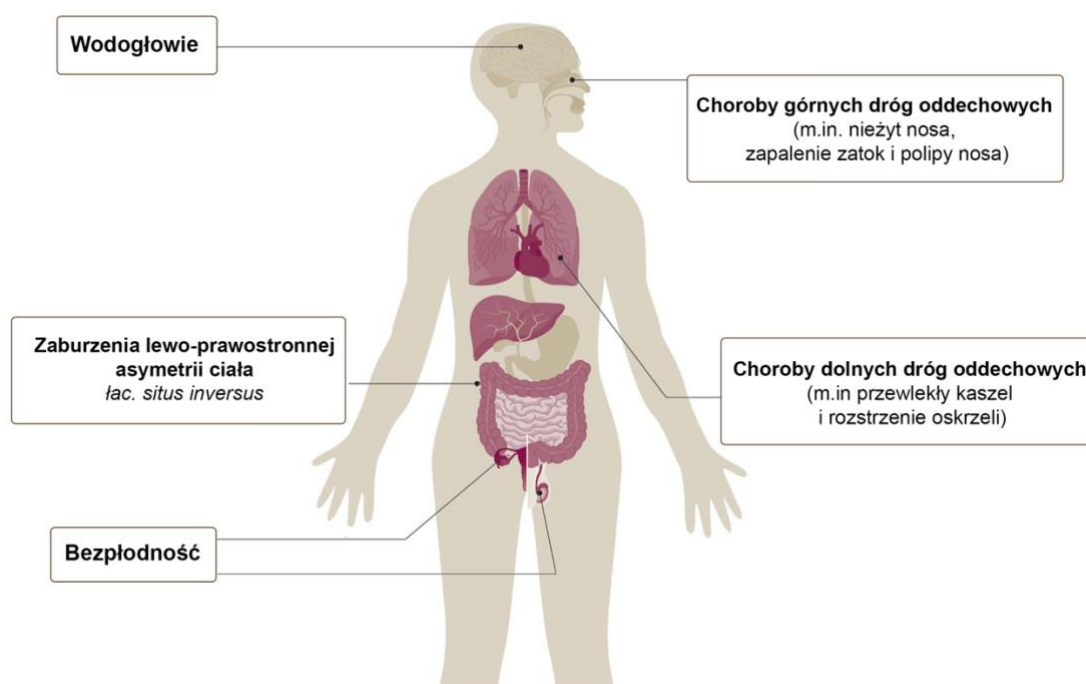
Ryc. 1 Rzęski ruchome u ssaków. (A) Rzęski tchawicy (Brooks i Wallingford, 2014); (B) rzęski ependymy (Brown i Witman, 2014); (C) rzęski wyściełające jajowód (Satir i Christensen, 2007); (D) plemnik i komórka jajowa (Brown i Witman, 2014).

Prócz głównej funkcji motorycznej, rzęski ruchome, podobnie jak pierwotne, mogą również pełnić funkcje sensoryczne. Przykładowo, w błonie rzęsek ruchomych wytwarzanych przez komórki nabłonka układu oddechowego człowieka wykryto receptor gorzkiego smaku T24. Wykazano, że w wyniku jego aktywacji dochodzi do zwiększenia stężenia jonów  $Ca^{2+}$  i w konsekwencji do zwiększenia częstotliwości bicia rzęsek (Shah i in., 2009).

Nieprawidłowości w strukturze, funkcjonowaniu czy biogenezie rzęsek prowadzą do złożonych, wielonarządowych zaburzeń zwanych ogólnie ciliopatiami. W większości przypadków dziedziczone są one autosomalnie recesywnie. Obejmują organy takie jak: nerki, wątroba, mózg, układ oddechowy czy rozrodczy. Do tej pory opisano 35 różnych ciliopatii, w których wykryto mutacje 187 genów kodujących białka rzęskowe. Ponadto wytypowano 241 genów (również kodujących białka rzęskowe), których mutacje mogą być potencjalną przyczyną znanych bądź nowych, nieopisanych do tej pory ciliopatii (Reiter i Leroux, 2017).

Nieprawidłowe funkcjonowanie bądź brak rzęsek ruchomych prowadzi zwykle do tzw. pierwotnej dyskinezy rzęsek (ang. *Primary Ciliary Diskinesia, PCD*). Pierwotna dyskineza

rzęsek jest chorobą dziedziczną autosomalnie recesywnie. Do tej pory zidentyfikowano 57 genów, których mutacje prowadzą do jej rozwoju (Wallmeier i in., 2020). Większość z nich koduje białka strukturalne rzęski, białka odpowiedzialne za regulację ciliogenezy oraz białka kontrolujące prawidłowe funkcjonowanie rzęski (Horani i Ferkol, 2021). Pierwotna dyskineza rzęsek objawia się przewlekłym zapaleniem górnych i dolnych dróg oddechowych, wodogłowie, bezpłodnością u mężczyzn i obniżoną płodnością u kobiet a także zaburzeniem lewo-prawostronnej asymetrii ciała np. odwrócenie trzewi (łac. *situs inversus*) (Ryc.2) (Reiter i Leroux, 2017; Wallmeier i in., 2020). Odrębnym schorzeniem jest bezpłodność u mężczyzn związana z różnymi zaburzeniami morfologicznymi wici plemników takimi jak skrócenie, zakrzywienie lub całkowity brak wici, któremu nie towarzyszą inne objawy PCD. Zespół ten nazwano MMAF (ang. *Multiple Morphological Anomalies of the Flagella*) (Ben Khelifa i in., 2014; Sha i in., 2020).



Ryc. 2 Objawy kliniczne pierwotnej dyskinezy rzęsek (ang. *Primary Ciliary Diskinesia, PCD*). Wallmeier i in., 2020, zmodyfikowano.

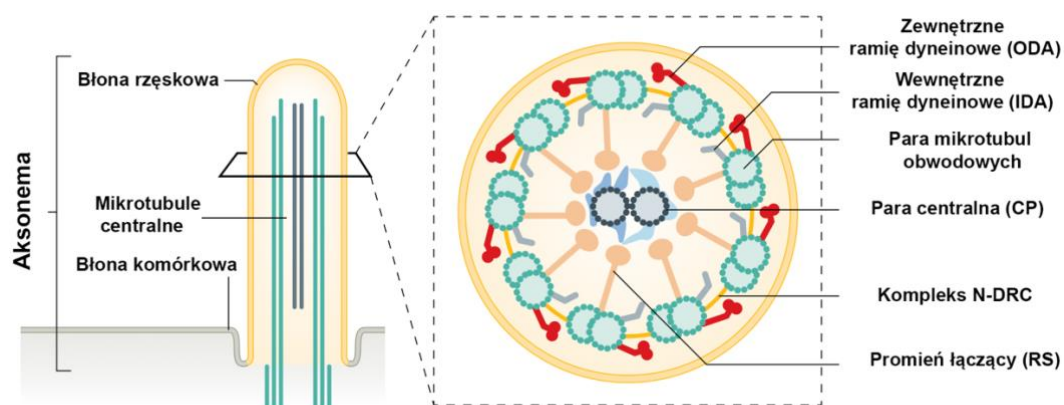
## 1.2 Budowa rzęsek

Bez względu na różnice w budowie oraz pełnione funkcje, szkielet rzęsek tzw. aksonemę, stanowią mikrotubule. Zarówno rzęski pierwotne jak i rzęski ruchome zbudowane

są z 9 par mikrotubul rozmieszczonych obwodowo (Ryc.3). Każdy z dubletów tworzy „pełna” 13-protofilamentowa mikrotubula A oraz oparta o nią, „niepełna” 10-protofilamentowa mikrotubula B. W przypadku rzęsek ruchomych, w centralnej części aksonemy, znajdują się dodatkowo dwie pojedyncze mikrotubule nazwane C1 oraz C2.

Wszystkie rodzaje rzęsek powstają na zrębie zakotwiczonych tuż poniżej błony komórkowej ciałek podstawowych. Ta cylindryczna struktura zbudowana jest z 9 tripletów mikrotubul rozmieszczonych obwodowo, oznaczonych odpowiednio literami: A, B i C. Mikrotubule obwodowe tworzące szkielet rzęsek są kontynuacją mikrotubul A i B ciała podstawowego, a mikrotubula C kończy się w jego dystalnej części (Bayless i in., 2016; Dutcher i O’Toole, 2016; Garcia i Reiter, 2016; Li i in., 2012).

Mikrotubulom obwodowym jak i centralnym rzęsek ruchomych towarzyszą liczne makrokompleksy białkowe, które umożliwiają generację i rewulację ich ruchu. W przypadku mikrotubul obwodowych są to: zewnętrzne ramiona dyneinowe (ang. *outer dynein arm, ODA*), wewnętrzne ramiona dyneinowe (ang. *inner dynein arm, IDA*), kompleks neksynowy regulujący aktywność dynein (ang. *nexin-dynein regulatory complex, N-DRC*), promienie łączące (ang. *radial spokes, RS*) oraz kilka mniejszych kompleksów (Ryc.3) (T. Ishikawa, 2017; Satir i Christensen, 2007). Kompleksy te rozmieszczone są wzdłuż każdej tubuli A cyklicznie tworząc tzw. jednostkę rzęskową o długości 96 nm (Nicastro i in., 2006). W pojedynczym powtórzeniu rzęskowym znajdują się 4 zewnętrzne ramiona dyneinowe, 7 różnych pod względem budowy i funkcji wewnętrznych ramion dyneinowych, trzy promienie łączące oraz kompleks N-DRC (Ryc.4) (Oda, Yanagisawa, Kamiya, i in., 2014).



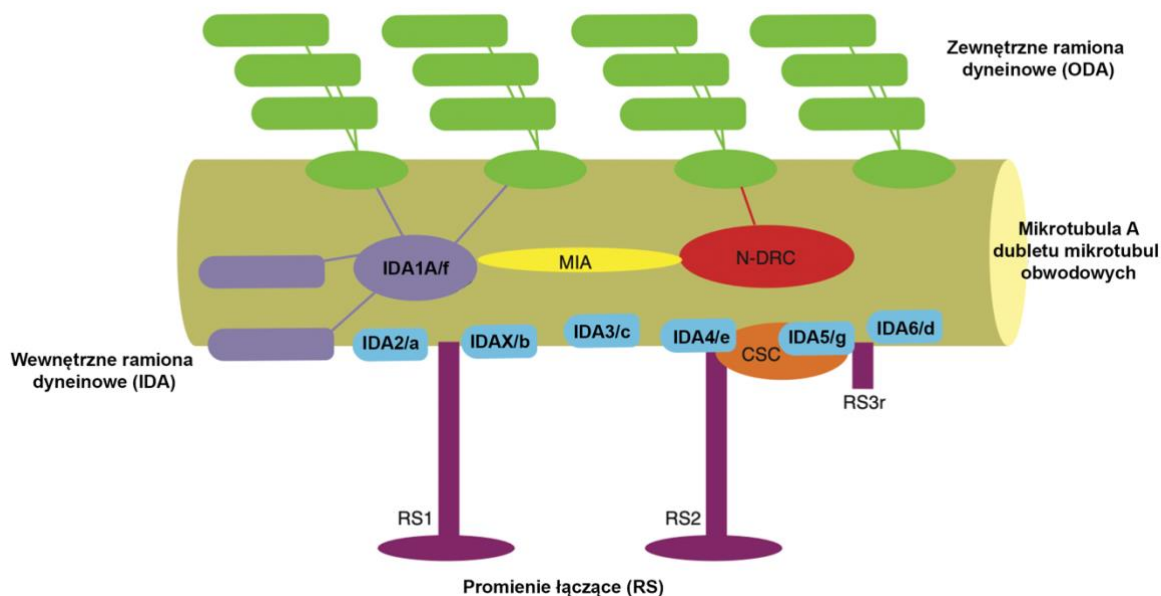
Ryc. 3 Schemat przedstawiający budowę rzęski ruchomej. Po lewej pokazano schemat podłużny a po prawej przekrój poprzeczny przez rzęskę, Reiter i Leroux, 2017, Wallmeier i in. 2020, zmodyfikowano.

Mikrotubule pary centralnej połączone są ze sobą tzw. mostem (*ang. bridge*) a towarzyszące im makrokompleksy białkowe nazywane są wyrostkami. Razem tworzą aparat centralny rzęski ruchomej (*ang. central apparatus, CA*).

### **1.2.1 Makrokompleksy mikrotubul obwodowych**

#### ***Zewnętrzne (ODA) i wewnętrzne (IDA) ramiona dyneinowe***

Jak wspomniano wyżej, mikrotubulom obwodowym rzęsek ruchomych towarzyszą dwa rodzaje ramion dyneinowych – zewnętrzne (*ODA*) i wewnętrzne (*IDA*). Są to duże makrokompleksy białkowe rozmieszczone w dwóch rzędach na mikrotubuli A i trwale na niej zakotwiczone za pomocą tzw. kompleksu dokującego (*ang. docking complex*). Ich domeny motoryczne oddziałują z mikrotubulą B poprzedzającej pary mikrotubul, a aktywność ATP-azy umożliwia im „kroczenie” w kierunku jej końca minus tj. ku podstawie rzęski w stronę ciała podstawowego (King, 2016). Dzięki temu dochodzi do przesuwania się względem siebie sąsiadujących par mikrotubul obwodowych, uginania aksonemy i w konsekwencji ruchu rzęski (Satir, 1968; Satir i in., 2014). W każdej jednostce rzęskowej znajdują się cztery identyczne pod względem budowy zewnętrzne ramiona dyneinowe, rozmieszczone w odległości 24 nm od siebie oraz 7 różnych pod względem budowy i funkcji, wewnętrznych ramion dyneinowych (Ryc.4) (Oda, Yanagisawa, Kamiya, i in., 2014).



Ryc. 4 Schemat jednostki rzęskowej u *Chlamydomonas*. Każde powtórzenie rzęskowe zawiera 4 zewnętrzne ramiona dyneinowe (kolor zielony), 7 wewnętrznych ramion dyneinowych – ramię dimeryczne IDA1A/f oznaczono kolorem fioletowym, pozostałe ramiona monomeryczne IDAa,b,c,e,g,d oznaczono kolorem niebieskim. Promień RS1 zlokalizowany jest w pobliżu ramienia IDA1A/f oraz kompleksu MIA (żółty), a promień RS2 oraz RS3r (u *Chlamydomonas* występuje zredukowany promień łączący RS3) w pobliżu kompleksu N-DRC oraz CSC. Na podstawie King 2016, zmodyfikowano.

Zewnętrzne ramiona dyneinowe u większości organizmów jednokomórkowych, w tym u *Tetrahymena*, posiadają trzy łańcuchy ciężkie oznaczane  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$ , natomiast u człowieka i ssaków posiadają tylko dwa –  $\beta$ , i  $\gamma$  (King, 2016). Spośród 7 wewnętrznych ramion dyneinowych tylko jedno z nich – ramię IDA1A/f, oznaczane umownie jako pierwsze ramię powtórzenia rzęskowego, posiada dwa łańcuchy ciężkie. Pozostałe, które nazwano odpowiednio a,b,c,e,g,d, posiadają tylko jeden, specyficzny dla danego ramienia łańcuch ciężki (ramiona monomeryczne), a ich kompleksy budowane są dodatkowo przez aktynę lub centrynę (King, 2012). Zewnętrzne ramiona dyneinowe odpowiadają za częstotliwość bicia rzęsek i siłę uderzenia, a wewnętrzne za generację prawidłowego wzoru bicia rzęski (Brokaw i Kamiya, 1987; King i Kamiya, 2009).

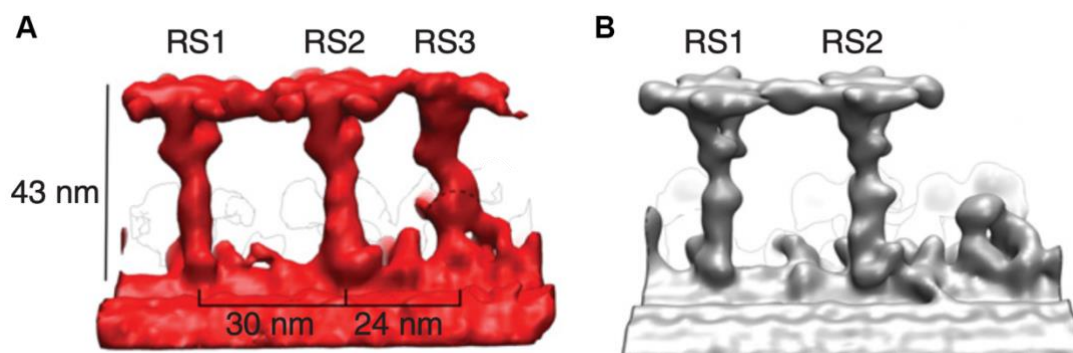
### ***Kompleks neksynowy regulujący aktywność dynein (nexin-dynein regulatory complex, N-DRC)***

W każdym powtórzeniu rzęskowym znajduje się pojedynczy kompleks neksynowy regulujący aktywność dynein (ang. *nexin-dynein regulatory complex, N-DRC*) (Ryc.4), zbudowany z co najmniej 11 białek (Heuser i in., 2009). W jego budowie można wyróżnić dwie

części – płatowatą podstawę (ang. *basal plate*), która jest przyłączona do mikrotubuli A oraz odchodzący od niej trzon łączący mikrotubulę A z mikrotubulą B sąsiadującego dubletu. Kompleks ten spełnia dwie ważne funkcje: łączy sąsiadujące pary mikrotubul oraz reguluje zewnętrzne i wewnętrzne ramiona dyneinowe umożliwiając przekształcenie ruchu ślizgowego mikrotubul w uginanie aksonemy (Summers & Gibbons, 1971; Warner, 1976). Brak budującego kompleks N-DRC białka TCTE1 (DRC5) u myszy nie powoduje zaburzeń ultrastruktury rzęski, lecz prowadzi do niepłodności ze względu na nieprawidłowe bicie wici plemników (Castaneda i in., 2017).

### **Promienie łączące**

Promienie łączące są strukturami w kształcie litery T a w ich budowie rozróżnia się tzw. trzon, który osadzony jest na powierzchni tubuli A oraz główkę, która skierowana jest w stronę aparatu centralnego (Nicastro i in., 2006; Witman i in., 1978). W każdej jednostce rzęskowej znajdują się trzy promienie łączące oznaczane RS1, RS2 oraz RS3 które u ssaków, ale również u *Tetrahymena* są pełnej długości (Ryc.5A). Natomiast u *Chlamydomonas reinhardtii*, glonu będącego jednym z organizmów modelowych wykorzystywanych do badania rzęski ruchomej, trzeci promień łączący jest zredukowany i tworzy tylko niewielki wyrostek (Ryc.5B). (Dentler i Cunningham, 1977; Goodenough i Heuser, 1985; Nicastro i in., 2005; Pigo i in., 2011). Promienie łączące RS1 oraz RS2 mają podobną budowę. Promień RS3 charakteryzuje się odmienną morfologią, posiada asymetryczną główkę oraz zagięty/skręcony trzonek (Barber i in., 2012; Nicastro i in., 2006).



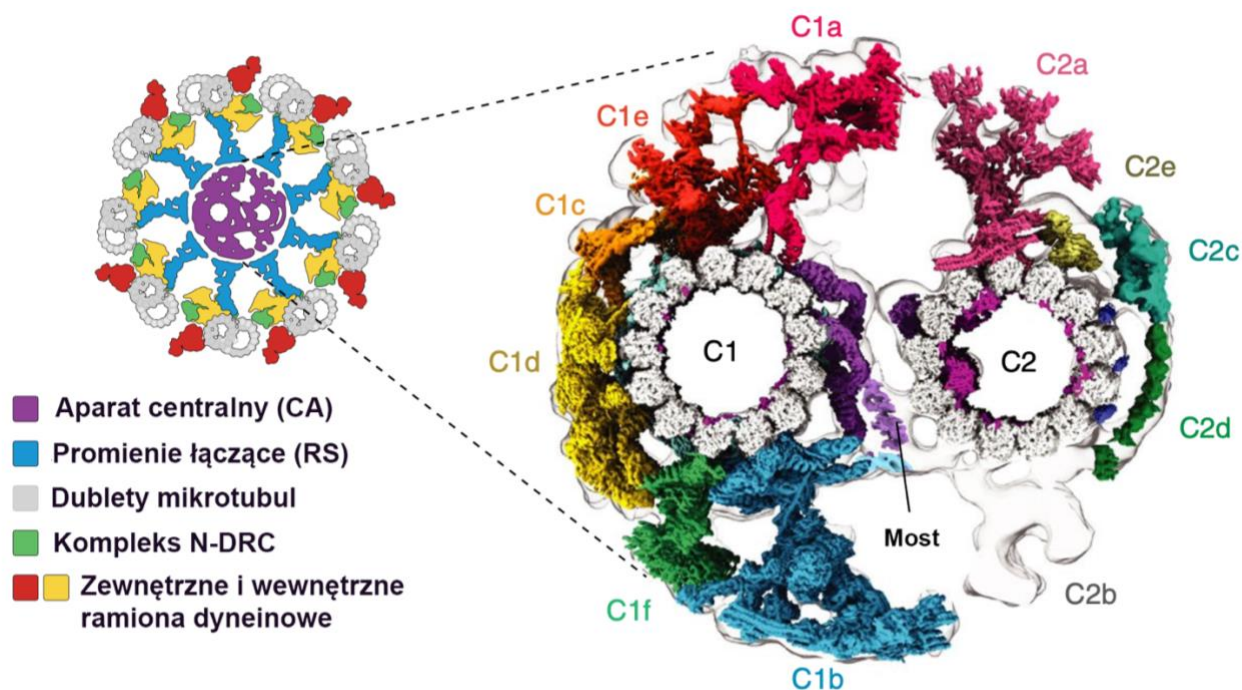
Ryc. 5 Rekonstrukcja przestrzenna struktury promieni łączących w powtórzeniu rzęskowym u *Tetrahymena* (A) oraz u *Chlamydomonas* (B). Jako RS1, RS2, oraz RS3 oznaczono kolejne promienie łączące (ang. radial spoke). Ishikawa i in., 2017, zmodyfikowano.

Każdy z promieni łączących przyłączony jest do tubuli A w innym miejscu jednostki rzęskowej co sugeruje, że pełnią one odmienne funkcje (Ryc.5). Tak też promień RS1 zlokalizowany jest w pobliżu wewnętrznego ramienia dyneinowego IDA1A/f (posiadającego dwie domeny motoryczne) oraz tzw. kompleksu MIA (ang. *modifier of inner arm, MIA*), który bierze udział w regulacji wewnętrznych ramion dyneinowych (Yamamoto i in., 2013). Natomiast promienie RS2 oraz RS3 lokalizują się po przeciwnych stronach kompleksu N-DRC oraz w pobliżu kompleksu CSC (ang. *calmodulin and spoke associated complex*) biorącego udział w regulacji dynein, w którym ważną rolę pełni kalmodulina, białko modulatorowe regulowane poprzez stężenie jonów  $Ca^{2+}$  (Dymek i Smith, 2007; Heuser i in., 2012; Urbanska i in., 2015).

### 1.2.2 Aparat centralny

Aparat centralny to duży asymetryczny kompleks charakterystyczny dla struktury rzęski ruchomej. Jak wspomniano, kompleks ten zbudowany jest z dwóch, centralnie rozmieszczonych 13-protofilamentowych mikrotubul, nazywanych C1 oraz C2, połączonych ze sobą strukturą nazywaną mostem. Mikrotubule te w przeciwieństwie do par mikrotubul obwodowych nie powstają jako przedłużenie mikrotubul ciała podstawowego, lecz rozpoczynają się w proksymalnej części rzęski i kończą powyżej mikrotubul obwodowych w rejonie zwanym czubkiem rzęski (Carbajal-González i in., 2013; Loreng i Smith, 2017; Teves i in., 2016) (Loreng i Smith, 2017).

Mikrotubulom centralnym towarzyszą liczne, różne pod względem struktury, makrokompleksy białkowe tworzące tzw. wyrostki (ang. *projections*). Z mikrotubulą C1 związanych jest 6 wyrostków oznaczanych C1a-C1f, a z mikrotubulą C2 związanych jest 5 wyrostków oznaczanych C2a-C2e (Ryc.6). Wypustki występują na całej długości mikrotubul pary centralnej z wyjątkiem ich części dystalnej, zlokalizowanej w czubku rzęski (Ringo, 1967).



Ryc. 6 Schemat i rekonstrukcja przestrzenna rzęski ruchomej i aparatu centralnego w przekroju poprzecznym. Mikrotubule centralne oznaczono jako C1 oraz C2. Wyrostki towarzyszące mikrotubuli C1 oznaczono C1a-C1f, wyrostki towarzyszące mikrotubuli C2 oznaczono C2a-C2e. Strzałką zaznaczono strukturę mostu łączącego mikrotubule centralne. Gui i in., 2022, zmodyfikowano.

Skład białkowy wyrostków pary centralnej nie jest dokładnie poznany. Stosunkowo niedawno opublikowane badania proteomiczne, w których badano aparat centralny glonu *Chlamydomonas reinhardtii*, pozwoliły na wytypowanie ponad 40 białek potencjalnie budujących jego strukturę, z czego tylko 13 to białka zachowane w toku ewolucji, których ortologii występują u człowieka (Dai i in., 2020; Zhao i in., 2019).

### ***Mikrotubula C1***

Najlepiej poznany białkiem towarzyszącym mikrotubuli C1 jest białko PF16/Spag6, które pełni kluczową rolę w jej tworzeniu i stabilizacji. Przez dłuższy czas białko to uważano za składnik wyrostka C1a, ale najnowsze badania, wykorzystujące mikroskopię krioelektronową wykazały, że homodimery białka PF16 tworzą prawoskrętną spiralę dookoła mikrotubuli C1 stanowiąc podstawę jej pozostałych wyrostków umożliwiającą zakotwiczenie



budujących je białek (Gui i in., 2022). Mutanty *Chlamydomonas* pozbawione tego białka w około 50 % przypadków nie tworzą mikrotubuli C1 a ich wici są nieruchome (Fu i in., 2019; Mitchell i Sale, 1999; Smith i Lefebvre, 1996). Natomiast brak białka Spag6 (ortologa białka PF16 u ssaków) u myszy skutkuje obniżoną częstotliwością bicia rzęsek tchawicy oraz wici plemników, bez widocznych zmian w strukturze aksonemy. Zaobserwowano natomiast zmniejszoną liczbę rzęsek oraz ich nieprawidłową organizację w tchawicy oraz ependymie, co sugeruje udział białka Spag6 w ciliogenezie. Zmiany te prowadziły często do śmierci myszy w wyniku wodogłowia, a u samców dożywających do wieku dojrzałości płciowej – do bezpłodności (Teves i in., 2014). Podobnie u ludzi mutacje białka SPAG6 skutkują bezpłodnością ze względu na nieprawidłową budowę wici plemników (Wu i in., 2020). Mikrotubuli C1 towarzyszy 6 wyrostków, z których największe to C1a oraz C1b (Ryc.6). Wyrostki te powtarzają się cyklicznie co 16 nm wzdłuż jej długości. Pozostałe, mniejsze wyrostki tj. C1c, C1d, C1e oraz C1f powtarzają się regularnie co 32 nm (Carbajal-González i in., 2013). Ostatnie badania wykazały, że wyrostek C1a tworzy tzw. „superkompleks C1a-c-e” poprzez wzajemne połączenia z wyrostkami C1c oraz C1e (Fu i in., 2019). Ważnym białkiem budującym wyrostek C1a jest białko PF6/Spag17. Wykazano, że białko to jest kluczowe dla powstania tego wyrostka zarówno u *Chlamydomonas* jak i u myszy (Dutcher i in., 1984; Teves i in., 2013).

Wyrostek C1b zbudowany jest z kilku białek: CPC1/Spf2, CFAP69, FAP246/Lrguk i enolazy (Joachim i in., 2021; Mitchell & Sale, 1999; H. Zhang & Mitchell, 2004), Białko CPC1/Spf2 jest kluczowym białkiem wyrostka C1b. Jest to duże białko o masie cząsteczkowej powyżej 200 kDa. Mutanty *Chlamydomonas* pozbawione białka CPC1 mają obniżoną częstotliwość bicia wici, a w ich strukturze brak jest zarówno wyrostka C1b jak i sąsiadującego z nim, mniejszego wyrostka C1f. Często obserwowano również brak wyrostka C2b co sugeruje, że wyrostki te mogą ze sobą oddziaływać lub wzajemnie się stabilizować (Mitchell i Sale, 1999). Ortologiem białka CPC1 u ssaków jest białko Spf2. Jego brak prowadzi do pierwotnej dyskinezy rzęsek oraz MMAF zarówno u myszy jak i u człowieka (Sironen i in., 2011; Tu i in., 2020). W rzęskach *Tetrahymena* obecne są dwa białka wykazujące homologię do białka CPC1/Spf2 – oznaczane odpowiednio Spf2A oraz Spf2B. Na podstawie analizy budowy domenowej tych białek przyjęto, że białko Spf2A jest właściwym ortologiem białka CPC1/Spf2. Brak białka Spf2A u *Tetrahymena* powoduje utratę całego wyrostka C1b a w konsekwencji rotacyjny ruch rzęsek (Joachim i in., 2021). Innym białkiem budującym wyrostek C1b jest białko Cfp69. Zarówno u *Tetrahymena* jak i u ssaków (myszy i człowieka)

jest ono niezbędne do prawidłowej lokalizacji białka Spef2 w rzęsce. U *Tetrahymena* w przypadku braku białka Cfp69 obserwowano podobny fenotyp jak w przypadku braku białka Spef2A co sugeruje bliskie powiązanie tych białek (He i in., 2019; Joachimiak i in., 2021).

Badania nad wyrostkiem C1d glonu *Chlamydomonas reinhardtii* wykazały, że w skład tego wyrostka wchodzi kilka białek m.in. FAP54, FAP74, FAP221, FAP297/WDR93 oraz kalmodulina (Brown i in., 2012; Dai i in., 2020; DiPetrillo i Smith, 2010). Brak tych białek lub ich mutacje prowadzą najczęściej do niepłodności u samców, która wynika z nieprawidłowej budowy wici plemników a także do rozwoju PCD. Ortologiem białka FAP221 u ssaków jest białko Pcdp1 (ang. *Primary Ciliary Diskinesia Protein 1*). Białko to w swojej strukturze posiada domenę wiążącą kalmodulinę, co wskazuje, że może być ono potencjalnie zaangażowane w przekazanie sygnału w rzęsce. U myszy brak białka Pcdp1 prowadzi do niepłodności oraz rozwoju PCD, lecz nie zaburza funkcjonowania struktury rzęsek układu oddechowego (Lee i in., 2008). Podobny fenotyp obserwuje się u pacjentów z mutacją białka Pcdp1, z tą różnicą, że rzęski układu oddechowego wykazują rotacyjny wzór bicia (Bustamante-Marin i in., 2020). Białko FAP54/Cfp54, podobnie jak białko FAP221/Pcdp1 ma zdolność wiązania kalmoduliny, a jego brak u myszy prowadzi do utraty całego wyrostka C1d, a w konsekwencji obniżenie częstotliwości bicia rzęsek układu oddechowego i rozwój PCD. Dochodzi również do zaburzenia spermatogenezy a wici plemników mutantów są krótkie, co skutkuje niepłodnością (Brown i in., 2012; McKenzie i in., 2015).

### ***Mikrotubula C2***

Struktura wyrostków mikrotubuli C2 aparatu centralnego oraz jego skład białkowy są dużo słabiej poznane niż struktura wyrostków mikrotubuli C1. Wyrostki C2a, C2b oraz C2c powtarzają się regularnie co 16 nm a wyrostki C2d oraz C2e co 32 nm (Carbajal-González i in., 2013). Dotychczas zbadano jedynie 3 białka związane z mikrotubulą C2: FAP70, hydinę i KLP1/Kif9.

Białko FAP70/Cfp70 jest głównym białkiem budującym wyrostek C2a, a jego brak powoduje jego całkowitą utratę (Hou i in., 2021). U *Chlamydomonas* brak białka FAP70 wiąże się z równoczesną utratą białek FAP65 oraz FAP174, co wskazuje, że białka te również budują wyrostek C2a a ich obecność w rzęsce zależna jest od białka FAP70. Ponadto sugeruje się, że białko FAP70 bierze udział w regulacji zewnętrznych ramion dyneinowych na co wskazują

podobieństwa fenotypu mutantów pozbawionych białka FAP70 i mutantów pozbawionych ODA (Hou i in., 2021).

Hydina (ang. hydrocephallus associated protein) jest bardzo dużym białkiem o masie cząsteczkowej wynoszącej około 540 kDa, będące najprawdopodobniej głównym elementem budującym wypustkę C2b. U *Chlamydomonas* brak tego białka powoduje utratę całej wypustki C2b oraz części sąsiadującej z nią wypustki C2c co sugeruje, że białko to może być również częścią tego wyrostka bądź jest niezbędne do jego stabilizacji. Mutanty *Chlamydomonas* pozbawione hydiny mają sparaliżowane wici, które lokalizują się w charakterystyczny sposób wzdłuż ciała komórki co sugeruje problemy z fazą uderzenia powrotnego (Lehtreck i Witman, 2007). Podobnie u *Trypanosoma* zaobserwowano niezdolne do ruchu wici pozbawione jednej bądź obu mikrotubul aparatu centralnego (Dawe i in., 2007). U myszy nieposiadających hydiny często odnotowywano wodogłowie, a u ludzi wśród objawów dominowały problemy z układem oddechowym. W ultrastrukturze rzęsek tchawicy ssaków, podobnie jak u *Chlamydomonas*, obserwowano brak całego wyrostka C2b oraz części C2c (Olbrich i in., 2012).

KLP1 (ang. kinesin-like protein 1) budujące wypustkę C2c, i jego ssaczy ortolog, Kif9, są kinezynami, białkami wiążącymi mikrotubule i wykazującymi zdolność do ruchu wzdłuż jej powierzchni. Brak tego białka u *Chlamydomonas* i *Trypanosoma* skutkuje zaburzeniem bicia wici (Bernstein i in., 1994; Demonchy i in., 2009; Yokoyama i in., 2004). U myszy pozbawionych białka Kif9 obserwowano nieprawidłowe bicie wici plemników a w konsekwencji obniżoną płodność. Nie zaobserwowano natomiast by brak białka Kif9 skutkował nieprawidłowym funkcjonowaniem rzęsek tchawicy (Miyata i in., 2020). Ostatnie badania pacjentów wykazały, że mutacje białka Kif9 u ludzi, podobnie jak u myszy, prowadzą do obniżonej płodności u mężczyzn wynikającej z nieprawidłowego bicia wici plemników (Meng i in., 2023).

### **Most**

Mikrotubule C1 oraz C2 aparatu centralnego połączone są strukturą nazywaną mostem. Skład białek budujących ten kompleks jest w dużej mierze nieznany. Uważa się, że głównym białkiem mostu jest białko PF20/Spag16. Mutanty *Chlamydomonas* pozbawione białka PF20 mają sparaliżowane wici, a w ich ultrastrukturze najczęściej brak jest obu mikrotubul pary centralnej (Smith i Lefebvre, 1997). U mutantów *Trypanosoma* z obniżonym poziomem białka PF20 również obserwowano sparaliżowane wici, nie związane jednak z całkowitą utratą

mikrotubul aparatu centralnego. Może to wynikać z niecałkowitego braku białka PF20 lub z charakterystycznej budowy wici *Trypanosoma*, w której obecne są dodatkowe struktury biorące udział w jej stabilizacji (Branche i in., 2006). Natomiast u ssaków, występują dwie formy białka PF20 – białko Spag16L (L – ang. *large*, duży) oraz białko Spag16S (S – ang. *small*, mały). Białko Spag16S jest skróconą wersją białka Spag16L, obejmującą jego koniec karboksylowy zawierający domeny WD biorące najprawdopodobniej udział w oddziaływaniu z białkiem PF16/Spag6. Białko Spag16L wytwarzane jest w jądrach, jajowodach oraz mózgu, lecz jego brak w głównej mierze wpływa na plemniki, powodując, że posiadają one sparalizowane wici. Natomiast białko Spag16S obecne jest jedynie w jądrach (Alciaturi i in., 2019; Nagarkatti-Gude i in., 2011; Z. Zhang i in., 2002, 2006). U ludzi mutacja pojedynczego allelu SPAG16 nie skutkuje PCD czy niepłodnością, do tej pory nie opisano przypadków pacjentów z mutacją w obu *loci* genu tego białka (Z. Zhang i in., 2007).

### 1.3 Rola aparatu centralnego

Dokładna rola aparatu centralnego w regulacji ruchu rzęski, a także sposób przekazywania sygnału z aparatu centralnego do makrokompleksów zlokalizowanych na mikrotubulach obwodowych pozostaje nieznany. Postuluje się, że sygnał inicjowany w aparacie centralnym przekazywany jest poprzez oddziaływania mechaniczno-chemiczne do główek promieni łączących, skąd kierowany jest do kompleksu N-DRC oraz ramion dyneinowych prowadząc do aktywacji ruchu ślizgowego mikrotubul i w konsekwencji bicia rzęski (Mitchell, 2004; Smith i Yang, 2004).

Jak wspomniano, główki promieni łączących kierują się w stronę aparatu centralnego i oddziałują z jego wypustkami. Wiele mutantów *Chlamydomonas*, posiadających mutacje białek promieni łączących lub pary centralnej ma sparalizowane wici, które są jednak w stanie „wibrować” co sugeruje, że ramiona dyneinowe są aktywne, lecz zaburzona jest ich prawidłowa koordynacja. Dodatkowe mutacje ramion dyneinowych lub kompleksu N-DRC są w stanie częściowo przywrócić ruch wici (Zhu i in., 2017). Prawdopodobne jest więc, że promienie łączące oddziałując z kompleksem aparatu centralnego koordynują aktywacje ramion dyneinowych poprzez kompleks N-DRC w celu generacji prawidłowego ruchu wici. Co więcej mutanty *Chlamydomonas* pozbawione białka PF6/Spag17 nie posiadają wypustki C1a a ich wici są niezdolne do ruchu. Wykazano, że produkcja białek promieni łączących Rsp3, Rsp4

i Rsp6 z dołączoną na końcu karboksylowym tych białek metką GFP, jest w stanie częściowo przywrócić bicie wici mutantów *pf6*. Badania te sugerują, że do aktywacji dynein niezbędny jest w pewnym stopniu jedynie kontakt mechaniczny, który nie wymaga specyficznego oddziaływania białko-białko (Oda, Yanagisawa, Yagi, i in., 2014).

U orzęsków oraz *Chlamydomonas* aparat centralny tworzy lewoskrętną helisę, która zmienia pozycję w trakcie bicia rzęski bądź wici. Wobec tego wyrostki aparatu centralnego mogą oddziaływać z promieniami łączącymi różnych dubletów mikrotubul w zależności od położenia (Mitchell, 2003; Omoto i Kung, 1980). Mechanizm ten nie został jednak do tej pory dobrze zbadany. Jednakże nie u wszystkich organizmów aparat centralny podlega rotacji – u organizmów wielokomórkowych oraz u *Trypanosoma* wykazuje on stałe położenie względem mikrotubul obwodowych oraz płaszczyzny ugięcia rzęski, a każdy z wyrostków oddziałuje zawsze z tym samym promieniem łączącym tej samej pary mikrotubul obwodowych (Gadelha i in., 2006; Mitchell, 2017; Samsel i in., 2021; Tamm & Tamm, 1981). Nie wiadomo, jak rotacja lub jej brak wpływa na funkcjonowanie rzęsek. Prawdopodobne jest że rotacja stanowi dodatkowy mechanizm regulujący złożony wzór bicia rzęski, tak jak obserwuje się u orzęsków i *Chlamydomonas* (Smith & Yang, 2004).

Poza oddziaływaniami mechanicznymi najprawdopodobniej dużą rolę w przekazywaniu sygnału i regulacji aparatu centralnego pełnią oddziaływania elektrochemiczne.

Liczne badania sugerują, że regulacja bicia wici i rzęsek, w tym również związana z aktywnością aparatu centralnego, zależna jest od zmian stężenia jonów wapnia. Zaobserwowano, że wysoki poziom jonów wapnia zaburza aktywację dynein w mutantach *Chlamydomonas* pozbawionych wyrostka C1a, lecz nie wpływa na mutanty pozbawione wyrostka C1b, co najprawdopodobniej spowodowane jest obecnością kalmoduliny, zależnego od jonów wapnia białka modulatorowego, które obecne jest w wypustce C1a (Wargo i in., 2004, 2005).

Niedawno opublikowane badania wskazują na udział oddziaływań elektrostatycznych w przekazywaniu sygnału pomiędzy wypustkami aparatu centralnego a główkami promieni łączących. Wykazano, że główki promieni łączących bogate są w negatywnie naładowane reszty aminokwasowe. Mutanty *Chlamydomonas*, u których powierzchnie główek promieni łączących oddziałujące z aparatem centralnym pozbawiono ładunku (poprzez wprowadzenie mutacji zmieniających sekwencję aminokwasową białek budujących te powierzchnie), miały obniżoną częstotliwość bicia wici, a ich tory ruchu były spiralne (Grossman-Haham i in., 2021).

Dodatkowo, badania ładunku elektrostatycznego wyrostków aparatu centralnego C1a, C1b oraz C1d wykazały, że na każdym z wyrostków znajdują się rejony o pozytywnym oraz negatywnym ładunku, przy czym żaden z nich nie był dominujący, co dodatkowo potwierdza, że oddziaływania elektrostatyczne mogą być istotne w regulacji przekazywania sygnału pomiędzy aparatem centralnym a promieniami łączącymi. (Gui i in., 2022).

Wydaje się również, że modyfikacje potranslacyjne białek aparatu centralnego mogą mieć istotny wpływ na regulację jego powstawania i funkcji, choć dane na ten temat są nieliczne. Wiadomo, że kinaza serynowo-treoninowa Stk36 w rzęskach tworzonych przez nabłonek tchawicy, jajowodów oraz ependymę u myszy pełni kluczową rolę podczas biogenezy aparatu centralnego. Rzęski myszy nieposiadające tej kinazy pozbawione były całego aparatu centralnego oraz charakteryzowały się obniżoną częstotliwością oraz amplitudą bicia, a ich ruch był rotacyjny (Nozawa i in., 2013; Wilson i in., 2009). Ponadto u pacjentów z PCD, u których wykryto mutacje genów kodujących białka promieni łączących RSPH1, RSPH4 oraz RSPH9 nie odnotowano obecności kinazy Stk36 w rzęskach. Autorzy wspomnianych badań sugerują, że kinaza ta może lokalizować się pomiędzy aparatem centralnym a główkami promieni łączących oraz że jej obecność w rzęsce zależna jest od obecności wymienionych wcześniej białek RSP (Edelbusch i in., 2017). Tym samym kinaza ta nie tylko pełniłaby funkcję w biogenezie aparatu centralnego, ale również stanowiłaby istotny element przekazywania sygnału między aparatem centralnym a główkami promieni łączących. Do tej pory wykazano, że kinaza STK36 oddziałuje z białkiem wypustki C1d – cFAP221/Pcdp1 oraz białkiem budującym strukturę mostu łączącego mikrotubule centralne – PF20/Spag16 (Nozawa i in., 2013) jednak nie wiadomo, czy białka te są jej substratami.

#### **1.4 Kinazy MAP w rzęsce ruchomej**

Kinazy aktywowane mitogenami (ang. *Mitogen-activated protein kinase, MAPK*) stanowią główne elementy wielu szlaków sygnałowych regulujących procesy takie jak: transkrypcja genów, biosynteza białek, proliferacja, różnicowanie i apoptoza komórek eukariotycznych zarówno drożdży jak i człowieka (Keshet i Seger, 2010). Rolą tych enzymów jest uruchomienie kaskady fosforylacji w odpowiedzi na czynnik zewnętrzny i doprowadzenie do odpowiedniej odpowiedzi biologicznej. W konwencjonalnym szlaku kinaza kinazy aktywującej MAPK (MAPKKK) w odpowiedzi na bodziec aktywuje kinazę aktywującą MAPK (MAPKK) a ta kinazę efektorową MAPK, która fosforyluje odpowiednie substraty znajdujące się

w cytoplazmie lub jądrze komórkowym (Cuevas i in., 2007; Qi i Elion, 2005). Kluczowe role w regulacji szlaku MAP kinaz oraz ich inaktywacji u ssaków, pełnią fosfatazy – w tym fosfatazy o podwójnej specyficzności (ang. *Dual-specificity phosphatase, DUSP*). Charakteryzują się one dobrze zachowanym w toku ewolucji motywem domeny katalitycznej HCX<sub>5</sub>R (gdzie X to dowolny aminokwas). Pierwszą opisaną u ssaków fosfatazą regulującą kinazy MAP była fosfataza DUSP1, która reguluje m.in. kinazy JNK i p38 przez co pełni ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej (Seternes i in., 2019). Unikalną spośród tej grupy fosfataz jest fosfataza DUSP5, która wykazuje specyficzność jedynie wobec kinazy ERK1/2 (Mandl i in., 2005). Jak wykazano w regulacji szlaku kinaz MAP biorą udział nie tylko fosfatazy. Kluczową rolę pełnią również kinezy, które umożliwiają transport elementów szlaku MAP kinaz wewnątrz komórki przez co zapewniają ciągłość przekaźnictwa sygnału. Jak do tej pory u ssaków zidentyfikowano 6 rodzin kinezyn zaangażowanych w ten szlak sygnałowy. Należą do nich m.in kinezy z rodziny kinezy-1, których łańcuchy ciężkie i lekkie a także domena motoryczna oddziałują z kinazą ERK regulując m.in. różnicowanie neuronów (Liang & Yang, 2019). Niewykluczony jest również udział kinaz NIMA/Nek (ang. *Never In Mitosis, gene A*) w regulacji szlaku kinaz MAP. Jak wykazano u zarodźca malarii *Plasmodium falciparum*, kinaza z grupy NIMA Pfnek-1 jest zdolna do fosforylacji kinazy Mapk2 w warunkach *in vitro*, równocześnie prowadząc do jej aktywacji (Dorin i in., 2001).

Niewiele jest wiadomo o występowaniu i funkcji kinaz szlaku MAP w rzęskach. Wykazano, że kinaza ERK7 (inaczej ERK8 lub MAPK15) występuje w ciałku podstawowym rzęsek ruchomych *Xenopus* i komórek człowieka oraz w ciałkach podstawowych i rzęskach czuciowych *C. elegans*, (Kazatskaya i in., 2017; Miyatake i in., 2015). ERK7 jest niezbędna do zajścia prawidłowej biogenezy rzęsek w embrionach *Xenopus* oraz mysich rzęskach tchawicy. Białko to bierze również udział w migracji ciałek podstawowych i prawidłowej organizacji aktyny w komórkach orzęsionych *Xenopus* (ang. *multiciliated cells, MCC*), a jego działanie związane jest z fosforylacją białka regulującego ciliogenezę CapZIP (Miyatake i in., 2015). Ponadto wykazano, że ERK7 bierze udział w tworzeniu rzęski pierwotnej u *C.elegans* oraz u człowieka, a jego brak skutkuje nieprawidłową długością oraz morfologią rzęsek i zaburza lokalizację ciałek podstawowych (Kazatskaya i in., 2017). Dowodzi to zachowaną w toku ewolucji funkcję białka ERK7 zarówno w rzęskach ruchomych jak i pierwotnych. Co istotne, wykazano również, że kinaza MAPK p38 w miracidiach *Schistosoma mansoni* (przywry żyłnej), lokalizująca się u podstawy rzęski i w jej części dystalnej, reguluje bicie rzęsek

(Ressurreição i in., 2011), a w rzęskach pierwotnych *C.elegans*, jest zaangażowana w szlak sygnałowy kontrolujący długość rzęsek (van der Vaart i in., 2015).

Niemniej jednak, brak jest danych dotyczących dokładnej wewnątrzrzęskowej lokalizacji kinaz szlaku MAP i ich rzęskowych substratów, co uniemożliwia zrozumienie podłoża nieprawidłowości funkcjonowania rzęsek obserwowanych w komórkach pozbawionych tych białek.

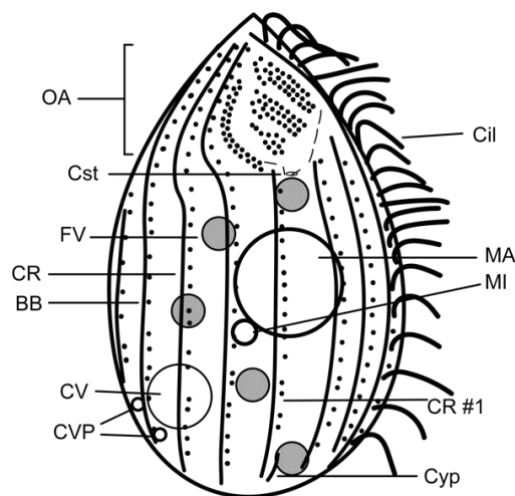
### **1.5 Organizm modelowy – orzęsek *Tetrahymena thermophila***

Rzęski ruchome pełnią istotną rolę nie tylko u Metazoa (w tym u człowieka), lecz również w organizmach jednokomórkowych, umożliwiając im m.in. przemieszczanie się w środowisku wodnym i pobieranie pokarmu. W związku z wysokim poziomem zachowania ewolucyjnego budowy, składu i funkcji rzęsek, organizmy te stanowią dobre modele do badań nad rzęską ruchomą co umożliwia wprowadzenie zasady 3R (*ang. Replacement, Reduction, Refinement* – zastąpienie, ograniczenie, doskonalenie) minimalizując wykorzystanie zwierząt w badaniach podstawowych. Orzęsek *Tetrahymena thermophila* jest jednokomórkowym, wolnożyjącym organizmem eukariotycznym, który wytwarza na swojej powierzchni około 500 rzęsek somatycznych umożliwiających mu przemieszczanie się w środowisku wodnym oraz około 100 rzęsek gębowych wspomagających zdobywanie pokarmu. *Tetrahymena* jest uznanym organizmem modelowym m.in. do badań nad rzęską ruchomą. Metody hodowli w warunkach laboratoryjnych są bardzo dobrze opisane i stosunkowo proste. Komórki charakteryzują się krótkim czasem generacji – w optymalnych warunkach dzielą się co 2-3 h co pozwala na łatwe uzyskanie dużej ilości materiału badawczego w krótkim czasie (Frankel, 1999). Bardzo dobrze opracowane są również metody biochemiczne w tym metody odrzęsiania komórek *Tetrahymena*, które pod wpływem szoku pH tracą rzęski, co umożliwia badanie czystej frakcji rzęskowej. Ponadto pozbawione rzęsek komórki są zdolne do ich pełnej regeneracji w ciągu 2 godzin, umożliwiając obserwacje procesu ciliogenezy (Guttman i Gorovsky, 1979).

Orzęski *Tetrahymena* mają łezkowaty kształt i zazwyczaj osiągają do 50  $\mu\text{m}$  długości oraz 20  $\mu\text{m}$  szerokości. Mutacje w genach kodujących białka tworzące strukturę rzęski czy regulujące jej funkcjonowanie mogą zaburzać tempo oraz sposób ich poruszania się, co dzięki ich rozmiarom można łatwo obserwować i rejestrować z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej. Podobnie jak u innych orzęsków, u *Tetrahymena* występuje dualizm jądrowy. W komórkach orzęska występują dwa jądra: diploidalny, nieaktywny transkrypcyjnie



mikronukleus, zawierający 5 par chromosomów oraz makronukleus – aneuploidalne, aktywne transkrypcyjnie jądro wegetatywne zawierające około 200 par chromosomów (~45n) powstałych poprzez reorganizację i powielenie fragmentów materiału genetycznego mikronukleusa. Na powierzchni ciała komórek znajduje się od 18 do 21 tzw. rzędów rzęskowych w których zlokalizowane są orzęsione ciała podstawowe. W przedniej części komórki usytuowany jest aparat gębowy, zbudowany z czterech różnych orzęsionych struktur otaczających cytostom – zagłębienie, w którym dochodzi do powstawania wodniczek pokarmowych (fagosomów) na drodze fagocytozy (Włoga i Frankel, 2012). Rzęski gębowe pełnią więc ważną rolę umożliwiając przesuwanie pokarmu w kierunku zagłębienia aparatu gębowego. Nieprawidłowe funkcjonowanie rzęsek gębowych prowadzi do spowolnienia tempa fagocytozy bądź też jej całkowitego zahamowania (Nilsson i Williams, 1966). Wzdłuż tego samego rzędu rzęskowego, przy którym zlokalizowany jest aparat gębowy, w dolnej części komórki znajduje się cytoprokt (Ryc.7) w którym dochodzi do fuzji fagosomów z błoną komórkową i usuwania niestrawionych resztek pokarmu. Ponadto w tylnej prawej części komórki znajdują się tzw. pory wodniczki tętniącej (najczęściej dwa) pełniące funkcję osmoregulacyjną (*ang. contractile vacuole pores*) (Ryc.7) (Włoga i Frankel, 2012).



Ryc .7 Schemat budowy orzęska *Tetrahymena thermophila*. Cil – rzęski somatyczny, MA – makronukleus, MI – mikronukleus, Cil – rzęski somatyczny, CR #1 – pierwszy rząd rzęskowy, Cyp – cytoprokt, CVP – otwory wodniczki tętniącej, CV – wodniczka tętniąca, BB – ciałko podstawowe, CR – rząd rzęskowy, FV – wodniczka pokarmowa, Cst – cytostom, OA – aparat gębowy. Na podstawie Frankel, 1999, zmodyfikowano.

Bezpłciowe rozmnażanie orzęska *Tetrahymena* zachodzi na drodze podziałów poprzecznych komórki. W jego trakcie mikronukleus podlega mitozie, natomiast makronukleus

dzieli się na drodze amitozy, w wyniku której dochodzi do przypadkowego podziału materiału genetycznego pomiędzy makronukleusy potomne. Prowadzi to nierównego rozdzielania kopii danego genu pomiędzy komórki potomne, co może doprowadzić do utraty niekorzystnego lub nagromadzenie korzystnego dla przeżycia komórek allelu. Proces ten określany jest jako tzw. sortowanie fenotypowe (ang. *phenotypic assortment*) i wykorzystywany jest przy uzyskiwaniu mutantów (Orias i Newby, 1975; Turkewitz i in., 2002). W końcowym etapie podziału, w trakcie cytokinezy, komórka rozdziela się na dwie komórki potomne, a proces ten wspomagany jest przez tzw. rotokinezę, czyli ruch komórek wokół własnej osi, który wynika z wyspecjalizowanego ruchu rzęsek. Nieprawidłowości w budowie lub funkcjonowaniu rzęsek mogą więc prowadzić do spowolnienia tempa podziałów komórkowych bądź też zatrzymania procesu cytokinezy ze względu na brak możliwości rozdziału komórek potomnych (Brown i in., 1999).

W warunkach niekorzystnych (np. brak pokarmu) dojrzałe płciowo komórki mogą przejść proces płciowy umożliwiającą rekombinację genetyczną, tzw. koniugację. W trakcie koniugacji komórki o odmiennych typach płciowych (u *Tetrahymena* występuje 7 typów płciowych) łączą się w pary i a ich mikronukleusy przechodzą szereg podziałów i fuzję, co umożliwia wymianę materiału genetycznego. Mikronukleus ulega mejozie oraz postmejotycznej mitozie, w trakcie której w każdej z komórek powstają dwa przedjądra. Po wymianie przedjądrzy między koniugującymi partnerami, dochodzi do ich fuzji, a następnie dwóch podziałów mitotycznych. Na bazie nowopowstałego mikronukleusa powstaje nowy makronukleus a stary makronukleus ulega degradacji (Dave i in., 2009). Jest to szczególnie przydatne przy tworzeniu mutantów z delecją genów niezbędnych do życia komórki. Zmutowany gen może zostać „przechowany” w nieaktywnym transkrypcyjnie mikronukleusie, a fenotyp wynikający z jego delecji ujawni się dopiero po procesie koniugacji i utworzeniu nowego makronukleusa (Hai i in., 1999). Ponadto niewątpliwą zaletą orzęska *Tetrahymena* jako organizmu modelowego jest również całkowicie zsekwencjonowany genom (Eisen i in., 2006; Hamilton i in., 2016) a także zachodzenie w jądrach komórkowych wyłącznie rekombinacji homologicznej, co umożliwia dowolne manipulacje genetyczne (typu knock-in i knock-out) i badania z użyciem tradycyjnej i „odwrotnej” genetyki (ang. *forward and reverse genetics*).

## 2. Cel pracy

Badania przeprowadzone w Pracowni Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek wykazały, że brak białka Spef2A lub białka Cfap69 prowadzi do utraty całej wypustki C1b aparatu centralnego (Spef2A) lub jej znaczącej części (Cfap69) (Joachimiak i in., 2021). Porównanie ciliomów komórek szczepu dzikiego *Tetrahymena* i mutantów pozbawionych białka Spef2A (SPEF2A-coDel) lub Cfap69 (CFAP69-KO) umożliwiło identyfikację białek budujących wypustkę C1b (białka te były wyeliminowane lub ich poziom był znacząco obniżony w rzęskach mutantów) (Joachimiak i in., 2021). Podczas analizy ciliomów zidentyfikowano białka niestrukturalne (Tabela 1), których poziom w rzęsce był zmieniony w mutantach SPEF2A-coDel i CFAP69-KO, co umożliwiło identyfikację białek enzymatycznych, mogących brać udział w regulacji aktywności białek budujących wypustkę C1b aparatu centralnego a także w generacji i regulacji sygnałów przekazywanych z aparatu centralnego do promieni łączących. Spośród wytypowanych białek, w przypadku kinazy Map2k7 liczba peptydów zidentyfikowanych w rzęskach mutantów C1b była istotnie wyższa niż w przypadku komórek szczepu dzikiego. Poziom pozostałych białek był istotnie obniżony w rzęskach mutantów, a w przypadku białka **Dusp5** nie zidentyfikowano żadnego peptydu co wskazuje, że u *Tetrahymena* brak białka Spef2A lub Cfap69, a tym samym brak wypustki C1b prowadzi również do utraty białka Dusp5. Dotychczas nie opisano białek biorących udział w regulacji szlaku MAP kinaz w aparacie centralnym rzęsek ruchomych w żadnym organizmie. **Poniższe badania miały na celu określenie czy u *Tetrahymena* białka Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c oraz budująca wyrostek C2c kinezyna Kif9 mogą stanowić elementy i regulatory wspólnego szlaku regulatorowego kinaz MAP w aparacie centralnym rzęski ruchomej.**

### Cele szczegółowe:

1. Analiza bioinformatyczna białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c oraz Kif9
2. Zbadanie lokalizacji badanych białek w komórkach *Tetrahymena*
3. Identyfikacja potencjalnych partnerów białka Dusp5
4. Identyfikacja białek tworzących trwały kompleks z białkiem Dusp5
5. Identyfikacja wzajemnych oddziaływań bezpośrednich białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c oraz Kif9
6. Zbadanie roli białek Dusp5 oraz Kif9 w komórkach *Tetrahymena* poprzez delecję genów i porównanie fenotypu mutantów do fenotypu komórek typu dzikiego

**Tabela 1 Porównanie liczby zidentyfikowanych peptydów w ciliomach mutantów SPEF2A-KO i CFAP69-KO oraz rzęskach komórek szczepu dzikiego (WT) (na podstawie danych spektrometrii masowej proteomów porównawczych rzęsek komórek szczepu dzikiego – WT oraz komórek SPEF2A-coDel i CFAP69-KO, uzyskanych w Pracowni Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek).**

Białko	Liczba peptydów zidentyfikowana w komórkach (suma z 6 powtórzeń):			Stosunek		Poziom
	WT	SPEF2A-coDel	CFAP69-KO	SPEF2A-coDel /WT	CFAP69-KO/WT	
Dusp5	28	0	0	0	0	↓
Mapk3	10	4	1	0,4	0,1	↓
Map2k7	24	71	78	2,96	3,25	↑
Nek6/ Nr32	9	4	1	0,44	0,11	↓
Pp2c	23	7	6	0,3	0,26	↓

### 3. Materiały

#### 3.1 Odczynniki i roztwory stosowane do hodowli bakterii

- Pożywka LB (ang. *Lysogeny Broth*): 0,5% ekstrakt drożdżowy (Difco, USA), 1% trypton (Difco, USA), 0,5 % NaCl (Chempur, Polska),
- Pożywka SOC (ang. *Super Optimal Catabolite Repression*): 0,5 % ekstrakt drożdżowy, 2% trypton, 20 mM glukoza (Merck, Niemcy), 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl (Merck, Niemcy), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Niemcy),
- Pożywka SOB (ang. *Super Optimal Broth*) 2% trypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>,
- Bufor Inoue: 15 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck, Niemcy), 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (Merck, Niemcy), 10 mM PIPES, pH 6,7 (Merck, Niemcy),
- Agar (Difco, USA),
- DMSO ≥ 99,9% (Merck, Niemcy),
- Glicerol (Chempur, Polska),
- Ampicylina (BioShop, Kanada).

#### 3.2 Roztwory do oczyszczania plazmidowego DNA z bakterii metodą lizy alkalicznej

- Roztwór do zawieszania bakterii: 50 mM Tris-HCl, pH 8 (Merck, Niemcy), 10 mM EDTA (Merck, Niemcy), 100 µg/ml RNaza A (Invitrogen, Norwegia),
- Roztwór lizujący: 1% SDS (BioRad, USA), 0,2 M NaOH,
- Roztwór precypitujący: 3 M octan potasu (BioMol, Niemcy), 2 M kwas octowy (POCH, Polska)
- Alkohol izopropylowy (POCH, Polska),
- 70% Alkohol etylowy (POCH, Polska).

#### 3.3 Komercyjne zestawy stosowane do oczyszczania DNA, plazmidów, produktów reakcji PCR

- GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EURx, Polska),
- GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (EURx, Polska),

- EXTRACTME Plasmid Midi Kit (Blirt, Polska),
- GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (EURx, Polska),
- GeneMATRIX PCR/ DNA Clean-Up Purification Kit (EURx, Polska).

### **3.4 Bufory stosowane do elektroforezy DNA**

- Bufor TAE (Tris-Acetate-EDTA): 40 mM Tris, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA, pH 8,5,
- Bufor obciążający: 6 x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, USA),
- Znacznik wielkości: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA),
- Bromek etydy (BioRad, USA),
- Agaroz (Difco, Niemcy).

### **3.5 Enzymy stosowane w metodach biologii molekularnej**

- Ligaza T4 wraz z dołączonym przez producenta buforem (Thermo Scientific, USA),
- Polimeraza Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) wraz z dołączonymi przez producenta buforami,
- Enzymy restrykcyjne: ApaI, BamHI, BglII, BssHIII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, MluI, NcoI, NdeI, PstI, SacI, SacII, XhoI (EURx, Polska) (New England Biolabs, USA) wraz z odpowiednimi buforami dostarczonymi przez producentów.

### **3.6 Pożywki i roztwory stosowane do hodowli orzęska *Tetrahymena thermophila***

- Pożywka SPP (ang. *Sequesterine Proteose-Peptide*): 1% proteozo-pepton (Difco, USA), 0,2% glukoza, 0,1% ekstrakt drożdżowy, 0,003% Fe-EDTA (Merck, Niemcy),
- Pożywka MEPP (ang. *Minimally Enriched Proteose Peptide*): 2% proteozo-pepton, 2 mM cytrynian sodu, 1 mM chlorek żelaza III, 1,7 μM kwas folinowy (Rasmussen i Orias, 1976)
- Mieszanina antybiotyków: penicylina (10 000 U/ml), streptomycyna (10 000 μg/ml), amfoterycyna B (25 μg/ml) (Gibco, USA),
- CdCl<sub>2</sub> (Merck, Niemcy),
- 10 mM Tris-HCl pH 7,4,

- Związki stosowane do selekcji szczepów: paromomycyna (Merck, Niemcy), puromycyna (BioShop, Kanada), blastycydyna S (BioShop, Kanada), 6-metylpuryna (Merck, Niemcy), cykloheksymid (Merck, Niemcy).

### **3.7 Odczynniki i bufory stosowane do odrzężania komórek *Tetrahymena***

- Bufor do odrzężania komórek: 50 mM sacharoza, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM CaCl<sub>2</sub>,
- 0,5 M CH<sub>3</sub>COOH,
- 0,6 M KOH,
- Roztwór Ficoll: 10% Ficoll 400 (Merck, Niemcy), 10 mM octan sodu, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, pH 4,2.

### **3.8 Zestaw stosowany do pomiaru białka**

- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA).

### **3.9 Roztwory stosowane do elektroforezy w żelu poliakryloamidowym i metody Western blot**

- Bufor Laemmliego do denaturacji białek: 312,5 mM Tris-HCl, 10% SDS, 25% glicerol, 10% β-merkptoetanol (Merck, Niemcy),
- Znacznik wielkości: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA),
- Bufor do elektroforezy białek: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicyna (BioRad, USA), 0,1% SDS,
- Bufor do transferu białek: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicyna, 20% alkohol metylowy (POCH, Polska),
- Roztwór Ponceau S (Merck, Niemcy): 0,1% Ponceau S, 5% kwas octowy,
- Bufor TBS (ang. *Tris Base Saline*): 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl,
- Bufor TBST: Bufor TBS, 0,1% Tween 20 (Merck, Niemcy),
- Roztwory do blokowania błony nitrocelulozowej: 5% odtłuszczone mleko w buforze TBST lub 3% albumina surowicy bydlęcej (ang. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (BioShop, Kanada) w buforze TBST,

- Substrat do chemiluminescencji: Westar  $\eta$ C Ultra 2.0 (Cyanagen, Włochy).

### 3.10 Zestaw stosowany do wykrywania fosforylowanych białek

- Odczynnik barwiący fluorescencyjnie fosforylowane białka rozdzielone w żelu poliakrylamidowym: Pro-Q™ Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Thermo Scientific, USA).

### 3.11 Odczynniki i bufor stosowane w metodzie BioID (ang. *proximity-dependent biotin identification*)

- Bufor do lizy komórek: 50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0,4% SDS, 1mM DTT (Merck, Niemcy), 2% Triton X-100 (Merck, Niemcy),
- Inhibitory proteaz: cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, (Roche, Szwajcaria),
- Biotyna (BioShop, Kanada),
- DMSO  $\geq$  99,9% (Merck, Niemcy),
- NP-40 (Roche, Szwajcaria),
- Złoże związane ze streptawidyną: Dynabeads™ M-280 Streptavidin (Thermo Scientific, USA),
- Zestaw do precipitacji i oczyszczania białek ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (BioRad, USA),
- 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Merck, Niemcy).

### 3.12 Odczynniki i bufor stosowane w metodzie koimmunoprecypitacji

- Bufor do koimmunoprecypitacji: 80 mM Tris-HCl pH 7,4, 1,2 M NaCl, 2% NP-40,
- Bufor do płukania złoża: 40 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,3 M NaCl, 0,2% NP-40,
- Inhibitory proteaz: cOmplete Protease Inhibitor Cocktail,
- Złoże związane z przeciwciałem anti-HA: Pierce™ Anti-HA Agarose (Thermo Scientific, USA).



### 3.13 Odczynniki i bufor y stosowane w metodzie typu *pull-down*

- Zmodyfikowany bufor 2 x RIPA: 50 mM Tris pH 7,4, 300 mM NaCl, 2% NP-40, 2% deoksycholan sodu (Merck, Niemcy), 10% glicerol,
- Bufor do rozcieńczenia białek: 25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 5% glicerol,
- Bufor do płukania złoza: 25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,2% NP-40, 5% glicerol,
- Inhibitory proteaz: cOmplete Protease Inhibitor Cocktail,
- Złoze związane z przeciwciałem anti-GFP: ChromoTek GFP-Trap<sup>®</sup> Magnetic Agarose (Chromotek, Niemcy).

### 3.14 Odczynniki i roztwory stosowane w immunocytochemii

- Bufor PHEM: 60 mM PIPES, 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich, USA), pH 6,9, 10 mM EGTA (Serva, Niemcy), 2 mM MgCl<sub>2</sub>,
- Roztwory permeabilizujące błonę komórkową i utrwalające:
  - 2% paraformaldehyd (BioMol, Niemcy), 1% Triton X-100 w buforze PHEM,
  - 2% paraformaldehyd, 1% NP.-40 w buforze PHEM,
  - 70% alkohol etylowy, 0,6% NP-40 w buforze PHEM,
- Bufor do płukania – PBS (ang. *Phosphate Buffer Saline*): 137 mM NaCl, 100 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Niemcy), 10 mM EDTA, 2,7 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Niemcy), pH 7,2,
- Bufor do blokowania i rozcieńczenia przeciwciał I-wszo i II-go rzędowych: 3% albumina surowicy bydlęcej (BSA) w buforze PBS,
- Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL).

### 3.13 Stosowane przeciwciała

Przeciwciała I-rzędowe i II-rzędowe wykorzystywane w metodzie Western blot oraz technikach immunocytochemicznych umieszczono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Przeciwciała wykorzystywane w przeprowadzonych doświadczeniach

<b>Przeciwciała I rządowe</b>				
<b>Przeciwciało</b>	<b>Antygen</b>	<b>Stosowane rozcieńczenie</b>		<b>Źródło</b>
		<b>Western blot</b>	<b>Immunocytochemia</b>	
Anty-HA (mysie)	Peptyd HA YPYDVPDYA	1:2000	1:300	BioLegend (USA) nr kat. 901501
Anty-GFP (królicze)	Białko GFP	1:60000	1:6000	Abcam (Wielka Brytania) nr kat. ab6556
12G10 Anty- $\alpha$ -tubulina (mysie)	$\alpha$ -tubulina	1:80000	1:200	DSHB, Iowa University, USA, (12G10)
Streptawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową	Biotyna	1:25000		Thermo Scientific (USA) nr kat. 21130
Anty-poliglicylowana tubulina (PolyG)	Poliglicylowana tubulina			1:4000
<b>Przeciwciała II rządowe</b>				
Anty-mysie skoniugowane z peroksydazą chrzanową	Mysie IgG	1:10000		Jackson ImmunoResearch (Wielka Brytania) nr kat. 154319
Anty-królicze skoniugowane z peroksydazą chrzanową	Królicze IgG	1:20000		Merck/Calbiochem (Niemcy) nr kat.401315
Anty-mysie skoniugowane z AlexaFluor 488	Mysie IgG		1:300	Invitrogen (USA) A11001
Anty-mysie skoniugowane z AlexaFluor 555	Mysie IgG			Invitrogen (USA) A21147
Anty-królicze skoniugowane z AlexaFluor 488	Królicze IgG			Invitrogen (USA) A11034
Anty-królicze skoniugowane z AlexaFluor 555	Królicze IgG			Invitrogen (USA) A21429

### 3.14 Szczepy komórek *Tetrahymena*

W badaniach stosowano standardowo używane szczepy typu dzikiego (ang. *wild-type*) orzęska *Tetrahymena* (Tabela 3), a także mutanty typu knock-in i knock-out uzyskane poprzez transformację komórek szczepu dzikiego, które wykazywały odporność na wybrany czynnik selekcyjny (Tabela 4).

**Tabela 3.** Standardowe szczepy orzęska *Tetrahymena thermophila*

Nazwa szczepu	Opis szczepu	Pochodzenie
Cu428	Komórki szczepu typu dzikiego – posiadają w mikronukleusie gen <i>mpr1</i> warunkujący odporność na 6-metylpurynę	<i>Tetrahymena</i> stock center
Cu427	Komórki szczepu typu dzikiego – posiadają w mikronukleusie gen <i>CHX1</i> warunkujący odporność na cykloheksymid	<i>Tetrahymena</i> stock center
B2086	Komórki szczepu typu dzikiego o odmiennym typie płciowym od Cu428	<i>Tetrahymena</i> stock center
AIII*	Komórki posiadające aneuploidalny mikronukleus	<i>Tetrahymena</i> stock center

**Tabela 4.** Mutanty orzęska *Tetrahymena thermophila* uzyskane w wyniku transformacji komórek szczepu dzikiego

Nazwa szczepu	Opis szczepu	Czynnik selekcyjny
Dusp5-3HA-pNeo4	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Dusp5 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu	Paromomycyna

	karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	
Kif9-3HA-pNeo4	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Kif9 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Mapk3-3HA-pNeo4	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Mapk3 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Map2k7-3HA-pNeo4	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Map2k7 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Nek6-3HA-pNeo4	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka DUSP jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Pp2c-3HA-pNeo4	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Pp2c jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Dusp5-3HA-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Dusp5 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna

Mapk3-3HA-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Mapk3 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna
Map2k7-3HA-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Map2k7 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna
Nek6-3HA-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Nek6 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna
Pp2c-3HA-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Pp2c jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką 3xHA pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna
Dusp5-GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Dusp5 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna
Map2k7- GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Map2k7 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna
Nek6- GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Nek6 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu	Puromycyna

	karboksylowym metką GFP pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	
Pp2c- GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Pp2c jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Puromycyna
DUSP-HA-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem wprowadzonym do <i>locus</i> genu BTU1 umożliwiającym nadprodukcję białka DUSP jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA pod kontrolą promotora MTT1.	Blastycydyna
Dusp5-GFP-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Dusp5 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTU1</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Kif9-GFP-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Kif9 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTU1</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Mapk3-HA-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Mapk3 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTU1</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Mapk3-GFP-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Mapk3	Blastycydyna

	jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego.	
Map2k7-HA-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Map2k7 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Map2k7-GFP-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Map2k7 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Nek6-HA-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Nek6 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Nek6-GFP-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Nek6 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Pp2c-HA-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Pp2c jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA pod kontrolą	Blastycydyna

	promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego.	
Pp2c-GFP-OEX	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka Pp2c jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą promotora MTT1 wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego.	Blastycydyna
Dusp5-HA-BirA*	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Dusp5 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA-BirA* pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Kif9-HA-BirA*	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Kif9 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA-BirA* pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Spef2A-HA-TurboID	Komórki szczepu Cu428 z konstruktem umożliwiającym produkcję białka Spef2A jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA-TurboID pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i> .	Paromomycyna
Spef2A-HA-TurboID Dusp5-GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428, które w genomie makronuklearnym mają wprowadzone dwa konstrukty: (i) umożliwiający produkcję białka Spef2A jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA-TurboID, oraz (ii) białka DUSP jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP – oba pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i>	Paromomycyna Puromycyna



Spef2A-HA-TurboID Map2k7- GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428, które w genomie makronuklearnym mają wprowadzone dwa konstrukty: (i) umożliwiający produkcję białka Spef2A jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA-TurboID, oraz (ii) białka Map2k7 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP – oba pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i>	Paromomycyna Puromycyna
Spef2A-HA-TurboID Nek6- GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428, które w genomie makronuklearnym mają wprowadzone dwa konstrukty: (i) umożliwiający produkcję białka Spef2A jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA-TurboID, oraz (ii) białka Nek6 jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP – oba pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i>	Paromomycyna Puromycyna
Spef2A-HA-TurboID Pp2c- GFP-pPur	Komórki szczepu Cu428, które w genomie makronuklearnym mają wprowadzone dwa konstrukty: (i) umożliwiający produkcję białka Spef2A jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką HA-TurboID, oraz (ii) białka Pp2c jako białka fuzyjnego z przyłączoną na końcu karboksylowym metką GFP – oba pod kontrolą natywnego promotora, w natywnym <i>locus</i>	Paromomycyna Puromycyna
DUSP5-KO-HE1 DUSP5-KO-HE2	Heterokariony (HE1 i HE2) o odmiennych typach płciowych z delecją genu <i>DUSP5</i> w genomie mikronuklearnym	Brak
DUSP5-KO	Komórki z delecją genu <i>DUSP5</i> w genomie mikronuklearnym i makronuklearnym	Paromomycyna

KIF9-KO	Komórki z delecją genu <i>KIF9</i> w genomie mikronuklearnym i makronuklearnym	Paromomycyna
DUSP5-KO-rescue	Komórki z delecją genu <i>DUSP5</i> (DUSP5-KO) w genomie mikronuklearnym i makronuklearnym z wprowadzonym do <i>locus BTUI</i> genomu makronuklearnego konstruktem umożliwiającym nadprodukcję białka DUSP jako białka fuzyjnego z umieszczoną na końcu karboksylowym metką GFP pod kontrolą promotora MTT1	Paromomycyna Blastycydyna

## 4. Metody

### 4.1 Metody bioinformatyczne

Sekwencje aminokwasowe badanych białek oraz sekwencje nukleotydowe kodujących je genów pobierano z bazy danych TGD - *Tetrahymena Genome Database* (<https://tet.ciliate.org/>, dostęp: 19.01.2023r.). Ich teoretyczną masę molekularną wyznaczano z wykorzystaniem programu ExPasy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/), dostęp: 19.01.2023r.). Analizę domenową badanych białek przeprowadzono w programie SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>, dostęp: 19.01.2023r.)

Ortologi badanych białek wyszukiwano z wykorzystaniem algorytmu BLASTp na podstawie bazy danych NCBI (ang. *National Centre for Biology Information*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, dostęp: 19.01.2023r.). W programie ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, dostęp: 22.04.2023 r.) (Sievers i in., 2011) przygotowywano zestawienie (ang. *alignment*) sekwencji aminokwasowych zidentyfikowanych ortologów, które następnie analizowano i wprowadzano ewentualne korekty w programie SeaView (Galtier i in., 1996)

Startery wykorzystywane do amplifikacji fragmentów sekwencji nukleotydowych genów w reakcji PCR, projektowano z wykorzystaniem programu IDT OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/>, dostęp: 19.01.2023r.).

## **4.2 Hodowla komórek *Tetrahymena thermophila***

Komórki *Tetrahymena thermophila* hodowano w pożywce SPP (ang. *Sequestrene Proteose-Peptide*) z dodatkiem mieszaniny antybiotyków (100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny, 0,25 µg/ml amfoterycyny B). Komórki hodowano w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 80 rpm. W przypadku mutantów *Tetrahymena* zdolnych do nadprodukcji białka, przed doświadczeniem komórki hodowano przez 2-16 godzin w pożywce SPP z dodatkiem jonów kadmu w stężeniu 2,5 µg/ml w celu pobudzenia aktywności promotora *MTT1*. W celu przygotowania komórek do transformacji lub koniugacji, komórki z hodowli w fazie wzrostu logarytmicznego przenoszono od 10 mM Tris-HCl pH 7,4 i hodowano w nim przez ok 20-22 godziny (tzw. głodzenie komórek).

## **4.3 Hodowla bakterii *Escherichia coli***

Bakterie *Escherichia coli* hodowano 16-18 godzin w płynnej pożywce LB (ang. *Lysogeny Broth*) bez lub z dodatkiem ampicyliny w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 rpm (rpm – ang. *rotation per minute*). Selekcję bakterii po transformacji prowadzono przez 16-20 godzin na szalkach Petriego ze stałym podłożem LB-agar z dodatkiem ampicyliny w temperaturze 37°C.

### **4.3.1 Przygotowanie bakterii kompetentnych**

Komórki kompetentne bakterii *Escherichia coli* szczepu XL-Gold przygotowywano z wykorzystaniem metody manganowo-wapniowej (Inoue i in., 1990). Z płynnej hodowli bakterii szczepu XL-Gold wykonywano posiew redukcyjny na stałym podłożu LB-agar bez czynnika selekcyjnego i hodowano przez noc w temperaturze 37°C. Pojedynczą kolonię bakterii zaszczepiano na pożywkę SOB (ang. *Super Optimal Broth*) i hodowano przez noc w temperaturze 18°C z wytrząsaniem 100 rpm. Pomiaru gęstości optycznej OD (ang. *Optical Density*) hodowli bakteryjnej dokonywano przy długości fali 600 nm z wykorzystaniem spektrofotometru BioPhotometer plus (Eppendorf, Niemcy). Hodowle bakteryjne, które osiągnęły OD = 0,55 przenoszono do lodu, inkubowano 10 minut, a następnie wirowano (2500 x g) przez 10 minut w temperaturze 4 °C. Osad komórek bakteryjnych przepłukiwano zimnym buforem Inoue i ponownie wirowano. Kolejno komórki zawieszano w buforze Inoue zawierającym 7,5% DMSO, inkubowano 10 min na lodzie i przenoszono do probówek, które

następnie zamrażano w ciekłym azocie. Przygotowane bakterie kompetentne przechowywano w temperaturze -80°C.

#### **4.3.2 Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego**

Plazmidowe DNA wprowadzano do komórek bakterii kompetentnych *E.coli*, stosując metodę szoku cieplnego. Do 50 µl zawiesiny bakteryjnej dodawano 3 µl mieszaniny ligacyjnej (rozdz. 4.4.7) i delikatnie mieszano. Po 30 minutach inkubacji w lodzie próbówki umieszczano na 45 s w termobloku (temperatura 42 °C, szok cieplny). Po transformacji próbówki z bakteriami umieszczano na 2 min w lodzie, po czym zawieszano w 1 ml pożywki SOC i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie komórki wirowano przez 1 min (4600 x g), osad zawieszano w 50 µl pożywki SOC i wysiewano na szalkach Petriego ze stałym podłożem LB-agar zawierającym czynnik selekcyjny – ampicylinę w stężeniu 100µg/ml.

#### **4.3.3 Mrożenie transformowanych bakterii**

Aby przechować bakterii *E.coli* z wprowadzonym DNA plazmidowym, zamrażano zawiesinę bakteryjną. W tym celu mieszano 1 ml całonocnej hodowli bakterii mieszano z 700 µl sterylnego 100 % glicerolu i po szybkim zamrożeniu w ciekłym azocie przechowywano w temperaturze -80°C.

### **4.4 Metody biologii molekularnej**

#### **4.4.1 Oczyszczanie genomowego DNA z komórek *Tetrahymena thermophila***

Genomowe DNA z komórek *Tetrahymena* oczyszczano stosując komercyjny zestaw GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (oczyszczanie na minikolumnach wiążących DNA). Komórki *Tetrahymena* szczepu dzikiego Cu428 bądź mutantów, hodowano w pożywce SPP do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu ( $2-2,5 \times 10^5$  komórek/ml). Następnie komórki wirowano (1600 x g) przez 3 min, a uzyskany osad komórek procedowano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Genomowe DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

#### 4.4.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

Fragmety genomowego DNA użyte do przygotowania konstruktów powielano z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy, którą przeprowadzano w termocyklerze T100 Thermal Cycler (BioRad, USA). Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej PCR używano: polimerazę Phusion High-Fidelity DNA Polymerase charakteryzującą się wysoką wiernością syntezy DNA, bufor dołączony do polimerazy przez producenta, 200  $\mu$ M mieszaninę nukleotydów, genomowe DNA stanowiące matrycę oraz odpowiednie startery (Tabela 5). W celu wstawienia powielonych fragmentów do odpowiednich plazmidów, zaprojektowane startery zawierały w swojej sekwencji miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, które znajdowały się również na danym wektorze plazmidowym (rozdz. 4.5).

**Tabela 5.** Wykaz starterów użytych w reakcji PCR, pogrubioną czcionką zaznaczono miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne wykorzystane w czasie klonowania.

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'->3'
Startery wykorzystane do przygotowania konstruktów do produkcji białek na poziomie natywnym z metką 3xHA, GFP, HA-BirA* lub TurboID dołączoną na końcu karboksylowym badanego białka	
Kif9-cod-F-native-MluI	AATA <b>ACGCGT</b> GAGAACTTAGTAAATATACCTAAAGACGAA
Kif9-cod-R-native-BamHI	ATAT <b>GGATCC</b> ATTTTAAACTTTTCCATTTTACGAGC
Kif9-3'UTR-F-native-PstI	AAAT <b>CTGCAG</b> CATATAAAGGTAGGCTTATTAATATACTC
Kif9-3'UTR-R-native-XhoI	ATAT <b>CTCGAG</b> ATATCAGGAGCTCATTTAGTAGTAAATG
Dusp5-cod-F-native-MluI	AATA <b>ACGCGT</b> CTG TGC ATG TGA AAT TTA ATG TCA AA
Dusp5-cod-R-native-BamHI	ATAT <b>GGATCC</b> ATCATTTTTCTTTTTAACAGTGACTIONAAAGC
Dusp5-3'UTR-F-native-PstI	AAAT <b>CTGCAG</b> CACTCTAAACGAAATTATGTCTATGTTAAAT
Dusp5-3'UTR-R-native-XhoI	ATAT <b>CTCGAG</b> GGGATGGATGGCATATAGTATTG
Pp2c-cod-F-native-MluI	AATA <b>ACGCGT</b> T ATGGGAGCTTACTTAACAAAGC
Pp2c -cod-R-native-BamHI	ATAT <b>GGATCC</b> TCTCTTATCGTGATTGATTTTACTACAAT
Pp2c -3'UTR-F-native-PstI	AAAT <b>CTGCAG</b> TTCAATAAGTCATTCAATCAATCAGTT
Pp2c -3'UTR-R-native-XhoI	ATAT <b>CTCGAG</b> ATAACAACCTTCATTCTTATGGTCTTAGT
Map2k7-cod-F-native-MluI	AATA <b>ACGCGT</b> GTTGAATAACAGTTTGGGAAGAATACTA
Map2k7-cod-R-native-BamHI	ATAT <b>GGATCC</b> AATAATAGAAAAAGTTTAATTAATTACGG
Map2k7-3'UTR-F-native-PstI	AAAT <b>CTGCAG</b> GATTTAACATTACCACTCATATTTTACTAC
Map2k7-3'UTR-R-native-XhoI	ATAT <b>CTCGAG</b> TAGATCTCTTGATAACTTCTTCAATCTAT

Mapk3-cod-F-native-MluI	AATA <b>ACGCGT</b> GTTGGTATTATTTTTGCAGAGCTAAT
Mapk3-cod-R-native-BamHI	ATAT <b>GGATCC</b> ATAATCTTAATCAGAAGAGAATTCTTCATC
Mapk3-3'UTR-F-native-PstI	AAAT <b>CTGCAG</b> AGCTTAATTTTACACTGTTTAAACTTAA
Mapk3-3'UTR-R-native-XhoI	ATAT <b>CTCGAG</b> CTGCACAAAATTAGCAACCTATC
Nek6-cod-F-native-MluI	AATA <b>ACGCGT</b> ATGATTATCTCGAATGTTGATCCAC
Nek6-cod-R-native-BamHI	ATAT <b>GGATCC</b> AAAATTATCATCAGATATATCCATTAAATTTTCT
Nek6-3'UTR-F-native-PstI	AAAT <b>CTGCAG</b> GTTTATAAATCATCTCAATAAATATTTAATTTCC
Nek6-3'UTR-R-native-XhoI	ATAT <b>CTCGAG</b> TCAATTTTCTCTTGATATAAGAAAATCCC
Startery wykorzystane do przygotowania konstruktów do nadprodukcji białek z metką GFP lub HA, dołączoną na końcu karboksylowym badanego białka w locus <i>BTUI</i>	
Dusp5-OEX-ATG-MluI-F	AATA <b>ACGCGT</b> T ATGAAGAAGTCTTAAACTTTGATAAAAATC
Dusp5-OEX-BamHI-R	ATAT <b>GGATCC</b> ATCATTTTTCTTTTTAACAGTGAATAAAGC
Kif9-OEX-ATG-MluI-F	AATA <b>ACGCGT</b> T ATGGTAAAAGCTCCTATTAAAGTAGTA
Kif9-OEX-BamHI-R	ATAT <b>GGATCC</b> ATTTTTAACTTTTCCATTTTACGAGC
Pp2c-OEX-ATG-MluI-F	AATA <b>ACGCGT</b> T ATGGGAGCTTACTTAACAAAGC
Pp2c-OEX-BamHI-R	ATAT <b>GGATCC</b> TCTCTTATCGTGATTGATTTTTACTACAAT
Map2k7-OEX-ATG-MluI-F	AATA <b>ACGCGT</b> T ATGGGACAAGGAAAATCTAAATTC
Map2k7-OEX-BamHI-R	ATAT <b>GGATCC</b> AATAATAGAAAAAGTTAATTAATTACGG
Mapk3-OEX-ATG-MluI-F	AATA <b>ACGCGT</b> T ATGGATACAGCTAATTTAGTTGCA
Mapk3-OEX-BamHI-R	ATAT <b>GGATCC</b> ATAATCTTAATCAGAAGAGAATTCTTCATC
Nek6-OEX-ATG-MluI-F	AATA <b>ACGCGT</b> T ATG AGT AAA GAC ATT CAG GAG CT
Nek6-OEX-BamHI-R	ATAT <b>GGATCC</b> AAAATTATCATCAGATATATCCATTAAATTTTCT
Startery wykorzystane do przygotowania konstruktów umożliwiających delecję fragmentu genu kodującego badane białko	
Dusp5-KO-5'-ApaI	ATAT <b>GGGCC</b> CACTTTTGAATCAAGGAATAGCTACA
Dusp5-KO-5'-R-SmaI	ATAT <b>CCCGG</b> ATTGCTCTTCTTTTCTGTATT
Dusp5-KO-3'-F-PstI	ATAT <b>CTGCAG</b> CTAAATGGAATTAATATAGGACCATGC
Dusp5-KO-3'-R-SacII	ATAT <b>CCGCG</b> ATATGGGATGGATGGCATATAGTAT
Startery wykorzystane do analizy genomu komórek z usuniętym fragmentem genu	
Dusp5-KO-SPR-F	AAAGCATGAAGAAGTCTTAAACTT
Dusp5-KO-SPR-R-1	TTAATACCAAGTCCATGAGTGAA
Dusp5-KO-SPR-R-2	CTTTTTAACAGTGAATAAAGCAAGT

#### **4.4.3 Oczyszczanie produktów reakcji PCR**

Wielkość powielonych fragmentów DNA oraz wydajność reakcji PCR oceniano przeprowadzając elektroforezę w żelu agarozowym o stężeniu procentowym w zakresie od 0,8 do 1%. Otrzymane fragmenty DNA oczyszczano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

#### **4.4.4 Trawienie enzymami restrykcyjnymi**

Oczyszczone fragmenty DNA otrzymane w wyniku reakcji PCR oraz DNA plazmidowe cięto odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Reakcję prowadzono przez 3 godziny w temperaturze 37°C. W przypadku enzymów ApaI i SmaI, dla których optymalna temperatura działania wynosi 25°C, reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej.

#### **4.4.5 Elektroforeza i oczyszczanie DNA z żelu agarozowego**

Trawione enzymami restrykcyjnymi fragmenty DNA rozdzielano w 0,6-0,8% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny (0,5 µg/ml). Elektroforezę prowadzono w aparacie do elektroforezy poziomej (BioRad, CA, USA) w buforze TAE przy stałym napięciu 70 V przez 60-90 minut. Do próbek przed nałożeniem na żel dodawano bufor obciążający. Jako znacznik wielkości fragmentów DNA stosowano GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Fragmenty DNA rozdzielone na żelu wizualizowano w świetle UV w transiluminatorze InGenius (SynGene Bio Imaging, Wielka Brytania), a następnie wybrane prążki wycinano i oczyszczano z agarozy z wykorzystaniem zestawu do oczyszczania DNA z żelu, GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit zgodnie z zaleceniami producenta.

#### **4.4.6 Pomiar stężenia DNA**

Stężenie DNA oznaczano z wykorzystaniem urządzenia NanoReady FC-2100 (LifeReal, Korea Południowa). W celu określenia czystości DNA oceniano parametry OD 260/280 oraz OD 260/230. Pierwszy z nich wskazuje na czystość analizowanych kwasów nukleinowych pod kątem zawartości białka w próbce, drugi wskazuje na zanieczyszczenia nieorganiczne. Próbkę uznawano za czystą przy OD 260/280 wynoszącym 1,8-2 oraz OD 260/230 większym niż 2.

#### **4.4.7 Ligacja fragmentów DNA**

Oczyszczone z żelu fragmenty DNA łączono ze sobą z wykorzystaniem ligazy T4 – enzymu łączącego wolne końce cząsteczek DNA (tzw. ligacja). Mieszanina reakcyjna zawierała ligazę T4 oraz bufor do ligacji dostarczony przez producenta a także fragmenty DNA w stosunku molarnym 3:1 (wstawka:wektor). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 godziny lub przez noc w temperaturze 16°C. Do transformacji komórek bakteryjnych stosowano 3 µl mieszaniny ligacyjnej.

#### **4.4.8 Oczyszczanie plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej (wg Birnboim i Doly, 1979)**

Zawiesinę hodowli bakteryjnej o objętości 2 ml wirowano (16000 x g) przez 1 minutę. Otrzymany po wirowaniu osad bakteryjny zawieszano w 100 µl roztworu do zawieszania bakterii, a następnie dodawano 200 µl buforu lizującego i prowadzono lizę przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Dodanie do mieszaniny 150 µl buforu precypitującego zatrzymywało lizę i powodowało precypitację białek, ścian komórkowych bakterii oraz genomowego DNA. Po wirowaniu (21130 x g) przez 10 minut w 10°C, otrzymany supernatant zawierający plazmidowe DNA przenoszono do nowych probówek i precypitowano przez dodanie równej objętości alkoholu izopropylowego. Następnie próbki wirowano (21130 x g) przez 5 minut przy w 10°C. Otrzymany osad zawierający plazmidowe DNA przemywano 70% alkoholem etylowym. Otrzymany osad suszono w temperaturze pokojowej i rozpuszczano w 40 µl sterylnej, ultraczystej wody.

#### **4.4.9 Oczyszczanie plazmidowego DNA z zastosowaniem komercyjnego zestawu**

Plazmidowe DNA stosowane do transformacji komórek *Tetrahymena* lub do klonowania oczyszczano na minikolumnach z wykorzystaniem komercyjnego zestawu GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit lub EXTRACTME Plasmid Midi Kit. Po oczyszczeniu stężenie i jakość uzyskanego DNA plazmidowego mierzono przy użyciu spektrofotometru (rozdz. 4.4.6) a następnie przechowywano w temperaturze -20°C.

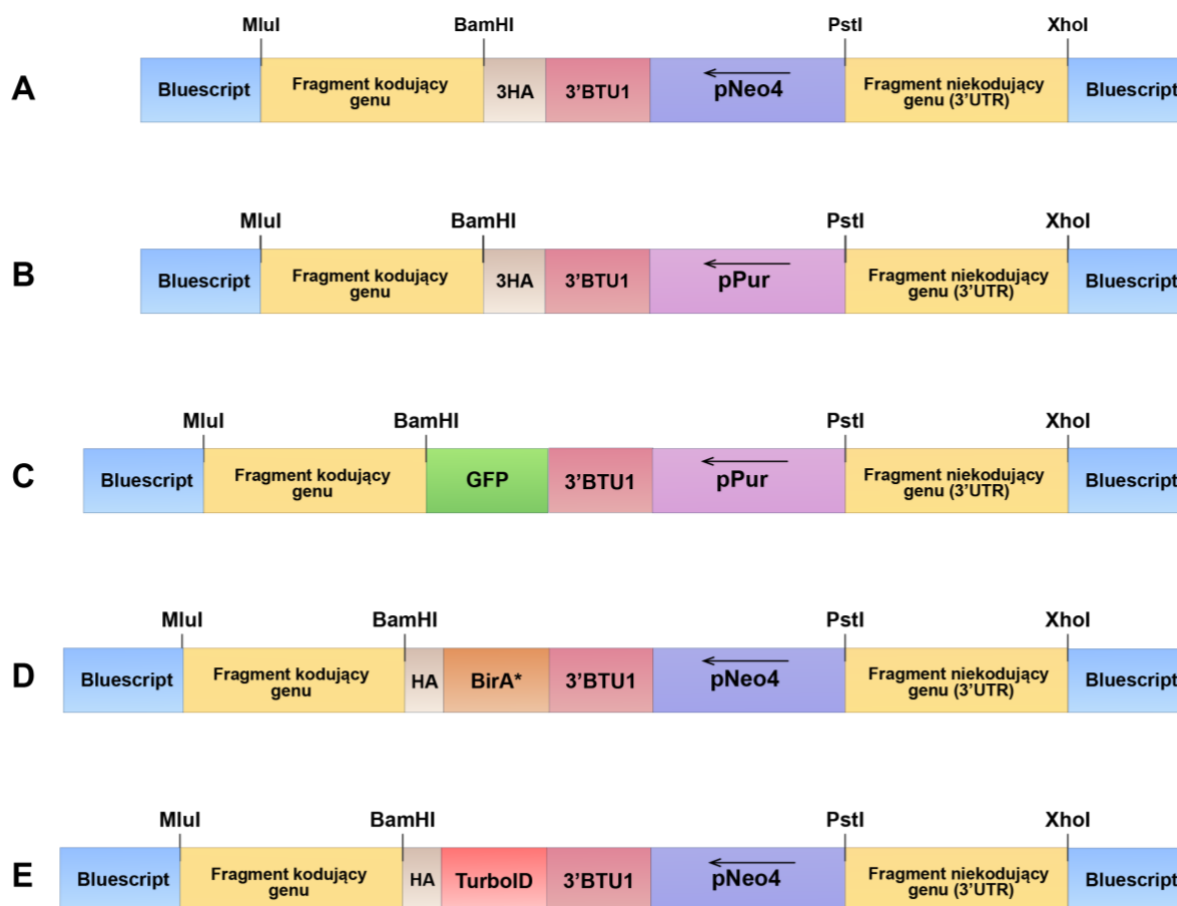


## **4.5 Przygotowanie konstruktów/plazmidów do transformacji komórek *Tetrahymena***

### **4.5.1 Przygotowanie plazmidów umożliwiających produkcję białek fuzyjnych w natywnych *loci* pod kontrolą natywnego promotora z metką dodaną na końcu karboksylowym białka**

W celu uzyskania plazmidów umożliwiających produkcję białek fuzyjnych z dodaną na końcu karboksylowym białka metką 3xHA, GFP, HA-BirA\* lub HA-TurboID, dwa fragmenty DNA o długości około 800 par zasad (pz) powielano z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (rozdz. 4.4.2); jeden to fragment regionu kodującego bez kodonu STOP, drugi to region niekodujący z rejonu 3'UTR (Tabela 6). Startery wykorzystane do reakcji zawierały w swoich sekwencjach fragmenty rozpoznawane przez określone enzymy restrykcyjne tj. dla regionu kodującego MluI i BamHI, a dla regionu niekodującego PstI i XhoI (Tabela 5). Produkty reakcji PCR oczyszczano (rozdz. 4.4.3), trawiono enzymami restrykcyjnymi (rozdz. 4.4.4) i wprowadzono do odpowiedniego plazmidu strawionego tymi samymi enzymami restrykcyjnymi. W doświadczeniach wykorzystano plazmidy: 3xHA-pNeo4 bądź 3xHA-pPur – umożliwiające produkcję białka w fuzji z metką 3xHA, GFP-pPur – umożliwiające produkcję białka w fuzji z metką GFP, HA-BirA\*-pNeo4 – umożliwiające produkcję białka w fuzji z metką HA oraz ze zmutowaną ligazą biotyny BirA\* oraz HA-TurboID-pNeo4 – umożliwiające produkcję białka w fuzji ze zmutowaną ligazą biotyny TurboID charakteryzującej się wyższą aktywnością niż ligaza biotyny BirA\* (Ryc.8).

W sekwencjach wszystkich wykorzystanych plazmidów znajduje się fragment 3'UTR genu *BTUI*, który pełni rolę terminatora transkrypcji, a także kasetę warunkującą oporność na czynnik selekcyjny: pNeo4 – warunkująca oporność na paromomycynę lub pPur – warunkująca oporność na puromycynę. Kasety pNeo4 i pPur umożliwiają selekcję mutantów komórek *Tetrahymena*, w których w wyniku transformacji doszło do wprowadzenia konstruktów do genomu makronuklearnego.



Ryc. 8 Schemat budowy plazmidów umożliwiających produkcję białek fuzyjnych, w komórkach *Tetrahymena*, z przyłączoną na końcu karboksylowym metką: 3HA (A, B), GFP (C), HA-BirA\* (D), HA-TurboID (E) pod kontrolą natywnego promotora w natywnym locus. Kierunek przebiegu transkrypcji (oznaczony strzałką) kasety niosącej oporność na czynnik selekcyjny – pNeo4 lub pPur jest przeciwny do kierunku transkrypcji badanych genów. Fragment kodujący genu bez kodonu STOP oraz fragment niekodujący (3'UTR) umożliwiają zajście rekombinacji homologicznej w natywnym locus. Fragment 3'BTU1 pełni rolę terminatora transkrypcji.

Do transformacji komórek *Tetrahymena* z wykorzystaniem działu biolistycznego (rozd. 4.6.1) użyto 10  $\mu\text{g}$  plazmidowego DNA strawionego uprzednio enzymami restrykcyjnymi MluI i XhoI w celu oddzielenia konstruktu wprowadzanego do makronukleusa *Tetrahymen* od części podstawowej plazmidu, dzięki czemu możliwe było zajście rekombinacji homologicznej i włączenie konstrukt do odpowiedniego locus genomu makronuklearnego.

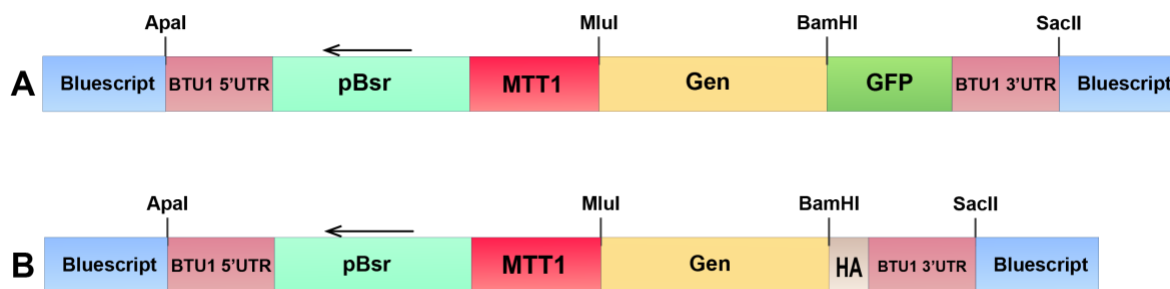
**Tabela 6.** Wielkości fragmentów kodujących i niekodujących 3'UTR genów badanych białek powielonych w reakcji PCR

Nazwa genu	Wielkość fragmentu kodującego (pz)	Wielkość fragmentu niekodującego 3'UTR (pz)
<i>KIF9</i>	844	772
<i>DUSP5</i>	757	840
<i>MAPK3</i>	667	732
<i>MAP2K7</i>	862	960
<i>NEK6</i>	861	833
<i>PP2C</i>	879	710

Przed przystąpieniem do transformacji komórek *Tetrahymena* z wykorzystaniem działu biolistycznego (rozdz. 4.6.1) 10 µg plazmidu trawiono enzymami restrykcyjnymi MluI i SacII w celu pozbycia się części podstawowej plazmidu i jego linearyzacji.

#### **4.5.2 Przygotowanie plazmidów umożliwiających nadprodukcję białek z przyłączoną na końcu karboksylowym białka metką HA lub GFP w locus BTU1**

W celu uzyskania plazmidów umożliwiających nadprodukcję wybranych białek w fuzji z metką HA lub metką GFP na końcu karboksylowym białka, powielono cały region kodujący genów: *KIF9* (2818 pz), *DUSP5* (1338 pz), *MAPK3* (2213 pz), *MAP2K7* (1407 pz), *NEK6* (3525 pz) i *PP2C* (879 pz) z wykorzystaniem starterów zawierających w swojej sekwencji fragmenty rozpoznawane przez endonukleazy MluI i BamHI (Tabela 3). Powielone geny oraz plazmidy pBsr-HA, pBsr-GFP (Ryc. 9) cięto wyżej wymienionymi enzymami restrykcyjnymi (rozdz. 4.4.4) i ligowano ze sobą (rozdz. 4.4.7). Oba plazmidy zawierały kasetę pBsr, w której sekwencji znajdował się promotor *H4*, region kodujący genu warunkującego odporność na blastycydynę oraz terminator *BTU2*. W obu plazmidach nadprodukcja białka kontrolowana była przez zależny od jonów kadmu promotor *MTT1*, a fragmenty BTU1 5'UTR i BTU1 3'UTR umożliwiły zajście rekombinacji homologicznej w niekoniecznym do życia locus *BTU1* w genomie makronuklearnym *Tetrahymena*.



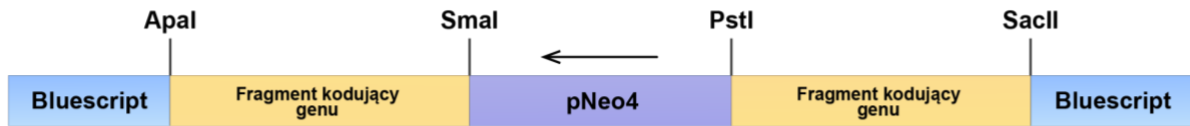
Ryc. 9 Schemat plazmidów umożliwiających nadprodukcję białka w komórkach *Tetrahymena*, z metką GFP (A) lub HA (B) na końcu karboksylowym pod kontrolą promotora *MTT1* z kasetą *pBsr* zawierającą gen warunkujący oporność na blastycydynę. Fragmenty genu *BTU1* – 5'UTR oraz 3'UTR umożliwiają zajście rekombinacji homologicznej w locus *BTU1*. Kierunek transkrypcji (oznaczony strzałką) kasety *pBsr*, warunkującej oporność na czynnik selekcyjny jest odwrotny do kierunku transkrypcji badanego genu.

Przed transformacją komórek *Tetrahymena* z wykorzystaniem działła biolistycznego (rozdz. 4.6.1) 10 µg plazmidu trawiono enzymami restrykcyjnymi *ApaI* i *SacII* w celu linearyzacji plazmidu i oddzielenia części podstawowej plazmidu od konstrukt. W przypadku plazmidu *pBsr-GFP* z fragmentem genu kodującego białko *Dusp5*, konstrukt wprowadzono zarówno do komórek *Tetrahymena* szczepu dzikiego *Cu428* jak i komórek z delecją genu kodującego to białko (knock-out, KO) w celu przeprowadzenia doświadczenia typu „rescue” (rozdz. 4.6.5).

#### 4.5.3 Przygotowanie plazmidu umożliwiającego usunięcie fragmentu genu (ang. germline Knock-Out, KO) (wg Cassidy-Hanley i wsp., 1997)

Mutanty *Tetrahymena* z delecją genu uzyskuje się przez usunięcie fragmentu kodującego genu o wielkości około 1000-1500 pz i wprowadzenie w to miejsce kasety warunkującej oporność na czynnik selekcyjny – najczęściej paromomycynę (Dave i in., 2009). Aby uzyskać konstrukty umożliwiające unieczynnienie genu *DUSP5* powielono jego dwa fragmenty o długości około 1500 pz, znajdujące się od siebie w odległości około 1000 pz. Fragmenty powielono w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów zawierających sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez endonukleazy *ApaI* i *SmaI* dla fragmentu 5' oraz *PstI* i *SacII* dla fragmentu 3' (Tabela 5). Plazmid (Ryc. 10) oraz fragmenty 5' i 3' po oczyszczeniu trawiono odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (rozdz. 4.4.4) i ligowano (rozdz. 4.4.7) dwustopniowo do plazmidu *pNeo4*, jeden powyżej, drugi poniżej kasety *pNeo4*. Przed przystąpieniem do transformacji biolistycznej 80 µg plazmidu cięto enzymami *ApaI* i *SacII*

celem linearyzacji plazmidu i oddzielenia jego części podstawowej od konstrukt. Konstrukt wprowadzano do koniugujących komórek *Tetrahymena* szczepów Cu428 i B2086 znajdujących się na etapie mejozy.



Ryc. 10 Schemat budowy plazmidu umożliwiającego usunięcie fragmentu regionu kodującego genu w komórkach *Tetrahymena*. Fragmenty kodujące badanego genu umożliwiają zajście rekombinacji homologicznej. Kierunek transkrypcji kasety pNeo4 (oznaczony strzałką), warunkującej oporność na czynnik selekcyjny, jest przeciwny do kierunku transkrypcji wklonowanych fragmentów badanego genu.

## 4.6 Wytwarzanie mutantów *Tetrahymena thermophila*

### 4.6.1 Transformacja somatyczna komórek *Tetrahymena thermophila*

Transformację somatyczną głodzonych komórek *Tetrahymena* (rozd. 4.2) przeprowadzano z wykorzystaniem działa biolistycznego PDS1000/He (BioRad, USA). Bezpośrednio przed przeprowadzeniem transformacji biolistycznej przygotowane i pocięte odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi plazmidy (rozd. 4.4), wiązano do cząstek złota koloidalnego o średnicy 0,6  $\mu\text{m}$  (BioRad, USA) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Zgłodzone komórki *Tetrahymena* wirowano, osad komórek nanoszono na sterylną bibułę filtracyjną i poddawano transformacji biolistycznej polegającej na wprowadzeniu do genomu makronuklearnego komórek *Tetrahymena* będących w częściowej próżni, cząsteczek złota z plazmidowym DNA pod wpływem siły (ciśnienie 1100 psi) uwolnionej przez przerwanie tzw. dysku (ang. *rupture disc*) według protokołu dostarczonego przez producenta.

#### 4.6.1.1 Selekcja mutantów *Tetrahymena thermophila* z konstrukt wprowadzonym do genomu makronuklearnego do natywnego *locus* genu

Selekcję mutantów *Tetrahymena* zdolnych do produkcji białek fuzyjnych pod kontrolą natywnego promotora możliwa jest dzięki obecności kasety (pNeo4 lub pPur) w sekwencji przygotowanych konstruktów. Kasety powoduje oporność na wybrany antybiotyk. Po przeprowadzeniu transformacji biolistycznej komórki umieszczone na bibule filtracyjnej przenoszono do pożywki SPP i hodowano zależnie od rodzaju kasety użytej do selekcji. Kasety pNeo4 oraz pPur zawiera promotor *MTT1*, którego aktywność zależy od obecności jonów

kadm w pożywce (2,5 µg/ml CdCl<sub>2</sub>). Komórki hodowano w temperaturze 30°C bez wytrząsania przez 3 h (pNeo4) bądź 12-14 h (pPur) w pożywce z dodatkiem jonów kadmu. Po tym czasie do komórek dodawano czynnik selekcyjny (antybiotyk) – paromomycynę w stężeniu 100 µg/ml (pNeo4) bądź puromycynę w stężeniu 200 µg/ml (pPur). Po 3 dniach hodowli w temperaturze 30°C na płytkach 96-dołkowych, komórki wykazujące oporność na czynnik selekcyjny przenoszono na nowe płytki i hodowano przez około 14 dni, codziennie przenosząc około 2 µl komórek do 100 µl świeżej pożywki. W przypadku kasety pNeo4 stopniowo zwiększano stężenie paromomycyny (do 1200 µg/ml) w pożywce, jednocześnie stopniowo obniżając stężenie jonów kadmu (do 0,1 µg/ml). Z kolei w przypadku kasety pPur stosowano stałe stężenie puromycyny (200 µg/ml) i obniżano stężenie jonów kadmu (do 0,1 µg/ml). Takie prowadzenie hodowli umożliwiło selekcję i promowało wzrost komórek z większą liczbą kopii wprowadzonego transgenu w genomie makronuklearnym.

#### **4.6.1.2 Selekcja mutantów *Tetrahymena thermophila* zdolnych do nadprodukcji białek**

Komórki *Tetrahymena* zdolne do nadprodukcji badanego białka z dołączoną na końcu karboksylowym metką GFP bądź HA uzyskiwano poprzez wprowadzenie konstruktów do niekońiecznego do życia *locus BTUI*, gdzie produkcja białka zachodziła pod kontrolą aktywowanego jonami kadmu promotora *MTT1*. Konstrukty, które zawierały w swojej sekwencji kasetę pBsr (warunkującą oporność na blastycydynę) wprowadzano do komórek szczepu dzikiego Cu428 za pomocą transformacji biolistycznej (ciśnienie 1100 psi), po czym transformowane komórki przenoszono do pożywki SPP. Po 12-14 h dodawano do hodowli czynnik selekcyjny – blastycydynę w stężeniu 60 µg/ml, i hodowano przez 3 dni w 30°C. Następnie komórki odporne na czynnik selekcyjny przeszczepiano stosując wzrastające stężenie antybiotyku (do 120 µg/ml).

#### **4.6.2 Transformacja i selekcja komórek *Tetrahymena thermophila* z delecją badanego genu w genomie mikronuklearnym i makronuklearnym**

Mutanty *Tetrahymena* z delecją wybranego genu zarówno w genomie mikronuklearnym jak i makronuklearnym otrzymywano poprzez wprowadzenie konstruktów (rozdz. 4.5.3) do genomu mikronukleusa w trakcie wczesnych etapów mejozy podczas koniugacji komórek dwóch szczepów typu dzikiego, Cu428 i B2086. W tym celu zgłodzone komórki szczepów dzikich o podobnej gęstości mieszano w stosunku 1:1. Komórki dwóch szczepów łączono ze sobą 2; 2,5; 4 i 4,5 godziny przed transformacją i hodowano w 30°C bez wytrząsania,

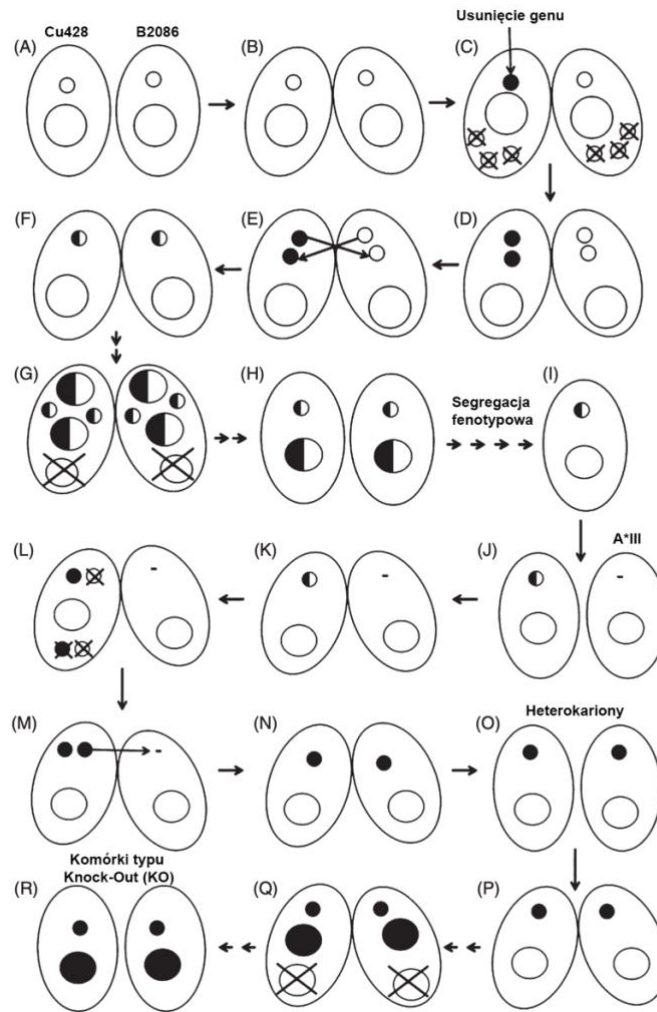
co umożliwiło rozpoczęcie koniugacji. Bezpośrednio przed transformacją komórki ze wszystkich czterech hodowli mieszano i wirowano, a osad komórek nanoszono na sterylną bibułę filtracyjną i poddawano czterokrotnie transformacji biolistycznej przy ciśnieniu 1800 psi w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wprowadzenia konstruktów do genomu mikronuklearnego. Po transformacji komórki przenoszono do 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 i hodowano przez noc w 30°C bez wytrząsania, aby umożliwić ukończenie procesu koniugacji, po czym przenoszono do pożywki SPP z dodatkiem 2,5 µg/ml CdCl<sub>2</sub> w celu pobudzenia promotora *MTT1* znajdującego się w kasecie warunkującej oporność na paromomycynę. Po 2 godzinach do pożywki dodawano paromomycynę o końcowym stężeniu 100 µg/ml, przenoszono komórki na płytki 96-dółkowe (po 100 µl komórek na dołek) i hodowano 3 dni w 30°C. Komórki wykazujące oporność na paromomycynę przenoszono do nowych płytek 96-dółkowych zawierających pożywkę SPP z dodatkiem 6-metylpuryny (6-MP) w stężeniu 15 µg/ml i hodowano przez kolejne 2-3 dni. W mikronukleusie komórek szczepu Cu428 znajduje się gen warunkujący oporność na 6-MP. W trakcie prawidłowo przebiegającej koniugacji gen ten przekazywany jest do nowoutworzonych jąder obu koniugujących partnerów. Oporność zarówno na paromomycynę jak i 6-metylpurynę wskazuje, że komórki prawidłowo przeszły proces koniugacji, a ich nowy makronukleus powstał w wyniku rearanżacji genomowego DNA mikronukleusa, do którego w wyniku transformacji wprowadzony został konstrukt z genem oporności na paromomycynę.

#### **4.6.3 Otrzymanie mutantów z delecją badanego genu w genomie mikronuklearnym i makronuklearnym – krzyżówki genetyczne**

W wyniku transformacji mikronukleusa, uzyskuje się heterozygotę zawierającą jeden allel normalny i jeden zmutowany poprzez wstawienie konstruktów. Aby uzyskać homozygotę niezbędne jest przeprowadzenie serii krzyżówek. W tym celu klony które wykazywały oporność zarówno na paromomycynę jak i 6-metylpurynę przenoszono do pożywki SPP i przeszczepiano przez kolejne 14 dni, przenosząc 2 µl komórek do 100 µl świeżej pożywki SPP. Po około 80 podziałach komórki osiągały dojrzałość płciową, a niektóre z nich w wyniku zachodzącej podczas podziałów amitotycznych segregacji chromosomów w makronukleusie, traciły gen warunkujący oporność na paromomycynę (w takich komórkach gen z wprowadzonym konstruktem obecny jest tylko w diploidalnym mikronukleusie). Komórki wrażliwe na paromomycynę (pokolenie G1) koniugowano z komórkami szczepu typu dzikiego

Cu427, które w mikronukleusie posiadają dwa identyczne allele genu *CHX1*, warunkującego oporność na cykloheksymid (CHX). Po około 7,5 godzinach od rozpoczęcia koniugacji, pojedyncze pary komórek przenoszono do kropeł pożywki SPP i hodowano 2 dni w 30°C. Wszystkie kolonie ekskoniugantów powstałe w wyniku skrzyżowania komórek pokolenia G1 z komórkami szczepu Cu427 wykazywały oporność na cykloheksymid a połowa z nich również na paromomycynę. Oporność na cykloheksymid wskazała, że komórki pokolenia G1 osiągnęły dojrzałość płciową i prawidłowo przechodzą proces koniugacji, a oporność na paromomycynę, że wprowadzony konstrukt przekazywany jest podczas koniugacji do komórek ekskoniugantów. W kolejnym etapie komórki pokolenia G1 koniugowano z komórkami szczepu A\*III. Szczep ten posiada aneuploidalny mikronukleus niezdolny do utworzenia haploidalnych produktów mejozy w procesie koniugacji. W trakcie koniugacji płodnego szczepu pokolenia G1 z komórkami A\*III, dochodzi do degradacji poronnych produktów mejozy w komórce szczepu A\*III a w komórce pokolenia G1 jeden z produktów mejozy przechodzi mitozę a następnie transportowany jest do komórki szczepu A\*III i w obu koniugantach przechodzi diploidyzację a makronukleus nie podlega degradacji. Uzyskane ekskoniuganty posiadają więc „nowy” homozygotyczny mikronukleus i różny pod względem genetycznym „przedkoniugacyjny” makronukleus (są heterokarionami). Po 7 godzinach od rozpoczęcia koniugacji pomiędzy komórkami G1 i A\*III, pojedyncze pary komórek przenoszono do kropeł pożywki SPP a następnie, gdy komórki rozdzieliły się, jedną z komórek przenoszono do osobnej kropli. W ten sposób uzyskiwano pary heterokarionów, które następnie w wyniku koniugacji ze sobą dawały pokolenie komórek posiadających homozygotyczny mikronukleus i nowy, utworzony w wyniku jego rearanżacji makronukleus. Uzyskane ekskoniuganty, mutanty typu knock-out (KO), posiadały jedynie zmutowane, niefunkcjonalne allele badanego genu zarówno w genomie mikronuklearnym jak i makronuklearnym (Ryc.11). Fenotyp komórek KO (np. tempo pływania, wzór bicia rzęsek) jest spowodowany brakiem białka kodowanego przez unieczynniony gen.





Ryc. 11 Schemat uzyskiwania komórek *Tetrahymena* typu knock-out (KO) – z delecją fragmentu badanego genu w genomie mikro- i makronuklearnym. (A-B) Łączenie się w pary komórek odmiennych typów płciowych. (C) Podział mejotyczny mikronukleusa – moment wprowadzenia konstrukt, degradacja trzech z powstałych jąder mejotycznych w tylnej części komórki. (D) Mitoza prezygotyczna pozostałego jądra mejotycznego prowadząca do powstania przedjądrzy: migracyjnego i stacjonarnego. (E) Wymiana przedjądrzy migracyjnych pomiędzy koniugującymi partnerami i (F) fuzja z przedjądrzem stacjonarnym – utworzenie diploidalnych jąder zygotycznych. (G) Nowe mikro- i makronukleusy powstałe w wyniku podziałów mitotycznych jądra zygotycznego, zawierające zmutowany allel (jeden w mikronukleusie i połowę spośród ok 45 w makronukleusie); jednoczesna stopniowa degradacja starego makronukleusa. (H) Ekskoniuganty. (I) Segregacja fenotypowa komórek. W trakcie kolejnych podziałów komórek dochodzi do segregacji chromosomów w amitotycznie dzielących się makronukleusach i utraty genu z delecją w niektórych komórkach; gen z delecją nadal obecny w mikronukleusie. (J-O) Koniugacja ze szczepem A\*III posiadającym aneuploidalny mikronukleus, uzyskanie heterokarionów – komórek posiadających homozygotyczny pod względem wprowadzonego konstrukt mikro- i makronukleusa i zachowany „stary” przedkoniugacyjny makronukleus. (P-R) Koniugacja heterokarionów w wyniku której otrzymane komórki potomne posiadają homozygotyczny pod względem wprowadzonego konstrukt mikro- i makronukleusa. (Dave i in., 2009, zmodyfikowano).

#### 4.6.4 Weryfikacja delecji fragmentu genu w mutantach knock-out

Aby potwierdzić, że otrzymane mutanty mają usunięty fragment badanego genu oczyszczano genomowe DNA, a następnie przeprowadzano reakcję PCR. Do reakcji PCR wykorzystywano startery (Tabela 5), które zaprojektowano tak, by jeden z nich był komplementarny do fragmentu genu, który został usunięty, a dwa pozostałe komplementarne do zachowanych sekwencji badanego genu (5' i 3' w stosunku do pozycji usuniętego fragmentu). W wyniku reakcji PCR, w przypadku mutantu typu knock-out, fragment powielony z wykorzystaniem dwóch starterów komplementarnych do zachowanych sekwencji genu, jest większy (fragment ten obejmuje kasetę pNeo4 mającą 2000 pz, która zastąpiła usunięty, mający około 800 pz fragment genu) niż w przypadku, gdy jako matrycę użyto genomowe DNA oczyszczone z komórek szczepu dzikiego. W przypadku użycia startera komplementarnego do usuniętego fragmentu genu, produkt PCR jest tworzony tylko w przypadku użycia DNA z komórek szczepu dzikiego jako matrycy. Równolegle prowadzono reakcję PCR bez matrycowego DNA (kontrola czystości odczynników).

#### 4.6.5 Doświadczenie typu *rescue*

W celu weryfikacji czy obserwowany fenotyp mutantów typu knock-out wynika jedynie z usunięcia fragmentu badanego genu, przeprowadzono doświadczenie typu *rescue*. Do komórek DUSP5-KO wprowadzono za pomocą transformacji biolistycznej konstrukt umożliwiający produkcję białka fuzyjnego Dusp5-GFP w niekoniecznym do życia locus *BTUI* (rozdz. 4.5.2). Przywrócenie fenotypu charakterystycznego dla komórek szczepu typu dzikiego potwierdzało, że fenotyp uzyskanych mutantów typu KO związany był wyłącznie z delecją fragmentu genu *DUSP5*.

### 4.7 Analiza fenotypu mutantów *Tetrahymena*

#### 4.7.1 Tempo proliferacji

Mutanty *Tetrahymena* DUSP5-KO, KIF9-KO oraz komórki szczepu typu dzikiego Cu428 hodowano do osiągnięcia przez hodowlę fazy wzrostu logarytmicznego w pożywce SPP, a następnie rozcieńczano do gęstości  $2 \cdot 10^4$  komórek/ml. Komórki hodowano w temperaturze 30°C bez wytrząsania, a gęstość hodowli określano co 3 godziny. W celu oceny

gęstości hodowli pobierano 90  $\mu$ l komórek, które utrwalano z użyciem 10  $\mu$ l 10% kwasu trichlorooctowego (TCA) a następnie zliczano z wykorzystaniem komory Bürkera.

#### **4.7.2 Tempo fagocytozy**

Analizę tempa fagocytozy, czyli tempa tworzenia nowych wodniczek pokarmowych w komórkach *Tetrahymena* - mutantach DUSP5-KO, KIF9-KO oraz komórkach szczepu typu dzikiego Cu428 – przeprowadzano poprzez dodanie do hodowli tuszu kreślarskiego o końcowym stężeniu 0,2%. Obecność tuszu w pożywce powoduje, że nowoutworzone wodniczki są ciemne, co umożliwia ich policzenie. Komórki z hodowli w fazie wzrostu logarytmicznego hodowano w pożywce z dodatkiem tuszu przez 10 minut w temperaturze 30°C bez wytrząsania. Następnie komórki utrwalano 2% paraformaldehydem a nowoutworzone wodniczki liczone w przynajmniej 100 komórkach z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym Leitz Orthoplan (Niemcy).

#### **4.7.3 Rejestracja torów ruchu komórek**

Tory ruchów komórek *Tetrahymena* rejestrowano z wykorzystaniem mikroskopu Zeiss Discover V8 steREO (Zeiss, Niemcy) oraz programu ZEN dołączonego przez producenta. Komórki z hodowli w fazie wzrostu logarytmicznego rozcieńczano w około 600  $\mu$ l pożywki SPP na płycie 12-dołkowej, do osiągnięcia gęstości około  $0,5 \cdot 10^4$  komórek/ml. Taka gęstość umożliwiała śledzenie początku i końca trajektorii pojedynczej komórki. W przypadku komórek typu *rescue* dla mutantów DUSP5-KO oraz komórek zdolnych do nadprodukcji badanych białek do pożywki dodawano 2,5  $\mu$ g/ml  $\text{CdCl}_2$  w celu pobudzenia promotora *MTTI* i produkcji białka (rozdz. 4.6.5). Tory ruchu komórek rejestrowano przy otwarciu przesłony na 3 s, otrzymując obraz jasnych torów na ciemnym tle. Dla każdego badanego szczepu wykonywano zdjęcia umożliwiające zmierzenie długości co najmniej 100 trajektorii. Długość torów ruchu mierzono z wykorzystaniem programu Fiji ImageJ.

#### **4.7.4 Pomiar długości rzęsek**

Komórki *Tetrahymena* szczepu dzikiego Cu428 oraz mutantów utrwalano i znakowano przeciwciałem przeciwko  $\alpha$ -tubulinie (12G10) oraz przeciwciałem przeciwko poliglicylowanej tubulinie (Tabela 2). Następnie komórki obrazowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Leica SP8 (Dostępny w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych). Długość rzęsek mierzono w programie Fiji ImageJ – mierzono co najmniej 100 rzęsek.

#### 4.7.5 Tempo regeneracji rzęsek

Komórki *Tetrahymena* z hodowli w fazie wzrostu logarytmicznego –  $2-2,5 \cdot 10^4$  komórek/ml (5 ml), wirowano i przepłukiwano roztworem 10 mM Tris-HCl pH 7,4, a następnie zawieszano w 900  $\mu$ l 10% roztworu Ficoll 400 pH 4,2 i przepuszczano pięciokrotnie w ciągu 1 minuty przez strzykawkę z igłą o grubości 21G. W wyniku szoku pH oraz działania siły mechanicznej, komórki *Tetrahymena* tracą rzęski. W celu umożliwienia ich regeneracji komórki przenoszono do pożywki SPP (w takiej ilości by roztwór Ficoll 400 rozcieńczyć 100x) i hodowano bez wytrząsania przez 2 godziny w 30°C. Tuż po odrznięciu (0 min) oraz po 30, 60 i 120 minutach pobierano 10  $\mu$ l komórek i mieszano z równą objętością roztworu permeabilizującego i utrwalającego (1% NP-40, 4% PFA w buforze PHEM) a następnie znakowano przeciwciałem przeciwko  $\alpha$ -tubulinie (12G10) (Tabela 2).

#### 4.7.6 Rejestracja ruchu rzęsek

Ruch rzęsek mutantów DUSP-KO, KLP1-KO oraz komórek szczepu typu dzikiego Cu428 analizowano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego AXIO Imager M2 wyposażonego w obiektyw immersyjny 63x oraz kamerę szybkoklatkową Phantom Miro C110. Komórki hodowano do momentu osiągnięcia przez hodowlę fazy wzrostu logarytmicznego ( $2-2,5 \cdot 10^5$  komórek/ml) a następnie rejestrowano ruch rzęsek w rozdzielności 1280x1024 przy 900 klatkach/s i ekspozycji 1100 sekund. Dalszą analizę prowadzono w programie Fiji ImageJ gdzie otrzymane obrazy konwertowano na filmy odtwarzane z szybkością 10 klatek/s, oraz w programie Adobe Photoshop CC.

### 4.8 Metody biochemiczne

#### 4.8.1 Oczyszczanie białek rzęskowych

Białka rzęskowe komórek *Tetrahymena* oczyszczano komórek z hodowli w fazie wzrostu logarytmicznego ( $2-2,5 \cdot 10^5$  komórek/ml) o minimalnej objętości 200 ml. Komórki wirowano (1609 x g) przez 3 minuty a po przepłukaniu roztworem 10 mM Tris-HCl pH 7,4 zawieszano w 40 ml buforu do odrznięcia i przenoszono do kolb stożkowych. Delikatnie mieszając do zawiesiny komórek dodawano 840  $\mu$ l 0,5 M kwasu octowego, po czym po 90 s kwaśne środowisko neutralizowano przez dodanie 720  $\mu$ l 0,6 M wodorotlenku potasu. Szok pH powoduje, że komórki tracą rzęski, a proces ten dodatkowo wspomagany jest poprzez działanie sił mechanicznych spowodowanych mieszaniem. Po odrznięciu komórki dwukrotnie

wirowano przez 5 minut (1720 x g) w 4 °C w celu oddzielenia frakcji rzęskowej od pozbawionych rzęsek ciał komórek. Nadsącz zawierający rzęski wirowano przez 30 minut (21200 x g) w 4°C w celu zebrania frakcji rzęskowej. Osad rzęsek przepłukiwano około 500 µl buforu do odrzęsiania zawierającego inhibitory proteaz, po czym ponownie wirowano przez 20 minut (21200 x g) w 4°C. Uzyskany osad rzęskowy zamrażano w -80°C lub zawieszano ponownie w buforze do odrzęsiania z 1x stężonymi inhibitorami proteaz i mierzono stężenie białka z wykorzystaniem metody BCA (rozdz. 4.8.2) i procesowano dalej.

#### **4.8.2 Pomiar stężenia białka z wykorzystaniem kwasu bis-cynchoniniowego (BCA)**

Pomiaru stężenia białka w przygotowanych próbkach dokonywano z wykorzystaniem zestawu Pierce BCA Protein Assay Kit zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta, z wykorzystaniem urządzenia EnSpire Multimode plate 67 Reader (PerkinElmer, USA) przy długości fali 562 nm. Do przygotowania krzywej standardowej używano seryjnych rozcieńczeń albuminy surowicy bydlęcej (BSA) o znanym stężeniu. Przygotowane ekstrakty białkowe o nieznanym stężeniu rozcieńczano 10-krotnie przed pomiarem.

#### **4.8.3 Elektroforeza SDS-PAGE – rozdział białek w warunkach denaturujących**

W celu rozdzielania białek według ich masy cząsteczkowej przeprowadzano elektroforezę w warunkach denaturujących SDS-PAGE. Uzyskane ekstrakty białkowe (2-40 µg) denaturowano poprzez dodanie pięciokrotnie stężonego buforu Laemmliego i inkubowano w 95°C przez 5 minut. Próbki oraz komercyjnie dostępny standard wielkości białek PageRuler (zakres 10-180 kDa) nakładano na żel poliakryloamidowy (4% żel zagęszczający i 10% żel rozdzielający) o grubości 1 mm. Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w buforze do elektroforezy przy użyciu aparatu Mini-Protean II (Bio-Rad, USA) przy napięciu 90 V w żelu zagęszczającym i 200 V w żelu rozdzielającym. Rozdzielone elektroforetycznie białka: (i) przenoszono na membranę nitrocelulozową (rozdz. 4.8.4), (ii) barwiono azotanem srebra (rozdz. 4.8.5) lub (iii) barwiono przy użyciu komercyjnego zestawu do detekcji fosforylowanych białek (rozdz. 4.8.6).

#### **4.8.4 Detekcja białek metodą Western blot**

Białka rozdzielone elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym (rozdz. 4.8.3) przenoszono na membranę nitrocelulozową z wykorzystaniem aparatu Mini Trans-Blot (Bio-Rad, USA), (Towbin i in., 1979). Transfer prowadzono przez 70-90 minut w schłodzonym do około 4-8°C buforze do transferu przy stałym natężeniu prądu 160 mA. Aby ocenić wydajność transferu białek, membranę barwiono roztworem Ponceau S, po czym wypłukiwano barwnik roztworem TBST. Membranę blokowano przez 60 minut w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST (w temperaturze pokojowej) w celu zminimalizowania niespecyficznego wiązania przeciwciał do membrany nitrocelulozowej. Następnie membranę inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednim przeciwciałem I-rzędowym (Tabela 2), 4-krotnie płukano roztworem TBST i inkubowano z odpowiednim przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (Tabela 2) w temperaturze pokojowej przez 60-90 min. Wszystkie przeciwciała rozcieńczano w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w TBST. Po inkubacji z przeciwciałem II-rzędowym membranę płukano 3-krotnie roztworem TBST i jednokrotnie roztworem TBS. Każde płukanie trwało 10 minut.

W przypadku detekcji biotynylowanych białek membranę po transferze blokowano przez noc w 3% roztworze BSA w 4°C, po całonocnej inkubacji przez 3 godziny inkubowano ze streptawidyną skoniugowaną z peroksydazą chrzanową (Tabela 2) i płukano tak jak opisano powyżej.

Wyznakowane białka uwidaczniiano stosując metodę immunochemiczną przy użyciu zestawu do chemiluminescencji Westar ηC Ultra 2.0 i aparatu G:Box (Syngene, Wielka Brytania) z oprogramowaniem GeneSys.

#### **4.8.5 Detekcja białek z wykorzystaniem azotanu srebra**

Po rozdziale białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (rozdz. 4.8.3), żel utrwalano 45-60 minut w roztworze zawierającym 5% kwas octowy i 50% metanol. Po utrwaleniu żel przepłukiwano w 50% metanolu a następnie w wodzie destylowanej. Następnie żel inkubowano 3 minuty w przygotowanym na świeżo 0,02% tiosiarczanie sodu i przemywano dwukrotnie w wodzie destylowanej. Srebrzenie prowadzono w ciemności przez 30-45 minut poprzez inkubację ze świeżo przygotowanym 0,15% roztworze azotanu srebra, po czym ponownie dwukrotnie płukano wodą destylowaną. Wysrebrzone białka uwidaczniiano poprzez dodanie roztworu zawierającego 0,04% formalinę i 2% wodorowęglan sodu. Po pojawieniu się prążków białek, reakcję zatrzymywano poprzez przeniesienie żelu do 5%

roztworu kwasu octowego. Żel przechowywano w roztworze zawierającym 1% kwas octowy i 10% metanol.

#### **4.8.6 Detekcja fosforylowanych białek w żelu poliakryloamidowym**

Fosforylowane białka rozdzielone przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE w żelu poliakryloamidowym (rozdz. 4.8.3) wykrywano konstrukty z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu Pro-Q™ Diamond Phosphoprotein Gel Stain. Procedurę prowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta a wizualizację fosforylowanych białek z wykorzystaniem aparatu G:Box (Syngene, Wielka Brytania) z oprogramowaniem GeneSys.

### **4.9 Badanie oddziaływań między białkami**

#### **4.9.1 Identyfikacja białek zlokalizowanych w pobliżu badanego białka (ang. proximity labeling assay), metoda BioID**

W celu zidentyfikowania białek znajdujących się w najbliższej odległości (nie więcej niż 10 nm) od badanych białek (a wśród nich potencjalnych partnerów badanych białek) wykorzystano metodę BioID polegającą na biotynylowaniu i detekcji białek znajdujących się w sąsiedztwie badanego białka (Roux i in., 2012). W tym celu przygotowano mutanty *Tetrahymena* (rozdz. 4.5.1) produkujące badane białka jako białka fuzyjne ze zmutowaną ligazą biotyny BirA\* lub TurboID. Ligazy te w obecności biotyny przyłączają jej cząsteczki do reszt aminokwasowych lizyny znajdujących się w pobliżu białek. Ligaza BirA\* i TurboID różnią się od siebie wydajnością biotynylacji (Branon i in., 2018). Biotynylowane białka oczyszcza się na złożu skoniugowanym ze streptawidyną, a następnie poddaje analizie spektrometrii mas.

Komórki *Tetrahymena* produkujące badane białka w fuzji z metką HA-BirA\* lub HA-TurboID na końcu karboksylowym oraz komórki szczepu typu dzikiego Cu428 z hodowli w fazie wzrostu logarytmicznego głodzono w buforze Tris-HCl pH7,4. Po ok 16-18 godzinach inkubacji w 30°C z wytrząsaniem 80 rpm do hodowli dodawano 50 µM biotynę i inkubowano przez 4 godziny w przypadku ligazy BirA\* lub 30 minut w przypadku ligazy TurboID. Po inkubacji z biotyną oczyszczano frakcję rzęskową (rozdz. 4.8.1) a uzyskany osad rzęskowy, zawieszano w buforze do odrzężania z dodatkiem 1% NP-40 i dwukrotnie stężonymi inhibitorami proteaz i inkubowano 5 minut w lodzie w celu usunięcia błony rzęskowej i biotyny niezwiązanej z białkami. Odbłonione rzęski (aksonemy) wirowano (21110 x g) w 4°C przez 15 minut, osad przepłukiwano buforem do odrzężania zawierającym 1-krotnie stężone

inhibitory proteaz (celem usunięcia resztek detergentu NP-40) i ponownie wirowano. Otrzymany osad, zawierający odbłonione rzęski, poddawano lizie w 200  $\mu$ l buforu lizującego (rozdz. 3.11) w temperaturze pokojowej przez 60 minut po czym wirowano (8000 x g) w 4 °C przez 10 minut, zbierano supernatant i mierzono stężenie białka BU metodą BCA (rozdz. 4.8.2). Na uprzednio kondycjonowane złoża magnetyczne pokryte streptawidyną (100  $\mu$ l) наносono 800  $\mu$ g oczyszczonych białek rzęskowych rozcieńczonych czterokrotnie za pomocą 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Próbkę białka inkubowano przez noc w 4°C na kołyszce laboratoryjnej. Następnie złożo płukano 6-krotnie w tym samym roztworze w celu usunięcia niezwiązanych ze złożem białek. Próbkę zawieszano w 100  $\mu$ l buforu Laemmliego niezawierającego błękitu bromofenolowego, denaturowano białka przez 5 minut w 95°C i pobierano roztwór z dna złoża zawierający oderwane białka. Białka oczyszczano i zatężano z wykorzystaniem zestawu ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit postępując według procedury dostarczonej przez producenta z tym wyjątkiem, że końcowo precipitat białek zawieszano w 50 mM wodorowęglanie amonu.

Detekcję biotynylowanych białek prowadzono przy użyciu metody Western blot (rozdz. 4.8.4). Na żel poliakryloamidowy nakładano 10% uzyskanej próbki. Pozostałą część próbki przekazywano do analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas znajdującym się w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

#### **4.9.2 Modyfikacja metody BioID**

Do doświadczeń użyto mutanty *Tetrahymena*, w których jednocześnie zachodziła produkcja dwóch różnych białek fuzyjnych: Spef2A-HA-TurboID oraz badanego białka z metką GFP (X-GFP). Produkcja badanego białka z metką GFP umożliwiała sprawdzenie czy znajduje się ono wśród biotynylowanych białek, które zostały związane do złoża, a tym samym czy białko X-GFP znajduje się w najbliższym sąsiedztwie białka Spef2A. Procedura przebiegała tak samo jak opisano powyżej z tym wyjątkiem, że 200  $\mu$ g próbki białka nakładano na 25  $\mu$ l złoża streptawidynowego. Ponadto po całonocnej inkubacji i płukaniu złoża w celu usunięcia niezwiązanych białek, próbkę zawieszano w 25  $\mu$ l 5-krotnie stężonego buforu Laemmliego i denaturowano przez 5 minut w 95°C. Następnie całą próbkę nakładano na żel poliakryloamidowy, prowadzono elektroforezę SDS-PAGE, a biotynylowane białka oraz białka z metką GFP wykrywano metodą Western blot (rozdz. 4.8.4).



### **4.8.3 Identyfikacja białek koprecypitujących z wybranymi białkami (koimmunoprecypitacja)**

Zastosowanie metody koimmunoprecypitacji umożliwiło identyfikację kompleksów białkowych, w skład których wchodzi badane białka. Komórki *Tetrahymena* produkujące badane białka w fuzji z metką 3xHA – Kif9-3xHA oraz Dusp5-3xHA, a także komórki szczepu typu dzikiego, Cu428, hodowano w pożywce SPP w objętości 600 ml po czym oczyszczano białka frakcji rzęskowej (rozdz. 4.8.1). Otrzymany osad rzęskowy zawieszano w 300  $\mu$ l buforu do odrzędzania z 1-krotnie stężonymi inhibitorami proteaz po czym dodawano równą objętość roztworu zawierającego NP-40 oraz chlorek sodu o końcowych stężeniach odpowiednio 2% i 1,2 M. Detergent – NP-40 – umożliwia usunięcie błony rzęskowej a chlorek sodu powoduje oddzielenie m.in. białek wypustek aparatu centralnego. Zawiesinę rzęsek przepuszczano 10-krotnie przez strzykawkę insulinową i inkubowano w lodzie przez 30 minut. Następnie próbkę wirowano (2100 x g) w 4 °C, przez 25 minut, po czym pobierano supernatant i rozcieńczano 4-krotnie 10 mM Tris-HCl pH 7,4 z 1-krotnie stężonymi inhibitorami proteaz. Stężenie białka w próbce oznaczano z wykorzystaniem metody BCA (rozdz. 4.8.2). Na uprzednio kondycjonowane buforem płuczającym złożę agarozowe sprzężone z przeciwciałem anti-HA (100  $\mu$ l) nakładano 1000  $\mu$ g białka. Próbkę inkubowano przez noc w temperaturze 4 °C na kołyszce laboratoryjnej, a następnie płukano 5-krotnie buforem płuczającym, w celu usunięcia niezwiązanych białek. Białka odrywano od złoża inkubując przez 10 minut w temperaturze pokojowej w 100  $\mu$ l roztworu zawierającego 7 M mocznik i 2% CHAPS. W trakcie inkubacji próbkę mieszano co 2 minuty. Procedurę powtarzano ponownie uzyskując końcowo 200  $\mu$ l próbki, której 10% nakładano na żel poliakryloamidowy i rozdzielano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (rozdz. 4.8.3). Detekcję białek prowadzono z wykorzystaniem azotanu srebra (rozdz. 4.8.5). Pozostałą próbkę przekazywano do analizy z wykorzystaniem spektrometrii mas w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas znajdującym się w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

### **4.8.4 Analiza oddziaływań pomiędzy wybranymi białkami (ang. *pull-down*)**

W celu identyfikacji bezpośrednich oddziaływań między badanymi białkami przeprowadzono doświadczenia typu *pull-down*. Komórki *Tetrahymena* zdolne do nadprodukcji badanych białek jako białek fuzyjnych z metką HA lub metką GFP (rozdz. 4.5.2) hodowano w 10 ml pożywki SPP do osiągnięcia gęstości  $2-2,5 \cdot 10^5$  komórek/ml. W celu indukcji nadprodukcji białka w komórkach, do hodowli dodawano 2,5  $\mu$ g/ml CdCl<sub>2</sub> i hodowano

komórki w 30°C z wytrząsaniem 80 rpm przez 2 godziny. Po tym czasie komórki wirowano (1690 x g) przez 3 minuty i przepłukiwano 10 mM Tris-HCl pH 7,4. Osad komórek zawieszano w 300 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,4 po czym dodawano równą objętość 2-krotnie stężonego zmodyfikowanego roztworu RIPA (MRIPA) z 20-krotnie stężonymi inhibitorami proteaz, zawieszano przez pipetowanie i inkubowano 5 minut w lodzie. Po lizie, komórki wstępnie wirowano (21100 x g) w 4 °C, przez 20 minut w celu pozbycia się z próbki niezliżowanych resztek, pobierano supernatant i wirowano (120 000 x g,) w 4°C, 30 minut w celu uzyskania czystej frakcji cytozolowej. Stężenie białka w próbce mierzono za pomocą metody BCA (rozdz. 4.8.2). Na uprzednio kondycjonowane (buforem do płukania) złoża magnetyczne sprzężone z przeciwciałem anti-GFP nanoszono 250 µg białka produkowanego w fuzji z metką GFP (rozcieńczonego 4-krotnie buforem do rozcieńczania) i dopełniano do 0,5 ml buforem do płukania złoża. Inkubację ze złożem prowadzono przez 45 minut w temperaturze pokojowej z ciągłym mieszaniem. Po tym czasie złożo płukano 5-krotnie buforem do płukania złoża w celu usunięcia niezwiązanych białek i nanoszono 250 µg białka produkowanego w fuzji z metką HA (rozcieńczonego 4-krotnie buforem do rozcieńczania) i dopełniano do 0,5 ml buforem do płukania złoża. Inkubację ze złożem prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z ciągłym mieszaniem, a następnie złożo ponownie 5-krotnie płukano buforem do płukania złoża. Po ostatnim płukaniu złożo zawieszano w 40 µl 2,5-krotnie stężonego buforu Laemmliego i denaturowano związane z nim białka w 95°C przez 5 minut. Detekcję związanych ze złożem białek przeprowadzono metodą Western blot (rozdz. 4.8.4).

#### **4.10 Metody obrazowania immunocytochemicznego**

##### **4.10.1 Immunocytochemiczne znakowanie komórek *Tetrahymena thermophila***

Komórki *Tetrahymena* (10 µl) nanoszono na szkiełko nakrywkowe a następnie permeabilizowano i utrwalano poprzez zmieszanie z równą objętością roztworu utrwalającego. Po wyschnięciu szkiełko pokrywano roztworem 3% BSA w PBS i inkubowano 10 minut w celu zminimalizowania niespecyficznego wiązania przeciwciał. Zarówno utrwalanie jak i blokowanie preparatu przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty inkubowano z odpowiednim przeciwciałem I-rzędowym (Tabela 2) zawieszonym w 3% BSA w PBS przez noc w temperaturze 4°C. Po całonocnej inkubacji usuwano nadmiar przeciwciał poprzez 3-krotne płukanie w roztworze PBS i nanoszono odpowiednie przeciwciało II-rzędowe

(Tabela 2) zawieszono w 3% BSA w PBS po czym inkubowano 2 godziny w ciemności w temperaturze pokojowej. Po tym czasie preparaty ponownie 3-krotnie płukano po czym nanoszono na szkiełka podstawowe z 10  $\mu$ l preparatu Fluoromont G, który przedłuża żywotność fluorochromów i zabezpiecza preparaty przed wyschnięciem.

#### **4.10.2 Analiza preparatów immunocytochemicznych przy użyciu mikroskopu konfokalnego**

Wstępnej oceny preparatów immunofluorescencyjnych dokonywano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego AXIO Imager M2. Obrazy rejestrowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Leica SP8 znajdującego się w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie. Analizę i obróbkę obrazów prowadzono w programie Fiji ImageJ oraz Adobe Photoshop CC.

## 5. Wyniki

### CZEŚĆ I

#### **Analiza filogenetyczna i domenowa potencjalnych białek szlaku MAP kinaz rzęsek ruchomych oraz określenie ich wzajemnych oddziaływań**

##### **5.1 Analiza filogenetyczna i domenowa potencjalnych elementów i regulatorów szlaku MAP kinaz**

Spośród zidentyfikowanych białek niestrukturalnych, których poziom w ciliomach komórek pozbawionych wypustki C1b (SPEF2A-coDel i CFAP69-KO) był zmieniony (obniżony lub podwyższony) w stosunku do rzęsek komórek typu dzikiego szczególną uwagę zwrócili białka mogące stanowić elementy właściwe i regulatorowe szlaku MAP kinaz. Analiza filogenetyczna wykazała, że wytypowane białka są ortologami: ludzkiej kinazy Mapk3 (ang. *mitogen-activated protein kinase 3*, kinaza 3 aktywowana mitogenami), kinazy Map2k7 (ang. *Mitogen-activated protein kinase 2 kinase 7*, kinaza 7 kinazy 2 aktywowanej mitogenami), kinazy Nek6 (ang. *never in mitosis A-related kinase 6*), fosfatazy Dusp5 (ang. *dual-specificity phosphatase 5*) oraz fosfatazy PPM1B/PP2CB (ang. *protein phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent 1B/protein phosphatase 2C-beta*) (Ryc. 12) i kinezy Kif9 (ang. *kinesin family member 9*), której ortolog u *Chlamydomonas* – białko KLP1 lokalizuje się w wypustce C2c. Jak wykazano kinezy oprócz udziału w transporcie organelli w komórce pełnią również istotne role w transporcie wewnątrzkomórkowym – w tym elementów szlaku MAP kinaz biorąc udział w regulacji przekaźnictwa sygnału związanego ze szlakiem MAP kinaz (Liang i Yang, 2019).

Ryc. 12 Porównanie sekwencji aminokwasowych ortologów białka *Mapk3* (A), *Map2k7* (B), *Nek6* (C), *Dusp5* (D), *Pp2c* (E) i *Kif9* (F).

### (A) Mapk3

	1						
T_brucei_gambiense	-----	-----	-----	-----	-----	MNRS SRNLAEMQDE	
T_cruzi	-----	-----	-----	-----	-----	MSHQ IRSLSELOEE	
S_kowalevskii	-----	-----	-----	-----	MSAPEGV KA	GFYKVELNKT	
S_coeruleus	-----	-----	MDRG KSG	N RYGV	SELGGPSGO	FRKSTKIVGS	
B_stoltei	-----	MEPST R	NNPPG PPR	N PYAI	SHVGGPSIV	NKRQVNVIGA	
S_lemnae	-----	-----	MKK	NO	EVE	DNNVYMLVGS	
P_tetraurelia	-----	MHGLNKYC	IKKOKINIIK	RMKT COLPD	D IIOH	YSNFRNKKK	KLKVSTILGS
T_thermophila	-----	-----	-----	MDTANLVAK	E VVEY	YQPYRH KS	NFTVTQVHGS
I_multifiliis	-----	-----	MNN	NTNIONSIAK	D VVEY	YSKYRA KK	TLKQSQIHGT
C_reinhardtii	-----	M	ADPGAQPVPA	POSAB EPVT	GGLQESVEVT	ASGKLDSSYNR	EYNQFLVCGS
D_melanogaster	-----	-----	MEE	FN SS GSVV	NG	TGS TEVP	QSNAEVIRGO
S_purpuratus	-----	-----	MAD	QGGAK	-----	T KRTN	EKPETVIRGO
H_sapiens	-----	MAAA	-----	QGGG GEPR	RT	EGV GPGV	PGEVEMVKGQ
M_musculus	-----	MAAAA	-----	AA	GGT	AGV VPV	PGEVEMVKGQ
B_bufo	-----	-----	MAA	AAGAS SN	-----	-----	GGGPEMVRGO
D_rerio	MAESGSSAAA	AEPGSNSSAA	GP	GP	GP	SG AAGS	KPGLSVKGO
	61						
T_brucei_gambiense	INOLDDRYKL	EKIIGAGSYG	VVIRARDTT	---TNDLVAI	KRVNKEIFEE	IILAKRILRE	
T_cruzi	VNSLDSRYVL	EKIIGAGSYG	IVIRARDTL	---NDNELVAL	KRVNKEIFEE	MILAKRVLRE	
S_kowalevskii	VWVVPTRYQA	LSPVSGAYG	OVCSAYDNS	---LKMKVAI	KKLAR PFQS	KIHAKRTYRE	
S_coeruleus	TFLLDERYQI	QDTLGSAYG	VVVSARDTR	---TGEIVAI	KKIEK AFEH	STYTKRTLRE	
B_stoltei	TFLIDARYEV	IGTVGSGAYG	VVVSARDTL	---TGORVAI	KKIEK AFEH	STFTKRTLRE	
S_lemnae	KFEVDKRYEI	IDPVGSGAYG	VVVAAKDLQA	EDQENNLVAI	KKIEK AFEH	KVFAQRTLRE	
P_tetraurelia	RFEIDDKYEI	LDNIGOGAYG	IVVAARDN T	LDPEDNLVAI	KKIEK AFEH	KIFTKRTLRE	
T_thermophila	VFNIDERYRI	LEKIGOGAYG	VVSAADQ V	---KRKSVAI	KKIEK AFED	RIYTKRTLRE	
I_multifiliis	NFNIDERYKI	LEKIGOGAYG	VVVAADQ A	E NKKKVAI	KKIEK AFEE	RIYTKRTLRE	
C_reinhardtii	LFECPAKYL	IKPIGKAYG	VVCSAKNLD	---NOEKVAI	KKIAN AFDN	VIDAKRTLRE	
D_melanogaster	IFEVGPRIYK	LAYIGEGAYG	MVVSADDTL	---TNORVAI	KKIS PFEH	QTYCORTLRE	
S_purpuratus	VFDVGPRIYV	LNYIGEGAYG	MVCSAVDTR	---HGGKVAI	KKIS PFEH	QTYCORTLRE	
H_sapiens	PFDVGPRIYQ	LOYIGEGAYG	MVSSAYDHY	---RKTRVAI	KKIS PFEH	QTYCORTLRE	
M_musculus	PFDVGPRIYQ	LOYIGEGAYG	MVSSAYDHY	---RKTRVAI	KKIS PFEH	QTYCORTLRE	
B_bufo	AFDVGPRIYTN	LSYIGEGAYG	MVCSAYDHY	---NKVRVAI	KKIS PFEH	QTYCORTLRE	
D_rerio	NFDVGPRIYD	LOYIGEGAYG	MVCSAFDHY	---NKIRVAI	KKIS PFEH	QTYCORTLRE	
	121						
T_brucei_gambiense	IKLLAHFHHD	NIIGLRNLIT	PA DRDNYDY	FYIVMDVMEI	DLKQVLRITGO	SLTEGHIOYF	
T_cruzi	IKLLSPFNDE	NIIALRNILT	PL DSEDFDH	FYIVMEIMET	DLKQVLRITGO	ELTEAHVQPF	
S_kowalevskii	LKLLKHMDE	NIIGLVDFVS	PSLTFDFDD	VYLVTHLGA	DLNIVKQ C	RLTDDHVQFL	
S_coeruleus	LKIMRLEHE	NIIRIKSIQL	PR SREEFDD	IYVIVELMET	DLSSIIKSPQ	PLSDEHVQFF	
B_stoltei	LKILRLEHD	NIMRIVSIQL	PL SREEFDE	IYVISELMET	DLSSIIKSPQ	VFSDEHCQFF	
S_lemnae	LKIMRLLQHD	NVIGVKTILK	PT SRESFKE	IYVIVELMET	DLAQIISKNO	PLSDDHIOFF	
P_tetraurelia	LRLRLRLOHE	NIIGINTILL	PK SREEFED	IYVIVELMET	DLAQIISKSD	NLADEHCQFF	
T_thermophila	LKLLRLTHE	NVIGLESILL	PK SREEFDD	IYVISELMET	DLQOIKSDQ	QLTQDHCQFF	
I_multifiliis	LKLLRLLNHE	NVIGLDSILL	PK SREEFND	IYVISELMET	DLQOIKSEQ	VLTAHDHKFF	
C_reinhardtii	IKLLRHLQHE	NIVQIKDIIP	PT NRDAFKD	LYVIVELMET	DLHQIIRSPQ	ALSNDHSQYF	
D_melanogaster	ITILTRFKHE	NIIDIRDLR	VD SIDQMRD	VYIVQCLMET	DLYKLLKT Q	RLSNDHICYF	
S_purpuratus	IKILTRFNHE	NIINIQDIK	AD TIEAMRD	VYIVQSLMET	DLYKLLKT Q	RLSNDHICYF	
H_sapiens	IQILLRFRHE	NVIGIRDILR	AS TLEAMRD	VYIVQDLMET	DLYKLLKS Q	QLSNDHICYF	
M_musculus	IQILLRFRHE	NVIGIRDILR	AP TLEAMRD	VYIVQDLMET	DLYKLLKS Q	QLSNDHICYF	
B_bufo	IKILLRFRHE	NIIGINDIIR	AP TIEQMKD	VYIVQDLMET	DLYKLLKT Q	RLSNDHICYF	
D_rerio	IKILLRFRHE	NIIGINDILR	AR HIDYMRD	VYIVQDLMET	DLYKLLKT Q	QLSNDHICYF	
	181						
T_brucei_gambiense	IYQILHALNF	IHSAGVIHRD	ITPANILVNK	NCDLKICDFG	LSKEESD ---	QGEHMTDYV	
T_cruzi	IYQILHALKV	IHTAGVIHRD	ITPANILVNO	NCDLKICDFG	LAKEEND ---	RGENMTDYV	
S_kowalevskii	VYQILRGLKY	VHSANIVHRD	LKPSNIAVNE	DCELKILDFG	LARQTD ---	EMTGYV	
S_coeruleus	LYQILRGLKF	MHSAAIHRD	LKPRNLLVNA	NCDLKICDFG	LARPVIGDMK	VNTSQMTDYV	
B_stoltei	LYQILMGLKY	MHSAGIHRD	LKPRNLLVNS	NCDLKICDFG	LARPIISDLK	VSGAQMPTYV	
S_lemnae	MYQILRGLKY	IHSAGILHRD	LKPRNLLVNS	NCDLKICDFG	LARADIPYFO	TQSAVMTDYV	
P_tetraurelia	LYQILRGLKY	VHSANVHRD	LKPRNLLVNS	NCDLKICDFG	LARALIPDLK	AKAGVLTDYV	
T_thermophila	IYQILRGLKY	IHSANIVHRD	LKPRNLLVNS	NCDLKICDFG	LARSVAN ---	T KNDLTDYV	
I_multifiliis	IYQILRGLKY	VHSGGVIHRD	LKPRNLLVNS	NCDLKICDFG	LARAIPE ---	SKANDLTDYV	
C_reinhardtii	LYQILRGLKY	IHSANILHRD	LKPSNLLVNA	NCDLKICDFG	LARTSTS N	EKEFMTYV	
D_melanogaster	LYQILRGLKY	IHSANVHRD	LKPSNLLLNK	NCDLKICDFG	LARIADPEHD	HTGFLTEYV	
S_purpuratus	LYQILRGLKY	IHSANVHRD	LKPSNLLNLT	NCDLKICDFG	LARIADPGHD	HTGFLTEYV	
H_sapiens	LYQILRGLKY	IHSANVHRD	LKPSNLLINT	NCDLKICDFG	LARIADPEHD	HTGFLTEYV	
M_musculus	LYQILRGLKY	IHSANVHRD	LKPSNLLINT	NCDLKICDFG	LARIADPEHD	HTGFLTEYV	
B_bufo	LYQILRGLKY	IHSANVHRD	LKPSNLLNLT	NCDLKICDFG	LARVADPHD	HTGFLTEYV	
D_rerio	LYQILRGLKY	IHSANVHRD	LKPSNLLINT	NCDLKICDFG	LARIADPEHD	HTGFLTEYV	

301

```

T_cruzi      EEDIKSLGSPAKYLRKKETRPPLDWRAKYPKASEEALDLLKRMVLFHPDKRITVDEALRHPFLAELYDEQYET
S_kowalevskii DRLLLEKIKSQEAKTYIKSLAKMEKRDFRDYFVGANPFAIDLLSKMLVLDIDERITASEALKHPYVAQYHDPDDEP
S_coeruleus  AEDIQKIPHPRSREKVLRLMPKRPEKDFNTIFRDANPHAMDLLRRLTFDPDKRITVDQALEHPYLEGLHYDPDDEP
B_stoltei    DEDIESIPNPLSKEKVSRLAKKPGKNFOTIFRDANPDALDLRKLIFNPEKRITVQAALEHPYLATPHCEEDEP
S_lemnae     EDLVEQITILKNKEFIQSLPKRKKPFPTIFKGGANGDAIDLKMLTFDPARRITVDQALEHPYMSQLHFPDDEP
P_tetraurelia EQELNMPKKEKYRTIAKGLPKRPGKDFNKLFPNASNLAIIDLKSLTFDAKKRITVEDALRHPYLSALHCPDDEP
T_thermophila ENEIQMIPYDEYRKFIRELPKREPQFEKIFSKAPKEALDLLKMLTFDFNKRITVEEALKHPYLSDLHLPEDEP
I_multifiliis PQEIAMIPYDEYRKFIRELPKREPQFEKIFSKAPKEALDLDRMLTFDFQQRITVEQALQHPYLADLHLPEDEP
C_reinhardtii EEELGFITSEKAKRYIRSLPRSERVDFGOLWPHVTKTALDLDLIDKMLVFDPTKRITVEQALEHPYLSLHLDVSDPEP
D_melanogaster RDDLECIINEKARNYLESLPFKPNVPWAKLFPNADALALDLDLGMKLTFFNPKRITPVEEALAHPLYEQYDPPGDEP
S_purpuratus  QDDLKCIINEKARAYLQGLPFKSKLPLKSLFPKADNKALDFLERMLSFNPKRITVEEALAHPLYEQYDPPDDEP
H_sapiens     QEDLNCIINMKARNYLSLPSKTKVAVAKLFPKSDSKALDLDLDRMLTFNPNKRITVEEALAHPLYEQYDPTDEP
M_musculus    QEDLNCIINMKARNYLSLPSKTKVAVAKLFPKSDSKALDLDLDRMLTFNPNKRITVEEALAHPLYEQYDPTDEP
B_bufo        QEDLNCIINLKARNYLLSLPHKNKVPWNRLFPNADPKALDLDLDRMLTFNPNKRITVEEALAHPLYEQYDPSDEP
D_gerio       QDDLNCIINMKARNYLSLPKPKIPWNKLPKADNKALDLDLDRMLTFNPKRINVEQALAHPLYEQYDPSDEP

```

376

```

T_cruzi      INIPLFSFD----EQEQKTVHDVKKAVYEESSVMFHEKYPKTAPRHRQLQQQQQQQQQQGGGSAIPSMVDVTGGRS
S_kowalevskii DCQPYD---DSFEGI-ELDVLKWKRLIYLEIKQ-----
S_coeruleus  TTHPVSLDFEYERQ-LLTMKDLKDLMYDEILLYHFNDDKQEVYKAKAEYVATHOPT-----LSFLRINDES--
B_stoltei    TTTVPVSMDFEFKQ-PLMMRQLKDLIYEEILLYHFPQKKEEYKLAEYDNOORQA-----GKSMPOEFEEEE
S_lemnae     TTELVSADFDFEYI-SLKKEDYQDLIYEEIMLYHDENSFKQYLKDKKENPEGILHKRYG---KDRIKKKFKK--
P_tetraurelia IAVPQRIDFEFEEY-NMTLQQLKDCIYEEILYHYKDFKDEYETKKRNSSSIINH-IIKNENSKIIDPDADDDD
T_thermophila SRSEVPFYEFEFEMHSNLTROQYKDLVYEEILLYHYPDFKKYLDKIONNQSVMQH-IFDNANKNIVDEEFSSDQ
I_multifiliis SRQQVFFLEFEFESYPNLTRQYKDLVYEEILLYHYPDFKKQYLFNISNOKSVMQH-IFNNSNKNIIDQEFTEED
C_reinhardtii VCPPTFFDFDSE---HLTPDVVREVIQDMAELHT-----
D_melanogaster VAEVPPFRINMEND-DISRDLKSLIFEETLKFKEKOPDNAP-----
S_purpuratus  VKEEPPFTFVTELD-DLPKEKLEKEMIFEEASKFNPSPSPTS-----
H_sapiens     VAEPPFTFAMELD-DLPKERLKEKELIFQETARFQPGVLEAP-----
M_musculus    VAEPPFTFDMELD-DLPKERLKEKELIFQETARFQGAPEGE-----
B_bufo        VAEAPFKFEMELD-DLPKETLKEKELIFEETARFQPGY-----
D_gerio       VAEPPFTFNMELD-DLPKEKLEKELIFEETARFOANYOGS-----

```

451

```

T_cruzi      AORTIERDSVEDVDNGRFDEMLEAS
S_kowalevskii -----
S_coeruleus  -DEEMA-----
B_stoltei    EEEELN-----
S_lemnae     -----
P_tetraurelia NDSDEEPI-----
T_thermophila DY-----
I_multifiliis G-----
C_reinhardtii -----
D_melanogaster -----
S_purpuratus -----
H_sapiens     -----
M_musculus    -----
B_bufo        -----
D_gerio       -----

```

*Blepharisma stoltei* (CAG9331548.1), *Bufo bufo* (XP\_040272287.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (XP\_001700291.1), *Danio rerio* (BAB11812.1), *Drosophila melanogaster* (NP\_001015122.1), *Homo sapiens* (NP\_002737.2), *Ichthyophthirius multifiliis* (XP\_004023847.1) *Mus musculus* (NP\_036082.1), *Paramecium tetraurelia* (XP\_001458850.1), *Saccoglossus kowalevskii* (XP\_006822450.1), *Stentor coeruleus* (OMJ87638.1), *Strongylocentrotus purpuratus* (NP\_999813.1), *Stylonychia lemnae* (CDW75540.1), *Tetrahymena thermophila* (THERM\_00760270), *Trypanosoma cruzi* (EKF99016.1)

## (B) Map2k7

	1	
P_tetraurelia	-----	
T_thermophila	-----	
P_persalinus	-----	
T_vivax	-----	
C_reinhardtii	-----	
A_japonica	-----	
D_riero	-----	
X_laevis	-----	
M_musculus	-----	
H_sapiens	-----	
	77	
P_tetraurelia	-----	
T_thermophila	-----	
P_persalinus	-----	
T_vivax	-----	
C_reinhardtii	-----	
A_japonica	-----	
D_riero	-----	
X_laevis	-----	
M_musculus	-----	
H_sapiens	-----	
	153	
P_tetraurelia	-----	
T_thermophila	-----	
P_persalinus	-----	
T_vivax	-----	
C_reinhardtii	-----	
A_japonica	-----	
D_riero	-----	
X_laevis	-----	
M_musculus	-----	
H_sapiens	-----	
	229	
P_tetraurelia	-----	
T_thermophila	-----	
P_persalinus	-----	
T_vivax	-----	
C_reinhardtii	-----	
A_japonica	-----	
D_riero	-----	
X_laevis	-----	
M_musculus	-----	
H_sapiens	-----	
	305	
P_tetraurelia	-----	
T_thermophila	-----	
P_persalinus	-----	
T_vivax	-----	
C_reinhardtii	-----	
A_japonica	-----	
D_riero	-----	
X_laevis	-----	
M_musculus	-----	
H_sapiens	-----	
	381	
P_tetraurelia	-----	
T_thermophila	-----	
P_persalinus	-----	
T_vivax	-----	
C_reinhardtii	-----	
A_japonica	-----	
D_riero	-----	
X_laevis	-----	
M_musculus	-----	
H_sapiens	-----	

457

P_tetraurelia	R O P E R T N S P P P D M G L S S K S P V L R D L S I Q S Y F R T P L O R S V S P V L D R S G K Y L S P A Q S R N T T A A L S G F N K T P T K O T I L I
T_thermophila	V S Q I Q G G F I Q E T Y E E K E V V O R S A N P A R O S Y T O E K T Y E A P I N Y T T T T Y T T O T P V I E T T N Y N N D D L N A R I Q A V L A M S R
P_persalinus	N P E Q T E L I Q E E V V I E E N A K R Q A Q P V G G G I Q L I P E E Q K E Y I T P A I S G Y D L S Q I E E R I N R V L Q O S K H T V Q O Y G G A K G N
T_vivax	V P T L I E N E R V I P R R
C_reinhardtii	H D K L D E I A I V F A F N Y A L L N A G V O R L R D L A P L Y S P K S T M R Y D G E M A V G R D A I I A K L O A V A O M H A G F R V V H E V D V Q
A_japonica	V K D Y P T V D L C V
D_rerio	T E S P R S S Q C F S H H Q L H S L F S R
X_laervis	T E S P R S S T L L S P Q N L P F F G R
M_musculus	T E S P R T S G V L S Q H H L P F F S G S L E E S P T S P P S P K S F P L S P A I P Q A Q A E W V S G R
H_sapiens	T E S P R T S G V L S Q P H L P F F R

533

P_tetraurelia	O S O K T P I K D E R G R K L N T V T E N S R N I M V I S R S P I Q N Q S R K T S F O M T S M H K P A L K L V T P L H H T G F L P P Y Q Q A F Y Q D K A
T_thermophila	E T I A K Y G S S N L S Y T S A P V N Y T T T Y T T S A - V P N T T Y T A T Y T A P I D A K A S O I E T R T F L N E N T N N I E T K S Y Q Q Q E P V I
P_persalinus	E V Y E S Y K P E Y T E P I R Q S N V Q T S V T Y T Y T - R P E Q Q Q Y Y G S Y Q P A Y T S N Y N R T Y O S Y Q Q P H Y N P I S S T T Y H N A P O N E
T_vivax	
C_reinhardtii	C O P L G F D G S A L V N V T G Q L V S P A A S N K P Q P F M E V F V L S Q I O A G E Y Y V A N C F R L L K Q
A_japonica	
D_rerio	
X_laervis	
M_musculus	
H_sapiens	

609

P_tetraurelia	N O K Q V N P Q O O F S O T L Q H F V Q P C F N N Q E N L G N T I P K S D S A Y Y S K P O E A S F O O O H S I P K Q O O E Q O O O V I A Q N C O P O S A
T_thermophila	N O T F S I I
P_persalinus	Q D D D Y I P L P A G V A Q Q K I K T S E N K P Y V S T I N Q O T T E F Q O O S Q O O O O D L D K Q I Q E S L E R S K O L E N I R K S Q F E S Q O O T
T_vivax	
C_reinhardtii	
A_japonica	
D_rerio	
X_laervis	
M_musculus	
H_sapiens	

685

P_tetraurelia	N P F G K T P Q K V P Q K G I N L L S P L S S N N K
T_thermophila	
P_persalinus	A A Q Q Q
T_vivax	
C_reinhardtii	
A_japonica	
D_rerio	
X_laervis	
M_musculus	
H_sapiens	

*Anneissia japonica* (XP\_033108648.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (XP\_001696437.1), *Danio rerio* (NP\_001177235.1), *Homo sapiens* (NP\_001284484.1), *Mus musculus* (NP\_001036022.1), *Paramecium tetraurelia* (XP\_001446993.1), *Pseudocohnilembus persalinus* (KRX09481.1), *Tetrahymena thermophila* (THERM\_000584709), *Trypanosoma vivax* (KAG8342097.1), *Xenopus laevis* (XP\_018106258.1)



### (C) Nek6

1  
T\_brucei -----MKPRDISA  
T\_thermophila -----MSKDIQFTG  
I\_multifiliis -----MNKDIHEYVG  
C\_reinhardtii MSRPTSROESERPOTVEAQ-----PGAGSLOTVPSPAROASKNGSRPATREAPNTARGDGETLGVVSPCPG  
S\_coeruleus -----MNKSEDSRRAG  
B\_stoltei -----MKNEEVDISG  
P\_tetraurelia -----MSQFID  
H\_grandinella -----MSEMHPSHLLQGOSQLNKOTSNVNSAAAIDHSQVVOQARPOIIEKSEFQD  
S\_purpuratus -----MADMY-----EOPSQLSHED-PAMY  
D\_riero -----MEQNSLQDONK-----NYNEGCGYV-FGYC  
S\_kowalevskii -----MDEDO-----PMEIQPSTAG-NDVY  
H\_sapiens MLHRSPSGTRARPRALVRLACRMAGOPGHMHPHGGSGNNLCHTLGPVHPDPORHPNT-LSFR  
M\_musculus -----MAGOPSHMHPHGGSPNHLCHALGPAPPPDPORLPNT-LSFR  
B\_bufo -----MDGNHCLEDQ-----NSPLCKVQGDYQHDGORHTTS-YPYR  
X\_laevius -----MTS-YPYR

77  
T\_brucei PELKRYAIEKALFLGNTTDFVKVREVTDRPYVLKQMSLLPMG-ADERKRVLQEICVMSGVDHPNIVKFPRESFSGN  
T\_thermophila KEIQGYTVSKPIGQKGFSTVYKAET-ANKQVFALKKIKIFDMMDPKQREKCLKEVGLMKPLDHPNIIKYIDSF1HN  
I\_multifiliis KDMNGYRVQKPIGQKGFSTVYKAET-SDNKIAALKKIKIFDMMDPKQREKCLKEVGLMKPLDHPNIIKYIDSF1HN  
C\_reinhardtii RLTDAYDVQKPVKGGYAVVYKGIIRDDGRVVAVKVEIFEMS-AKKRDRCLQEVETLLQOLDHPNIIQMLDAFIDE  
S\_coeruleus KEIKGYKIIKPIGQKGFSTVYKAERISDNLVPAIKIIFDMMDPKQREKCLKEVSLLESKHPNIIKYIDSF1IEE  
B\_stoltei REINGFRVVKPIGQKGFSTVYKAERISDTPVALKMIKIFDMMDPKQREKCLKEVRLLESHPNIIKYIDSF1AD  
P\_tetraurelia QEINGYKVKRAIGEGKGFSTVYKAMN-KEGNVVALKIKIFDMMDPKQREKCLKEVRLLESHPNIIKYIDSF1YN  
H\_grandinella KVVDRYRIIKPIGEGKFSVVFKAQKVS DGTQVALKLIKIFDMMDPKQREKCLKEVRLLESHPNIIKYIDSF1IEE  
S\_purpuratus AELGNFAIEKRIKGFSEVYRARCILNDRVTALKKVQIFEMMDAKARNDCKEIDLLKSLDHDHVIKYLASF1EN  
D\_riero SNLSNFLIEKKIGRGQFSEVYRATCLLNNQKVALKKVQIFEMMDAKARQDCVKEIDLLKQLNHPNIIKYIDSF1AN  
S\_kowalevskii GCLANFNIEKKIGRGQFVVYRATHNIENTVVALKKVQIFEMMDAKARQDCVKEIDLLKQLNHPNIIKYILASF1ED  
H\_sapiens CSLADFQIEKKIGRGQFSEVYKATCLLDRKTVALKKQVIFEMMDAKARQDCVKEIGLLKQLNHPNIIKYIDSF1ED  
M\_musculus SNLSNFLIEKKIGRGQFSEVYKATCLLDRKTVALKKQVIFEMMDAKARQDCVKEIGLLKQLNHPNIIKYIDSF1ED  
B\_bufo CNLADFQIEKKIGRGQFSEVYRANCHLDRKTVALKKQVIFEMMDAKARQDCVKEIDLLKQLNHPNIIKYIDSF1ED  
X\_laevius CTLADFQIEKKIGRGQFSEVYKATCLLDRKTVALKKQVIFEMMDAKARQDCVKEIDLLKQLNHPNIIKYIDSF1ED

153  
T\_brucei TSVNIIMECC-KCTLEEIIMLQOEEGQFPPEEATIEWMVELLSGLAHLHSRRVVRDIIKTSNIFVTEKNHLKLGDF  
T\_thermophila NELIIVTEWAEKGDLLKRLIKMQOQEEPTFEEELKIWEYMQQIASALNHMHEKRIMHRDLK PANIFIAQDDTLKVGDL  
I\_multifiliis NELIIVTEWAEKGDLLKRLIKMQOQEEPTFEEELKIWEYMQQIASALNHMHEKRIMHRDLK PANIFIASDDLLKIGDL  
C\_reinhardtii NMLIIFEWAPAGDLKRLIKKTAEQKTLDEPSIWLTFYQVTDGLRYMHQHRIMHRDIK PANVLVANGALKLGD  
S\_coeruleus NELLIAIEWAEKGDLLKRLIKKTAEQKTLDEPSIWLTFYQVTDGLRYMHQHRIMHRDIK PANIFITADTKLGD  
B\_stoltei NELLIAIEWAEKGDLLKRVIKRAQSESSIEESKIWEYMQQIASALNHMHEKRIMHRDLK PANIFISADNSLKLGD  
P\_tetraurelia NELIATIEWAERGDLLKRIKNAQSDPTFEEVQLWNYIMOIASALDHMHEKRIMHRDLK PANIFIGDGLKVGDL  
H\_grandinella NEMFIVVEWAEKGDLLKRLIKKTAEQKTLDEPSIWLTFYQVTDGLRYMHQHRIMHRDIK PANIFIDAHNKLGD  
S\_purpuratus NELNIVLELADAGDLSRMIKHFKKQKRLIPERTIWKYFVQLCSALEHMHQKRVHRDIK PANVFITADGKVKLGD  
D\_riero NELNIVLELADAGDLSOMIMHFKKKRLIPERTIWKYFVQLCSALEHMSRRVMHRDIK PANVFITASGEVKLGD  
S\_kowalevskii NELNIVLELADAGDLSRMIKHFKKQKRLIPERTIWKYFVQLCSALDHMSRRVMHRDIK PANVFITAAGVVKLGD  
H\_sapiens NELNIVLELADAGDLSOMIKYFKKQKRLIPERTVWKYFVQLCSAVEHMSRRVMHRDIK PANVFITATGVVKLGD  
M\_musculus NELNIVLELADAGDLSOMIKYFKKQKRLIPERTVWKYFVQLCSAVEHMSRRVMHRDIK PANVFITATGAVKLGDL  
B\_bufo NELNIVLELADAGDLSOMIKYFKKQKRLIPERTVWKYFVQLCSAVEHMSRRIMHRDIK PANVFITAAGVVKLGD  
X\_laevius NELNIVLEIADAGDLSOMIKYFKKQKRLIPERTVWKYFVQLCSAVEHMSRRIMHRDIK PANMFITATGVVKLGD

229  
T\_brucei GVCTVLTSAIATNSMVGTPLYFSPEVCAGDAYDVRSDVWSLGVVYEMCTLRPFEEA-----HLPGLLOOVLTRD  
T\_thermophila GLGREFSSGTIEVYSKVGTPLYMSPELLHGEYDMKSDVWSLGCIVYELSEFKSPFRNENDKMSLMDLFPNITKGE  
I\_multifiliis GLGREFSSETIEAYSKVGTPLYMSPELLNGEYDMKSDIWSLGCIIYEFCELSPPFRNENKMSLMDLFPNITQGG  
C\_reinhardtii GLGROLSEQTMEAFSKVGTPYVVSPEVVRGAGYDWKSDVWSMGCLLYELACLRSPPFEME--GANLYDVPQKISKGE  
S\_coeruleus GLGRYLSSQTIEAFSRVGTPLYMSPEVLKSGYDWKSDVWSLGCVVYELACLRSPPFRKDDTKMSLYDLFPOTISKGE  
B\_stoltei GLGRYLSSQTIEAFSRVGTPLYMSPEVLKSGYDWKSDVWSLGCVVYELACLRSPPFKQDDQKMSLYDLFPNTINKGE  
P\_tetraurelia GLGRIFSSETIEAYSKVGTPLYMSPELLHGEYDMKSDIWSLGCIIYEMAEFKSPFKOS-EKMSLMDLFPNITKGE  
H\_grandinella GLGRDFTSQTMEAFSRVGTPLYMSPEVLQNGYDFKSDVWSLGCITIELCALKNPFDKTKMSLYDLFPNITKINSV  
S\_purpuratus GLGRFFSSKTAAHSLVGTPTYMSPERIHETGYNFKSDIWSLGCIIYEMAEALHSPFYAE--GLDLYSLCQKIDKCE  
D\_riero GLGRFFSSKTAAHSLVGTPTYMSPERIHENGYNFKSDIWSLGCIIYEMAEALHSPFYSD--KMNLLSLCHKIEQCE  
S\_kowalevskii GLGRFFSSKTAAHSLVGTPTYMSPERIHENGYNFKSDMWSLGCIIYEMAEALHSPFYGD--KMNLYSLCKKIEQCD  
H\_sapiens GLGRFFSSETAAHSLVGTPTYMSPERIHENGYNFKSDIWSLGCIIYEMAEALHSPFYGD--KMNLFSLCQKIEQCD  
M\_musculus GLGRFFSSETAAHSLVGTPTYMSPERIHENGYNFKSDIWSLGCIIYEMAEALHSPFYGD--KMNLFSLCQKIEQCD  
B\_bufo GLGRFFSSKTAAHSLVGTPTYMSPERIHENGYNFKSDIWSLGCIIYEMAEALHSPFYGD--KMNLFSLCQKIEQCE  
X\_laevius GLGRFFSSETAAHSLVGTPTYMSPERIHENGYNFKSDIWSLGCIIYEMAEALHSPFYGD--KMNLFSLCQKIEQCD

305

T_brucei	VAPFDTGLDTRLEEIVLRMLRKDPKERPTSODLIDNHLVPPS-----HPSHASOKPSRGLLIQ
T_thermophila	YKQISKRYSEDLQOIIDDMIVVDPTRKIDTEVVLQCEKKINOLK-----KNPKIDCILVNE
I_multifiliis	YKKISKRYSEELSNIIDOMIIVDPSKRIDSQVYVLFKSOEIIENMK-----KSPKIDCVLINE
C_reinhardtii	YSPLPADQFSAPLRSLVGRMLQIDPAKRPELEEVWTTISGAVQSOART-----RTDVHGAAA
S_coeruleus	FIPIGEKYSEELRTIVNSMIQVNPCKRLDIDQVVELCNIOKLSWSOK-----KPKVDISLIMD
B_stoltei	FPPLPERYSEELRQLVNSMIQVDPKRNLSIDQIVELCEIHTKTA-PK-----KSKIDPFLVMD
P_tetraurelia	FKPVSNRYSOQLRDVIEGMIVVDPQKRLDASTVLQKSEIHTTFLDTKKT-----QIINVLMME
H_grandinella	YAPLSASRYSSSELRYLIDSMRLVDPSTRVDVNDVNYCEKHITQMVQASNPDQDSHNSNLRRIRSRMDPVLIMD
S_purpuratus	YPGLPAHYSEELRNLVAMCIPDPNLRPDVSYVLEVAKRMMHOSVQSS-----
D_rerio	YPPLPEHYEQKFRDLVSMCINPEPDORPDISFVLQFSTOMKLWTTST-----
S_kowalevskii	YPPLPAEHYSEELRSLVAMCINPDPQORPDVSHVYEVAKMMHOSLQOQSS-----
H_sapiens	YPPLPGEHYSEKLRRLVSMCICPDPHQRPDIGYVHQAQOMHIWMSST-----
M_musculus	YPPLPGEHYSEKLRRLVSMCIYPDPDHRPDIYVYVHQAQOMHVWTSST-----
B_bufo	YPPLPTEHYSEKLRRLVSMCIYPDPDORPDIYVYVHQAQOMHVWTSST-----
X_laevis	YPPLPEHYSEKLRRLVSMCIYPDPDORPDIYVYVHQAQOMHAWTSST-----

381

T_brucei	OYYGPELFFSCDAVTSWGNERGAEKKAAVMA-----VDDCSRKKLQVRQOOKHPLTARGOT
T_thermophila	DIYEKLTLLLEYHNF-----FCKPM
I_multifiliis	DIYEKLTLLLEYQKY-----FCKPI
C_reinhardtii	EVYDHVLLSCEVTNRLRGKPPPPSTPPNGKRRGDAAAAAAAAAAAAAAVSNGSLAPPPTD
S_coeruleus	DIQEKLKLLDYENQ-----FCKVF
B_stoltei	DIYEKLKLLDYENN-----FCKIF
P_tetraurelia	DIYEKLSLVQYHEY-----FCIPL
H_grandinella	DIIEKLLHLLDYIKG-----FCKPY
S_purpuratus	-----
D_rerio	-----
S_kowalevskii	-----
H_sapiens	-----
M_musculus	-----
B_bufo	-----
X_laevis	-----

457

T_brucei	GAPKVPGNTAVPAKRNNIPKATPRLDKQKELSSQERMEAMERIKSAKSKINMSELRKNMOORRMELLGKENADAA
T_thermophila	HRDPVSKVFFSISDOT-----PAQNNKFFFYFAEL-----CYWIMSIQKYDKKNI
I_multifiliis	NRKPIISKIYFALPDNN-----MILNNEKFFFYFAEL-----SYWIMSIKKYDQKNI
C_reinhardtii	TIRSLHPLYFSEPLVPOLRSYDAFOKQOLGAF LAV-----LAWLLRLNGKPDAAA
S_coeruleus	KYQPVSHVYFAH-----VNPM-EQLCYFYDL-----AYWMLSLNKLKS-P
B_stoltei	KRQPVSRVYFCHP-----IDSQ-TQLAYCYDL-----ANWMLSFSLKQKQGP
P_tetraurelia	KKKPVSKYFSLDE-----NVN-QNRFYFVVEL-----CYWMLSLPKQKKNMA
H_grandinella	NKKPISRITYFAVGS-----POEPTDEKVRCFVEL-----SYWMLSLGINSSKQVT
S_purpuratus	-----
D_rerio	-----
S_kowalevskii	-----
H_sapiens	-----
M_musculus	-----
B_bufo	-----
X_laevis	-----

533

T_brucei	DGVPVVIELKQEP-----RSSORADTSDISLSHE
T_thermophila	QAALKLK-----SLGNWESVDECAOQLFD-----LKKWGLRPLDLSNVQHIRNGYG
I_multifiliis	LAAQOLK-----DNGIWDSEIECGQLLQD-----LRKWSRLPDOLNISHIRNGYG
C_reinhardtii	VEANLELVPTARAPTURLAAASRANGAGGGGPAAGQLHLCTNLLKGAEEAKKGAQVLG-LSTEFAPVNAIALGHG
S_coeruleus	GFRPN-----TPLLSASAIG-----DAEEIAKHILAD-----VKQFGIKAAENITPMIKHGYG
B_stoltei	ISSPL-----GPVLDDFSFA-----DPREVSKQILSD-----ARSFGAKIPESVTFQSIISLGYG
P_tetraurelia	Q-PI-----KLNYP-----NVEETARLLID-----IKAWGIKLPQQLGSPHISQGGC
H_grandinella	P-EK-----GSQDK-----RLQKRS-----DNIWKQESN
S_purpuratus	-----
D_rerio	-----
S_kowalevskii	-----
H_sapiens	-----
M_musculus	-----
B_bufo	-----
X_laevis	-----

609

T\_brucei D-----LSRTGSSFLDDIAAVLERHS-----AGGAKIDLQDDA  
T\_thermophila DTVCFILNDILNRELIRLNFKFEDPKHTDVONGQOE---TENGVLQDPD---LNEYMIEEEDIQDE  
I\_multifiliis DTICFILNDILNRELIRVNFKFDQPIFKNEQCDQKV-----ILLDSE-----NEESIKEI  
C\_reinhardtii RAVCGLLQDALALTAGRVPLAVR--PLGRAAEAAAEEVADEADGVLEGPAAESVLTAACTGGGAGGYGSDGDDEAEY  
S\_coeruleus EGVCLIIINDLLNRELVRQDYKFGLPVTVIENGNVYKSLN-PQEIVEEII---NFDMPDMLWKDEEDVADY  
B\_stoltei ESVCYLINELLNRELIRRRDFKFLAPTII--NGQEIYKIDTNSGEEIFEEI-----DADFNEENNIMKYNEQVEED  
P\_tetraurelia DMVCFILNDLLNRELIRINFKFESPNGFGKDLLESSVIQVKNKIDNEDLVEI-----QEENE-----NEEVEQD  
H\_grandinella -----  
S\_purpuratus -----  
D\_riero -----  
S\_kowalevskii -----  
H\_sapiens -----  
M\_musculus -----  
B\_bufo -----  
X\_laevis -----

685

T\_brucei A-----ALLCOYKVTNYGLC-----  
T\_thermophila DSIVGEE-----EQGDLLNGQYNKRONGEEAYDYKKIIDEDEMIISNVDPLEWQKECLRVTELONFDLKIK  
I\_multifiliis N-----SINSSYYEEKHEEFINKDIEKNENNIIEKSEINEQDWKKEYKRVYQELHDFDKNIN  
C\_reinhardtii SGSAADQORANESLRPGAASTSGGGGG-AGGGRGGGR-GRGGNPAAVSMTQVDPPIAWRQELERLAPOLGRIKISAE  
S\_coeruleus E-----ENIPKSSSTANSDAVFTKDRINK--DKEKEGKILETNVDPDEWRKEANKVANKLVFSIENDE  
B\_stoltei -----EPPRTESTNISDNVI-----KEEEIAMGIVESSVSPEEWMAEVORIEKOLVYAEEDIG  
P\_tetraurelia E-----LTQSILFYHKKYNNESTDY---NOVPODROVIETKVMANNEWTKEFNRVKEKFSKFEANLK  
H\_grandinella -----  
S\_purpuratus -----  
D\_riero -----  
S\_kowalevskii -----  
H\_sapiens -----  
M\_musculus -----  
B\_bufo -----  
X\_laevis -----

761

T\_brucei -----  
T\_thermophila KNEITACINENDYINNLNRLQKFORGM-----NMQAQLQEPFVNKIIITNWONQLDQIEKGEORING  
I\_multifiliis KFERQ--KQEEYYFNLYKMKQYKKSLL-----KNDI-FEYKSIHDKFYVOLQNLDDIKNGOYIINS  
C\_reinhardtii AAA-----GDWAQRWAOTKEQLSTLA-----GAAPDVRATLGLKLEGVSRDLDRITQTSQORLND  
S\_coeruleus NPIFARVEEIKKLREVN-----KRVNEPOFSKFLEKK--SESVGVELEKIKIGEKKHA  
B\_stoltei LYE-----EDWQSRICQFIESLHNVO-----KFTVEGN-LKYLEKM--TDGLTEELERINKGEVVIQK  
P\_tetraurelia VNKOYL--KDYERTIITISKCKOLSILSEHLKSSEVOEIQOOWINYLELLPKLETNVVTOQIPEN-----  
H\_grandinella -----  
S\_purpuratus -----  
D\_riero -----  
S\_kowalevskii -----  
H\_sapiens -----  
M\_musculus -----  
B\_bufo -----  
X\_laevis -----

837

T\_brucei -----  
T\_thermophila GNIDSINVLKEKVSQKRRFLLDLEOKS-----EovKsoIQNFDSMNEQYKVKKEIVEREKLIITGNDOTNK  
I\_multifiliis GNLENIQILQEQARNKNEFLKELKORS-----EQVELYVKKHLNLLKEONTRIKKQIQEKEKLIITNNNQKQK  
C\_reinhardtii NTREMLAEYAAIRRR---FDALARERRTH-----DELLEMGSAAALHEINEKLEEVQOQIQDKTDGLDGSROVKL  
S\_coeruleus LCCEEQIFKLRGIAEKRLAFRQSEKRNKVAEFC-----ELYDNMQHKLDAITREIERSHDFKSNDKINL  
B\_stoltei FCQKDIDELKLMQKKKELAGKLNVRNKVSQOC-----EEFDKIKEQENTLNKTIEKRVSELNDTNPLEG  
P\_tetraurelia -----VQITLKENRNTISNLQFQISQLNKGNSEKQEIQQOOLNQQLLDVKERTPVLADNRS--K  
H\_grandinella -----  
S\_purpuratus -----  
D\_riero -----  
S\_kowalevskii -----  
H\_sapiens -----  
M\_musculus -----  
B\_bufo -----  
X\_laevis -----

913

T_brucei	-----
T_thermophila	IKDAIQKIKTEIKSMTIKIGVLOSLLSKQLNIELNKFNGS-DDEDGIDDNYLNDLQOSKNNNKNSNTNGEINQG
I_multifiliis	IQEAITNLNKEIKNMNLKIGIIOASIQOKK-----
C_reinhardtii	MHDAMRSMHKEMRKMDVRMGVVRHQLWAKQVGRTLKLSAAAGRSDNDDDDD-----
S_coeruleus	IRSAIKSMKEEVRSLTYKEAIAEQQLDVHRLN-----
B_stoltei	IKAGLLSLKEQIKSLNYETALARFQLDQFSSKG-----
P_tetraurelia	QKQLINQLRNDIRDMDIKIGIMQTOISKQYFHTYDVLSDDEF-----
H_grandinella	-----
S_purpuratus	-----
D_rerio	-----
S_kowalevskii	-----
H_sapiens	-----
M_musculus	-----
B_bufo	-----
X_laevis	-----

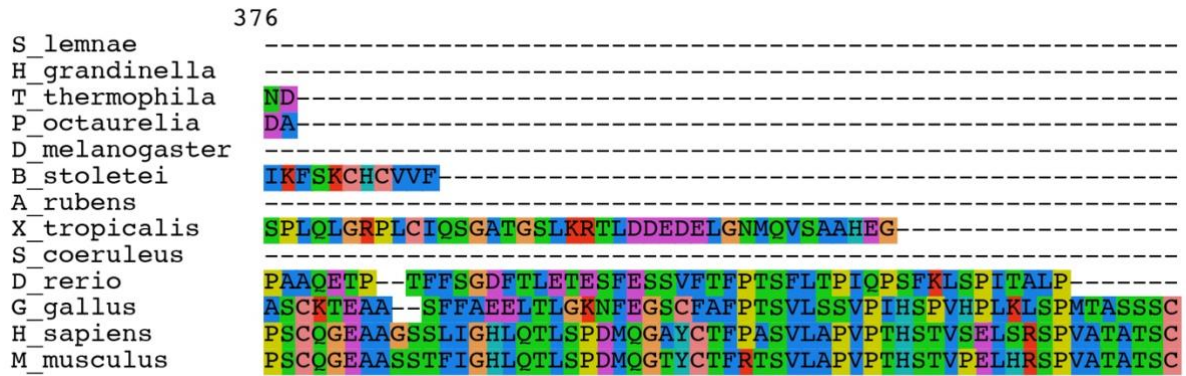
989

T_brucei	-----
T_thermophila	FSDDQNEENLMDISDDNF-----
I_multifiliis	-----
C_reinhardtii	-----
S_coeruleus	-----
B_stoltei	-----
P_tetraurelia	-----
H_grandinella	-----
S_purpuratus	-----
D_rerio	-----
S_kowalevskii	-----
H_sapiens	-----
M_musculus	-----
B_bufo	-----
X_laevis	-----

*Blepharisma stoltei* (CAG9310233.1), *Bufo bufo* (XP\_040260836.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (XP\_001703012.1), *Danio rerio* (XP\_005161552.1), *Halteria grandinella* (TNV84428.1) *Homo sapiens* (AAG13417.1), *Ichthyophthirius multifiliis* (XP\_004035337.1) *Mus musculus* (BAB23676.2), *Paramecium tetraurelia* (XP\_001459232.1), *Saccoglossus kowalevskii* (XP\_002733050.1), *Stentor coeruleus* (OMJ80953.1), *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_030840182.1), *Tetrahymena thermophila* (THERM\_00412070), *Trypanosoma brucei gambiense* (XP\_011772275.1), *Xenopus laevis* (XP\_018087368.1).

# (D) Dusp5

	1	
S_lemnae	-----MEFLEDNDPMLNAQFEP IPEENNKYESRLQ	
H_grandinella	-----	
T_thermophila	MKKSQNFQKNQDYNOSKYYVIRNTGKEEFQYNEDDNOIPQTVTSVOSQKKIQORSOKSFNQISKK	---PSS
P_octaurelia	-----MLNRTDKSSQFRRTNQSLGASKK	---BII
D_melanogaster	-----	
B_stoleti	-----	
A_rubens	-----	
X_tropicalis	-----	
S_coeruleus	-----	
D_erio	MKVS-SIDCRN-----LRKIIRKE-C GNCLIVDCRPYFSF-----SNSCIRGSVNVNLNSVVVR	R
G_gallus	MKVT-SLDCRO-----LRKLLRKE-P SRCLVLDCRPYLSY-----SASCLRGSLNVNLNSVVMR	R
H_sapiens	MKVT-SLDGRO-----LRKMLRKEAA-ARCVVLDLDCRPYLAF-----AASNVRGSLNVNLNSVVL	R
M_musculus	MKVT-SLDGRO-----LRKMLRKEAE-ARCVVLDLDCRPYLAF-----AASSVRGSLNVNLNSVVL	R
	76	
S_lemnae	SRNSLGERNLGIPNLNATTGAGGS-----LSPHKVSRHSSNKSVT	
H_grandinella	-----	
T_thermophila	SNNKEQGGLDPTSQESRRLLQRES-----SSQL-QSRNTOR-----EALSNSHFDLQRESNPQL	
P_octaurelia	SDQ-KSRKELAVPOEDERKMLGSKES-----EKRSQKIGSHOQSR	---KTLRGODDEEKGFV
D_melanogaster	-----	
B_stoleti	-----	
A_rubens	-----	
X_tropicalis	-----	
S_coeruleus	-----	
D_erio	SRGGPVPLQFVLPDEKALFRLE-----GSI SAVVALDDRTPHLOKLLKSDIAQIVINTLSHL	---FSSASIC
G_gallus	ARGGAVPLHFVVPDAAARSLLLGSBGAAGARLAAVVLDQGTGHWQKLLKSDIAQIVNLNALLSSLEPAGARVC	
H_sapiens	ARGGAVSARYVLPDEAARARLQEGG-----GGVAVVVLDQGSRHWQKLRRESAARVVLTSLLACL	---AGPRVY
M_musculus	ARGGAVSARYVLPDEAARARLQEGG-----GGVAVVVLDQGSRHWQKLRRESAARVVLTSLLACL	---AGPRVY
	151	
S_lemnae	-----ASAHQKPEVVG-----KYSGEEDNIICGRFPMDVCACDIQCSIA-----LREINLFEVYPGILMGPYQA	
H_grandinella	-----	
T_thermophila	IG-----EGRIG-----EYEEEEENITCARPHLSFCACIQOTA-----IKEIQLLEVPYGIYLGNFTH	
P_octaurelia	IG-----EGRLD-----EYEEEEEDIVCLRFPHLSFCPYNYQSQ-----LKETLFIETIQPGIYLCGFAM	
D_melanogaster	-----MSWRYASPSRLETSEOTTGRQLQRLVHYSMAPSRALPL-----RRAECAIHDVDCDEVYPGIYIGDAAA	
B_stoleti	-----	
A_rubens	SFLGDIESFSQTNLKKVDTQVTTATGKRLVETRSD-GSFSOKTVEGKSMGFVCDTKPDFQVLEVRPGVLLGSQDV	
X_tropicalis	-----	
S_coeruleus	-----MEEEST-EEPC-----APVAPTENELRLLQOVK-----LILALKYAK-NDNOAAEILPHLYLGSVGA	
D_erio	FLKGGYENFHAHYPELCT-ETRS-----VEVSEDKSERGVSSHCDKLAS--HHKPDY-DQGRPVEILPFLYLGSAH	
G_gallus	FLKGGYETFFSQYPECCV-DGKL-----ISLERSDVERNLTSHCEKQSA--NHKPAY-DQGGPVEILPFLYLGSAH	
H_sapiens	FLKGGYETFYSEYPECCV-DVKP-----ISQEKIESERALISQCGKPVNVVSYRPAI-DQGGPVEILPFLYLGSAH	
M_musculus	FLKGGYETFYSQYPECCV-DVKP-----TSQEKIEGERSLLSQCGKPVLSVAYRPAY-DQGGPVEILPFLYLGSAH	
	226	
S_lemnae	GFKT-KOLIDMGVTHILNVTCR-----EYMKRRRYFKYLDIQIFDNHSEDAKKHFRITNRRFIDEARKSP	
H_grandinella	AFKT-KOLVEMGVTHVNLVTCR-----EYTKRPKYFKYLDVAIYDTHSEDAKKNFRITNRRFIEARKST	
T_thermophila	GLGI-KLLLLKGVTHILNVTAQ-----EYKKRTKYFKYLNIDVYNKSDDEDIKKHFRITNRRFIDCKIIS	
P_octaurelia	GLWT-KYLLQKAVTNVNLNLTSM-----EYTKRTKYFKYLNIDVHNTSDEDIKKHFRITNRRFIRETLIQ	
D_melanogaster	AKNK-TYLRLMGITHVLNAAEGCRYGOVDTGHYSYRDMPSIRYMGFPMDAPTDISRYFYVASKFIDSAISS	
B_stoleti	ANSL-EILTEHGITHILIAAKE-----LQPHFEGSFVYKKIDIDYDOSNADIRKYFGECNQFIDEAISN	
A_rubens	AANL-ELLQKHVTHILNVASG-----IVNFFPNQFIYKSVETIDVPEKDI TGYFAECQFIDAA-KA	
X_tropicalis	AMKSKLSVLQKCGITHVICIRN-----LEANFIKPNFOQLFRYLVDIADNPVENIIRFFPMSKEFIDGCLQ	
S_coeruleus	AMHK-KNLOSAGITHIIVADN-----IKPRFPEIFTYKCVDFLDTCTADLLSILPECFEFDIDDAQRN	
D_erio	ACRQ-DYLSDLHITALLNVSRK-----DSRPARGOYNYKWIPVEDSHTADISSHFQEAIDFIDVRRAA	
G_gallus	ASKC-EFLANLHITALLNVSRK-----SSESFQOYCYKWIPVEDSHTADISSHFQEAIDFIDVRRAA	
H_sapiens	ASKC-EFLANLHITALLNVSRK-----TSEACTHLHYKWIPVEDSHTADISSHFQEAIDFIDCVREK	
M_musculus	ASKC-EFLANLHITALLNVSRK-----TSEACTHLHYKWIPVEDSHTADISSHFQEAIDFIDCVREE	
	301	
S_lemnae	A---OGKVLVHVSVOGKSRAATFILAYLIGKEKMKLKDGLTLLRQYVTEVEPNETFMHQLAEYDLEILSKY	
H_grandinella	SHHGDCVKLVHVSVOGKSRAATFILAYLIGKEKMKLKDGLALLRQFVPEVEPNETFMQQLAEYDLEILSNKF	
T_thermophila	-----GGKVFIDHNLG INIGPCFCCLAYLINNEKIPLKTFGDLME-ROOLQITPNFFKQLERYDLEKLALVTVKKK	
P_octaurelia	-----KGVLIHCRDGLNIGPCFILAYLINEIKMPLKLGIELLOSFPOLDIAVHFYKOLEQYDLEKLALLQIKTK	
D_melanogaster	-----GGKILVHCLVGMRSATCVLAYLMI CRKMSAEDAIRTVRMRR-DINPNDGFLOQLADLDLMELKRKNLYPY	
B_stoleti	-----NGKVLVHCYOGISRSC TIVAAYLIYKKGYSMTLDLKKKHHCPCNDGFIKQLEDEYSONLKHINPGL	
A_rubens	-----TGKVLVHCNAGVSRSPSVVIAYLMS TEGVSLGAILDELGRERPAVRPNDGFMKCLEEYERRLKDKK	
X_tropicalis	-----GGKVLVHCNAGVSRSP TCMAYLMKTKKRLLEAFDYIKORRSLSPNFGFMGQLLOEYSEILSSTPSPPI	
S_coeruleus	-----EGKVLVHCNAGVSRSAAVCIAYVMKSLNISLEAFRHRVRRRQCALPNTGFMROKLYEESLGISG	
D_erio	-----GGKVLVHCNAGVSRSP TCMAYLMKTKKRLLEAFDYIKORRSLSPNFGFMGQLLOEYSEILSSTPSPPI	
G_gallus	-----GGKVLVHCNAGVSRSP TCMAYLMKTKKRLLEAFDYIKORRSLSPNFGFMGQLLOEYSEILSSTPSPPI	
H_sapiens	-----GGKVLVHCNAGVSRSP TCMAYLMKTKKRLLEAFDYIKORRSLSPNFGFMGQLLOEYSEILSSTPSPPI	
M_musculus	-----GGKVLVHCNAGVSRSP TCMAYLMKTKKRLLEAFDYIKORRSLSPNFGFMGQLLOEYSEILSSTPSPPI	



*Asterias rubens* (XP\_033639381.1), *Blepharisma stoltei* (CAG9330279.1), *Danio rerio* (NP\_997730.1), *Drosophila melanogaster* (AAL90399.1), *Gallus gallus* (XP\_040530947.1), *Halteria grandinella* (TNV76132.1), *Homo sapiens* (AAB06261.1), *Mus musculus* (NP\_001078859.1), *Paramecium octaurelia* (CAD8179010.1), *Stentor coeruleus* (OMJ78558.1), *Stylonychia lemnae* (CDW73039.1), *Tetrahymena thermophila* (THERM\_00279780) *Xenopus tropicalis* (NP\_001135695.1). Ramką zaznaczono zachowaną w toku ewolucji sekwencję centrum aktywnego

# (E) Pp2c

1  
B\_bufo MGAFLDKPKMEKHNAQGGHGLRLRYGLSSMQGWRVEMEDAHTAVIGLPLNGLDGSFFFAVYDGHAGSQVAKYCCHELL  
M\_musculus MGAFLDKPKMEKHNAQGGHGLRLRYGLSSMQGWRVEMEDAHTAVIGLPSGLETFWSFFFAVYDGHAGSQVAKYCCHELL  
D\_rerio MGAFLDKPKTEKHNAHGEGNGLRFLGLSSMQGWRVEMEDAHTAAVGLPHGLDDWSFFGVYDGHAGSRVANYCSKHL  
X\_laevis MGAFLDKPKTEKHNAHGAGNGLRFLGLSSMQGWRVEMEDAHTAAVGLRGLDDWSFFFAVYDGHAGSRVANYCSSHLL  
H\_sapiens MGAFLDKPKTEKHNAHGAGNGLRFLGLSSMQGWRVEMEDAHTAAVGLRGLDDWSFFFAVYDGHAGSRVANYCSTHLL  
T\_thermophila MGAYLTKPIIQKETHODSRGRFEYASVCMQGWRVSMEDAHIQSLDFDG--DDKAIFGVFDGHGGKEMAQVFSOHFI  
I\_multifiliis MGCYLSSPITLKDTEKQONNRFYTAVMQGWRTNMEDSHIANLNFDPG--EDKSIFGVFDGHGGKEVAKFVKYFY  
C\_reinhardtii MGAYLSSPITDKEVFEQDGHGLRFGGGAMQGWRRTMEDAHAVEVNVAND--PNVAMFGVFDGHGGAEVAKFCQKYMA  
P\_tetraurelia MGPYLSQPQREKVTTSGEKSVIFAASEMCGWRNTMEDAHIHRPDIIV---QDVSVFGVFDGHGGREVAQFVEKHF  
B\_stoltei MGPYLSSTPKTEKRTSTGESORMRFATSDMCGWRVTMEDARIVNLQLD---ANTALFGVYDGHGGPEVAEFVTRHLC  
S\_coeruleus MGPYLSPIRDKKTSQSENARAKCASCEMCGWRNTMEDAKLVNLSLS---DTSMIFGVFDGHGGKEVAEFVSRHFC  
T\_cruzi MGETLSKPVTEKHTSTFETSHLRVGCCEMCGWRKSMEDAHAQNLNLEGD--KHHAFFGVFDGHNGYKIAKYCSGHIL  
T\_brucei MGETLSKPVTEKHTSTFETSHIHVGCCEMCGWRKSMEDAHAQNLNLEGD--KHHFTFIVFDGHNGKIAKYCREHLL  
S\_purpuratus MGOFLDEPVTAKETS GCENHLCKVAGSCMCGWRINMEDAHTQILAIDDD--KDSAFFAVYDGHGGAKVAQYAGQHLH  
S\_kowalevskii MGOFLSEPVTTKETTRDGNHAFKIGSSCMCGWRINMEDAHTHILSLQED--KDSAFFAVYDGHGGAKVAQYAGKLNH

77  
B\_bufo DHITSNODF-----KGTGQOLSVEVSKSGIRTFGLQIDEHMRVISEKKHG-----  
M\_musculus DHITNNQDF-----RGSAGAPSVENVKNGIRTFGLEIDEHMRVISEKKHG-----  
D\_rerio EHIVAAGSADLRLKAGAPA-PETPAIEAVKRGIRAGFLRIDEHMRSFDDLNRG-----  
X\_laevis EHITDND-----FRATEAPGSALEPTVENVSKGIRTFGLKIDEYMRNFPADLRNG-----  
H\_sapiens EHITDND-----FRATEAPGSALEPTVENVSKGIRTFGLKIDEYMRNFPADLRNG-----  
T\_thermophila KELLRCQAYK-----EGKYKEALEQTFLRMDELAEATEDGKKNQIGD-----  
I\_multifiliis OELKANQSYK-----IGNYTQALEDTFFKMDQLIASADGKRELEN-----  
C\_reinhardtii AELQRFEEFG-----KGSVEDSLVKVFRHMDLEMLRDORYAELEKLSKESNEDEGE GEGGVSTT  
P\_tetraurelia DELLKKNFK-----EOKFEDALKETFLKMDLEMLTPEGAKELNNYKA-----  
B\_stoltei OELLQOAYK-----EGRLDALROSYLRMDELQOTPDGIRELIRISRDLPD-----  
S\_coeruleus OELLSNRSYK-----NRNYEQALKETFLRMDELIKTODGLEKIVIRIAKDLDP-----  
T\_cruzi DELMATPEYR-----EGVYDEAFKKAIFSLDRKLSMPALRS-----  
T\_brucei DELMLTPEYR-----SGSYDEAFKKAIFGAIDSNLSKMSMLRS-----  
S\_purpuratus RKLANQSTYK-----RGEISTAIRESFLKIDEDMLKDEAMKD-----  
S\_kowalevskii HRILQOPAYK-----RGEIEEAIKGGFIALDEDMLEDEAMKD-----

153  
B\_bufo -----ADRSGSTAVGVMI SPHHIYF INCGDSRGLLCSRKVVH  
M\_musculus -----ADRSGSTAVGVLT SPOHTYF INCGDSRGLLCSRNRKVH  
D\_rerio -----MDRSGSTAVAVLLSPEHLYF INCGDSRALLCRSGHVC  
X\_laevis -----MDRSGSTAVAVLLSPNHVYF INCGDSRSLVLYRSGOVC  
H\_sapiens -----MDRSGSTAVGVMI SPKHIYF INCGDSRAVLYRNGOVC  
T\_thermophila -----GNPGCTANVVLIVKDKIY CANSGDSRAIVMKTKEY  
I\_multifiliis -----SNSGCTANVCLIVNKKIY CANSGDSRTVVSQGGKAV  
C\_reinhardtii DALDLLRRVFLQKRFVGGNSNMGEGGSEEPAESPEELVQAGCTAVVAVKFGNELFVANAGDSRGVLCRAGKAV  
P\_tetraurelia -----TDTDES YAGCTANVALIHKNTLYVANAGDSRSVLCRNNTNF  
B\_stoltei -----STPVLINDNVQAGCTAVSALIRGNEIYVANAGDSRCVLSRGGGLAV  
S\_coeruleus -----NYPVQADPSMLVAGCTSVVSLLVNNTLYVANAGDSRCILCRDGKAI  
T\_cruzi -----EGGTAIICVLLAQGEIVCANAGDSRAVLFGRNRAI  
T\_brucei -----EGGTAAICVMLTONEVICANAGDSRAVLYRGTTRAI  
S\_purpuratus -----ELAGTTALITVMKNNKIYCGNVGDSRGVMSISGHAK  
S\_kowalevskii -----ELAGTTAVAVLKNKVF CGNVGDSRAVASVSGOVO

229  
B\_bufo FFTQDHKPSNLEKERIONAGGSVMI---ORVNGSLAVSRALGDFDYKCVHGKG---PTEQLVSPPEVYEIER  
M\_musculus FFTQDHKPSNLEKERIONAGGSVMI---ORVNGSLAVSRALGDFDYKCVHGKG---PTEQLVSPPEVHDIER  
D\_rerio FSTMDHKPCDPREKERIONAGGSVMI---ORVNGSLAVSRALGDYDYKCVHGKG---PTEQLVSPPEVFEIAR  
X\_laevis FSTQDHKPSNPREKERIONAGGSVMI---ORVNGSLAVSRALGDYDYKCVHGKG---PTEQLVSPPEVYEIVR  
H\_sapiens FSTQDHKPCNPREKERIONAGGSVMI---ORVNGSLAVSRALGDYDYKCVHGKG---PTEQLVSPPEVYEILR  
T\_thermophila ALSIDHKPDTDSEKRRIRERAGGTVIQ---GRVNGNLNLSRALGDLEYKVNKPNSSKNPKKEYMITAFPDVETAL  
I\_multifiliis ALSIEDHKPDNLKEKERIQKAGGDVFN---GRVNGNLNLSRALGDLEYKTNMANSONKDKPSFLITAPDIKEFDI  
C\_reinhardtii ALSIEDHKPAQEGERSRIIAAGGFLSEIGGVCRVNGNLNLSRAIGDLKYKTNNELP---PSDQIITAQPDIRKIAL  
P\_tetraurelia DMSVDHKPDNNEEKSRIRERAGGFVSD---GRVNGNLNLSRALGDLEYKSDSKLR---PNEQLIIAFPDVVKTEL  
B\_stoltei ELSMDHKPDLPEELERIRRAGGTVEE---GRVNGNLNLSRSIGDLEYKKNNSIP---QKQDMITAYPDIRRELL  
S\_coeruleus ELSQDHKPELQERDRIKAGGIVED---GRVNGNLNLSRSIGDLEYKKNNSIP---QKQDMISAYPDVRIEEL  
T\_cruzi PLSIDHKPSVATEKARVEKAGGTVOG---ORVNGTLALSRAIGDFDKENPKVS---WEEQIMVTALPEVNRVKW  
T\_brucei PLSIDHKPSAPGEKERILRAGGTVOG---HRVDGNLAVSRAIGDFDYKENSLS---WEEQIVTALPDVTRIDI  
S\_purpuratus PLSFDHKPSNENESKRIIAAGGWVEF---NRVNGNLNLSRALGDFVFKRNLKSG---PEEQIVTAVPDVTEIEI  
S\_kowalevskii QLSFDHKPCNEDETKRIVAAGGWVEF---NRVNGNLNLSRALGDFVFKKNDKKG---AEEQIVTAVPDVIVKDI

305

B_bufo	SEEDDQFIILACDGIWVDMGNEELCDFVRSRLEVTDD---LEKVCNEIVDTCLYKGS-----RDNMSVILICF
M_musculus	SEEDDQFIILACDGIWVDMGNEELCDFVRSRLEVTDD---LEKVCNEIVDTCLYKGS-----RDNMSVILICF
D_riero	SDAEDEFVVLACDGIWVDMTNEEDLCAFVRSRLEVTDD---LERVCNEIVDTSLHKGS-----RDNMSIVLVCL
X_laevis	AD-EDEFIILACDGIWVDMGNEELCEYVKSRLVETDD---LEKVCNSVVDTCCLHKGS-----RDNMSIVLVCF
H_sapiens	AE-EDEFIILACDGIWVDMGNEELCEYVKSRLVETDD---LEKVCNSVVDTCCLHKGS-----RDNMSIVLVCF
T_thermophila	TK-DISLIVLGCDDGIWECKSNQYIIVEYFAKTKONL---TOTCCDFLDSILAPHS---ATTWGLDNMSIIVVKI
I_multifiliis	TQ-ETKFIIVLGCDDGIWECKSNQEIINYFSESNNTMPL---DKRAENFLDSILASSTM---GCNSGLDNMTIIVVKI
C_reinhardtii	SP-EDRFFLLACDGIWVDMGNEELDAVDFVRSARLDQGMTE---SCASCALLDACLASDPKEARGVGCNDNMTVVVVQL
P_tetraurelia	TP-QDKFILMGCDGVFETLNHOELLKHVNTTLGNPVTENLLSKAAEDLLDQLLAPDT---SQTGCDNMTIIVLVL
B_stoltei	TP-NDEFIILACDGIWVDMGNEELDAVDFVRSARLDQGMTE---SAIVEMLDRCLSPETIGANAGLGCNDNMTAVIVQF
S_coeruleus	GR-GDQFLVLACDGIWVDMGNEELDAVDFVRSARLDQGMTE---NAVVEDVLDRCCLAPDIASSGGLGCNDNMTIIVVEL
T_cruzi	TS-EDAFIVIAACDGIWVDMGNEELDAVDFVRSARLDQGMTE---IGLVCEMVLDRCLAPRV---OGVGCNDNMTIIVQF
T_brucei	KE-EDAFVVVACDGIWVDMGNEELDAVDFVRSARLDQGMTE---IGLVCEAVLDRCLAPCI---OGTGCNDNMTIIVARF
S_purpuratus	LP-DSEFLLACDGIWVDMGNEELDAVDFVRSARLDQGMTE---PEKICEDLMTRCLAPDCC---MGGIGCDNMTVVVLVCL
S_kowalevskii	TD-NHEFVVLACDGIWVDMGNEELDAVDFVRSARLDQGMTE---PDOVVIC

381

B_bufo	PSAPKVLPEAVKREAELEDKYLESRVEEIIKKQGEQVPLVHVMRTLATETIPNLPPGGELASKRSVIEAVYNKLN
M_musculus	PSAPKVSAAEAVKKEAELEDKYLESRVEEGSLTKINK
D_riero	PNAPQVSEDAVKRDAELEDKYLESRVEELIEKAGEDGVPDLAHVMSSLSQENIPNLPPGGGLASKHSVIEVYVNRLN
X_laevis	HNAPKVSSEAIKKDADLDKHLSESRVEEIMTNAEEGMPDLAHVMRILAAENIPHLPPGGGLAAKRSVIEEVYVNRLN
H_sapiens	SNAPKVSDEAVKKDSELDKHLSESRVEELNAFESQ
T_thermophila	NHDKR-----
I_multifiliis	KN-----
C_reinhardtii	NSPSSS-----
P_tetraurelia	KK-----
B_stoltei	KHPLN-----
S_coeruleus	KH-----
T_cruzi	KPAFFC-----
T_brucei	KPAFFCSEK-----
S_purpuratus	LOGKSYDELNAKCAKPKSDKCFEIAIPVOL
S_kowalevskii	-----

457

B_bufo	PYRNDDTDSASTDDMW
M_musculus	-----
D_riero	PQREEDGSGADLEDPW
X_laevis	PHRESDGNV
H_sapiens	-----
T_thermophila	-----
I_multifiliis	-----
C_reinhardtii	-----
P_tetraurelia	-----
B_stoltei	-----
S_coeruleus	-----
T_cruzi	-----
T_brucei	-----
S_purpuratus	-----
S_kowalevskii	-----

*Blepharisma stoltei* (CAG9322450.1), *Bufo bufo* (XP\_040267138.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (XP\_001696785.1), *Danio rerio* (NP\_571473.1), *Homo sapiens* (XP\_054198659.1), *Ichthyophthirius multifiliis* (XP\_004039816.1) *Mus musculus* (AAG44661.1), *Paramecium tetraurelia* (XP\_001428225.1), *Saccoglossus kowalevskii* (XP\_002741378.2), *Stentor coeruleus* (OMJ94111.1), *Strongylocentrotus purpuratus* (XP\_782003.3), *Tetrahymena thermophila* (TTHERM\_00585480), *Trypanosoma brucei* (XP\_822740.1), *Trypanosoma cruzi* (EKG01522.1), *Xenopus laevis* (XP\_018119850.1).



# (F) Kif9

1  
C\_reinhardtii -----MVKQAVKVFVTRTRPTATSG-SGLKLGPDGQSVSVNVPKDLA-----GPVNNQOQEQSFKFD  
A\_digitifera -----MLOEGNGRVKVFARIRPTAKFAQDMIELLPDGKSIINIRCKKDLRR-----GYINNQILDWKFHLD  
S\_kowalevskii MSGISSADGRNRKRVHVYARTRPTANFAHDMLEFRPDGKTIIDHGRKDKTKR-----GVVNNQLLDWHFKVD  
H\_sapiens -----MGTRKKVHAFVVRVKTDDFAHEMIRYGDGKRSIDHLLKDDIR-----GVVNNQOTDWSFKLD  
M\_musculus -----MGTRKKVQAFVVRVPTDDFAHEMIKYGEDNKSIDHLLKDDTRR-----GVVNNQOTDWSFKLD  
R\_norvegicus -----MGTRKKVQAFVVRVKTDDFAHEMIKYGEDNKSIDHLLKDDTRR-----GAVNNQOTDWSFKLD  
X\_laevius -----MSSRPSTVVRVAVRVPKTPHFAHEIIRFGEDNKTVDIHLLKDDRL-----GVVNNKRSWDSFKVD  
B\_bufo -----MSAGSSDVRVVRIRPTPHFAQEIIRLGEDNKLVVDVHLRDKDKL-----GVVNNKRYDWSFKVD  
S\_coeruleus -----MVKSSIRVIRTRPTANFASKNLKIDIEKKTIEAFIPKDSDC-----GLINNOQENWFKFD  
P\_tetraurelia -----MVKTPIKVIVRTRPTVEFAYKNININENTGHIAINIPKSAEQGMNIDFKLK-----GAVNNHQQEDWGFTFD  
T\_thermophila -----MVKAPIKVVVRTRPTANFAYKNIIINENTNQISINIAKNADS-----GYVNHQQENWGFHFD  
I\_multifiliis -----MVKTPIKVIVRTRPTANFAYKNIIINENTNQISINIAKNADS-----GYVNHQQENWGFQFD

77 Walker A  
C\_reinhardtii GVLNVSOEAAAYTTLAHEVVDLSMAGYHGTIFAYGOTGAGKFTTMSGGGTAYAHRGLIPRAIHVVFREVDMDRADKM  
A\_digitifera GVLHNTSOSDVDFDECAEDIVTKALTYGNGTILAYGOTGAGKFTTMTGSTEKFOHRGIIPRAIQOIFREIREMREHS  
S\_kowalevskii GILHNASQDEVYENASRMVNNLLBGYNGTLMCYGOTGAGKFTTMTGATENYKHRGILPRSLAQVREVEDRSEHA  
H\_sapiens GVLHDASQDLVYETVAKDVVSQALDGYNGTIMCYGOTGAGKTYTMMGATENYKHRGILPRALQOVFRMIEERPTHA  
M\_musculus GVLHNASQDLVYETVAKDAVVSQALDGYNGTIMCYGOTGAGKTYTMTGATENYKHRGILPRALQOVFRMIEERPTHA  
R\_norvegicus GVLHDASQDLVYETVAKDAVVSQALDGYNGTIMCYGOTGAGKTYTMTGATENYKHRGILPRALQOVFRMIEERPTHA  
X\_laevius GLLHNASQDVTYDVAKSVVSQALDGYNGTIMCYGOTGAGKFTTITGGTENYKLRGIIPRALQOVFKIEIEGKSDOS  
B\_bufo GILHNATQAAVYDMVAKSVVSQALDGYNGTIMCYGOTGAGKTHITGATENYKNRGIIPRALQOVYKIEAEOQDCT  
S\_coeruleus EFLHNSTQEEVYDTCGRDIIHSVLEGGYNGTVFAYGOTGAGKTYTMSGGSONYKFRGIIPRAISQIFNEIOSKPEFS  
P\_tetraurelia KVLQNASQEVVFDICGKELIHSALGGYSGTIMAYGOTGAGKFTTMMGSOIDYKRYGMMPRCISLLFOEIEARYEQO  
T\_thermophila KVLQNVSOEVMFVCAKDIVLSVLEGGYSGTIMCYGOTGAGKFTTMTGTTDYKYRGLIPRCISQLFOEVGQRYEQO  
I\_multifiliis KVLQNVSOEVIFDICKDIIISALEGGYSGTIICYGOTGAGKFTTMTGTTDYKYRGLIPRCLSLFOEIQRYEQO

153  
C\_reinhardtii YRVHVSYLEIYNEQLYDILLGDTPTGSDA---LAVLEDSNSNTYVRGLTLVPRVEEALAQFFLEGGRTTAGHV  
A\_digitifera ISVRSIYSEIYNERMFDLLGSLPGVPPDPSLMAVTEDDDGYTRVKGLSVHQANSEEEALNLLFEGETNRIIGOHS  
S\_kowalevskii ITVRSIYSEIYNETMFDLLSTLPESIQSVQPM-TIVEDDQGGVSVKGLSVHLANTSEEEALNLLFEGETNRIATAHS  
H\_sapiens ITVRSIYSEIYNESLFDLLSTLPYVGPSVTPM-TIVENPO-GVFIKGLSVHLTSQEEADAFSLLEGETNRIIASHT  
M\_musculus ITVRSIYSEIYNEFLDLLSTLPYVGPSVTPM-TIVENPO-GVFIKGLSVHLTSQEEADAFSLLEGETNRIIASHT  
R\_norvegicus ITVRSIYSEIYNEFLDLLSTLPYVGPSVTPM-TIVENPO-GVFIKGLSVHLTSQEEADAFSLLEGETNRIIASHT  
X\_laevius ITVRSIYSEIYNETLYDILLSTVPDASAPDQOM-TIVDDAQ-GVFIKGLSVHLNLANSEEQALNLLFEGETNRIIGSHV  
B\_bufo VTVRSIYSEIYNETLLDSSMPDVPASDQOM-TIVDDPH-GVFIKGLSVHLAQAGEEHALNLLFEGETNRIIGSHT  
S\_coeruleus YVVKVSFAEYIYNEIYDLSST-PPSEOTGNI-MIQDDPKFGITVKGLTHVLCGSEEDALNQVFEGETNRIITAEHK  
P\_tetraurelia ITVGVSYLEIYNEMLDLAGG---DQNTGL-AIQEDNNGYVQVGLTIKCKOTEEDAIQVFEGETNRIITSEHK  
T\_thermophila ITVGVSYLEIYNEMLDLAGSVAPNDQTOOL-AIQEDTNGRVHVKNQIIRCKTEEEAQAMIFEGETNRIITSEHK  
I\_multifiliis ITVGVSYLEIYNEQLSDLLIGQNSDNVNSQL-AIQEDNMGNVHVKNQIIRCKTEEEAQAMIFEGETNRIITSEHK

229 Switch I Switch II  
C\_reinhardtii LNASSRSRSHCVFTIHVEMRTSDAASERAVLSKLNLDLAGSERTKKTGVTGOTLKEAQFINRSLSPLEQTVNALSR  
A\_digitifera LNKRSSRSRSHCVFTIHIESHSRVSNTKFFVTSKLNFDLAGSERLGLTSEGETQVEAMYINKSLTFLQAVIALGD  
S\_kowalevskii LNSVSSRSRSHCVFTIHIESRRTESNAKYIKSKLNLDLAGSERLGLTGSAGKTAMEAMYINKSLSPLEQTVIALGD  
H\_sapiens MNKNSSRSRSHCVFTIYEAHSRTLSDEKYITSKINLDLAGSERLGLTGSAGKTAMEAMYINKSLSPLEQTVIALGD  
M\_musculus MNKNSSRSRSHCVFTIYEAHSRTLSDEKYITSKINLDLAGSERLGLTGSAGKTAMEAMYINKSLSPLEQTVIALGD  
R\_norvegicus MNKNSSRSRSHCVFTIYEAHSRTLSDEKYITSKINLDLAGSERLGLTGSAGKTAMEAMYINKSLSPLEQTVIALGD  
X\_laevius LNKNSRSRSHCVFTIHVESRSRIVSDAKYTMKINLDLAGSERLGLTGSAGKTAMEAMYINKSLSPLEQTVIALGD  
B\_bufo LNKNSRSRSHCVFTIHLESRSRTLSNAKYITVVKINLDLAGSERVGTGSAGOVLEKATYINKSLSPLEQTVIALGD  
S\_coeruleus LNKNSRSRSHCVFTIYEAHSRTLSDEKYITSKINLDLAGSERTKKTGSEGLTTEANFINKSLSPLEQTVIALGD  
P\_tetraurelia LNKASSRSRSHCVFTIHLESRSRIVSDAKYTMKINLDLAGSERTKKTGSEGLTTEANFINKSLSPLEQTVIALGD  
T\_thermophila LNKNSRSRSHCVFTIHLESRSRIVSDAKYTMKINLDLAGSERTKKTGSEGLTTEANFINKSLSPLEQTVIALGD  
I\_multifiliis LNKQSSRSRSHCVFTIHLESRSRIVSDAKYTMKINLDLAGSERTKKTGSEGLTTEANFINKSLSPLEQTVIALGD

305  
C\_reinhardtii -KDTYVPPFROTKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
A\_digitifera RRRDHVPPFROTKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
S\_kowalevskii RKRHPIPYRQSKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
H\_sapiens OKRDHPIPFROTKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
M\_musculus QNRDHVPPFROTKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
R\_norvegicus QNRDHPIPFROTKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
X\_laevius RSRDHPIPFROTKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
B\_bufo -HRDHVPPFROTKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
S\_coeruleus KNRDHVPPYRQSKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
P\_tetraurelia KORDHPIPYRQSKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
T\_thermophila KORDHPIPYRQSKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE  
I\_multifiliis KORDHPIPYRQSKLTHALVLRDALGGNCKIVMVAANIWAEPHNEETLSTLRFASRVRTLTDLALNESNDPALLRRYE

381

C\_reinhardtii **RQIKELKAE**LAMRDTLSGKGRVSYDDLTDDELRELHATCRRFLHGEAEPEDLPADSMKRVRETFKALRAVHVAIK  
A\_digitifera **KEIRTLRQEL**AMHDTLNRSQISYELPSESQIHDVREOVKRF~~LAELNE~~IELVNVROIKETFAQFRVILNSVQS  
S\_kowalevskii **REIISLQEL**AMHDTLNRSQVSYEPLSDSOLYEIQRVQRYLEGLDDEIDIVNVROIQAVFSSFGKVMNQMES  
H\_sapiens **KELALLQEL**AIHDSLNRRTFVYTPDMEIQIAEINSQVRRYLEGLTDEIDIIISLROIKEVFNQFRVVLSSQEQ  
M\_musculus **KELALLQEL**AIHDSLNRRLVNYDPMDEIQIAEINSQVRRYLEGLTDEIDIIINLROIQEVFNQFRVVLSSAR  
R\_norvegicus **KELALLQEL**AIHDSLNRRLVNYDPMDEIQIAEINSQVRRYLEGLTDEIDIIINLROIQEVFNQFRVVLSSAR  
X\_laevis **KEIDHLRQEL**AIHDSLNRRTVSYEPNESQIAEINTQVRRYLDGTVDEIDIRNLROIQEIFNQFKLILSQEQ  
B\_bufo **REIDHLRREL**TLHDTLTKRPSANYEPTFDNQIAEINSQVRCRYLDGNLDEIDILNLROIQEVFNQFRVVLSSAR  
S\_coeruleus **REIRDQLQEL**AMHDTLANRGRVVYEAYTPEQQYQIQLAERYLEGDLDEVDIESLQVRELFNQRIRHYRKTMT  
P\_tetraurelia **KEIKDLRQEL**AMHDTLANRGRIQEYEPYTPQQYQKQQIAQQFLNGELEDIDIDSLRQVKELFFQFRNLRYNLVK  
T\_thermophila **KEIKELQEL**AMHDTLANRGRITYDQYTPQQYEQQVLAKKFLDGEIDDIEFESLQVVKELFFQFRNLRYNLAK  
I\_multifiliis **KEIKELQEL**AMHDTLANRGRITYDQYTPQQYEQQVLAKKFLDGAIEDIEFESLQVVKELFFQFRNLRYNLAK

457

C\_reinhardtii **DMATQMATLRRA**TEEGSGAAANGGDSAGP---SGVGDVDLRATGGFTVGHAPLDARPPVRELSGSPGAGA--SG  
A\_digitifera **GMEERLQKQ**SVREDREGATSTAGGKTRTLRDL---DVRLLVGVDGQGFVGVVSAPGVKPNVSTLLGTRKRVRSRQK  
S\_kowalevskii **QVENLRAKF**TLIDRADPNIAAAQKAGVVDENGEVSYVGDVDRONFGIGIAPSSSKPASSVVAARRVKSRKS  
H\_sapiens **EVESLRRKY**TLIDRNDFAAISAIQKAGLVD---VDGHLVGEPEGQNFGLGVAPFSTKPKKAKSK---  
M\_musculus **KEGASSP**---VSGKDFDVAS-ISKTQILIP-SSKDGDLKMLARERETSSIEPLIS-----DSP-----  
R\_norvegicus **KEGASSP**---VSGKDFDMS-ISKTQILIP-SSKEGDLKMLVRETERETSSIEPLIS-----DSP-----  
X\_laevis **EAEARLRKY**TLIDKTDVTVTAAQKAGLLD---TDGRMVGEVDGQSPFGIGVAPGSSKPSSSLQFSARKSKSRKS-  
B\_bufo **EVEARLRKY**TLIDKNNYTAIATAQKAGVLD---PDGKLVGEVDGSSFGIGVAPFSSKSNRS--LSARKSKSRKS-  
S\_coeruleus **RLGAEDLNRSR**PATNKTGTLKGNKAEAFVEE---REEGVQEEHSGGFLGRANPNRSPVDS--SALEPKNQFV-  
P\_tetraurelia **DLENKNYVPR**TEKEPD---V-SKKKSDQVK---TVDPVGYEENKNGFLGKARKDAKPTNIENLVNIPKDEFK-  
T\_thermophila **DIENKNYIET**KRDQDD---TIQKKKTDQASK---QQEAVGSEENKNGFLGKARKDARPOANIENLVNIPKDEF-  
I\_multifiliis **DVENKNYVDA**RLEQKD---TNVNKKVDQ-TK---QQNQVGVEENKNGFLGKSSKDARPOANIENLVNIPKDEF-

533

C\_reinhardtii **AEAL**-----GEPSPGGGLHAOASSH-TDA-----GSNWGDAGPLSSPGGTRLAGIFGV  
A\_digitifera **KERDSAKSAF**HGGVGGTDRQ-----GGDDGQNRPOSSG-QSPTORAVT  
S\_kowalevskii **KERASPPSKS**-GAPSSPVPSLTOTENSSPTR-----QPPDTRESMAGADATSVSGSAGAVG-DQMAPREST  
H\_sapiens -----KT-FKEPLRPDT  
M\_musculus -----KE-ELRAPRST  
R\_norvegicus -----KE-ESRRLRPST  
X\_laevis **KERSSPVSRK**-EGVGSPLVKGQEALSSSKSYLLTASARELDLKETAVKEQPELGNLDPQAEATV-KEDRSLSSS  
B\_bufo **KDLSSPTGRR**-DGAASPAIGKDLAASPSKT-MMSMSFRELVDVRESAIKEQENVTMDTORSEMAA-KEETSRRPT  
S\_coeruleus -----QEE-IEEKK-VSSREE-AKKAS-ANKSPKKVP  
P\_tetraurelia -----OLDE-KAQOE-LRKEQITEANK-ESTIEKRIV  
T\_thermophila -----EQKF-QENVI-EK-PGSPKE-KSKLDNKIV  
I\_multifiliis -----QOK-LEOTQ-EKTVKSPK-KNKLENKII

609

C\_reinhardtii **SGDRNAVFR**RYKVDVGEGRLEAASLKAASIALADTKASIRSLGASVNDKQRIDELSSALALRRGATPAG-----  
A\_digitifera **PPPKNDAFEE**FKO--ERGSEINRILNQNEKILRQKKKAKELSCSVNSLKDDINDIGVTLENREHERLEQGEFRD  
S\_kowalevskii **PPLRTVAFEE**FKH--EKGSEINRILTENKDLISQKKQCRDLAKTINGKTEIDTTREALEMKRSDRMEQGEFVNE  
H\_sapiens **PPSKPVAFEE**FKN--EQGSEINRIFKFNKSIILNERKRASETTOHINAIKREIDVTKEALNFQKSLREKQGGYEN-  
M\_musculus **PPSRVAFEE**FKN--ERGSEINRIFKFNKSIILNERKRASETTORINAIKQIEDTKDALNFQKSLREKQGEYEN-  
R\_norvegicus **PPSKPVAFEE**FKN--ERGSEINRIFKFNKSIILNERKRASETTORINAIKQIEDVTKEALNFQKSLREKQGEYEN-  
X\_laevis **PPPKSAFEE**FKV--ERGSLENRIFKFNKSTILADRKRRLKDVFORINLMKKEMDTTTTLNLVAKIEREKQGEYINE  
B\_bufo **PPPKSAFEE**FKA--ERGSLENRIFKFNKSTLAEQGRKLEKVTORINLIKKEIDTTTQNLNLAKLEREKQGEYISD  
S\_coeruleus **LIDKNQAFME**FKN--GEGKEIDSTLNEKEDLKERKNRISLTDEVNGLKLLIDECKDNLDSIRSERHN-----  
P\_tetraurelia **NVDKQQAFT**DFKN--KEGSSINQQILENINLQKKEKESIIISLSEVSIQLKQRIERKKGVIEQKQLNKNO-----EE  
T\_thermophila **NVDKQVAQD**FKD--KEGKRYNDSIVKNIEALKEKKEEIKQVTNLCNDIKNEIENLKLKDKKQANKNO-----EE  
I\_multifiliis **NVDKQSYQEF**KD--TEGKELNLQIVKNVKELEKENKEEIIHLTNLCNEIROEIEKIKIALDKKQENKNO-----EE

685

C\_reinhardtii **GDGEVLDSE**AYALMQLKSAKSRYRTDFDSLKSAREELEPQIQAVAVARAGLLEAFDRWAAAQSDTTLKRM---AT  
A\_digitifera **DGOVIDE**DEYELLRKIKELKLLYRDYEELNNTKSEVIYCEKLVSQCRORLLEFDNWAESFLGDDNAA-----  
S\_kowalevskii **DGETVIDE**EEFMLIKLKLKDLSSYSRSDYDELRDVKEVOYQCKLVDCRORLIQEFDTWYSQSFLLTTSDEOSSAQA  
H\_sapiens **KGLMIIDEE**FLILKDLKQYRSEYQDLRDLRAEIQYCOHLVDQCRHRLLMFEDIWYNESFVIPEDMQALKP  
M\_musculus **KGLMIIDEE**FLILKDLKQYRNEYQELRDLRAEIQYCORLVDQCRHRLLMFEDIWYNESFVIPEDVQALKL  
R\_norvegicus **KGLMIIDEE**FLILKDLKQYRNEYQELRDLRAEIQYCORLVDQCRHRLLMFEDIWYNESFVIPEDVQALKL  
X\_laevis **EGQVIDE**HEFLLIVRLKDLKQYRADYEELQDLRAEVTYCOKLVDCRORLLEFEVWYNESFVISEDMSLKF  
B\_bufo **EGQVIDE**HEFGLICRLKDLKQYRADYDELQDLKAEVOYQCKLVDCRORLLEFEVWYNESFVIVEE--NSVKL  
S\_coeruleus **EEEDVIDE**EEFALIKLKDYYKAYRSDYDLKASKDEINAIQSONIEFARDKLIAEFEIWEYKFGNQPETMSRESA  
P\_tetraurelia **IAQGIIDEE**EYVTLKELKELKQENIKNLKSEIILIDQSIQVQSKQALVSKFEEHFLKKGVLTLQDINNPLV  
T\_thermophila **ILQRIIDEE**EYIEMQOLKEKKNYKQYAOQVLDKSTIIIDQNIHTKNVLLNKFEWFQKKYGISVNDIENPLI  
I\_multifiliis **IQQGIIDEE**EYIQMQLKELKDYKLYANOVKELKSTIIIDQTITNCKNQLSRFEEWFQKKYGISVNDIENPLI

761

```

C_reinhardtii AGRAMSGIAPG--EEDEMDAGEQFERMOIARISERDPDSLAFHTALKRTGAAVSRP-----ATV
A_digitifera -----PTIGRVVQVPEDEQEKFDRLQLDLL-MEHPDSVPYYNAKMOTERRMHLG--GS--GGSOKRRRPGAI
S_kowalevskii GFGARLGT---TYNAEPEDEGERFERLOMELL-MENPDSAAFYNAKMRTERRQTYE---AAMGQAQPSLRKPGTP
H_sapiens GGSIRPGMVPVNRIVSLGEDDQDKFSQLOQRVL-PEGPDSISFYNAKVKIEQKHNYL---KTMVGLQQAHRK---
M_musculus GSSIRPGMVPISRIVCLGEDDQDRFSLHQQTVL-PEGLDSITFYNAKVKTDQKHNYM---KTMVGLQOQSHRK---
R_norvegicus GSSIRPGMVPITRIVCLGEDDQDRFSQLOQTVL-PEGPDSISFYNAKVKTEQKHSYM---KTMVGLQOQSHRK---
X_laevis GGSIRPGLIPANKLLALGEDEQETLERLQOELL-MEVPGSLPFHNARSNVEKKHKYS---RATAQLTPSKKKPNVI
B_bufo AGPLRSWMIPVVKLLSLGEDDQERYDKLOELL-MEAPGSLPFNNARIQSDRKHNS--RGQAQLPPTKKRPGII
S_coeruleus -----R-----ERPOTEKTNDD-----LDLDAFAYIKAKRNVO-----TLHKAKKVLGAV
P_tetraurelia NQKE-----EYSINDPSEODD-----VDQDALAYIRAKNK-----VTOLQKARKQEKMH
T_thermophila NOPSE-----ENITDNK--SED-----IDPDALAYIKAKKK-----VTOLQKARKMEKFK
I_multifiliis NOPSE-----DNISNNK--SED-----LDQDALAYIRAKKMYLYIYNIYLFIFKVSQLOKARKIEKNK

```

837

```

C_reinhardtii ATGGNAKAAAMATRKMEHTQAVNRGLAR
A_digitifera IATVRNQPPTRLTVT
S_kowalevskii TITVHNLPPSMLVQY
H_sapiens -----
M_musculus -----
R_norvegicus -----
X_laevis TSTIKNKPPSMLSAA-----
B_bufo TSSVKNKPPSVLTAV-----
S_coeruleus GKA-----
P_tetraurelia K-----
T_thermophila N-----
I_multifiliis N-----

```

*Acropora digitifera* (XP\_015751183.1), *Bufo bufo* (XP\_040287413.1), *Chlamydomonas reinhardtii* (P46870.1), *Homo sapiens* (NP\_071737.1), *Ichthyophthirius multifiliis* (XP\_004039271.1), *Mus musculus* (EDL09012.1), *Paramecium tetraurelia* (XP\_001455832.1), *Rattus norvegicus* (EDL77078.1), (*Saccoglossus kowalevskii* (XP\_002737743.1), *Stentor coeruleus* (OMJ90760.1), *Tetrahymena thermophila* (THERM\_00502590), *Xenopus laevis* (XP\_018124453.1). Ramkami zaznaczono sekwencje znanych motywów domeny motorycznej kinezyiny umożliwiające wiązanie ATP.

Białko Mapk3 *Tetrahymena* (ang. *Mitogen-activated protein kinase 3*) jest niewielkim białkiem zbudowanym z 413 aminokwasów o teoretycznej masie cząsteczkowej wynoszącej około 49 kDa. Analiza filogenetyczna wykazała, że białko to jest zachowane w toku ewolucji od pierwotniaków do człowieka, oraz jest w 49% identyczne i w 69% podobne do ludzkiego białka Mapk3.

Druga z badanych kinaz – kinaza Map2k7 (ang. *Mitogen-activated protein kinase kinase 7*) u orzęska *Tetrahymena* zbudowana jest z 469 aminokwasów i posiada teoretyczną masę cząsteczkową wynoszącą około 54 kDa. Białko to jest zachowane w toku ewolucji oraz jest w 24% identyczne i w 48% podobne do ludzkiego białka Map2k7.

Kinaza Nek6 (ang. *never in mitosis A-related kinase 6*) *Tetrahymena* zbudowana jest z 755 aminokwasów a jej teoretyczna masa cząsteczkowa wynosi około 88 kDa. Co ciekawe analiza filogenetyczna wykazała, że białko to, jest zachowane w toku ewolucji od pierwotniaków do człowieka (ludzki ortolog białka Nek6 jest w 49% identyczny i w 69% podobny do białka *Tetrahymena*) jedynie w części aminowej białka, gdzie znajduje się domena kinazy.

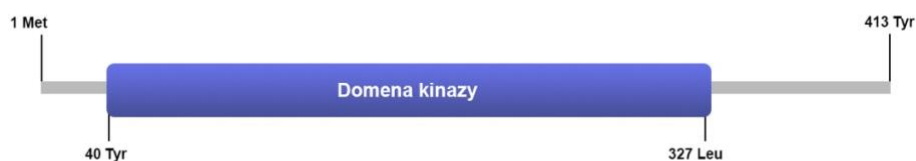
Fosfataza Dusp5 *Tetrahymena* zbudowana jest z 314 aminokwasów. Jest to małe białko o teoretycznej masie cząsteczkowej wynoszącej około 36 kDa. Białko Dusp5 *Tetrahymena* jest w 30% identyczne i 50% podobne do ludzkiego białka Dusp5.

Białko Pp2C orzęska *Tetrahymena* to również niewielkie białko zbudowane z 293 aminokwasów, którego teoretyczna masa cząsteczkowa wynosi około 33 kDa. Jest to białko bardzo dobrze zachowane w toku ewolucji – w 35% identyczne i 51% podobne do ludzkiego białka PPM1B (Pp2c-Beta).

Badana kinezyzna Kif9 orzęska *Tetrahymena thermophila* zbudowana jest z 717 aminokwasów, a jej teoretyczna masa cząsteczkowa wynosi około 83 kDa. Przeprowadzona analiza filogenetyczna wykazała, że białko Kif9 jest dobrze zachowane w toku ewolucji od pierwotniaków do człowieka. Białko to jest w 40% identyczne i w 59% podobne do ludzkiego białka Kif9, a w 37% identyczne i 54% podobne do białka KLP1 glonu *Chlamydomonas reinhardtii*.

## 5.2 Analiza budowy i sekwencji białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Dups5, Pp2c i Kif9

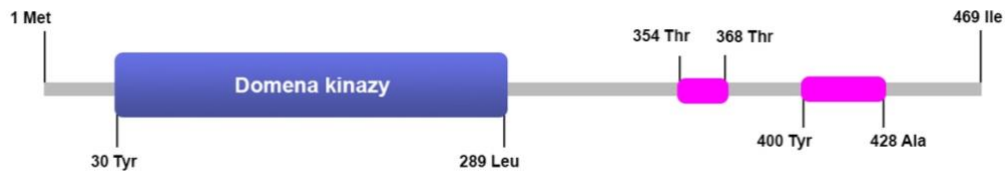
Analiza domenowa białka Mapk3 *Tetrahymena* wykazała, że w jego sekwencji obecna jest domena kinazy serynowo-treoninowej, która stanowi większą część białka (Ryc. 13). We wszystkich sekwencjach Mapk3 odnaleziono motyw DFG, biorący udział w wiązaniu jonu magnezu i niezbędny dla funkcji katalitycznej białka oraz motyw HRD stabilizujący wiązanie między centrum aktywnym enzymu a miejscem wiązania substratu.



Ryc. 13 Schemat budowy białka Mapk3 utworzony na podstawie danych, uzyskanych przy pomocy programu SMART. Kolorem granatowym oznaczono domenę kinazy.

W sekwencji białka Map2k7 bliżej końca aminowego znajduje się domena o aktywności kinazy o podwójnej specyficzności. Natomiast bliżej końca karboksylowego znajdują się dwa krótkie regiony o niskim poziomie skomplikowania (Ryc. 14).

W analizowanych sekwencjach występuje motyw HRD, jednakże u *Tetrahymena thermophila* oraz *Paramecium tetraurelia* arginina (R) została zastąpiona przez glicynę (G). Motyw DFG u części organizmów został zastąpiony przez sekwencję DLG. Natomiast u *Tetrahymena thermophila* oraz *Paramecium tetraurelia* motyw ten nie jest zachowany – co może sugerować brak funkcji katalitycznej tej kinazy.



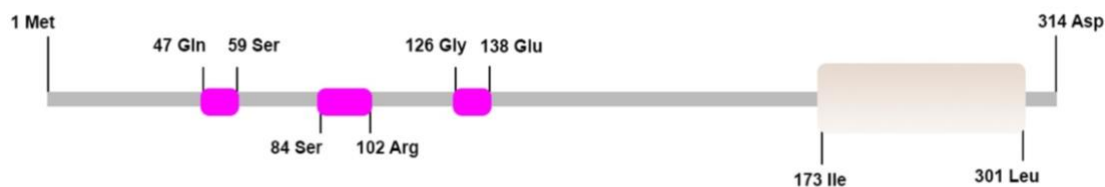
Ryc. 14 Schemat budowy białka *Map2k7* utworzony na podstawie danych, uzyskanych przy pomocy programu SMART. Kolorem granatowym oznaczono domenę kinazy o podwójnej specyficzności, a kolorem różowym regiony o niskim poziomie skomplikowania.

W przypadku białka *Nek6 Tetrahymena* zidentyfikowano dwie domeny – na końcu aminowym białka znajduje się domena kinazy serynowo-treoninowej a tuż za nią domena IFT57 (ang. *Intraflagellar transport protein 57*) oraz krótki region o niskim poziomie skomplikowania (Ryc. 15). W domenie kinazy dobrze zachowany jest motyw HRD, natomiast zamiast motywu APE znaleziono motyw SPE zlokalizowany w podobnej odległości od motywu HRD w jakim znajduje się motyw APE w innych kinazach. Sugeruje to, że u *Nek6* motyw SPE mógłby pełnić funkcję wiązania substratu, podobnie jak motyw APE u innych kinaz. W przypadku motywu DFG, motyw o tej sekwencji zlokalizowano jedynie u *Trypanosoma brucei* u pozostałych organizmów w tym miejscu znajduje się motyw o sekwencji DLG. Zidentyfikowana domena IFT57 zachowana jest tylko u analizowanych pierwotniaków z wyjątkiem *Halteria grandinella* (Ryc. 12C) i może świadczyć o udziale tego białka w transporcie wewnątrzrzęskowym.



Ryc.15 Schemat budowy białka Nek6 utworzony na podstawie danych, uzyskanych przy pomocy programu SMART. Kolorem granatowym oznaczono domenę kinazy, kolorem zielonym domenę IFT57, a kolorem różowym regiony o niskim poziomie skomplikowania.

Białko Dusp5 *Tetrahymena* posiada na końcu karboksylowym domenę fosfatazy o podwójnej specyficzności (ang. *dual-specificity phosphatase*), a na końcu aminowym trzy regiony o niskim poziomie skomplikowania (Ryc. 16). Fosfatazy o podwójnej specyficzności są zdolne do defosforylacji zarówno reszt tyrozynowych jak i serynowo-treoninowych oraz charakteryzują się obecnością silnie zachowanego w toku ewolucji motywu centrum aktywnego: HCXXGXXRS(T), gdzie X oznacza dowolny aminokwas (Denu i Dixon, 1995). Cysteina znajdująca się na drugiej pozycji w centrum aktywnym, jest niezbędna dla funkcji katalitycznej enzymu (Wishart i Dixon, 1998). W przypadku analizowanych sekwencji białek Dusp5 motyw ten jest dobrze zachowany w toku ewolucji, jednak u *Xenopus tropicalis* zamiast cysteiny (C) występuje glicyna (G), a u trzech z pięciu badanych orzęsków zamiast cysteiny jest – u *Halteria grandinella* i *Stylonychia lemnae* seryna (S), a u *Tetrahymena thermophila* kwas asparaginowy (D). Może to oznaczać, że u tych organizmów fosfataza jest nieaktywna (pseudofosfataza) i pełni pośrednią rolę w regulacji fosforylacji i/lub lokalizacji innych białek w rżęsce (Ribeiro i in., 2019).



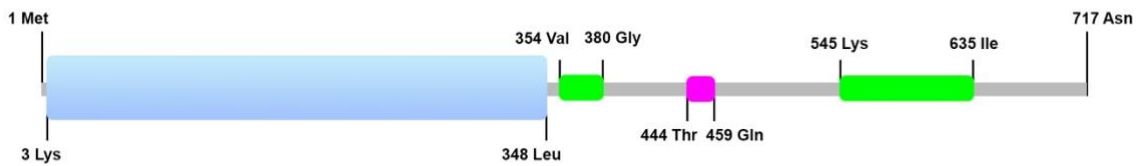
Ryc. 16 Schemat budowy białka Dusp5 *Tetrahymena* utworzony na podstawie danych, uzyskanych przy pomocy programu SMART. Kolorem beżowym oznaczono domenę fosfatazy o podwójnej specyficzności a kolorem różowym regiony o niskim poziomie skomplikowania.

W sekwencji aminokwasowej białka Pp2c *Tetrahymena* większą część zajmuje domena fosfatazy serynowo-treoninowej (Ryc. 17). Ponadto w obrębie tej domeny zachowane są aminokwasy biorące udział w wiązaniu jonu metalu niezbędnego dla funkcji katalitycznej enzymu jak np. kwas asparaginowy (D) w pozycji 234 u *Tetrahymena* (pozycja 317 zestawienia sekwencji) (Das i in., 1996).



Ryc. 17 Schemat budowy białka Pp2c utworzony na podstawie danych, uzyskanych przy pomocy programu SMART. Kolorem żółtym zaznaczono domenę fosfatazy

Białko Kif9 *Tetrahymena* posiada domenę motoryczną kinezyiny zlokalizowaną na końcu aminowym białka oraz dwie domeny tworzące superhelisy (ang. *coiled-coil domain*) – jedna tuż za domeną kinezyiny i druga na końcu karboksylowym białka (Ryc. 18). W przypadku białek motorycznych domeny te mogą regulować oddziaływania z transportowanymi cząsteczkami (ang. *cargo*) tym samym umożliwiając przemieszczanie wzdłuż mikrotubul (Trubestein i Leonard, 2016). Pomiędzy superhelisami znajduje się krótki region o niskim poziomie skomplikowania. Analiza sekwencji wykazała, że w toku ewolucji zachowane zostały również typowe motywy domeny motorycznej kinezyiny umożliwiające wiązanie ATP: motyw Walker A: GXXXXGKT/S (Walker i in., 1982), motyw Switch I: NXXSSR oraz motyw Switch II: DXXGXE (Kull i Endow, 2002) (gdzie X oznacza dowolny aminokwas). Sama domena motoryczna kinezyiny białka Kif9 *Tetrahymena* jest w 50% identyczna z domeną kinezyiny białka Kif9 człowieka. U wszystkich analizowanych ortologów białka Kif9 sekwencja motywu Walker A oraz Switch II jest identyczna, odpowiednio: **GQTGAGKT** oraz **DLAGSE**. W przypadku motywu Switch I, u większości analizowanych ortologów ma on sekwencję **NKNSSR**, jedynie u *Chlamydomonas reinhardtii*, *Acropora digitifera* i *Saccoglossus kowalevskii* dwa dowolne aminokwasy w motywie Switch I są inne (pogrubieniem oznaczono dowolne aminokwasy). Dane te wskazują, że zarówno białko Kif9 jak i jego domena kinezyiny są bardzo dobrze zachowane w toku ewolucji, tak więc aktywność motoryczna tego białka również może być zachowana.



*Ryc. 18 Schemat budowy białka Kif9 utworzony na podstawie danych, uzyskanych przy pomocy programu SMART. Kolorem niebieskim oznaczono domenę kinezy, kolorem zielonym regiony tworzące superhelisy a kolorem różowym region o niskim poziomie skomplikowania.*

Podsumowanie analizy domenowej i analizy sekwencji badanych białek przedstawiono w Tabeli 7.



**Tabela 7.** Podsumowanie analizy filogenetycznej i domenowej badanych białek

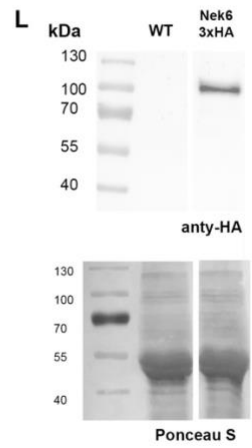
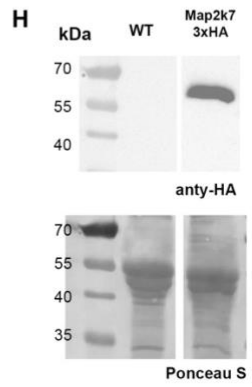
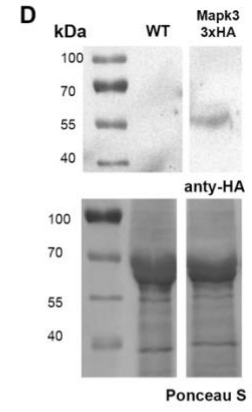
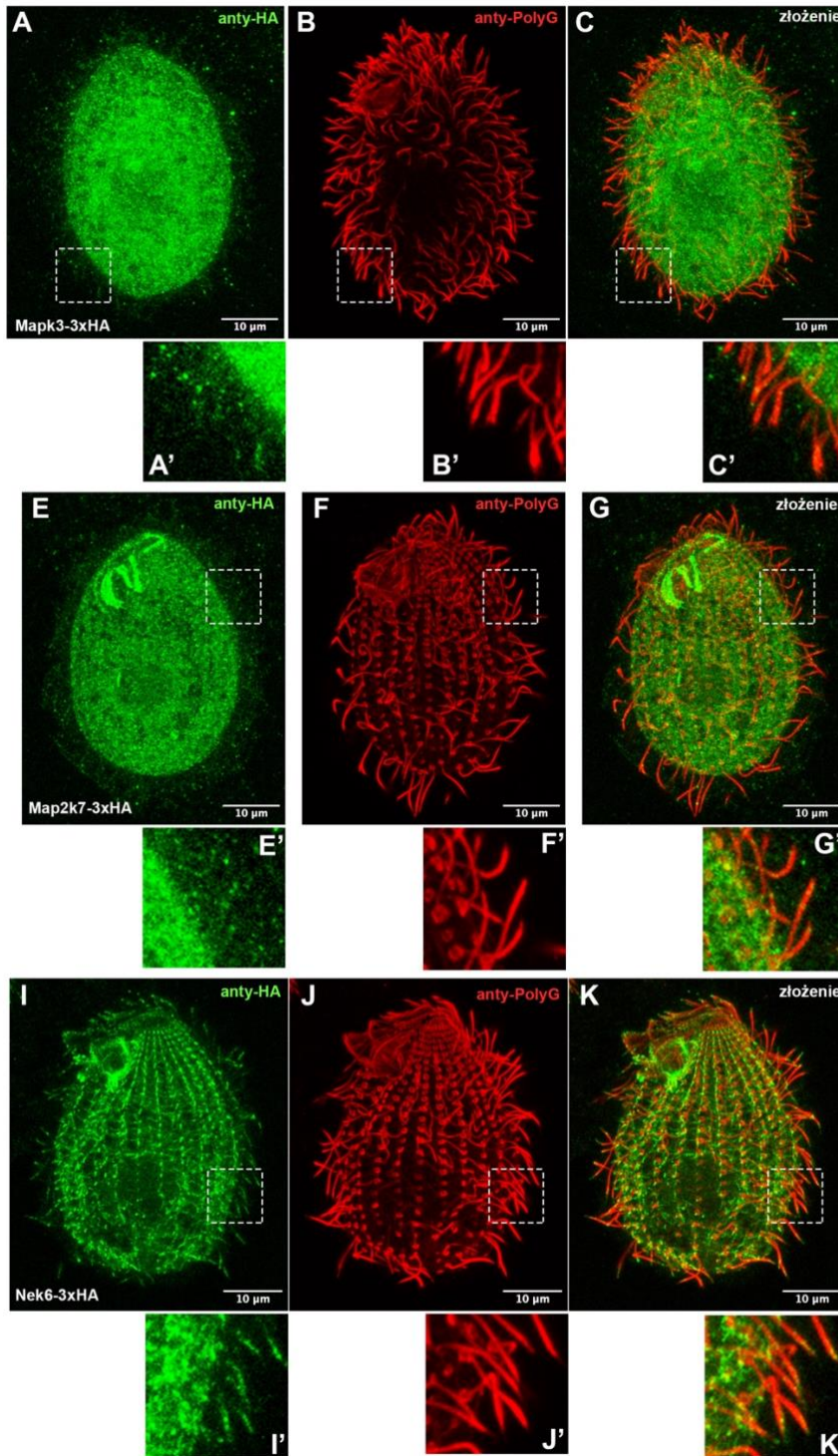
<b>Białko</b>	<b>Liczba aminokwasów [pz]</b>	<b>Masa cząsteczkowa [kDa]</b>	<b>Punkt izoelektryczny</b>	<b>Domeny</b>	<b>Motywy charakterystyczne</b>	<b>Przypuszczalna aktywność</b>
<b>Mapk3</b>	413	49	6,17	Domena kinazy serynowo-treoninowej	DFG HRD	Aktywność kinazy
<b>Map2k7</b>	469	54	5,05	Domena kinazy o podwójnej specyficzności	W motywie HRD arginina zastąpiona przez glicynę – HGD	Przypuszczalnie pseudokinaza
<b>Nek6</b>	755	88	5,08	Domena kinazy serynowo-treoninowej  Domena IFT57	HRD APE – zastąpiony przez SPE DFG – zastąpiony przez DLG	Aktywność kinazy Udział w transporcie wewnątrzkomórkowym
<b>Dusp5</b>	314	36	9,03	Domena fosfatazy o podwójnej specyficzności	Motyw HCXXGXXRS(T), Cysteina niezbędna dla aktywności katalitycznej zastąpiona kwasem asparaginowym	Przypuszczalnie pseudofosfataza pośrednio regulująca fosforylację
<b>Pp2c</b>	293	33	5,72	Domena fosfatazy serynowo-treoninowej	Zachowane aminokwasy niezbędne do wiązania jonu metalu niezbędnego dla funkcji katalitycznej - D234 (317 pozycja sekwencji)	Fosfataza serynowo-treoninowa
<b>Kif9</b>	717	83	7,17	Domena kinezy	Walker A Switch I Switch II	Aktywność kinezy – wiązanie mikrotubul, zdolność „kroczenia” po mikrotubulach

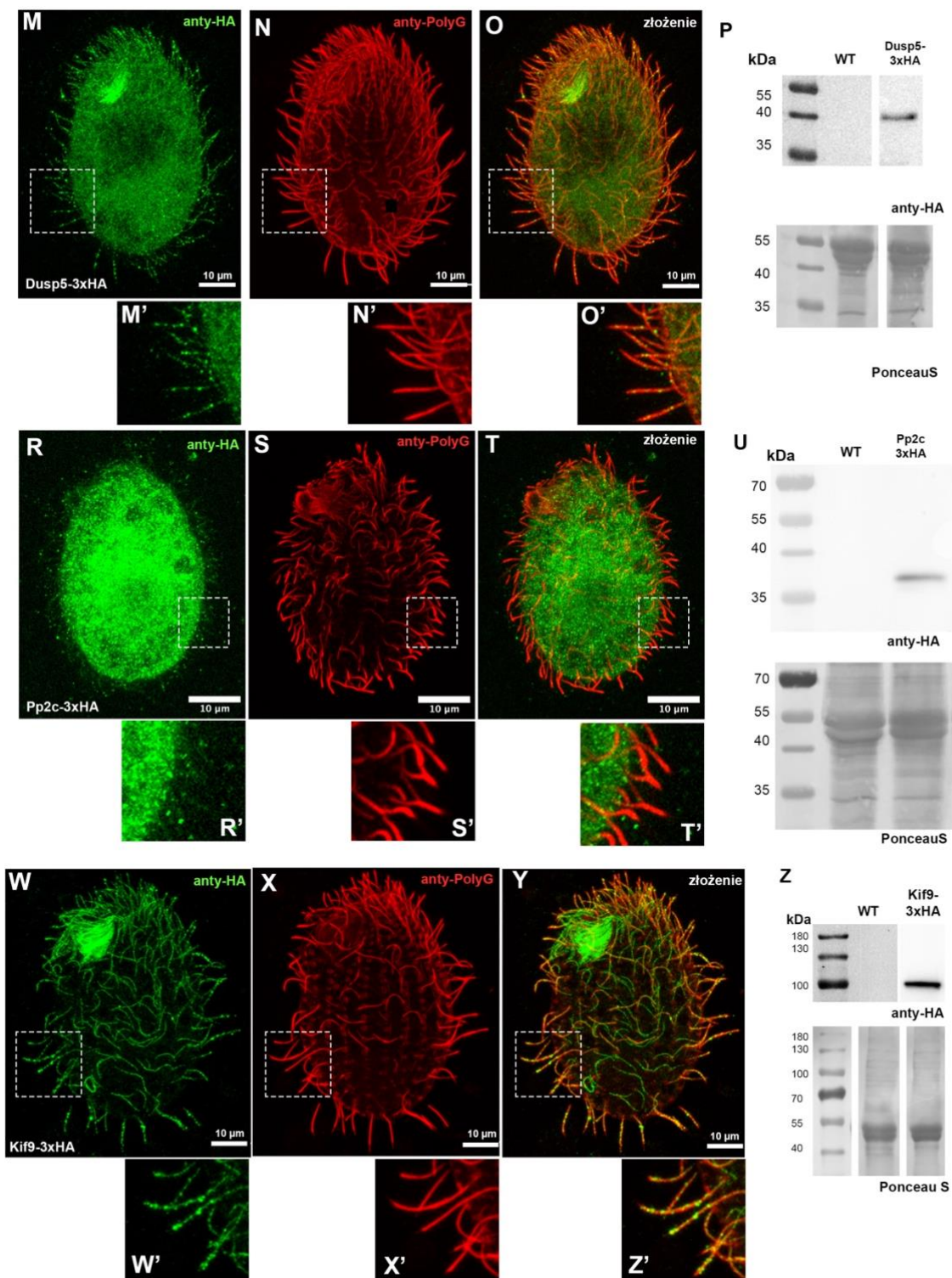
### 5.3 Lokalizacja badanych białek w komórkach *Tetrahymena* szczepu dzikiego

Ze względu na brak dostępnych komercyjnie przeciwciał, które specyficznie rozpoznawałyby badane białka w komórkach *Tetrahymena* oraz stosunkowo wysoki koszt i długi czas otrzymania własnych przeciwciał bez gwarancji ich specyficzności, lokalizację białek *Tetrahymena* badano z użyciem białek fuzyjnych z dołączoną metką 3xHA.

W tym celu przygotowano konstrukty umożliwiające produkcję badanych białek pod kontrolą natywnych promotorów z metką 3xHA dołączoną na końcu karboksylowym (wykorzystano konstrukty z kasetą neo4 niosącą oporność na paromomycynę, rozdz. 4.5.1) i wprowadzono je do komórek szczepu dzikiego. Aby potwierdzić, że powstające białka fuzyjne są prawidłowe przeprowadzono analizę Western blot (Ryc. 19) Wszystkie badane białka uwidocznione zostały jako prążki znajdujące się na wysokości odpowiadającej spodziewanej masie molekularnej.

Aby zwizualizować białka fuzyjne tj. Mapk3-3HA, Map2k7-3HA, Nek6-3HA, Dusp5-3HA, Pp2c-3HA i Kif9-3HA komórki utrwalono i wyznakowano z wykorzystaniem dwóch przeciwciał, anti-HA i poliG, rozpoznających odpowiednio metkę HA oraz poliglicylowaną tubulinę występującą na całej długości rzęski z wyjątkiem jej czubka. Wyznakowane komórki rejestrowano z użyciem mikroskopii konfokalnej. Wszystkie badane białka produkowane w komórkach szczepu dzikiego na natywnym poziomie lokalizowały się w rzęskach (Ryc. 19). Uzyskany sygnał pochodzący z wyznakowania metki 3xHA był jednak stosunkowo słaby co może świadczyć o niskim poziomie tych białek w rzęsce.





Ryc. 19 Lokalizacja białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c, Kif9 w komórkach Tetrahymena. Komórki produkujące badane białka pod kontrolą ich natywnych promotorów, zostały utrwalone i wyznakowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko metce HA (kolor zielony) i poliglicylowanej tubulinie (kolor czerwony). Białą ramką zaznaczono powiększone fragmenty. Skala: 10  $\mu$ m. Białko Mapk3 (A-C), białko Map2k7 (E-G), białko Nek6 (I-K), białko Dusp5 (M-O), białko Pp2c (R-T),

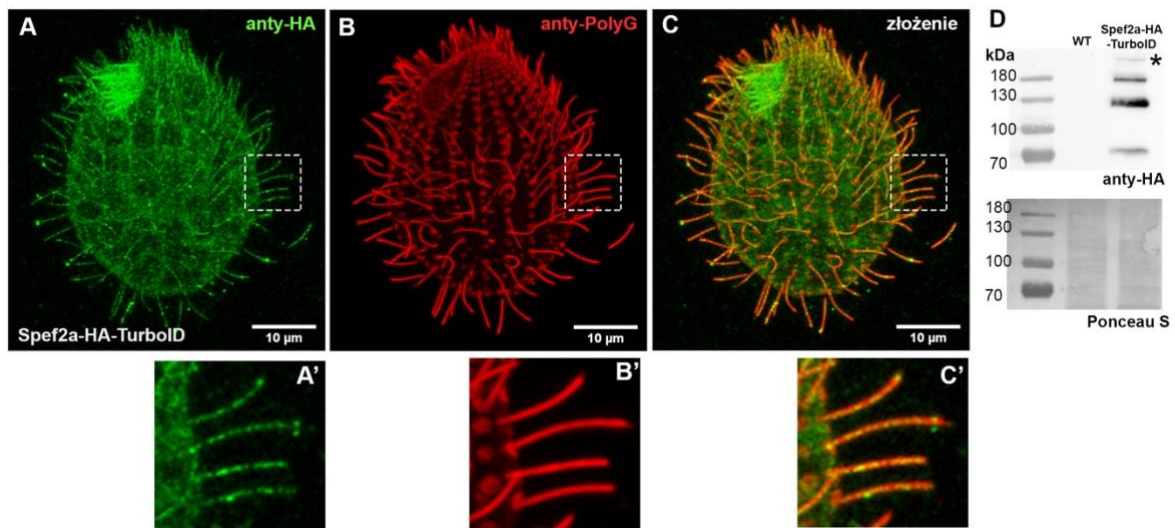
białko Kif9 (W-Y). Analiza białek frakcji rzęskowej metodą Western blot z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko metce HA. Rzęski oczyszczono z komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek *Mapk3-3xHA* (D), *Map2k7-3xHA* (H), *Nek6-3xHA* (L), *Dusp5-3xHA* (P), *Pp2c-3xHA* (U), *Kif9-3xHA* (Z) Jako kontrolę nałożenia wykorzystano barwienie roztworem Ponceau S.

#### 5.4 Weryfikacja oddziaływania badanych białek z białkiem Spef2A

Jak wykazało badanie z użyciem spektrometrii mas, poziom białek *Mapk3*, *Map2k7*, *Nek6* *Pp2c* i *Kif9* jest znacząco zmieniony w komórkach pozbawionych białka *Spef2A*. Jednakże w poprzednich badaniach (Joachimiak i in., 2021) analiza BioID (ang. *proximity-dependent biotinylation identification*) z użyciem produkowanego na poziomie natywnym białka *Spef2A* w fuzji z ligazą biotyny *BirA\** (rozdz. 4.9.1) nie wykazała by badane białka lokalizowały się w pobliżu białka fuzyjnego *Spef2A-BirA\**.

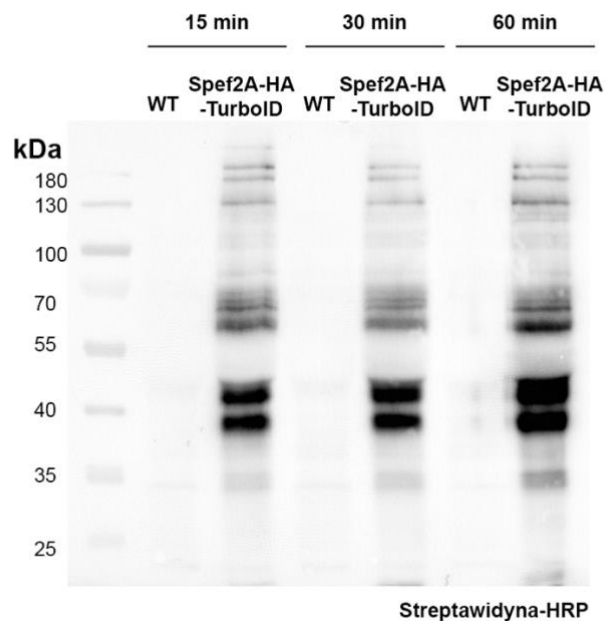
Wobec tego przeprowadzono ponowną analizę z wykorzystaniem bardziej czułej metody BioID (rozdz.4.9.2). Ligaza *BirA* występuje u bakterii *Escherichia coli* i odpowiada za specyficzną biotynylację karboksylazy acetylo-CoA. Jej zmutowana wersja *BirA\** nie wykazuje tej specyficzności i przyłącza biotynę do reszt aminokwasowych lizyny białek znajdujących się w odległości nie większej niż około 10 nm oraz białka, do którego jest przyłączona (Sears i in., 2019). Natomiast zmutowana wersja *BirA\**, ligaza TurboID charakteryzuje się znacznie większą wydajnością dzięki czemu czas wymagany do efektywnej biotynylacji pobliskich białek jest znacząco krótszy a poziom biotynylacji jest znacznie wyższy niż w przypadku *BirA\**. Dlatego w dalszych badaniach zamiast komórek produkujących białko *Spef2A-BirA\** wykorzystano *Spef2A* w fuzji z metką HA-TurboID. Komórki produkujące białko *Spef2A-HA-TurboID* wytworzyła Zuzanna Samsel – doktorantka Laboratorium Cytoszkieletu i Biologii Rzęsek.

Metodą immunofluorescencji pośredniej i metodą Western blot potwierdzono, że produkowane pod kontrolą natywnego promotora białko fuzyjne *Spef2A-HA-TurboID* lokalizuje się w całej długości rzęski (Ryc. 20, A-C) a jego masa jest zbliżona do oczekiwanej (Ryc.20, D, gwiazdka). Dodatkowe prążki występujące poniżej właściwego są najprawdopodobniej wynikiem degradacji białka *Spef2A* następującej ze względu na jego dużą masę cząsteczkową (ok.200 kDa).



Ryc. 20 Lokalizacja białka Spef2A produkowanego w fuzji z metką HA-TurboID w komórkach *Tetrahymena*. Komórki produkujące białko Spef2A-HA-TurboID (A-C) pod kontrolą natywnego promotora, zostały utrwalone i wyznakowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko metce HA (A, A' kolor zielony) i poliglicylowanej tubulinie (B, B' kolor czerwony), (C,C') złożenie obrazów A i B. Skala: 10 $\mu$ m. (D) Analiza białek frakcji rzęskowej metodą Western blot z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko metce HA. Rzęski oczyszczono z komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek Spef2A-HA-TurboID. Właściwy prążek odpowiadający białku Spef2A oznaczono gwiazdką. Jako kontrolę nałożenia wykorzystano barwienie roztworem Ponceau S.

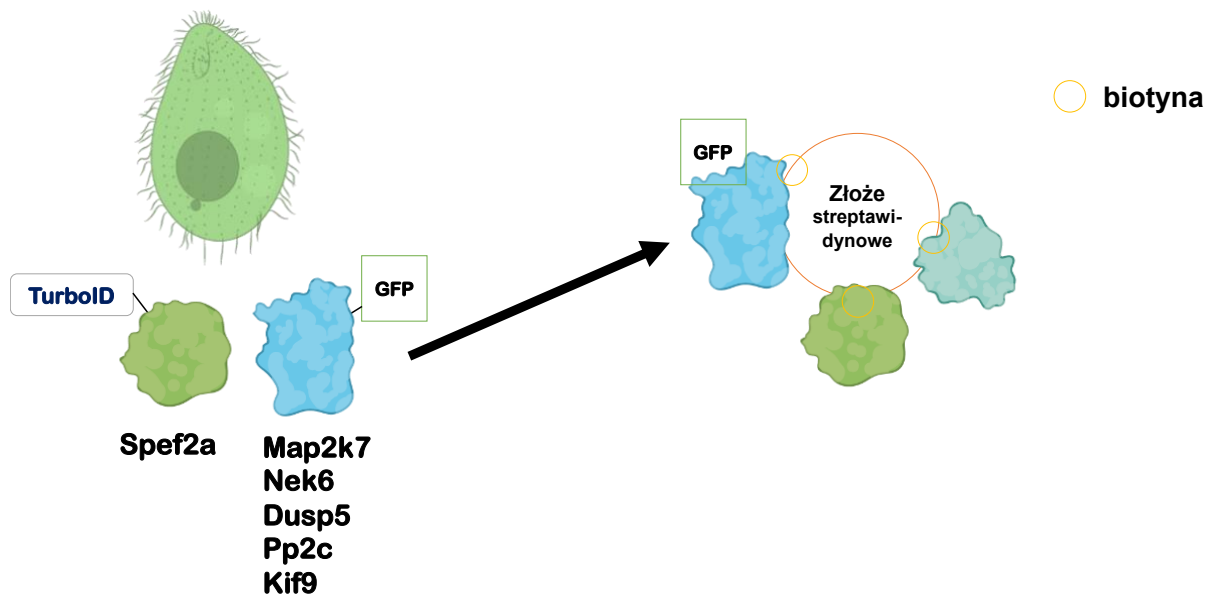
Aby ustalić warunki doświadczenia BioID, przeprowadzono analizę poziomu biotynylacji białek znajdujących się w bliskiej odległości białka Spef2A metodą Western blot. Komórki *Tetrahymena* mutantów produkujących białko Spef2A-HA-TurboID oraz komórki szczepu dzikiego (WT) inkubowano z 50  $\mu$ M biotyną przez 15, 30 oraz 60 minut. Uzyskane wyniki wykazały, że do silnej biotynylacji dochodzi już po 30 minutach (Ryc. 21). W dalszych etapach doświadczeń stosowano więc 30 minutową inkubację komórek z biotyną.



Ryc.21 Analiza biotynylowanych białek znajdujących się w sąsiedztwie białka Spef2A-HA-TurboID metodą Western blot. Białka frakcji rzęskowej oczyszczano z komórek mutantów produkujących białko fuzyjne Spef2A-HA-TurboID oraz komórek szczepu dzikiego (WT) po 15, 30 lub 60 minutach inkubacji z biotyną. Białka uwidoczniono za pomocą streptawidyny związanej z HRP.

W następnym etapie przygotowano konstrukty umożliwiające produkcję badanych białek, Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c i Kif9 w fuzji z metką GFP, które wprowadzono do komórek Spef2A-HA-TurboID. W ten sposób otrzymano podwójne mutanty komórek *Tetrahymena* produkujące jednocześnie białko Spef2A w fuzji z metką HA-TurboID oraz jedno z badanych białek w fuzji z metką GFP (Ryc. 22). Ze względu na stosunkowo duży rozmiar metki GFP (ok. 30 kDa) nie udało uzyskać się mutantów produkujących białko fuzyjne Mapk3-GFP, co tym samym uniemożliwiło przeprowadzenie dalszych doświadczeń dla tego białka.

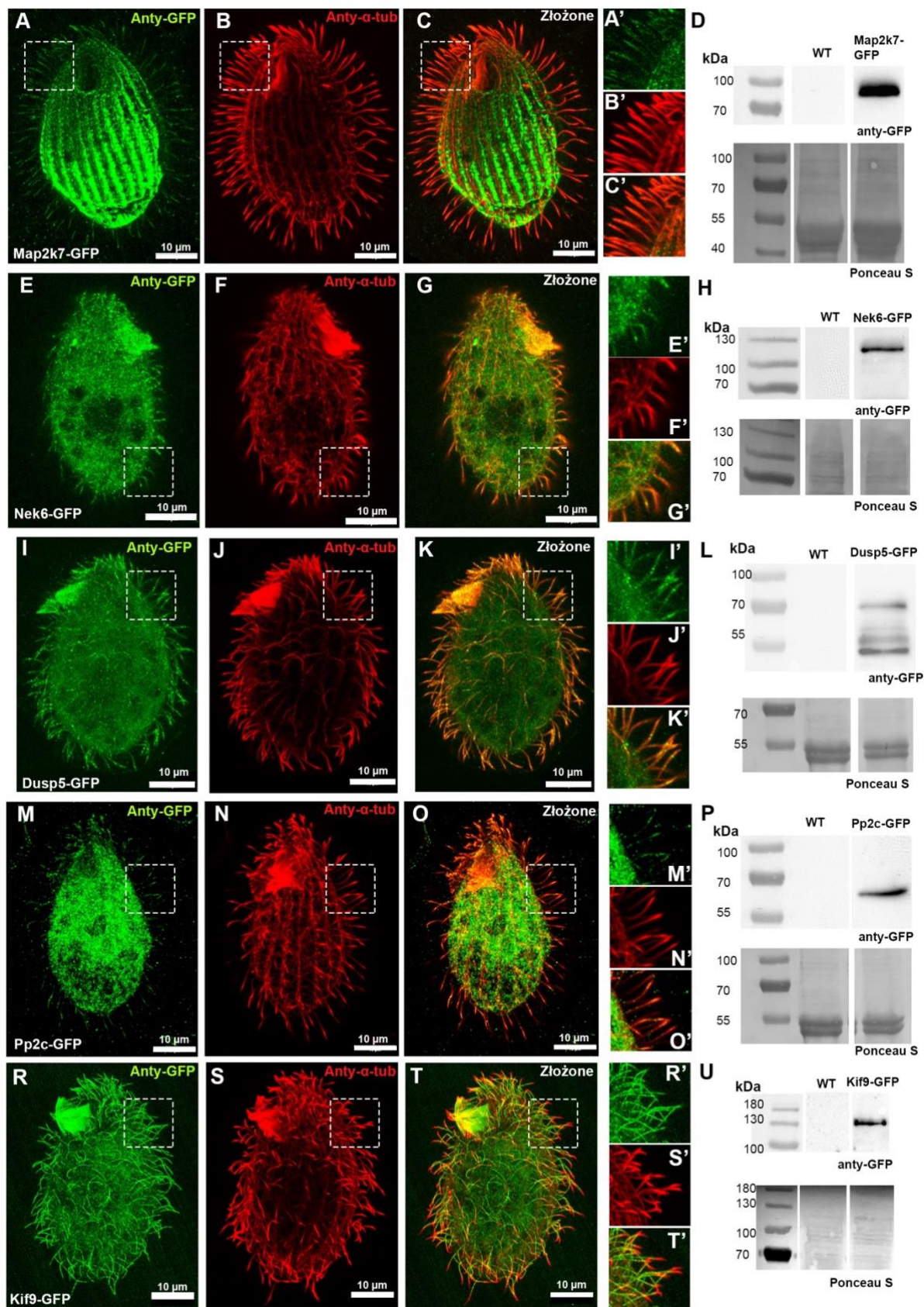
Produkcja białka Spef2A-HA-TurboID oraz badanego białka w fuzji z metką GFP umożliwiła sprawdzenie czy badane białko było biotynylowane i w konsekwencji doszło do jego związania ze streptawidyną znajdującą się na złożu – co tym samym wskazywało, że badane białko znajduje się w odległości nie większej niż 10 nm od białka Spef2A (Ryc. 22).



Ryc.22 Zasada zmodyfikowanego doświadczenia BioID umożliwiającego sprawdzenie czy badane białko – Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c, Kif9 znajduje się w bliskiej odległości białka Spef2A. W doświadczeniu wykorzystano podwójne mutanty produkujące białko Spef2A w fuzji z metką HA-TurboID oraz równocześnie jedno z badanych białek w fuzji z metką GFP. Identyfikacja białka z metką GFP spośród białek związanych do złoża streptawidynowego wskazywała, że białko to znajduje się w bliskiej odległości białka Spef2A.

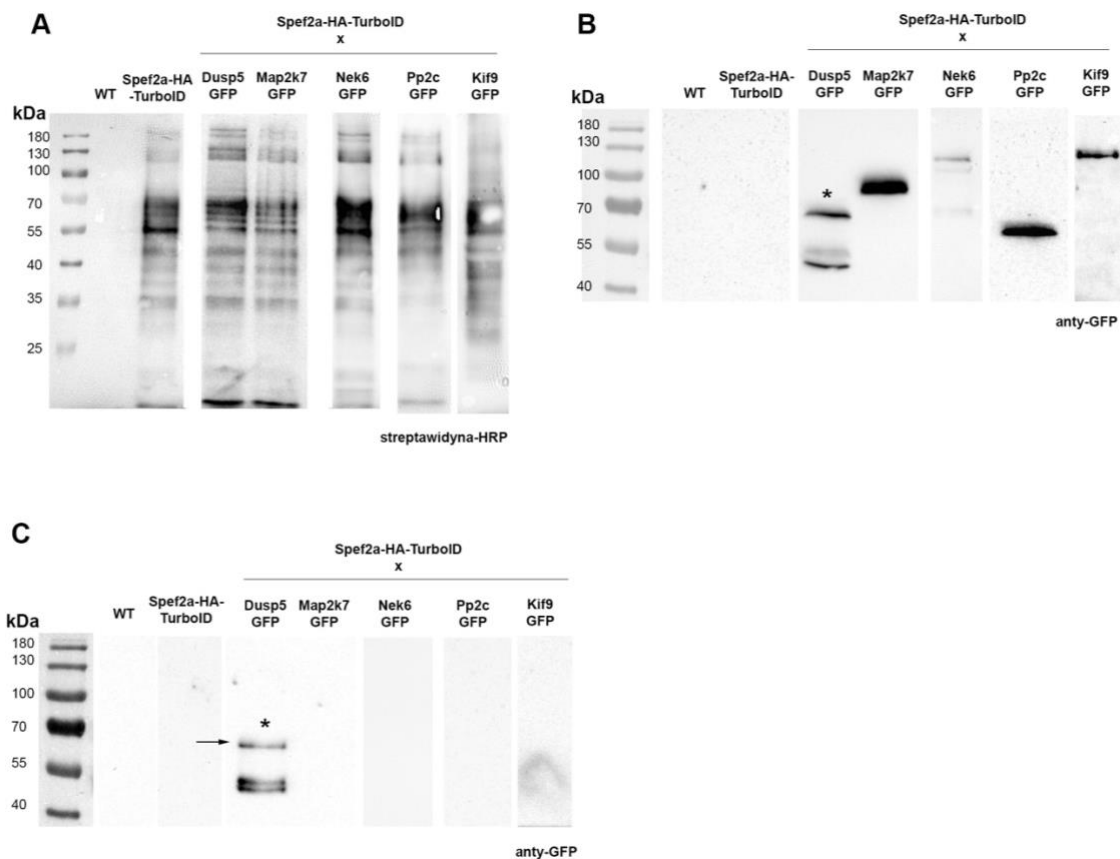
Metodą immunofluorescencji pośredniej potwierdzono, że w otrzymanych podwójnych mutantach, białka Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c oraz Kif9 z metką GFP lokalizują się w rzęskach, przy czym, z wyjątkiem białka Pp2c, występującego w części dystalnej rzęsek, wszystkie badane białka lokalizowały się w całej długości (Ryc. 23). W przypadku białka Map2k7 zaobserwowano również akumulację białka fuzyjnego w cytoszkielecie podbłonowym, w większości w tylnej części komórki. Może to wskazywać, że dołączenie metki GFP utrudnia transport Map2k7 do rzęski, a akumulowane w cytoplazmie Map2k7-GFP transportowane jest do regionu podbłonowego (podobnie jak przy nadprodukcji białka Map2k7-HA, patrz niżej). Analiza frakcji rzęskowej za pomocą metody Western blot, potwierdziła, że produkowane pod kontrolą natywnego promotora białka fuzyjne z metką GFP lokalizują się w rzęskach a ich masa cząsteczkowa była podobna do spodziewanej (Ryc. 23).





*Ryc.23 Lokalizacja badanych białek enzymatycznych produkowanych z metką GFP dołączoną na końcu karboksylowym białka w komórkach Tetrahymena pod kontrolą natywnych promotorów i jednoczesnej produkcji białka Spef2A-HA-TurboID. Komórki zostały utrwalone i wyznakowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko metce GFP i  $\alpha$ -tubulinie. Komórki Map2k7-GFP: metka GFP (A, A' – kolor zielony),  $\alpha$ -tubulina (B, B' – kolor czerwony), złożenie obrazów A i B (C, C'). Komórki Nek6-GFP: metka GFP (E, E' – kolor zielony),  $\alpha$ -tubulina (F, F' – kolor czerwony), złożenie obrazów E i F (G, G'). Komórki Dusp5-GFP: metka GFP (I, I' – kolor zielony),  $\alpha$ -tubulina (J, J' – kolor czerwony), złożenie obrazów I i J (K, K'). Komórki Pp2c-GFP: metka GFP (M, M' – kolor zielony),  $\alpha$ -tubulina (N, N' – kolor czerwony), złożenie obrazów M i N (O, O'). Komórki Kif9-GFP: metka GFP (R, R' – kolor zielony),  $\alpha$ -tubulina (S, S' – kolor czerwony), złożenie obrazów R i S (T, T'). Białą ramką zaznaczono powiększony fragment. Skala: 10  $\mu$ m. (D, H, L, P, U) Analiza białek frakcji rzęskowej metodą Western blot z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko metce GFP. Rzęski oczyszczono z komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek mutantów produkujących badane białka enzymatyczne z metką GFP. (D) Map2k7-GFP, (H) Nek6-GFP, (L) Dusp5-GFP, (P) Pp2c-GFP jednocześnie z białkiem Spef2A-HA-TurboID. Jako kontrolę nałożenia wykorzystano barwienie roztworem Ponceau S.*

Pośród badanych białek jedynie białko Dusp5 produkowane w fuzji metką GFP było biotynylowane, przez ligazę TurboID związaną z białkiem Spef2a i wiązało się do złoża związanego ze streptawidyną (ryc.24). W przypadku pozostałych badanych białek tj. białka Map2k7, Nek6, Pp2c oraz Kif9 wyniki wykazały, że żadne z nich nie znajdowało się pośród białek biotynylowanych przez ligazę TurboID dołączoną do białka Spef2a. Sugeruje to, że badane białka nie wchodzi w skład kompleksu wypustki C1b aparatu centralnego, lecz mogą oddziaływać z białkami tego kompleksu, w tym prawdopodobnie z białkiem Spef2a, jedynie przejściowo, wobec czego liczba biotynylowanych białek, która przyłączyła się do złoża mogła być zbyt mała by wykryć ją za pomocą metody Western Blot.

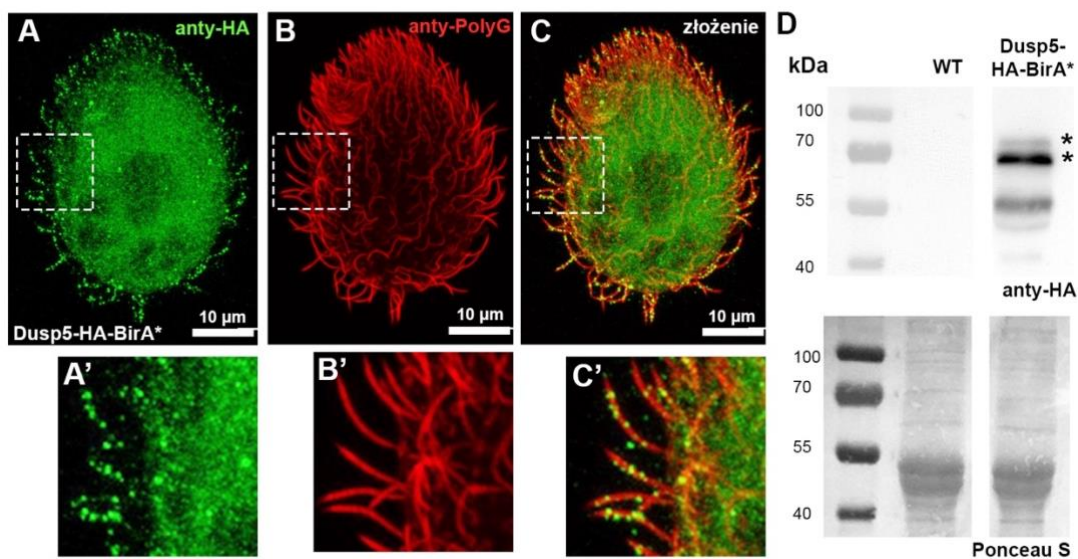


Ryc.24 Analiza białek znajdujących się w bliskiej odległości białka Spef2a. (A,B): Analiza frakcji rzęskowej oczyszczonej z podwójnych mutantów produkujących zarówno białko Spef2a w fuzji z ligazą biotyny TurboID jak i badane białko w fuzji z metką GFP. (A) Wizualizacja biotynylowanych białek znajdujących się w bliskiej odległości białka Spef2a (B) Wizualizacja białek produkowanych z metką GFP – Dusp5-GFP, Map2k7-GFP, Nek6-GFP, Pp2c-GFP, Kif9-GFP za pomocą przeciwciała anty-GFP. (C) Wizualizacja obecności białek produkowanych w fuzji z metką GFP pośród biotynylowanych białek związanych do złoża streptawidynowego znajdujących się w bliskiej odległości białka Spef2a. Kontrolę stanowiła frakcja rzęskowa oczyszczone z komórek typu dzikiego (WT) oraz mutantów Spef2a-HA-TurboID - kontrola negatywna. Białka uwidoczniono za pomocą (A) streptawidyny związanej z HRP oraz (B, C) przeciwciała skierowanego przeciwko metce GFP. Gwiazdką oznaczono prążek właściwy dla masy cząsteczkowej białka Dusp5. Strzałką oznaczono obecność białka Dusp5 z metką GFP pośród białek biotynylowanych związanych do złoża streptawidynowego.

## 5.5 Identyfikacja białek znajdujących się w najbliższym sąsiedztwie białka Dusp5 i tworzących z nim stabilny kompleks

Uzyskane powyżej dane wskazują, że spośród badanych białek jedynie Dusp5 lokalizuje się w pobliżu białka Spef2A-HA-Turbo ID na tyle długo, aby doszło do jego biotynylacji. Aby potwierdzić tę obserwację, przeprowadzono identyfikację białek znajdujących się w najbliższym sąsiedztwie białka Dusp5 metodą BioID. W tym celu uzyskano mutanty Dusp5-HA-BirA\* produkujące białko fuzyjne Dusp5 z dołączoną na końcu karboksylowym zmutowaną ligazą BirA\* oraz metką HA (rozd. 4.5.1).

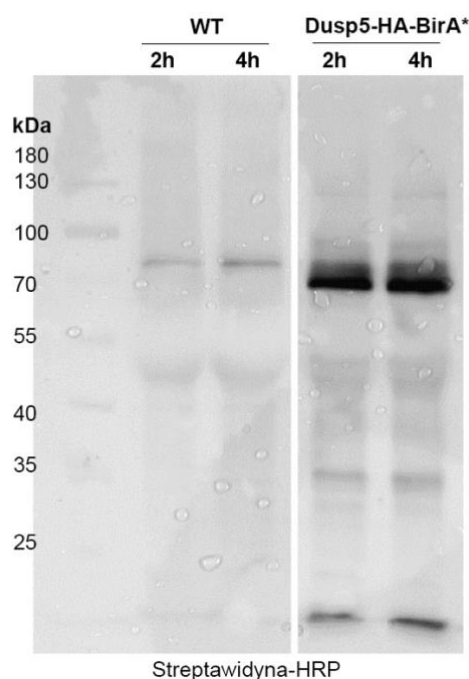
Badanie metodą immunofluorescencji pośredniej i Western blot potwierdziło, że białko fuzyjne Dusp5-HA-BirA\* lokalizowało się w rzęskach komórek *Tetrahymena*, a jego przewidziana masa cząsteczkowa zgadzała się z masą teoretyczną (białko Dusp5 – około 37 kDa, ligaza BirA\* 30 kDa) – górny prążek oznaczony gwiazdką na Rycinie 24, pozostałe prążki wynikają najprawdopodobniej z degradacji białka.



Ryc. 25 Lokalizacja białka fuzyjnego Dusp5-HA-BirA\* w komórkach *Tetrahymena*. (A-C) Komórki produkujące białko Dusp5-HA-BirA\* pod kontrolą natywnego promotora zostały utrwalone i wyznakowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko metce HA (A, A', kolor zielony) i poliglicylowanej tubulinie (B, B', kolor czerwony), (C, C') złożenie obrazów A i B. Białą ramką zaznaczono obszar powiększony jako A'-C'. Skala: 10  $\mu$ m. (D) Analiza białek frakcji rzęskowej metodą Western blot z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko metce HA. Rzęski oczyszczono z komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek Dusp5-HA-BirA\*. Gwiazdką zaznaczono prążki odpowiadające białku Dusp5-HA-BirA\* (najprawdopodobniej zachodzi degradacja białka). Jako kontrolę nałożenia wykorzystano barwienie roztworem Ponceau S.

Komórki z wprowadzonym transgenem kodującym Dusp5-HA-BirA\* hodowano przez 2 i 4 godziny w buforze z dodatkiem 50  $\mu$ M biotyny. Wykazano, że czterogodzinna inkubacja zapewniała wydajną biotynylację białek w komórkach mutantów. Uwidocznione za pomocą techniki Western blot prążki biotynylowanych białek w komórkach szczepu dzikiego wynikają z obecności działania endogennych biotynylaz (Ryc. 25).

Biotynylowane białka rzęskowe oczyszczano na złożu związanym ze streptawidyną (rozdz. 4.9.1) a następnie identyfikowano za pomocą spektrometrii mas.



Ryc. 26 Analiza białek biotynylowanych w komórkach szczepu dzikiego (WT) i mutantach produkujących białko Dusp5-HA-BirA\* przy użyciu metody Western blot. Białka frakcji rzęskowej oczyszczano po 2 lub 4 godzinach inkubacji z biotyną. Białka uwidoczniono za pomocą streptawidyny związanej HRP.

Wyniki analizy spektrometrii mas przedstawiono w Tabeli 8, gdzie liczba wszystkich peptydów oznacza całkowitą liczbę peptydów dla danego białka, w tym takich, których sekwencja jest identyczna (peptydy o tej samej sekwencji mogą pojawić się w widmie wielokrotnie), natomiast liczba peptydów o różnej sekwencji oznacza liczbę peptydów różniących się między sobą sekwencją, czyli odpowiadających różnym odcinkom białka. Analiza wyników wykazała, że wśród zidentyfikowanych białek obecne były białka budujące wypustkę C1b aparatu centralnego: Spef2A, Cfp69, androglobiny, Lrguk/Cfp246 oraz THERM\_00205170 (Joachimiak i in., 2021). Ponadto zidentyfikowano również białka, specyficznym występujące tylko u orzęsków: THERM\_00420720, THERM\_00703450,

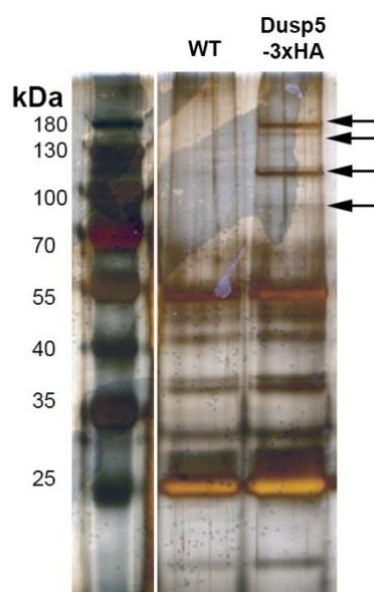
THERM\_00010960, zawierające w swoich sekwencjach domeny tworzące superhelisy (ang. *coiled-coil domain*), ale nie udało się zidentyfikować białek Mapk3, Map2k7, Nek6, Pp2c i Kif9. Otrzymane wyniki potwierdzają jednoznacznie, że białko Dusp5 lokalizuje się w bliskiej odległości i może stanowić niezidentyfikowany wcześniej element wypustki C1b aparatu centralnego rzęski ruchomej. Z drugiej strony nie udało się wykazać, że potencjalne elementy i regulatory szlaku Map kinaz zlokalizowane są w sąsiedztwie tego białka (Tabela 9).

**Tabela 8** Biotynylowane białka rzęskowe zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas w rzęskach komórek mutantów Dusp5-HA-BirA\*. Kontrolę stanowiły białka rzęskowe komórek szczepu dzikiego (WT).

Nazwa białka	Numer TGD	Liczba wszystkich zidentyfikowanych peptydów/ liczba peptydów o różnej sekwencji			
		WT		Dusp5-HA-BirA*	
		Dośw.1	Dośw.2	Dośw.1	Dośw.2
Białko specyficzne dla orzęsków	THERM_00205170	0/0	0/0	109/14	58/13
Spef2A	THERM_01142770	0/0	0/0	89/28	32/17
Cfap69	THERM_00691650	0/0	0/0	74/13	15/8
Androglobina	THERM_00290850	0/0	0/0	45/14	11/9
Dusp5	THERM_00279780	0/0	0/0	35/8	1/1
Białko specyficzne dla orzęsków	THERM_00420720	0/0	0/0	29/10	5/4
Lrguk/Cfap246	THERM_00188400	0/0	0/0	25/9	6/4
Białko specyficzne dla orzęsków	THERM_00703450	0/0	0/0	13/6	1/1
Białko specyficzne dla orzęsków	THERM_00010960	0/0	0/0	4/3	1/1

Dlatego, w celu identyfikacji białek tworzących trwałe kompleksy z białkiem Dusp5 w tym białek oddziałujących z nimi pośrednio i tym samym zlokalizowanych w odległości większej niż 10 nm, przeprowadzono doświadczenie koimmunoprecypitacji (rozdz.4.8.3). Do doświadczenia wykorzystano wcześniej opisane komórki produkujące białko fuzyjne Dusp5-3HA, które oczyszczono wraz z białkami tworzącymi z nim trwały kompleks z użyciem przeciwciała anti-HA związanego do złoża agarozowego. Oczyszczone białka rozdzielano w żelu poliakryloamidowym i wizualizowano stosując metodę srebrzenia (rozdz.4.8.5) a równolegle identyfikowano z wykorzystaniem metody spektrometrii mas.

Analiza wysrebrzonego żelu wykazała, że w precypitacie z rzęsek zawierających białko Dusp5-3HA występują, w porównaniu do kontroli, dodatkowe prążki (Ryc. 26, oznaczone strzałkami), co oznacza, że udało się oczyścić kompleksy, których elementem jest Dusp5.



Ryc.27 Białka koprecypitujące z białkiem Dusp5. Białko frakcji rzęskowej Dusp5-3xHA wraz z białkami tworzącymi z nim trwały kompleks selektywnie oczyszczono na złożu agarozowym związanym z przeciwciałem anti-HA, a następnie rozdzielono na żelu poliakryloamidowym i wizualizowano za pomocą metody srebrzenia. Strzałkami oznaczono dodatkowe prążki wskazujące na obecność dodatkowych białek w próbce.

Analiza danych uzyskanych za pomocą spektrometrii mas (Tabela 9) po raz kolejny potwierdziła, że białko Dusp5 tworzy trwałe kompleksy z białkami budującymi wypustkę C1b: Spef2A, Androglobiną, Cfap69 i Lrguk/Cfap246, wzmacniając hipotezę, że białko Dusp5 jest

częścią wypustki C1b. Dodatkowo zidentyfikowano białko Cfp174 oraz dwa nowe białka: TTHERM\_00578720 oraz TTHERM\_00558360 posiadające w swojej sekwencji aminokwasowej domenę metylotransferazy i wykazujące podobieństwo do metylotransferazy EEF1A u kręgowców, a także białko TTHERM\_00835010 specyficznie występujące u orzęsków zawierające domenę tworzącą superhelisę (ang. *coiled-coil domain*) na końcu karboksylowym białka. Wśród zidentyfikowanych białek nie było potencjalnych elementów i regulatorów rzęskowego szlaku Map kinaz.

**Tabela 10** Białka koprecypitujące z Dusp5-3HA zidentyfikowane za pomocą spektrometrii mas

Nazwa białka	Numer TGD	Liczba zidentyfikowanych peptydów/ liczba peptydów specyficznych			
		WT		DUSP-3xHA	
		Dośw.1	Dośw.2	Dośw.1	Dośw.2
Spef2A	TTHERM_01142770	0/0	0/0	83/83	73/72
Androglobina	TTHERM_00290850	0/0	0/0	80/80	65/65
Cfp69	TTHERM_00691650	0/0	0/0	41/41	40/39
Lrguk/Cfp246	TTHERM_00188400	0/0	0/0	22/22	17/17
Cfp174	TTHERM_00077420	0/0	0/0	7/7	6/6
Białko z domeną metylotransferazy	TTHERM_00578720	0/0	0/0	9/9	9/9
Białko specyficzne dla orzęsków	TTHERM_00835010	0/0	0/0	5/5	4/4
Dusp5	TTHERM_00279780	0/0	0/0	9/9	10/10
Białko z domeną metylotransferazy	TTHERM_00558360	0/0	0/0	6/6	10/10

Podsumowując, powyższe wyniki wskazują, że w rzęskach *Tetrahymena* białko Dusp5 lokalizuje się prawdopodobnie, wyłącznie w rejonie wypustki C1b aparatu centralnego.

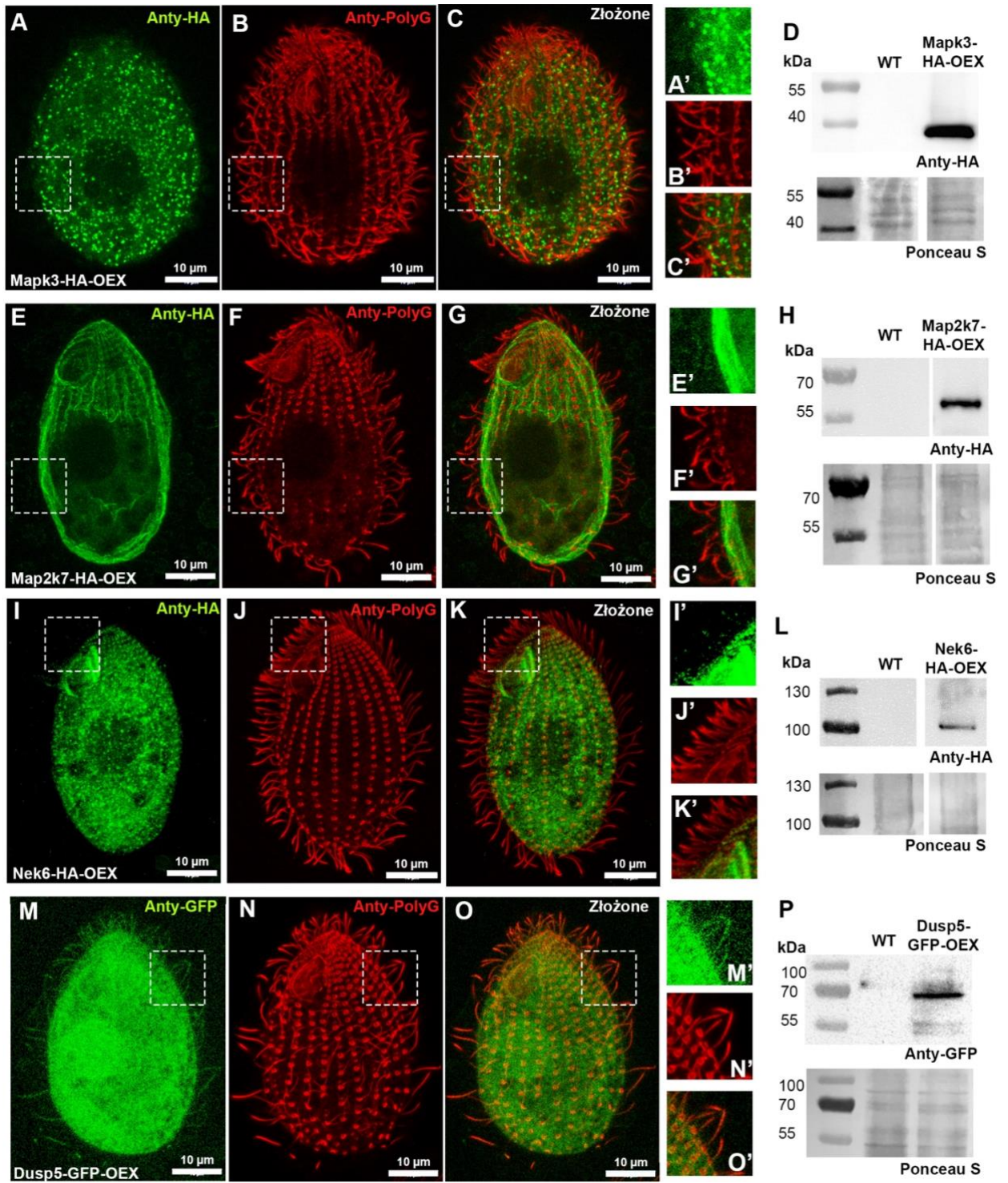


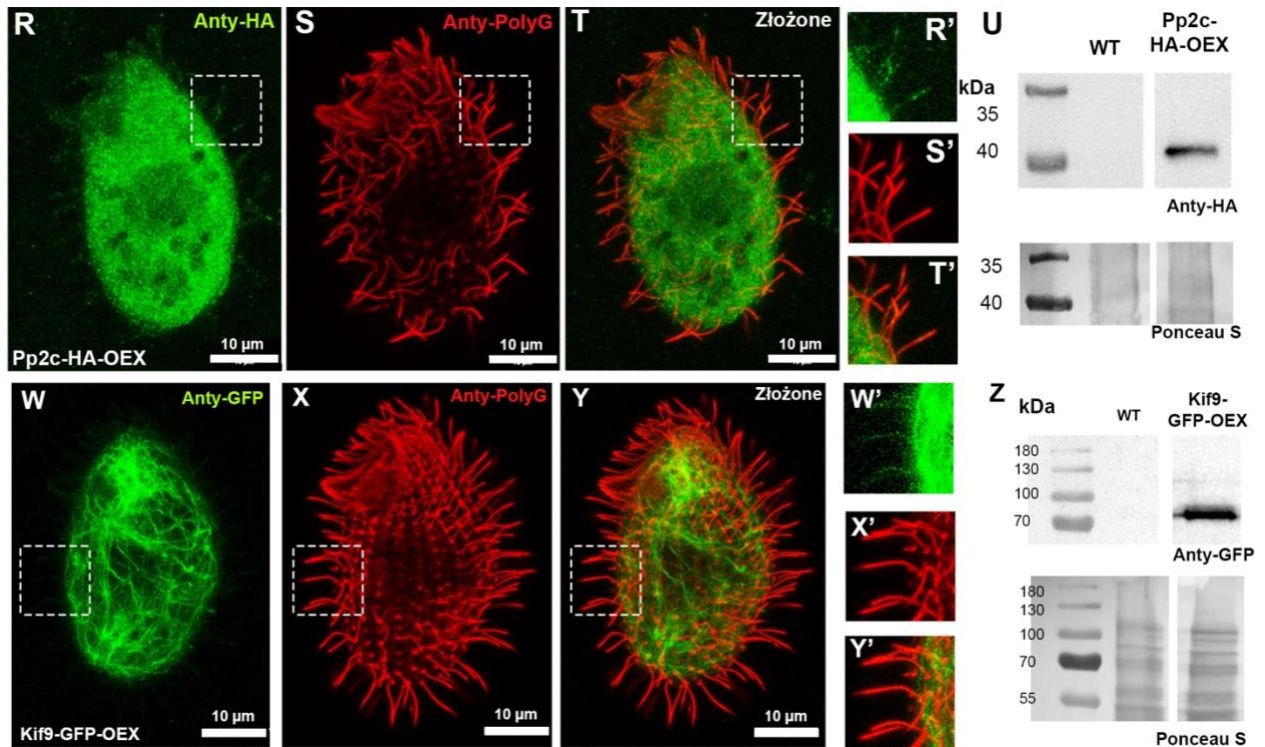
## 5.6 Identyfikacja oddziaływań badanych białek metodą pull-down

Jak opisano powyżej, żadne z zidentyfikowanych elementów potencjalnego rzęskowego szlaku MAP kinaz (Mapk3, Map2k7, Nek6, Pp2c, Kif9) nie występowało wśród białek biotynylowanych w komórkach produkujących białko Spef2A-HA-TurboID i Dusp5-HA-BirA\* (doświadczenie BioID) a także koprecypitujących z Dusp5-3HA (doświadczenie koimmunoprecypitacji). Być może oddziaływania zachodzące *in vivo* w rzęskach pomiędzy Dusp5 i tymi białkami są zbyt krótkotrwałe, by umożliwić ich wydajną biotynylację lub trwałe związanie w postaci kompleksu. Dlatego zbadano, czy białka te mogą oddziaływać z białkiem Dusp5 *in vitro* z użyciem metody pull-down. Z powodu dużej wielkości białka Spef2A i tym samym dużej wielkości genu, niemożliwe było przygotowanie komórek nadprodukcujących to białko.

W tym celu przygotowano konstrukty (rozdz. 4.5.2) i otrzymano mutanty *Tetrahymena*, które w wyniku indukcji jonami kadmu, nadprodukowały badane białka w fuzji z metką GFP (Dusp5-GFP, Mapk3-GFP, Map2k7-GFP, Nek6-GFP, Pp2c-GFP i Kif9-GFP) lub HA (Dusp5-HA, Mapk3-HA, Map2k7-HA, Nek6-HA i Pp2c-HA, dla białka Kif9 nie udało się uzyskać mutantu nadprodukcującego Kif9-HA). Analiza metodą immunofluorescencji pośredniej wykazała, że wszystkie nadprodukowane białka lokalizowały się w cytoplazmie. Ponadto Dusp5 i Pp2c były obecne w rzęskach, Mapk3 tworzyło w cytoplazmie agregaty (Ryc. 27 – odpowiednio: M,R,A), Mapk27 gromadziło się w rejonie podbłonowym (Ryc.27 E), Nek6 w rejonie ciałek podstawowych (Ryc. 27 I) a Kif9 tworzyło włókniste struktury w ciele komórki (Ryc.27 W). Te same białka nadprodukowane z metką GFP lub HA lokalizowały się w komórkach *Tetrahymena* w ten sam sposób.

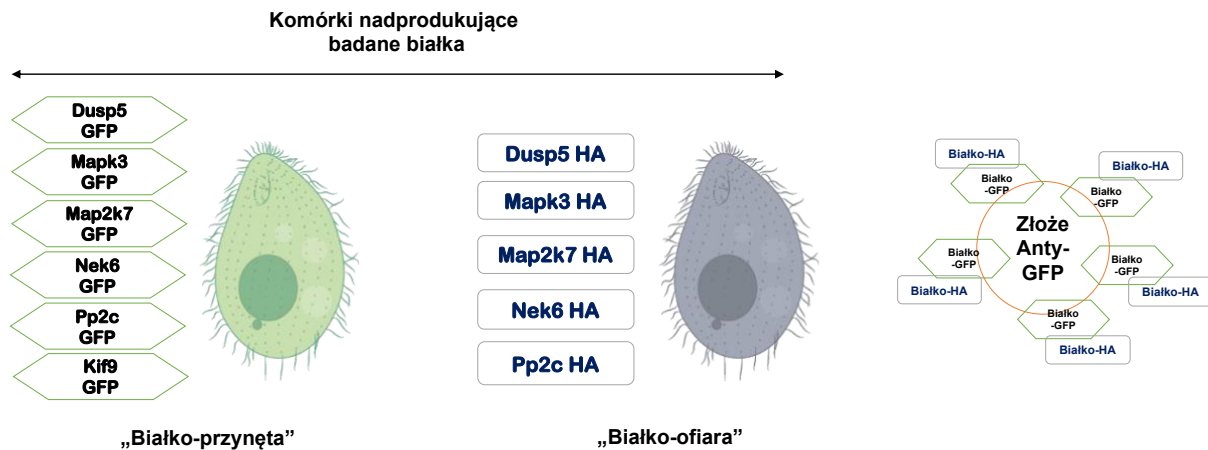
Analiza metodą Western blot frakcji cytoplazmatycznej potwierdziła obecność białek z metką – GFP lub – HA o odpowiedniej masie molekularnej: Mapk3-HA (ok. 49 kDa), Map2k7-HA (ok.54 kDa), Nek6-HA (ok. 88 kDa), Dusp5-GFP (ok. 36 kDa, metka GFP 30 kDa), Pp2c-HA (ok. 33 kDa), Kif9-GFP (ok. 83 kDa, metka GFP 30 kDa) (Ryc. 27).





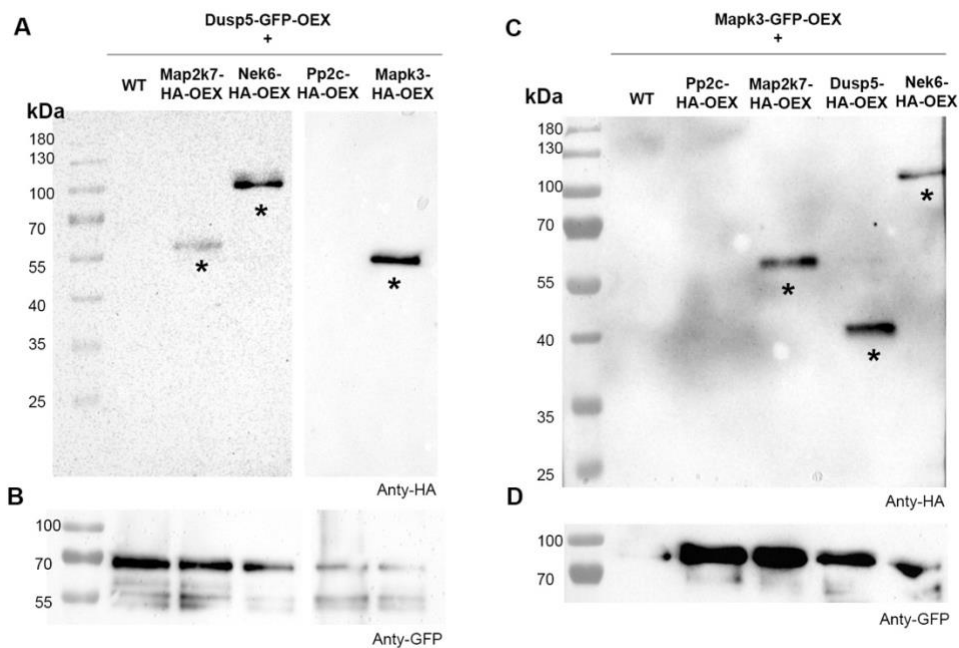
Ryc.28 Lokalizacja nadprodukowanych białek w komórkach *Tetrahymena*. Komórki zdolne do nadprodukcji białek enzymatycznych: *Mapk3*-HA, *Map2k7*-HA, *Nek6*-HA, *Dusp5*-GFP, *Pp2c*-HA, *Kif9*-GFP po 2 godzinach aktywacji  $CdCl_2$  zostały utrwalone i wyznakowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko metce HA (*Mapk3* (A), *Map2k7* (E), *Nek6* (I), *Pp2c* (R)) lub GFP (*Dusp5* (M), *Kif9* (W)) – kolor zielony oraz poliglicylowanej tubulinie (B,F,J,N,S,X) – kolor czerwony. Złożenie obrazów: (C,G,K,O,T,Y). Skala: 10  $\mu m$ . Analiza białek frakcji cytoplazmatycznej metodą Western blot z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko metce HA (*Mapk3* (D), *Mapk27* (H), *Nek6* (L), *Pp2c* (U)) lub GFP (*Dusp5* (P), *Kif9* (Z)). Frakcję cytoplazmatyczną oczyszczono z komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek zdolnych do nadprodukcji badanych białek po 2 godzinach aktywacji  $CdCl_2$ . Jako kontrolę nałożenia wykorzystano barwienie roztworem Ponceau S.

Aby sprawdzić czy badane białka bezpośrednio oddziałują z białkiem *Dusp5* oraz wzajemnie ze sobą przeprowadzono szereg doświadczeń typu *pull-down* (rozdz. 4.8.4) z użyciem frakcji cytoplazmatycznych. Białka nadprodukowane z metką GFP stanowiły tzw. „białko-przynętę” (ang. *bait*), związaną do złoża za pośrednictwem przeciwciał anti-GFP. Po oczyszczeniu do próbki zawierającej związane ze złożem oczyszczone białko w fuzji z metką GFP dodawano tzw. „białko-ofiarę” (ang. *prey*), nadprodukowane z metką HA. Obecność metek GFP i HA umożliwiło identyfikację białek za pomocą metody Western blot i wnioskowanie czy badana para białek może ze sobą bezpośrednio oddziaływać (Ryc.28).



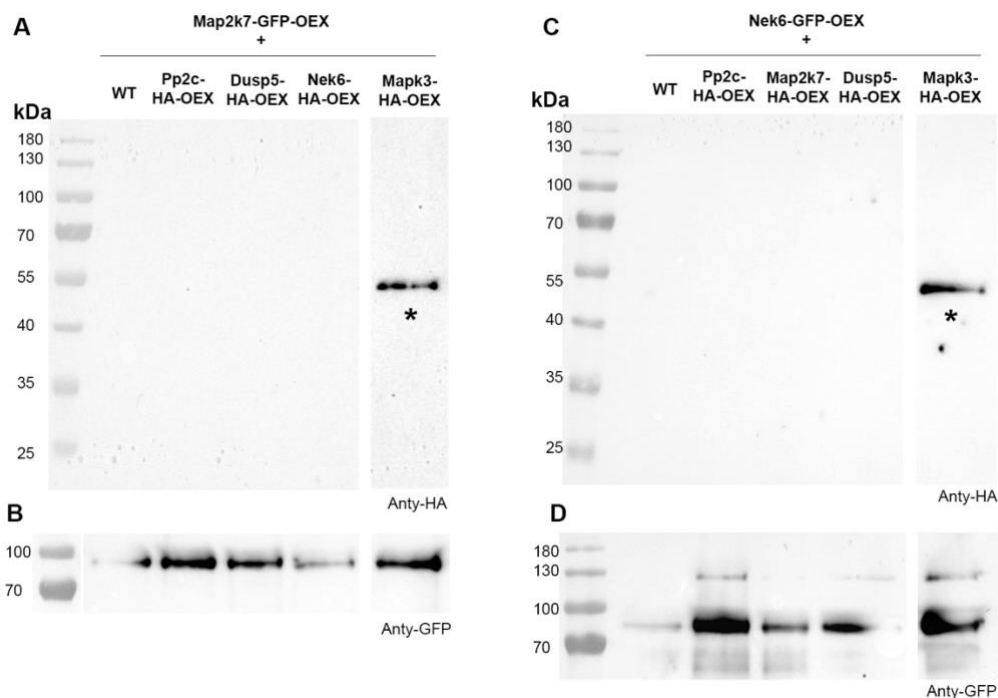
Ryc. 29 Schemat przedstawiający założenia przeprowadzonych doświadczeń typu pull-down. Wykorzystano mutanty zdolne do nadprodukcji białek enzymatycznych: Dusp5, Mapk3, Map2k7, Nek6, Pp2c i Kif9 z metką GFP lub HA. Oczyszczoną frakcję cytoplazmatyczną nanoszono na złoże związane z przeciwciałem anti-GFP i selektywnie oczyszczano białka produkowane w fuzji z metką GFP. Białka te stanowiły tzw. „białko-przynęta”. Do próbek dodawano frakcję cytoplazmatyczną oczyszczoną z mutantów zdolnych do nadprodukcji badanych białek z metką HA – tzw. „białko-ofiara”. W przypadku bezpośredniego oddziaływania badanych białek do złoża związane było zarówno białko z metką GFP jak i białko z metką HA.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń typu pull-down analizowano przy pomocy metody Western blot. Białka przyłączone do złoża wykrywano za pomocą przeciwciał anti-HA oraz anti-GFP. Obecność zarówno białka z metką GFP jak i białka z metką HA w próbce wskazywała na bezpośrednie oddziaływanie badanej pary białek. Doświadczenia, w których białko fuzyjne Dusp5-GFP zostało wykorzystane jako „białko-przynęta” wykazały, że z białkiem tym oddziałują wszystkie badane kinazy – Mapk3, Map2k7 oraz Nek6 (produkowane jako białka fuzyjne z metką HA). Nie wykryto natomiast oddziaływania z białkiem Pp2c-HA (Ryc.29 A). W przypadku białka Mapk3-GFP zastosowanego jako „białko-przynęta” wykryto oddziaływanie tego białka z białkiem DUSP-HA (co potwierdza wcześniej opisany wynik) oraz z kinazami Map2k7 oraz Nek6. Kinaza Mapk3, podobnie jak Dusp5, nie oddziaływała z fosfatazą Pp2c (Ryc.29 C).



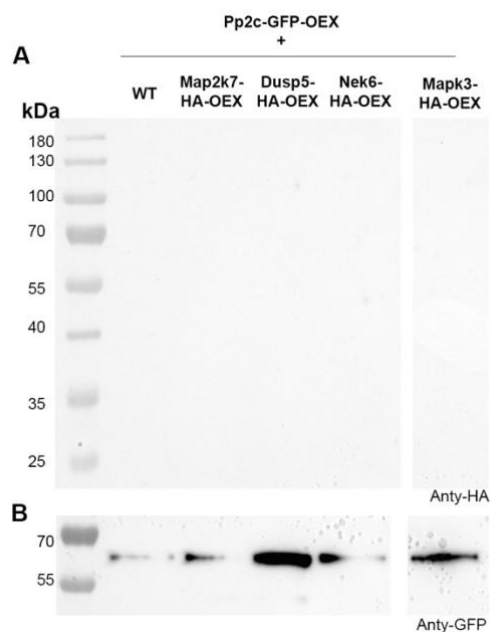
Ryc.30 Analiza oddziaływań białek metodą pull-down. (A i B) Analiza oddziaływań białka Dusp5-GFP z białkami Mapk3, Map2k7, Nek6 i Pp2c produkowanymi z dołączoną metką HA, zwizualizowana z wykorzystaniem przeciwciała anty-HA (A) oraz przeciwciała anty-GFP (B), WT – kontrola: Dusp5-GFP-OEX + lizat WT. (C i D) Analiza oddziaływań białka Mapk3-GFP z białkami Dusp5, Map2k7, Nek6, Pp2c produkowanymi z dołączoną metką HA, zwizualizowana z wykorzystaniem przeciwciała anty-HA (C) oraz przeciwciała anty-GFP (D). Analizowano białka oczyszczone z frakcji cytoplazmatycznej, doświadczenie powtórzono trzykrotnie.

Doświadczenia w których dwie pozostałe kinazy tj. Map2k7 oraz Nek6 produkowane z metką GFP stanowiły „białka-przynęty” wykazały, że oba te białka oddziaływały tylko z białkiem Mapk3 (Ryc.30 A,C). Nie udało się wykryć oddziaływania tych białek z białkiem Dusp5, pomimo, że we wcześniejszym badaniu pokazano, że Dusp5-GFP wiązał kinazy Map2k7-HA oraz Nek6-HA. Być może przyłączenie dużej metki GFP (26 kDa) do białek Map2k7 i Nek6 wpłynęło na ich oddziaływanie z białkiem Dusp5 np. przez zasłonięcie miejsca interakcji tych białek.



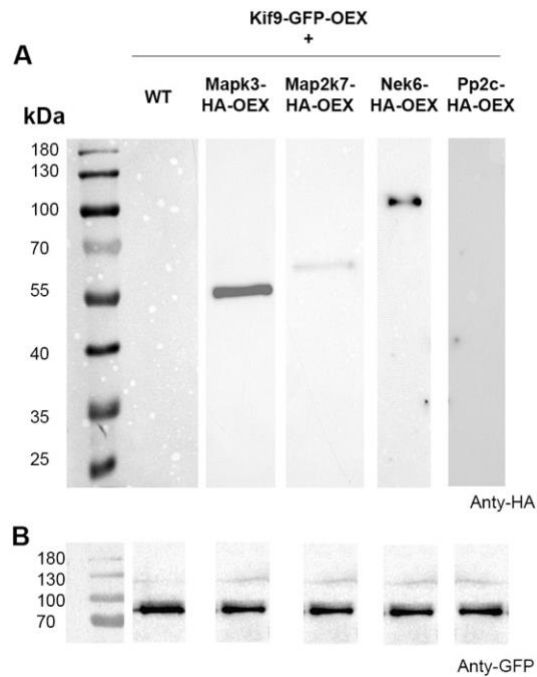
*Ryc.31 Analiza oddziaływań białek metodą pull-down. (A i B) Analiza oddziaływań białka Map2k7-GFP z białkami Dusp5, Mapk3, Nek6, Pp2c produkowanymi z dołączoną metką HA, zwizualizowana z wykorzystaniem przeciwciała anty-HA (A) oraz przeciwciała anty-GFP (B), WT – kontrola: Dusp5-GFP-OEX + lizat WT. (C i D) Analiza oddziaływań białka Nek6-GFP z białkami Dusp5, Mapk3, Map2k7 i Pp2c produkowanymi z dołączoną metką HA, zwizualizowana z wykorzystaniem przeciwciała anty-HA (C) oraz przeciwciała anty-GFP (D). Analizowano białka oczyszczone z frakcji cytoplazmatycznej, doświadczenie powtórzono trzykrotnie.*

Analizy metodą *pull-down* wykazały, że fosfataza Pp2c prawdopodobnie nie oddziałuje bezpośrednio z pozostałymi badanymi białkami, na co wskazuje również analiza, w której białko Pp2c-GFP stanowiło „białko-przynętę” (Ryc. 31).



Ryc. 32 Analiza oddziaływań białek metodą pull-down. (A i B) Analiza oddziaływań białka Pp2c-GFP z białkami Dusp5, Mapk3, Map2k7, Nek6 produkowanymi z dołączoną metką HA, zwizualizowana z wykorzystaniem przeciwciała anty-HA (A) oraz przeciwciała anty-GFP (B), WT – kontrola: Dusp5-GFP-OEX + lizat WT. Analizowano białka oczyszczone z frakcji cytoplazmatycznej, doświadczenie powtórzono trzykrotnie.

Analiza oddziaływań bezpośrednich metodą pull-down wykazała, że kinezyzna Kif9 bezpośrednio oddziałuje z badanymi kinazami – kinazą Mapk3, kinazą Nek6 oraz w słabszym stopniu z kinazą Map2k7 (Ryc. 32), nie udało się natomiast uzyskać wyniku dla białka Dusp5. Ze względu na problemy z uzyskaniem mutantów *Tetrahymena* zdolnych do nadprodukcji białka Kif9 z metką HA nie udało się przeprowadzić doświadczenia odwrotnego, gdzie badane kinazy stanowiłyby „białka-przynęty”.

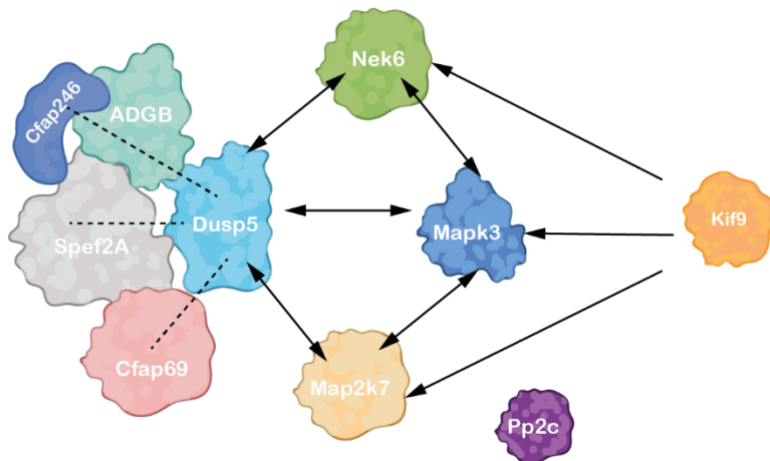


*Ryc.33 Analiza oddziaływań białek metodą pull-down. (A i B) Analiza oddziaływań białka Kif9-GFP z białkami Mapk3, Map2k7, Nek6 i Pp2c produkowanymi z dołączoną metką HA, zwizualizowana z wykorzystaniem przeciwciała anty-HA (A) oraz przeciwciała anty-GFP (B), WT – kontrola: Dusp5-GFP-OEX + lizat WT. Analizowano białka oczyszczone z frakcji cytoplazmatycznej, doświadczenie powtórzono trzykrotnie.*



## PODSUMOWANIE – CZĘŚĆ I

Podsumowując, potwierdzono, że wszystkie badane białka mogące stanowić elementy i regulatory szlaku MAP kinaz lokalizują się w rzęskach *Tetrahymena*. Białko Dusp5 nie tylko znajduje się w bliskiej odległości, ale również tworzy trwały kompleks z białkami wypustki C1b aparatu centralnego *Tetrahymena* tj. Spef2A, Cfap69, Androglobiną, Cfap246/Lrguk, Cfap174 i TTHERM\_00205170. Pozostałe badane białka najprawdopodobniej nie lokalizują się w pobliżu białka Spef2A, mogą jednak znajdować się w bardziej peryferycznej części wypustki C1b bądź oddziaływać z tym białkiem jedynie przejściowo. Zarówno białko Dusp5 jak i Kif9 oddziałują ze wszystkimi badanymi kinazami tj. Mapk3, Map2k7 oraz Nek6. Białko Pp2c nie wchodzi w skład sieci oddziaływań tworzonej przez te białka. Na podstawie uzyskanych wyników możliwe było stworzenie modelu wzajemnych oddziaływań badanych białek (Ryc. 33)



Ryc. 33 Proponowany schemat oddziaływań badanych białek. Liniami przerywanymi oznaczono białka lokalizujące się w bliskiej odległości białka Dusp5 oraz tworzące z nim trwały kompleks. Liniami ciągłymi ze strzałkami oznaczono wzajemne oddziaływania między białkami.

## CZEŚĆ 2

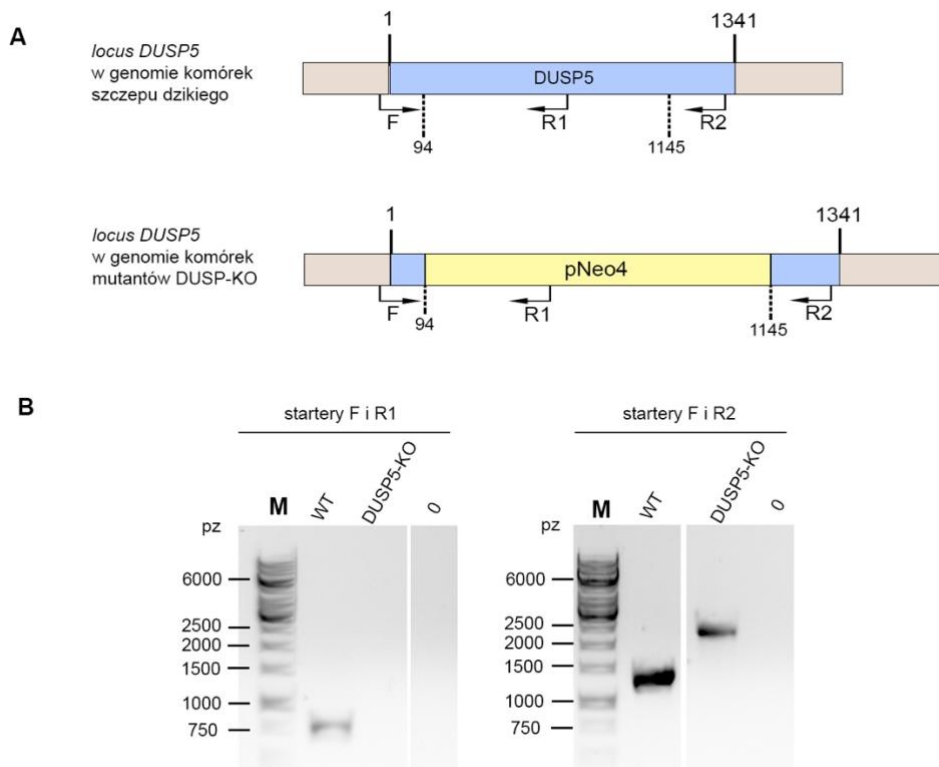
### Analiza funkcjonalna wybranych białek

Jak wykazano powyżej, białka, Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5 i Kif9, których poziom jest obniżony w mutantach pozbawionych wypustki C1b tworzą sieć oddziaływań, która mogłaby pełnić funkcjonalny szlak przekaźnictwa sygnału. Dlatego, aby lepiej zrozumieć rolę jaką pełnią wzajemne oddziaływania tych białek w rzęsce ruchomej, podjęto się próby określenia ich funkcji poprzez analizę fenotypu mutantów pozbawionych badanych białek. Z przyczyn technicznych udało się przygotować jedynie komórki typu knock-out pozbawione białka Dusp5 (rozdz. 4.5.3 oraz rozdz. 4.6.3) (szczep DUSP5-KO). Dodatkowo udało się uzyskać komórki pozbawione białka Kif9 przygotowane w pracowni prof. Jacka Gaertiga (szczep KIF9-KO). Fenotyp tych komórek nie był wcześniej badany.

#### 5.7 Analiza fenotypu komórek pozbawionych badanych białek

Usunięcie fragmentu genu *KIF9* w komórkach KIF9-KO zostało uprzednio przeprowadzone w pracowni prof. Gaertiga (dane niepokazane). W celu potwierdzenia delecji fragmentu genu *DUSP5* oczyszczono genomowe DNA mutantów DUSP5-KO oraz komórek szczepu dzikiego (kontrola) i przeprowadzono reakcję PCR. Jako kontrolę negatywną przeprowadzono reakcję bez matrycowego DNA. Do reakcji PCR wykorzystano startery (Tabela 2) z których dwa (F i R2, Ryc. 10) były komplementarne zarówno do DNA mutantu jak i DNA komórek szczepu dzikiego, a kolejny (R1, Ryc. 10) był komplementarny tylko do genomowego DNA komórek szczepu dzikiego – jego miejsce wiązania znajdowało się w usuniętym u mutantu fragmencie genu. Tak zaprojektowane startery umożliwiły przeprowadzenie dwóch reakcji PCR. Konstrukcja została zaprojektowana tak, by jego inkorporacja w genom powodowała usunięcie prawie całego genu (około 1000 pz) i zastąpienie go przez kasetę neo4 (2 kb), co oznacza, wydłużenie zmutowanego allelu o 1000 pz w stosunku do allelu w genomie szczepu dzikiego. Z tego względu w przypadku użycia jako matrycy genomowego DNA szczepu knock-out produkt reakcji PCR z użyciem starterów F i R2 jest dłuższy niż w przypadku użycia genomowego DNA komórek szczepu dzikiego, natomiast w przypadku użycia starterów F i R1 produkt PCR będzie obecny wyłącznie w przypadku

użycia genomowego DNA komórek szczepu dzikiego (Ryc. 34 A). Analiza z wykorzystaniem metody PCR potwierdziła, że uzyskane mutanty *Tetrahymena* nie posiadają natywnej wersji genu *DUSP5* (Ryc. 34B).



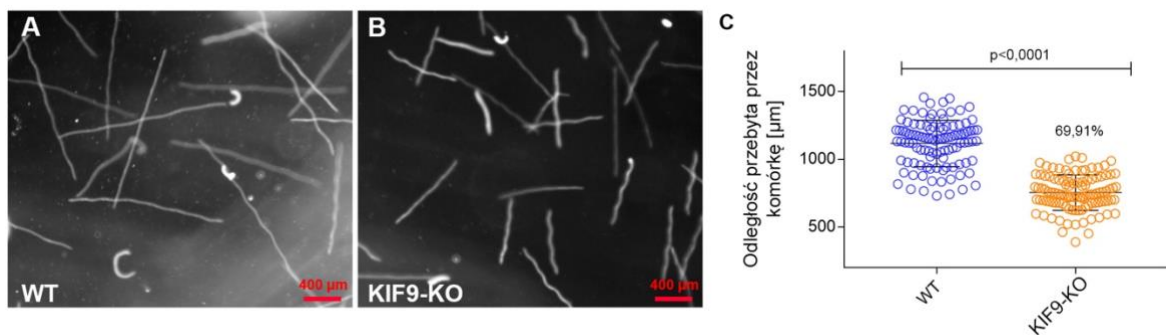
Ryc.34 Analiza zmiany locus *DUSP5* w mutantach *DUSP5-KO*. (A) Schemat locus *DUSP5* w genomie komórek szczepu dzikiego oraz mutantu *DUSP5-KO*. Numery nad liniami ciągłymi oznaczają pozycję nukleotydów, gdzie 1 oznacza pozycję adeniny w kodonie start ATG, a 1341 oznacza pozycję adeniny w kodonie stop TGA. Liniami przerywanymi oznaczono pozycje nukleotydów w sekwencji genu *DUSP5* wyznaczające fragment kodujący genu, który został zastąpiony przez kasetę pNeo4. Strzałkami oznaczono pozycje starterów wykorzystanych do potwierdzenia usunięcia fragmentu genu *DUSP5*, F – starter forward, R1, R2 – startery reverse, odpowiednio starter nr 1 oraz nr 2. Starter R1 wiąże się wyłącznie do DNA komórek typu dzikiego, z nieuszkodzonym genem *DUSP5*. (B) Genomowe DNA oczyszczono z komórek mutantów *DUSP5-KO* i komórek szczepu dzikiego (WT) i użyto jako matrycy w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów przedstawionych na schemacie. Jako „0” oznaczono kontrolę negatywną (reakcja PCR bez matrycowego DNA). Analiza produktów reakcji PCR rozdzielonych na żelu agarozowym, potwierdziła usunięcie fragmentu genu *DUSP5* z genomu otrzymanych mutantów *Tetrahymena*. M – znacznik wielkości fragmentów DNA, pz – pary zasady.

### 5.7.1 Analiza fenotypu mutantów typu knock-out: KIF9-KO oraz DUSP5-KO

Jak wspomniano, rzęski *Tetrahymena* tworzą około 500 rzęsek, które umożliwiają poruszanie się, podziały komórkowe oraz biorą udział w fagocytozie (Dave i in., 2009). Nieprawidłowa budowa lub funkcjonowanie rzęsek może więc prowadzić do zmian w sposobie poruszania się komórek, problemów z podziałem komórkowym i zaburzeń w pobieraniu pokarmu. Wobec tego w ramach wstępnej analizy fenotypu mutantów pozbawionych białka Kif9 bądź Dusp5 przeprowadzono doświadczenia umożliwiające ocenę wyżej wymienionych procesów fizjologicznych (rozdz. 4.7.).

#### 5.7.1.1 Analiza fenotypu mutantów Kif9-KO

Jedną z podstawowych funkcji jakie spełniają rzęski u *Tetrahymena* jest funkcja lokomotoryczna. Analiza tempa poruszania się komórek mutantów KIF9-KO wykazała, że pływały one około 30 % wolniej niż komórki szczepu dzikiego (WT) przy czym tory ruchów komórek mutantów nie odbiegały kształtem od torów ruchu komórek szczepu dzikiego (Ryc. 35)

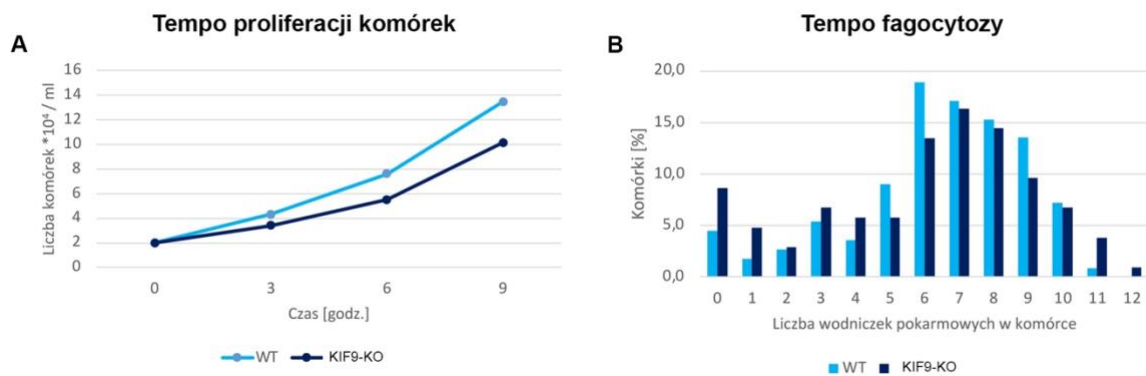


Ryc. 35 Wpływ delecji genu KIF9 na tempo ruchu oraz kształt torów ruchu komórek *Tetrahymena*. (A) Tory ruchu komórek szczepu dzikiego (WT), (B) tory ruchu komórek KIF9-KO, (C) wykres przedstawiający odległości przebyte przez komórki szczepu dzikiego (WT) oraz komórki mutantów KIF9-KO w czasie 3,2 s. Przedział ufności słupków błędów standardowego = 95%, Test T-studenta, różnice są istotne statystycznie. WT ( $n=105$ ), KIF9-KO ( $n=105$ ),  $n$  – liczba zmierzonych torów ruchu.

W komórkach *Tetrahymena* rzęski pełnią również ważną rolę w trakcie podziałów umożliwiając zajście tzw. rotokinezy, która umożliwia rozdzielenie komórek potomnych w końcowej fazie podziału (Brown i in., 1999). Aby porównać tempo proliferacji mutantów KIF9-KO oraz komórek szczepu dzikiego oznaczano gęstość komórek w hodowli w ciągu 9 godzin. Na tej podstawie wykazano, że czas generacji komórek szczepu dzikiego wynosił około 3,25 godz., natomiast komórek

mutantów 3,8 godz., co wskazuje, że komórki KIF9-KO dzieliły się tylko nieznacznie wolniej (Ryc. 36 A).

U *Tetrahymena* rzęski odgrywają również ważną rolę w zdobywaniu pożywienia na drodze fagocytozy. Ruch rzęsek zlokalizowanych w aparacie gębowym umożliwia gromadzenie drobin pokarmu w jego zagłębieniu i tworzenie wodniczek pokarmowych. Dodanie do pożywki czarnego tuszu kreślarskiego powoduje, że drobiny tuszu są pobierane i gromadzone w nowo utworzonych wodniczkach. Porównanie liczby ciemnych wodniczek tworzonych w ciągu 10 minut umożliwia określenie tempa fagocytozy. Przeprowadzone badania wykazały, że tempo fagocytozy komórek szczepu dzikiego i komórek mutantów KIF9-KO było podobne. Komórki szczepu dzikiego średnio wytwarzały 6,4 wodniczek na komórkę, a komórki mutantów KIF9-KO 6 wodniczek na komórkę (Ryc. 36B).

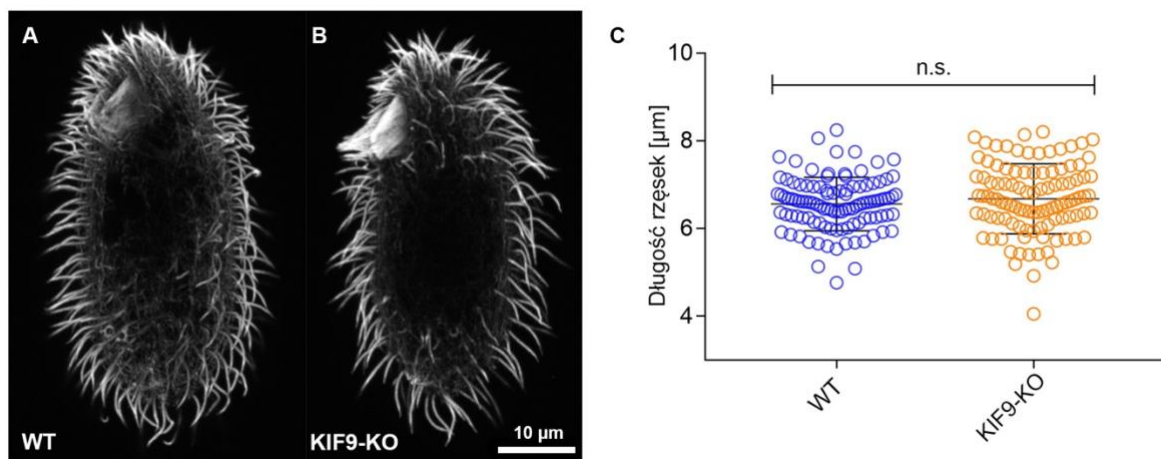


Ryc.36 Wpływ delecji genu *KIF9* na tempo proliferacji oraz tempo fagocytozy komórek *Tetrahymena*. (A) Porównanie tempa proliferacji komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek mutantów *KIF9-KO* szczepu dzikiego (WT). Gęstość hodowli szacowano co 3 godziny. W punkcie „0” hodowle miały taką samą gęstość początkową ( $2 \cdot 10^4$  komórek/ml), (B) Porównanie tempa fagocytozy komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek mutantów *KIF9-KO*. Na wykresie przedstawiono procentowy udział komórek tworzących daną liczbę wodniczek spośród wszystkich analizowanych komórek. WT ( $n=111$ ), *KIF9-KO* ( $n=104$ ),  $n$  – liczba analizowanych komórek.

Podsumowując, wstępna ocena podstawowych procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach mutantów z delecją genu *KIF9*, wykazała, że brak kodowanego przez ten gen białka nie wpływa zarówno na tempo proliferacji jak i tempo fagocytozy, lecz spowalnia, w niewielkim stopniu, tempo pływania komórek. Obniżenie tempa ruchu komórek może być

spowodowane przez zmienioną długość lub liczbę rzęsek albo wynikać z niewłaściwego sposobu bicia rzęski.

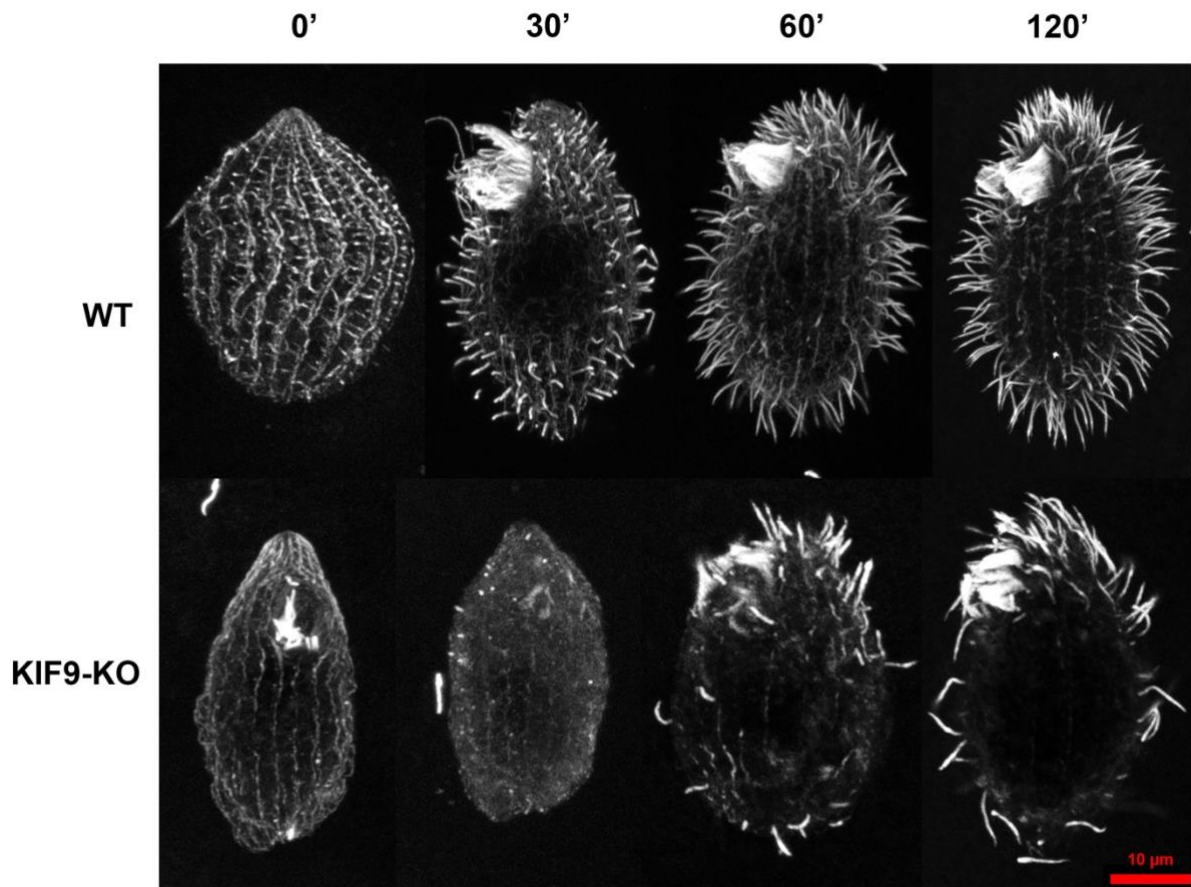
Dlatego w kolejnym etapie doświadczeń oceniono czy brak białka Kif9 wpływa na długość rzęsek tworzonych przez komórki. W tym celu komórki utrwalono i wyznakowano za pomocą przeciwciała skierowanego przeciwko  $\alpha$ -tubulinie, wizualizowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, a następnie mierzono długość rzęsek w programie ImageJ. Otrzymane wyniki wykazały, że komórki mutantów KIF9-KO tworzą rzęski o podobnej długości jak komórki szczepu dzikiego (Ryc. 37). Jednakże jednocześnie w wielu komórkach mutanta KIF9-KO zaobserwowano mniejszą liczbę rzęsek. Taki wynik sugeruje, że brak białka Kif9 hamuje proces ciliogenezy.



Ryc. 37 Mutanty z delecją genu *Kif9* tworzą rzęski normalnej długości. (A) Komórki szczepu dzikiego (WT) oraz (B) komórki mutantów KIF9-KO znakowano przeciwciałem skierowanym przeciwko  $\alpha$ -tubulinie. Skala: 10  $\mu\text{m}$ . (C) Wykres obrazujący pomiary długości rzęsek. Przedział ufności słupków błędów standardowego = 95%, Test T-studenta, różnice nie są istotne statystycznie.

Wobec tego w kolejnym etapie badań fenotypu mutantów KIF9-KO analizowano tempo regeneracji rzęsek po ich eksperymentalnym usunięciu. Komórki *Tetrahymena* szczepu dzikiego regenerują rzęski pełnej długości w ciągu 2 godzin. Komórki mutantów pozbawionych białka Kif9 oraz komórki szczepu dzikiego odrzęsiano (rozd. 4.8.1), a następnie hodowano w 30°C bez wytrząsania w pożywce SPP. Komórki utrwalano a następnie znakowano przeciwciałami skierowanymi przeciwko  $\alpha$ -tubulinie w czterech punktach czasowych – tuż po, a następnie 30, 60 oraz 120 minut po odrzęsieniu w celu obserwacji tempa regeneracji rzęsek. Zaobserwowano, że brak białka Kif9 znacząco wpływa na zdolność regeneracji rzęsek komórek mutantów. Komórki szczepu dzikiego już po godzinie miały prawie całkowicie zregenerowane

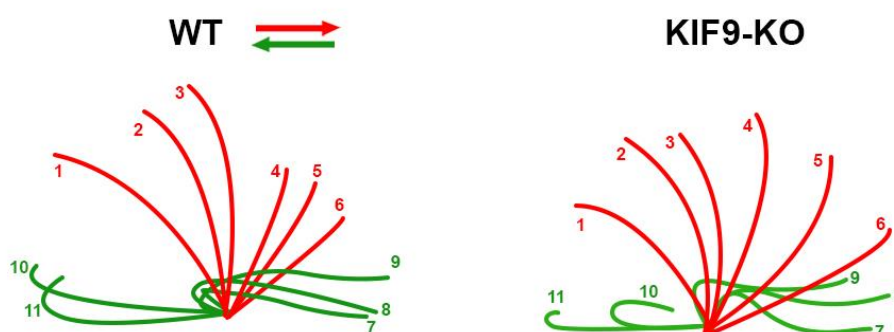
rzęski, natomiast w tym samym punkcie czasowym komórki mutantu utworzyły bardzo nieliczne rzęski, głównie w części przedniej komórki (Ryc. 38).



Ryc. 38 Wpływ braku białka Kif9 na tempo regeneracji rzęsek komórek *Tetrahymena*. Komórki szczepu dzikiego (WT – górny rząd) oraz komórki mutantów KIF9-KO (dolny rząd) utrwalano zaraz po odrzuceniu (0'), oraz po upływie 30, 60 i 120 minut, a następnie znakowano przeciwciałem skierowanym przeciwko  $\alpha$ -tubulinie. Brak białka Kif9 znacząco wpływa na tempo regeneracji rzęsek komórek *Tetrahymena*. Skala: 10  $\mu$ m.

Jak wspomniano powyżej, obniżenie tempa pływania komórek *Tetrahymena* może być spowodowane zmianami w sposobie bicia rzęski. W trakcie prawidłowego ruchu rzęski wyróżnia się dwie fazy – fazę uderzenia efektywnego (ang. *power stroke*), w której dochodzi do przemieszczenia się prostej rzęski w kierunku tylnej części komórki oraz fazę powrotną (ang. *recovery stroke*), w której rzęska ugina się u podstawy i znajdując się blisko ciała komórki powoli wraca do pozycji wyjściowej. Z wykorzystaniem kamery szybkoklatkowej, przy 900 klatkach/s, zarejestrowano ruch rzęsek komórek mutantów KIF9-KO oraz komórek szczepu dzikiego. Analiza poszczególnych klatek umożliwiła odtworzenie ruchu pojedynczej rzęski

w fazie uderzeniowej i fazie powrotnej. Nie zaobserwowano jednak znaczących zmian w żadnej z opisanych faz wzoru bicia rzęski pomiędzy mutantami KLP1-KO a komórkami szczepu dzikiego (Ryc. 39).



Ryc. 39 Analiza kolejnych etapów ruchu pojedynczej rzęski – komórek typu dzikiego (WT) oraz komórek pozbawionych białka Kif9 (KIF9-KO). Kolorem czerwonym zaznaczono fazę uderzenia efektywnego, a kolorem zielonym fazę powrotną. Numerami oznaczono kolejne położenie rzęski w trakcie jednego cyklu.

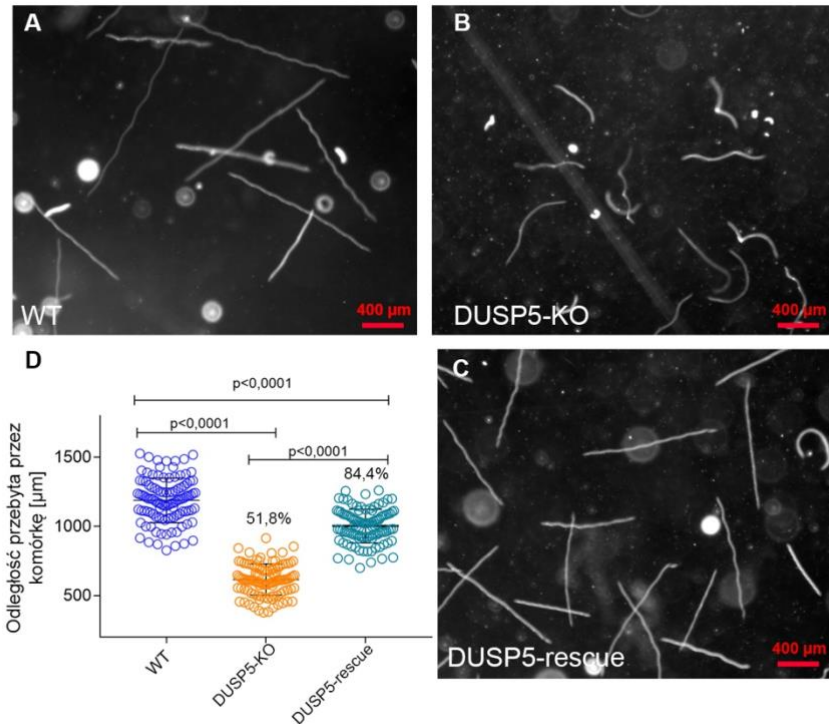
Podsumowując, analiza fenotypu mutantów *Tetrahymena* z delecją genu białka Kif9 wykazała, że brak tego białka nie wpływa na tempo proliferacji ani tempo fagocytozy. Również długość rzęsek, a także ich wzór bicia nie odbiegał od tych obserwowanych u komórek szczepu dzikiego, choć tempo pływania komórek mutantu było nieznacznie obniżone. Co ciekawe, u *Tetrahymena* brak białka Kif9 związany był ze znaczącym spowolnieniem tempa regeneracji rzęsek.

### 5.7.1.2 Analiza fenotypu mutantów DUSP5-KO

W pierwszym etapie zbadano jak usunięcie genu *DUSP5* wpływa na tempo proliferacji i fagocytozę. Analiza tempa ruchu komórek oraz kształtu torów ruchu wykazała, że komórki DUSP5-KO poruszają się o około 50% wolniej od komórek szczepu dzikiego. Ponadto torów ruchów były często zakrzywione co wskazuje, że komórki częściej zmieniały kierunek pływania (Ryc. 40). Aby ocenić, czy obserwowany fenotyp rzeczywiście wynika z braku białka Dusp5, a nie przypadkowo wprowadzonej mutacji, przeprowadzono doświadczenie typu *rescue* (rozdz. 4.6.5). Do komórek mutantów DUSP5-KO wprowadzono konstrukcję umożliwiającą produkcję białka Dusp5 pod kontrolą zależnego od jonów kadmu promotora *MTT1*. Gen białka DUSP5 wprowadzono do niekoniecznego do życia locus *BTU1*. Szybkość pływania komórek



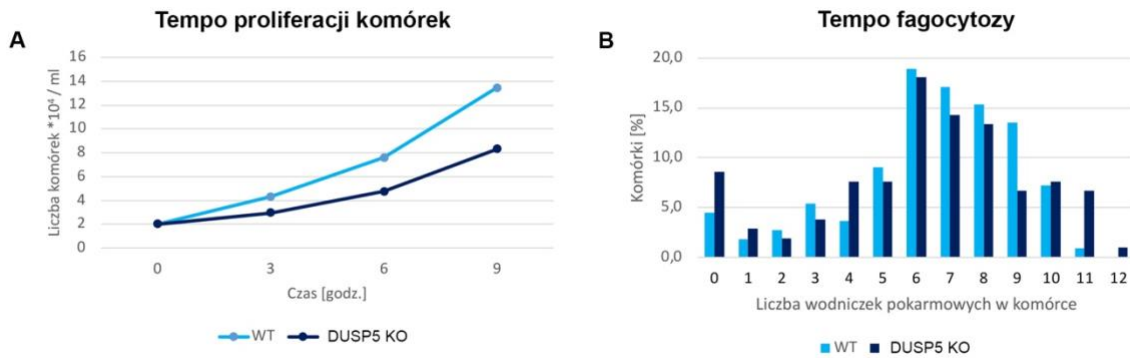
DUSP5-rescue oraz kształty torów ruchu były podobne do komórek typu dzikiego, co potwierdza, że obserwowany fenotyp komórek DUSP5-KO wynikał jedynie z braku białka Dusp5 (Ryc. 40).



Ryc. 40 Wpływ delekcji genu DUSP5 na tempo ruchu oraz kształt torów ruchu komórek Tetrahymena. (A) Tory ruchu komórek szczepu dzikiego (WT), (B) tory ruchu komórek DUSP5-KO i (C) DUSP5-rescue, (D) wykres przedstawiający odległości przebyte przez komórki szczepu dzikiego (WT), komórki mutantów DUSP5-KO oraz DUSP5-rescue w czasie 3,2 s. Przedział ufności słupków błędu standardowego = 95 %, Test T-studenta, różnice są istotne statystycznie. WT (n=105), DUSP-KO (n=105), DUSP-rescue (n=104), n – liczba zmierzonych torów ruchu.

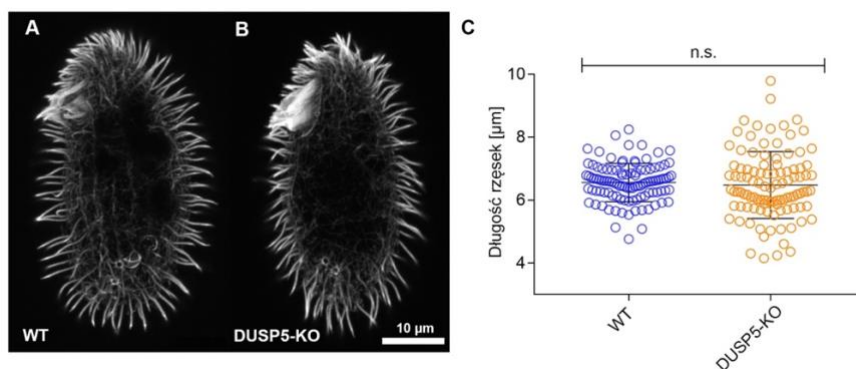
Ocena tempa proliferacji komórek DUSP5-KO wykazała, że komórki mutantów dzielą się wolniej niż komórki szczepu dzikiego. Czas generacji komórek mutantów wynosił 4,4 godz. w porównaniu do 3,25 godz. w przypadku komórek szczepu dzikiego (Ryc. 41A). Nie zaobserwowano natomiast różnic w średniej liczbie tworzonych wodniczek pokarmowych w stosunku do komórek typu dzikiego. Komórki DUSP5-KO tworzyły średnio 6,2 wodniczek na komórkę, a komórki szczepu dzikiego średnio 6,4 wodniczek (Ryc. 7). Obserwowane zmiany w tempie pływania komórek oraz tempie proliferacji wskazują, że rzęski u komórek

mutantów DUSP5-KO nie funkcjonują prawidłowo. Wobec tego w kolejnym etapie badań oceniono parametry rzęsek, które mogą być przyczyną obserwowanych zmian.



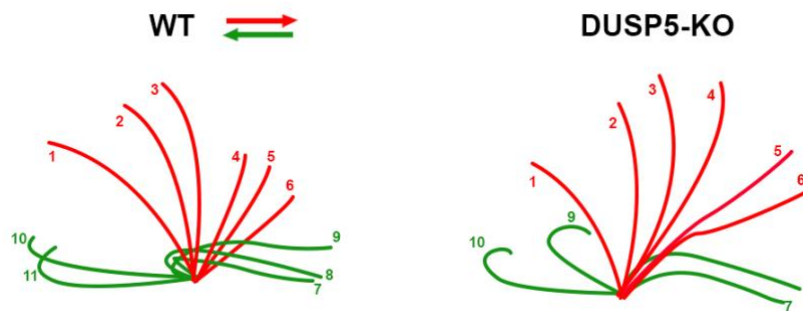
Ryc. 41 Wpływ delecji genu *DUSP5* na tempo proliferacji oraz tempo fagocytozy komórek *Tetrahymena*. (A) Porównanie tempa proliferacji komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek mutantów *DUSP5-KO*. Gęstość hodowli szacowano co 3 godziny. W punkcie „0” hodowle miały taką samą gęstość ( $2 \cdot 10^4$  komórek/ml), (B) Porównanie tempa fagocytozy komórek szczepu dzikiego (WT) oraz komórek mutantów *DUSP5-KO*. Na wykresie przedstawiono procentowy udział komórek tworzących daną liczbę wodniczek spośród wszystkich analizowanych komórek. WT ( $n=111$ ), *DUSP5-KO* ( $n=105$ ),  $n$  – liczba analizowanych komórek.

Analiza długości rzęsek w komórkach mutantów wykazała brak statystycznie istotnych różnic w długości rzęsek komórek *DUSP5-KO* w stosunku do komórek szczepu dzikiego (Ryc. 42). Obserwowany fenotyp mutantu nie wynikał więc ze zmian w długości rzęsek.



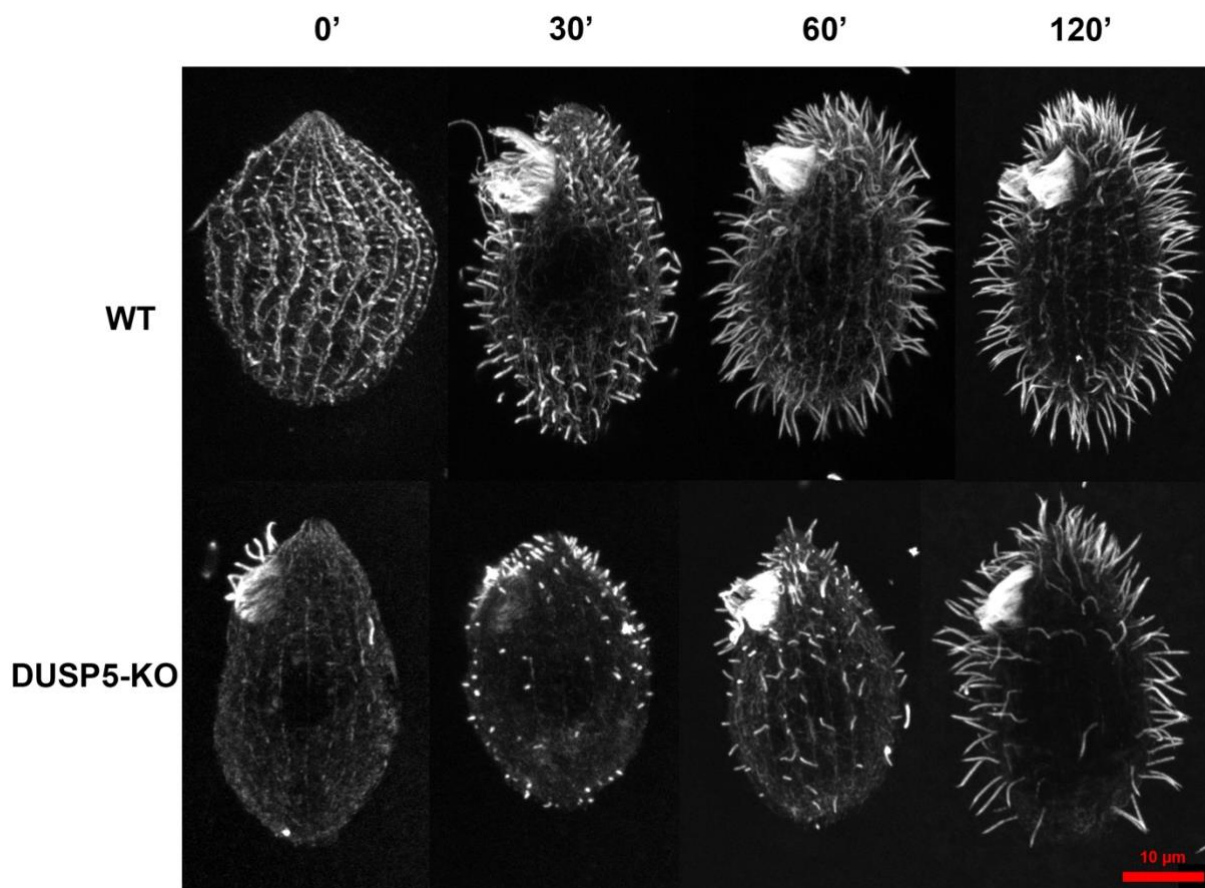
Ryc. 42 Wpływ braku białka *DUSP5* na długość rzęsek komórek *Tetrahymena*. (A) Komórki szczepu dzikiego (WT) oraz (B) komórki mutantów *DUSP5-KO* znakowano przeciwciałem skierowanym przeciwko  $\alpha$ -tubulinie. Skala:  $10 \mu\text{m}$ . (C) Wykres obrazujący pomiary długości rzęsek. Przedział ufności słupków błędu standardowego = 95%, Test *T*-studenta, różnice nie są istotne statystycznie,  $n=100$ , doświadczenie powtórzono 3 razy.

Następnie oceniono czy zmiany w tempie pływania komórek mutantów mogą wynikać ze zmian w sposobie bicia rzęski. Odtworzenie ruchu pojedynczej rzęski mutantów DUSP5-KO za pomocą analizy poszczególnych klatek filmów zarejestrowanych przy pomocy kamery szybkoklatkowej wykazało brak znaczących zmian zarówno w fazie uderzeniowej jak i fazie powrotnej wzoru bicia rzęski pomiędzy mutantami DUSP5-KO a komórkami szczepu dzikiego (Ryc. 43).



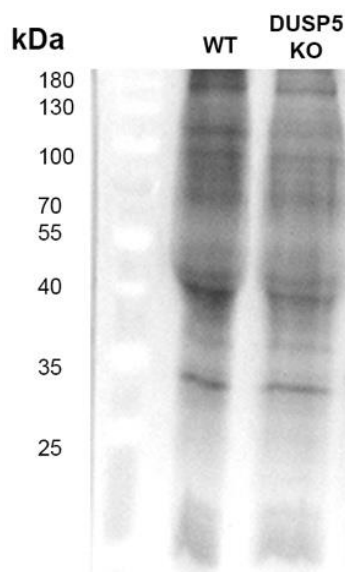
Ryc. 43 Schemat przedstawiający etapy ruchu pojedynczej rzęski – komórek typu dzikiego (WT) oraz komórek pozbawionych białka *Dusp5* (DUSP5-KO). Kolorem czerwonym zaznaczono fazę uderzenia efektywnego, a kolorem zielonym fazę powrotną. Numerami oznaczono kolejne etapy ruchu rzęski.

Aby ocenić fenotyp mutantów DUSP5-KO badano również zdolność komórek nieposiadających białka *Dusp5* do regeneracji rzęsek po ich eksperymentalnym usunięciu. Podobnie jak w przypadku mutantów KIF9-KO, zaobserwowano spowolnienie tempa ciliogenezy (Ryc. 44). Tempo wzrostu rzęsek było wolniejsze co można szczególnie zaobserwować w dwóch punktach czasowych – 30 oraz 60 minut po odrzęsieniu. Jednakże po 2 godz., w komórkach DUSP5-KO długość rzęsek jest podobna (Ryc.44), choć jest ich mniej niż w komórkach szczepu dzikiego.



Ryc. 44 Wpływ braku białka *Dusp5* na tempo regeneracji rzęsek komórek *Tetrahymena*. Komórki szczepu dzikiego (WT – górny rząd) oraz komórki mutantów *DUSP5-KO* (dolny rząd) utrwalano zaraz po odrzuceniu (0'), oraz po 30, 60 i 120 minutach od odrzucenia, a następnie znakowano przeciwciałem skierowanym przeciwko  $\alpha$ -tubulinie. Brak białka *Dusp5* znacząco wpływa na tempo regeneracji rzęsek komórek *Tetrahymena*. Skala: 10  $\mu$ m.

Biorąc pod uwagę, że białko *Dusp5* może bezpośrednio lub pośrednio brać udział w regulacji fosforylacji w rzęsce, porównano ogólny poziom fosforylacji białek we frakcji rzęskowej komórek mutantów *DUSP5-KO* oraz komórek szczepu dzikiego przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Pro-Q™ Diamond Phosphoprotein Gel Stain umożliwiającego selektywne wybarwienie fosforylowanych białek rozdzielonych w żelu poliakryloamidowym (rozdz. 4.8.6). Analiza ta wskazuje, że w komórkach *DUSP5-KO* poziom fosforylacji białek rzęskowych może być nieco obniżony niż w komórkach szczepu dzikiego (Ryc. 46).



Ryc. 46 Detekcja ogólnego poziomu fosforylacji białek we frakcji rzęskowej komórek typu dzikiego (WT) oraz komórek pozbawionych białka *Dusp5* (DUSP5-KO). Próbkę białkową frakcji rzęskowej zostały rozdzielone w żelu poliakryloamidowym, a następnie wybarwione z użyciem odczynnika Pro-Q Diamond.

Podsumowując, analiza fenotypu mutantów DUSP5-KO wykazała, że brak białka *Dusp5* znacząco spowalnia ruch komórek oraz tempo podziałów w porównaniu do komórek szczepu dzikiego. Nie zaobserwowano natomiast zmian w tempie fagocytozy oraz wpływu *Dusp5* na długość rzęsek, ale wykazano, że białko *Dusp5* pełni rolę w procesie ciliogenezy.

## PODSUMOWANIE – CZĘŚĆ II

Delecja zarówno białka *Dusp5* jak i białka *Kif9* obniża tempo ruchu komórek *Tetrahymena*. Ponadto, w obu mutantach zaobserwowano znaczne obniżenie tempa regeneracji rzęsek po eksperymentalnym odrzuceniu. Nie zaobserwowano natomiast zmian w tempie proliferacji, fagocytozy czy długości rzęsek w obu mutantach.

## 5. Dyskusja

Charakterystycznym elementem budowy rzęsek ruchomych jest centralnie umieszczony kompleks aparatu centralnego. Wykazano, że do funkcjonowania aparatu centralnego glonu *Chlamydomonas reinhardtii* niezbędne jest co najmniej 70 białek (Dai i in., 2020; Zhao i in., 2019). Przyjmuje się, że aparat centralny pełni istotną rolę w inicjacji oraz regulacji sygnału umożliwiającego bicie rzęsek. Wiedza na temat jego dokładnej budowy i pełnionych funkcji wciąż jest bardzo ograniczona, szczególnie w odniesieniu do białek posiadających domeny enzymatyczne bądź motoryczne.

Analiza proteomu rzęsek mutantów *Tetrahymena* pozbawionych wyrostka C1b (SPEF2A-CoDel) wykazała, że w tych komórkach zaburzony jest nie tylko poziom białek strukturalnych, ale również poziom białek enzymatycznych. Spośród nich, na podstawie analizy filogenetycznej, wytypowano białka zachowane w toku ewolucji i będące homologami kinaz MAP: Mapk3, Map2k7, kinazy Nek6, fosfatazy Pp2c oraz fosfatazy o podwójnej specyficzności Dusp5. Do grupy badanych białek dołączono również kinezynę Kif9 – ortolog białka Klp1 u *Chlamydomonas* (Bernstein i in., 1994; Yokoyama i in., 2004). Kinezyna ta jest białkiem wchodzącym w skład wyrostka C2c aparatu centralnego. Wykazano, że niektóre kinezyzny mogą pełnić istotną rolę w szlaku sygnałowym MAP kinaz, uczestnicząc w ich transporcie i tym samym zapewniając ciągłość przekazywania sygnału (Liang i Yang, 2019). Postanowiono więc sprawdzić, czy białko to jest powiązane z wytypowanymi kinazami.

Największa część badań skupiona została na białku Dusp5, które jest całkowicie nieobecne w komórkach pozbawionych wyrostka C1b (komórki SPEF2A-coDel), co sugeruje bliskie powiązanie z białkiem Spef2A oraz zależną od niego lokalizacją w rzęsce. Przeprowadzone doświadczenia – zarówno doświadczenie BioID umożliwiające identyfikację białek znajdujących się w bliskiej odległości, a także koimmunoprecypitacja potwierdziły te przypuszczenia. Wykazano, że białko Dusp5 nie tylko lokalizuje się w bliskiej odległości białek budujących wyrostek C1b, ale również tworzy z nimi trwały kompleks. Były to te same białka, które zostały zlokalizowane w pobliżu białka Spef2A tj. Cfp69, androglobina, Lrguk/Cfp246, Cfp174 oraz białko specyficzne dla orzęsków THERM\_00205170 (Joachimiak i in., 2021). Można więc stwierdzić, że białko Dusp5 jest nowoodkrytym białkiem strukturalnym budującym wyrostek C1b aparatu centralnego.

Analiza domenowa wykazała natomiast, że białko Dusp5 jest fosfatazą o podwójnej specyficzności. Fosfatazy takie charakteryzują się dobrze zachowanym w toku ewolucji motywem, w którym kluczowa dla zachowania aktywności enzymatycznej jest znajdująca się

na drugiej pozycji tego motywu cysteina (Denu i Dixon, 1995; Wishart i Dixon, 1998). W sekwencji aminokwasowej Dusp5 u *Tetrahymena* motyw ten jest zachowany, jednak cysteina zastąpiona została przez kwas asparaginowy co sugeruje, że białko to najprawdopodobniej jest pseudofosfatazą. Mimo potencjalnego braku aktywności enzymatycznej, Dusp5 wciąż może być istotnym elementem szlaku przekazywania sygnału w rzęskach. Badania wykazały, że pseudoenzymy stanowią około 10 % proteomów i pełnią kluczowe funkcje w przekazywaniu sygnałów poprzez: (i) regulację allosteryczną aktywności innych enzymów, (ii) uleganie modyfikacjom posttranslacyjnym i tym samym uczestniczenie w szlaku przekazywania sygnału, (iii) branie udziału w tworzeniu kompleksów sygnałowych, (iv) kompetencyjne wiązanie substratu, (v) regulowanie lokalizacji innych enzymów (Murphy i in., 2017). Wobec tego uważa się, że pseudoenzymy mają duże znaczenie terapeutyczne i mogą być celem nowych terapii w leczeniu wielu chorób (Ribeiro i in., 2019). Pseudoenzymy nie były jak dotąd badane w kontekście roli w rzęskach zarówno u ludzi jak i u organizmów modelowych w tym *Tetrahymena*. Można odnieść się jednak do badań nad pseudofosfatazą STYX u człowieka. Białko to również zaliczane jest do grupy fosfataz o podwójnej specyficzności i jak wykazano, kluczowa dla zachowania funkcji enzymatycznej cysteina została zastąpiona przez glicynę w motywie centrum aktywnego. Pomimo braku aktywności katalitycznej fosfataza STYX jest m.in. ważnym regulatorem szlaku sygnałowego kinazy ERK1/2. Wykazano, że białko to konkuruje z fosfatazą Dusp4 w wiązaniu ERK1. Brak fosfatazy STYX powoduje wzrost aktywności ERK1, zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, prowadząc do zaburzenia prawidłowej migracji komórek (Reiterer i in., 2013). Niewykluczone jest więc, że podobnie jak pseudofosfataza STYX u człowieka, białko Dusp5 u *Tetrahymena* może pełnić rolę w regulacji szlaków sygnałowych w rzęskach, tym samym regulując ich funkcjonowanie. Wskazują na to wyniki doświadczeń typu *pull-down*, w których analizowano oddziaływania bezpośrednie z pozostałymi badanymi białkami. Białko Dusp5 zastosowane jako „białko-przynęta” oddziaływało z kinazą Mapk3, Map2k7 i Nek6. Wykonano również doświadczenie odwrotne w którym kinazy te produkowane z metką GFP stanowiły „białko-przynęty”. W tym wypadku białko Dusp5 oddziaływało tylko z kinazą Mapk3. Być może kinazy Map2k7 oraz Nek6 w wyniku dołączonej na końcu karboksylowym białka metce GFP miały zasłonięte miejsce niezbędne do interakcji z białkiem Dusp5. Niemniej jednak wynik ten sugeruje, że fosfataza Dusp5 może być zaangażowana pośrednio w regulację przekazywania sygnału w rzęsce np. poprzez kompetencyjne wiązanie tych białek bądź regulowanie ich lokalizacji i umożliwienie fosforylacji ich substratów.

Kinazy Mapk3, Map2k7, Nek6 oraz fosfataza Pp2c charakteryzują się zaburzonym poziomem w mutantach pozbawionych białka Spef2A i w konsekwencji wyrostka C2b. Aby sprawdzić, czy znajdują się one w pobliżu tego białka (a więc mogą być jego potencjalnymi partnerami), przeprowadzono zmodyfikowane doświadczenie BioID. W doświadczeniu tym sprawdzano, czy badane białko produkowane z metką GFP znajduje się wśród białek biotynylowanych poprzez związaną z białkiem Spef2A zmutowaną ligazę biotyny TurboID. W związku z tym, że w klasycznym doświadczeniu BioID w pobliżu białka Dusp5 zidentyfikowano białko Spef2A, wykorzystano to białko do przeprowadzenia kontroli pozytywnej. Doświadczenie kontrolne potwierdziło obecność białka Dusp5 z dołączoną metką GFP wśród biotynylowanych białek, tym samym potwierdzając, że taka modyfikacja doświadczenia pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników. W przypadku białka Mapk3 nie udało się przeprowadzić tego doświadczenia ze względu na problemy z otrzymaniem podwójnych mutantów *Tetrahymena* produkujących zarówno białko Mapk3 z metką GFP jak i białko Spef2A z metką HA-TurboID. Co ciekawe pozostałe białka tj. Map2k7, Nek6, Pp2c oraz Kif9 nie lokalizowały się w pobliżu białka Spef2A. Jednakże nie wyklucza to ostatecznie, że białka te nie znajdują się w jego bliskiej odległości. Być może liczba biotynylowanych peptydów tych białek była zbyt niska by można było wykryć je za pomocą metody Western Blot, bądź białka te oddziałują tylko przejściowo z białkami znajdującymi się w bliskiej odległości białka Spef2A.

Analiza filogenetyczna, oddziałującej z Dusp5, kinazy serynowo-treoninowej Mapk3 *Tetrahymena* wykazała, że w sekwencji aminokwasowej tego białka zachowane zostały kluczowe motywy centrum aktywnego, a więc najprawdopodobniej białko to wykazuje aktywność enzymatyczną. W mutantach pozbawionych wyrostka C1b (SPEF2A-CoDel) poziom tego białka był obniżony w porównaniu do komórek szczepu typu dzikiego. W sekwencji aminokwasowej białka zachowane są motywy DFG i HRD, a w motywie APE, alanina została zastąpiona przez prolinę. Opisane motywy są zachowanymi w toku ewolucji motywami warunkującymi aktywność enzymatyczną kinezyn. Motyw HRD znajduje się w części katalitycznej enzymu, motyw APE pełni ważną rolę w wiązaniu substratu, a motyw DFG jest kluczowy w wiązaniu jonu magnezu (Kornev i Taylor, 2010). Białko Mapk3, na natywnym poziomie, lokalizuje się w rzęskach *Tetrahymena*, obserwowany sygnał jest jednak stosunkowo słaby co może wynikać z niewielkiej ilości tego białka w rzęsce spowodowanej pełnioną przez to białko funkcją enzymatyczną. Natomiast nadprodukowane białko Mapk3 tworzy agregaty w cytoplazmie, których lokalizacja nie pokrywa się z lokalizacją



ciałek podstawowych. Podobnie jak w przypadku białka Mapk3 poziom kinazy Nek6 również jest obniżony w mutantach SPEF2A-CoDel. W sekwencji aminokwasowej tej kinazy zachowany jest motyw HRD, lecz w motywie APE, alanina została zastąpiona seryną, a w motywie DFG, znajdująca się na drugiej pozycji fenyloalanina została zastąpiona przez leucynę. Taką zmianę obserwowano we wszystkich sekwencjach aminokwasowych homologów tego białka od pierwotniaków do człowieka co może sugerować, że pomimo tych zmian białko to ma zachowaną funkcję katalityczną. Co ciekawe w sekwencji aminokwasowej białka Nek6 u pierwotniaków (za wyjątkiem *Halteria grandinella*) za znajdującą się w części aminowej białka domenie kinazy znajduje się domena białka IFT57. Białko IFT57 jest białkiem zaangażowanym w transport wewnątrzrzęskowy i wchodzi w skład kompleksu IFT-B, biorącego udział w transporcie wstępującym tj. w kierunku czubka rzęski (H. Ishikawa i Marshall, 2017). Być może białko Nek6 pełni zarówno funkcję kinazy jak i jest zaangażowane w transport innych białek do rzęski np. białek budujących wyrostek C1b/f. Białko Nek6 na natywnym poziomie lokalizuje się w rzęskach, obserwowano również wzmocnienie sygnału u ich podstawy. Natomiast w wyniku nadprodukcji białko to lokalizuje się w rejonie ciałek podstawowych. Takie rozmieszczenie białka Nek6 sugeruje więc, że faktycznie może ono być częścią kompleksu IFT-B. Badania nad białkiem IFT57 u *Chlamydomonas* wykazały, że białko to nie jest kluczowe w formowaniu kompleksu IFT, lecz bierze udział w jego stabilizacji i uczestniczy w transporcie białek niezbędnych do zapewnienia prawidłowego ruchu rzęski. Mutanty pozbawione tego białka charakteryzowały się zaburzonym wzorem bicia rzęski, a poziom podjednostki IC97 wewnętrznego ramienia dyneinowego II w ich rzęskach był znacząco obniżony, przy niezmiennym ogólnym poziomie tego białka, co wskazuje na problem z transportem do rzęski (Jiang i in., 2017).

Jedynym białkiem, które charakteryzowało się znacząco podwyższonym poziomem w komórkach mutantów pozbawionych wyrostka C1b była kinaza Map2k7. Analiza domenowa wykazała, że jest to kinaza o podwójnej specyficzności, jednak nie wszystkie motywy niezbędne dla funkcji katalitycznej były zachowane. W doświadczeniach typu *pull-down* wykazano, że Map2k7 oddziałuje bezpośrednio z kinazą Nek6, kinezyną Kif9 oraz jak wspomniano wcześniej białkiem Dusp5. Co ciekawe białko to na natywnym poziomie lokalizowało się w rzęskach, lecz w przypadku nadprodukcji lokowało się w regionie podbłonowym. Możliwe jest więc, że również w komórkach pozbawionych białka Spef2A lokalizacja tego białka ulega zmianie w podobny sposób.

Analiza filogenetyczna kinezyzny Kif9 potwierdziła, że białko to jest dobrze zachowane w toku ewolucji. Kinezyzny wykorzystują energię uwolnioną z rozpadu ATP do zmiany konformacji umożliwiającej „kroczenie” w kierunku plus mikrotubul. Przeprowadzona analiza sekwencji aminokwasowej białka Kif9 pozwoliła na zidentyfikowanie charakterystycznych motywów umożliwiających wiązanie ATP, takich jak motyw Walker A oraz motywy Switch I oraz Switch II (Kull & Endow, 2002; Walker i in., 1982). Niewykluczone jest więc, że białko Kif9 stanowi nie tylko białko strukturalne aparatu centralnego, ale może mieć również zachowaną aktywność motoryczną, która stanowi ważny element prawidłowej regulacji bicia rzęski. Przeprowadzone badania potwierdziły, że białko Kif9 *Tetrahymena* produkowane na natywnym poziomie lokalizuje się w rzęskach. Co ciekawe nadprodukcja białka Kif9 powoduje, że białko to nie tylko znajduje się w rzęskach, ale również w ciele komórki, gdzie tworzy charakterystyczne, włókniste struktury przypominające układ mikrotubul w cytoplazmie, co sugeruje, że białko Kif9 może mieć zdolność wiązania mikrotubul.

Druga z badanych fosfataz – fosfataza Pp2c jest bardzo dobrze zachowana w toku ewolucji, a w jej sekwencji znajdują się aminokwasy kluczowe pod względem wiązania jonu magnezu niezbędnego dla jej funkcji katalitycznej. Białko Pp2c lokalizuje się w rzęskach *Tetrahymena*, jednak przeprowadzone badania wykazały, że nie lokalizuje się w pobliżu białka Spf2A oraz Dusp5, a także nie oddziałuje bezpośrednio z żadnym z pozostałych badanych białek. Najprawdopodobniej białko to nie stanowi elementu sieci białek tworzonej przez kinazę Mapk3, Map2k7, Nek6, fosfatazę Dusp5 oraz kinezyzę Kif9.

W przypadku analizy mutantów pozbawionych białek enzymatycznych, może dojść do tzw. redundancji, która polega na przejęciu funkcji brakującego białka przez inne białko. W takim przypadku u mutantów nie dochodzi do zmian w fenotypie, wobec czego niemożliwa jest ocena funkcji tego białka. Wykazano, że u kinaz MAP, kinaza ERK1 i ERK2 oraz kinaza JNK oraz p38 mogą wzajemnie przejmować swoje role, a więc zachodzi wyżej wspomniane zjawisko (Saba-El-Leil i in., 2016). Wobec tego w ramach przeprowadzonych badań dokonano analizy funkcjonalnej białka Dusp5 oraz kinezyzny Kif9. W tym celu przygotowano mutanty *Tetrahymena* pozbawione tych białek, odpowiednio mutanty DUSP5-KO oraz KIF9-KO.

Analiza fenotypu komórek *Tetrahymena* pozbawionych białka Dusp5 wykazała, że pływają one około połowę wolniej niż komórki szczepu typu dzikiego przy jednoczesnym braku różnic we wzorze bicia rzęski. Obserwowany fenotyp nie jest podobny do fenotypu mutantów SPEF2A-CoDel i CFAP69-KO, które charakteryzowały się rotacyjnym wzorem bicia rzęski, a w konsekwencji znacznym obniżeniem tempa pływania (Joachimiak i in., 2021).

Najprawdopodobniej utrata białka Dusp5 nie wiąże się więc z utratą całego bądź znacznej części wyrostka C1b, jak w przypadku braku białka Spef2A lub Cfp69. Według niedawno opublikowanych wyników badań wykorzystujących kriomikroskopię elektronową, w aparacie centralnym *Chlamydomonas* białko CPC1 (ortolog Spef2) oraz białko FAP69 znajdują się u podstawy wyrostka C1b i oddziałują z innymi budującymi go białkami co tłumaczy ich kluczową rolę w jego powstawaniu (Gui i in., 2022). Sugeruje to, że białko Dusp5 nie warunkuje lokalizacji białka Spef2A oraz Cfp69 i stanowi bardziej dystalny element wyrostka C1b. Ponadto badania te wykazały również, że w strukturze wyrostka C1b aparatu centralnego znajdują się dwie domeny kinazy adenylanowej (w białku CPC1 (ortologu Spef2) oraz FAP42), pięć domen kinazy guanylanowej (w białku FAP42) oraz enolaza. Kinaza adenylanowa przekształca ADP do ATP, kinaza guanylanowa wytwarza GMP z wykorzystaniem ATP, a enolaza uczestniczy w glikolitycznym szlaku powstawania ATP (Dzeja & Terzic, 2009; Stehle & Schulz, 1992; E. Zhang i in., 1997). Autorzy tych badań sugerują, że zgromadzenie domen zdolnych do produkcji bądź zużycia ATP w obrębie wyrostka C1b ma najprawdopodobniej znaczenie funkcjonalne i podkreślają, że do jednego cyklu bicia rzęski potrzebne jest około 230 000 cząsteczek ATP, a lokalne zmiany stosunku ATP/ADP mogą wpływać na funkcjonowanie rzęsek (Gui i in., 2022). Niewykluczone jest więc, że białko Dusp5, oraz pozostałe badane białka tworzące z nim sieć wzajemnych oddziaływań, mogą być zaangażowane w regulację zasobów energetycznych rzęski. Szlak przekazywania sygnału z aparatu centralnego poprzez promienie łączące do kompleksu N-DRC i ramion dyneinowych wciąż pozostaje nieznany. Wiadomo jednak, że zewnętrzne ramiona dyneinowe mogą być regulowane przez szereg czynników w tym m.in. poprzez modyfikacje posttranslacyjne – w tym fosforylację (Hamasaki, 1999; Hamasaki i in., 1991). Wykazano, że u *Paramecium* zależna od cAMP oraz jonów wapnia fosforylacja podjednostek ramion dyneinowych wpływa na szybkość pływania komórek (Bonini i in., 1986). Być może białko Dusp5 również zaangażowane jest w szlak sygnałowy regulujący aktywność ODA poprzez fosforylację. Aby więc ocenić czy brak białka Dusp5 bezpośrednio lub pośrednio wpływa na poziom fosforylacji białek rzęskowych przeprowadzono doświadczenie umożliwiające wizualizację fosforylowanych białek frakcji rzęskowej, rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym. Nie zaobserwowano jednak znaczących różnic w poziomie fosforylacji pomiędzy komórkami szczepu typu dzikiego, a komórkami pozbawionymi białka Dusp5. Wydaje się jednak, że zastosowana metoda mogła być zbyt mało swoista – umożliwiała obserwację zmian w fosforylacji białek całego proteomu rzęskowego. W przypadku, gdyby białko Dusp5

regulowało poziom fosforylacji tylko jednego bądź kilku białek zaobserwowanie różnic byłoby bardzo trudne. Zakładając, że białko Dusp5 posiada jednak funkcję enzymatyczną jego rolę mogłaby również przejąć inna fosfataza. Na podstawie uzyskanych wyników nie można więc jednoznacznie wykluczyć bezpośredniego lub pośredniego wpływu białka Dusp5 na poziom fosforylacji białek rzęskowych. Dobrym doświadczeniem umożliwiającym nie tylko ocenę różnic w fosforylacji proteomu rzęskowego, ale także identyfikację ewentualnych białek – substratów fosfatazy Dusp5 byłoby przeprowadzenie identyfikacji fosforylowanych reszt seryny, treoniny i tyrozyny za pomocą spektrometrii mas w lizacie białkowym rzęsek mutantów i komórek szczepu typu dzikiego. Pozwoliłoby to na analizę jakościową oraz ilościową poziomu fosforylacji białek w rzęsce (Breitkopf & Asara, 2012; Yu & Veenstra, 2020). Innym, ciekawym doświadczeniem, które pozwoliłoby na lepszą ocenę funkcji białka Dusp5 byłoby przygotowanie mutantów *Tetrahymena* produkujących to białko z mutacją punktową w motywie charakterystycznym dla fosfataz o podwójnej specyficzności, polegającą na zamianie kwasu asparaginowego na cysteinę co teoretycznie mogłoby przywrócić jej aktywność enzymatyczną (Hinton, 2016).

Podsumowując przeprowadzone badania nad białkiem Dusp5 *Tetrahymena* sugerują, że białko to pełni w aparacie centralnym funkcję strukturalną, ale niewykluczone jest, że stanowi również element regulacji przekazywania sygnału np. poprzez oddziaływanie z badanymi kinazami. Rola białka Dusp5 może być podobna do roli kinazy STK36, która najprawdopodobniej lokalizuje się pomiędzy główkami promieni łączących a wyrostkami aparatu centralnego i reguluje przekazywanie sygnału między tymi strukturami (Edelbusch i in., 2017).

Analiza mutantów *Tetrahymena* pozbawionych białka Kif9 wykazała, że komórki te mają spowolnione tempo pływania względem komórek szczepu typu dzikiego o około 30 %. Poza tym nie obserwowano żadnych istotnych zmian fenotypu za wyjątkiem znacznego spowolnienia tempa regeneracji rzęsek po eksperymentalnym odrzuceniu. Co ciekawe podobne zmiany zaobserwowano w mutantach DUSP5-KO. Sugeruje to, że białka te mogą brać udział w procesie biogenezy rzęsek np. poprzez regulowanie bądź zaangażowanie w transport wewnątrzrzęskowy (ang. *Intraflagellar Transport*, IFT). Obecnie uważa się, że system transportu wewnątrzrzęskowego odbywa się po mikrotubulach dubletów peryferycznych (H. Ishikawa i Marshall, 2017; Taschner i Lorentzen, 2016). Wyniki tych badań wskazują jednak na możliwość transportu wewnątrzrzęskowego w pobliżu aparatu centralnego. Co istotne

w mutantach pozbawionych wypustki C1b poziom większości białek IFT jest obniżony, co może wspierać przedstawioną tezę.

Badania przeprowadzone na mutantach *Chlamydomonas* pozbawionych białka KLP1 (ortologu Kif9) wykazały, że mają one sparaliżowane wici co wynika najprawdopodobniej z utraty wypustki C2c, a także części sąsiadującej wypustki C2b (Yokoyama i in., 2004). Wydaje się więc, że białko Kif9 u *Tetrahymena* może pełnić nieco odmienną rolę niż u *Chlamydomonas*. Ponadto autorzy tych badań potwierdzili, że białko to występuje w dwóch formach – fosforylowanej i niefosforylowanej oraz ma zdolność wiązania do mikrotubul – podobnie jak sugeruje lokalizacja nadprodukowanego białka Kif9 u *Tetrahymena*. Natomiast u *Trypanosoma brucei* ortologiem białka Kif9 jest białko KIF9A, którego brak także zaburza ruch wici jednak, w przeciwieństwie do *Chlamydomonas*, nie zaobserwowano zmian strukturalnych w aksonemie (Demonchy i in., 2009). Natomiast badania mysiego ortologu białka Kif9, wykazały, że białko to głównie lokalizuje się w jądrach a jedynie w niewielkich ilościach produkowane jest w mózgu czy płucach. Brak białka Kif9 skutkowało obniżoną płodnością ze względu na nieprawidłowy ruch wici plemników, które charakteryzowały się asymetrycznym wzorem bicia (Miyata i in., 2020). Ponadto dalsze badania tej grupy ujawniły, że poprzez wprowadzenie mutacji w motywie odpowiedzialnym za wiązanie ATP, dochodzi do pozbawienia Kif9 aktywności domeny motorycznej i tym samym uniemożliwia lokalizację tego białka w wiciach plemników. Autorzy tych badań sugerują, że białko Kif9 może wykorzystywać własną domenę motoryczną by przemieszczać się wzdłuż mikrotubul tworzonej wici bądź domena ta jest niezbędna dla tego białka tylko do przemieszczenia się w rejon podstawy rzęski (Miyata i in., 2022). Badania na orzęsionych komórkach *Xenopus* potwierdziły te wyniki wskazując, że białko Kif9 jest zdolne do ruchu *in vitro*, jednak ma ograniczony zasięg przemieszczania *in vivo* w aksonemie (Konjikusic i in., 2023). Biorąc pod uwagę, że nadprodukowane białko Kif9 u *Tetrahymena* tworzy w ciele komórki wzór przypominający mikrotubule, prawdopodobne jest więc, że aktywność domeny motorycznej tego białka zachowana jest w toku ewolucji. Wykorzystując kriomikroskopię elektronową badania białka Klp1 u *Chlamydomonas* wykazały, że białko to występuje w aparacie centralnym w dwóch odmiennych konformacjach (Han i in., 2022). Autorzy sugerują, że białko to ma zdolność kroczenia po mikrotubuli C2 aparatu centralnego *Chlamydomonas* i poprzez zmianę konformacji uczestniczy w ruchu ślizgowym i rotacji jego mikrotubul, przyczyniając się do tworzenia sił mechanicznych, przekazywanych z mikrotubuli C2 do mikrotubuli C1 i w konsekwencji do promieni łączących (Han i in., 2022). Podsumowując, białko *Kif9* ma

najprawdopodobniej zachowaną w toku ewolucji aktywność domeny motorycznej, jednak jego dokładna rola w aparacie centralnym nie została jeszcze dokładnie określona. Wykazano, że aktywność kinezyn może być regulowana przez fosforylację zależną od działania różnych kinaz (Kumari i Ray, 2022). Być może zidentyfikowane z wykorzystaniem metody *pull-down* oddziaływania bezpośrednie Kif9 z badanymi kinazami Mapk3, Map2k7 i Nek6 odpowiedzialne są za regulację funkcji tego białka i w konsekwencji za powstawanie oddziaływań mechanicznych odpowiedzialne za prawidłowy ruch rzęsek.

## 6. Podsumowanie i wnioski

**Podsumowując**, badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy wykazały, że:

1. Poziom białek enzymatycznych Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5, Pp2c jest zaburzony w komórkach pozbawionych wyrostka C1b aparatu centralnego *Tetrahymena* (SPEF2A-CoDel),
2. Białka Mapk3, Map2k7, Nek6, Pp2c i Kif9 są dobrze zachowane w toku ewolucji wraz z domenami odpowiedzialnymi za ich aktywność katalityczną,
3. Białko Dusp5 jest białkiem dobrze zachowanym w toku ewolucji z zachowanym motywem charakterystycznym dla fosfataz o podwójnej specyficzności, w którym doszło do zamiany istotnej dla funkcji katalitycznej białka cysteiny na argininę,
4. W sekwencji aminokwasowej białka Nek6 u orzęsków występuje dodatkowa domena IFT57,
5. Wszystkie badane białka produkowane na natywnym poziomie lokalizują się w rzęskach
6. Białko Dusp5 lokalizuje się w pobliżu białek wyrostka C1b *Tetrahymena* tj. Spef2A, Cfp69, androglobiny, Lrguk/Cfp246, Cfp174, THERM\_00205170 (białko specyficzne dla orzęsków) oraz tworzy z nimi trwałe kompleksy,
7. Nadprodukcja białka Dusp5 oraz Pp2c powoduje, że lokalizują się one w rzęskach i ciele komórki. Nadprodukowane białko Mapk3 tworzy agregaty w ciele komórki, białko Map2k7 lokalizuje się w rejonie podbłonowym a białko Nek6 w pobliżu ciałek podstawowych,
8. Delecja genu *DUSP5* u *Tetrahymena* powoduje obniżenie tempa pływania komórek o połowę w porównaniu do komórek szczepu typu dzikiego przy jednoczesnym braku zmian we wzorze bicia rzęski oraz ich długości. Brak białka Dusp5 w znacznym stopniu zaburza tempo regeneracji rzęsek oraz w niewielkim stopniu obniża tempo proliferacji komórek. Fenotyp mutantów *DUSP5-KO* jest odmienny od fenotypu mutantów nieposiadających całości lub części wyrostka C1b (SPEF2A-CoDel i CFAP69-KO)
9. Nie zaobserwowano znacznego wpływu braku białka Dusp5 na poziom fosforylacji białek rzęskowych,
10. Delecja genu *KIF9* u *Tetrahymena* powoduje obniżenie tempa pływania komórek o około 35 % w porównaniu do komórek szczepu dzikiego przy

jednoczesnym braku zmian we wzorze bicia rzęski oraz ich długości. Brak białka Kif9 w znacznym stopniu zaburza tempo regeneracji rzęsek oraz w niewielkim stopniu obniża tempo proliferacji komórek,

11. Białka Map2k7, Nek6, Pp2c i Kif9 najprawdopodobniej nie lokalizują się w pobliżu białka Spef2A,
12. Białko Dusp5 oraz białko Kif9 oddziałują bezpośrednio z białkiem Mapk3, Map2k7 oraz Nek6, lecz nie oddziałują ze sobą wzajemnie,
13. Białko Map2k7 oraz Nek6 oddziałują bezpośrednio z białkiem Mapk3, Dusp5 oraz Kif9, lecz nie oddziałują ze sobą wzajemnie,
14. Białko Pp2c nie oddziałuje bezpośrednio z żadnym z badanych białek.

### **Można więc sformułować następujące wnioski:**

1. Białko Dusp5 jest najprawdopodobniej pseudofosfatazą,
2. Białko Dusp5 jest białkiem strukturalnym wyrostka C1b, którego obecność w rzęsce zależna jest od obecności białka Spef2a,
3. Białko Kif9 ma najprawdopodobniej zdolność wiązania mikrotubul,
4. Białka Mapk3, Map2k7, Nek6, Dusp5 oraz Kif9 tworzą wzajemną sieć oddziaływań, która może wpływać na funkcjonowanie aparatu centralnego,
5. Białko Pp2c nie wchodzi w skład sieci oddziaływań tworzonej przez pozostałe badane białka i obniżenie jego poziomu w mutantach pozbawionych wyrostka C1b nie jest z nimi powiązane,
6. Utrata białka Dusp5 najprawdopodobniej nie prowadzi do utraty całości lub części wyrostka C1b a lokalizacja białka Spef2A oraz Cfp69 nie jest od niego zależna,
7. Białko Kif9 u *Tetrahymena* i ssaków pełni najprawdopodobniej odmienną rolę niż u *Chlamydomonas*, gdzie utrata tego białka skutkuje całkowitym paraliżem wici,
8. Białko Kif9 poprzez fosforylację i zmianę konformacji może brać udział w tworzeniu sygnału mechanicznego regulującego prawidłowy ruch rzęsek.



## 7. Spis literatury

1. Alciaturi, J., Anesetti, G., Irigoien, F., Skowronek, F., & Sapiro, R. (2019). Distribution of sperm antigen 6 (SPAG6) and 16 (SPAG16) in mouse ciliated and non-ciliated tissues. *Journal of Molecular Histology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s10735-019-09817-z>
2. Aprea, I., Nöthe-Menchen, T., Dougherty, G. W., Raidt, J., Loges, N. T., Kaiser, T., Wallmeier, J., Olbrich, H., Strünker, T., Kliesch, S., Pennekamp, P., & Omran, H. (2021). Motility of efferent duct cilia aids passage of sperm cells through the male reproductive system. *Molecular Human Reproduction*, 27(3). <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab009>
3. Barber, C. F., Heuser, T., Carbajal-González, B. I., Botchkarev, V. V., & Nicastro, D. (2012). Three-dimensional structure of the radial spokes reveals heterogeneity and interactions with dyneins in Chlamydomonas flagella. *Molecular Biology of the Cell*, 23(1), 111–120. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0692>
4. Bayless, B. A., Galati, D. F., & Pearson, C. G. (2016). Tetrahymena basal bodies. *W Cilia* (T. 5, Numer 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13630-016-0022-8>
5. Ben Khelifa, M., Coutton, C., Zouari, R., Karaouzène, T., Rendu, J., Bidart, M., Yassine, S., Pierre, V., Delaroche, J., Hennebicq, S., Grunwald, D., Escalier, D., Pernet-Gallay, K., Jouk, P.-S., Thierry-Mieg, N., Touré, A., Arnoult, C., & Ray, P. F. (2014). Mutations in DNAH1, which Encodes an Inner Arm Heavy Chain Dynein, Lead to Male Infertility from Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *The American Journal of Human Genetics*, 94(1), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.11.017>
6. Bernstein, M., Beech, P. L., Katz, S. G., & Rosenbaum, J. L. (1994). A new kinesin-like protein (Klp1) localized to a single microtubule of the Chlamydomonas flagellum. *The Journal of cell biology*, 125(6), 1313–1326. <https://doi.org/10.1083/jcb.125.6.1313>
7. Bonini, N. M., Gustin, M. C., & Nelson, D. L. (1986). Regulation of ciliary motility by membrane potential in Paramecium: A role for cyclic AMP. *Cell Motility*, 6(3), 256–272. <https://doi.org/10.1002/cm.970060303>

8. Branche, C., Kohl, L., Toutirais, G., Buisson, J., Cosson, J., & Bastin, P. (2006). Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility. *Journal of Cell Science*, *119*(16), 3443–3455. <https://doi.org/10.1242/jcs.03078>
9. Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, *36*(9), 880–887. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>
10. Breitkopf, S. B., & Asara, J. M. (2012). Determining In Vivo Phosphorylation Sites Using Mass Spectrometry. *Current Protocols in Molecular Biology*, *98*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1819s98>
11. Brokaw, C. J., & Kamiya, R. (1987). Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *8*(1), 68–75. <https://doi.org/10.1002/cm.970080110>
12. Brooks, E. R., & Wallingford, J. B. (2014). Multiciliated Cells. *Current Biology*, *24*(19), R973–R982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.047>
13. Brown, J. M., DiPetrillo, C. G., Smith, E. F., & Witman, G. B. (2012). A FAP46 mutant provides new insights into the function and assembly of the C1d complex of the ciliary central apparatus. *Journal of Cell Science*, *125*(16), 3904–3913. <https://doi.org/10.1242/jcs.107151>
14. Brown, J. M., Hardin, C., & Gaertig, J. (1999). Rotokinesis, a novel phenomenon of cell locomotion-assisted cytokinesis in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Cell Biology International*, *23*(12), 841–848. <https://doi.org/10.1006/cbir.1999.0480>
15. Brown, J. M., & Witman, G. B. (2014). Cilia and Diseases. *BioScience*, *64*(12), 1126–1137. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu174>
16. Bustamante-Marin, X. M., Shapiro, A., Sears, P. R., Charng, W.-L., Conrad, D. F., Leigh, M. W., Knowles, M. R., Ostrowski, L. E., & Zariwala, M. A. (2020). Identification of genetic variants in CFAP221 as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Journal of Human Genetics*, *65*(2), 175–180. <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0686-1>

17. Carbajal-González, B. I., Heuser, T., Fu, X., Lin, J., Smith, B. W., Mitchell, D. R., & Nicastro, D. (2013). Conserved structural motifs in the central pair complex of eukaryotic flagella. *Cytoskeleton*, *70*(2), 101–120. <https://doi.org/10.1002/cm.21094>
18. Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, José. B., & Bettencourt-Dias, M. (2011). Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *Journal of Cell Biology*, *194*(2), 165–175. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011152>
19. Castaneda, J. M., Hua, R., Miyata, H., Oji, A., Guo, Y., Cheng, Y., Zhou, T., Guo, X., Cui, Y., Shen, B., Wang, Z., Hu, Z., Zhou, Z., Sha, J., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Yu, Z., Ramirez-Solis, R., Ikawa, M., Matzuk, M. M., & Liu, M. (2017). TCTE1 is a conserved component of the dynein regulatory complex and is required for motility and metabolism in mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(27), E5370–E5378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621279114>
20. Cuevas, B. D., Abell, A. N., & Johnson, G. L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, *26*(22), 3159–3171. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210409>
21. Dai, D., Ichikawa, M., Peri, K., Rebinsky, R., & Bui, K. H. (2020). Identification and mapping of central pair proteins by proteomic analysis. *Biophysics and physicobiology*, *17*, 71–85. <https://doi.org/10.2142/biophysico.BSJ-2019048>
22. Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T., & Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *The EMBO journal*, *15*(24), 6798–6809. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9003755>
23. Dasgupta, A., & Amack, J. D. (2016). Cilia in vertebrate left–right patterning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1710), 20150410. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0410>
24. Dave, D., Wloga, D., & Gaertig, J. (2009). Manipulating ciliary protein-encoding genes in *Tetrahymena thermophila*. *Methods in cell biology*, *93*, 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)93001-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)93001-6)
25. Dawe, H. R., Shaw, M. K., Farr, H., & Gull, K. (2007). The hydrocephalus inducing gene product, Hydin, positions axonemal central pair microtubules. *BMC Biology*, *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-33>

26. Demonchy, R., Blisnick, T., Deprez, C., Toutirais, G., Loussert, C., Marande, W., Grellier, P., Bastin, P., & Kohl, L. (2009). Kinesin 9 family members perform separate functions in the trypanosome flagellum. *Journal of Cell Biology*, *187*(5), 615–622. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903139>
27. Dentler, W. L., & Cunningham, W. P. (1977). Structure and organization of radial spokes in cilia of *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of Morphology*, *153*(1), 143–151. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051530110>
28. Denu, J. M., & Dixon, J. E. (1995). A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(13), 5910–5914. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5910>
29. DiPetrillo, C. G., & Smith, E. F. (2010). Pcdp1 is a central apparatus protein that binds Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and regulates ciliary motility. *Journal of Cell Biology*, *189*(3), 601–612. <https://doi.org/10.1083/jcb.200912009>
30. Dobell, C., & Leeuwenhoek, A. van. (1932). *Antony van Leeuwenhoek and his „Little animals”; being some account of the father of protozoology and bacteriology and his multifarious discoveries in these disciplines*. Harcourt, Brace and company. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/47806>
31. Dorin, D., Le Roch, K., Sallicandro, P., Alano, P., Parzy, D., Pouillet, P., Meijer, L., & Doerig, C. (2001). Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *European Journal of Biochemistry*, *268*(9), 2600–2608. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02151.x>
32. Duan, J., & Gorovsky, M. A. (2002). Both Carboxy-Terminal Tails of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulin Are Essential, but Either One Will Suffice. *Current Biology*, *12*(4), 313–316. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00651-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00651-6)
33. Dutcher, S. K., Huang, B., & Luck, D. J. (1984). Genetic dissection of the central pair microtubules of the flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Biology*, *98*(1), 229–236. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.1.229>
34. Dutcher, S. K., & O’Toole, E. T. (2016). The basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii*. *W Cilia* (T. 5, Numer 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13630-016-0039-z>

35. Dymek, E. E., & Smith, E. F. (2007). A conserved CaM- and radial spoke-associated complex mediates regulation of flagellar dynein activity. *Journal of Cell Biology*, *179*(3), 515–526. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703107>
36. Dzeja, P., & Terzic, A. (2009). Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(4), 1729–1772. <https://doi.org/10.3390/ijms10041729>
37. Edelbusch, C., Cindrić, S., Dougherty, G. W., Loges, N. T., Olbrich, H., Rivlin, J., Wallmeier, J., Pennekamp, P., Amirav, I., & Omran, H. (2017). Mutation of serine/threonine protein kinase 36 (STK36) causes primary ciliary dyskinesia with a central pair defect. *Human Mutation*, *38*(8), 964–969. <https://doi.org/10.1002/humu.23261>
38. Eisen, J. A., Coyne, R. S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J. R., Badger, J. H., Ren, Q., Amedeo, P., Jones, K. M., Tallon, L. J., Delcher, A. L., Salzberg, S. L., Silva, J. C., Haas, B. J., Majoros, W. H., Farzad, M., Carlton, J. M., Smith, R. K., ... Orias, E. (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biology*, *4*(9), 1620–1642. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040286>
39. Frankel, J. (1999). Chapter 2 Cell Biology of *Tetrahymena thermophila*. *W Methods in Cell Biology* (s. 27–125). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61528-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61528-9)
40. Fu, G., Zhao, L., Dymek, E., Hou, Y., Song, K., Phan, N., Shang, Z., Smith, E. F., Witman, G. B., & Nicastro, D. (2019). Structural organization of the C1a-e-c supercomplex within the ciliary central apparatus. *The Journal of Cell Biology*, *jcb.201906006*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201906006>
41. Gadelha, C., Wickstead, B., McKean, P. G., & Gull, K. (2006). Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. *Journal of Cell Science*, *119*(12), 2405–2413. <https://doi.org/10.1242/jcs.02969>
42. Galtier, N., Gouy, M., & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*, *12*(6), 543–548. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.6.543>

43. Garcia, G., & Reiter, J. F. (2016). A primer on the mouse basal body. W *Cilia* (T. 5, Numer 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13630-016-0038-0>
44. Goodenough, U. W., & Heuser, J. E. (1985). Substructure of inner dynein arms, radial spokes, and the central pair/projection complex of cilia and flagella. *The Journal of Cell Biology*, *100*(6), 2008–2018. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.6.2008>
45. Grimes, D. T., & Burdine, R. D. (2017). Left–Right Patterning: Breaking Symmetry to Asymmetric Morphogenesis. *Trends in Genetics*, *33*(9), 616–628. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.06.004>
46. Grossman-Haham, I., Coudray, N., Yu, Z., Wang, F., Zhang, N., Bhabha, G., & Vale, R. D. (2021). Structure of the radial spoke head and insights into its role in mechanoregulation of ciliary beating. *Nature Structural & Molecular Biology*, *28*(1), 20–28. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00519-9>
47. Gui, M., Wang, X., Dutcher, S. K., Brown, A., & Zhang, R. (2022). Ciliary central apparatus structure reveals mechanisms of microtubule patterning. *Nature Structural and Molecular Biology*, *29*(5), 483–492. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00770-2>
48. Guttman, S. D., & Gorovsky, M. A. (1979). Cilia regeneration in starved tetrahymena: an inducible system for studying gene expression and organelle biogenesis. *Cell*, *17*(2), 307–317. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90156-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90156-9)
49. Hai, B., Gaertig, J., & Gorovsky, M. A. (1999). *Chapter 28 Knockout Heterokaryons Enable Facile Mutagenic Analysis of Essential Genes in Tetrahymena* (s. 513–531). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61554-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61554-X)
50. Hamasaki, T. (1999). Regulation of outer-arm-dynein activity by phosphorylation and control of ciliary beat frequency. W *Protoplasma* (T. 206).
51. Hamasaki, T., Barkalow, K., Richmond, J., & Satir, P. (1991). cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in Paramecium (ciliary motility/ATPase/phosphoproteins/in vitro translocation). W *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (T. 88).

52. Hamilton, E. P., Kapusta, A., Huvos, P. E., Bidwell, S. L., Zafar, N., Tang, H., Hadjithomas, M., Krishnakumar, V., Badger, J. H., Caler, E. V., Russ, C., Zeng, Q., Fan, L., Levin, J. Z., Shea, T., Young, S. K., Hegarty, R., Daza, R., Gujja, S., ... Coyne, R. S. (2016). Structure of the germline genome of *Tetrahymena thermophila* and relationship to the massively rearranged somatic genome. *eLife*, 5(NOVEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.19090.001>
53. Han, L., Rao, Q., Yang, R., Wang, Y., Chai, P., Xiong, Y., & Zhang, K. (2022). Cryo-EM structure of an active central apparatus. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(5), 472–482. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00769-9>
54. He, X., Li, W., Wu, H., Lv, M., Liu, W., Liu, C., Zhu, F., Li, C., Fang, Y., Yang, C., Cheng, H., Zhang, J., Tan, J., Chen, T., Tang, D., Song, B., Wang, X., Zha, X., Wang, H., ... Cao, Y. (2019). Novel homozygous *CFAP69* mutations in humans and mice cause severe asthenoteratospermia with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Journal of Medical Genetics*, 56(2), 96–103. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105486>
55. Heath, I. B., Kaminskyj, S. G. W., & Bauchop, T. (1986). Basal body loss during fungal zoospore encystment: evidence against centriole autonomy. *Journal of Cell Science*, 83(1), 135–140. <https://doi.org/10.1242/jcs.83.1.135>
56. Heuser, T., Dymek, E. E., Lin, J., Smith, E. F., & Nicastro, D. (2012). The CSC connects three major axonemal complexes involved in dynein regulation. *Molecular Biology of the Cell*, 23(16), 3143–3155. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0357>
57. Heuser, T., Raytchev, M., Krell, J., Porter, M. E., & Nicastro, D. (2009). The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *Journal of Cell Biology*, 187(6), 921–933. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908067>
58. Hinton, S. D. (2016). Analyzing Pseudophosphatase Function. W *Methods in Molecular Biology* (T. 1447, s. 139–153). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3746-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3746-2_9)

59. Hodges, M. E., Wickstead, B., Gull, K., & Langdale, J. A. (2012). The evolution of land plant cilia. *New Phytologist* (T. 195, Numer 3, s. 526–540). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04197.x>
60. Horani, A., & Ferkol, T. W. (2021). Understanding Primary Ciliary Dyskinesia and Other Ciliopathies. *Journal of Pediatrics*, 230, 15-22.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.11.040>
61. Hou, Y., Zhao, L., Kubo, T., Cheng, X., McNeill, N., Oda, T., & Witman, G. B. (2021). Chlamydomonas FAP70 is a component of the previously uncharacterized ciliary central apparatus projection C2a. *Journal of Cell Science*, 134(12). <https://doi.org/10.1242/jcs.258540>
62. Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
63. Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2017). Intraflagellar Transport and Ciliary Dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(3), a021998. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021998>
64. Ishikawa, T. (2017). Axoneme structure from motile cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028076>
65. Jiang, X., Hernandez, D., Hernandez, C., Ding, Z., Nan, B., Aufderheide, K., & Qin, H. (2017). IFT57 stabilizes assembled intraflagellar transport complex and mediates transport of motility-related flagellar cargo. *Journal of Cell Science*, 130(5), 879–891. <https://doi.org/10.1242/jcs.199117>
66. Joachimiak, E., Osinka, A., Farahat, H., Świdarska, B., Sitkiewicz, E., Poprzeczko, M., Fabczak, H., & Wloga, D. (2021). Composition and function of the C1b/C1f region in the ciliary central apparatus. *Scientific Reports*, 11(1), 11760. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90996-9>
67. Kazatskaya, A., Kuhns, S., Lambacher, N. J., Kennedy, J. E., Brear, A. G., McManus, G. J., Sengupta, P., & Blacque, O. E. (2017). Primary Cilium Formation and Ciliary Protein Trafficking Is Regulated by the Atypical MAP Kinase MAPK15 in *Caenorhabditis elegans* and Human Cells. *Genetics*, 207(4), 1423–1440. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300383>



68. Keshet, Y., & Seger, R. (2010). The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. W *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (T. 661, s. 3–38). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_1)
69. King, S. M. (2012). Composition and assembly of axonemal dyneins. W *Dyneins* (s. 208–243). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382004-4.10007-X>
70. King, S. M. (2016). Axonemal dynein arms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028100>
71. King, S. M., & Kamiya, R. (2009). Axonemal Dyneins. W *The Chlamydomonas Sourcebook* (s. 131–208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00043-5>
72. Konjikusic, M. J., Lee, C., Yue, Y., Shrestha, B. D., Nguimsop, A. M., Horani, A., Brody, S., Prakash, V. N., Gray, R. S., Verhey, K. J., & Wallingford, J. B. (2023). Kif9 is an active kinesin motor required for ciliary beating and proximodistal patterning of motile axonemes. *Journal of Cell Science*, 136(5). <https://doi.org/10.1242/jcs.259535>
73. Kornev, A. P., & Taylor, S. S. (2010). Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(3), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>
74. Kull, F. J., & Endow, S. A. (2002). Kinesin: switch I & II and the motor mechanism. *Journal of Cell Science*, 115(1), 15–23. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.1.15>
75. Kumari, D., & Ray, K. (2022). Phosphoregulation of Kinesins Involved in Long-Range Intracellular Transport. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.873164>
76. Lechtreck, K.-F., & Witman, G. B. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* hidin is a central pair protein required for flagellar motility. *Journal of Cell Biology*, 176(4), 473–482. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611115>
77. Lee, L., Campagna, D. R., Pinkus, J. L., Mulhern, H., Wyatt, T. A., Sisson, J. H., Pavlik, J. A., Pinkus, G. S., & Fleming, M. D. (2008). Primary Ciliary

- Dyskinesia in Mice Lacking the Novel Ciliary Protein Pcdp1. *Molecular and Cellular Biology*, 28(3), 949–957. <https://doi.org/10.1128/mcb.00354-07>
78. Li, S., Fernandez, J. J., Marshall, W. F., & Agard, D. A. (2012). Three-dimensional structure of basal body triplet revealed by electron cryotomography. *EMBO Journal*, 31(3), 552–562. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.460>
79. Liang, Y.-J., & Yang, W.-X. (2019). Kinesins in MAPK cascade: How kinesin motors are involved in the MAPK pathway? *Gene*, 684, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.042>
80. Loreng, T. D., & Smith, E. F. (2017). The Central Apparatus of Cilia and Eukaryotic Flagella. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(2), a028118. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028118>
81. Malicki, J. J., & Johnson, C. A. (2017). The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology*, 27(2), 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.002>
82. Mandl, M., Slack, D. N., & Keyse, S. M. (2005). Specific Inactivation and Nuclear Anchoring of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 by the Inducible Dual-Specificity Protein Phosphatase DUSP5. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1830–1845. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1830-1845.2005>
83. McKenzie, C. W., Craige, B., Kroeger, T. V., Finn, R., Wyatt, T. A., Sisson, J. H., Pavlik, J. A., Strittmatter, L., Hendricks, G. M., Witman, G. B., & Lee, L. (2015). CFAP54 is required for proper ciliary motility and assembly of the central pair apparatus in mice. *Molecular Biology of the Cell*, 26(18), 3140–3149. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0121>
84. Meng, Z., Meng, Q., Gao, T., Zhou, H., Xue, J., Li, H., Wu, Y., & Lv, J. (2023). Identification of bi-allelic KIF9 loss-of-function variants contributing to asthenospermia and male infertility in two Chinese families. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1091107>
85. Mitchell, D. R. (2003). Orientation of the central pair complex during flagellar bend formation in *Chlamydomonas*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 56(2), 120–129. <https://doi.org/10.1002/cm.10142>

86. Mitchell, D. R. (2004). Speculations on the evolution of 9+2 organelles and the role of central pair microtubules. *Biology of the Cell*, 96(9), 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.07.004>
87. Mitchell, D. R. (2017). Evolution of cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028290>
88. Mitchell, D. R., & Sale, W. S. (1999). Characterization of a Chlamydomonas insertional mutant that disrupts flagellar central pair microtubule-associated structures. *Journal of Cell Biology*, 144(2), 293–304. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.293>
89. Miyata, H., Oyama, Y., Kaneda, Y., & Ikawa, M. (2022). The motor domain of testis-enriched kinesin KIF9 is essential for its localization in the mouse flagellum. *Experimental Animals*, 71(1), 46–52. <https://doi.org/10.1538/expanim.21-0082>
90. Miyata, H., Shimada, K., Morohoshi, A., Oura, S., Matsumura, T., Xu, Z., Oyama, Y., & Ikawa, M. (2020). Testis-enriched kinesin KIF9 is important for progressive motility in mouse spermatozoa. *FASEB Journal*, 34(4), 5389–5400. <https://doi.org/10.1096/fj.201902755R>
91. Miyatake, K., Kusakabe, M., Takahashi, C., & Nishida, E. (2015). ERK7 regulates ciliogenesis by phosphorylating the actin regulator CapZIP in cooperation with Dishevelled. *Nature Communications*, 6(1), 6666. <https://doi.org/10.1038/ncomms7666>
92. Murphy, J. M., Mace, P. D., & Eyers, P. A. (2017). Live and let die: insights into pseudoenzyme mechanisms from structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.07.004>
93. Nagarkatti-Gude, D. R., Jaimez, R., Henderson, S. C., Teves, M. E., Zhang, Z., & Strauss, J. F. (2011). Spag16, an axonemal central apparatus gene, encodes a male germ cell nuclear speckle protein that regulates SPAG16 mRNA expression. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020625>
94. Nicastro, D., McIntosh, J. R., & Baumeister, W. (2005). 3D structure of eukaryotic flagella in a quiescent state revealed by cryo-electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 102(44), 15889–15894.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0508274102>
95. Nicastro, D., Schwartz, C., Pierson, J., Gaudette, R., Porter, M. E., & McIntosh, J. R. (2006). The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 313(5789), 944–948.  
<https://doi.org/10.1126/science.1128618>
96. Nilsson, J. R., & Williams, N. E. (1966). An electron microscope study of the oral apparatus of *Tetrahymena pyriformis*. *Comptes-rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*, 35(7), 119–141.
97. Nozawa, Y. I., Yao, E., Lin, C., Yang, J. H., Wilson, C. W., Gacayan, R., & Chuang, P. T. (2013). Fused (Stk36) is a ciliary protein required for central pair assembly and motile cilia orientation in the mammalian oviduct. *Developmental Dynamics*, 242(11), 1307–1319.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.24024>
98. Oda, T., Yanagisawa, H., Kamiya, R., & Kikkawa, M. (2014). A molecular ruler determines the repeat length in eukaryotic cilia and flagella. *Science*, 346(6211), 857–860. <https://doi.org/10.1126/science.1260214>
99. Oda, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., & Kikkawa, M. (2014). Mechanosignaling between central apparatus and radial spokes controls axonemal dynein activity. *Journal of Cell Biology*, 204(5), 807–819.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201312014>
100. Olbrich, H., Schmidts, M., Werner, C., Onoufriadis, A., Loges, N. T., Raidt, J., Banki, N. F., Shoemark, A., Burgoyne, T., Al Turki, S., Hurles, M. E., Köhler, G., Schroeder, J., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Chung, E. M. K., Reinhardt, R., Marthin, J. K., Nielsen, K. G., ... Omran, H. (2012). Recessive HYDIN Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia without Randomization of Left-Right Body Asymmetry. *The American Journal of Human Genetics*, 91(4), 672–684. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.08.016>
101. Omoto, C. K., & Kung, C. (1980). Rotation and twist of the central-pair microtubules in the cilia of *Paramecium*. *Journal of Cell Biology*, 87(1), 33–46. <https://doi.org/10.1083/jcb.87.1.33>
102. Orias, E., & Newby, C. J. (1975). Macronuclear genetics of *Tetrahymena*. II. Macronuclear location of somatic mutations to

- cycloheximide resistance. *Genetics*, 80(2), 251–262.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/80.2.251>
103. Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J., & Witman, G. B. (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *Journal of Cell Biology*, 170(1), 103–113.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200504008>
104. Pedersen, L. B., Veland, I. R., Schrøder, J. M., & Christensen, S. T. (2008). Assembly of primary cilia. W *Developmental Dynamics* (T. 237, Numer 8, s. 1993–2006). <https://doi.org/10.1002/dvdy.21521>
105. Pigino, G., Bui, K. H., Maheshwari, A., Lupetti, P., Diener, D., & Ishikawa, T. (2011). Cryoelectron tomography of radial spokes in cilia and flagella. *Journal of Cell Biology*, 195(4), 673–687.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201106125>
106. Qi, M., & Elion, E. A. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science*, 118(16), 3569–3572. <https://doi.org/10.1242/jcs.02470>
107. Rasmussen, L., & Orias, E. (1976). Dual capacity for nutrient uptake in tetrahymena importance of the oral uptake system for Fe and Cu uptake. *Carlsberg Research Communications*, 41(2), 81–90.  
<https://doi.org/10.1007/BF02906419>
108. Reiter, J. F., & Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. W *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (T. 18, Numer 9, s. 533–547). Nature Publishing Group.  
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60>
109. Reiterer, V., Fey, D., Kolch, W., Kholodenko, B. N., & Farhan, H. (2013). Pseudophosphatase STYX modulates cell-fate decisions and cell migration by spatiotemporal regulation of ERK1/2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1301985110>
110. Ressurreição, M., Rollinson, D., Emery, A. M., & Walker, A. J. (2011). A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote. *BMC Cell Biology*, 12(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-6>
111. Ribeiro, A. J. M., Das, S., Dawson, N., Zaru, R., Orchard, S., Thornton, J. M., Orengo, C., Zeqiraj, E., Murphy, J. M., & Evers, P. A. (2019). Emerging

- concepts in pseudoenzyme classification, evolution, and signaling. *Science Signaling*, 12(594). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat9797>
112. Ringo, D. L. (1967). Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. *Journal of Cell Biology*, 33(3), 543–571. <https://doi.org/10.1083/jcb.33.3.543>
  113. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 801–810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
  114. Saba-El-Leil, M. K., Frémin, C., & Meloche, S. (2016). Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(JUN). <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00067>
  115. Samsel, Z., Sekretarska, J., Osinka, A., Wloga, D., & Joachimiak, E. (2021). Central apparatus, the molecular kickstarter of ciliary and flagellar nanomachines. W *International Journal of Molecular Sciences* (T. 22, Numer 6, s. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22063013>
  116. Satir, P. (1968). STUDIES ON CILIA. *Journal of Cell Biology*, 39(1), 77–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.39.1.77>
  117. Satir, P., & Christensen, S. T. (2007). Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
  118. Satir, P., & Christensen, S. T. (2008). Structure and function of mammalian cilia. W *Histochemistry and Cell Biology* (T. 129, Numer 6, s. 687–693). <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0416-9>
  119. Satir, P., Heuser, T., & Sale, W. S. (2014). A Structural Basis for How Motile Cilia Beat. *BioScience*, 64(12), 1073–1083. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu180>
  120. Sears, R. M., May, D. G., & Roux, K. J. (2019). BioID as a tool for protein-proximity labeling in living cells. W *Methods in Molecular Biology* (T. 2012, s. 299–313). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9546-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9546-2_15)
  121. Seternes, O.-M., Kidger, A. M., & Keyse, S. M. (2019). Dual-specificity MAP kinase phosphatases in health and disease. *Biochimica et Biophysica*

- Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(1), 124–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.09.002>
122. Sha, Y., Wei, X., Ding, L., Ji, Z., Mei, L., Huang, X., Su, Z., Wang, W., Zhang, X., & Lin, S. (2020). Biallelic mutations of CFAP74 may cause human primary ciliary dyskinesia and MMAF phenotype. *Journal of Human Genetics*, 65(11), 961–969. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-0790-2>
123. Shah, A. S., Yehuda, B. S., Moninger, T. O., Kline, J. N., & Welsh, M. J. (2009). Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*, 325(5944), 1131–1134. <https://doi.org/10.1126/science.1173869>
124. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
125. Sironen, A., Kotaja, N., Mulhern, H., Wyatt, T. A., Sisson, J. H., Pavlik, J. A., Miiluniemi, M., Fleming, M. D., & Lee, L. (2011). Loss of SPEF2 Function in Mice Results in Spermatogenesis Defects and Primary Ciliary Dyskinesia1. *Biology of Reproduction*, 85(4), 690–701. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091132>
126. Smith, E. F., & Lefebvre, P. A. (1996). PF16 encodes a protein with armadillo repeats and localizes to a single microtubule of the central apparatus in *Chlamydomonas* flagella. *The Journal of Cell Biology*, 132(3), 359–370. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.359>
127. Smith, E. F., & Lefebvre, P. A. (1997). PF20 gene product contains WD repeats and localizes to the intermicrotubule bridges in *Chlamydomonas* flagella. *Molecular Biology of the Cell*, 8(3), 455–467. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.3.455>
128. Smith, E. F., & Yang, P. (2004). The radial spokes and central apparatus: Mechano-chemical transducers that regulate flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 57(1), 8–17. <https://doi.org/10.1002/cm.10155>
129. Stehle, T., & Schulz, G. E. (1992). Refined structure of the complex between guanylate kinase and its substrate GMP at 2.0 Å resolution. *Journal*

- of Molecular Biology*, 224(4), 1127–1141. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90474-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90474-X)
130. Summers, K. E., & Gibbons, I. R. (1971). Adenosine Triphosphate-Induced Sliding of Tubules in Trypsin-Treated Flagella of Sea-Urchin Sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(12), 3092–3096. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.12.3092>
131. Tamm, S. L., & Tamm, S. (1981). Ciliary reversal without rotation of axonemal structures in ctenophore comb plates. *Journal of Cell Biology*, 89(3), 495–509. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.3.495>
132. Taschner, M., & Lorentzen, E. (2016). The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(10), a028092. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028092>
133. Teves, M. E., Nagarkatti-Gude, D. R., Zhang, Z., & Strauss, J. F. (2016). Mammalian axoneme central pair complex proteins: Broader roles revealed by gene knockout phenotypes. *Cytoskeleton*, 73(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/cm.21271>
134. Teves, M. E., Sears, P. R., Li, W., Zhang, Z., Tang, W., Van Reesema, L., Costanzo, R. M., Davis, C. W., Knowles, M. R., Strauss, J. F., & Zhang, Z. (2014). Sperm-associated antigen 6 (SPAG6) deficiency and defects in ciliogenesis and cilia function: Polarity, density, and beat. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107271>
135. Teves, M. E., Zhang, Z., Costanzo, R. M., Henderson, S. C., Corwin, F. D., Zweit, J., Sundaresan, G., Subler, M., Salloum, F. N., Rubin, B. K., & Strauss, J. F. (2013). Sperm-Associated Antigen-17 Gene Is Essential for Motile Cilia Function and Neonatal Survival. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48(6), 765–772. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0362OC>
136. Tilley, A. E., Walters, M. S., Shaykhiev, R., & Crystal, R. G. (2015). Cilia Dysfunction in Lung Disease. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071931>
137. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and



- some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
138. Tu, C., Nie, H., Meng, L., Wang, W., Li, H., Yuan, S., Cheng, D., He, W., Liu, G., Du, J., Gong, F., Lu, G., Lin, G., Zhang, Q., & Tan, Y. Q. (2020). Novel mutations in SPEF2 causing different defects between flagella and cilia bridge: the phenotypic link between MMAF and PCD. *Human Genetics*, 139(2), 257–271. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02110-0>
139. Turkewitz, A. P., Orias, E., & Kapler, G. (2002). Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. *Trends in Genetics*, 18(1), 35–40. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02560-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02560-4)
140. Urbanska, P., Song, K., Joachimiak, E., Krzemien-Ojak, L., Koprowski, P., Hennessey, T., Jerka-Dziadosz, M., Fabczak, H., Gaertig, J., Nicastro, D., & Wloga, D. (2015). The CSC proteins FAP61 and FAP251 build the basal substructures of radial spoke 3 in cilia. *Molecular Biology of the Cell*, 26(8), 1463–1475. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1545>
141. van der Vaart, A., Rademakers, S., & Jansen, G. (2015). DLK-1/p38 MAP Kinase Signaling Controls Cilium Length by Regulating RAB-5 Mediated Endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics*, 11(12), e1005733. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005733>
142. Wagner, M. K., & Yost, H. J. (2000). Left–right development: The roles of nodal cilia. *Current Biology*, 10(4), R149–R151. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00328-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00328-6)
143. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1(8), 945–951. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01276.x>
144. Wallmeier, J., Nielsen, K. G., Kuehni, C. E., Lucas, J. S., Leigh, M. W., Zariwala, M. A., & Omran, H. (2020). Motile ciliopathies. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0209-6>
145. Wargo, M. J., Dymek, E. E., & Smith, E. F. (2005). Calmodulin and PF6 are components of a complex that localizes to the C1 microtubule of the

- flagellar central apparatus. *Journal of Cell Science*, 118(20), 4655–4665. <https://doi.org/10.1242/jcs.02585>
146. Wargo, M. J., McPeck, M. A., & Smith, E. F. (2004). Analysis of microtubule sliding patterns in *Chlamydomonas* flagellar axonemes reveals dynein activity on specific doublet microtubules. *Journal of Cell Science*, 117(12), 2533–2544. <https://doi.org/10.1242/jcs.01082>
147. Warner, F. D. (1976). Ciliary inter-microtubule bridges. *Journal of Cell Science*, 20(1), 101–114. <https://doi.org/10.1242/jcs.20.1.101>
148. Wilson, C. W., Nguyen, C. T., Chen, M. H., Yang, J. H., Gacayan, R., Huang, J., Chen, J. N., & Chuang, P. T. (2009). Fused has evolved divergent roles in vertebrate Hedgehog signalling and motile ciliogenesis. *Nature*, 459(7243), 98–102. <https://doi.org/10.1038/nature07883>
149. Wishart, M. J., & Dixon, J. E. (1998). Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(8), 301–306. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01241-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01241-9)
150. Witman, G. B., Plummer, J., & Sander, G. (1978). *Chlamydomonas* flagellar mutants lacking radial spokes and central tubules. Structure, composition, and function of specific axonemal components. *Journal of Cell Biology*, 76(3), 729–747. <https://doi.org/10.1083/jcb.76.3.729>
151. Wloga, D., & Frankel, J. (2012). From Molecules to Morphology: Cellular Organization of *Tetrahymena thermophila*. W *Methods in Cell Biology* (T. 109, s. 83–140). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385967-9.00005-0>
152. Wu, H., Wang, J., Cheng, H., Gao, Y., Liu, W., Zhang, Z., Jiang, H., Li, W., Zhu, F., Lv, M., Liu, C., Tan, Q., Zhang, X., Wang, C., Ni, X., Chen, Y., Song, B., Zhou, P., Wei, Z., ... Cao, Y. (2020). Patients with severe asthenoteratospermia carrying SPAG6 or RSPH3 mutations have a positive pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(4), 829–840. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01721-w>
153. Yamamoto, R., Song, K., Yanagisawa, H. aki, Fox, L., Yagi, T., Wirschell, M., Hirono, M., Kamiya, R., Nicastro, D., & Sale, W. S. (2013).

- The MIA complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility. *Journal of Cell Biology*, 201(2), 263–278. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211048>
154. Yokoyama, R., O’Toole, E., Ghosh, S., & Mitchell, D. R. (2004). Regulation of flagellar dynein activity by a central pair kinesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), 17398–17403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406817101>
  155. Yu, L.-R., & Veenstra, T. D. (2020). Characterization of Phosphorylated Proteins Using Mass Spectrometry. *Current Protein & Peptide Science*, 22(2), 148–157. <https://doi.org/10.2174/1389203721999201123200439>
  156. Zhang, E., Brewer, J. M., Minor, W., Carreira, L. A., & Lebioda, L. (1997). Mechanism of Enolase: The Crystal Structure of Asymmetric Dimer Enolase–2-Phospho-  
glycerate/Enolase–Phosphoenolpyruvate at 2.0 Å Resolution . *Biochemistry*, 36(41), 12526–12534. <https://doi.org/10.1021/bi9712450>
  157. Zhang, H., & Mitchell, D. R. (2004). Cpc1, a Chlamydomonas central pair protein with an adenylate kinase domain. *Journal of Cell Science*, 117(18), 4179–4188. <https://doi.org/10.1242/jcs.01297>
  158. Zhang, Z., Kostetskii, I., Tang, W., Haig-Ladewig, L., Sapiro, R., Wei, Z., Patel, A. M., Bennett, J., Gerton, G. L., Moss, S. B., Radice, G. L., & III, J. F. S. (2006). Deficiency of SPAG16L Causes Male Infertility Associated with Impaired Sperm Motility. *Biology of Reproduction*, 74(4), 751–759. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.049254>
  159. Zhang, Z., Sapiro, R., Kapfhamer, D., Bucan, M., Bray, J., Chennathukuzhi, V., McNamara, P., Curtis, A., Zhang, M., Blanchette-Mackie, E. J., & Strauss, J. F. (2002). A Sperm-Associated WD Repeat Protein Orthologous to Chlamydomonas PF20 Associates with Spag6, the Mammalian Orthologue of Chlamydomonas PF16 . *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), 7993–8004. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.22.7993-8004.2002>
  160. Zhang, Z., Zariwala, M. A., Mahadevan, M. M., Caballero-Campo, P., Shen, X., Escudier, E., Duriez, B., Bridoux, A.-M., Leigh, M., Gerton, G. L., Kennedy, M., Amselem, S., Knowles, M. R., & Strauss, J. F. (2007). A

Heterozygous Mutation Disrupting the SPAG16 Gene Results in Biochemical Instability of Central Apparatus Components of the Human Sperm Axoneme1. *Biology of Reproduction*, 77(5), 864–871. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063206>

161. Zhao, L., Hou, Y., Picariello, T., Craige, B., & Witman, G. B. (2019). Proteome of the central apparatus of a ciliary axoneme. *The Journal of cell biology*, 218(6), 2051–2070. <https://doi.org/10.1083/jcb.201902017>
162. Zhu, X., Liu, Y., & Yang, P. (2017). Radial Spokes—A Snapshot of the Motility Regulation, Assembly, and Evolution of Cilia and Flagella. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(5), a028126. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028126>

## Spis publikacji doktorantki

- 1 Niziolek M, Bicka M, Osinka A, Samsel Z, **Sekretarska J**, Poprzeczko M, Bazan R, Fabczak H, Joachimiak E, Wloga D. PCD Genes-From Patients to Model Organisms and Back to Humans. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 3;23(3):1749. doi: 10.3390/ijms23031749. PMID: 35163666; PMCID: PMC8836003.
- 2 Samsel Z\*, **Sekretarska J\***, Osinka A, Wloga D, Joachimiak E. Central Apparatus, the Molecular Kickstarter of Ciliary and Flagellar Nanomachines. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 16;22(6):3013. doi: 10.3390/ijms22063013. PMID: 33809498; PMCID: PMC7999657  
\*równy wkład
- 3 **Sekretarska J**, Szczepaniak J, Sosnowska M, Grodzik M, Kutwin M, Wierzbicki M, Jaworski S, Bałaban J, Daniluk K, Sawosz E, Chwalibog A, Strojny B. Influence of Selected Carbon Nanostructures on the CYP2C9 Enzyme of the P450 Cytochrome. *Materials (Basel).* 2019 Dec 11;12(24):4149. doi: 10.3390/ma12244149. PMID: 31835701; PMCID: PMC6947289.