

Justyna Sekretarska

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

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 kinezyne 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. W toku badań potwierdzono również, że wszystkie badane białka znajdują się w rzęskach *Tetrahymena*, a nadprodukowane lokalizują się w rzęskach oraz ciele komórki. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń BioID oraz koimmunoprecypitacji wykazano m.in., 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.

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 oddziałuje 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 odrzuceniu, co sugeruje, że białka te mogą pełnić rolę w transporcie wewnątrzrzęskowym.

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. Conducted research allowed to confirm that all examined proteins localize in *Tetrahymena* cilia and when overexpressed are present in both cilia and cell body. 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, Cfp69, Androglobin and Cfp246/Lrguk. BioID and pull-down experiments results showed also 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.