

mgr Jan Witold Węśławski

**Poszukiwanie kinezyń kluczowych dla patologicznego rozwoju
neuronu w modelu stwardnienia guzowatego**

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Jacek Jaworski



Warszawa, rok 2024

Oświadczenie autora

Ja, niżej podpisany Jan Węśławski wyrażam zgodę na przechowywanie i udostępnianie mojej pracy doktorskiej pt. „**Poszukiwanie kinezyn kluczowych dla patologicznego rozwoju neuronu w modelu stwardnienia guzowatego**” przez Bibliotekę Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w formie drukowanej, w czytelni oraz w ramach wypożyczeń międzybibliotecznych, na zasadach dozwolonego użytku.

Jednocześnie udzielam Bibliotece Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN nieodpłatnej licencji niewyłącznej na korzystanie z w. w. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji:

- 1) umieszczenie treści pracy w formie pliku pdf wraz z metadanymi, w repozytorium cyfrowym RCIN (*Repozytorium Cyfrowe Instytutów Naukowych, kolekcja: Instytut Biologii Doświadczalnej PAN/ Prace dyplomowe*) znajdującym się pod adresem: <https://rcin.org.pl/dlibra/collectiondescription>
- 2) zwielokrotnienie utworu techniką cyfrową (digitalizacja pracy w przypadku konieczności zeskanowania wersji drukowanej)

Warszawa, dnia

Podpis

Wykonanie niniejszej pracy było możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez:
Narodowe Centrum Nauki Grant OPUS (2016/21/B/NZ3/03639)

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym podziękować przede wszystkim **Profesorowi Jackowi Jaworskiemu**, za ogromną cierpliwość, zaangażowanie i wsparcie przez całą tę drogę, ale również za podsycanie entuzjazmu do nauki, zachętę do zadawania pytań i stworzenie fantastycznego zespołu, w którym każdy dzień pracy był przygodą.

Moim współpracownikom z LNMIK, przede wszystkim **Oliverowi** za niekończące się dyskusje zarówno na tematy naukowe, jak i zupełnie nienaukowe oraz wzajemne motywowanie się do rozwoju. **Magdzie M, Oli T, Karolinie, Kasi O i Juan** za codzienną pracę w inspirującej atmosferze. **Ewie, Adze, Matyldzie, Gosi, Magdzie B** oraz **Kasi K**, za ogromną pomoc, cenne rady i opiekę, szczególnie w pierwszych latach pracy.

Dalszej „rodzynie” doktorantów MIBMiK, przede wszystkim **Maćkowi, Karimowi, Agacie, Gabrysi, Marcie, Abhishkowi, Antonowi, Malwinie** jak i wielu innym, za piękny czas spędzony w instytucie jak i poza nim, oraz dzielnie radości jak i frustracji życia na doktoracie.

Administracji i członkom *core facility* MIBMiK, a w szczególności **Tomkowi Węgierskiemu**, dzięki któremu cały asortyment mikroskopów dostępnych w Instytucie działał nienagannie, oraz za godziny poświęcone na szkolenia i pomoc w odkrywaniu tego, co niewidoczne gołym okiem.

Profesorowi Maksymilianowi Bieleckiemu za pokazanie, że statystyka może być niezwykle interesującą dziedziną nauki, oraz naukę licznych sztuczek w R, ułatwiających przepływanie przez morze danych.

Mojej **Źonie Anecie** za *wszystko*, oraz **Rodzicom** za zachętę do poszukiwania własnej drogi i wsparcie niezależnie od decyzji.

STRESZCZENIE

Stwardnienie guzowate (ang. Tuberous Sclerosis Complex, TSC), to rzadka, genetyczna choroba, objawiająca się licznymi, niezłośliwymi guzami w wielu narządach ciała, w tym w obrębie mózgu. Ze strony układu nerwowego objawami są lekooporne napady padaczkowe, niepełnosprawność intelektualna czy zaburzenia ze spektrum autyzmu. Genetycznym podłożem choroby są mutacje w genach *TSC1* lub *TSC2*, kodujących białka tworzące kompleks będący inhibitorem kinazy mTOR (ang. Mammalian Target of Rapamycin), co skutkuje jej nadmierną aktywacją. Na poziomie pojedynczego neuronu objawia się to min. znacznym zwiększeniem ciała komórki, jak i niekontrolowanym rozrostem drzewka dendrytycznego. Jako, że stosowanie w leczeniu choroby klasycznych inhibitorów mTOR takich jak rapamycyna, wiąże się z licznymi skutkami ubocznymi, wciąż konieczne jest poszukiwanie nowych celów terapeutycznych, w czym pomoc może lepsze zrozumienie procesów zachodzących zaburzonych komórkach. Jednym z takich procesów, dotąd słabo poznanych w kontekście nadaktywacji mTOR jest transport mikrotubularny, który w neuronie ze względu na jego charakterystyczną budowę z długimi dendrytami oraz aksonem odbywa się na wyjątkowo dalekie odległości. Za transport ten odpowiadają dwie grupy białek – dyneina-dynaktyna oraz kinezyiny. Wcześniejsze badania prowadzone w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej wykazały pewne powiązania pomiędzy mTOR, a regulacją transportu pełnionego przez dyneinę. Natomiast nie są znane tego typu oddziaływania dla kinezyin. Tym samym, głównym celem niniejszej pracy było zbadanie, czy którekolwiek z białek należących do rodziny kinezyin, jest konieczne do obserwowanego nadmiernego wzrostu neuronu w modelu TSC, skutkującym nadaktywacją mTOR. W wyniku przeprowadzonych badań przesiewowych, wykazano, że KIF11, KIF12, KIF13A, KIF13B, KIF14, KIF15, KIF16B, KIF18A, KIF18B, KIF19, KIF1A, KIF1B, KIF20A, KIF21A, KIF21B, KIF22, KIF23, KIF24, KIF26A, KIF26B, KIF27, KIF2A, KIF2B, KIF2C, KIF3A, KIF3B, KIF3C, KIF4A, KIF5A, KIF5C, KIF6, KIF7, KIFC1, KIFC2, KIFC3 mogą być konieczne dla nadmiernego wzrostu neuronu spowodowanego aktywacją ścieżki mTOR przez kinazę 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), natomiast: KIF3A, KIF3C, KIF21B oraz KIF26B mogą być zaangażowane w nadmierny wzrost neuronu spowodowany wyciszeniem *TSC2*.

W drugiej części pracy podjęto próbę odnalezienia potencjalnych mechanizmów, w których funkcje pełnione przez kinezyiny są kluczowe dla zmian obserwowanych przy nadmiernej aktywacji mTOR, zarówno w komórkach neuronalnych, jak i linii szczurzych fibroblastów. W efekcie przeprowadzonych eksperymentów, wykazano pewien udział KIF3A oraz KIF3C w regulacji powstawania i rozwoju pierwotnych rzęsek, zaburzonego w modelu TSC, choć dokładna natura tego oddziaływania pozostaje niejasna.

SUMMARY

Tuberous sclerosis complex (TSC) is a rare, genetic disorder characterized by the development of numerous benign tumors in various organs, including the brain. Neurological symptoms include drug-resistant seizures, intellectual disability, and autism spectrum disorder. The genetic basis of the disease lies in mutations in the *TSC1* or *TSC2* genes, which encode a protein complex that normally inhibits the mTOR kinase, resulting in its excessive activation. At the level of a single neuron, this manifests in a significant increase in cell size and uncontrolled growth of the dendritic tree. Since the use of classical mTOR inhibitors such as rapamycin in treating the disease, is associated with numerous side effects, it is desirable to develop new therapeutic targets, which could be aided by a better understanding of the processes occurring in affected cells. One such process, which is poorly understood in the context of mTOR hyperactivation, is microtubule transport. In neurons, due to their unique structure with long dendrites and axons, this process occurs over exceptionally long distances. This transport is carried out by two groups of proteins – dynein and kinesins. Previous research conducted in the Laboratory of Molecular and Cellular Neurobiology revealed some connections between mTOR and the regulation of dynein-mediated transport, but no such interactions are known for kinesins. Therefore, the main goal of this study was to determine whether any of the proteins belonging to the kinesin family, are necessary for the observed excessive neuronal growth in the TSC model, resulting from mTOR hyperactivation. Through screening studies, it was shown that KIF11, KIF12, KIF13A, KIF13B, KIF14, KIF15, KIF16B, KIF18A, KIF18B, KIF19, KIF1A, KIF1B, KIF20A, KIF21A, KIF21B, KIF22, KIF23, KIF24, KIF26A, KIF26B, KIF27, KIF2A, KIF2B, KIF2C, KIF3A, KIF3B, KIF3C, KIF4A, KIF5A, KIF5C, KIF6, KIF7, KIFC1, KIFC2, and KIFC3 may be necessary for the excessive neuronal growth caused by activation of the mTOR pathway through phosphoinositide 3-kinase (PI3K), while KIF3A, KIF3C, KIF21B, and KIF26B may be involved in excessive neuronal growth resulting from TSC2 silencing.

In the second part of the study, an attempt was made to identify potential mechanisms by which the functions of kinesins are crucial for the changes observed in the context of excessive mTOR activation, both in neuronal cells and in rat fibroblast cell lines. The experiments demonstrated some involvement of KIF3A and KIF3C in the regulation of the formation and development of primary cilia, which is disrupted in the TSC model, although the exact nature of this interaction remains unclear.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	5
SUMMARY	6
SPIS TREŚCI	7
WYKAZ SKRÓTÓW	12
1. WSTĘP.....	15
1.1 Komórka nerwowa.....	15
1.1.1 Cytoszkielek neuronu	15
1.1.2 Budowa i rozwój neuronu	18
1.1.3 Pierwotne rzęski komórki nerwowej	20
1.1.4 Transport wewnątrzkomórkowy w neuronie.....	24
1.2 Kinezyzny	26
1.2.1 Podział i budowa kinezyzyn.....	27
1.2.2 Kinezyzny w transporcie aksonalnym.....	32
1.2.3 Kinezyzny w transporcie dendrytycznym	35
1.2.4 Wybrane niekanoniczne funkcje kinezyzyn.....	37
1.2.5 Wzajemna regulacja kinezyzyn i elementów ścieżek sygnałowych	42
1.3 Kinaza mTOR	43
1.3.1 Kontrola translacji przez mTOR	44
1.3.2 Regulacja transkrypcji przez mTOR	45
1.3.3 mTOR i autofagia	46
1.3.4 Wpływ mTOR na cytoszkielek	47
1.3.5 Regulacja kinazy mTOR	48
1.3.6 Kinaza mTOR w rozwoju neuronu.....	50
1.3.7 Rola mTOR w patologii stwardnienia guzowatego.....	51
1.3.8 Nadmierny wzrost neuronu w stwardnieniu guzowatym	53
1.3.9 Wzajemna regulacja mTOR i kinezyzyn w transporcie wewnątrzkomórkowym	55
2. CELE PRACY.....	58

3. MATERIAŁY I METODY	59
3.1. Najczęściej stosowane materiały i odczynniki.....	59
3.1.1. Najczęściej stosowane odczynniki w metodach biologii molekularnej	59
3.1.2. Odczynniki stosowane w metodach cytochemicznych.....	60
3.1.3. Roztwory	61
3.1.4. Przeciwciała.....	62
3.1.5. Wektory plazmidowe.....	63
3.1.6. Materiały stosowane w hodowlach bakteryjnych.....	69
3.1.7. Materiały stosowane w hodowli komórek ssaczy.....	69
3.2. Metody pracy z kwasami nukleinowymi	72
3.2.1. Izolacja plazmidowego DNA	72
3.2.2. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	72
3.2.3. Ligacja fragmentów DNA	72
3.2.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR.....	72
3.2.5. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	73
3.2.6. Oczyszczanie fragmentów DNA po reakcjach enzymatycznych	73
3.2.7. Sekwencjonowanie DNA	73
3.2.8. Izolacja RNA z hodowli komórkowych	73
3.2.9. Synteza cDNA na bazie RNA	74
3.2.10. Określanie stężenia i czystości preparatów DNA i RNA	74
3.2.11. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)	74
3.3. Hodowle komórek bakteryjnych	75
3.3.1. Warunki hodowli bakteryjnych	75
3.3.2. Przygotowanie bakterii chemokompetentnych.....	75
3.3.3. Transformacja bakterii chemokompetentnych	75
3.4. Hodowle komórek ssaczy.....	76
3.4.1. Hodowle pierwotne szczurzych neuronów korowych i hipokampalnych	76
3.4.2. Hodowle ssaczy linii komórkowych.....	76
3.5. Wprowadzanie plazmidów ekspresyjnych do komórek ssaczy hodowanych <i>in vitro</i>	77

3.5.1. Transfekcje neuronów hipokampalnych przy użyciu liposomów kationowych.....	77
3.5.2. Nukleofekcja komórek ssaczych przy użyciu elektroporacji	80
3.5.3. Transfekcja linii komórkowej HEK293T przy użyciu chlorku wapnia w celu produkcji wektorów lentiwirusowych	81
3.5.4. Transdukcja komórek ssaczych przy użyciu wektorów lentiwirusowych.....	81
3.5.5. Selekcja komórkowych linii stabilnych.....	82
3.6. Metody pracy z białkami.....	83
3.6.1. Przygotowywanie lizatów białkowych z hodowli komórkowych.....	83
3.6.2. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących.....	83
3.6.3. Technika Western Blot.....	83
3.7. Barwienie preparatów komórkowych technikami immunocytochemicznymi.....	84
3.7.1. Utrwalanie komórek	84
3.7.2. Barwienie komórek przy użyciu przeciwciał	84
3.8. Rejestracja obrazów mikroskopowych	85
3.8.1. Mikroskopia fluorescencyjna	85
3.8.2. Mikroskopia konfokalna.....	85
3.8.3. Obrazowanie przyżyciowe	85
3.9. Analiza obrazów mikroskopowych.....	86
3.9.1. Pomiar morfometryczny komórek.....	86
3.9.2. Analiza filmów poklatkowych	86
3.10. Analiza statystyczna.....	88
4. WYNIKI.....	89
4.1 Poszukiwanie kinezyń kluczowych dla nadmiernego wzrostu neuronu, w fenotypie nadaktywnego mTOR.	89
4.1.1 Pierwszorzędowe badanie przesiewowe.....	89
4.1.2 Wybór kinezyń do dalszych badań.....	118
4.1.3 Badanie wpływu wyciszenia wybranych kinezyń na rozwój neuronu w warunkach bazowej aktywności ścieżki PI3K-mTOR.....	120
4.1.4 Drugorzędowe badanie przesiewowe	123
4.1.5. Wybór kinezyń do dalszej pracy i walidacja założonego modelu.....	128

4.2. Poszukiwanie funkcji wybranych kinezyń, mogących ulegać zaburzeniu w komórkowym modelu stwardnienia guzowatego.....	132
4.2.1 Analiza mobilności wybranych kinezyń w komórkach neuronalnych z wyciszoną ekspresją <i>Tsc2</i>	132
4.2.2 Analiza wpływu obniżenia poziomu KIF21B na dynamikę mikrotubul w komórkach nerwowych o wyciszonej ekspresji <i>Tsc2</i>	136
4.2.3. Wpływ wyciszenia KIF3A oraz KIF3C na rozwój rzęsek, w neuronach o ograniczonej ekspresji <i>Tsc1/Tsc2</i>	139
4.3 Analiza funkcji wybranych kinezyń w modelu TSC w komórkach nieneuronalnych.	150
4.3.1 Tworzenie i walidacja linii stabilnych komórek Rat2	151
4.3.2 Analiza tempa podziałów komórkowych i powierzchni komórek uzyskanych linii.	155
4.3.3. Analiza powierzchni komórek oraz występowania i długości rzęsek w uzyskanych liniach komórkowych pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C.	158
4.3.4 Analiza ruchu pęcherzyków zawierających LAMP1-GFP w uzyskanych liniach Rat2 pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C.	163
5. DYSKUSJA.....	171
5.1 Rola kinezyń we wzroście neuronu spowodowanym aktywacją mTOR	171
5.1.1 Pierwszorzędowe badanie przesiewowe.....	171
5.1.2 Wpływ wyciszania wybranych genów kinezyń na neurony o bazowym poziomie aktywności mTOR.....	173
5.1.3 Drugorzędowe badanie przesiewowe	173
5.2 Rola badanych kinezyń w patologicznym wzroście neuronu	174
5.2.1 Walidacja zastosowanych sekwencji shRNA i badanie zmian w ekspresji genów kinezyń w komórkach shTSC2	174
5.2.2 Wybrane funkcje KIF21B w modelu TSC w neuronach.....	175
5.2.3 Wybrane funkcje KIF3A/KIF3C w modelu TSC w neuronach	177
5.2.4. Wybrane funkcje KIF3A/KIF3C w modelu TSC w komórkach nieneuronalnych	180
5.3 Podsumowanie dyskusji.....	183
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	184

7. BIBLIOGRAFIA.....	185
8. PUBLIKACJE DOKTORANTA	219
9. SPIS FILMÓW	220

WYKAZ SKRÓTÓW

+TIP	ang. <i>plus-end tracking proteins</i> , białka śledzące plus koniec mikrotubul
4E-BP	ang. <i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i> , białko wiążące eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E
ADP	adenozyno-5'-difosforan
AMPA	ang. <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> , kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoksazolopropinowy
AMPK	ang. <i>AMP-activated protein kinase</i> , kinaza białkowa regulowana przez AMP
AMPAR	ang. <i>AMPA receptor</i> , receptor dla glutaminianu selektywnie aktywowany przez AMPA
AP2	ang. <i>adaptor complex 2</i> , kompleks adaptorowy 2
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BDNF	ang. <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
β-gal	β-galaktozydaza
BSA	ang. <i>bovine serum albumin</i> , albumina surowicy wołowej
CaMK	ang. <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i> , kinaza aktywowana wapniem i kalmoduliną
CAP-Gly	ang. <i>Glycine-rich cytoskeleton-associated protein</i>
CC	ang. <i>coiled coil</i> , domena zwiniętej cewki
CAAX	cysteina, dwa aminokwasy alifatyczne oraz dowolny aminokwas. Sekwencja sygnałowa farnezytacji.
cDNA	ang. <i>complementary DNA</i> , komplementarny DNA
CHAPS	ang. <i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate</i>
Deptor	ang. <i>DEP domain-containing mTOR interacting protein</i> , białko oddziałujące z kinazą mTOR, zawierające domenę DEP
DIV	ang. <i>day in vitro</i> , dzień w hodowli <i>in vitro</i>
DMEM	ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> , dimetylosulfotlenek
DNA	ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> , kwas deoksyrybonukleinowy
DCV	ang. <i>dense core vesicles</i> , pęcherzyki o gęstym rdzeniu
EDTA	ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , kwas wersenowy
ER	ang. <i>endoplasmic reticulum</i> , siateczka śródplazmatyczna

ERK	ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i> , kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
FBS	ang. <i>fetal bovine albumin</i> , płodowa surowica wołowa
g	ang. <i>g-force</i> , nadważkość, równoważnik siły grawitacji
GAP	ang. <i>GTPase-activating protein</i> , białko aktywujące GTPazę
GEF	ang. <i>guanine nucleotide exchange factor</i> , aktywator wymiany nukleotydu
GFP	ang. <i>green fluorescent protein</i> , białko zielonej fluorescencji
GTP	ang. <i>guanosine-5'-triphosphate</i> , guanozyno-5'-trifosforan
HBSS	ang. <i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	kwask N-2hydroksyetylo-piperazylo-N"-2-etanosulfonowy
HRP	ang. <i>horseradish peroxidase</i> , peroksydaza chrzanowa
Hh	ang. <i>Hedgehog</i>
IF	ang. <i>immunofluorescence</i> , immunofluorescencja
IFT	ang. <i>intraflagellar transport</i> , transport wewnątrzrzęskowy
khc	ang. <i>kinesin heavy chain</i> , łańcuch ciężki kinezyzny
KIF	ang. <i>kinesin superfamily protein</i> , białko z rodziny kinezyzyn
klc	ang. <i>kinesin light chain</i> , łańcuch lekki kinezyzny
ktrl	kontrola
MAPK	ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i> , kinaza aktywowana mitogenami
MIP	ang. <i>maximum intensity projection</i> , projekcja maksymalnej intensywności
mTOR	ang. <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i> , ssaczy/mechanistyczny cel rapamycyny
mTORC	ang. <i>mammalian/mechanistic target of rapamycin complex</i> , kompleks kinazy mTOR
NMDA	ang. <i>N-methyl-D-aspartic acid</i> , kwas N-metylo-D-asparaginowy
NMDAR	ang. <i>NMDA receptor</i> , receptor dla glutaminianu selektywnie aktywowany przez NMDA
OD	ang. <i>optical density</i> , gęstość optyczna
PB	ang. <i>phosphate buffer</i> , bufor fosforanowy
PBS	ang. <i>phosphate buffered saline</i> , sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PDL	poli-D-lizyna
PFA	ang. <i>paraformaldehyde</i> , paraformaldehyd
PI3K	ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i> , kinaza 3-fosfofatydyloinozytolu
PLL	poli-L-lizyna
P-S6	ang. <i>phosphorylated ribosomal S6 protein</i> , ufosforylowana forma rybosomalnego białka S6
PSD	ang. <i>post-synaptic density</i> , zagęszczenie postsynaptyczne

px	ang. <i>pixel</i> , piksel
pz	pary zasad
Raptor	ang. <i>regulator-associated protein of mTOR</i> , białko regulatorowe związane z mTOR
Rictor	ang. <i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i> , białko towarzyszące mTOR, niewrażliwe na rapamycynę
RNA	ang. <i>ribonucleic acid</i> , kwas rybonukleinowy
S6	ang. <i>ribosomal protein S6</i> , białko rybosomalne S6
S6K	ang. <i>ribosomal protein S6 kinase</i> , kinaza białka rybosomalnego S6
SDS	ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , dodecylosiarczan sodu
SEM	ang. <i>standard error of the mean</i> , błąd standardowy średniej
SEGA	ang. <i>supependymal giant cell astrocytomas</i> , gwiazdki podwysięłkowe olbrzymiokomórkowe
shRNA	ang. <i>small hairpin RNA</i> , mały RNA o kształcie spinki do włosów
Shh	ang. <i>Sonic hedgehog</i>
TBS	ang. <i>tris buffered saline</i> , roztwór soli fizjologicznej buforowany tris
TEMED	ang. <i>tetramethylethylenediamine</i> , N'-tetrametyloetylenodiamina
TRIS	2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol
TrkB	ang. <i>tropomyosin receptor kinase B</i> , kinaza receptora tropomiozyny B
TSC	ang. <i>tuberous sclerosis complex</i> , stwardnienie guzowate
TSC1	ang. <i>tuberous sclerosis protein 1</i> , hamartyna
TSC2	ang. <i>tuberous sclerosis protein 2</i> , tuberyna
WB	ang. <i>Western blot</i>

1. WSTĘP

1.1 Komórka nerwowa

Pełnienie przez komórki nerwowe funkcji przekazywania sygnałów na znaczne odległości, jest możliwe przede wszystkim dzięki ich specjalnej budowie. W ogólnym ujęciu neuron składa się z ciała komórki (nazywanego również perykarionem) oraz licznych wypustek zbiorczo określanych neurytami, wśród których można wyróżnić dendryty oraz akson. Akson odpowiada za propagację sygnału, który odbierany jest przez dendryty innych komórek nerwowych, tworząc z nimi połączenia w formie wyspecjalizowanych struktur nazywanych synapsami. Najdłuższe aksony w ciele człowieka posiadają neurony tworzące nerw kulszowy i mogą osiągać długość 1 m (Muzio i Cascella 2023). Podczas gdy aksony komórek nerwowych tworzących centralny układ nerwowy są znacznie krótsze, osiągając typowo długości kilku centymetrów, w skali molekularnej wciąż są to znaczne odległości. Tym samym efektywne przewodnictwo nerwowe, jak również samo utrzymanie neurytów oraz synaps, wymaga skoordynowania procesów, takich jak usuwanie produktów metabolizmu i uszkodzonych organelli, czy transport substancji odżywczych i składników budujących komórkę, w obrębie dużych odległości.

1.1.1 Cytoskielet neuronu

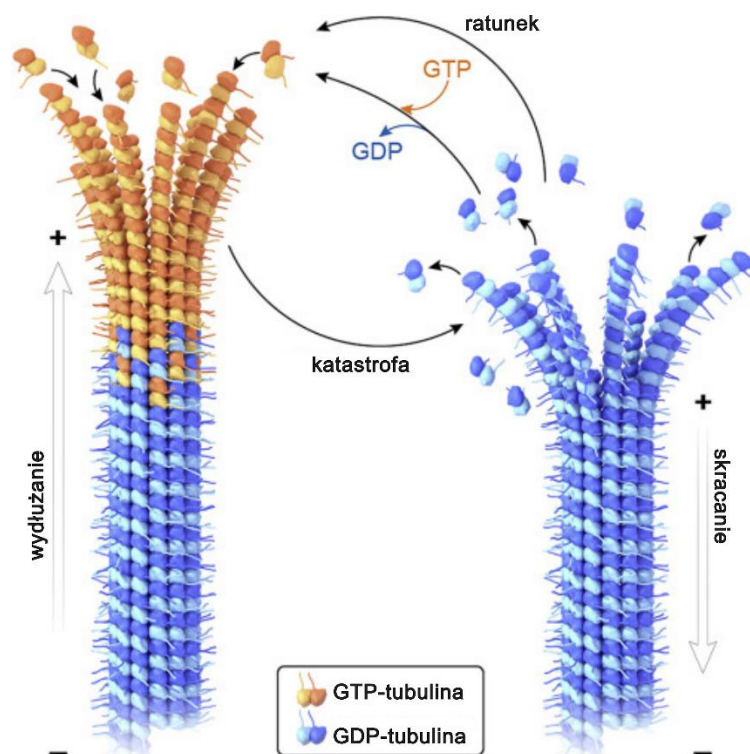
Termin cytoskielet jest powszechnie stosowany do opisanego białkowych struktur nadających komórkom, pewną sztywność, kształt oraz tworzących wraz z błonami przedziały komórkowe. W rzeczywistości, cytoskielet komórki nie jest jednorodną strukturą, a raczej konstrukcją składającą się z kilku różniących się budową elementów: neurofilamentów (w przypadku komórek nerwowych), mikrofilamentów oraz mikrotubul.

Te pierwsze należą do szerszej rodziny pośrednich, w której skład wchodzi min. keratynowe filamenty nabłonka czy laminy tworzące osłonkę jądrową. Neurofilamenty składają się z długich włókien o średnicy około 10 nm, w formie α -helikalnych zwiniętych cewek zbudowanych z tripletu białek: NFH, NFM i NFL. Jednakże, zależnie od lokalizacji oraz wieku neuronu, mogą zawierać dodatkowe białka takie jak α -interneksyna, nestyna oraz peryferyna (Kirkpatrick i Brady 1999).

Mikrofilamenty zbudowane są z dwóch helikalnie skręconych włókien białka F-aktyny (filamentowej), te zaś składają się z monomerów G-aktyny (globularnej). W strukturze mikrofilamentów aktynowych można wyróżnić dwa odmienne końce, koniec „+” zwany końcem ostrym oraz „-” zwany końcem kolczastym (Rędownicz 2018). Proces wydłużania włókien, zachodzi znacznie wydajniej na końcu ostrym, w tym czasie koniec kolczasty często ulega degradacji. Prowadzi to do zjawiska przesuwania się całego filamentu w stronę końca plus, co przypomina ruch bieżni (ang. *treadmilling*). Dodatkowo istnieje grupa białek wspomagających selektywne wydłużanie końca „plus”,

z których najlepiej opisano Arp2/3. Kontrolowane wydłużanie i skracanie włókien aktynowych, jest podstawą ameboidalnego ruchu wielu typów komórek eukariotycznych (Campellone i Welch 2010).

Ostatnią wymienioną grupą są mikrotubule. Składają się one z 12-14 (zazwyczaj 13) protofilamentów, zbudowanych z dimerów naprzemiennie ułożonych białek, α i β -tubuliny. W genomie człowieka zidentyfikowano dziewięć genów (izoform) kodujących zarówno α jak i β tubulinę, z czego przynajmniej pięć ulega ekspresji w neuronach (Roll-Mecak 2020). Protofilamenty łączą się razem tworząc długie, cylindryczne, puste w środku włókna o średnicy około 25 nm. Ponieważ tworzące owe włókna protofilamenty układają się razem w stałej orientacji, podobnie jak w przypadku aktyny, w mikrotubulach można wyróżnić końce „+” oraz „-”. Podczas gdy mikrotubule mogą rosnąć na obu końcach, zmiany na końcu „+” zachodzą znacznie bardziej wydajnie i z większą częstotliwością. Co więcej, w większości komórek nieneuronalnych, koniec „-” pozostaje związany z kompleksem nazywanym γ -TuRC (np. w obrębie centrosomu), co całkowicie blokuje jego dynamikę. Wydłużanie mikrotubul odbywa się poprzez dołączanie nowych dimerów α oraz β -tubuliny, co możliwe jest jedynie, gdy związane są one z GTP, co zapewnia ich odpowiednią konformację. Jednocześnie w krótkim czasie po włączeniu do protofilamentu, GTP ulega hydrolizie do GDP. Następuje to, jednakże jedynie w obrębie β -tubuliny, α -tubulina pozostaje zaś związana z GTP niezależnie od zachodzących przemian (Alushin i in. 2014). Tym samym mikrotubula na ogół zawiera związaną z GTP β -tubulinę tylko w pobliżu rosnącego końca, co bywa nazywane „czapeczką GTP” (ang. *GTP cap*). Utrata „czapeczki” np. na skutek hydrolizy GTP w całej włączonej β -tubulinie przy jednoczesnym braku dostępności nowych związanych z GTP kompleksów α i β -tubuliny, skutkuje gwałtownym odłączaniem dimerów od rosnącego końca powodując nagłe skracanie się całej mikrotubuli. Zjawisko to jest nazywane katastrofą (ang. *catastrophe*). Jednocześnie, o ile tylko występuje dostatek GTP, odłączone dimery mogą ulegać sprawnej wymianie nukleotydu wracając do stanu początkowego. Wspomniane skracanie może zostać zatem przerwane w każdym momencie, przez dołączenie nowych dimerów GTP-tubuliny, co stanowi „ratunek” (ang. *rescue*). Takie cykle katastrofa-ratunek występują w rosnących mikrotubulach z dużą częstotliwością, co w literaturze bywa określane dynamiczną niestabilnością lub po prostu dynamiką (Ryc. 1.1). Proces ten umożliwia mikrotubulom penetrację wąskich kompartmentów jak neuryty rosnącej komórki nerwowej, jak i dopasowywanie kształtu do poruszającej się lub wzrastającej komórki (Akhmanova i Steinmetz 2008). Warty uwagi jest fakt istnienia całej grupy białek wiążących się do rosnącego „+” końca mikrotubul (ang. *plus end tracking proteins*, białka śledzące plus koniec, +TIP). Łącząc się z rosnącym końcem, mogą wpływać nie tylko na jego stabilność, zmniejszając prawdopodobieństwo katastrofy, ale również wpływać na kierunek polimeryzacji, co ma duże znaczenie np. w nawigacji rosnącego aksonu. Odłączają się one jednak natychmiast w momencie katastrofy. Ta właściwość sprawia, że po sprzężeniu z fluorescencyjną metką często wykorzystywane są jako marker dynamiki mikrotubul. Do najbardziej znanych przykładów można zaliczyć: EB1, EB3 czy Clip-170 (Jaworski 2018).



Ryc. 1.1. Dynamiczna niestabilność mikrotubul. W przypadku dostępności dimerów tubuliny związanych z GTP dochodzi do efektywnego wydłużania mikrotubuli, jednocześnie u dołączonych dimerów dochodzi do hydrolizy GTP do GDP. W momencie braku dostępnych nowych dimerów związanych z GTP, dochodzi do nagłego rozpadu mikrotubuli (katastrofa). Proces ten może zostać w każdej chwili przerwany, przez pojawienie się nowej GTP-tubuliny co skutkuje ponownym wzrostem (ratunek). Zmodyfikowano wg [Roll-Mecak 2020](#).

Charakterystyczną cechą mikrotubul, szczególnie tych budujących neurony, są ich modyfikacje potranslacyjne. Nowo powstałe monomery α -tubuliny zawierają resztę tyrozyny na końcu karboksylowym. Aminokwas ten może zostać usunięty przez karboksypeptydazę, ale tylko jeżeli dana α -tubulina stanowi już część mikrotubuli. Co więcej, wolna detyrozynowana α -tubulina z dużą wydajnością ulega ponownej tyrozynacji przez ligazę tubuliny-tyrozyny. Tym samym modyfikacja ta jest silnie powiązana z dynamiką mikrotubul. W generalnym ujęciu, starsze, dłużej spolimeryzowane mikrotubule będą zawierały więcej detyrozynowanej tubuliny niż nowe, ulegające bardziej dynamicznym przemianom (Wehland i Weber 1987; Kirkpatrick i Brady 1999). Drugą najlepiej zbadaną modyfikacją potranslacyjną tubuliny jest acetylacja na lizyny-40 α -tubuliny przez acetylotransferazę α -TAT1. Podobnie jak detyrozynacja, zachodzi ona dopiero na α -tubulinie włączonej już w skład makrostruktury. Co ciekawe, sama modyfikacja wprowadzona jest wewnątrz światła cylindra mikrotubuli, nie zaś jak pozostałe na zewnątrz. (Janke i Montagnac 2017). Acetylacja mikrotubul silnie koreluje z ich stabilnością w modelach *in vitro*, będąc charakterystycznym markerem długo żyjących mikrotubul (Szyk i in. 2014). Jednym z proponowanych wyjaśnień, może być ich większa odporność mechaniczna. Na skutek acetylacji miałyby dochodzić do osłabienia oddziaływań pomiędzy sąsiadującymi podjednostkami tubuliny wewnątrz protofilamentu, co zwiększałoby ich elastyczność a

w konsekwencji i odporność na pękanie (Portran i in. 2017). Jednakże badania *in vitro* nie wykazały, aby sama acetylacja wystarczyła do zapobiegania katastrofom mikrotubul, co oznacza, że jest to raczej modyfikacja, której z czasem ulegają długo żyjące mikrotubule, niż bezpośrednia przyczyna ich stabilności (Janke i Kneussel 2010). Powodami, dla których niektóre mikrotubule pozostają bardziej stabilne niż inne, może być aktywność białek z rodziny MAP (ang. *microtubule associated protein*, białka związane z mikrotubulami) np. MAP6 (Kapitein i Hoogenraad 2015), specjalna rodzina białek STOP (ang. *stable tubulin-only-protein*) (Guillaud i in. 1998), oraz specyficzne modyfikacje, takie jak poliaminacja (Song i in. 2013), które zmniejszają prawdopodobieństwo katastrofy. Jednakże zapobieganie rozpadowi nie jest jedynym sposobem w jaki białka te mogą wpływać na stabilność mikrotubul. Dobrze znany jest fakt ochronnego wpływu białka tau na aksonalne mikrotubule przed pocięciem przez kataninę (Qiang i in. 2006). Trzecią modyfikacją potranslacyjną, o której warto wspomnieć w kontekście neuronu, jest poli-glutaminacja polegająca na dodaniu reszt glutaminy do C-końca, zarówno α jak i β -tubuliny. W neuronalnych mikrotubulach zazwyczaj dołączane jest 3-6 aminokwasów, w niektórych przypadkach jednak odnotowywano ich nawet 21 (Schneider i in. 1998). Modyfikacja ta zmienia właściwości fizyczne mikrotubuli dodając dodatkowe ujemnie naładowane reszty aminokwasowe. Ma to prawdopodobnie wpływ na ułatwienie wiązanie się do mikrotubul różnych białek, w tym wspomnianych MAP (Mitchell 2010). Opisane modyfikacje potranslacyjne, w połączeniu z obecnością izoform α i β tubuliny tworzą tzw. „kod tubulinowy”, (ang. *tubulin code*), odpowiadający za różnice pomiędzy pozornie podobnymi włóknami (Roll-Mecak 2020).

1.1.2 Budowa i rozwój neuronu

Neurony tworzące centralny układ nerwowy ssaków biorą swój początek od macierzystych komórek neuralnych (ang. *neural stem cells, NSCs*), wywodzących się z neuroepitelium cewy nerwowej (Kintner 2002). W rozwoju embrionalnym, pula komórek macierzystych zostaje utrzymana przez podziały asymetryczne. W ich wyniku, jedna z komórek potomnych pozostaje zdolna do dalszych podziałów, podczas gdy druga wchodzi na drogę różnicowania stając się komórką neuroprogenitorową. Złożona, wielowarstwowa budowa wielu obszarów mózgu możliwa jest dzięki zjawisku migracji neuroprogenitorów przez dojrzewającą tkankę, niekiedy na znaczną odległość od miejsca proliferacji w niszy neurogennej. Sztandarowym tego przykładem jest rozwój kory mózgowej, w czasie którego radialne komórki glejowe stanowią swego rodzaju „rusztowanie” umożliwiające podróż komórkom progenitorowym przez kolejne warstwy, aż do osiągnięcia ostatecznej lokalizacji (Allen i Lyons 2018). Typowo u progenitorów korowych, proces polaryzacji rozpoczyna się już w czasie migracji, kiedy „wspinająca się” wzdłuż warstw kory komórka wytwarza wyraźne bieguny - prowadzący oraz tylny. Wydłużanie bieguna prowadzącego i wycofywanie tylnego, za co odpowiada dynamiczna rearanżacja cytoszkieletu, umożliwia jej ruch (Cooper 2013). Generalnie, polaryzacja komórki nerwowej, rozumiana jako podział na akson oraz dendryty zależy w dużej mierze od gradientu stężeń cząsteczek

sygnałowych w otoczeniu. Jednakże, przynajmniej w niektórych przypadkach, to z którego bieguna powstanie akson, a z którego drzewko dendrytyczne, może zostać zdeterminowane już na etapie komórki progenitorowej, przez jej podstawno-wierzchołkową (ang. *basal-apical*) orientację (Polleux i Snider 2010), co wspomaga prawidłowe ułożenie nowego neuronu w przestrzeni rozwijającej się kory mózgowej. Jednakże same intensywne zmiany morfologiczne, nadające neuronowi jego unikalny kształt, z pojedynczym aksonem i wieloma dendrytami, rozpoczynają się dopiero po dotarciu do ostatecznej lokalizacji.

Również w przypadku hodowli neuronalnych *in vitro*, zazwyczaj wyróżnia się pięć charakterystycznych etapów rozwoju (Dotti, Sullivan, i Banker 1988). Niemal zaraz po przytwierdzeniu do podłoża hodowlanego, komórka wytwarza wiele krótkich wypustek zbudowanych z aktyny – lamellipodii. Po niedługim czasie, dają one początek kilku dłuższym projekcjom, nazywanym neurytami. W ciągu następnej doby, jeden z neurytów zaczyna gwałtownie rosnać dając początek aksonowi, podczas gdy rozwój pozostałych ulega zatrzymaniu. W następnym etapie, po wyspecjalizowaniu się aksonu, pozostałe wypustki zaczynają ponownie rosnać stając się dendrytami (Bradke i Dotti 2000). Co ciekawe, w przypadku neuronów w hodowli *in vitro*, to który neuryt stanie się aksonem zdaje się być determinowane losowo. Każdy z nich konkuruje niejako z sąsiadami o przewyżnienie wydzielanych przez nie cząsteczek zatrzymujących wzrost, aż jednemu uda się spontanicznie przełamać symetrię (Andersen i Bi 2000). Co do zasady neuryt, który ostatecznie rozpocznie specjalizację do aksonu, jest w stanie skutecznie zatrzymać ten proces u pozostałych, co powoduje, iż stają się dendrytami. Warto jednak dodać, że w przypadku mechanicznego zniszczenia aksonu (aksotomia), jeden z istniejących dendrytów przejmie jego rolę i wyspecjalizuje się wtórnie do aksonu (Dotti i Banker 1987). W procesie budowy i wydłużania rosnących neurytów, ogromne znaczenie mają również zewnętrzne cząsteczki sygnałowe, oraz „czynniki prowadzące” (ang. *guidance cues*) umożliwiające rosnącym aksonom sprawną nawigację do pożądanego celu, takie jak: netryny, semaforyny i efryny (W. S. Lee i in. 2019). Natomiast na poziomie wewnątrzkomórkowym kluczową rolę odgrywają tu białka z rodziny GTPaz Rho (Rac, Cdc42) (Nobes i Hall 1995).

Na poziomie molekularnym, determinacja losu danego neurytu zależy, nie tylko od wspomnianych cząsteczek sygnałowych, ale również od lokalnej translacji i degradacji białek oraz aranżacji cytoszkieletu. Charakterystyczną cechą zwiastującą specjalizację jednej z pierwotnych wypustek w akson, jest większa dynamika i niestabilność aktyny w tzw. stożku wzrostu (ang. *growth cone*). Już sam fakt dodania do pożywki w małym stężeniu czynników depolimeryzujących aktynę jak cytochalazyna D lub latrunkulina B, skutkuje rozwojem wielu aksonów (Andersen i Bi 2000). Podejrzewa się, że depolimeryzacja filamentów aktynowych, prowadzi do silniejszej polimeryzacji drugiego podstawowego budulca cytoszkieletu – mikrotubul, stanowiących główne „rusztowanie”, biegnące wzdłuż aksonu. W dojrzewających neurytach gęsto usieciowane filamenty aktyny stanowią blokadę utrudniającą wzrost mikrotubul. Tym samym większa dynamika mikrotubul oraz depolimeryzacja aktyny może sprzyjać sprawniejszemu wydłużaniu tych pierwszych. To z kolei może

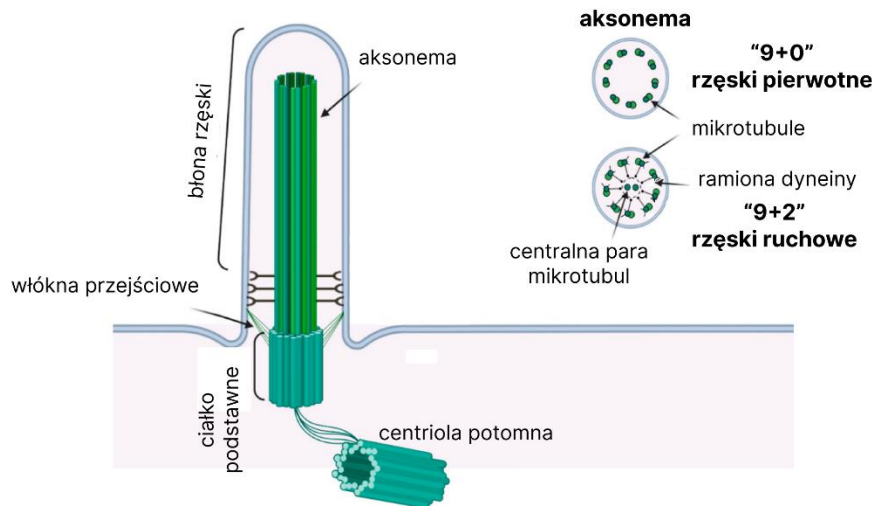
tłumaczyć kilkukrotnie szybszy wzrost aksonu względem dendrytów, obserwowany w początkowej fazie dojrzewania neuronu. Jednak oprócz mechanicznej regulacji tego procesu, inne czynniki również zdają się pełnić istotną rolę. Można tu wymienić między innymi wspomniane wcześniej białka związane z mikrotubulami, przede wszystkim tau oraz MAP1B, których rozmieszczenie oraz gradient fosforylacji wpływa na promowanie oraz regulację wzrostu mikrotubul (Bradke i Dotti 2000).

W ssaczych neuronach, charakterystyczną cechą aksonu, jest uporządkowane ułożenie mikrotubul ustawionych końcem „plus” w kierunku wierzchołka. Mimo, że średnia długość pojedynczej mikrotubuli to tylko około 4 μm (Yogev i in. 2016) ich wiązki mogą ciągnąć się przez całą długość aksonu. Jednocześnie, dominuje tu acetylowana, detyrozynowana forma tubuliny. Prostopadle do mikrotubul, występują rozlokowane w równych odstępach, co około 180 - 190 nm, zbudowane z aktyny struktury przypominające pierścien i okrążające średnicę aksonu. Połączone są one spektryną i stanowią dodatkowe, poprzeczne „rusztowanie”, mogące zwiększać jego odporność mechaniczną (Xu, Zhong, i Zhuang 2013). W przypadku dendrytów, orientacja mikrotubul jest mieszana w początkowych ich odcinkach, jednak wraz z kolejnymi rozgałęzieniami i odległością od ciała komórki zaczyna przypominać tę aksonalną (Baas i Lin 2011). Tym co dodatkowo odróżnia mikrotubule zlokalizowane w dendrytach od tych aksonalnych, są modyfikacje potranslacyjne. W dendrytach dominują dynamiczne mikrotubule, zawierające tyrozynowaną α -tubulinę. W obrębie dendrytów również stwierdzono występowanie podobnych pierścieni aktyny jak te w aksonach, jednak częstotliwość ich występowania jak i rozpowszechnienie w dalszych odcinkach dendrytów pozostaje tematem debaty (B. Han i in. 2017). Aktyna jest również budulcem kolców dendrytycznych (ang. *dendritic spines*), będących krótkimi, silnie dynamicznymi wypustkami dendrytów, stanowiącymi miejsce lokalizacji synaps pobudzających (Chidambaram i in. 2019).

1.1.3 Pierwotne rzęski komórki nerwowej

Rzęski są organellami blisko spokrewnionym z wiciami. Typowe rzęski osiągają długość 4-5 μm , i są otoczone błoną komórkową zawierającą specyficzny skład fosfolipidów. Cytoskielet rzęski tworzy 9 koncentrycznie ułożonych par mikrotubul, które składają się ze standardowego 13-protofilamentowego włókna A, oraz niekompletnego, zazwyczaj 10-protofilamentowego włókna B. Opisany kompleks mikrotubul nazywany jest aksonemą i bierze początek od struktury wywodzącej się z centrioli nazywanej ciałkiem podstawnym (ang. *basal body*). Tubulina tworząca rzęskę typowo jest silnie acetylowana, stąd przeciwiała rozpoznające tę formę tubuliny, bywa używane jako specyficzny, rzęskowy marker, zaś jej włókna podobnie jak w aksonie ustawione są końcami „+” na zewnątrz. Rozróżniane są dwa rodzaje rzęsek – ruchowe oraz pierwotne. Ich główna różnica objawia się w budowie. Rzęski ruchowe pośrodku okręgu wspomnianych 9 dubletów mikrotubul, posiadają dodatkową parę (budowa 9 + 2), połączoną z zewnętrznym pierścieniem strukturami nazywanymi promieniami łączącymi (ang. *radial spokes*). Dodatkowo rzęski ruchowe zawierają rozpięte pomiędzy

włóknami A i B sąsiadujących par mikrotubul kompleksy białka motorycznego – dyneiny. Ruch dynein wokół sąsiadujących włókien mikrotubul powoduje obrót aksonemy, a w efekcie całej rzęski. Mechanizm ten jest wspólny dla rzęsek i wici i stanowi podstawę ruchu niektórych komórek eukariotycznych np. plemników. Rzęski pierwotne natomiast, nie posiadają centralnej pary mikrotubul (budowa 9 + 0), ani dynein wewnątrz aksonemy, tym samym pozostają nieruchome (Avasthi i Marshall 2012). Uproszczony schemat budowy rzęski przedstawiono na ryc. 1.2.



Ryc. 1.2. Budowa rzęsek komórek eukariotycznych. Cytoszkielecik rzęski tworzy zbudowana z dziewięciu par mikrotubul struktura nazywana aksonemą. W rzęskach ruchowych wewnątrz aksonemy występuje dodatkowa para mikrotubul (budowa „9+2”), zaś pomiędzy mikrotubulami rozpięte są kompleksy dyneiny. Rzęski pierwotne nie zawierają centralnej pary mikrotubul, ani dynein (budowa „9+0”). Zmodyfikowano wg Chen, Hu, i Ling 2022.

Pierwotne rzęski występują w większości typów komórek (Anvarian i in. 2019), również u dojrzałych neuronów (Lepanto, Badano, i Zolessi 2016). Jednakże przez długi czas ich dokładna rola pozostawała zagadkowa. Jednakże, ostatnia dekada przyniosła rewolucję w rozumieniu funkcji tego organellum, ujawniając jego kluczowy udział w wielu procesach komórkowych. Istotność rzęsek w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu podkreśla fakt występowania specyficznej grupy chorób rozwojowych – ciliopatii, związanych bezpośrednio z zaburzeniami rozwoju rzęsek. (Lee i Gleeson 2010). Jako przykład można wymienić wielotorbielowatość nerek (ang. *polycystic kidney disease*, PDK), gdzie kluczowa jest pełniona przez rzęskę funkcja mechanoreceptora, reagującego na przepływ płynów w bezpośrednim otoczeniu. Jest to możliwe dzięki posiadaniu przez rzęski białek kanału kationowego, polycystyny-2 (TRPP2, opisywany też pod nazwą PKD2), które regulują przepływ jonów wapnia w następstwie bodźca ruchowego. (Daigneault i Miller 2021). Inną konsekwencją zaburzeń działania tego mechanoreceptora jest często opisywane w ciliopatiach zjawisko losowej determinacji osi prawo-lewo (łac. *situs inversus*), skutkujące między innymi nieprawidłowym ułożeniem organów (Handel i Kennedy 1984)

Pierwotne rzęski to organella, których występowanie jest silnie powiązane z cyklem komórkowym. Najczęściej zaczynają rosnąć w fazie G1, występują najliczniej u komórek w fazie G0, natomiast zazwyczaj ulegają degradacji u komórek wchodzących w mitozę. Wiąże się to z miejscem ich występowania. U większości zwierzęcych komórek, aby skutecznie przejść przez cykl komórkowy, ciało podstawne z którego rzęski biorą swój początek, musi ulec przemianie z powrotem do centrioli, których para tworzy centrosom będący miejscem organizacji wrzeciona podziałowego. Stwierdzono jednak, że obecność centrioli nie jest konieczna do przejścia przez cykl komórkowy u muszki owocowej (Basto i in. 2006), oraz w niektórych liniach komórkowych, jak np. HeLa. (Holland i in. 2012). Dla wielu komórek jednak, bezpośrednią konsekwencją uniemożliwienia degradacji rzęski, jest zatrzymanie cyklu, najprawdopodobniej przez działanie białka p53 (Srsen i in. 2006). Fakt kontroli podziału przez obecność rzęski, został dobrze przebadany w przypadku komórek neuroprogenitorowych. Jak wspomniano wcześniej, podczas rozwoju układu nerwowego komórki te przechodzą podziały asymetryczne, częściowo zachowując populację nie zróżnicowanych komórek zdolnych do podziału. Badania wykazały, że sam fakt zatrzymania maszynarii potrzebnej do rozłożenia rzęski, skutkowało nie tylko zatrzymaniem podziału, ale również różnicowaniem się komórki progenitorowej w neuron (Gabriel i in. 2016). W tym kontekście, rzęski zdają się pełnić jeszcze jedną rolę. W momencie podziału komórki, centrosom również ulega duplikacji, po czym, po jednej parze centriol zajmie miejsce na przeciwnych biegunach komórki i trafi do komórek potomnych. Udowodniono, że fragmenty błony aksonemy rzęski, mogą przed podziałem ulec endocytozie i pozostać w obrębie jednej z centriol. W takim wypadku, zostanie ona przekazana jednej z komórek potomnych, podczas gdy druga otrzyma centrosom nie zawierający elementów ciała podstawnego (Paridaen, Wilsch-Bräuninger, i Huttner 2013). Na skutek tego, nowopowstałe komórki mogą różnić się zdolnością do wykształcenia rzęsek, a tym samym prawdopodobieństwem kontynuowania cyklu komórkowego lub różnicowania (Anderson i Stearns 2009). Może to stanowić jeden z mechanizmów stojących za asymetrycznym podziałem (Tylkowski i in. 2015).

Oprócz funkcji mechanoreceptora i regulacji cyklu komórkowego, pierwotna rzęska została opisana jako istotne centrum sygnałowe komórki. Wzdłuż rzęsek lokalizuje się wiele kanałów jonowych, receptorów związanych z białkiem G (GPCR, ang. *G protein coupled receptors*), receptorów kinaz tyrozynowych, czy innych białek transbłonowych pełniących rolę receptorów dla specyficznych substratów. W przypadku neuronalnych rzęsek, można tu wymienić min. receptor somatostatyny typu 3, receptor hormonu zagęszczającego melaninę typu 1 (Berbari i in. 2008), receptor serotoninowy 6 (ang. *5-hydroxytryptamine receptor 6, 5HT6R*) (Wang i in. 2019), czy Ptc (ang. *Patched*) będący negatywnym regulatorem w ścieżce Sonic Hedgehog (Shh). (Kim i in. 2015). Warto dodać, że konkretny zestaw receptorów obecnych na rzęsce neuronu, różni się zależnie od regionu mózgu, a w niektórych przypadkach receptory te mogą występować jedynie na tym organellum. Wyjątkowy stosunek powierzchni do objętości rzęski, sprawia, że możliwe staje się łatwe uzyskanie dużego stężenia czynnika efektorowego w obrębie małej przestrzeni, co ułatwia transdukcję sygnału (Truong i in. 2021).

Głównym efekтором rzęskowych GPCR w neuronach jest cyklaza adenylylowa 3 (*ang. adenylyl cyclase 3, AC3*), produkująca cykliczne AMP będące elementem transdukcji sygnału w wielu ścieżkach sygnałowych komórki, ale do bezpośrednich efektorów należą również kinazy fosfatydyloinozytolu-3 (*ang. phosphoinositide 3-kinase, PI3K*) będące aktywatorami ścieżki Akt/mTOR (opisanej w punkcie 1.3.5) (J. Guo i in. 2019).

W przypadku ciliopatii dotyczących układu nerwowego, najbardziej znany jest zespół Joubert, objawiający przede wszystkim nieprawidłową budowę mózdzku, a co za tym idzie ataksją, niskim napięciem mięśniowym i zaburzeniami rytmu oddychania. Jednocześnie zespół ten charakteryzuje się bardzo szerokim spektrum objawów i został powiązany z mutacjami w przynajmniej 40 genach, z których wszystkie skutkują zaburzeniem funkcjonowania rzęsek pierwotnych (Gana, Serpieri, i Valente 2022). Nie tylko jednak sam fakt obecności rzęski, ale również skład jej receptorów ma znaczenie w funkcjonowaniu układu nerwowego. Nieprawidłowa, pozarzęskowa lokalizacja receptora melanokortyny 4 w neuronach wzgórza, została powiązana z zaburzeniami odczuwania głodu i predyspozycją do otyłości (Siljee i in. 2018). Rzęski pełnią również rolę w utrzymaniu prawidłowych połączeń w starszych neuronach. W badaniu Guo i wsp. selektywne usunięcie w interneuronach małej GTPazy - białka podobnego do czynnika ADP-rybozylacji 13B (*ang. ADP-ribosylation factor-like protein 13B, ARL13B*), będącego jednym z kluczowych białek dla funkcjonowania rzęsek, skutkowało skróceniem długości neurytów i zmniejszeniem liczby synaps w preparatach z mysich mózgow pobranych 60 dni po urodzeniu, ale nie po 30 (J. Guo i in. 2017). Wykazano również, że w mysim modelu choroby Alzheimera, obecność agregatów β -amyloidu koreluje z krótszymi rzęskami, a same agregaty lokalizują się również w ich wnętrzu (Chakravarthy i in. 2012). Rzęski zdają się również regulować aktywność neuronów. Nadprodukcja występującego głównie w rzęskach receptora dla serotoniny H5T6R skutkowała obniżoną pobudliwością w modelu mysich neuronów hipokampalnych, korelując również ze zmianami morfologii rzęsek (B. Wang i in. 2019). Inne badanie sugeruje wręcz istnienie struktur przypominających synapsy pomiędzy rzęską a początkowym segmentem aksonu, których aktywność przekłada się na zmiany w transkrypcji wpływające na aktywność neuronu (Sheu i in. 2023).

Jednakże, rzęska stanowi więcej niż tylko „antenę” odbierającą sygnały. W niektórych ścieżkach sygnałowych pełni rolę istotnego przedziału, w obrębie, którego zachodzą przemiany substratów. We wspomnianej ścieżce Shh, translokacja do rzęski efektorowych białek palca cynkowego z rodziny GLI (*ang. Zinc finger protein family GLI*) GLI2 oraz GLI3 jest istotną częścią ich procesu aktywacji (Sasai i Briscoe 2012). Podobnie wykazano również lokalizowanie się do rzęski kinazy receptora tropomiozyny B (*ang. tropomyosin receptor kinase B, TrkB*) w obecności jego ligandu czyli neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (*ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF*) (Leitch i Zaghoul 2014). Wśród innych ważnych ścieżek sygnałowych, których regulacje powiązane z rzęskami pierwotnymi można wymienić również ścieżki Wnt (May-Simera i Kelley 2012) czy

plytkopochodnego czynnika wzrostu (*ang. platelet-derived growth factor*, PDGF) (Y.-C. Tsai i in. 2023).

1.1.4 Transport wewnątrzkomórkowy w neuronie

Jedną z cech budowy komórek umożliwiającą im prowadzenie jednocześnie tak wielu procesów metabolicznych, niekiedy wzajemnie antagonistycznych, jest podział na wyspecjalizowane przedziały (kompartymenty). Skutkuje to jednak nieustanną koniecznością transportu różnego rodzaju molekularnych ładunków pomiędzy tymi przedziałami. Na niewielkie odległości może do tego celu wystarczyć prosta lub wspomagana dyfuzja, jednak niejednokrotnie konieczne jest pokonanie znacznych w skali molekularnej odległości. Jako przykłady można wymienić: transport mRNA do rybosomów, nowopowstałych białek do miejsca przeznaczenia, cząsteczek sygnałowych czy wręcz całych fragmentów błon. W tym przypadku konieczny jest tzw. transport aktywny. Jest on zapewniany w komórce, przez specjalne białka poruszające się wzdłuż elementów cytoszkieletu. Białka te nazywane są motorycznymi, ze względu na swoją zdolność do aktywnego ruchu na skutek hydrolizy ATP. Do białek tych zalicza się kinezy i dyneiny poruszające się po mikrotubulach, oraz miozyny, transportujące ładunki wzdłuż filamentów aktynowych (Sweeney i Holzbaur 2018).

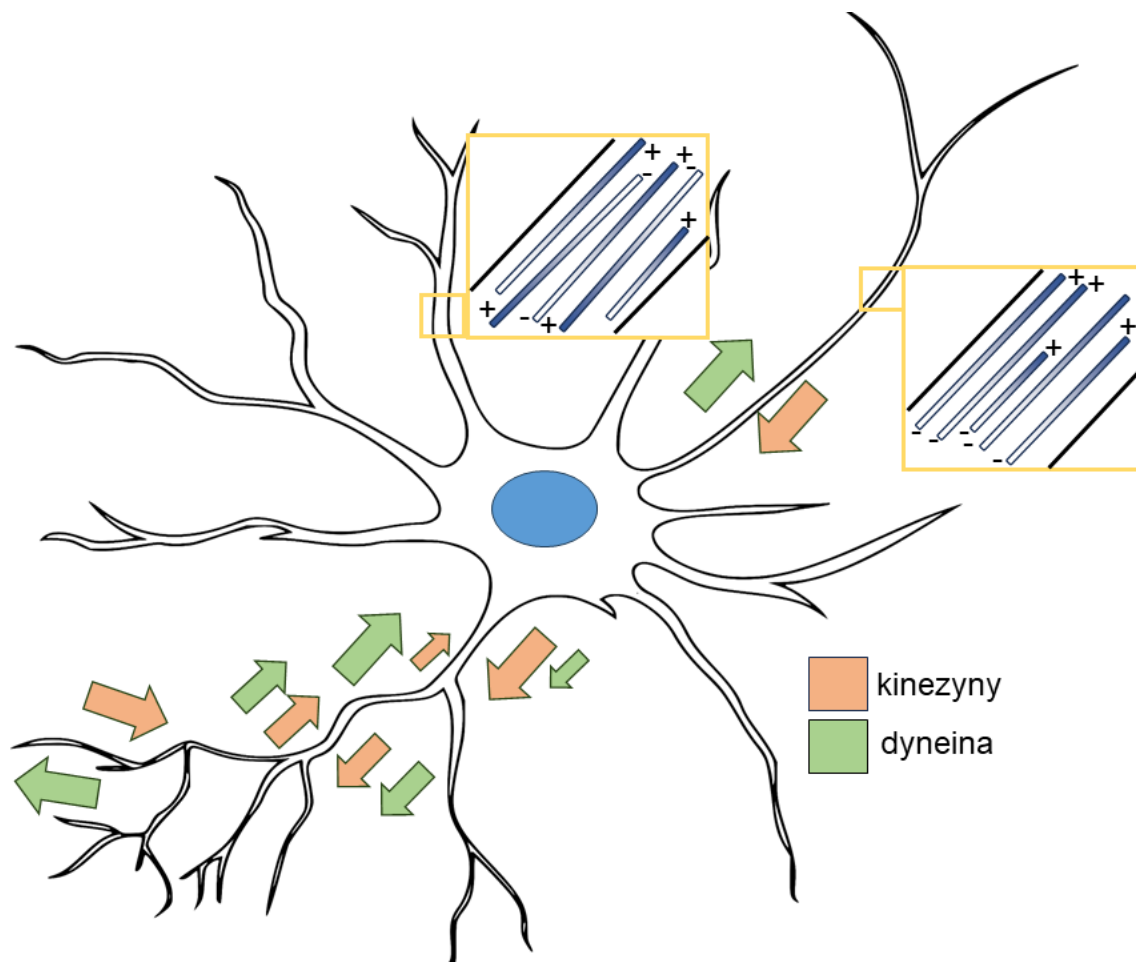
Jak już wspomniano na początku tego rozdziału, szczególna budowa neuronu sprawia, że ciało komórki a końcowe odcinki jego długich wypustek dzielą ogromne jak na skalę molekularną odległości. Tym samym w szczególnym stopniu musi on polegać na sprawnym transporcie wewnątrzkomórkowym. Jak opisano w punkcie 1.1.1 głównym „rusztowaniem” ciągnącym się równolegle przez całą długość dendrytów i aksonu są mikrotubule. Oprócz nadawania sztywności i odporności mechanicznej, stanowią one również podłoże transportu przez całą tę drogę. Jak już wspomniano, mikrotubule posiadają koniec „minus” oraz bardziej dynamiczny koniec „plus”, zaś ich orientacja w aksonie jest uporządkowana, końcem plus na zewnątrz. Ma to także kluczowe znaczenie dla transportu, jako że każde z białek motorycznych może poruszać się wzdłuż mikrotubul tylko w określonym kierunku. Tak więc za transport w kierunku „plus”, do zakończenia aksonu, nazywany postępowym (*ang. anterograde*), odpowiadają kinezy zaś za ruch w przeciwnym kierunku, do ciała komórki, nazywany wstecznym (*ang. retrograde*), przede wszystkim dyneina, aczkolwiek istnieje również rodzina kinezyn poruszająca się w tym kierunku (więcej opisano w podrozdziale 1.2).

Pomimo, że w aksonie występują rybosomy oraz zachodzi translacja (Holt, Martin, i Schuman 2019), transkrypcja odbywa w jądrze, zatem mRNA musi zostać do nich dostarczone. Co więcej, wspomniana lokalna translacja, zachodzi na zbyt małą skalę by pokryć w pełni zapotrzebowanie aksonu, w którym aktywność metaboliczna pozostaje na wysokim poziomie. Stąd również znaczna liczba białek wyprodukowanych w obrębie ciała komórki musi zostać tam dostarczona. Należą do nich zarówno np. elementy synaps i receptorów, jak i całe fragmenty cytoszkieletu, łącznie z częściowo już

spolimeryzowanymi odcinkami mikrotubul. Oprócz białek transportowane są całe organella, jak wspomniane rybosomy, mitochondria czy fragmenty aparatu Golgiego, oraz liczne pęcherzyki np. zawierające neuroprzekaźniki i składniki do budowy błon (Maday i in. 2014). W drugą stronę przenoszone są nie tylko uszkodzone organella i zagregowane białka w celu degradacji, ale również receptory, które ulegają internalizacji po związaniu z ligandem i do pełnej aktywności wymagają transportu do ciała komórki. Jako przykład można wymienić TrkB, po związaniu z BDNF (Kononenko i in. 2017). Co istotne, do tego samego ładunku może wiązać się jednocześnie wiele motorów, w tym również poruszające się w przeciwnych kierunkach. Z jednej strony zjawisko to, umożliwia ich prawidłowe pozycjonowanie (np. mitochondriów), z drugiej może skutkować obniżoną prędkością transportu, na skutek mechanizmu „przeciągania liny” (ang. *tug of war*) pomiędzy poruszającymi się w przeciwnych kierunkach motorami, skutkując licznymi przerwami w trakcie ruchu (Hancock 2014).

W dendrytach, transportowany jest bardzo podobny zestaw ładunków, co w aksonie, jednakże ich nawigacja jest znacznie bardziej skomplikowana. Wynika to z wspomnianego mieszanego ułożenia końcami plus/minus mikrotubul tworzących cytoskielet dendrytu, szczególnie w najbliższych (proksymalnych) ciału komórki odcinkach (Kapitein i in. 2010). Mimo tego, podobnie jak w aksonie, transport dendrytyczny pozostaje również wydajny. Wynika to w głównej mierze z faktu wiązania się do ładunku wielu białek motorycznych naraz, a tym samym możliwości prowadzenia go naprzemiennie po kilku mikrotubulach (Iwanski i Kapitein 2023). Co więcej, badania wskazują, że włókna ułożone końcem „+” w stronę zakończenia dendrytu rozlokowane są peryferyjnie, bliżej błon, zaś włókna zorientowane „+” końcem w stronę ciała komórki, centralnie (Tas i in. 2017).

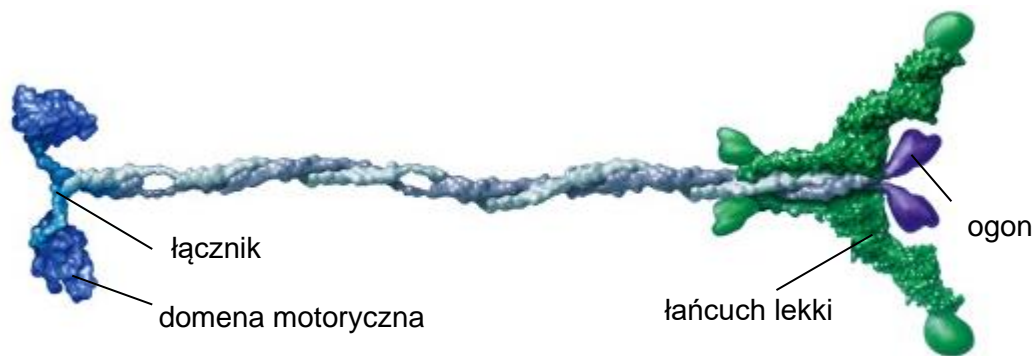
Jak wspomniano wcześniej, za transport mikrotubularny, odpowiadają dwie grupy białek. Pierwszą z nich są dyneiny. Rozróżniane są tylko dwie ich odmiany – aksonemalna (odpowiadająca za ruch rzęsek i wici patrz punkt 1.1.3) oraz cytoplazmatyczna, która jest tą zaangażowaną w transport mikrotubularny. Dyneina funkcjonuje jako duży (1,5 MDa) kompleks 12 białek. Za jej ruch odpowiadają dwa łańcuchy ciężkie z domeną motoryczną, filogenetycznie wywodzącą się z rodziny ATPazy AAA (ang. *ATPases associated with diverse cellular activities*, ATPazy związane z różnymi funkcjami komórkowymi). Dyneina zazwyczaj pełni funkcje transportowe związana z drugim dużym kompleksem, dynaktyną (około 1 MDa), która służy za adaptor wiążący wiele różnych ładunków oraz zwiększający procesywność dyneiny. Drugą grupą białek odpowiedzialnych za transport mikrotubularny są natomiast kinezy, którym poświęcono kolejny podrozdział.



Ryc. 1.4. Transport mikrotubularny w neuronie. Dyneina odpowiada za transport wsteczny (retogradowy) w aksonie, gdzie mikrotubule ułożone są jednorodnie, końcem „plus” w stronę wierzchołka, w stronę którego zaś poruszają się kinezynty (transport postępowy). Mimo, że w bliskich ciała komórki odcinkach dendrytów, orientacja mikrotubul jest mieszana, tylko niektóre z kinezyn są w stanie aktywnie wprowadzać do nich ładunki, a za większą część transportu odpowiada dyneina. Im dalej od ciała komórki, tym bardziej organizacja tubuliny zaczyna przypominać tę aksonalną, a w konsekwencji również transport mikrotubularny w aksonach. Zmodyfikowano wg [Tempes i in., 2020](#).

1.2 Kinezynty

W porównaniu do dynein, rodzina kinezyn jest znacznie większa. W genomie człowieka zidentyfikowano 45 genów kodujących łańcuchy ciężkie (KIF), w obrębie których znajduje się domena ATPazy umożliwiająca ruch. Ma ona zupełnie inne pochodzenie ewolucyjne od odpowiadającej domeny dyneiny, zaś kinezynty zdają się być bliżej spokrewnione z miozynami (Kull, Vale, i Fletterick 1998). Kinezynty są białkami intensywnie badanymi ze względu na swój kluczowy udział w organizacji i rozdziale włókna kariokinetycznego, przez co budzą zainteresowanie jako potencjalny cel terapeutyczny w wielu nowotworach (Welburn 2013). Jednakże dalsza część tego rozdziału będzie skupiona wokół ich funkcji transportowych oraz niekanonicznych w komórce nerwowej.



Ryc. 1.3 Budowa kinezyn na przykładzie kinezyny-1. Zmodyfikowano wg Vale 2003.

1.2.1 Podział i budowa kinezyn

Zgodnie z współczesną, ustandaryzowaną nomenklaturą (Lawrence i in. 2004), ludzkie geny kinezyn oraz ich homologi u innych gatunków pogrupowane są w 14 rodzin (kinezyny1-14), choć niektórzy autorzy dzielą rodzinę 14 dodatkowo na 14A oraz 14B (Hirokawa i Tanaka 2015). Pojawiające się w dalszej części wstępu określenia kinezyny poprzez rodzinę, jak np. kinezyna-1 będą się odnosić do dowolnego, lub nieokreślonego dokładnie członka danej rodziny. Wynika to bezpośrednio z częstego braku rozróżnienia pomiędzy danymi członkami w literaturze, aczkolwiek często przedstawiciele danej rodziny mogą pełnić wymiennie opisywane w konkretnej publikacji funkcje. Oprócz rodzin, białka te można podzielić na podgrupy na podstawie lokalizacji domeny motorycznej. Większość z nich to tzw. N-kinezyny (rodzina 1-12), posiadające domenę motoryczną na końcu aminowym i poruszające się w kierunku „plus” mikrotubul. Drugą grupę stanowią M-kinezyny, gdzie domena motoryczna znalazła się mniej więcej pośrodku sekwencji (rodzina-13). Są one nieruchome, ale mają zdolność depolimeryzacji mikrotubul. Trzecią grupę stanowią C-kinezyny (rodzina 14, A i B), u których domena motoryczna znajduje się na końcu karboksylowym. Poruszają się one w stronę końca „minus” mikrotubul, zatem w tę samą co dyneina (Hirokawa i in. 2009).

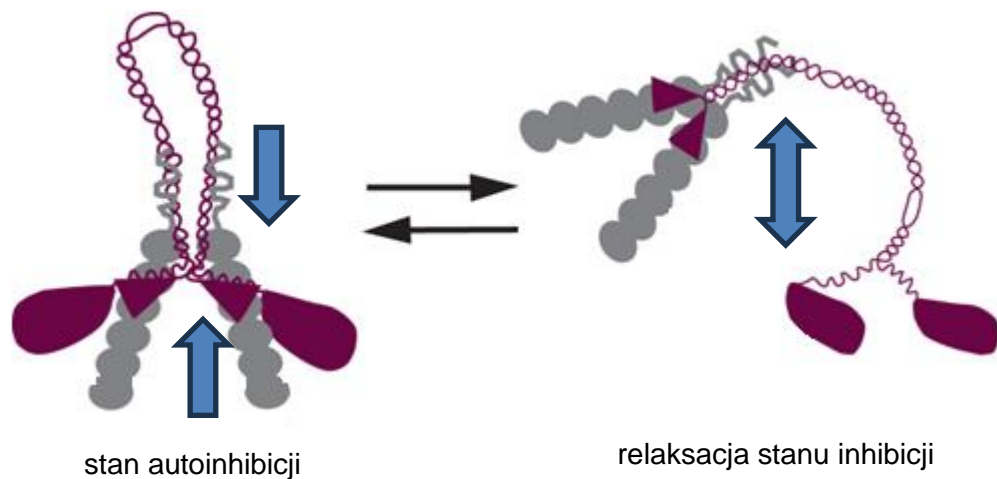
Typowo, budowa kinezyn omawiana jest na przykładzie kinezyny-1, nazywanej również konwencjonalną, jako że została opisana jako pierwsza. W strukturze łańcuchów ciężkich (KIF5A, KIF5B oraz KIF5C), można wyróżnić zlokalizowaną na końcu aminowym, zawierającą domenę motoryczną głowę (ang. *head*), kończącą się krótkim (zwykle 15 aminokwasów) łącznikiem (ang. *linker*), po którym następuje fragment nazywany szyją (ang. *neck*) i długi zbudowany ze zwiniętych cewek trzon (ang. *stalk*), zaś w pobliżu końca karboksylowego ogon (ang. *tail*), będący miejscem wiązania łańcuchów lekkich. Łańcuchy te uczestniczą w oddziaływaniach z ładunkami, ale nie są kluczowe dla ruchu. Co więcej, nie wszystkie kinezyny łączą się z łańcuchami lekkimi. Większość kinezyn funkcjonuje jako homodimery, gdzie dwa łańcuchy ciężkie, splatają się trzonami, tworząc strukturę z dwiema głowami, mogącymi niezależnie wiązać się do mikrotubul. Struktura domeny motorycznej jest silnie konserwowana w obrębie całej rodziny, a tym samym również mechanizm ruchu.

Związana z ADP domena głowy, dzięki dodatnio naładowanym aminokwasom wykazuje się słabym elektrostatycznym wiązaniem do ujemnych ładunków na powierzchni mikrotubul, wystarczy to jednak do nawiązania pierwszego kontaktu. Na skutek wymiany nukleotydu na ATP jednak, wiązanie to staje się wielokrotnie silniejsze. Jednocześnie skutkuje ono zmianą konformacyjną, której efektem jest napięcie łącznika znajdującego się na końcu domeny motorycznej, powodujące obrót całego białka i wyrzucenie drugiej głowy naprzód, w kierunku końca „plus” mikrotubuli. Zmiana ta powoduje również hydrolizę ATP, a tym samym ponowne poluzowanie łącznika jak i całego wiązania głowy do mikrotubuli. Ponieważ niemal w tym samym czasie, na drugiej głowie odbywa się wymiana ADP na ATP, następuje obrót w drugą stronę i tym razem to pierwsza głowa zostaje wyrzucona naprzód. Taki pojedynczy „krok” wynosi 8 nm i odpowiada odległości pomiędzy dimerami tubulin (Clancy i in. 2011). Przy odpowiedniej dostępności ATP kinezyzna może tak „kroczyć” przed siebie, w stałym, procesywnym tempie. W przypadku kinezy-1 może to być nawet 100 cykli zanim odłączy się ona od tubuliny, choć inne kinezyzny mogą być mniej lub bardziej procesywne. Dla przykładu białka z rodziny kinezyn-3 mogą wykonać nawet 500 „kroków” bez odłączania, co wynika z ich znacznie silniejszego wiązania do mikrotubul (Guedes-Dias i in. 2019). Co ważne, podobieństwo domeny motorycznej jest zachowane również w przypadku rodziny-14, a za ich ruch w przeciwnym kierunku odpowiada sam fakt jej lokalizacji po przeciwnej stronie łańcucha polipeptydowego, a co za tym idzie odwrotna orientacja łącznika, którego napięcie w tym przypadku będzie obracało białkiem w stronę końca „minus” (Endres i in. 2006).

Pomimo, iż większość kinezyn funkcjonuje jako dimery, istnieją wyjątki. Białka z rodziny-3: KIF1A, oraz KIF1B w stanie wolnym egzystują jako monomery (Okada i in. 1995; Nangaku i in. 1994) jednak mogą dimeryzować na skutek związania z ładunkiem (Rashid i in. 2005). Należący do rodziny kinezyn-5 KIF11 (znany również jako eg5) z kolei, tworzy homotetramery. Składają się one z dwóch dimerów złączonych antyrównolegle, sekwencjami ogonowymi. Z tego względu może on oddziaływać z dwoma naprzeciwnymi włóknami mikrotubul jednocześnie, co umożliwi min. ich przesuwanie względem siebie (X. Guo i in. 2022). Jego nietypowa budowa, pozwoliła również na opracowanie specyficznego inhibitora – monastrolu. Ze względu na fakt, iż KIF11 jest jedną z kinezyn zaangażowanych w mitozę, lek ten bywa stosowany w terapii niektórych odmian nowotworów (Cochran i in. 2005). Białka należące do kinezyn-2, a konkretnie KIF3A, KIF3B oraz KIF3C tworzą z kolei heterotrimery. KIF3A może dimeryzować z KIF3B lub KIF3C, tworząc białko motoryczne zbudowane z dwóch różnych łańcuchów ciężkich. Trzecim elementem kompleksu, jest białko związane z kinezynami 3 (KAP3, ang. *kinesin associated protein 3*), stabilizujące kompleks i służące jako adaptor dla ładunków (Hirokawa 2000). Jednakże, nowe badania sugerują również występowanie dimerów KIF3A-KIF3C bez konieczności wiązania z KAP3. Możliwe jest więc, że funkcja stabilizacji jest konieczna jedynie dla KIF3A-KIF3B (Quinn i in. 2020).

Charakterystyczną cechą wielu kinezyn jest możliwość wchodzenia w stan autoinhibicji (Ryc. 1.5). Odbywa się to poprzez oddziaływanie domeny ogona z motoryczną głową, na skutek czego

kinezyzna ulega „zwinięciu” i traci możliwość ruchu (Kaan, Hackney, i Kozielski 2011). W generalnym ujęciu stan autoinhibicji może zostać przerwany przez związanie ładunku lub adaptora, jednakże przynajmniej w niektórych wypadkach sama obecność ładunku jest niewystarczająca i konieczny jest najpierw pośrednik z tzw. aktywatorem, którego przykładem jest białko 3 oddziałujące z kinazą JNK (ang. *JNK-interacting protein 3*, JIP3) (Fu i Holzbaur 2014).



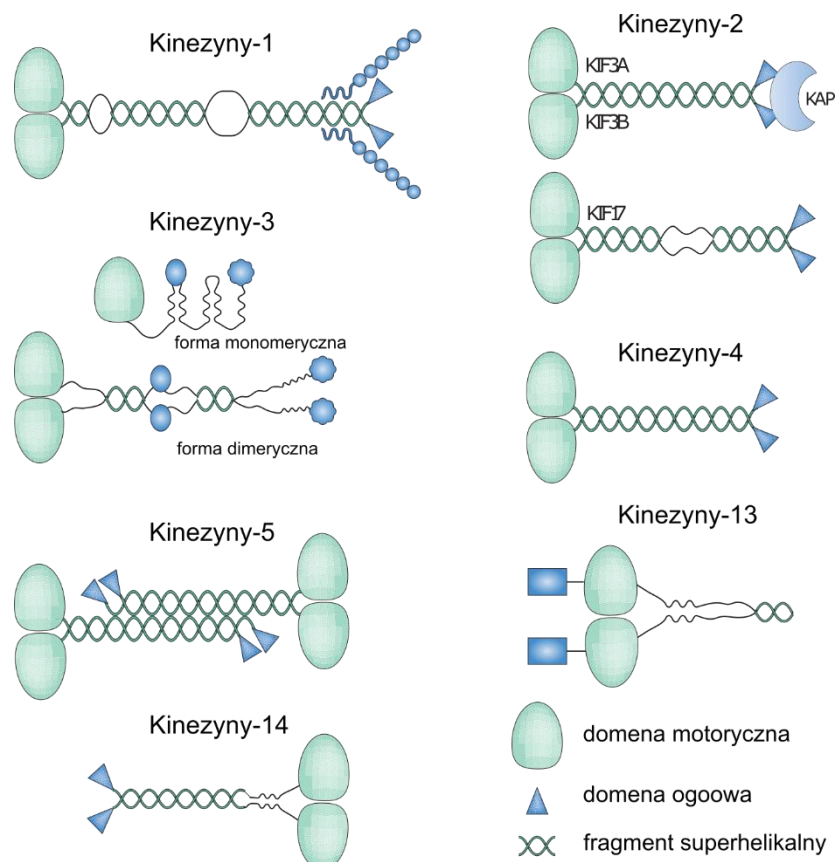
Ryc. 1.5. Przechodzenie pomiędzy stanem aktywnym a autoinhibicji na przykładzie kinezyzny-1. Zmodyfikowano wg Cai i in. 2007.

Tabela 1.1. Przedstawiciele rodziny kinezyn w genomie człowieka.

Rodzina	Przedstawiciele	Charakterystyka
N-kinezyzny		
Kinezyzny-1	KIF5A KIF5B KIF5C	Konwencjonalne kinezyzny; Kluczowe w transporcie aksonalnym; odpowiedzialne również za przesuwanie fragmentów mikrotubul względem siebie
Kinezyzny-2	KIF3A KIF3B KIF3C KIF17	Tworzą heterodimery w formie: KIF3A-3B oraz KIF3A-3C, często razem białkiem KAP3; kluczowe w transporcie rzęskowym; KIF3A/3B istotne w ścieżce Hedgehog (Hh)

Kinezyzny-3	KIF1A KIF1B KIF1C KIF13A KIF13B KIF14 KIF16A KIF16B	KIF1A-C w formie wolnej występują jako monomery; białko KBP działa jako ich inhibitor; ważne w transporcie aksonalnym;
Kinezyzny-4	KIF4A KIF4B KIF7 KIF21A KIF21B KIF27	KIF4A zaangażowane w organizację wrzeciona podziałowego, istotne w dojrzewaniu neuronów; KIF21A oraz KIF21B zaangażowane w transport aksonalny i dendrytyczny; KIF7 podobnie jak KIF3A/3B istotne w aktywacji ścieżki Hedgehog (Hh);
Kinezyzny-5	KIF11 (eg5)	Tworzy antyrównoległe heterotetramery; wrażliwe na monastrol; wspomaga poprawną utrzymanie orientacji mikrotubul w aksonie i dendrytach; „hamulec” spowalniający wydłużanie mikrotubul;
Kinezyzny-6	KIF20A KIF20B KIF23	KIF20A (Rabkinesin-6) jest specyficznym motorem pęcherzyków związanych z Rab6;
Kinezyzny-7	KIF10	Znany też jako białko E związane z centrosomem (CENP-E, <i>ang. Centromere-associated protein E</i>); kluczowe przy organizacji wrzeciona podziałowego;
Kinezyzny-8	KIF18A KIF18B KIF19A KIF19B	Organizacja wrzeciona podziałowego; depolimeryzacja mikrotubul na „+” końcu (KIF8A);
Kinezyzny-9	KIF6 KIF9	Utrzymanie prawidłowej budowy rzęsek;
Kinezyzny-10	KIF22	Organizacja wrzeciona podziałowego; pozycjonowanie chromosomów;

Kinezy-11	KIF26A KIF26B	Prawdopodobnie nieruchome; Istotne w ścieżce sygnałowej Wnt; Onkogeny w wielu typach nowotworów;
Kinezy-12	KIF12 KIF15	Organizacja wrzeciona podziałowego; regulacja dynamiki i sieciowania mikrotubul;
M-kinezy		
Kinezy-13	KIF2A KIF2B KIF2C KIF24	Brak możliwości ruchu; Charakterystyczną cechą jest zdolność do aktywnej depolimeryzacji mikrotubul
C-kinezy		
Kinezy-14A	KIFC1	Poruszają się w kierunku końca „-” mikrotubul; organizacja wrzeciona podziałowego
Kinezy-14B	KIFC2 KIFC3 KIF25	



Ryc. 1.6. Różnice w budowie kinezyn należących do różnych rodzin. Rodzina kinezyn-1 (konwencjonalna) składa się z dwóch łańcuchów ciężkich, oraz zazwyczaj dwóch łańcuchów lekkich

uczestniczących w wiązaniu ładunków, jednak niekoniecznych do ruchu. W skład rodziny Kinezy-2 wchodzi zarówno heterodimeryczne KIF3A/3B/3C, jak i homodimeryczna KIF17. Kinezy-3 mogą funkcjonować zarówno jako monomery, jak i homodimery. Przedstawiciel kinezyn-5, KIF11 tworzy homotetramer, mogący jednocześnie oddziaływać z dwiema naprzeciwlegle ułożonymi mikrotubulami. Kinezy-13 posiadają domenę motoryczną zlokalizowaną pośrodku sekwencji, co uniemożliwia im ruch, ale stało się podstawą ich zdolności do depolimeryzacji mikrotubul. W przeciwieństwie do pozostałych kinezyn, przedstawiciele rodziny-14 posiadają domenę motoryczną zlokalizowaną na końcu karboksylowym, co skutkuje odwrotnym kierunkiem ich ruchu (do „-” końca mikrotubuli) w stosunku do pozostałych kinezyn. Zmodyfikowano wg Verhey i Hammond 2009.

1.2.2 Kinezy w transporcie aksonalnym

Jak już wspomniano, cały transport mikrotubularny w kierunku „plus” końca odbywa się za pośrednictwem kinezyn. W przypadku aksonu, gdzie mikrotubule ułożone są w stałej orientacji, kinezy odpowiadają za transport od ciała komórki do kolbki presynaptycznej (ang. *synaptic button*) na końcu aksonu. Na moment pisania tej pracy, tylko białka należące do czterech pierwszych rodzin kinezyn (kinezy-1 do 4) zostały zidentyfikowane jako pełniące funkcje transportowe w aksonie (Guedes-Dias i Holzbaur 2019). Transport aksonalny, jest tradycyjnie w literaturze dzielony na szybki (50 – 200 mm / dzień), który dotyczy ładunków związanych z błonami pęcherzyków oraz wolny (0,2 – 10 mm / dzień) odpowiedzialny za transport rozpuszczalnych białek i elementów cytoszkieletu (Roy 2014). Przykładami ładunków przenoszonych na drodze wolnego transportu są elementy cytoszkieletu. KIF5A (kinezy-1) odpowiada za dostarczenie rosnącemu aksonowi neurofilamentów (Xia i in. 2003). Innym przykładem wolnego transportu jest postępowy transport krótkich fragmentów mikrotubul, jednak która rodzina kinezyn za niego odpowiada pozostaje niejasne (Wang i Brown 2002; Baas, Vidya Nadar, i Myers 2006; Roy 2014). Wiadomo jednak, że kinezy-1 potrafią przesuwając względem siebie krótkie mikrotubule umożliwiając ich umieszczenie we wzgórku aksonu (Jolly i in. 2010).

W przypadku transportu szybkiego, najszerzej w literaturze opisany jest transport aksonalny zależny od białek rodzin kinezyn-1 oraz kinezyn-3. Z tej pierwszej głównie dotyczy to KIF5A oraz KIF5B, zaś z drugiej KIF1A i KIF1B. Funkcje transportowe prowadzone przez obie te rodziny są w dużej mierze zbieżne, świadcząc na pozór o nadmiarowości w transporcie aksonalnym. Jednakże członkowie obu rodzin różnią się preferencjami co do mikrotubul oraz mechanizmami regulacji. Jak wspomniano już w poprzednim podrozdziale, kinezy-3 cechują się znacznie większym (nawet 250-krotnym, (Atherton i in. 2014) powinowactwem do mikrotubul, co umożliwia im dłuższy ruch bez przerw. Jednakże kinezy-3 są wrażliwe na inhibicję na skutek wiązania z białko wiążące kinezy (KBP, ang. *kinesin binding protein*), podczas gdy kinezy-1 nie (Kevenaar i in. 2016). Często opisywany w literaturze jest też fakt, preferencji białek z rodziny kinezyn-1 do wiązania się z stabilną, acetylowaną tubuliną, podczas gdy kinezy-3 nie wykazują takich różnic (D. Cai i in. 2009). Również interpretacja „kodu” białek MAP może być źródłem precyzyjnej kontroli ruchu. Podczas gdy białko tau stanowi przeszkodę skutkującą odłączeniem się wszystkich kinezyn (Dixit i in. 2008), MAP7 utrudnia

wiązanie kinezy-3 jednocześnie promując przyłączanie kinezy-1 (Monroy i in. 2018), zaś MAP9 odwrotnie – sprzyja wiązaniu kinezy-3 (Monroy i in. 2020). Co ciekawe, również obecność GTP- β -tubuliny w protofilamentach może selektywnie wpływać na powinowactwo kinezy. KIF1A wykazuje się znacznie słabszym wiązaniem do takiej formy, co skutkuje jego łatwiejszym odłączeniem po dotarciu do krańca mikrotubuli, gdzie często znajduje się czapeczka-GTP (Guedes-Dias i in. 2019). Tym samym prowadzenie tych samych ładunków przez różnie kontrolowane motory, może stanowić istotną część selektywnego transportu. Jednocześnie jednak tego typu różnice przyczyniają się do pewnej nadmiarowości w obrębie rodziny kinezy, gdzie pomimo zaistnienia warunków niekorzystnych dla efektywności jeden rodziny np. zmiany modyfikacji mikrotubul, inna rodzina jest w stanie przejąć jej funkcje. Stanowi też to pewne wyzwanie w badaniach nad tą grupą białek, gdyż nawet całkowite wyeliminowanie jednego z motorów może nie wpłynąć na zmianę fenotypu (Goldstein 1991; Kalantari i Filges 2020).

Do ładunków transportowanych przez rodziny kinezy-1 oraz kinezy-3 należą między innymi prekursorzy pęcherzyków synaptycznych (ang. *synaptic vesicle precursor*, SVPs) (Okada i in. 1995), (Q. Cai, Pan, i Sheng 2007) zawierające składniki konieczne do utrzymania funkcjonalności synaps. Dla kinezy-3 zidentyfikowanymi adaptorami tych ładunków są lipryna- α (Miller i in. 2005) oraz DENN/MADD (ang. *MAP kinase-activating death domain protein*) dla pęcherzyków związanych z Rab3 (Niwa, Tanaka, i Hirokawa 2008). Innym ładunkiem są gęste pęcherzyki (DCV, ang. *dense-core vesicles*) będących nośnikami monoamin, neuropeptydów sygnałowych oraz miRNA. W ich transporcie dobrze udokumentowana jest rola KIF1A (kinezy-3) (Lo i in. 2011), ale powiązано z nimi również kinezy-1 (Lim, Rechtsteiner, i Saxton 2017). Warto w tym miejscu nadmienić, że w niektórych typach neuronów oprócz synaps obecnych na końcach rozgałęzień aksonu, kolbki synaptyczne mogą się również tworzyć na jego długości, takie synapsy nazywa się *en passant* (Parato i Bartolini 2021), co sprawia, że ładunek niesiony przez kinezy niekiedy musi zostać odłączony przed dotarciem do wierzchołka aksonu (Guedes-Dias i Holzbaur 2019).

Ze względu na dużą aktywność metaboliczną szczególnie w rejonie synapsy, w aksonie konieczna jest obecność sprawnych mitochondriów. Około połowa z nich obecna jest w przestrzeni presynaptycznej, gdzie zostają zakotwiczone przez białko syntafilinę (Chen i Sheng 2013). Transport tych organelli z ciała komórki odbywa się preferencyjnie przez kinezy-1 (van Spronsen i in. 2013). Istnieją przesłanki o zaangażowaniu również KIF1B w ten proces, aczkolwiek, nawet jeżeli białka z rodziny kinezy-3 mogą transportować mitochondria, ich rola nie jest niezbędna w tym procesie (Zhao i in. 2001). Wiązanie się kinezy do mitochondriów zachodzi dzięki silnie konserwowanemu w królestwie zwierząt mechanizmowi tworzonemu przez dwa białka adaptorowe, TRAK (znany również jako Milton) oraz Miro (van Spronsen i in. 2013). TRAK działa jako adaptor wiążący się bezpośrednio z łańcuchem ciężkim kinezy oraz Miro, które z kolei zakotwicza się w błonie mitochondrium. Jednocześnie Miro jest również wrażliwe na obecność jonów wapnia, których wiązanie skutkuje zmianą konformacyjną i zatrzymaniem transportu (X. Wang i Schwarz 2009).

Kolejnym istotnym ładunkiem podróżującym postępowo wzdłuż aksonu, są lizosomy/późne endosomy, których wspólnym markerem jest białko związane z błoną lizosomalną 1 (ang. *lysosomal-associated membrane protein 1*, LAMP1) (Ferguson 2018). Ma to kluczowe znaczenie w procesie degradacji i recyklingu zużytych fragmentów synaps, jako że lizosomy wychodzą niejako „naprzeciw” powstającym w dalszych końcach autofagosomom. W momencie kontaktu może dojść do fuzji tych dwóch organelli i utworzenia autofagolizosomu, który następnie zostaje przetransportowany przez dyneinę z powrotem do ciała komórki dojrzewając w trakcie tej podróży (Maday, Wallace, i Holzbaur 2012). Zdają się to potwierdzać badania wskazujące, na niską kolokalizację markerów lizosomalnych, takich jak LAMP1 oraz zabarwienia przez LysoTracker™ pęcherzyków znajdujących się w pobliżu przestrzeni presynaptycznej. Natomiast gęstość pęcherzyków pozytywnych dla obu tych sygnałów, rośnie w miarę zbliżania się do ciała komórki (Maday, Wallace, i Holzbaur 2012). W literaturze można znaleźć liczne doniesienia o zaangażowaniu kinezy-1 w dostarczanie lizosomów do dalszych fragmentów aksonu, czemu najprawdopodobniej pośredniczy kompleks (Rosa-Ferreira i Munro 2011; W. Du i in. 2016). Jednocześnie pojawiają się również doniesienia o pełnieniu tej funkcji przez kinezy-2 (dokładniej KIF3A, KIF3B, KIF3C), jednakże ich rola jest dużo słabiej poznana (Hendricks i in. 2010; Brown i in. 2005). Co ciekawe, mimo wypadkowego ruchu autofagosomów w kierunku ciała komórki, w ich transport zaangażowane są również kinezy-1. Objawia się to licznymi przerwami w podróży autofagosomów wzdłuż aksonu i okazjonalnymi ruchami z powrotem w kierunku „plus” końca. Z jednej strony może to być przejaw „przeciągania liny” pomiędzy dyneinami i kinezynami, z drugiej może zaś odpowiadać za precyzyjny mechanizm ich poprawnego ustawienia na mikrotubulach. Kluczową rolę w tym procesie zdaje się odgrywać białko adaptorowe JIP1, którego aktywacja skutkuje inhibicją kinezy-1 i zwiększeniem transportu do ciała komórki. Eksperymentalnie potwierdza to wynik, w którym zablokowanie syntezy JIP1 skutkowało utrudnieniem opuszczania przez autofagosomy wierzchołków aksonów (Fu, Nirschl, i Holzbaur 2014). Należy tu dodać, że samo dostarczenie swojego konkurenta w postaci dyneiny do końcowych odcinków aksonu jest jedną z funkcji kinezy-1 (Twelvetrees i in. 2016).

Jak opisano w poprzednim podrozdziale, mRNA przeznaczone do lokalnej translacji, musi zostać dostarczone do odległych obszarów aksonu. Jest ono również transportowane przez kinezy-1 wewnątrz specjalnych granul, zawierających oprócz RNA wiele wspomagających białek (Kanai, Dohmae, i Hirokawa 2004). Dodatkowo wykazano również transport niektórych białek samego rybosomu przez KIF4A (kinezy-4) w aksonie (Bisbal i in. 2009).

Transport zależny od kinezyn ma również znaczenie dla dojrzewania aksonu. Należące do kinezyn-3 KIF13B (nazywany dawniej GAKIN) zostało opisane jako odpowiedzialny za transport PIP₃. Przyniesione badanie sugeruje również, że jego dostarczenie do wierzchołka najdłuższego neurytu w dojrzewającym neuronie, ma udział w specjalizacji do aksonu (Horiguchi i in. 2006). Podobnie KIF3A (kinezy-2) odpowiada za akumulację PAR-3 na końcu rosnącego aksonu, co również odgrywa istotną rolę w polaryzacji neuronu (Nishimura i in. 2004). Natomiast KIF4A, przedstawiciel kinezyn-4,

transportuje integrynę $\beta 1$ do młodego aksonu, której obecność jest istotna dla jego oddziaływania z obecną w macierzy zewnątrzkomórkowej lamininą i w konsekwencji sprawnego wydłużania (Heintz i in. 2014). Podobnie ta sama kinezyzna została powiązana z transportem pęcherzyków zawierających transbłonowe białko L1, będące jednym z kluczowych czynników adhezji, koniecznym dla prawidłowego prowadzenia aksonu (Peretti i in. 2000).

1.2.3 Kinezyzny w transporcie dendrytycznym

Ze względu na bardziej złożony układ mikrotubul, badanie transportu w dendrytach stanowi znacznie większe wyzwanie niż aksonalnego. Jednocześnie warto podkreślić, że opisana skomplikowana nawigacja w mieszanej orientacji mikrotubul, dotyczy ssaczych neuronów. W innych szeroko stosowanych w biologii molekularnej modelach, jak muszka owocowa czy nicienie *C. elegans* ułożenie mikrotubul w dendrytach odbiega od tego u kręgowców (Tempes i in. 2020), stąd badania nawet wysoce homologicznych kinezyzn, w różnych modelach, mogą dawać niespójne rezultaty. Przez długi czas pozostawało niejasne, które kinezyzny aktywnie lokalizują się do dendrytów w ssaczych neuronach, a które są jedynie biernie transportowane przez inne motory, w tym również dyneinę, która w początkowych odcinkach dendrytów może prowadzić transport postępowy (Kapitein i in. 2010).

Badania Lipki i wsp. rzuciły na tę kwestię światło, wskazując jedynie niektórych przedstawicieli kinezyzn-3 (KIF1A, KIF3B, KIFC) oraz kinezyzn-4 (KIF21A, KIF21B) jako zdolnych do aktywnego transportu do dendrytów (Lipka i in. 2016). We wspomnianym badaniu wykorzystano jednoczesną produkcję fuzyjnego białka PEX-RFP-FKBP, zawierającego sekwencję kierującą do peroksysomów (PEX), białko czerwonej fluorescencji (RFP) oraz domenę FKBP12 (ang. *FK506 binding protein*), wraz ze zmodyfikowanymi kinezyznami zawierającymi domenę FRB (ang. *FKBP12-rapamycin binding domain*). Po dodaniu rapalogu, domeny FRB oraz FKBP12 ulegają związaniu, umożliwiając śledzenie ruchu motorów na podstawie sygnały fluorescencyjnego (system opisany w [Kapitein i in. 2010](#)). Wśród wymienionych kinezyzn zwraca uwagę brak głównego motoru odpowiedzialnego za aktywny transport w aksonach, czyli konwencjonalnej kinezyzny-1. Może to być związane z preferencją tego motoru do acetylowanej tubuliny, która jest ubogo reprezentowana w dendrytach. W cytowanym badaniu jednak, wykorzystano skrócone formy kinezyzn, w celu uniknięcia zjawiska autoinhibicji. Konsekwencją jest ich niezdolność do wiązania ładunków. Tym samym o ile wydaje się, że sama domena motoryczna kinezyzn-1 unika lokalizacji do dendrytów, inne badania sugerują, że po związaniu z odpowiednim ładunkiem kinezyzny-1 są zdolne do transportu do tego przedziału (Setou i in. 2002). Jednocześnie wiele doniesień na temat transportu dendrytycznego przez kinezyzny-1 cytowanych w literaturze przeglądowej, pochodzi z badań nad bezkręgowcami, a nie ssakami (Kelliher i in. 2018; Yan i in. 2013; Hoerndli i in. 2013).

W jaki dokładnie sposób kinezyzny odróżniają, które ładunki mają trafić do aksonu, a które do dendrytów pozostaje intensywnie badanym tematem. Oprócz wspomnianych modyfikacji potranslacyjnych samej tubuliny, duże znaczenie w sterowaniu ruchem motorów zdają się mieć białka

MAP, jak np. DCLK1 (ang. *doublecortin like kinase 1*) zaangażowane w kierowanie kinezy-3 do dendrytów (Lipka i in. 2016). Za mechanizm rozpoznawania białek związanych z mikrotubulami przez kinezy, przynajmniej częściowo mogą odpowiadać różnice w budowie domeny motorycznej. Huang i wsp. wykazali, że podmiana metodami inżynierii genetycznej 12-stej pętli z KIF5A na analogiczną z KIF1A skutkuje utratą przez te pierwszą preferencji względem aksonu (C. Huang i Banker 2012). Wypadkowo za regulację transportu odpowiadają zarówno modyfikacje mikrotubul oraz związane z nimi białka, jak i same ładunki kinezy i ich adaptory (Nabb, Frank, i Bentley 2020).

Część transportowanych w dendrytach ładunków pokrywa się z tymi aksonalnymi, wliczając mitochondria (Zinsmaier, Babic, i Russo 2009), DSV (Lipka i in. 2016) czy mRNA (Hirokawa 2006). Inne jednak, są ściśle związane z funkcją dendrytów jako miejsca odbierania sygnałów i są składnikami synapsy. Do najważniejszych należą liczne podjednostki receptorów wiążących chemiczne sygnały w synapsach. Te najlepiej opisane wymieniono w Tabeli 2.2.

Tabela 1.2. Przykłady podjednostek receptorów transportowanych przez kinezy w dendrytach.

Kinezyzna	Receptor	Adaptor (jeśli znany)	Źródło
KIF17 (kinezy-2)	Podjednostka N2RB receptora NMDA	-	(Yin i in. 2011)
KIF21B (kinezy-4)	Podjednostka γ 2 receptora GABA	TRIM3	(Labonté, Thies, i Kneussel 2014)
KIF5A oraz KIF5C (kinezy-1)	AMPA	protrudyna	(Brachet i in. 2021)
KIF13A (kinezy-3)	AMPA	centauryna- α 1	(Gutiérrez i in. 2021)

Kinezy-2 są również odpowiedzialne za transport kadheryn (Teng i in. 2005) oraz β -kateniny (Liang i in. 2020) - białek mających kluczowe znaczenie w adhezji komórek, ich oddziaływań pomiędzy sobą oraz rozwoju drzewka dendrytycznego. (Tan i in. 2010). Jednakże na moment pisania tej pracy nie wykazano bezpośredniego transportu kadheryn przez KIF3 w dendrytach.

Z kolei badania Ghiretti i wsp. powiązały KIF21B (kinezy-4) z transportem sygnałowych endosomów zawierających receptor TrkB po związaniu z BDNF w kierunku ciała komórki (Ghiretti i in. 2016). Niedawno inna grupa również potwierdziła to zjawisko (Ganchala i in. 2023). Jest to o tyle interesujące, że taki model transportu dla tego ładunku został opisany wielokrotnie jako pełniony przez dyneinę (Liot i in. 2013; Ayloo i in. 2017). Może to być jednak zrozumiałe biorąc pod uwagę mieszaną orientację mikrotubul w dendrytach. W cytowanej pracy Ghiretti i wsp. sugerują współpracę tych dwóch motorów w nawigowaniu w skomplikowanym środowisku dendrytu. Co więcej autorzy sugerują, że to dyneina jest wiodącym motorem w tym ruchu, jako że pęcherzyki TrkB/BDNF poruszają się szybciej

niż KIF21B w jakichkolwiek innych warunkach (Ghiretti i in. 2016). Stanowiłoby to ciekawy przykład współpracy dwóch odwrotnie zorientowanych motorów, w prowadzeniu ładunku we wspólnym kierunku.

1.2.4 Wybrane niekanoniczne funkcje kinezyn

Obszerność rodziny kinezyn, z których większość powstała na skutek duplikacji istniejących genów (paralogi) pozwoliła na silną specjalizację poszczególnych jej członków (Wickstead, Gull, i Richards 2010). Podczas gdy w wielu sytuacjach te same ładunki mogą być transportowane przez różne motory (punkt 1.2.2 oraz 1.2.3), w innych interakcja wymaga na tyle specyficznych oddziaływań, że mogą je pełnić tylko wyspecjalizowane białka. Co więcej, specjalizacja niektórych kinezyn zaszła tak daleko, że oprócz udziału w transporcie komórkowym, nabyły one nowe funkcje, niezwiązane bezpośrednio z przenoszeniem ładunku wzdłuż mikrotubul, stąd bywają one określane mianem niekanonicznych. Niektóre z nich pełnione są przez nie równoległe ze swoją rolą w transporcie (KIF3A, KIF21B), zaś w przypadku innych kinezyn są ich wiodącą aktywnością (KIF2C, KIF11). W niniejszym podrozdziale zostały opisane wybrane z nich.

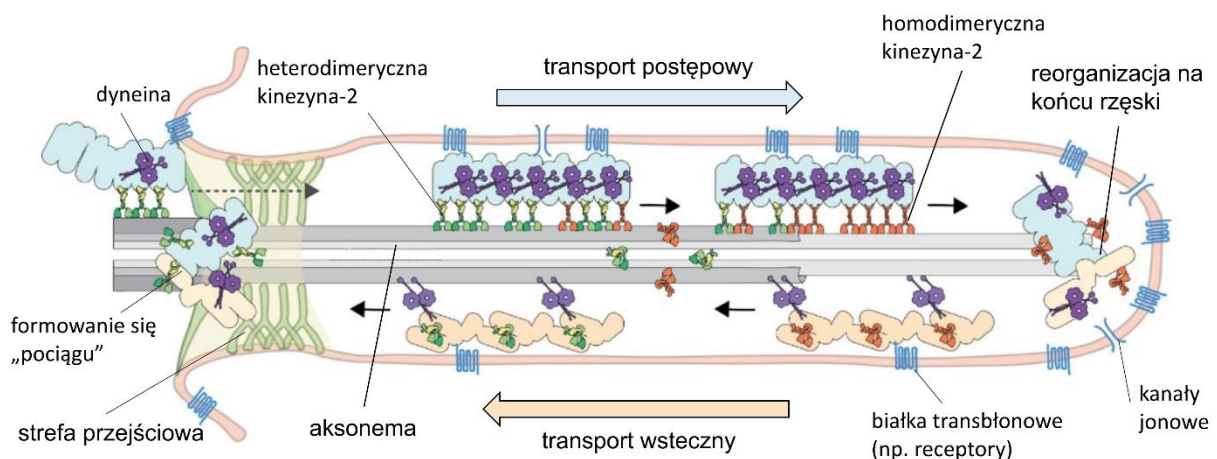
Kinezyny-1

Konwencjonalne kinezyny z rodziny pierwszej, oprócz licznych opisanych w poprzednich podrozdziałach funkcji transportowych, pełnią również dodatkową rolę w organizacji cytoszkieletu. Wynika to z faktu, że oprócz domeny motorycznej, również domena ogona na końcu karboksylowym jest w stanie wiązać się do mikrotubul. Taki układ, umożliwia kinezynie-1 przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie, wiążąc się do każdej przeciwnym końcem (Jolly i Gelfand 2010). Zjawisko to zostało wskazane jako istotne zarówno w rozwoju aksonu, jak i w jego regeneracji na skutek uszkodzeń, jednakże większość wyników na ten temat pochodzi z badań w modelach bezkręgowców takich jak muszka owocowa ; He i in., 2020).

Kinezyny-2

W obrębie rodziny kinezyn-2, można rozróżnić te tworzące heterodimery KIF3A, KIF3B i KIF3C (co zostało opisane w punkcie 1.2.1.) oraz homodimer KIF17. Rodzina ta, jest szeroko opisywana w literaturze ze względu na swoją rolę w rozwoju i utrzymaniu rzęsek. Jak opisano w punkcie 1.1.3, wzdłuż całej rzęski rozlokowane są liczne receptory i kanały jonowe, które muszą zostać tam dostarczone, oraz wymagają wymiany na nowe w miarę zużycia. Podobnie nowe dimery α i β -tubuliny wydłużające „plus” koniec w trakcie wzrostu. Co więcej, białka efektorowe niektórych szlaków sygnałowych potrzebują translokacji do rzęski w celu aktywacji. Jednocześnie, przy granicy błony komórki i błony rzęski, występuje tzw. strefa przejściowa (ang. *transition zone*) zawierająca składające się z szeregu białek, gęsto upakowane włókna, które utrudniają swobodną dyfuzję w obu kierunkach (Gonçalves i Pelletier 2017). Tym samym, za wprowadzanie, wyprowadzanie ładunków z rzęski jak i

utrzymanie samych mikrotubul odpowiada tzw. transport wewnątrzrzęskowy (ang. *intraflagellar transport*, IFT). Pomimo pewnych podobieństw, transport ten jest jednak w znacznym stopniu odmiennym od aksonalnego czy dendrytycznego. Ładunki wewnątrz rzęski transportowane są w postaci dużych kompleksów białkowych nazywanych powszechnie w literaturze „pociągami IFT” (ang. *IFT trains*). Owe „pociągi” zbudowane są z dwóch dużych kompleksów białek: IFT-A oraz IFT-B, do których wiążą się ładunki. Za ich transport w kierunku ciała komórki odpowiada dyneina za pośrednictwem adaptora TULP3 (ang. *Tubby-related protein 3*), zaś do czubka rzęski przenoszą je właśnie kinezy-2. Uczestniczą w tym zarówno heterodimeryczne KIF3A/KIF3B, KIF3A/KIF3C, jak i homodimery KIF17. Co ważne, mimo iż kompleksy transportowane w obie strony składają się z tego samego zestawu białek, ich struktura i ułożenie względem siebie jest różne, zależnie czy transportowane są postępowo czy wstecznie (Webb, Mukhopadhyay, i Roberts 2020). Co więcej, transport rzęskowy zdaje się być precyzyjnie zorganizowany. Nie występuje tu „przeciąganie liny” pomiędzy odwrotnie zorientowanymi motorami, jak ma to miejsce w dendrytach i aksonie (Mul, Mitra, i Peterman 2022). „Pociągi” IFT tworzą się u podstawy rzęski, gdzie następnie przekraczają strefę przejściową transportowane przez kinezy, podczas gdy dyneina pozostaje z nimi związana jako bierny ładunek. Po dotarciu do wierzchołka, następuje przebudowanie kompleksów i to kinezy stają się biernym ładunkiem dla dyneiny. Dokładny mechanizm reorganizacji kompleksów i zmiany motorów wciąż pozostaje tematem intensywnych badań, jednak pewien udział mogą w tym mieć kinazy, jak CILK1 (ang. *ciliogenesis associated kinase*), która po dotarciu do czubka rzęski fosforyluje kinezy (Chaya i in. 2014). Inni autorzy natomiast donoszą, jakoby fakt dotarcia do końca mikrotubul był wystarczający do rearanżacji transportu (Nievergelt i in. 2022). Kluczowe znaczenie kinezyn jak i samego transportu dla utrzymania rzęski, potwierdzają eksperymenty, w których pozbawienie komórek ekspresji genu *KIF3A* skutkuje ich całkowitym zanikiem. Indukowanie takiego fenotypu jest często wykorzystywane jako model badania ciliopatii (Quinlan, Tobin, i Beales 2008). KIF17 pozostając zaangażowane w transport, zdaje się nie być kluczowe dla samego rozwoju i obecności rzęski (Funabashi i in. 2017). Oprócz utrzymania rzęsek, kinezy odpowiadają również za transport ładunków koniecznych dla pełnienia przez nie funkcji sygnałowych. Jako przykład można wymienić transport opsyn w rzęsce fotoreceptorów siatkówki (Marszałek i in. 2000), czy wspomnianych już białek efektorowych GLI w ścieżce Shh (Carpenter i in. 2015).



Ryc. 1.7. Transport wewnątrzrzęskowy (IFT). Zarówno rozpuszczalne (np. fragmenty mikrotubul), jak i nierozpuszczalne (np. białka transbłonowe) ładunki są transportowane w postaci długich „pociągów” zbudowanych z białkowych kompleksów IFT-A oraz IFT-B. Formują się one przy podstawie rzęski, skąd przechodząc przez strefę przejściową, transportowane są przez kinezy-2 do wierzchołka. Po dotarciu do celu, następuje reorganizacja kompleksów, a ładunki przeznaczone do ciała komórki zostają przetransportowane przez dyneinę. Zmodyfikowano wg Mul, Mitra, i Peterman 2022.

Kinezy-4

KIF4A należąca do kinezyn-4, oprócz transportu, pełni również funkcje zależnej od aktywności neuronalnej kontroli apoptozy młodych neuronów w dojrzewającym mózgu. Odbywa się to poprzez czynnik transkrypcyjny poli-[ADP-rybozo] polimeraza (PARP1, ang. *Poly [ADP-ribose] polymerase*), którego aktywacja m.in. chroni komórki przed wejściem w apoptozę. Znajdujący się również w jądrze KIF4A łączy się z PARP1 przy pomocy domeny na końcu karboksylowym, a w efekcie hamuje jego działanie. Na skutek aktywności neuronalnej, kiedy dochodzi do pojawienia się jonów wapnia, kinaza zależna od kalmoduliny-2 (CaMKII) inicjuje odłączenie KIF4A od PARP1, co przywraca jego funkcjonalność. Co więcej, rozbitcie kompleksu, skutkuje opuszczeniem przez KIF4A jądra komórkowego, a następnie oddaleniem się wzdłuż mikrotubul do neurytów, co zapobiega jego ponownemu związaniu z PARP1 (Midorikawa, Takei, i Hirokawa 2006). Szeroko cytowane w literaturze są również prace opisujące zdolność Xklp1 (ang. *Xenopus kinesin-like protein 1*) będącego homologiem KIF4 u *Xenopus laevis* do hamowania dynamiki mikrotubul, rozumianej jako zmniejszanie zarówno tempa wzrostu, jak i liczby katastrof (Bieling, Telley, i Surrey 2010) (Bringmann i in. 2004). Również inni przedstawiciele rodziny kinezyn-4 oprócz funkcji transportowych zdają się regulować dynamikę mikrotubul. KIF21A została opisana jako kinezyzna wiążąca się do końców i analogicznie jak Xklp1 hamująca ich przemiany (van der Vaart i in. 2013). Blisko z nią spokrewniona kinezyzna KIF21B, została już wspomniana w poprzednim podrozdziale jako kluczowy motor dendrytyczny. Jednocześnie i ona posiada wpływ na dynamikę mikrotubul, jednakże w przeciwieństwie do siostrzanej KIF21A zamiast blokować zarówno wzrost, jak i skracanie, jej obecność na „plus” końcu mikrotubuli zdaje się

indukować katastrofy. Sugerowany mechanizm polega na hamowaniu wzrostu jedynie pojedynczych protofilamentów, co skutkowałoby zaburzeniem budowy na końcu mikrotubuli, a w konsekwencji jej rozpadem. Co ciekawe, za tę aktywność odpowiada nie domena motoryczna, a zlokalizowana na drugim końcu łańcucha polipeptydowego domena zawierająca powtórzenia WD40. (van Riel i in. 2017). Warto wspomnieć, że istnieją badania, które sugerują, że to aktywność neuronalna odpowiada za „przełączanie” pomiędzy funkcjami transportowymi KIF21B, a tymi regulującymi dynamikę mikrotubul (Ghiretti i in. 2016). Dodatkowo Muhia i wsp. wykazali, że brak KIF21B skutkuje zaburzeniem rozwoju kolców dendrytycznych (Muhia i in. 2016). Możliwe, że jest to związane z jego rolą w regulacji dynamiki mikrotubul. Mimo iż kolce dendrytyczne buduje aktywna, to do zmian ich morfologii związanych z aktywnością neuronalną konieczna jest przejściowa penetracja przez rosnące mikrotubule (Jaworski i in. 2009).

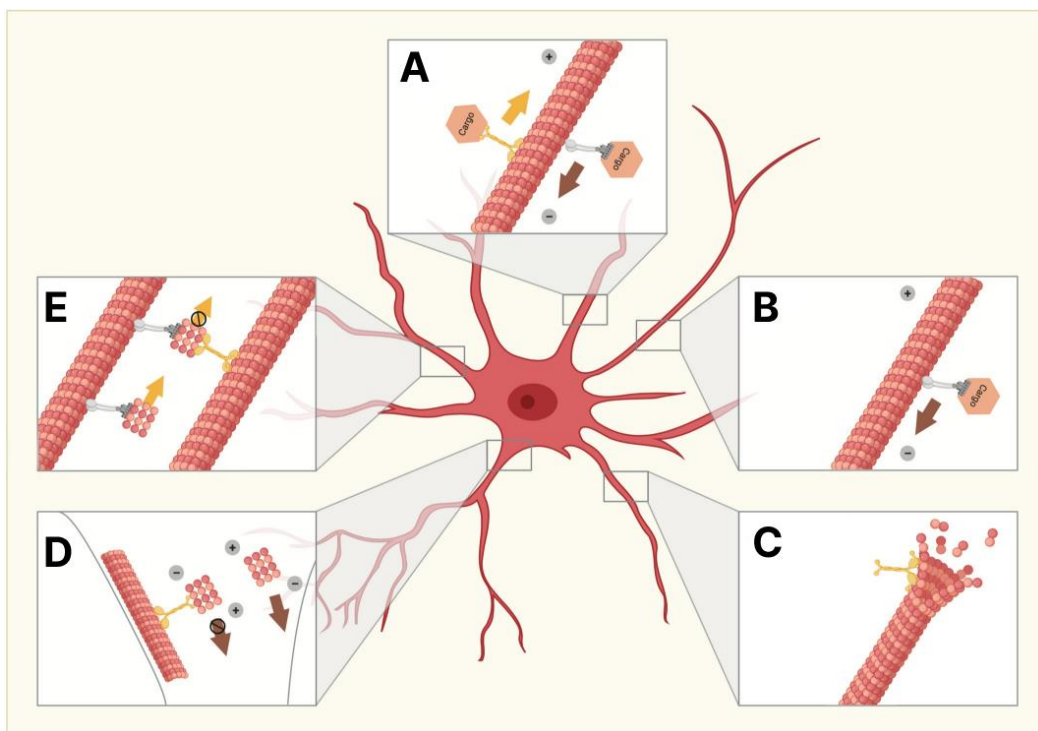
Co ciekawe KIF7 będące również przedstawicielem rodziny-4 jest podobnie jak członkowie rodziny-2 (KIF3A, KIF3B) zaangażowane w aktywację ścieżki Shh. KIF7 gromadzi się w końcówce rzęski, gdzie jego obecność wydaje się kluczowa dla aktywacji białek GLI, aczkolwiek dokładny mechanizm tej aktywacji pozostaje niejasny (Yue i in. 2022). Jest to o tyle interesujące, że KIF7 powszechnie jest uważane za niezdolne do aktywnego ruchu po mikrotubulach (Yue i in. 2018; M. He i in. 2014). Być może więc, zostaje przetransportowane do czubka rzęski przez inne motory.

Kinezy-5

Kolejną kinezyną szeroko badaną ze względu na swoje niekanoniczne funkcje jest należąca do rodziny 5, KIF11 (eg5). Została ona wspomniana w punkcie 1.2.1 ze względu na swoją nietypową budowę w postaci homotetrameru, z dwiema parami domen motorycznych ustawionych antyrównolegle. Podczas gdy KIF11 jest zdolny do ruchu wzdłuż mikrotubul, jest bardzo wolnym motorem, (nawet około 100 wolniejszym od dyneiny) w efekcie spowalniając inne kinezy z związane do tego samego ładunku. Jego specyficzna budowa natomiast, umożliwia oddziaływanie z dwiema mikrotubulami jednocześnie, a w konsekwencji przesuwanie ich względem siebie (Kapitein i in. 2005). Odgrywa to istotną rolę w rozwoju neuronu. Badania Meyers i wsp. wykazały, że KIF11 jest kluczowy dla prawidłowego rozwoju aksonu, jednakże jego zahamowanie nie skutkuje inhibicją tego procesu jak większość przytoczonych wcześniej przykładów, a jego przyśpieszeniem. Aksony neuronów pozbawionych KIF11 zdają się także nie ulegać skracaniu (retrakcji) oraz nie reagują na zewnętrzne cząsteczki sygnałowe. Tworzy to w ogólnym ujęciu obraz utraty kontroli nad jego rozwojem. Podstawą tego mechanizmu, zdaje się być aktywność KIF11 jako „hamulca” transportu dłuższych fragmentów mikrotubul do aksonu przez inne motory, co pozwala na dokładniejszą regulację (Myers i Baas 2007). Jego aktywność ma również wpływ na migrację neuroprogenitorów. W tym przypadku również, jego hamujące działanie na rozwój cytoszkieletu zapewnia prawidłowe umiejscowienie komórek, zaś jego nadprodukcja skutkuje spowolnieniem migracji (Falnikar, Tole, i Baas 2011).

Kinezy-13

Jak opisano w punkcie 1.2.1 rodzina kinezy-13 nie posiada zdolności ruchu, na skutek umiejscowienia domeny motorycznej pośrodku łańcucha polipeptydowego. Zamiast tego, jej charakterystyczną cechą jest zdolność do depolimeryzacji mikrotubul (Desai i in. 1999) (Howard i Hyman 2007). Najszerzej opisanym przedstawicielem tej rodziny jest KIF2C znany również jako MCAK (ang. *mitotic centromere-associated kinesin*, mitotyczna kinezyzna związana z centromerem) (Friel i Howard 2011). Co ciekawe, KIF2C wykazuje aktywność na obu końcach mikrotubul. Dodatkowo reszty aminokwasów zawarte w domenie szyi umożliwiają wstępne związanie z mikrotubulą. W tym stanie, kinezyzna może przesuwać się w którąkolwiek stronę, aż dotrze do jednego z końców mikrotubuli. Po dotarciu tam, wiązanie staje się znacznie silniejsze, a w konsekwencji domena motoryczna powoduje wygięcie protofilamentów, co ułatwia ich pęknięcie. Hydroliza ATP jest konieczna w tym procesie, zarówno do aktywacji samego białka, jak i uwalniania kinezyzny od świeżo usuniętych dimerów tubuliny (Ritter i in. 2016). Co ważne, do jednego końca może się związać jednocześnie więcej niż jedno białko KIF2C, tym samym potęgując efekt (Oguchi i in. 2011). W neuronach aktywność ta jest kluczowa dla regulowania długości mikrotubul. Ma to również znaczenie dla neuroplastyczności i w konsekwencji zdolności uczenia się (Zheng i in. 2022).



Ryc. 1.8. Przykładowe funkcje pełnione przez kinezyzny w neuronie. **A.** Transport aksonalny/dendrytyczny w kierunku „+” końca mikrotubul pełniony przede wszystkim przez kinezyzny-1 oraz kinezyzny-2. **B.** Transport w kierunku „-” końca mikrotubul, unikalny dla rodziny kinezy-14. **C.** Aktywna depolimeryzacja mikrotubul, wspomagana przez kinezyzny-13. **D.** Transport fragmentów mikrotubul ustawionych jedynie w odpowiedniej orientacji przez kinezyzny-5. **E.** Blokowanie/spowalnianie ruchu innych motorów przez kinezyzny-5. Zmodyfikowano wg Tempes i in. 2020.

1.2.5 Wzajemna regulacja kinezyn i elementów ścieżek sygnałowych

Ze względu na istotną rolę transportu mikrotubularnego w funkcjonowaniu komórki, oraz liczne dodatkowe funkcje pełnione przez kinezyny, nie jest zaskakujące, że są one regulowane przez wiele ścieżek sygnałowych. Jednocześnie, regulacja ta bywa niekiedy dwukierunkowa. Można tu wymienić choćby rodzinę kinezyn-2 (KIF3A, KIF3B), i ich istotną rolę w transporcie rzęskowym, co jest potrzebne do wspomnianej w punkcie 1.2.3 aktywacji białek GLI2 i GLI3 w ścieżce Shh. Podobnie ścieżka PDGF zdaje się polegać na transporcie rzęskowym, choć bezpośrednia rola kinezyn (Schneider i in. 2010; Umberger i Caspari 2015). Oprócz tego kinezyny zostały powiązane ze ścieżkami: kinazy syntazy glikogenu (GSK3)(G. Morfini i in. 2004; Rathgeber i in. 2015), kaskadzie sygnałowej MAPK (Liang i Yang 2019) czy Wnt (Wei i in. 2021; Li i in. 2022, 23; Puri i in. 2021)

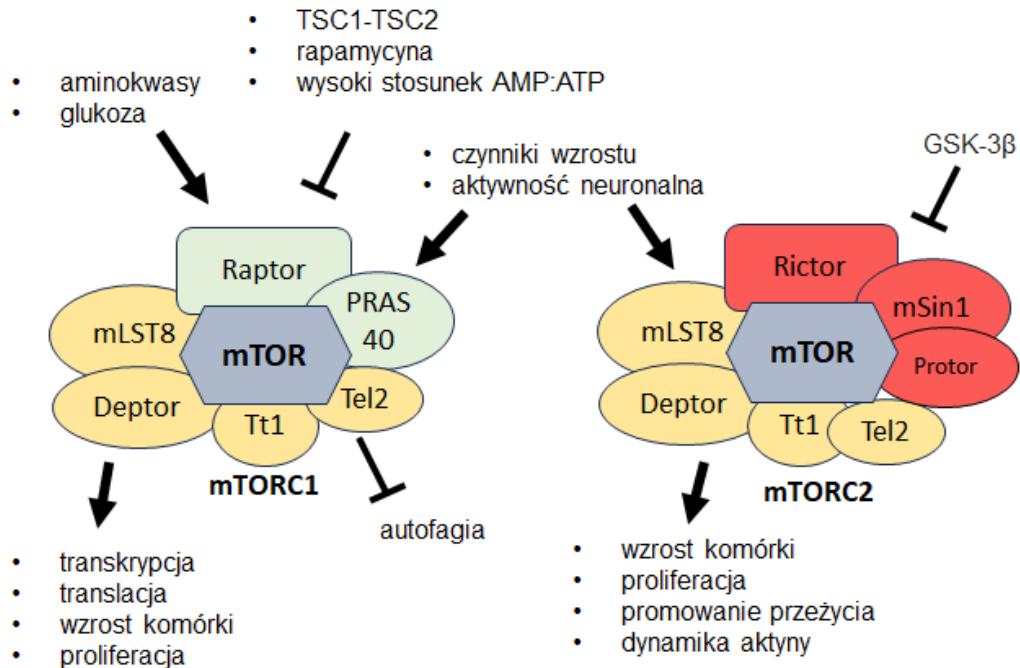
Jako że, efektorami wielu ścieżek sygnałowych są kinazy, jednym z mechanizmów regulacji kinezyn może być ich fosforylacja. Jednocześnie modyfikacja ta może wpływać na aktywność kinezyn wielorako (Tempes i in. 2020). Z jednej strony badania na muszce owocowej wykazały, że fosforylacja kinezyny-1 na reszcie serynowej 181 oraz 182 może promować wyjście kinezyny ze stanu autoinhibicji (Kelliher i in. 2018), z drugiej, fosforylacja reszty serynowej 175 skutkowałą z kolei ustabilizowaniem autoinhibicji i zmniejszeniem siły, (ang. *stall force*) z jaką kinezyna może transportować ładunek (DeBerg i in. 2013). Podobnie Morfini i wsp. wykazali, że u myszy fosforylacja reszty serynowej 176 kinezyny-1 przez JNK3 skutkuje zmniejszonym powinowactwem do mikrotubul, a w konsekwencji mniejszą procesywnością (G. A. Morfini i in. 2009). Mechanizmy te zdają się być istotne m.in. dla regulowania miejsca dostarczenia ładunku. Ich zaburzenie, na przykład poprzez wykorzystanie mutacji fosfomimetycznej (imitującej stan permanentnej fosforylacji), może skutkować dostarczeniem ładunku przeznaczonego do dendrytów do aksonu (Kelliher i in. 2018). Mechanizm dezaktywacji poprzez fosforylację wykazano również dla innych kinezyn, np. KIF11 (kinezyny-5) może być fosforylowany na reszcie treoninowej 926 przez CDK1, co skutkuje jej utratą funkcji do wiązania mikrotubul. Występowanie tej modyfikacji zdaje się zależeć od fazy cyklu komórkowego (Blangy i in. 1995). Co więcej, praca Kahn i wsp. donosi jakoby ta sama pozycja KIF11 była fosforylowana w neuronach przez CDK5, zaś dodanie reszty fosforanowej korelowało z obecnością białka w dendrytach, zaś jej brak – w aksonie. Sugeruje to możliwy mechanizm regulacji miejsca przeznaczenia. (Kahn i in. 2015). CDK5 fosforyluje również innego przedstawiciela kinezyn – KIF2A (depolimeryzująca mikrotubule rodzina 13). Równoległa fosforylacja przez CDK5 i PAK1(ang. *p21-activated kinase 1*) odpowiednio treoniny 474 i seryny 503 białka KIF2A skutkuje zmniejszeniem jego powinowactwa do mikrotubul, a w konsekwencji osłabieniem ich depolimeryzacji. Jednocześnie w tej samej pracy autorzy wskazali, że fosforylacja reszty treoninowej 482 tej samej kinezyny przez ROCK2 (ang. *Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2*), skutkuje z kolei jej aktywacją i nasileniem depolimeryzacji mikrotubul (Ogawa i Hirokawa 2015).

Bardzo istotną ze względu na swoją rolę w komórce jest również kinaza mTOR. Jest ona kluczowym elementem szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR zaangażowanego w szereg procesów istotnych dla funkcjonowania komórki, przede wszystkim związanych ze wzrostem i proliferacją. Badania prowadzone w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej w dużym stopniu koncentrują się wokół roli mTOR w rozwoju i patologii komórki nerwowej. Jednocześnie mimo uzasadnienia podejrzenia związku tak istotnej ścieżki z kinezynami, w literaturze wciąż jest niewiele informacji na ten temat. Następny rozdział stanowi charakterystykę procesów komórkowych regulowanych przez mTOR oraz próbę podsumowania wiadomości dostępnych w literaturze na moment pisania pracy, na temat relacji mTOR i kinezyn.

1.3 Kinaza mTOR

Kinaza mTOR (ang. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*, ssaczy/mechanistyczny cel rapamycyny) odgrywa kluczową rolę we wzroście i dojrzewaniu wszystkich typów ssaczych komórek. Funkcjonuje ona w dwóch, dużych (~ 1 MDa) kompleksach nazywanych kompleksem I mTOR (mTORC1) oraz kompleksem II mTOR (mTORC2). Różnią się one składem związanych białek, z czego unikalne dla mTORC1 są Raptor oraz PRAS40, zaś dla mTORC2 - Rictor, mSin1 oraz Protor. Oprócz tego, oba kompleksy zawierają ten sam zestaw białek w postaci: mLST8, Deptor, Tti1 oraz Tel2 (Switon i in. 2017). Co istotne, oba kompleksy funkcjonują jako dimery. Specyficznym inhibitorem mTORC1 jest rapamycyna (sirolimus). Wiąże się ona z opiekuńczym białkiem FKPB12, z którym będąc w kompleksie cechuje się silnym powinowactwem do domeny FRB mTOR, blokując jej aktywność katalityczną. Kompleks mTORC2 uchodzi za niewrażliwy na rapamycynę, jednakże jej przewlekłe podawanie skutkuje obniżeniem jego aktywności, być może przez ograniczenie dostępności białka mTOR (Sarbassov i in. 2006). Natomiast szeroko stosowanymi inhibitorami obu kompleksów mTOR, są INK-128 (Sapanisertib) (H. Jiang i Zeng 2015) oraz AZD-8055 (Chresta i in. 2010). Aktywacja zarówno mTORC1, jak i mTORC2 prowadzi do całej kaskady zdarzeń, których wspólnym mianownikiem jest wzrost komórki, oraz w wielu przypadkach również proliferacja. Trudno znaleźć proces związany ze wzrostem komórki, w którym wspomniane kompleksy nie odgrywałyby przynajmniej pośredniej roli. W generalnym ujęciu, aktywacja mTOR następuje w wyniku dostatecznej dostępności substancji odżywczych oraz na skutek zewnątrzkomórkowych sygnałów pobudzających do wzrostu, czyniąc mTOR głównym czynnikiem promującym wzrost, w sprzyjających dla komórki warunkach. Jednocześnie funkcje i regulacja obu kompleksów pozostają w znacznym stopniu odmienne, przy czym dla kompleksu pierwszego są one znacznie lepiej poznane. Podczas gdy oba kompleksy aktywowane są za pośrednictwem PI3K przez czynniki wzrostu i hormony, w przypadku kompleksu pierwszego dobrze poznano szereg specyficznych mechanizmów regulacji. Do najważniejszych należą te zależne od dostępności aminokwasów oraz stanu energetycznego, komórki (wyrażonego jako stosunek AMP do ATP). W biologii molekularnej, najczęściej stosowanym markerem aktywności

mTORC1 jest fosforylowana forma rybosomalnego białka S6 (seryny 242/244 lub 235/236), zaś dla mTORC2 fosforylowana kinaza Akt (seryna 473) (Switon i in. 2017).



Ryc. 1.9. Uproszczony schemat kompleksów mTOR, ich regulacji i funkcji.

1.3.1 Kontrola translacji przez mTOR

Pozytywna kontrola translacji jest najczęściej opisywanym działaniem kompleksu mTORC1. Odbyna się ona przede wszystkim poprzez fosforylację dwóch substratów. Pierwszym z nich jest białko wiążące czynnik inicjacji translacji 4E1 (4E-BP1, ang. *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*), co umożliwia uwolnienie i aktywację eukariotycznego czynnika elongacji translacji 4E (eIF4E, ang. *eukaryotic translation initiation factor 4E*), będącego zasadniczym czynnikiem promującym translację zależną od czapeczki mRNA. Drugą ścieżką, jest fosforylacja kinazy p70S6 (S6K1), co prowadzi do jej aktywacji, czego konsekwencją jest m.in. fosforylacja białka S6 będącego składnikiem podjednostki 40S rybosomu, o czym wspomniano w punkcie 1.3 (G. Y. Liu i Sabatini 2020). Jednakże, fosforylacja tego ostatniego okazuje się nie być kluczowa w procesie translacji zależnej od mTORC1. Badania udowodniły, że usunięcie w sekwencji S6 wszystkich pięciu seryn mogących być celem S6K1 nie skutkuje zablokowaniem translacji (Ruvinsky i in. 2005), jakkolwiek może mieć wpływ na powstawanie nowych rybosomów (Chauvin i in. 2014). Samo S6K1 również stymuluje ekspresję rybosomalnego RNA (Hannan i in. 2003). Jednak prawdopodobnie, najważniejsza dla stymulacji translacji przez S6K1, jest aktywacja eIF4B (ang. *eukaryotic translation initiation factor 4B*) (Holz i in. 2005) oraz degradacja PDCD4 (ang. *programmed cell death protein 4*), będącego z kolei inhibitorem eIF4A (ang. *eukaryotic translation initiation factor 4A1*) (Holz i in. 2005). Oba wymienione

czynniki (eIF4B oraz eIF4A) należą, podobnie jak wspomniany wcześniej eIF4E, do kluczowych komponentów kompleksu inicjacji translacji, wspomagającego wiązanie mRNA do rybosomu (Mishra, Datey, i Hussain 2020).

Jak już wspomniano w punkcie 1.1.4, oprócz typowej translacji odbywającej się w ciele komórki, w neuronach w pewnym stopniu zachodzi ona również lokalnie, w dendrytach i aksonie. Zależnie od regionu, z którego pochodzą komórki nerwowe, badania wskazują na 1200 – 2000 różnych mRNA ulegających translacji w aksonie (Ostroff i in. 2019; Shigeoka i in. 2018), co więcej udowodniono, że sam mTOR również ulega lokalnej syntezie (Terenzio i in. 2018). Ważnym czynnikiem stymulującym lokalną translację w obrębie synaps po stronie dendrytów jest BDNF. Do najważniejszych białek, których produkcja na skutek stymulacji BDNF zostaje zwiększona w dendrytach, można zaliczyć: CamKII α , GluA1 (ang. *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1*), Homer2, oraz DLG2 (ang. *disks large homolog 2*). Jednocześnie rapamycyna hamuje zależną od BDNF lokalną translację GluA1 oraz Homer2, co sugeruje możliwe zaangażowanie mTOR (Schratt i in. 2004). Podobnie badania Lee i wsp. wykazały udział mTOR w lokalnej translacji PSD95 (ang. *post synaptic density protein 95*, białko gęstości postsynaptycznej 95) w dendrytach na skutek stymulacji insuliną (C.-C. Lee i in. 2005). Istotność precyzyjnej regulacji translacji w dojrzewającym neuronie podkreśla fakt, że w pracy Lin i wsp. produkcja konstytutywnie aktywnej formy 4EBP1 wystarczyła aby zniwelować część negatywnych skutków hiperaktywnego mTORC1 (T. V. Lin i in. 2016).

1.3.2 Regulacja transkrypcji przez mTOR

Kinaza mTOR została również powiązana z regulacją aktywności lub lokalizacji wielu czynników transkrypcyjnych, wpływając na funkcję wszystkich polimeraz RNA (Mayer i Grummt 2006), jak i również regulacji syntezy miRNA poprzez stymulowanie degradacji niezbędnego do ich powstawania enzymu Drosha (Ye i in. 2015). Wśród najlepiej opisanych czynników transkrypcyjnych, można wyróżnić: Hif1 α , będący kluczowym w odpowiedzi na niedotlenienie (Land i Tee 2007), SREBP1 kontrolujący geny zaangażowane w metabolizm lipidów i dostarczanie elementów błon komórkowych (Porstmann i in. 2008), Maf1, sam w sobie regulujący transkrypcję zależną od polimerazy III (Shor i in. 2010) czy TFEB, pod którego kontrolą pozostają kluczowe geny zaangażowane w autofagię (Peña-Llopis i in. 2011). Również badania prowadzone w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej opisują zmiany transkrypcyjne powiązane z mTOR. Blazejczyk i wsp. wykazali, że w modelu epilepsji polegającym na stymulowaniu neuronów kwasem kainowym, dochodzi do zwiększonej ekspresji *Elmo1*, będącego modulatorem dynamiki aktyny, zaś rapamycyna niweluje ten efekt (Blazejczyk i in. 2017). Z kolei, praca Malik i wsp. wskazuje, że ekspresja *Ccn1*, kodującego białko Cyr61 jest konieczna dla stymulowanego przez mTOR wzrostu drzewka dendrytycznego (Malik i in. 2013).

1.3.3 mTOR i autofagia

Termin autofagia określa zbiorczo szereg zjawisk polegających na kontrolowanym rozkładzie przez komórkę własnych elementów składowych, takich jak białka, fragmenty błon, czy organella. Wyróżnia się min. mikroautofagię, makroautofagię czy autofagię zależną od białek opiekuńczych (T. Nie, Zhu, i Yang 2021). Ze względu na tematykę projektu, w dalszej części pracy omawiana będzie jedynie makroautofagia, nazywana odtąd dla uproszczenia autofagią. Jest to proces degradacji agregatów nieprawidłowo zwiniętych lub uszkodzonych białek, jak i całych organelli, poprzez zamknięcie ich w otoczonym podwójną błoną pęcherzyku zwanym autofagosomem, a następnie fuzję z lizosomem zawierającym liczne enzymy proteolityczne (Griffey i Yamamoto 2022). Dodatkowo rozróżnia się autofagię selektywną, zależną od trawionego substratu, w tym: mitofagia (mitochondria), ERfagia (elementy siateczki śród plazmatycznej, ang. *endoplasmic reticulu*, ER) czy agregofagia (agregaty białek). W warunkach niedoboru substancji odżywczych, autofagia odpowiada również za uzyskiwanie energii kosztem składników komórki. Tak pojmowany proces nazywany również bywa autofagią nieselektywną. Za autofagię nieselektywną, jak i selektywną odpowiada ta sama maszyneria, jednakże w tym drugim przypadku rozpoznanie, substratu przeznaczonego do degradacji, odbywa się przez specjalne receptory, wśród których można wymienić białko p62/SQSTM1, wiążące ubikwitynowane agregaty białek (Pankiv i in. 2007), czy FUNDC1 (ang. *FUN14 domain containing 1*) rozpoznający uszkodzone mitochondria (M. Chen i in. 2016). W obu podanych przykładach, receptor wiąże wspomniany substrat do autofagosomu poprzez zawarte w jego błonie białko LC3 (ang. *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*, znane również jako MAP1LC3B). Co ważne, proces ten pełni szczególną rolę w neuronach, gdzie bazowy poziom autofagii selektywnej pozostaje wysoki, niezależnie od dostępności substancji odżywczych. Rozwój i wydłużanie neurytów, jak i działanie synaps, wymaga częstej wymiany zawartych w nich organelli jak i fragmentów błon (Boland i in. 2008). Najwięcej autofagosomów powstaje na końcach aksonów (jeden co około 20 min. w neuronach hipokampalnych). Następnie są z dużą wydajnością transportowane do ciała komórki w celu dojrzewania i degradacji. Tworzenie autofagosomów zachodzi również obrębie denrytów i ciała komórki, choć ze znacznie mniejszą częstotliwością (Maday i Holzbaur 2014). W ostatnich latach coraz więcej doniesień w literaturze podkreśla istotną rolę autofagii w procesie neuroplastyczności i ochrony przed chorobami neurodegeneracyjnymi (Fleming i Rubinsztein 2020; Stacchiotti i Corsetti 2020).

Ponieważ w generalnym ujęciu, autofagia jest procesem związanym z oszczędzaniem energii, i zatrzymaniem wzrostu, stymulacja proliferacji i rozwoju komórki musi się wiązać z jej zatrzymaniem. Kompleks kinazy mTOR dokonuje tego poprzez fosforylowanie kilku istotnych składników tej ścieżki: ULK1 (ang. *unc-51-like kinase 1*), Atg13 (ang. *autophagy-related protein 13*) oraz AMBRA1 (ang. *autophagy and beclin 1 regulator 1*) (Ganley i in. 2009; Nazio i Cecconi 2013). Jednocześnie dobrze znanym skutkiem stosowania rapamycyny jest efekt odwrotny, czyli nasilenie autofagii.

1.3.4 Wpływ mTOR na cytoszkielet

Pomimo, że doniesienia o wpływie kinazy mTOR na cytoszkielet pojawiają się wielokrotnie w literaturze, dokładny mechanizm tej interakcji jest słabo poznany (Switon i in. 2017). Do najlepiej opisanych należy wpływ mTORC2 na organizację aktyny, oddziałując min. na rodzinę małych GTP-az Rho (Jacinto i in. 2004; Sarbassov i in. 2006). Badania przeprowadzane przez Huang i wsp. wykazały, że warunkowe usunięcie białka Rictor, będącego kluczowym elementem mTORC2 skutkuje zablokowaniem polimeryzacji aktyny i związanej z nią plastyczności synaptycznej w mysich neuronach (W. Huang i in. 2013). Podobnie, inne badania wskazują na pośrednią rolę mTORC2 w regulacji polimeryzacji aktyny poprzez fosforylację kinazy białkowej C (PKC, ang. *protein kinase C*), która następnie kolei kontroluje aktywność czynników promujących wydłużanie filamentów aktynowych, czyli MARCKS (ang. *myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*,) oraz GAP-43 (ang. *growth associated protein 43*) (Angliker i Rüegg 2013).

Wpływ mTOR na mikrotubule jest znacznie słabiej poznany. Jednym z substratów mTORC1 potencjalnie zaangażowanym w regulację dynamiki mikrotubul lub ich oddziaływań białkowych jest białko śledzące plus końce mikrotubul - Clip-170 (J. H. Choi i in. 2002; Swiech i in. 2011). Choi i wsp. wykazali, iż zablokowanie fosforylacji Clip-170 przez mTOR przy użyciu rapamycyny skutkuje dysocjacją CLIP-170 od „+” końców mikrotubul i zmniejszeniem stabilności mikrotubul. Jednak wyników tych nie potwierdziły prace prowadzone w naszym laboratorium (Tempes i in. 2024). Natomiast Swiech i wsp (2011) wykazali, iż fosforylacja Clip-170 przez mTOR wpływa na jego interakcję z białkiem IQGAP1. Interakcja ta, ma kluczowe znaczenie w oddziaływaniu mikrotubul z F-aktyną, a w konsekwencji prawidłową morfologię dendrytów (Swiech i in. 2011). W końcu praca Jiang i Yeung wskazuje na rolę CLIP-170 w deregulacji dynamiki cytoszkieletu i penetracji mikrotubul do korteksu korowego w komórkach pozbawionych TSC2, charakteryzujących się nadmierną aktywnością mTORC1 (X. Jiang i Yeung 2006).

Interesująca jest natomiast relacja kinazy mTOR z pierwotnymi rzęskami. Dobrze znany w literaturze jest fakt korelacji długości rzęski z poziomem autofagii. U komórek hodowanych *in vitro* najdłuższe rzęski można zanotować po osiągnięciu przez nie konfluencji, co jest zgodne z opisanym w punkcie 1.1.3 mechanizmem powiązania rzęski z zatrzymaniem cyklu komórkowego. Podobnie głodzenie, jest czynnikiem sprzyjającym obecności i długości rzęski (Kiprilov i in. 2008). Badania prowadzone przez Park i wsp. dowodzą, że mysie fibroblasty ze zmutowaną, nadaktywną formą mTOR cechują się krótszymi rzęskami i upośledzeniem samego procesu ich powstawania. Jednocześnie fenotyp ten ulega odwróceniu po zastosowaniu rapamycyny (Park i in. 2018). Jak opisano w punkcie 1.3.3, jedną z najlepiej opisanych funkcji mTORC1 jest zahamowanie autofagii. Jednocześnie relacja pomiędzy autofagią, a wzrostem rzęski jest złożona i zdaje się być sprzężona w obu kierunkach. Z jednej strony rzęska promuje autofagię (Orhon i in. 2016), zgodnie z tym Pampliega i wsp. wykazali, że

komórki bez funkcjonalnych rzęsek cechują obniżonym jej poziomem. Jednakże, w tej samej pracy autorzy sugerują, że aktywna autofagia skutkuje skracaniem rzęsek na skutek ograniczenia dostępności czynników potrzebnych do jej wzrostu (Pampliega i in. 2013). Z drugiej strony inne badania donoszą, że w procesie autofagii dochodzi min. do degradacji białka OFD1 będącego inhibitorem rozwoju rzęski z okolic centrioli (Z. Tang i in. 2013), co promuje jej wzrost. Z literatury wyłania się zatem złożony obraz, wskazujący, że dokładna relacja między autofagią, a pierwotną rzęską nie pozwala na proste przewidywania na temat jej wzrostu.

1.3.5 Regulacja kinazy mTOR

Ze względu na szerokie spektrum działania oraz pobudzanie wzrostu komórek, oba kompleksy kinazy mTOR podlegają skomplikowanej sieci regulacji. W klasycznym ujęciu, aktywność mTOR zależy od dostępności substancji odżywczych, tym samym będąc „centrum decyzyjnym” promującym wzrost komórki w sytuacji ich dostatecznej ilości. Bezpośrednim aktywatorem mTORC1 jest mała GTPaza Rheb (ang. *Ras homolog enriched in brain*), która w formie związanej z GTP jest w stanie aktywować mTOR, najpewniej powodując zmianę konformacyjną. Jednocześnie głównym inhibitorem aktywności mTORC1 jest kompleks tworzony przez trzy białka: hamartynę (TSC1), tuberynę (TSC2) oraz towarzyszące im TBC1D7. W aktywnej formie kompleksu, TSC2 indukuje hydrolizę związanego z Rheb GTP do GDP, co skutkuje zahamowaniem jego aktywności, a w konsekwencji również mTORC1. TSC1 natomiast min. zapobiega degradacji TSC2, chroniąc je przed ubiquitynacją (Chong-Kopera i in. 2006).

Najbardziej kanonicznym mechanizmem aktywacji mTORC1 jest ten zależny od dostępności aminokwasów. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa system nazywany Ragulator-Rag. Pierwsza część to składający się z pięciu białek Lamtor (Lamtor1-5) kompleks Ragulator (Yonehara i in. 2017). Lamtor1 zakotwicza cały kompleks w błonie lizosomu, gdzie znajduje się również wspomniana wcześniej GTPaza Rheb. Drugim składnikiem tego systemu, są cztery białka Rag, (RagA-RagD, występujące zawsze jako heterodimery. W sytuacji dostępności aminokwasów, dimery Rag wiążą się do mTORC1 poprzez białko Raptor, a następnie promują translokację całego kompleksu do błony lizosomu, gdzie wiążą się do Ragulatora. W konsekwencji mTORC1 może zostać aktywowany przez Rheb. Jak wspomniano wcześniej, kompleks TSC1-TSC2 stanowi inhibitor tego procesu, jednakże w sytuacji dostępności substancji odżywczych, kinaza Akt fosforyluje TSC2 dezaktywując cały kompleks i umożliwiając Rheb pozostanie w formie związanej z GTP (Inoki i in. 2003). Jest to także punkt sprzężenia między oboma kompleksami mTOR, jako że jednym z aktywatorów Akt jest mTORC2 (M. Urbanska i in. 2012, 1; Baffi i in. 2021).

Drugą istotną ścieżką aktywacji mTORC1 jest aktywacja receptorów błonowych na skutek działania hormonów (np. leptyny lub insuliny) oraz czynników wzrostu takich jak naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*,) (T i in. 2006), czynnik wzrostu nerwów (NGF, ang. *nerve*

growth factor), (Z.-G. Wang i in. 2016) oraz BDNF (Skalecka i in. 2016). Proces ten rozpoczyna się przez związanie się przez nie z odpowiednim receptorem z rodziny RTK (ang. *receptor tyrosine kinase*, receptory o aktywności kinaz tyrozynowych). Związanie ligandu skutkuje zmianą konformacyjną receptora, oraz najczęściej autofosforylacją i dimeryzacją (Z. Du i Lovly 2018), a w następstwie rozpoczęciem dalszych kaskad sygnałowych. Jedną z nich, jest związanie poprzez domenę SH2, a w konsekwencji aktywację kinazy fosfatidyloinozytolu-3 (ang. *phosphoinositide 3-kinase*, PI3K). Skutkiem aktywnej PI3K jest kataliza produkcji PIP3 (fosfatidyloinozytolu-3,4,5-trifosforanu). PIP3 następnie rekrutuje do błony kinazę Akt, co jest możliwe dzięki obecności u tej drugiej domeny PH (ang. *pleckstrin homology domain*, domena homologiczna do plekstryny). Po dotarciu do błony, Thr 308 Akt ulega fosforylacji przez PDK1 (kinazę zależną od fosfatidyloinozytolu). Następnie fosforylacji Ser-473 Akt, co może być katalizowane przez różne kinazy m.in. mTORC2 (Chua i in. 2009). Jak wspomniano wcześniej, aktywna kinaza Akt fosforyluje tuberynę, tym samym inaktywując kompleks TSC1-TSC2, umożliwiając aktywację mTOR (Ersahin, Tuncbag, i Cetin-Atalay 2015). Jednocześnie, na skutek działania receptorów RTK dochodzi do aktywacji ścieżki MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*, kinazy aktywowanaa mitogenami). Jedną z jej konsekwencji jest również inaktywująca fosforylacja TSC2, w tym przypadku przez ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*, kinazę regulowaną czynnikami zewnątrzkomórkowymi) (Ma i in. 2005). W neuronach, aktywacja mTOR zachodzi również na skutek sygnałów specyficznych dla układu nerwowego. Takie działanie ma np. BDNF (za pośrednictwem ścieżki PI3K) wydzielany min. na skutek aktywności neuronalnej (Takei i in. 2004), ale również neuroprzekaźniki takie jak glutaminian (Lenz i Avruch 2005) czy dopamina (Schicknick i in. 2008).

Kolejnym kluczowym mechanizmem regulacji aktywności mTOR, jest stan energetyczny komórki, wyrażony jako stosunek AMP do ATP. Za wykrycie tego stanu odpowiedzialna jest kinaza aktywowana 5'AMP (ang. *5'AMP-activated protein kinase*, AMPK). W momencie braku dostępności składników odżywczych, dochodzi do wzrostu stężenia AMP, zaś kinaza ta ulega aktywacji, w konsekwencji fosforylując TSC2. Jednak w przeciwieństwie do fosforylacji przez Akt czy ERK, ta modyfikacja skutkuje wzrostem aktywności kompleksu TSC1-TSC2 a tym samym inhibicją mTORC1 (Inoki, Zhu, i Guan 2003). Co więcej, oprócz aktywacji głównego inhibitora, AMPK fosforyluje również Raptor, co skutkuje związaniem się do niego białka z rodziny 14-3-3, a w konsekwencji inhibicję całego kompleksu (Gwinn i in. 2008).

Jak opisano w punkcie 1.2.4, mTOR ma pewien udowodniony wpływ na regulację rozwoju rzęsek. Relacja ta może być jednak dwukierunkowa. Jak sugerują badania Boehlke i wsp., mechaniczne pobudzenie rzęski w mysich komórkach nerki przez przepływ płynów skutkuje obniżeniem aktywności mTOR. Za mechanizm ten, zdaje się odpowiadać zwiększona fosforylacja AMPK poprzez białko Lkb1 (ang. *liver kinase B1*), gromadzące się w ciałku podstawnym na skutek bodźca mechanicznego. Jednocześnie komórki pozbawione rzęsek cechowały się większym rozmiarem przyczyniając się do powstawania torbieli, przy czym stosowanie rapamycyny niwelowało ten efekt. (Boehlke i in. 2010a).

W przeciwieństwie do mTORC1, regulacja mTORC2 jest dużo słabiej poznana. Podobnie jak kompleks pierwszy, mTORC2 ulega aktywacji na skutek działania czynników sygnałowych stymulujących PI3-kinazę (np. EGF, insulina) (M. Urbanska i in. 2012) oraz aktywności neuronalnej (W. Huang i in. 2013). Innym opisanym mechanizmem kontroli jest fosforylacja białka Rictor przez GSK-3 β w konsekwencji stresu związanego z siateczką śródplazmatyczną (ang. *ER stress*). Fosforylacja ta zaburza wiązanie substratów przez cały kompleks mTORC2, skutecznie blokując jego aktywność (C.-H. Chen i in. 2011).

1.3.6 Kinaza mTOR w rozwoju neuronu

Jak wspomniano w poprzednich rozdziałach, mTOR odgrywa kluczową rolę w dojrzewaniu i wzroście wszystkich typów komórek. Mutacja powodująca brak aktywności domeny kinazowej w genie *MTOR* u myszy skutkuje śmiercią embrionu (Murakami i in. 2004). Podobnie, śmiertelny jest brak kluczowych komponentów tworzących kompleksy mTORC1 oraz mTORC2, czyli białek Raptor i Rictor (Guertin i in. 2006). Wykorzystanie techniki warunkowego wyciszenia w mózgu przy użyciu rekombinazy CRE, wykazało, że komponenty kompleksów mTOR odgrywają również kluczową rolę w rozwoju układu nerwowego. Usunięcie w mózgu myszy białka Raptor (kompleks mTORC1) skutkowało śmiercią zwierzęcia niedługo po urodzeniu, jednocześnie stwierdzono mikrocefalię i znacznie zmniejszoną liczbę komórek (Cloëtta i in. 2013). Usunięcie Rictor (kompleks mTORC2) również skutkowało mikrocefalią, ale łagodniejszą niż w przypadku braku kompleksu pierwszego, zaś myszy były w stanie przetrwać jakiś czas po urodzeniu (Thomanetz i in. 2013). Jednocześnie w obu przypadkach, komórki nerwowe były znacznie mniejsze niż u zwierząt kontrolnych, a drzewka dendrytyczne uproszczone (Skalecka i in. 2016; Thomanetz i in. 2013).

Obserwowana mikrocefalia i znaczne zmniejszenie liczby komórek wskazuje, że mTOR konieczny jest już na etapie neurogenezy. Istotnie, badania na myszach wskazują, że brak funkcjonalnego mTORC1 skutkuje nie tylko wydłużeniem cyklu komórkowego i zmniejszeniem liczby podziałów neuroprogenitorów, ale również ich częstszą apoptozą (Cloëtta i in. 2013). Podobnie dobrze znana jest funkcja mTORC2 w promowaniu przeżywalności (Hung i in. 2012). Również poprawna migracja dojrzewających neuronów, jest zależna od właściwego działania ścieżki mTOR. Choć w tym wypadku, w literaturze najlepiej opisano zaburzenia związane z jej nadmierną aktywacją (Magri i in. 2013; 2011; Tarkowski i in. 2019), skutkujące szeregiem patologicznych zmian w mózgu, co szerzej opisano w kolejnym rozdziale.

Również specjalizacja i wydłużanie aksonu są regulowane przez mTOR. Jak wspomniano w punkcie 1.2 rosnący akson potrzebuje do prawidłowej nawigacji w przestrzeni zewnętrznych cząsteczek sygnałowych. Część z nich działa „przyciągająco” (chemoatraktanty, np. netryna-1), zaś inne „odpychająco” (chemorepelenty, np. semaforyna 3A, Slit) (Stoeckli 2018). Wykazano, że dodanie rapamycyny upośledza odpowiedź aksonu na wspomniane cząsteczki sygnałowe (Holt i in., 2006). Ma

to najprawdopodobniej związek z obniżeniem lokalnej translacji w stożku wzrostu, co okazuje się być kluczowe dla prawidłowej nawigacji aksonu (Campbell i Holt 2001). Znana jest również rola mTOR w regeneracji aksonu w następstwie uszkodzeń (Williams i in. 2020; Miao i in. 2016).

Stosunkowo dobrze opisanym w literaturze zjawiskiem, jest wpływ mTOR na rozwój drzewka dendrytycznego (Jaworski i in. 2005; Kumar i in. 2005; Skalecka i in. 2016; Jossin i Goffinet 2007). Traktowanie rapamycyną skutkuje uproszczeniem drzewka dendrytycznego w neuronach hodowanych *in vitro*, nawet w przypadku ich jednoczesnej stymulacji BDNF czy insuliną (Jaworski i wsp., 2005; Kumar i wsp., 2005; Urbańska i wsp., 2012). Podobny efekt można zaobserwować wyciszając ekspresję genów *Mtor* i *Rptor* poprzez interferencję RNA lub knock-out (Jaworski i wsp., 2005; Urbanska i wsp., 2012; Skalecka i in. 2016). Skalecka i wsp. wykazali również ten efekt *in vivo* dla neuronów ziarnistych powstających w opuszce węchowej myszy. Jednocześnie wpływ mTORC1 na rozwój drzewka dendrytycznego jest wielokierunkowy i wynika bezpośrednio z jego roli w regulacji wielu procesów komórkowych, opisanych w poprzednich rozdziałach. W tym, wpływu na translację, min. GluA (Koscielny i in. 2017), modyfikację cytoszkieletu (Swiech i in. 2011), transkrypcję (Malik i in. 2013) oraz autofagię (Błazejczyk, Tkaczyk, Młostek, Kisielewska i in., w przygotowaniu). Jednocześnie nie tylko mTORC1, ale również mTORC2 jest istotny w tym procesie, jako że wyciszenie genu kodującego białko Rictor również skutkuje uproszczeniem drzewka dendrytycznego (Urbanska i in. 2012; Skalecka i in., 2016, Urbanska i wsp., 2017), co może być w pewnym stopniu powiązane z jego aktywnością w regulowaniu dynamiki aktyny (Thomanetz i in. 2013; W. Huang i in. 2013) ale również z kontrolą nad ścieżką mTORC1 (Urbanska i in. 2012) oraz transportem dendrytycznym mRNA zależnym od ZBP1 (ang. *Z-DNA-binding protein 1*) (Urbanska i wsp., 2017).

1.3.7 Rola mTOR w patologii stwardnienia guzowego

Ze względu na tak istotny udział w regulacji licznych procesów komórkowych, zaburzenia w aktywności mTOR są przyczyną wielu chorób. Wśród nich można wymienić liczne nowotwory (Pópulo, Lopes, i Soares 2012), choroby neurodegeneracyjne (Perluigi, Di Domenico, i Butterfield 2015), otyłość, cukrzycę lub wspomnianą już wielotorbielowatość nerek (Laplante i Sabatini 2012). Chorobą, której podłoże jest od wielu lat badane w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej jest stwardnienie guzowe (ang. *tuberous sclerosis complex*, TSC). Bezpośrednią przyczyną choroby są mutacje w genach *TSC1* bądź *TSC2*, kodujących odpowiednio hamartynę oraz tuberynę, tworzących tak jak opisano w punkcie 1.2.5 kluczowy kompleks hamujący mTORC1, co skutkuje jego hiperaktywacją (Switon i in. 2016). Jednocześnie mutacje w *TSC2* uważane są za poważniejsze w skutkach (Sancak i in. 2005). Powszechnie w literaturze pojawia opinia, że stwardnienie guzowe wpisuje się w model „dwóch uderzeń” (ang. *two hits*) Knudsona. Zgodnie z nim, chorzy rodzą się z jednym uszkodzonym allelem odziedziczonym od rodziców bądź powstałym w wyniku mutacji w rozwoju zarodkowym, a zmiany patologicznie tworzą się na skutek proliferacji komórek, w których doszło do nabytej mutacji w

drugim allelu (utrata heterozygotyczności) (Knudson 2001; Feliciano i in. 2013). Występowanie TSC szacuje się między 1:6000 a 1:10000 żywych urodzeń. U pacjentów choroba objawia się przede wszystkim licznymi, niezłośliwymi guzami (określanymi jako hamartoma) w wielu narządach ciała, w tym nerkach, skórze, płucach oraz w mózgu. Wśród zmian w obrębie tego ostatniego wyróżnić można: podwyściółkowe guzki okołokomorowe (SEN; ang. *subependymal nodules*), guzy korowo-podkorowe (ang. *critical/subcortical tubers*) oraz olbrzymiokomórkowe gwiazdziaki podwyściółkowe (SEGA, ang. *supependymal giant cell astrocytomas*). Typowo, u chorych występuje epilepsja (85% pacjentów) (Paolo Curatolo, Bombardieri, i Jozwiak 2008), której napady rozpoczynają się często przed pierwszym rokiem życia. U niemowląt przybierają one najczęściej postać „spazmów niemowlęcych” (ang. *infantile spasms*) (Uysal i Şahin 2020). Jednocześnie napady bywają bardzo częste (nawet do 100 dziennie) oraz lekooporne, co sprawia, że stosowane jest również leczenie chirurgiczne (K. Zhang i in. 2013). Oprócz epilepsji, stwardnieniu guzowatemu zazwyczaj towarzyszy zespół objawów neurologicznych nazywany TANDs (ang. *TSC associated neuropsychiatric disorders*, zaburzenia neuropsychiatryczne towarzyszące TSC), do których zaliczyć można niepełnosprawność intelektualną zaburzenia ze spektrum autyzmu, deficyty uwagi czy zaburzenia lękowe (de Vries i in. 2015). W przeszłości uważano, że objawy ze strony układu nerwowego wynikają bezpośrednio z obecności w mózgu zmian takich jak guzki korowe, jednakże nowsze badania na modelach zwierzęcych, wykazały występowanie zarówno epilepsji, jak i TANDs nawet bez obecności widocznych guzów w mózgu (Lozovaya i in. 2014). Warto jednak nadmienić, iż u ludzi istnieje silna korelacja między epilepsją i występowaniem zmian anatomicznych w korze mózgowej, w szczególności guzków korowych, których otoczenie często jest źródłem aktywności epileptogennej a ich chirurgiczne usunięcie bywa jednym ratunkiem dla pacjentów z lekooporną padaczką. Z drugiej strony brakuje silnej korelacji pomiędzy występowaniem guzków czy SEGA a takimi objawami neuropsychiatrycznymi jak spektrum autyzmu czy podwyższony poziom lęku. Tym samym za te patologiczne objawy TSC prawdopodobnie w głównej mierze odpowiadają: zaburzenia ścieżek sygnałowych na poziomie komórkowym i nieprawidłowe tworzenie połączeń między neuronami (J. M. Han i Sahin 2011; V. Tsai i in. 2014), nieprawidłowości w strukturze warstw kory wynikające z zaburzonej migracji neuroprogenitorów (Feliciano 2020) oraz nieprawidłowa równowaga neurotransmisji pobudzającej (transmisja glutamatergiczna) do hamującej (transmisja GABAergiczna) (Sarlo i Holton 2021). Warto dodać, że nasilenie objawów cechuje się bardzo dużą różnorodnością pomiędzy pacjentami, co w dużej mierze zależy od charakteru mutacji (całkowita lub częściowa utrata funkcji; mutacja w *TSC2* vs. *TSC1*). W niektórych wypadkach diagnoza może dotyczyć jedynie zmian skórnych, bez objawów ze strony układu nerwowego (Henske i in. 2016; Uysal i Şahin 2020).

W leczeniu stosuje się inhibitory mTOR jak wspomniana wielokrotnie w pracy rapamycyna (sirolimus), oraz jej pochodne nazywane ogólnie rapalogami. Ich długotrwałe stosowanie jest skuteczne w łagodzeniu objawów choroby, jednakże wiąże się z licznymi efektami niepożądanymi. Do najważniejszych należą konsekwencje upośledzenia układu odpornościowego, czyli zwiększona

zapadalność na infekcje oraz osłabienie gojenia ran. Jednocześnie przerwanie terapii, skutkuje szybkim nawrotem patologicznych zmian. Natomiast w zapobieganiu napadom padaczkowych, szczególnie u dzieci, najlepsze efekty daje wigabatryna. Jej mechanizm działania wiąże się z zwiększeniem stężenia GABA w centralnym układzie nerwowym, co jest w zgodzie z teorią o przyczynie epilepsji w TSC związanej z zaburzeniem balansu między sygnałami hamującymi i pobudzającymi w mózgu (P. Curatolo, Verdecchia, i Bombardieri 2001). Co więcej, jak sugeruje Zhang i wsp. działanie wigabatryny może wynikać z jej bezpośredniego oddziaływania na samą ścieżkę mTOR (B. Zhang i in. 2013).

1.3.8 Nadmierny wzrost neuronu w stwardnieniu guzowatym

Na poziomie pojedynczego neuronu, hiperaktywacja mTORC1 objawia się przede wszystkim nadmiernym wzrostem całej komórki, jak i niekontrolowanym, rozgałęzieniem drzewka dendrytycznego, co efektywnie można modelować wykorzystując neurony hodowane *in vitro* (Jaworski i in. 2005; Malik i in., 2015). Zgodnie z przewidywaniami, taki sam fenotyp można zaobserwować w przypadku mutacji z utratą funkcji w genach *TSC1* lub *TSC2 in vivo* (Feliciano 2020). Podobnie wyciszanie ekspresji wspomnianych genów np. przez interferencję RNA również skutkuje fenotypem nadmiernego wzrostu (Malik i wsp., 2015). Jak wykazały badania nad mutantami *TSC2* o różnicowanym poziomie ekspresji, wystarczy by spadła ona do około 30 % naturalnego poziomu, by wywołać hiperaktywację mTOR (Yuan i in. 2012). Jednocześnie rapamycyna powoduje zatrzymanie patologicznego fenotypu zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, co stanowi bezpośredni dowód na kluczową funkcję mTORC1 w rozwoju choroby (Switon i in. 2016). Natomiast rola kompleksu mTORC2 w fenotypie stwardnienia guzowatego pozostaje niejasna, aczkolwiek większość literatury donosi o obniżeniu jego aktywności w przypadku TSC (J. Huang i in. 2008). Jak opisano w poprzednich punktach tego rozdziału, kinaza mTOR kontroluje niemal wszystkie procesy związane z wzrostem komórki, tym samym jej wpływ na nadmierny rozrost neuronu jest wielokierunkowy. W dalszej części tego podrozdziału podsumowano funkcje mogące odpowiadać za te zależności.

Zjawiskiem, które może przyczyniać się do obserwowanego, nadmiernego wzrostu komórki przy hiperaktywacji mTOR jest zahamowanie autofagii (opisana w punkcie 1.3.3). Sprawia to, że komórki rosną nawet przy ograniczonej dostępności substancji odżywczych, co zostało zaobserwowane w guzach obecnych w TSC (Parkhitko i in. 2011; Reis i in. 2021). Jednak obniżenie autofagii ma jeszcze jedną konsekwencję. Prawidłowy rozwój neuronu wiąże się z eliminacją niektórych synaps (ang. *synapse pruning*), co jest istotne w procesie dojrzewania mózgu. Autofagia odgrywa w tym zasadniczą rolę, umożliwiając degradację elementów nadmiarowych synaps. Hiperaktywacja mTOR skutkuje upośledzeniem tego procesu, co zostało powiązane z rozwojem zaburzeń ze spektrum autyzmu, występujących również w stwardnieniu guzowatym. Jednocześnie rapamycyna zdaje się łagodzić te objawy w mysim modelu TSC (G. Tang i in. 2014).

Jak wspomniano, nadmierny wzrost drzewka dendrytycznego jest charakterystyczną cechą neuronów pochodzących z hodowli komórkowych w modelu TSC. Jednakże w przypadku preparatów pochodzących od pacjentów, stopień zmiany złożoności drzewka dendrytycznego w TSC jest różny i zależy od badanego rejonu mózgu (Młostek i in. 2023). Niewątpliwie jednak, cytoarchitektura neuronów ulega zaburzeniu, również poza obszarem guzów (Marcotte i in. 2012), zaś nieprawidłowości w rozwoju drzewka dendrytycznego przyczyniają się do objawów epilepsji (Kumari i Brewster 2023). Wśród możliwych efektorów tego procesu, można wymienić białko HIF1a (ang. *hypoxia-inducible factor 1a*), którego obecność okazywała się kluczowa dla rozwoju dendrytów powodowanym brakiem Tsc1 (Land i Tee 2007), oraz białko macierzy Cyr61 (ang. *cysteine-rich angiogenic inducer 61*), które ulga zwiększonej produkcji w przypadku wyciszenia *Tsc2*, a nadekspresja samego genu *Cyr61* jest wystarczająca to uzyskania fenotypu rozrośniętego drzewka dendrytycznego (Malik i in. 2013).

Oprócz nadmiernego wzrostu dendrytów, również nawigacja aksonu pozostaje zaburzona. Hiperaktywacja mTORC1 na skutek obniżenia poziomu Tsc1/Tsc2 powoduje nadmierny wzrost aksonu, zarówno *in vitro*, jak *in vivo*, skutkując nieprawidłowo umiejscowionymi (ektopowymi) aksonami (Y.-J. Choi i in. 2008). Pewną rolę pełnią tu spowodowane nadmierną aktywnością mTOR zaburzenia translacji, szczególnie lokalnej w stożku wzrostu aksonu (Takei i in. 2004; Kelleher i Bear 2008). Inne badanie wskazuje na zaburzenia w prawidłowej nawigacji aksonu na skutek obniżonej odpowiedzi na efryny w neuronach o obniżonej ekspresji *Tsc2* (D. Nie i in. 2010).

Istotnym procesem we wzroście neuronu, jest organizacja cytoszkieletu, w której jak opisano w punkcie 1.3.4, w pewnym stopniu uczestniczą oba kompleksy mTORC. Jednakże, ich rola w zaburzeniach obserwowanych w TSC pozostaje niejasna. Niemniej, w preparatach z tkanki guzów mózgu pacjentów cierpiących na TSC, wykazano nieprawidłowe funkcjonowanie mikrotubul, objawiające się min. występowaniem licznych komórek o dwóch jądrach. Zmiany te powiązano z zaburzeniami ścieżki Rock2, a w efekcie małej GTP-azy Rho, będącej min. regulatorem dynamiki mikrotubul (Ferrer i in. 2014). Podobnie, w mysim modelu o obniżonej ekspresji *Tsc2*, wykazano nieprawidłową strukturę mikrotubul oraz nadmierną fosforylację białka Tau min. w hipokampie (Gąssowska-Dobrowolska i in. 2023). Również organizacja aktyny wydaje się być nieprawidłowa w TSC. W modelu szczurzych neuronów hipokampalnych, wykazano, że obniżenie ekspresji *Tsc2* prowadzi, do zwiększenia objętości, ale zmniejszenia liczby kolców dendrytycznych. Autorzy badania sugerują związek ze zwiększoną aktywnością kofiliny, będącej istotnym białkiem depolimeryzującym aktynę. Co ciekawe, kompleks TSC1/TSC2 zdaje się również wpływać na cytoszkielet aktynowy na drodze niezależnej od mTOR, poprzez regulację Rac1 (ang. *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) (Goncharova i in. 2004).

Nieoczywisty jest natomiast los pierwotnych rzęsek w fenotypie stwardnienia guzowatego. Cytowana uprzednio praca Park i wsp. opisuje, że mysie linie komórkowe z mutacją p.Cys1483Tyr w genie *Mtor*, która skutkuje jego nadmierną aktywnością cechują się zaburzonym rozwojem rzęsek. Co ważne, autorzy donoszą również, że zaobserwowali podobny fenotyp na preparatach z mózgow

pacjentów z mutacją w *Tsc2* (Park i in. 2018). Jednakże wpływ hamartyny oraz tuberyny na rzęski zdaje się być dużo bardziej złożony. Niektóre badania na mysich embrionalnych fibroblastach (MEF) sugerują wręcz, że wyciszenie, którejkolwiek z nich skutkuje dłuższymi rzęskami (Hartman i in. 2009), lub że brak TSC2 wpływa na skrócenie rzęsek, zaś TSC1 na ich wydłużenie (Rosengren i in. 2018). Oba artykuły donoszą jednak o lokalizowaniu się hamartyny w ciałku podstawnym. W drugim ze wspomnianych badań, autorzy bezpośrednio sugerują, że oprócz regulacji mTORC1 białka TSC1 oraz TSC2 pełnią inne, niezależne od siebie funkcje. W przypadku braku TSC1 miało dojść do wzrostu autofagii pomimo jednoczesnej zmierzonej większej aktywności mTORC1, co może być powiązane z zaangażowaniem tego pierwszego w ścieżkę sygnałową Hh. Podobnie, jak opisano w punkcie 1.2.4, wpływ autofagii na rzęski, jest złożony, a w literaturze brak jest konsensusu na ten temat. Tym samym ostateczny fenotyp dłuższych/krótszych rzęsek może zależeć w większym stopniu od innych czynników, niż zahamowania autofagii przez mTOR (Rosengren i in. 2018).

1.3.9 Wzajemna regulacja mTOR i kinezyn w transporcie wewnątrzkomórkowym

Jak przedstawiono w niniejszym rozdziale, aktywny mTOR pobudza szereg procesów związanych ze wzrostem komórki. Tym samym, uzasadnione jest podejrzenie, że jednym z nich może być transport wewnątrzkomórkowy. Wcześniejsze badania prowadzone w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej wykazały wiązanie się amfisosomów do dyneiny przez kompleks AP2 jako adaptor (Kononenko i in. 2017). Co więcej, nowe wyniki badań sugerują, że liczba kompleksów dyneiny-dynaktyny-AP2 zwiększa się po dodaniu rapamycyny, sugerując możliwy udział mTORC1 (Tempes i in. 2023). Jednocześnie w ciągu ostatnich kilku lat, w literaturze pojawia się coraz więcej doniesień na temat powiązania kinezyn ze ścieżką sygnałową mTOR, choć w przeważającej większości dotyczą one komórek nieneuronalnych i pochodzą z badań nad nowotworami. Tym samym na moment pisania tej pracy wątek ten wciąż pozostaje słabo poznany. W niniejszym podrozdziale, zebrano niektóre z dostępnych informacji na ten temat.

Jak wynika z badań Urbańskiej i wsp. zależna od mTORC2 fosforylacja ZBP1 na serynie 181, jest kluczowa dla jej mobilności i prawidłowej lokalizacji w punktach rozgałęziania dendrytów. Jako motor odpowiedzialny za transport zidentyfikowano KIF5A (kinezyne-1). Co ciekawe, zastosowanie mutacji uniemożliwiającej fosforylację ZBP1, powoduje jej zwiększone oddziaływanie z kinezyną, większą prędkość transportu, oraz mniejszą liczbę przerw w ruchu. Prowadzi to jednak do zaburzenia lokalizacji ZBP1 a w konsekwencji zaburzeń lokalnej syntezy białek i uproszczenia drzewka dendrytycznego (A. S. Urbanska i in. 2017).

KIF1B będąca przedstawicielem kinezyn-3 i jednocześnie kluczowym białkiem zarówno w transporcie aksonalnym jak i dendrytycznym, została również powiązana z transportem mRNA kodującego zasadowe białko mieliny (ang. *myelin basic protein*, MBP) w oligodendrocytach. Rolą tej kinezyne miałby być transport mRNA do peryferyjnych wypustek, zaś obniżenie ekspresji genu *KIF1B*

miałoby skutkować nieprawidłową lokalizacją translacji MBP w cytoplaźmie i w efekcie zaburzeniem mielinizacji komórek nerwowych (Lyons i in. 2009). Niedawno Muhia i wsp. opublikowali badanie, w którym wskazują na istotną rolę mTOR w regulacji cytoszkieletu oligodendrocytów, co jest kluczowym krokiem w procesie mielinizacji. Co więcej, autorzy wskazują na bezpośrednią stymulację ekspresji genu *KIF1B* przez mTOR, a w efekcie sprawniejszy transport mRNA kodującego MBP (Musah i in. 2020).

Jak opisano w punkcie 1.3.5 jednym z podstawowych mechanizmów regulacji mTORC1, jest jego aktywacja na błonie lizosomu w czym pośredniczy kompleks Ragulator-Rag. Jednakże w stanie niedoboru aminokwasów, mTORC1 powinien opuścić błonę lizosomu i pozostać w znacznej mierze rozproszony w cytoplazmie. Niedawne badania na muszce owocowej opublikowane przez Jang i wsp. sugerują, że za translokację TORC1 z lizosomu odpowiada transport mikrotubularny oraz Klp61F (kinezy-5) będąca homologiem KIF11 (Jang i in. 2020). Co więcej, autorzy wykazali podobny mechanizm również w ludzkiej linii komórkowej HEK293E, wskazując bezpośrednie wiązanie przez domenę motoryczną KIF11 komponentu mTORC1 w postaci białka mLST8. Warto tu przypomnieć, że KIF11 funkcjonuje jako homotetramer posiadający po dwie pary domen motorycznych po przeciwnych stronach. Zarówno zaburzenie mikrotubul poprzez traktowanie komórek kolchicyną jak i wyciszenie KIF11 mają skutkować brakiem inhibicji mTORC1 w stanie niedoboru aminokwasów. Co ważne, efekt ten jest jednostronny, jako że ponowna stymulacja mTOR przez dostępność aminokwasów zachodzi nawet w pozbawionych KIF11 komórkach (Jang i in. 2020).

Jak zostało już opisane w podrozdziale dotyczącym rzęsek pierwotnych, wzrost autofagii pozytywnie koreluje z ich długością i *vice versa*. Jak sugerują Wang i wsp. inhibicja autofagii przez aktywny mTOR, skutkuje degradacją KIF3A przez ubiquitytację i degradację w proteasomie, co przynajmniej częściowo przekłada się na skrócenie rzęsek (Lai i Jiang 2020). Jednocześnie jak wspomniano w punkcie 1.3.5 rzęski mają funkcjonalne hamujący wpływ na mTORC1 poprzez Lkb1 i AMPK (Boehlke i in. 2010a), tym samym ujawniając mechanizm sprzężenia zwrotnego pomiędzy KIF3A i mTOR. Inne białko z rodziny kinezyn-2, KIF3C zostało z kolei wymienione przez Gao i wsp. jako pełniące rolę w patologii glejaka wielopostaciowego. Autorzy donoszą, że nadprodukcja KIF3C jest związana z silniejszą proliferacją jak i inwazyjnością komórek nowotworowych, zaś jej wyciszenie ze złagodzeniem fenotypu. Miałoby się to odbywać poprzez aktywację ścieżki PI3K/Akt, której mTOR jest jednym z efektorów, choć cytowane badanie nie wykazuje bezpośrednio oddziaływania z tym ostatnim (Gao i in. 2020).

Bardzo podobny efekt do tego opisanego dla KIF3C został wykazany również dla KIF21B (kinezy-4) w komórkach kostniakomięsaka. Analogicznie jak w przypadku kinezy-2, większa ekspresja genu *KIF21B* wiązała się z bardziej inwazyjnym charakterem choroby, jednocześnie korelując z większą aktywacją ścieżki PI3K/Akt. Co więcej, zastosowanie agonisty ścieżki Akt w postaci IGF-1 na komórkach bez *KIF21B* daje bardzo podobny efekt co jego nadekspresja, sugerując wspólny mechanizm działania. (Ni i in. 2021) Podobnie jednak jak w badaniu Gao i wsp. autorzy nie wymieniają

bezpośrednio mTOR. Warto w tym miejscu również dodać, że KIF21B została w wielu badaniach powiązana z patologią choroby Alzheimera oraz stwardnienia rozsianego (Kreft i in. 2014), aczkolwiek wymienione przykłady nie dotyczą związku ze ścieżką mTOR.

Co ciekawe, w ostatnich latach powiązanie zwiększonej ekspresji genu z aktywacją ścieżki PI3K/Akt w przebiegu różnych nowotworów zostało opisane dla wielu innych członków rodziny kinezyn. Można tu oprócz wcześniej wymienionych, dodać również: KIFC3 (kinezyny-13) w raku wątrobowokomórkowym (S. Lu i in. 2023), KIF23 (kinezyny-6) w chłoniaku (Gong i in. 2022), KIF18B (kinezyny-8) w gruczołowym raku płuc (Ji i in. 2019). Może to sugerować istnienie głębszej zależności między tymi białkami motorycznymi, a szlakami kontrolującymi wzrost i proliferację komórek, jednakże na ten moment dane literaturowe są fragmentaryczne i skąpe, jeżeli chodzi o wyjaśnianie potencjalnego mechanizmu, zaś w komórkach nerwowych doniesień tych nie ma prawie wcale.

Tym samym uzasadnione wydaje się poszukiwanie zależności między aktywacją kinazy mTOR a rodziną kinezyn, szczególnie w kontekście chorób takich jak stwardnienie guzowate.

2. CELE PRACY

Stwardnienie guzowate jest rzadką, genetyczną chorobą której przyczyną jest mutacja w genach *TSC1* lub *TSC2*, co prowadzi do hiperaktywacji ścieżki mTOR. Skutkuje to licznymi guzami w wielu narządach ciała w tym mózgu, w którym również stwierdza się nieprawidłowości w organizacji struktur takich jak kora mózgowa. Objawia się to częstymi i lekoopornymi napadami padaczkowymi, opóźnieniem umysłowym czy zaburzeniami ze spektrum autyzmu. W terapii stosuje się inhibitory mTORC1 takie jak rapamycyna, jednakże ich stosowanie wiąże się ze skutkami ubocznymi, a odstawienie natychmiastowym nawrotem objawów. Tym samym dokładniejsze poznanie mechanizmów stojących za patologią choroby jest konieczne dla opracowania nowych form leczenia. Na poziomie pojedynczego neuronu, hiperaktywacja mTOR skutkuje nadmiernym rozrostem ciała komórki oraz niekontrolowanym rozgałęzieniem drzewka dendrytycznego. Fenotyp ten można modelować przy użyciu pierwotnych hodowli neuronalnych, np. poprzez nadprodukcję aktywnej formy PI3-kinazy będącej silnym aktywatorem ścieżki mTOR, albo wyciszenie ekspresji genów *TSC1* lub *TSC2*. Jednocześnie specyficzna budowa neuronu z długimi dendrytami oraz aksonem, sprawia, że komórka nerwowa potrzebuje dostarczania składników odżywczych, białek czy całych organelli na znaczne odległości. Rolę tę, w głównym stopniu pełnią białka motoryczne poruszające się wzdłuż mikrotubul: kinezyne oraz dyneina. O ile w przypadku dyneiny istnieją przesłanki o jej powiązaniu ze ścieżką mTOR, w literaturze brakuje informacji na temat udziału kinezyn w hipertrofii neuronów uwarunkowanej nadmierną aktywnością mTORC. **Tym samym celem niniejszej pracy, było sprawdzenie czy któraś z kinezyn, może być istotna dla nadmiernego wzrostu neuronu w modelu TSC. Aby go zrealizować, wyznaczono podane cele szczegółowe:**

1. Identyfikacja kinezyn istotnych dla patologii TSC:

- a) Przeprowadzenie badania przesiewowego w celu wyłonienia genów kinezyn, których ekspresja jest konieczna do wzrostu neuronów transfekowanych konstytutywnie aktywną formą PI3-kinazy.
- b) Sprawdzenie czy wyłonione kinezyne są konieczne również dla wzrostu neuronu z wyciszoną ekspresją *TSC2*, co stanowi model choroby.

2. Poznanie mechanizmu stojącego za powiązaniem zidentyfikowanych kinezyn z patologią TSC:

- a) Sprawdzenie, czy wybrane funkcje kinezyn zaangażowanych w patologiczny wzrost komórek nerwowych w TSC są zaburzone w komórkach z obniżonym poziomem *TSC2*.
- b) Sprawdzenie, czy jednoczesne wyciszenie ekspresji wybranych kinezyn, skutkuje unormowaniem ewentualnych zaburzeń wybranych funkcji w komórkach z obniżoną ekspresją *TSC2*.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Najczęściej stosowane materiały i odczynniki

3.1.1. Najczęściej stosowane odczynniki w metodach biologii molekularnej

Enzymy:

- nukleazy (enzymy restrykcyjne): Sall, PstI, SnaBI FastDigest™: EcorI, XhoI, BglIII, HindIII (Thermo Fisher Scientific)
- modyfikujące DNA: ligaza T4 (5U/μl) (Thermo Fisher Scientific Scientific)
- polimerazy: Q5 High Fidelity Polymerase (Thermo Fisher Scientific Scientific), Polimeraza RUN (A&A Biotechnology)

Wzorce wielkości DNA i masy białek:

- PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)
 - Perfect Plus™ 1kb, 100bp DNA Ladder (EURx)

Zestawy i odczynniki do pracy z kwasami nukleinowymi:

- Plasmid Mini (A&A Biotechnology)
- Plasmid Mini Plus KIT (Qiagen)
- Clean-Up Concentrator (A&A Biotechnology)
- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific)
 - RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen)
 - High-Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems)
 - TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)
 - Płytki 96-dołkowe do prowadzenia reakcji RT-QPCR
 - SimplySafe™ (EURx)
- Deoksynukleotydy (dNTPs) (Thermo Fisher Scientific)
 - Sondy TaqMan™ (Applied Biosystems; Tabela 3.1)

Tabela 3.1. Sondy TaqMan wykorzystane w pracy:

Gen	Numer referencyjny
KIF3A	Rn01463898_m1
KIF3C	Rn00585148_m1
KIF21B	Rn01483144_m1

KIF27	Rn01448658_m1
KIF11	Rn01479336_m1
KIFC2	Rn00495161_m1
KIF4A	Rn01419484_m1
KIF5A	Rn01505197_m1
KIF26B	Rn01411851_m1
KIF20A	Rn01761062_m1
TSC2	Rn00562086_m1
GAPDH	Rn01775763_g1

Wszystkie sondy wymienione w Tabeli 3.1 były sprzężone z barwnikiem FAM i rozpoznawały sekwencje pochodzenia szczurzego.

Materialy, zestawy i odczynniki do pracy z białkami:

- Błona nitrocelulozowa (VWR)
- Filmy światłoczułe (Foma)
- Płytki 96-dołkowe do pomiaru białka w lizatach komórkowych (Nerbe plus GmbH)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
 - Akryloamid/bis-akryloamid (30%; Sigma-Aldrich)
 - N'-Tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Odczynniki stosowane w metodach cytochemicznych

- Falloidyna sprzężona z Alexa Fluor™ 647 (ang. *Phalloidin AF647*; Thermo Fisher Scientific Scientific)
- Barwnik Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific)
- ProLong™ Gold (Invitrogen)
- Odczynnik do znakowania przeciwciał Mix-n-Stain™ CF640™ (Biotum)

3.1.3. Roztwory

Do przygotowania roztworów używano wody oczyszczonej przez odwróconą osmozę i filtrację przez filtry Mili-Q Plus (Milipore). Podstawowe odczynniki pochodziły z firm Sigma-Aldrich, Bioshop i POCh. W Tabeli 3.2 wymieniono najczęściej stosowane roztwory i ich skład.

Tabela 3.2. Najczęściej stosowane roztwory.

Nazwa	Skład
Bufory do pracy z kwasami nukleinowymi	
6 x roztwór obciążający do DNA	60% glicerol; 0,25% błękit bromofenolowy; 0,25% błękit ksylenowy
10 x TBE (ang. Tris-boran-EDTA, bufor do elektroforezy DNA)	0,315 M Tris-HCl pH 6,8; 50% 61ethanol; 10% SDS; 25% (v/v) β-merkaptotetanol; 0,0125% błękit bromofenolowy
Bufory do pracy z białkami	
roztwór soli buforowany Tris (ang. <i>Tris-buffered saline</i> , TBS)	0,5 mM Tris-HCl pH 7,5; 1,5 mM NaCl
10 x Tris-glicyna (bufor do elektroforezy białek)	0,25 M Tris-HCl pH 8,4; 2 M glicyna; 10% SDS
bufor Towbina (bufor do transferu białek)	25 mM Tris-HCl pH 8,5; 20% etanol; 0,192 M glicyna
TBST	0,1% Tween-20 w TBS
TBST-M	5% mleko odtłuszczone w TBST
TBST-BSA	5% roztwór BSA w TBST
Bufor do chemiluminescencji (ECL)	100 mM Tris pH 8,5; 1,25 mM 3-aminofthalhydrazyd; 200 μM kwas kumarowy; 0,01% nadtlenek wodoru
Roztwór czerwieni Ponceau S	40% metanol; 15% kwas octowy; 0,25%
Bufory do immunocytochemii	
10 x PBS (ang. Phosphate buffered saline)	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 80 mM Na ₂ HPO ₄ ; 14 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PB (bufor fosforanowy)	10 mM: 81% Na ₂ HPO ₄ i 19% NaH ₂ PO ₄
PFA (bufor utrwalający)	4% PFA; 4% sacharoza w 5 mM PB; pH 7,4
PFA-Triton (bufor ekstrahująco-utrwalający)	PFA, 0,2% Triton-X, 60 mM PIPES, 25mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl ₂ , 0,15% aldehyd glutarowy
GDB (bufor do barwień immunocytochemicznych)	0,1% żelatyna, 0,3% Triton-X, 450 mM NaCl, 15 mM PB
Pozostałe bufory	

Bufor boranowy	40 mM kwas borowy; 10 mM tetraboran sodu; pH 8,5
HBSS (ang. Hank's Balanced Salt Solution)	1 x bufor Hanksa; 10 mM HEPES pH 7,3; 0,01% penicylina-streptomycyna
TBS-K (bufor do zbierania komórek)	25 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl

3.1.4. Przeciwciała

Tabela 3.3. Przeciwciała pierwszorzędowe stosowane w pracy.

Antygen	Pochodzenie	Stosowane rozcieńczenie	Producent i numer katalogowy
α -Tubulina	Mysz	WB 1:10000	Sigma-Aldrich, #T5168
Tyrozynowana-Tubulina	Szczur	IF: 1:500	Millipore, #MAB1864
GFP	Mysz	IF: 1:500	Invitrogen, #33-2600
KIF3A	Królik	IF: 1:300	Abcam, #ab11259
KIF3C	Królik	IF: 1:300	Proteintech, #14333-1-AP
KIF21B	Królik	IF: 1:300	Sigma-Aldrich, #HPA027274
Neurofascyna	Mysz	Obrazowania przyżyciowe 1:100	Antibodies Incorporated #75-172
Acetylowana-tubulina	Mysz	IF: 1:500	GeneTex GTX16292
AC3	Królik	IF: 1:300	Abcam, #ab125093
ARL13b	Królik	IF: 1:300	Proteintech, #17711-1-AP
fosfo-S6 (S235/236; P-S6)	Królik	IF: 1:300 WB 1: 1000	Cell Signaling Technology, #4858L
TSC2	Królik	IF: 1:300 WB: 1:1000	Cell Signaling Technology, #4308

Skróty stosowane w Tabeli 3.3: WB - Western Blot, IF - immunofluorescencja

Tabela 3.4. Przeciwciała drugorzędowe stosowane w pracy.

Przeciwciało	Antygen	Stosowane rozcieńczenie	Producent i numer katalogowy
Kozie przeciwciało sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. <i>horseradish peroxidase</i>)	królicze IgG	WB 1:10000	Jackson Immuno Research #111-035-003
Kozie przeciwciało sprzężone z HRP	mysie IgG	WB 1:10000	Jackson Immuno Research #115-035-003

Koźle przeciwciało sprzężone z HRP	szczurze IgG	WB 1:10000	Jackson Immuno Research #112-005-003
Ośle przeciwciało sprzężone z barwnikiem Alexa Fluor™ 647	królicze IgG	IF 1:500	Invitrogen #A31573
Ośle przeciwciało sprzężone z barwnikiem Alexa Fluor™ 568	królicze IgG	IF 1:500	Invitrogen #A10042
Ośle przeciwciało sprzężone z barwnikiem Alexa Fluor™ 488	królicze IgG	IF 1:500	Invitrogen #A21206
Ośle przeciwciało sprzężone z barwnikiem Alexa Fluor™ 647	mysie IgG	IF 1:500	Invitrogen #A31571
Ośle przeciwciało sprzężone z barwnikiem Alexa Fluor™ 568	mysie IgG	IF 1:500	Invitrogen #A10037
Ośle przeciwciało sprzężone z barwnikiem Alexa Fluor™ 488	mysie IgG	IF 1:500	Invitrogen # A21202

Skróty stosowane w Tabeli 3.4: WB- Western Blot, IF – immunofluorescencja

3.1.5. Wektory plazmidowe

Biblioteka sekwencji shRNA przeciw kinezydom:

W pracy wykorzystano bibliotekę shRNA wyciszających geny kinezy, opracowaną przez dr Joannę Lipkę. Wszystkie shRNA zostały zaprojektowane na podstawie dostępnych sekwencji szczurzych genów, a następnie umieszczone pod kontrolą promotora H1 w wektorze pSUPER (OligoEngine, Brummelkampi wsp., 2002) umożliwiającym wydajną ekspresję shRNA. W Tabeli 3.5 wymieniono wszystkie użyte sekwencje shRNA wraz z numerami referencyjnymi genów na podstawie, których zostały opracowane.

Tabela 3.5. Sekwencje siRNA użyte do stworzenia biblioteki shRNA przeciw szczurzym kinezydom.

Kinezyzna	Nr shRNA	Sekwencja siRNA	Numer referencyjny genu
KIF11	1	GCTGGTATAATTCCACGTA	NM_001169112
	2	CCACGTACTCTTCATCAGA	
	3	GCAGAGTTATTTACGGATA	
KIF12	1	GCCAATAGCATTAACCGCA	NM_001012102.2
	2	CTTCACCTGGCTATTAGAT	
	3	GAAGCTTTGATGGA ACTAT	
KIF13A	1	CGTACCTTATCGAGATTCA	NM_001107462
	2	GAACCAGTTAGACGTGTCT	
	3	GCTCATTA AACGACGGGAA	
KIF13B	1	GAAGCCGACAAACGTTGAA	

	2	GACGAGAAATTGACTTACA	NM_213626.1
	3	GGATGATGCTGACCGAGAG	
KIF14	1	CATAAACAGCACTTATGTT	NM_001108345.1
	2	CATCCCGATATGAAACAAA	
	3	CGCTCTCATTCCGTTTTCA	
KIF15	1	GGCTATTGCTCGACTAGAA	NM_181635.2
	2	CCTACGATAACTTACAAGA	
	3	GGAAATTGATAGGTCATCA	
KIF18A	1	GCAGCTACTAGACAATGGA	NM_001137642.1
	2	TTGTAGAAAGGCACAAATA	
	3	GACACATATAACACTCTTA	
KIF18B	1	CCTATGAGGATACTTACAA	NM_001039019.1
	2	AGATCTTTGTGAAGCAGCA	
	3	TGACCACCATGGAAGTGT	
KIF19	1	GCAATGACATGGAATATGA	XM_221082
	2	CCAAGTGTATCTCCGTGAA	
	3	CGGGAGAAGTCATACCTCT	
KIF1A	1	CAGGATGACCGGACCTTCT	XM_343630.4
	2	GACCGGACCTTCTACCAGT	
	3	GTCATCAGGATACGTCCAT	
KIF1B	1	GGGCTAAACATTTTCGTTGT	NM_057200.1
	2	GCAACGCTGTTATCAATGA	
	3	CTGGATCTAATGCGAGAGA	
KIF20A	1	CGGCAATCCTTACGTGAAA	NM_001108426.2
	2	CTTCGAATCAGACCGTTCT	
	3	GCATCTACATATGACGAAA	
KIF21A	1	CACGCACTGTGAATACAGA	NM_001106790
	2	CCGCGAACATAGATTACAT	
	3	GCAAACATCACGTGCGAAA	
KIF21B	1	GACGCTCACTGCTAAGTTC	NM_001105990
	2	CCCTCGTTGAGATCAAAGA	
	3	CTCACTATGACGGTATCGA	
KIF22	1	GAGAGCGAATGGTACTCAT	NM_001009645
	2	GCTTAAGATGAAGCAAAAA	
	3	GGAATTCGGCTAAAAGAGA	
KIF23	1	GGAGAAACGACATCGCTTA	NM_001108155.1
	2	GAAGTGGTCAATAGTACAA	
	3	CCTTGTTAGAACGGCAGAA	
KIF24	1	GGATAGAGCTGGTTATGGT	

	2	GTGCTTAGAATCAGACTCT	XM_232902.5
	3	CAGTCGGAATCAGACATCT	
KIF26A	1	GCGGTTTCGATAACTCAGA	NM_001170348
	2	GGAGTGTATAGATGGCAGT	
	3	AGATCAAGGTGTATGAGAT	
KIF26B	1	GCTCAACCGTTACAATGCT	NM_001109079
	2	GTGACCGACAACATTAGGA	
	3	CCTACACCATGATCGGAAG	
KIF27	1	GGTGATAAATTTGCGAGAA	NM_198050
	2	CGTATAGGGATGCGAAGAT	
	3	GGACCTTCACATCCGAGAA	
KIF2A	1	GTTGTTTACTTTCCACGAA	XM_345150.4
	2	GATCGGGATTTACGTGGAA	
	3	GAACTGACTGTGGATCCAA	
KIF2B	1	GAAAGAAGATTGAACTGGA	XM_001074241.2
	2	CACAATGGGTGGAGCCTTT	
	3	GGCAATACAAATTCGGA	
KIF2C	1	CAACGCAGCAATGGGTAA	NM_001085369.1
	2	GTGACGTTCTTCGAGATCT	
	3	GCCAATATAAGCACGGTGA	
KIF3A	1	GTGCGACCAATATGAACGA	NM_053377.1
	2	CGTATCGGAACTCTAACT	
	3	GTTGGTGCGACCAATATGA	
KIF3B	1	GGATACAAGAGACCACTGA	NM_001106529.1
	2	GGTCAGGCATCTTACTTA	
	3	GGGCATCTTACTTAGAGAT	
KIF3C	1	ATACAGGGCTGAAAATATA	NM_053486
	2	GGAATTTTCTCATGACCAA	
	3	CCACGTCTAAAGTGCGAAA	
KIF4A	1	CTAATGTGCTCAGACGTAA	XM_001058828.2
	2	CCCAAACCTTTCCGTATTA	
	3	CCTTCGCTATGCTGACAGA	
KIF4B	1	GAAGTCTAGAATCGGAAGT	XM_234487.4
	2	CAAGCGGTTATCCATCTAT	
	3	GGTTATCCATCTATCAGAT	
KIF5A	1	GGACACCAGCGAAAACGGA	NM_212523.1
	2	GCTGGTACGTGACAATGCA	
	3	GAGACCAATAACGAATGCA	
KIF5B	1	GGTTATGCAAGACAGACGA	

	2	GGAATATGAATTGCTTAGT	NM_057202.1
	3	GCCTTATGCATTTGATCGT	
KIF5C	1	GGATCGCACACGATATTTT	NM_001107730.1
	2	CAATGCCTGTGCGAAGCAG	
	3	GCTGTCAATTACGACCAGA	
KIF6	1	CAGACGGATTCGTAAACAA	XM_343524.4
	2	CCGACATGCTAAGCTTCAT	
	3	CGTACACATATCCCTTACA	
KIF7	1	GGTCGACACATGTGGATAA	XM_218828.5
	2	GAGCAAGGTATTATCCCAA	
	3	GGATAAACCAGGAGCTCAA	
KIF9	1	GCAATGACATGGAATATGA	NM_001192000.1
	2	GTTAGACGAAACGCTATCT	
	3	CGGGAGAAGTCATACCTCT	
KIFC1	1	CCAGTTACGTAGAGATCTA	NM_001005878.1
	2	CTGTACCAATGCACGATA	
	3	CACGTGCCTTACCGAAATA	
KIFC2	1	CACACTGGGACGTACCTAA	NM_198752.1
	2	GGCACCCTGCAGTTTTAT	
	3	CGCCCTAATTACGCTGACT	
KIFC3	1	CGAGAACCCAGGCATTAAT	NM_001103352.1
	2	CAGCTCCGGGACAGGTTAT	
	3	CCACCTGTAAAGTATGTCA	

Tabela 3.6. Pozostałe wektory plazmidowe otrzymane od innych badaczy lub zakupione.

Nazwa	Źródło	Opis
β-actin GFP	Prof. J. Jaworski (Jaworski i wsp., 2005)	Plazmid zawierający gen kodujący białko zielonej fluorescencji pod promotorem β-aktyny. Zawiera gen oporności na ampicylinę.
pULTRA	Prof. M. Moore (Addgene #24129)	Plazmid lentiwirusowy trzeciej generacji pozwalający na jednoczesną produkcję GFP oraz wybranego shRNA. Zawiera gen oporności na ampicylinę
pULTRA-Chili	Prof. M. Moore (Addgene #24130)	Plazmid lentiwirusowy trzeciej generacji pozwalający na jednoczesną produkcję tdTomato oraz wybranego shRNA. Zawiera gen oporności na ampicylinę

EF-β-gal	Prof. M. Hetman (Konopka i wsp., 2005)	Plazmid kodujący β-galaktozydazę pod promotorem EF1a. Zawiera gen oporności na ampicylinę.
EB3-GFP	Prof. C. Hoogenraad (Stepanova i in. 2003)	Plazmid kodujący białko śledzące „+” końce rosnących mikrotubul EB3 sprzężone z GFP. Zawiera gen oporności na kanamycynę
P110-CAAX	Prof. J. Jaworski (Jaworski i wsp. 2005)	Plazmid kodujący konstytutywnie aktywną podjednostkę p110α białka PI3-kinazy, wraz z kotwicą błonową. Zawiera gen oporności na ampicylinę
pMD2.G	dr D. Trono (Addgene#12259)	Plazmid lentiwirusowy drugiej generacji, kodujący białko otoczki VSVG. Zawiera gen oporności na ampicylinę.
pPAX	dr D.Trono (Addgene#12260)	Pakujący plazmid lentiwirusowy drugiej generacji niosący sekwencje Gag, Pol i Rev. Zawiera gen oporności na ampicylinę.
pSUPER-shTSC1	dr A. Malik	Plazmid pSUPER kodujący shRNA przeciw szczurzej hamartynie (TSC1). Zawiera gen oporności na ampicylinę. Sekwencja spinki: GAAGAAGCTGCGATATCTA
pSUPER-shTSC2#2	dr A. Malik (Malik i wsp. 2015)	Plazmid pSUPER kodujący shRNA przeciw szczurzej tuberynie (TSC2). Zawiera gen oporności na ampicylinę. Sekwencja spinki: GGTGAAGAGAGCCGTATCACA
pLKO-shTSC2#2	dr E. Liszewska	Wektor lentiwirusowy, kodujący shRNA przeciw sekwencji szczurzej tuberyny. Zawiera geny oporności na ampicylinę i puromycynę.
pLKO.1-TRC	dr D. Root (Addgene#10878)	Wektor lentiwirusowy drugiej generacji, umożliwiający produkcję shRNA. Zawiera geny oporności na ampicylinę i puromycynę.
pLKO.1-TRC-control	dr D. Root (Addgene#10879)	Kontrolny wektor lentiwirusowy kodujący sekwencję RNA nie tworzącą spinki Zawiera geny oporności na ampicylinę i puromycynę.
β-actin KIF21B ^{truncated} -GFP	dr J. Lipka (Lipka i wsp. 2016)	Plazmid kodujący skróconą (ang. <i>truncated</i>) wersję białka KIF21B w fuzji z białkiem GFP pod promotorem β-aktyny. Zawiera gen oporności na ampicylinę.
β-actin KIF22 ^{truncated} -GFP	dr J. Lipka (Lipka i wsp. 2016)	Plazmid kodujący skróconą (ang. <i>truncated</i>) wersję białka KIF22 w fuzji z białkiem GFP pod promotorem β-aktyny. Zawiera gen oporności na ampicylinę.

Tabela 3.7. Wektory plazmidowe kodujące shRNA stworzone na potrzeby pracy.

Nazwa	Wektor wyjściowy	Sekwencja shRNA	Opis plazmidu docelowego
pULTRA-shTSC2#2	pULTRA	GTGAAGAGAGCCGTATCACA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję GFP oraz shTSC2#2
pULTRA-Chili-shTSC2#2	pULTRA-Chili	GTGAAGAGAGCCGTATCACA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shTSC2#2
pULTRA-Chili-shKIF21B	pULTRA-Chili	CTCACTATGACGGTATCGA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF21B#3
pULTRA-Chili-shKIF20A	pULTRA-Chili	GCACTACATATGACGAAA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF20A#3
pULTRA-Chili-shKIF27	pULTRA-Chili	GGTGATAAATTTGCGAGAA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF27#1
pULTRA-Chili-shKIFC2	pULTRA-Chili	CACACTGGGACGTACCTAA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIFC2#1
pULTRA-Chili-shKIF26B	pULTRA-Chili	GTGACCGACAACATTAGGA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF26B#2
pULTRA-Chili-shKIF5A	pULTRA-Chili	GCTGGTACGTGACAATGCA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF5A#2
pULTRA-Chili-shKIF11	pULTRA-Chili	GCTGGTATAATTCCACGTA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF11#1
pULTRA-Chili-shKIF3A	pULTRA-Chili	GTTGGTGCGACCAATATGA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF3A#3
pULTRA-Chili-shKIF3C	pULTRA-Chili	GGAATTTTCTCATGACCAA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną produkcję tdTomato oraz shKIF3C#2
pULTRA-Chili-shKIF4A	pULTRA-Chili	CCTTCGCTATGCTGACAGA	Plazmid lentiwirusowy umożliwiający jednoczesną

			produkcję tdTomato oraz shKIF4A#3
--	--	--	-----------------------------------

3.1.6. Materiały stosowane w hodowlach bakteryjnych

Szczepy bakterii:

- *Echericha coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific)

Podłoża i odczynniki wykorzystywane do hodowli bakteryjnych:

- LB (ang. *Lysogeny Broth*) (Bioshop)
- LB-Agar. Podłoże LB zawierające 1,5% agaru (Bioshop)

Antybiotyki

- Ampicylina (stężenie końcowe: 100 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich)
- Kanamycyna (stężenie końcowe 50 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich)

3.1.7. Materiały stosowane w hodowli komórek ssaczych

Linie komórkowe zakupione lub uzyskane od innych badaczy:

- Rat2 – szczurze płodowe fibroblasty (American Type Culture Collection; ATCC).
- HEK293T – ludzkie embrionalne komórki nerki ze zmutowanym antygenem T wirusa SV40 (ATCC)

Linie komórkowe stworzone na potrzeby prac:

Transgeniczne linie komórek Rat2 zostały uzyskane poprzez transdukcję linii źródłowych zgodnie z protokołem opisanym w rozdziałach 3.5.4 oraz 3.5.5. W Tabeli 3.8 opisano uzyskane linie Rat2 wraz z wektorami lentiwirusowymi użytymi do ich produkcji.

Tabela 3.8. Stabilne linie komórek Rat2 stworzone na potrzeby pracy

Nazwa	Transdukcja 1	Transdukcja 2	Opis
Rat2-Ctrl	pLKO.1 TRC control	-	Linia kontrolna (kodująca sekwencję nietworzącą spinki) komórek Rat2 oporna na puromycynę
Rat2-shTSC2	pLKO-shTSC2#1	-	Linia komórek Rat2 oporna na puromycynę, z częściowym wyciszeniem ekspresji genu <i>Tsc2</i>
Rat2-ctrl-chili	pLKO.1 - TRC control	pULTRA-Chili	Linia kontrolna komórek Rat2 oporna na puromycynę i produkująca TdTomato

Rat2-shTSC2-chili	pLKO-shTSC2#1	pULTRA-Chili	Linia komórek Rat2 oporna na puromycynę, z częściowym wyciszeniem genu TSC2, produkująca TdTomato
Rat2-Ctrl-shKIF3A	pLKO.1 - TRC control	pULTRA-Chili-shKIF3A	Linia komórek Rat2 oporna na puromycynę, z częściowym wyciszeniem genu KIF3A, produkująca TdTomato
Rat2-Ctrl-shKIF3C	pLKO.1 - TRC control	pULTRA-Chili-shKIF3C	Linia komórek Rat2 oporna na puromycynę, z częściowym wyciszeniem genu KIF3C, produkująca TdTomato
Rat2-shTSC2-shKIF3A	pLKO-shTSC2#1	pULTRA-Chili-shKIF3A	Linia komórek Rat2 oporna na puromycynę, z częściowym wyciszeniem genów TSC2 oraz KIF3A, produkująca TdTomato
Rat2-shTSC2-shKIF3C	pLKO-shTSC2#1	pULTRA-Chili-shKIF3C	Linia komórek Rat2 oporna na puromycynę, z częściowym wyciszeniem genów TSC2 oraz KIF3C, produkująca TdTomato

Pierwotne hodowle komórek nerwowych:

Pierwotne hodowle szczurzych komórek nerwowych, wzbogacona w neurony hipokampalne lub korowe, wyprowadzone z embrionów szczurzych rasy WISTAR w 19-nastym dniu rozwoju. Zwierzęta pochodziły z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN.

Pożywki hodowlane:

- DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) z dodatkiem 2 mM L-glutaminy i D-glukozy (4500 mg/ml; Sigma-Aldrich)
- DMEM/F-12 (Invitrogen)
- Neurobasal™ (Invitrogen)
- OptiMEM™ (Invitrogen)

Dodatkowe odczynniki i materiały używane do hodowli komórek ssaczych:

- Supplement B27 (Invitrogen)
- DMSO (ang. *dimethyl sulfoxide*, dimetylosulfotlenek) (Sigma-Aldrich)
- FBS (ang. *fetal bovine serum*, bydlęca surowica płodowa) inaktywowana przez 30-minutową inkubację w 55°C (Sigma-Aldrich)
- GlutaMax™ Supplement (Invitrogen)
- HBSS (ang. *Hank's Balanced Salt Solution*), 10 x stężony (Sigma-Aldrich)

- HEPES, kwas N-2hydroksyetylo-piperazyno-N^{''}-2-etanosulfonowy (Sigma-Aldrich)
- Kwas glutaminowy (Sigma-Aldrich)
- Laminina (Roche)
- L-glutmina (Sigma-Aldrich)
- Lipofectamine2000TM (Invitrogen)
- P/S (Mieszanina antybiotyków Penicyliny (10 000 jednostek na 1 ml) oraz Streptomycyny (10 000 µg/ml) (Sigma-Aldrich)
- Poli-L-lizyna (PLL) (Sigma-Aldrich)
- Szalki hodowlane plastikowe 10 cm (VWR International)
- Szalki hodowlane plastikowe 6, 12, 24 i 96-ścio dołkowe (VWR International)
- Szkiełka nakrywkowe 13 mm i 18 mm (VWR International)
- Trypsyna 2,5% do hodowli neuronalnych (Invitrogen)
- Trypsyna-EDTA 0,05% (Sigma-Aldrich)

Związki farmakologiczne:

- Rapamycyna (Calbiochem)
- Dichlorowodorek puromycyny (Sigma-Aldrich)

Tabela 3.9. Pełny skład pożywek do hodowli komórek ssaczych stosowanych w pracy.

Skład pożywki hodowlanej	Przeznaczenie	Hodowane komórki
DMEM, 10% FBS, 1% P/S	Standardowa hodowla komórek ssaczych	Linie komórkowe: Rat2, HEK293T
Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM glutaminy, 12,5µM glutaminianu i 1% P/S	Utrzymanie pierwotnej hodowli komórek neuronalnych.	Pierwotne hodowle szczurzych neuronów korowych oraz hodowle wzbogacone w neurony hipokampalne.
DMEM/F12, 2% B27, 1% GLUTAMAX, 1% P/S	Produkcja wektorów lentiwirusowych w komórkach HEK293T, przeznaczonych do transdukcji neuronów.	HEK293T po transfekcji wektorami lentiwirusowymi.
FBS 90%, DMSO 10%	Mrożenie komórek w celu przechowywania linii.	Linie komórkowe: Rat2, HEK293T.

3.2. Metody pracy z kwasami nukleinowymi

3.2.1. Izolacja plazmidowego DNA

Plazmidowe DNA używane do klonowania, analizy restrykcyjnej oraz sekwencjonowania oczyszczano z 5 ml hodowli bakteryjnych za pomocą zestawu Plasmid Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

Plazmidowe DNA do transfekcji komórek eukariotycznych oczyszczano z 50 ml hodowli bakteryjnych za pomocą zestawu Plasmid Midi Plus Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

3.2.2. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

DNA plazmidowe trawiono przy użyciu enzymów restrykcyjnych, najczęściej w stosunku 1 U enzymu na 1 µg DNA. Reakcje prowadzono w buforze dostarczonym przez producenta, przez 1 godz. w 37°C, w końcowej objętości 30 µl. Do trawień analitycznych używano 0,3 U enzymu na 1 µg DNA.

3.2.3. Ligacja fragmentów DNA

Do przeprowadzenia ligacji fragmentów DNA wykorzystywano ligazę faga T4 a reakcję prowadzono w buforze dostarczonym przez producenta. W przypadku łączenia fragmentów zakończonych tępymi końcami, do mieszaniny dodawano dodatkowo 50% glikol polietylenowy. Do standardowej reakcji używano 75 ng plazmidu, natomiast ilość wstawianego fragmentu wyliczano według wzoru:

$$\text{Ilość wstawki (ng)} = 3 * \frac{\text{wielkość wstawki (pz)}}{\text{wielkość wektora (pz)}}$$

Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl. W przypadku lepkich końców łączonych fragmentów DNA, reakcje prowadzono przez 15 min w temperaturze pokojowej, zaś przy tępych końcach 1 godz.

3.2.4. Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

Reakcje PCR prowadzono przy użyciu buforu i odczynników dostarczonych przez producenta używanej polimerazy. Warunki reakcji były zależne od polimerazy i zostały opisano w Tabeli 3.10.

Tabela 3.10. Warunki prowadzenia reakcji PCR zależnie od użytej polimerazy

	Polimeraza RUN	Polimeraza Q5
Zastosowanie	Weryfikacja klonowania	Namnażanie sekwencji kodującej białko
Stężenie dNTP	200 µM	250 µM

Stężenie starterów	200 nM	625 nM
Objętość końcowa	20 μ l	25 μ l
Program reakcji	94°C – 3 min. 94°C – 30 sek. 55 – 72°C – 30 sek. 72°C – 1 min. na 1000 pz. 72°C – 2 min. 4°C - ∞	98°C – 30 sek. 98°C – 10 sek. 50 – 72°C – 30 sek. 72°C – 30 sek. na 1000 pz. 72°C – 2 min. 4°C - ∞

3.2.5. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.

Fragmety DNA rozdzielano w żelach agarozowych w buforze 1x TBE z dodatkiem SimplySafe™ (EURx) dla umożliwienia wizualizacji rozdzielanego DNA. Zawartość agarozy (0,5% - 2%) zależała od wielkości spodziewanych fragmentów. Przed nałożeniem próbki mieszano z 6 x stężonym buforem obciążającym w proporcji 1:5. Rozdział prowadzono przy stałym napięciu 90 V. Zależnie od rozdzielanych fragmentów jako wzorzec wielkości stosowano Perfect™ 100 bp lub Perfect™ 1 kbp (EURx).

3.2.6. Oczyszczanie fragmentów DNA po reakcjach enzymatycznych

W celu izolacji fragmentu DNA rozdzielonego w żelu agarozowym, wycinano z żelu odpowiedni fragment DNA, a następnie oczyszczano przy pomocy zestawu GeneJET Gel Extraction Kit™ (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z protokołem producenta. W celu usunięcia zanieczyszczeń po reakcjach enzymatycznych bez rozdziału elektroforetycznego, stosowano zestaw Clean-Up Concentrator (A&A Biotechnology).

3.2.7. Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie plazmidowego DNA było wykonywane przez firmę Genomed. Otrzymane wyniki analizowane były przy użyciu programu ApE (Davis i Jorgensen 2022), natomiast sekwencje były porównywane z dostępnymi bazami danych przy użyciu narzędzia BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.8. Izolacja RNA z hodowli komórkowych

Do izolacji całkowitego RNA pochodzącego z hodowanych komórek używano zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen). W celu lizy dodawano bezpośrednio na komórki bufor RLT z 1% β -merkaptanoetanołem, a następnie przechowywano w -80°C do czasu izolacji, którą wykonywano zgodnie z protokołem producenta. Uzyskane próbki RNA przechowywano w -80°C do czasu dalszych analiz.

3.2.9. Synteza cDNA na bazie RNA

Syntezę cDNA na bazie uzyskanego RNA przeprowadzano przy użyciu zestawu High-Capacity cDNA Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z protokołem producenta. Uzyskane cDNA przechowywano w -20°C do czasu dalszych analiz.

3.2.10. Określanie stężenia i czystości preparatów DNA i RNA

Czystość i stężenie uzyskanych próbek DNA i RNA mierzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop NM-100 (Thermo Fisher Scientific). Stężenie określano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm, a czystość poprzez stosunek absorbancji 260 nm / 280 nm. Dla DNA za zadowalający uważany był stosunek pomiędzy 1,8 – 2, zaś dla RNA jak najbliższy wartości 2.

3.2.11. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Ilościowe reakcje PCR w czasie rzeczywistym prowadzono na płytce 96-dołkowej w objętości 10 μl . Do jednej reakcji wykorzystywano 0,5 μl sondy TaqManTM (wykorzystane sondy opisano w Tabeli 3.1) znakowanych barwnikiem FAM, 5 μl buforu TaqManTM Gene Expression Master Mix oraz 1 μl cDNA uzyskanego w punkcie 3.2.9. Reakcje prowadzono w termocyklerze LightCycler 96 (Roche) zgodnie z programem opisanym w Tabeli 3.11.

Po zakończeniu reakcji analizowano wartości metodą $\Delta\Delta C_T$. C_T (ang. *threshold cycle*, cykl progowy), czyli numer cyklu, w którym fluorescencja sondy związanej do produktu zaczęła przekraczać wartość tła. Na podstawie tej wartości wyliczano:

- Wartość ΔC_T czyli różnicę pomiędzy C_T dla badanego genu, a genu referencyjnego (GAPDH)
- Wartość $\Delta\Delta C_T$, czyli różnicę między wartościami ΔC_T otrzymanymi dla próbki badanej i kontroli
- Wartość $2^{-\Delta\Delta C_T}$, czyli krotność zmiany ekspresji genu w badanej próbce względem kontroli

Tabela 3.11. Program reakcji qRT-PCR

Krok	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna inkubacja I	50°C	2 min.	1
Wstępna inkubacja II	96°C	10 min.	1

Denaturacja	95°C	15 sek.	40
Amplifikacja	60°C	1 min.	40

3.3. Hodowle komórek bakteryjnych

3.3.1. Warunki hodowli bakteryjnych

W celu izolacji pojedynczych kolonii, bakterie były hodowane na podłożu stałym LB-Agar z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego. Hodowle były prowadzone przez noc w 37°C. W celu izolacji plazmidowego DNA, odpowiednia objętość pożywki płynnej LB (50 ml zestaw „midi”, 5 ml zestaw „mini”) była zaszczipiana pojedynczą kolonią i wytrząsana (135 obrotów/min.) przez noc w 37°C.

3.3.2. Przygotowanie bakterii chemokompetentnych

Pojedynczą kolonią bakterii szczepu DH5α zaszczipiano 5 ml pożywki płynnej LB i pozostawiano do nocnej hodowli w 37°C, z wytrząsaniem (135 obrotów/min.). Następnego dnia hodowlę odmładzano poprzez dodanie 2 ml nocnej hodowli do 100 ml świeżej pożywki LB i hodowano do osiągnięcia OD₆₀₀ około 0,6. Następnie hodowlę przenoszono do schłodzonych 50 ml probówek i wirowano przez 10 min. w 4°C z przyspieszeniem 4000 x g. Osad bakteryjny zawieszano w 10 ml zimnego 0,1 M roztworu CaCl₂ i inkubowano 30 min. na lodzie. Następnie zawiesinę ponownie wirowano w 4°C przez 10 min. przy 4000 x g, a otrzymany osad zawieszano w 4 ml 0,1 M CaCl₂ z 15% glicerolem. Tak przygotowane komórki były porcjowane po 100 µl i zamrażane w -80°C.

3.3.3. Transformacja bakterii chemokompetentnych

Dla pojedynczej transformacji dodawano około 100 ng DNA do 30 µl bakterii kompetentnych i inkubowano na lodzie przez 30 min. Następnie przeprowadzano szok cieplny w 42°C przez 90 sek. i natychmiast ponownie schładzano bakterie na lodzie przez kolejną minutę. Do zawiesiny bakterii dodawano 800 µl pożywki LB bez antybiotyków i inkubowano 40 min w 37°C z wytrząsaniem (350 obrotów/min.). Następnie, jeśli do transformacji użyto oczyszczonego DNA plazmidowego, wysiewano 150 µl zawiesiny komórek na podłoże stałe LB-agar z odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym. W przypadku transformacji mieszaniną ligacyjną, bakterie były najpierw wirowane 5 min. przy 3500 x g, a następnie uzyskany osad był zawieszany w 150 µl świeżej pożywki i wysiewany w całości na podłoże. Wysiane bakterie hodowano przez noc w 37°C, a następnie przechowywano w 4°C.

3.4. Hodowle komórek ssaczych

3.4.1. Hodowle pierwotne szczurzych neuronów korowych i hipokampalnych

Przygotowanie szkiełek hodowli

Szkiełka nakrywkowe (13 mm oraz 18 mm) umieszczano w 68% kwasie azotowym na 48 godz., a następnie płukano je co godzinę w pięciu zmianach wody dejonizowanej, suszono i sterylizowano w piecu przez 3 godz. w 180°C. Dwa dni przed hodowlą szkiełka nakrywkowe umieszczano w plastikowej szalce (13 mm w 24-dołkowej, zaś 18 mm w 12-dołkowej) i pokrywano mieszaniną lamininy (2,5 µg/ml) z poli-L-lizyną (37,5 µg/ml) w buforze boranowym. Następnego dnia szkiełka pięciokrotnie płukano sterylną wodą dejonizowaną, a po końcowym płukaniu wodę wymieniano na pożywkę hodowlaną.

Przygotowanie pierwotnych hodowli neuronalnych

Hodowle pierwotne neuronalne wzbogacone w neurony hipokampalne lub korowe przygotowano zgodnie z protokołem stosowanym w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej (opisanym w pracy Swiech i in., 2011). Procedura ta była prowadzona zgodnie z wytycznymi II-giej Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Samicę szczura szczepu Wistar w 19 dniu ciąży usypiano w komorze do eutanazji wypełnionej dwutlenkiem węgla. Następnie zwierzęta uśmiercano poprzez przerwanie rdzenia kręgowego. W kolejnym kroku z jamy brzusznej samicy wydobywano embriony, których głowy umieszczano w zlewce z zimnym roztworem HBSS trzymany na lodzie. Mózgi izolowano z głów na szalce Petriego wypełnionej lodem i pokrytej parafilmem. Kolejne etapy wykonywano w szalce wypełnionej zimnym roztworem HBSS przy pomocy pęset i binokularu. Półkule oczyszczano z opon mózgowych, odcinano od pnia mózgu i oddzielano od siebie. Następnie z każdej półkuli usuwano wzgórze, wycinano hipokamp oraz korę i umieszczano je w osobnych probówkach z zimnym HBSS. Wyizolowane tkanki płukano zimnym HBSS (hipokampy 3 razy po 10 ml, kory 3 razy po 20 ml). Po ostatnim płukaniu hipokampy zawieszano w 4 ml HBSS i dodawano 2,5% trypsynę (10 µl/hipokamp), zaś kory w 8 ml i dodawano 20 µl trypsyny na fragment tkanki. Następnie tkanki inkubowano w 37°C przez 15 min. Po trypsynizacji płukano roztworem HBSS ogrzany do 37 °C (3 razy po 10 ml hipokampy, 20 ml kory), a następnie dysocjowano w świeżej porcji ogrzanego HBSS przy użyciu pipety. Rozdysocjowane komórki liczone przy użyciu komory Bürkera. Komórki wysiewano na szalkę 12 lub 24-dołkową z przygotowanymi wcześniej szkiełkami pokrytymi PLL i lamininą, oraz wypełnioną pożywką do hodowli neuronalnych. Na płytce 12-dołkowej wysiewano 100 tys. komórek hipokampalnych lub 200 tys. korowych w 1 ml pożywki na dołek, zaś na płytce 24-dołkowej 55 tys. komórek hipokampalnych lub 100 tys. korowych w 0,5 ml pożywki na dołek. Komórki neuronalne hodowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂.

3.4.2. Hodowle ssaczych linii komórkowych

Rozmrażanie przechowywanych linii komórkowych

Linie komórkowe przechowywane w -80°C lub ciekłym azocie, rozmrażano przez szybkie ogrzanie w temperaturze 37°C . Po rozmrożeniu zawiesinę komórek przenoszono do probówki 15 ml i dodawano powoli 10 ml ciepłej pożywki hodowlanej. Następnie odwirowywano 5 min przy $800 \times g$ w celu usunięcia DMSO zawartego w pożywce do mrożenia. Osad komórkowy zawieszano w 1 ml świeżej pożywki hodowlanej i przenoszono do 9 ml pożywki w 10 cm szalce hodowlanej.

Hodowla i pasaż linii komórkowych

Komórki linii Rat2 i HEK293T hodowano na szalkach 10 cm w pożywce hodowlanej (Tabela 3.9) w 37°C przy 5% stężeniu CO_2 . Po osiągnięciu konfluencji, komórki płukano jeden raz buforem PBS, po czym dodawano 1 ml roztworu trypsyna-EDTA na szalkę 10 cm i inkubowano 5 min. w 37°C w celu strawienia macierzy zewnątrzkomórkowej. Po tym czasie dodawano 1 ml świeżej pożywki, komórki zawieszano i w celu dalszej hodowli przenoszono na nową szalkę z 10 ml pożywki hodowlanej w stosunku 1:10.

Zamrażanie komórek w celu przechowywania długoterminowego

W celu długoterminowego przechowywania w tzw. banku komórkowym, linie traktowano podobnie jak przy pasażu, po czym zawieszano w 10 ml pożywki, liczone i wirowano 5 min $300 \times g$. Następnie osad zawieszano w pożywce do mrożenia (FBS z 10% DMSO), w takiej objętości, aby uzyskać 1,5 mln komórek/ml. Zawiesinę po 1 ml przenoszono do krioprobówek, które umieszczano w pojemniku mrozeniowym (Nalgene) wypełnionym izopropanolem. Pojemnik przechowywano w -80°C , a po 48 h krioprobówki przenoszono do naczynia Dewara z ciekłym azotem.

3.5. Wprowadzanie plazmidów ekspresyjnych do komórek ssaczych hodowanych *in vitro*

3.5.1. Transfekcje neuronów hipokampalnych przy użyciu liposomów kationowych

Transfekcje neuronów hipokampalnych zależnie od eksperymentu przeprowadzano w pierwszym, czwartym lub ósmym dniu hodowli. Do transfekcji używano odczynnika Lipofectamine2000TM. W przypadku transfekcji na płytce 24-dołkowej na jeden dołek stosowano 0,9 μg DNA i 1,67 μl Lipofectamine2000TM, zaś na 12-dołkowej 2 μg DNA oraz 3,34 μl Lipofectamine2000TM. Mieszaniny DNA i Lipofectamine2000TM przygotowywano w osobnych probówkach, poprzez dodanie wspomnianych odczynników do pożywki Neurobasal (50 μl w przeliczeniu na dołek dla płytki 24-dołkowej i 100 μl dla 12-dołkowej). Po 5 min inkubacji w temperaturze pokojowej, próbki mieszano (uzyskując 100 mieszaniny dla płytki 24-dołkowej i 200 μl dla 12-dołkowej) i inkubowano przez kolejne 30 min. W międzyczasie przygotowywano nową pożywkę neuronalną (Tabela 3.9) pozbawioną kwasu glutaminowego. Nową pożywkę dodawano do szalki

hodowlanej w proporcji 1:1 do pożywki już obecnej na szalce, po czym połowę odbierano do nowej próbki uzyskując pożywkę wzbogaconą w metabolity. Pożywkę pozostałą na szalce zastępowano ogrzaną pożywką Neurobasal bez dodatku suplementów. Po zakończeniu inkubacji mieszaniny DNA z Lipofectamine2000™, dodawano ją do komórek po 100 µl na dołek na płytce 24-dołkowej lub 200 µl na 12-dołkowej. Szalkę pozostawiano na dwie godziny w 37°C. Po tym czasie komórki płukano 1 raz pożywką Neurobasal bez dodatku suplementów, a następnie dodawano przygotowaną wcześniej pożywkę wzbogaconą o metabolity.

W Tabelach 3.12 – 3.15 przedstawiono dokładne składy mieszanin DNA użytych w eksperymentach prowadzonych na neuronach hipokampalnych.

Tabela 3.12. Skład mieszanin DNA użytych do pierwszorzędowego badania przesiewowego (punkt 4.1.1).

Próbka	Plazmid 1	Plazmid 2	Plazmid 3
Ktrl-1	βactin-GFP (300 ng)	β-Gal (300 ng)	pSUPER (pusty) (300 ng)
Ktrl-2	βactin-GFP (300 ng)	PI3K (300 ng)	pSUPER (pusty) (300 ng)
Próbka badawcza	βactin-GFP (300 ng)	PI3K (300 ng)	pSUPER-shKIF#1 (100 ng) pSUPER-shKIF#2 (100 ng) pSUPER-shKIF#3 (100 ng)

Tabela 3.13. Skład mieszanin DNA użytych do eksperymentu mającego na celu ustalenie warunków drugorzędowego badania przesiewowego (punkt 4.1.4.1).

Próbka	Plazmid 1	Plazmid 2	Plazmid 3
Ktrl	β-actin-GFP 300 ng	pSUPER (pusty) 600 ng	-
shTSC1	β -actin-GFP 300 ng	pSUPER-shTSC1 300ng	pSUPER (pusty) 300 ng
shTSC2	β -actin-GFP 300 ng	pSUPER-shTSC2 300 ng	pSUPER (pusty) 300 ng
PI3K	β -actin-GFP 300 ng	PI3K 300 ng	pSUPER (pusty) 300 ng

Tabela 3.14. Skład mieszanin DNA użytych do drugorzędowego badania przesiewowego (punkt 4.1.4.2).

Próbka	Plazmid 1	Plazmid 2	Plazmid 3
Ktrl-1	β -actin-GFP 300 ng	pSUPER 600 ng	-
Ktrl-2	β -actin-GFP 300 ng	shTSC2 300 ng	pSUPER 300 ng
shTSC2 + shKIF	β -actin-GFP 300 ng	shTSC2 300 ng	100 ng shKIF#1 100 ng shKIF#2 100 ng shKIF#3

Tabela 3.15. Skład mieszanin DNA użytych do badania wpływu wyciszenia kinezyn na rozwój rzęsek w neuronach hipokampalnych 8-11DIV (punkt 4.2.3.1).

Wariant	Plazmid 1	Plazmid 2	Plazmid 3
pSUPER-Ktrl	pSUPER (300 ng)	pSUPER (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
pSUPER-shTSC1	pSUPER (300 ng)	shTSC1 (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
pSUPER-shTSC2	pSUPER (300 ng)	shTSC2 (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
shKIF3A-Ktrl	mieszanka shKIF3A#1-3 (po 100 ng)	pSUPER (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
shKIF3A-shTSC1	mieszanka shKIF3A#1-3 (po 100 ng)	shTSC1 (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
shKIF3A-shTSC2	mieszanka shKIF3A#1-3 (po 100 ng)	shTSC2 (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
shKIF3C-Ktrl	mieszanka shKIF3C#1-3 (po 100 ng)	pSUPER (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
shKIF3C-shTSC1	mieszanka shKIF3C#1-3 (po 100 ng)	shTSC1 (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)
shKIF3C-shTSC2	mieszanka shKIF3C#1-3 (po 100 ng)	shTSC2 (300 ng)	β actin-GFP (300 ng)

3.5.2. Nukleofekcja komórek ssaczych przy użyciu elektroporacji

Komórki poddawano nukleofekcji z użyciem elektroporatora NEPA21 (Nepagene). W przypadku komórek Rat2 na jeden wariant eksperymentu stosowano 1 mln komórek oraz 10 µg DNA, zaś w przypadku komórek wyizolowanych ze szczurzej embrionalnej kory mózgowej, 5 mln wraz 10 µg DNA. Komórki Rat2 najpierw trypsynizowano zgodnie z opisem w pkt 3.4.2 i zawieszano w pożywce. Następnie zarówno komórki Rat2, jak i pochodzące z kory mózgowej liczone i wirowano 5 min. 1000 obrotów/min. Osad zawieszano w 10 ml pożywki OptiMEM™, po czym ponownie wirowano. Następnie osad zawieszono w takiej objętości OptiMEM™, aby stężenie komórek wynosiło 10 mln/ml dla Rat2, lub 50 mln/ml dla komórek wyizolowanych ze szczurzej, embrionalnej kory mózgowej. W kolejnym kroku 100 µl zawiesiny mieszano z przygotowanym wcześniej DNA, a uzyskaną mieszaninę przenoszono do kuwety elektroporacyjnej. Nukleofekcję przeprowadzano zgodnie z ustawieniami opisanym w Tabeli 3.15. Po zakończeniu programu, do kuwety dodawano 1 ml pożywki hodowlanej bez antybiotyków, a następnie przenoszono do dołków na płytce 12-dołkowej w stosunku 1:4, zawierających również pożywkę bez antybiotyków. Następnego dnia pożywkę zmieniano na pełną.

W Tabelach 3.16 – 3.17 zawarto dokładny skład mieszanin DNA użytych do nukleofekcji komórek w przeprowadzonych eksperymentach.

Tabela 3.16. Ustawienia elektroporatora NEPA21 używane w celu nukleofekcji komórek.

Parametr	Puls I (ang. <i>poring pulse</i>)	Puls II (ang. <i>transfer pulse</i>)
Napięcie	150 V	20 V
Czas trwania pulsu	2,5 ms	50 ms
Interwał między pulsami	50 ms	50 ms
Liczba pulsów	6	5
Szybkość opadania pulsu	10 %	40%
Biegunowość	+/-	+/-

Tabela 3.17. Skład mieszanin użytych do nukleofekcji komórek korowych w DIV 0.

Wariant	Plazmid 1	Plazmid 2	Plazmid 3
Ktrl	EB3-GFP (3,3 µg)	pSUPER (6,6 µg)	-
shTSC2	EB3-GFP (3,3 µg)	pSUPER-shTSC2#2 (3,3 µg)	pSUPER (3,3 µg)
shTSC2 + shKIF21B	EB3-GFP (3,3 µg)	pSUPER-shTSC2#2 (3,3 µg)	shKIF21B#3 (3,3 µg)

3.5.3. Transfekcja linii komórkowej HEK293T przy użyciu chlorku wapnia w celu produkcji wektorów lentiwirusowych

Procedurę produkcji wektorów lentiwirusowych wykonywano w Zakładzie Inżynierii Genetycznej w pomieszczeniu przystosowanym do pracy z GMM kat. II, zgodnie z odpowiednim zezwoleniem Ministerstwa Środowiska. Komórki HEK293T (nie starsze niż 10 pasaż) wysiewano na 24 godz. przed planowaną transfekcją na szalki plastikowe 10 cm w liczbie 6 mln na szalkę. DNA przygotowywano poprzez zmieszanie dwóch plazmidów pakujących (pMD2.G oraz psPAX2) wraz z plazmidem kodującym rekombinowane białko lub shRNA. Dokładne proporcje opisano w Tabeli 3.18. Do przygotowanej mieszaniny DNA dodawano 62,5 µl 2M CaCl₂ i uzupełniano wodą dejonizowaną do 500 µl. Następnie mieszaninę dodawano bardzo powoli, kroplami do 2 x HBS (TAKARA), jednocześnie mieszając poprzez utrzymywanie roztworu na wytrząsarce typu vortex. Po dodaniu całości, roztwór inkubowano bez dostępu światła przez 20 min., a następnie dodawano do komórek HEK293T, którym uprzednio zmieniono pożywkę na 10 ml DMEM bez dodatku FBS. Następnie komórki inkubowano przez 6 godz., po czym zmieniano pożywkę na 6 ml docelowej do produkcji wirusów (opisana w Tabeli 3.9). Po 48 godz. od transfekcji, zbierano pożywkę z nad komórek. Następnie wirowano 5 min 1000 x g i filtrowano przez filtr strzykawkowy (Ø 0,45 µm). Tak uzyskany roztwór porcjowano po 1 ml i zamrażano w -80°C w celu przechowywania.

Tabela 3.18. Proporcje plazmidów używanych do produkcji wektorów lentiwirusowych (system drugiej generacji).

Plazmid	Ilość na jedną szalkę 10 cm
psPAX2	15 µg
pmD2.G	6 µg
Plazmid kodujący białko lub shRNA	20 µg

3.5.4. Transdukcja komórek ssaczy przy użyciu wektorów lentiwirusowych

W celu uzyskania większej liczby zmodyfikowanych komórek niż w przypadku transfekcji liposomami, komórki transdukowano wektorami lentiwirusowymi na bazie systemu pULTRA. Oprócz wyciszenia badanego genu, transdukowane komórki dodatkowo produkowały białko reporterowe, odpowiednio GFP (dla plazmidu pULTRA) lub TdTomato (dla plazmidu pULTRA-Chili). Proces produkcji wektorów lentiwirusowych opisano w punkcie 3.5.3.

Linie komórkowe

Transdukcja linii komórkowych odbywała się poprzez dodanie do świeżo zebranych za pomocą trypsyny komórek, supernatantu zawierającego wektory lentiwirusowe (pkt. 3.5.3) w stosunku 1 mln

komórek na 0,5 ml supernatantu. Następnie mieszaninę inkubowano 40 min. w 37°C, po czym wysiewano na odpowiednią szalkę.

Pierwotne hodowle neuronalne

W przypadku pierwotnych hodowli neuronalnych korowych, komórki świeżo wyizolowane z tkanki tak jak opisano w punkcie 3.5.1 mieszano z supernatantem zawierającym wektory lentiwirusowe (pkt. 3.5.3) w stosunku 2 mln komórek na 0,5 ml supernatantu. Następnie mieszaniny inkubowano w 37°C przez 20 min. po czym wysiewano w pełnej pożywce neuronalnej na odpowiednie szalki.

W przypadku hodowli neuronalnych wzbogacanych o neurony hipokampalne, transdukcje przeprowadzano nie wcześniej niż jeden dzień po wysianiu. W tym przypadku, z komórek rosnących na szalce odbierano połowę pożywki, którą zastępowano supernatantem zawierającym wektory wirusowe. Komórki inkubowano 40 min. w 37°C, po czym całą pożywkę z nad komórek zmieniano na nową.

3.5.5. Selekcja komórkowych linii stabilnych

Linie stabilne Rat2 z wyciszoną ekspresją *Tsc2*

Komórki Rat2 transdukowano zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.5.4 wektorem lentiwirusowym pLKO-shTSC2#2 (opisane w Tabeli 3.7) lub kontrolnym pLKO-TRC-control kodującym sekwencję RNA nie tworzącą struktury spinki. Jako kontrolę selekcji stosowano komórki transdukowane wektorem nieniosącym oporności na puromycynę (najczęściej pULTRA). Po 48 godz. od transdukcji, rozpoczynano selekcję poprzez przesianie komórek do pożywki zawierającej puromycynę w stężeniu 2 µg/ml. Po kolejnych 48 godz. oceniano skuteczność selekcji poprzez porównanie do kontroli negatywnej i w razie sukcesu, komórki ponownie przesiewano tym razem do pożywki z puromycyną w stężeniu 4 µg/ml. Skuteczność selekcji i wyciszenie ekspresji tuberyny sprawdzano techniką Western blot. Uzyskane linie zamrażano w celu długoterminowego przechowywania zgodnie z opisem z punktu 3.4.2.

Linie stabilne z wyciszoną ekspresją genów wybranych kinezyn

W celu jednoczesnego wyciszenia ekspresji *Tsc2*, jak i wybranych kinezyn, linie Rat2 uzyskane zgodnie z opisem w poprzednim punkcie, transdukowano wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA przeciwko wybranym kinezynom. Jako kontroli użyto pULTRA-Chili bez sekwencji kodującej shRNA. Po 48 godz. sprawdzono transdukowane komórki na obecność fluorescencji białka TdTomato, a następnie zebrane komórki w formie zawiesiny przekazano do wykonania sortowania dr Katarzynie Misztal z Pracowni Mikroskopii MIBMiK. Uzyskane po sortowaniu linie pasażowano w celu uzyskania większej liczby komórek, po czym zamrażano w celu przechowania zgodnie z punktem 3.4.2. Wszystkie linie wytworzone na potrzeby pracy opisano w Tabeli 3.8.

3.6. Metody pracy z białkami

3.6.1. Przygotowywanie lizatów białkowych z hodowli komórkowych

Komórki lizowano bezpośrednio na szalce poprzez odebranie pożywki i dodanie 1 x stężonego buforu Laemmliego. Otrzymany lizat zbierano, a następnie denaturowano w przez ogrzewanie w 96°C przez 10 min. W przypadku dłuższego przechowywania próbki mrożono w -20°C, a po rozmrożeniu ponownie podgrzewano przez 10 min. w 96°C.

3.6.2. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących

Do elektroforezy białek w poliakrylamidowym żelu denaturującym SDS-PAGE (ang. *Sodium Dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) używano systemu Mini-Protean III (BioRad). Przygotowywano dwuwarstwowe żełe poliakrylamidowe o 0,1 % zawartości SDS. Górną warstwę stanowił żel zagęszczający o długości około 1,5 cm zawierający 5% mieszaniny akryloamidu/bisakryloamidu i 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), natomiast drugą – żel rozdzielający zawierający 8-12% mieszaninę akryloamidu/bis-akryloamidu i 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8). Stosowane stężenia mieszaniny akryloamidu/bis-akryloamidu w żelu rozdzielającym zależały od masy cząsteczkowej badanych białek. Polimeryzacja żeli była indukowana przez dodanie nadsiarczanu amonu i katalizatora TEMED do stężeń odpowiednio 0,05% i 0,1%. Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x Tris-Glicyna. Początkowo rozdział prowadzono przy napięciu 90 V, a po przejściu czoła barwnika przez granicę żelu rozdzielającego i zagęszczającego, napięcie zmieniano na 130 V. Jako wzorzec mas cząsteczkowych białek stosowano PageRuler Plus Protein Ladder Prestained (Thermo Fisher Scientific).

3.6.3. Technika Western Blot

Transfer na błonę nitrocelulozową

Białka rozdzielone w żelu przenoszono na membranę nitrocelulozową (VWR) metodą mokrego elektrotransferu w buforze Towbina (Towbin, Staehelin i Gordon, 1979). W tym celu używano aparatu firmy BioRad, stosując prąd o stałym natężeniu 400 mA przez 90 min. w temperaturze 4°C. W celu oceny skuteczności transferu membrany barwiono roztworem czerwieni Ponceau S, a następnie barwnik odpłukiwano wodą dejonizowaną. Membranę blokowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej w buforze TBST-M.

Inkubacja z przeciwciałami

Po blokowaniu membranę inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym odpowiednio rozcieńczonym w buforze TBST-M lub TBST-BSA zależnie od zaleceń producenta przeciwciała. Po całonocnej inkubacji membranę płukano 3 razy po 10 min. buforem TBST, a następnie inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym

sprężonym z peroksydazą chrzanową rozcieńczonym w buforze TBST-M. Po zakończeniu inkubacji membranę ponownie płukano TBST (3 x 10 min.).

Obrazowanie wyników

Wyniki obrazowano poprzez reakcję chemiluminescencji (ECL, ang. *enhanced chemiluminescence*) w ciemni fotograficznej. W tym celu bezpośrednio na membranę dodawano 10 ml bufor do ECL wraz z dodatkiem 5 μ l 30 % nadtlenu wodoru i inkubowano 1 min. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, usuwano nadmiar buforu, a na błonę przykładano kliszę rentgenowską. Czas naświetlania dobierano każdorazowo do eksperymentu. Klisze wywoływano przy użyciu maszyny do zdjęć rentgenowskich.

3.7. Barwienie preparatów komórkowych technikami immunocytochemicznymi

3.7.1. Utrwalanie komórek

Linie komórkowe oraz pierwotne szczurze neurony hodowane na szkiełkach utrwalano, najczęściej poprzez dodanie bezpośrednio na komórki PFA w temperaturze pokojowej. W przypadku, gdy celem było zachowanie jak najlepiej elementów cytoszkieletu, do utrwalania stosowany był schłodzony do -20°C metanol z 2 mM EGTA lub roztwór Triton-PFA. Utrwalanie prowadzono przez 10 min., po tym czasie komórki płukano 3 x PBS. Uzyskane preparaty zaklejało poprzez umieszczenie na kropli odczynnika ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific) na powierzchni szkiełka podstawowego, lub barwiono immunofluorescencyjnie zgodnie z punktem 3.7.2.

3.7.2. Barwienie komórek przy użyciu przeciwciał

Utrwalone komórki poddawano w pierwszej kolejności blokowaniu w buforze GDB z 5 % surowicą ośłą przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie szkiełka płukano 1 x PBS i umieszczano w komorze wilgotnej z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w buforze GDB z 5 % ośłą surowicą. Inkubacje prowadzono przez noc w 4°C . Następnego dnia szkiełka płukano 3 x PBS, a następnie inkubowano w komorze z roztworem przeciwciał drugorzędowych sprężonych z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa FluorTM przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie płukano komórki 3 x PBS, przy czym do drugiego płukania używano roztworu barwnika Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific) w PBS o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$. Po zakończeniu płukania, każde szkiełko zanurzano w wodzie dejonizowanej, suszono przez krótki kontakt z ręcznikiem papierowym po czym umieszczano na kropli preparatu ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific) na powierzchni szkiełka podstawowego. Preparaty do czasu obrazowania przechowywano w 4°C , a w przypadku długotrwałego przechowywania w -20°C .

3.8. Rejestracja obrazów mikroskopowych

3.8.1. Mikroskopia fluorescencyjna

Obrazowanie komórek nerwowych wykazujących fluorescencję na skutek nadprodukcji GFP, wykonywano przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse 80i. Zdjęcia zbierano wykorzystując obiektyw 40x przy czasie naświetlania wynoszącym 200 ms. O ile nie napisano inaczej, w miarę możliwości zbierano po 10 zdjęć z jednego preparatu co przy dwóch powtórzeniach technicznych dawało 20 zdjęć na wariant.

3.8.2. Mikroskopia konfokalna

Obrazy z preparatów wymagających bardziej złożonych analiz, rejestrowano przy użyciu systemu mikroskopowego Carl Zeiss LSM800. Używano obiektywów 40x oraz 63x z immersją olejową. W obrębie eksperymentu sygnał zbierano przy identycznych ustawieniach mocy lasera i parametrach czułości fotopowielacza przy rozdzielczości 1024 x 1024 pikseli. O ile nie napisano inaczej, zbierano w miarę możliwości po 10 zdjęć z jednego preparatu, co przy dwóch powtórzeniach technicznych dawało 20 zdjęć na wariant. Obrazy uzyskiwano w formie tzw. „z-stack” czyli serii zdjęć wykonanych w różnych odległościach ogniskowych. Uzyskane serie zdjęć opracowywano w programie ImageJ. Zależnie od potrzeb wykonywano projekcje maksymalnej intensywności (ang. *max intensity projection*, MIP), lub tworzono filmy poklatkowe przedstawiające obrót wygenerowanego przez program modelu trójwymiarowego wzdłuż osi Y.

3.8.3. Obrazowanie przyżyciowe

Do obrazowania przyżyciowego komórek używano mikroskopu konfokalnego z wirującym dyskiem (ang. *spinning disc*) Andor Revolutions XD. System mikroskopowy był wyposażony w komorę, umożliwiającą inkubację obserwowanych komórek w stałej temperaturze 37°C i 5% stężeniu CO₂. Komórki obserwowano z użyciem obiektywu 63x, a w przypadku niektórych eksperymentów również ustawiając Optovar (wydłużający ogniskową obiektywu) na 1,6, co skutkowało ostatecznym powiększeniem 100,8x. Obraz zbierano w formie filmu poklatkowego (ang. *timelapse*), najczęściej przez 3 min. z interwałem 0,3 sek. pomiędzy klatkami i czasem naświetlania 200 ms, co skutkowało zebraniem 600 klatek. Uzyskane obrazy miały rozdzielczość 1004 x 1002 pikseli.

W przypadku konieczności identyfikacji aksonu w obserwowanych przyżyciowo neuronach, przygotowano przeciwciało rozpoznające neurofascynę, poprzez zmieszanie z odczynnikiem Mix-n-Stain™ CF640™ (Biotum) zgodnie z protokołem producenta. Umożliwiało to wyznakovanie przeciwciała z metką fluorescencyjną CF640. Następnie tak przygotowane przeciwciało dodawano do pożywki z obrazowanymi komórkami na 30 min. Po tym czasie pożywkę zmieniano, a akson obrazowano przy użyciu lasera o długości fali 640 nm.

3.9. Analiza obrazów mikroskopowych

Wszystkie analizy prowadzone były w programie ImageJ w dystrybucji Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>).

3.9.1. Pomiary morfometryczne komórek

Pomiary morfometryczne neuronów odbywały się poprzez obrysowanie i zmierzenie ciała komórki, oraz zależnie od eksperymentu również zliczenie wszystkich widocznych zakończeń dendrytycznych. Pomiaru rzęsek dokonywano poprzez wyodrębnienie obiektu zidentyfikowanego jako rzęska, utworzeniu maski binarnej, a następnie funkcję analizy cząsteczek (ang. *analyze particles*). Długość rzęski mierzono jako średnicę Fereta. Zależnie od eksperymentu mierzono również intensywność fluorescencji w danym kanale, wyrażoną jako uśredniona wartość poziomu szarości (ang. *mean grey value*, mgv) w obrębie komórki bądź wydzielonego jej fragmentu.

W przypadku analiz rzęsek na modelach trójwymiarowych, w pierwszej kolejności tworzono projekcje trójwymiarowe (3D, ang. *3D projection*) w pełnym obrocie o 360 stopni z krokiem, co jeden stopień i interpolacją. Następnie mierzone obiekty były izolowane z reszty obrazu i zamieniane w maski binarne. Długość tak uzyskanych modeli była mierzona na każdej klatce filmu przedstawiającego obrót, a następnie największa uzyskana wartość traktowana jako pomiar długości rzęski.

3.9.2. Analiza filmów poklatkowych

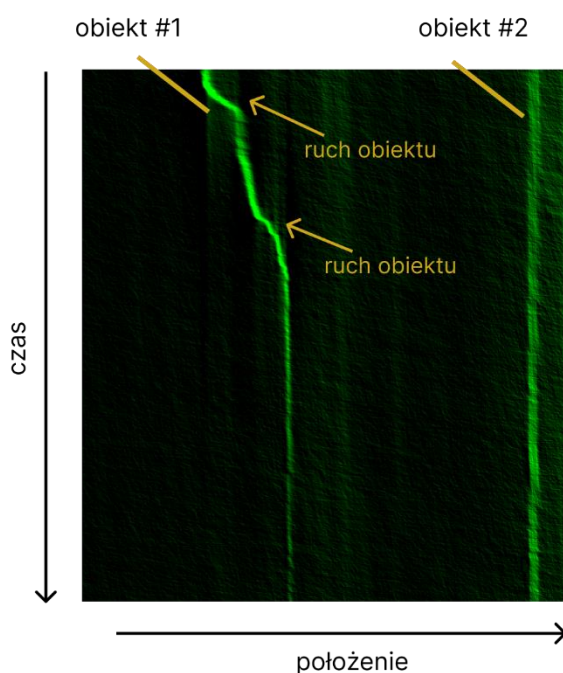
Analiza przy użyciu rozszerzenia TrackMate

Filmy poklatkowe rejestrowane podczas eksperymentów przyżyciowych, na których liczono wszystkie obiekty obecne w polu widzenia były analizowane przy pomocy oprogramowania ImageJ z rozszerzeniem „TrackMate” (Tinevez i in. 2017). Poruszające się obiekty wykrywano przy progu jakości sygnału (ang. *threshold*) równym 0,5 i średnicy wykrywanego obiektu ustawionej na 20 pikseli, chyba że zaznaczono inaczej. Uzyskane w ten sposób dane analizowano na dwa sposoby. W przypadku, kiedy zbierano dane o wszystkich ruchach, ale bez rozróżnienia ich kierunku wykorzystywano informacje o szlakach pokonanych przez mierzone obiekty (ang. *track statistics*) i na ich podstawie określano: średnią przebytą drogę, czas trwania ruchu oraz szybkość uzyskaną przez mierzone obiekty. W przypadku eksperymentów, gdzie znaczenie miał kierunek ruchu, wykorzystywano informację o pojedynczych obiektach (ang. *spots*) i ich lokalizacji w płaszczyźnie zdjęcia. Na podstawie zaznaczonego uprzednio punktu odniesienia (najczęściej środka komórki, chyba, że zaznaczono inaczej), określano odległość danego punktu na danej klatce. Następnie, aby określić wypadkowy kierunek, liczono korelację Pearsona pomiędzy dystansem od punktu odniesienia, a czasem w postaci numeru klatki. Korelacja w zakresie 0,5 – 1 uznawana była za rosnącą, a ponieważ dystans do punktu odniesienia rósł, kierunek był określany jako „na zewnątrz”. Analogicznie w przypadku korelacji w zakresie od -1 do -0,5, dystans malał, a tym samym kierunek oznaczano jako „do środka”. Wartości

pomiędzy, interpretowane były jako ruchy „oscylujące” bez określonego kierunku. Dalsze pomiary całkowitej przebytej drogi, prędkości lub czasu utrwalania wyliczane były już w oparciu na podział według kierunku ruchu. Wspomnianych obliczeń dokonywano w środowisku RStudio.

Analiza przy użyciu rozszerzenia KymographClear

W przypadku filmów poklatkowych, na których kluczowe znaczenie miała analiza obiektów poruszających się wzdłuż konkretnej ścieżki (np. dendrytu komórki nerwowej) wykorzystywano rozszerzenie KymoGraph clear do programu ImageJ (Mangeol, Prevo, i Peterman 2016). W pierwszej kolejności zaznaczano interesujący dendryt bądź akson. Następnie uzyskiwano kimogram będący dwuwymiarową reprezentacją ruchu, gdzie oś pozioma odpowiada pozycji obiektu na wcześniej wyznaczonej jednowymiarowej drodze, zaś oś pionowa oznaczona klatkę filmu a tym samym punkt w czasie. Na Ryc. 3.1 przedstawiono schemat przykładowego kimogramu.. Analizy dokonywano ręcznie, uwzględniając całkowitą pokonaną drogę, szybkość, jak i liczbę przerw.



Ryc. 3.1. Schemat objaśniający analizę kimogramu. Kimogram stanowi wykres jasności pikseli na jednowymiarowej drodze (oś x) w czasie (oś y). Poruszające się jaśniejsze obiekty, tworzą na wykresie charakterystyczny wzór. Na załączonym przykładzie, początkowo nieruchomy obiekt #1 wykonał w zmierzonym czasie dwa krótkie ruchy zakończone postojem. Obiekt #2 przez cały czas filmu poklatkowego pozostawał nieruchomy.

3.10. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej oraz graficznych prezentacji wyników, używano środowiska programistycznego „R” (CRAN) oraz aplikacji RStudio (Posit). Analizowane dane testowano na zgodność z rozkładem normalnym poprzez test Shapiro-Wilka. Dla danych o rozkładzie zbliżonym do normalnego, używano testów parametrycznych. O ile nie napisano inaczej, dla dwóch porównywanych grup był to test t studenta, zaś w przypadku poszukiwania efektu w obrębie większej liczby grup stosowaną jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, oraz test Tukeya typu *post-hoc* dla zmierzenia istotności różnic między konkretnymi grupami. W przypadku danych o rozkładzie różnym od normalnego, stosowano testy nieparametryczne. W przypadku pojedynczych porównań obserwacji do kontroli test Manna-Whitneya, zaś w przypadku poszukiwania efektu w obrębie większej liczby grup Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunn. O ile nie napisano inaczej słupki błędów prezentowane na wykresach prezentują standardowy błąd średniej (SEM, ang. *standard error of the mean*). Szczegółowe informacje o zastosowanych testach i liczbie powtórzeń zawarto w opisach poszczególnych rycin i rozdziałach opisujących wyniki. Jeżeli pod ryciną nie wskazano liczby powtórzeń (N), oznacza to, że dane zostały zebrane z jednego eksperymentu.

4. WYNIKI

Jak opisano we wstępie, zarówno rozwój komórki nerwowej, jak i jej funkcjonowanie po osiągnięciu dojrzałości, wymagają właściwego poziomu aktywności kinazy mTOR oraz sprawnego transportu mikrotubularnego, za który odpowiadają dwie grupy białek – dyneiny oraz kinezy. Wcześniejsze badania prowadzone w Laboratorium Biologii Molekularnej i Komórkowej w ramach pracy doktorskiej dr Aleksandry Tempes wykazały, że właściwy poziom aktywności mTORC1 reguluje efektywność transportu wybranych ładunków dyneiny (np. endosomów i lizosomów) w aksonach, oraz zwiększa liczbę oddziaływań dyneiny-dynaktyny z kompleksem AP2 (Tempes, Bogusz, Brzozowska, Weslowski et al., 2024), służącym jako adaptor w aksonalnym transporcie amfiosomów. Jednak do momentu rozpoczęcia opisywanych w niniejszej rozprawie badań, w literaturze brakowało informacji na temat udziału kinazy mTOR w regulacji funkcji kinezyn, w szczególności w warunkach nadaktywności tej kinazy, charakteryzujących m.in. stwardnienie guzowate. W związku z tym celem opisywanej tu pracy było sprawdzenie, czy istnieje zależność pomiędzy mTOR i którąś z licznych kinezyn, oraz czy istnieją kinezy istotne dla niekontrolowanego wzrostu neuronu w modelu *in vitro* stwardnienia guzowatego.

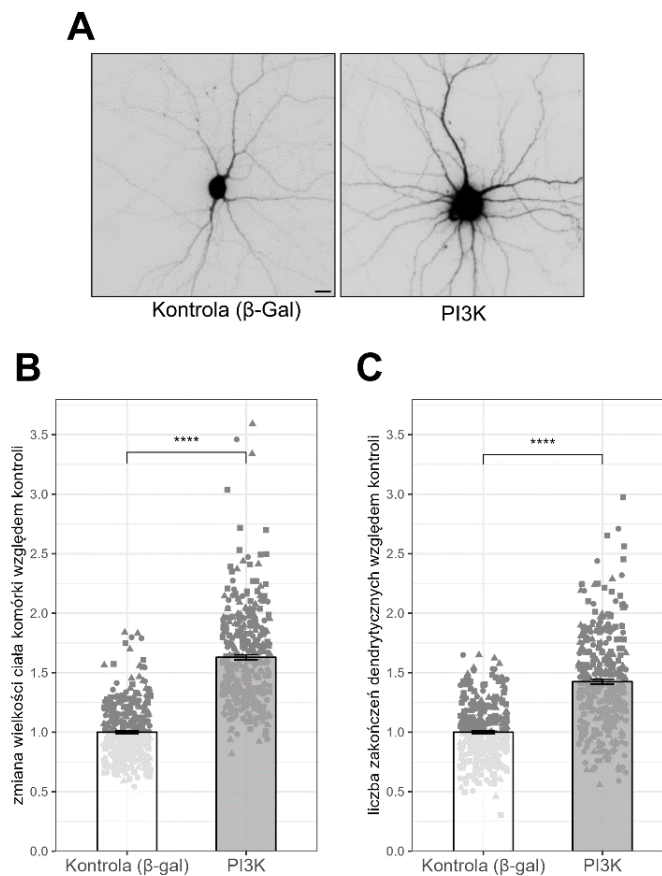
4.1 Poszukiwanie kinezyn kluczowych dla nadmiernego wzrostu neuronu, w fenotypie nadaktywnego mTOR.

4.1.1 Pierwszorzędowe badanie przesiewowe

W celu identyfikacji kinezyn istotnych dla patologicznego rozwoju neuronu wynikającego z hiperaktywacji ścieżki sygnałowej mTOR, wykorzystano rutynowo stosowany w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej model szczurzych, embrionalnych hodowli neuronalnych wzbogaconych o neurony hipokampalne (J. Jaworski 2005; Swiech i in. 2011; M. Urbanska i in. 2012), w dalszej części pracy nazywane hodowlami neuronów hipokampalnych.

Do pierwszorzędowego badania przesiewowego postanowiono wykorzystać plazmid kodujący rekombinowane białko p110-CAAX, będące konstytutywnie aktywną podjednostką PI3-kinazy, w dalszej części pracy określane jako PI3K. Białko to jest silnym aktywatorem ścieżki mTOR i ma znaczny, dobrze opisany wpływ na morfologię neuronu (J. Jaworski 2005). Wybór tak silnego aktywatora ścieżki mTOR wynikał z jednej strony z potrzeby sprawdzenia założonego modelu, ale również przy tak licznej rodzinie białek jak kinezy, miał uprościć wstępną selekcję, jako że spodziewana zmiana fenotypu powinna być łatwo zauważalna. Istotnie, już wstępne eksperymenty wykazały, iż transfekcja tym plazmidem neuronów hipokampalnych skutkuje 60 % wzrostem powierzchni ciała komórki oraz 40 % większą liczbą zakończeń dendrytycznych względem kontroli w ciągu pięciu dni. (Ryc. 4.1). Aby sprawdzić, które z kinezyn mogą być istotne w tym procesie, wykorzystano bibliotekę shRNA (ang. *small hairpin RNA*) przeciwko mRNA kodującym kinezy,

opracowaną przez dr Joanne Lipkę na bazie plazmidu pSUPER. W banku znalazły się po 3 plazmidy pSUPER kodujące sekwencje shRNA skierowane przeciwko szczurzym homologom 38-śmiu z 45 znanych ludzkich genów kodujących łańcuchy ciężkie kinezyn. W momencie tworzenia banku, nie wszystkie ludzkie geny kinezyn, posiadały w bazach danych, znane sekwencje szczurzych homologów. Tym samym do brakujących w banku i zarazem nie sprawdzonych w niniejszej pracy, należą: KIF1C, KIF10, KIF17, KIF19A, KIF19B KIF20B oraz KIF25. Wszystkie wykorzystane sekwencje zostały zawarte w Tabeli 3.5.



Ryc. 4.1. Wpływ nadprodukcji aktywnej formy PI3K w rozwijających się neuronach na ich morfologię. **A.** Przykładowe obrazy mikroskopowe ukazujące morfologię 15-dniowych komórek nerwowych transfekowanych w 8-mym dniu hodowli plazmidem kodującym aktywną formę PI3K (PI3K), lub β -gal (Kontrola), oraz GFP. Skala = 10 μ m. **B.** Wynik analizy powierzchni ciała komórki transfekowanych jak w **A.** **C.** Wynik analizy liczby zakończeń dendrytycznych neuronów transfekowanych jak w **A.** Dane przedstawiono jako średnie wartości, słupki błędów oznaczają SEM. Szarymi punktami oznaczono pojedyncze pomiary, normalizowane przez podzielenie przez średnią wartość kontroli z danego eksperymentu. **** $p < 0,001$ (test Manna-Whitneya). Przedstawiono zbiorcze dane z 18 płytek eksperymentalnych (N = 18). Całkowita liczba pomiarów (n): Kontrola (β -gal) – 349, PI3K – 351.

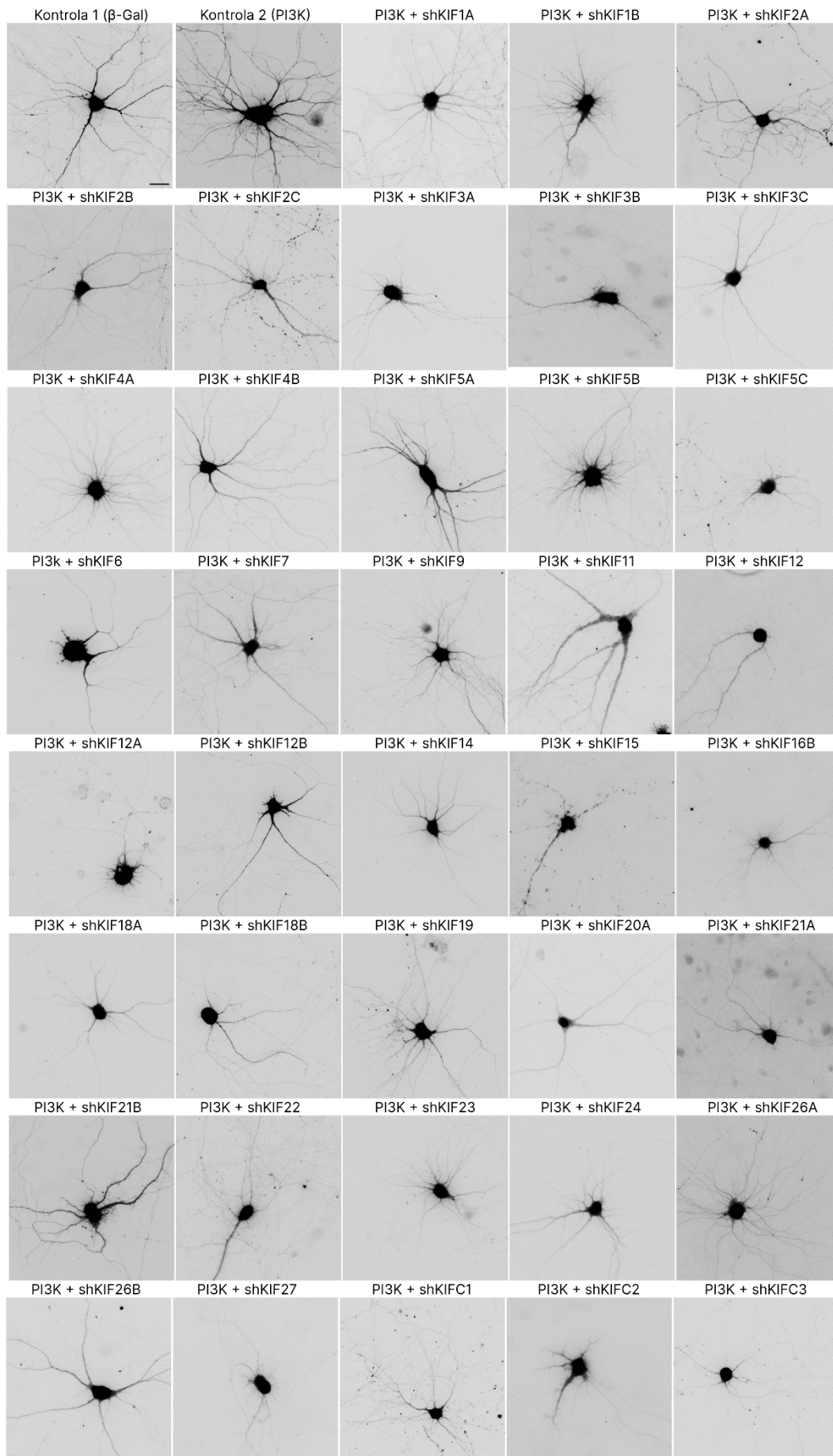
Zaprojektowane mieszaniny DNA do transfekcji neuronów, zawierały plazmidy pSUPER kodujące trzy sekwencje shRNA przeciwko wybranej kinezynej, oraz plazmid kodujący PI3K. W eksperymencie zastosowano również dwie kontrole – negatywną nazywaną Ktrl-1, oraz pozytywną określaną jako Ktrl-2. Kontrola negatywna zawierała plazmid pSUPER, niekodujący shRNA oraz plazmid kodujący β -galaktozydazę zamiast PI3K. Kontrola pozytywna zaś, zawierała PI3K analogicznie do próbki badawczej, jednak podobnie jak w Ktrl-1 w skład mieszaniny transfekcyjnej wchodził plazmid pSUPER. Do wszystkich próbek dodatkowo dodawano plazmid β -actin-GFP kodujący białko zielonej fluorescencji, aby umożliwić wizualizację stransfekowanych komórek. Całkowita masa plazmidów kodujących shRNA na dołek na płytce 24-dołkowej wynosiła 300 ng, zaś suma całego DNA 900 ng, co stanowi optymalną ilość na podstawie wcześniejszych eksperymentów przeprowadzanych w laboratorium (Malik i in. 2015; Perycz i in. 2011). Dokładny skład mieszanin transfekcyjnych użytych w eksperymencie znajduje się w Tabeli 3.12

Transfekcji szczurzych neuronów hipokampalnych dokonywano w ósmym dniu hodowli, zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.5.1. Dla każdego wariantu eksperymentalnego oraz obu kontroli, wykonywano dwa powtórzenia na jednej płytce 24-dołkowej. Komórki utrwalano w dniu trzynastym. Uzyskane preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej zgodnie z punktem 3.8.1. Przykładowe mikrofotografie neuronów dla każdego wariantu przedstawiono na Rycinie 4.2. Uzyskane obrazy analizowano pod kątem wielkości ciała komórki oraz liczby zakończeń dendrytycznych. Dla każdej mieszaniny shRNA skierowanych przeciwko mRNA danej kinezynej wykonano trzy powtórzenia biologiczne, za każdym razem z niezależnymi kontrolami na szalce. Aby zminimalizować różnice wynikające ze naturalnej zmienności pierwotnych hodowli neuronalnych, wszystkie pomiary były normalizowane poprzez podzielenie przez średnie wartości Ktrl-1 z danej płytki.

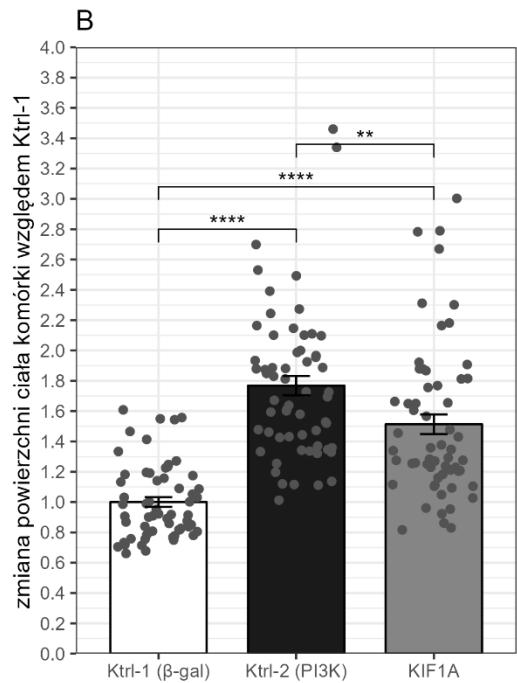
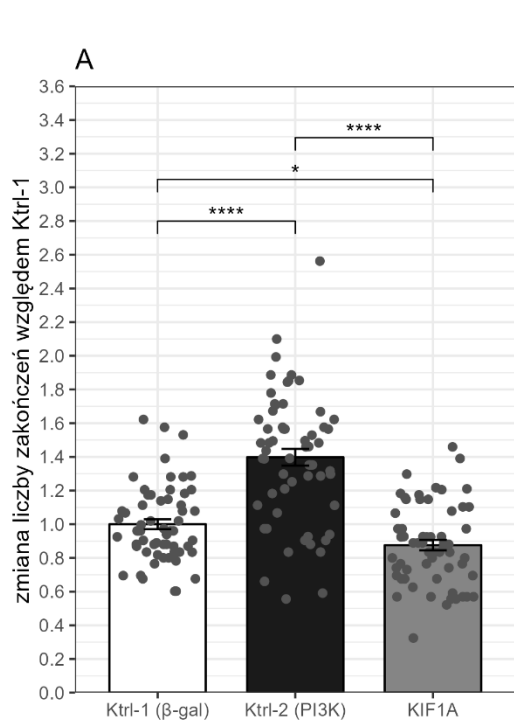
Otrzymane wyniki przedstawiono na trzy sposoby. Na Rycinie 4.3.1-4.3.37 znajdują się pojedyncze wykresy obrazujące bezpośrednie porównanie pomiarów neuronów transfekowanych PI3K oraz shRNA przeciwko danej kinezynej do Ktrl-1 (β -gal) oraz Ktrl-2 (PI3K). Na rycinie 4.4 natomiast dla łatwiejszego zobrazowania różnic, przedstawiono zebrane razem wyniki dla wszystkich badanych kinezyń, zaś poziomy istotności statystycznej odnoszą się do porównań z Kontrolą-2. Ryc. 4.5 natomiast, przedstawia wykres punktowy, ilustrujący wyniki pomiarów względem Ktrl-1, wykorzystując oś X do wskazania średniej liczby zakończeń dendrytycznych zaś oś Y do wskazania średniej powierzchni ciała komórki, gdzie wartości 1 to średnie uzyskane z pomiarów Ktrl-1. W przypadku tej analizy, jeżeli w danym powtórzeniu nie było żywych neuronów, do średniej wliczano 0.

Dla większości badanych próbek udało się zebrać liczbę zdjęć zbliżoną do zakładanych 60 z trzech powtórzeń. Wyjątkami były preparaty dla KIF12 oraz KIF15, dla których zebrano odpowiednio 11 oraz 19 obrazów. W tych dwóch przypadkach, na zdjęciach mikroskopowych przeważały komórki na różnych stadiach apoptozy. Mogło to wynikać zarówno z toksyczności samego stosowanego shRNA przeciwko KIF12 oraz KIF15, jak i z kluczowej roli, którą wyciszane geny pełnią w komórce.

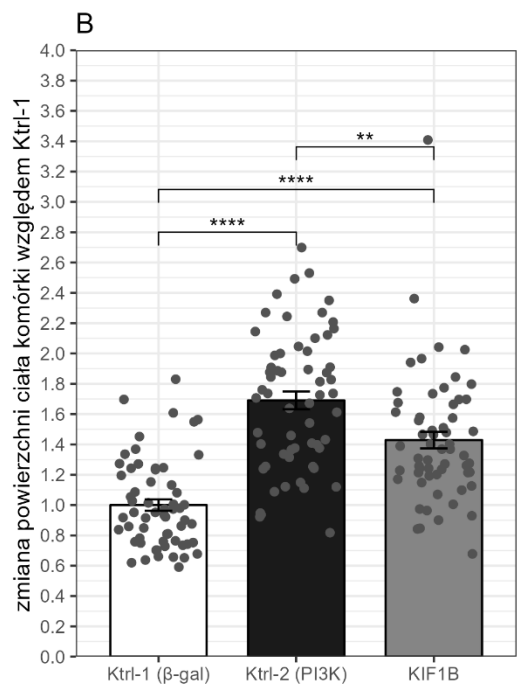
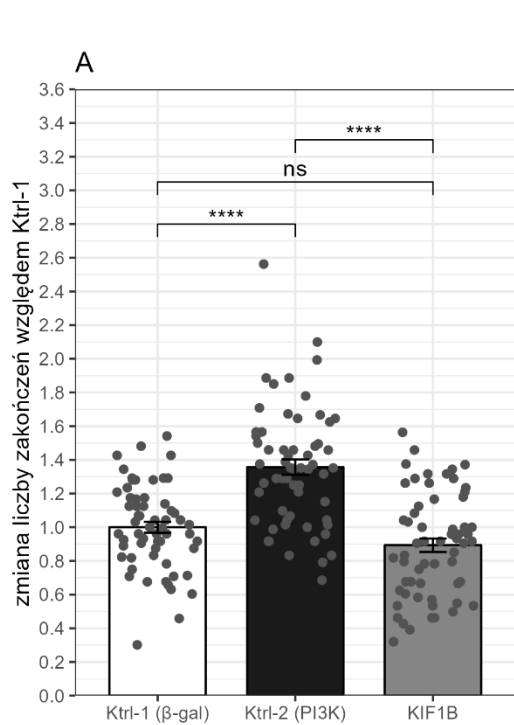
We wszystkich eksperymentach, zarówno ciało komórki, jak i liczba zakończeń dendrytycznych neuronów w Ktrl-2 okazywały się istotnie większe niż u tych z Ktrl-1. W przypadku wariantów z wyciszeniem kinezyn dla zakończeń dendrytycznych wykazano znaczącą różnicę dla niemal wszystkich wariantów eksperymentalnych z wyjątkiem wyciszenia KIF9, KIF4B oraz KIF5B (ryciny 4.3.1 – 4.3.38 panel A oraz 4.4 panel A). Z kolei, dla pomiarów ciała komórki różnic nie wykazano dla: KIF23, KIF7, KIF24, KIF18B, KIF1B, KIF26A, KIF1A, KIF4B, KIF5B, KIF13A, KIF4A, KIF6A, w pozostałych przypadkach notując istotny statystycznie spadek względem Ktrl-2 (ryciny 4.3.1 – 4.3.38 panel B oraz Ryc. 4.4 panel B).



Ryc. 4.2. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe neuronów uzyskane w pierwszorzędownym badaniu przesiewowym. Neurony hipokampalne transfekowano w 8-mym dniu hodowli mieszankami shRNA przeciwko mRNA wybranych kinezyn, aktywną formą PI3K oraz GFP. Ktrl-1 zamiast PI3K zawierała plazmid kodujący β -gal, a zamiast pSUPER-shRNA, plazmid pSUPER bez wstawki. Ktrl-2 również nie zawierała pSUPER-shRNA, jednak była tam obecna PI3K. Komórki utrwalane w dniu 13-nastym. Skala 10 μ m.

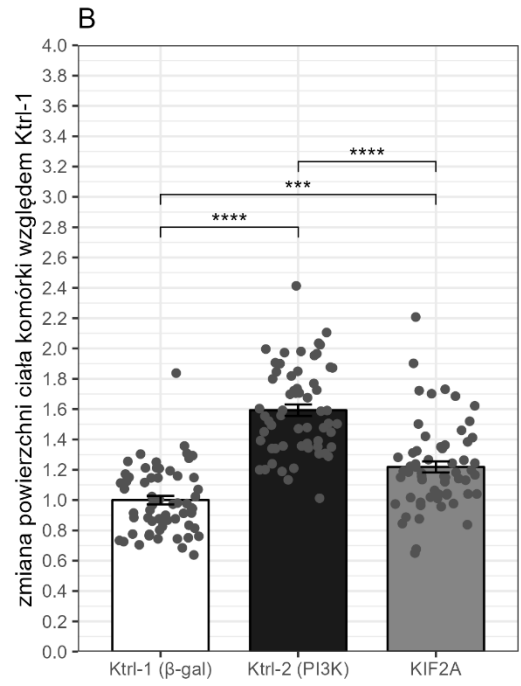
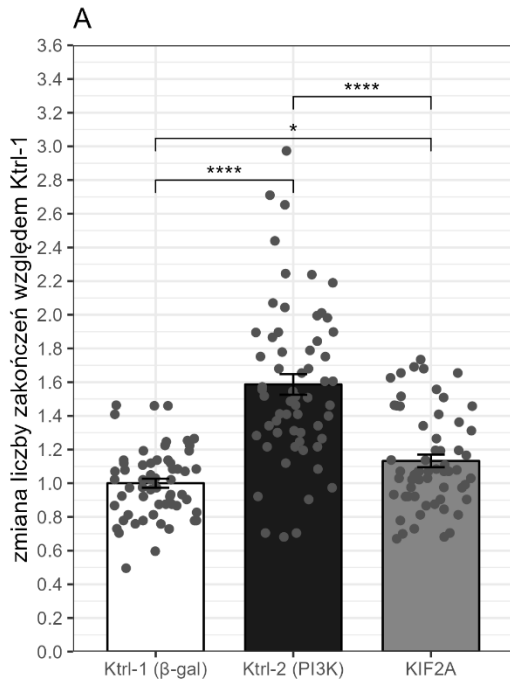


Ryc. 4.3.1



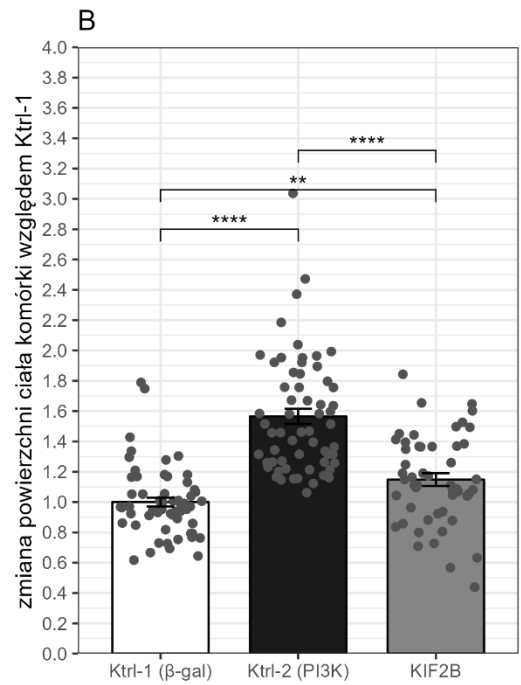
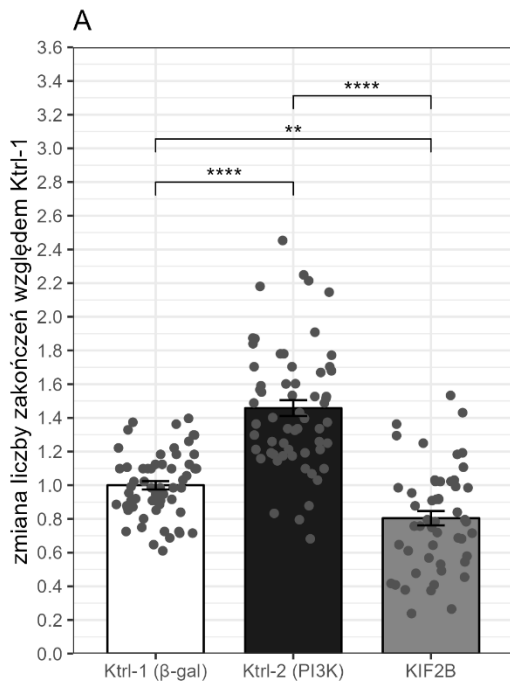
Ryc. 4.3.2

KIF2A

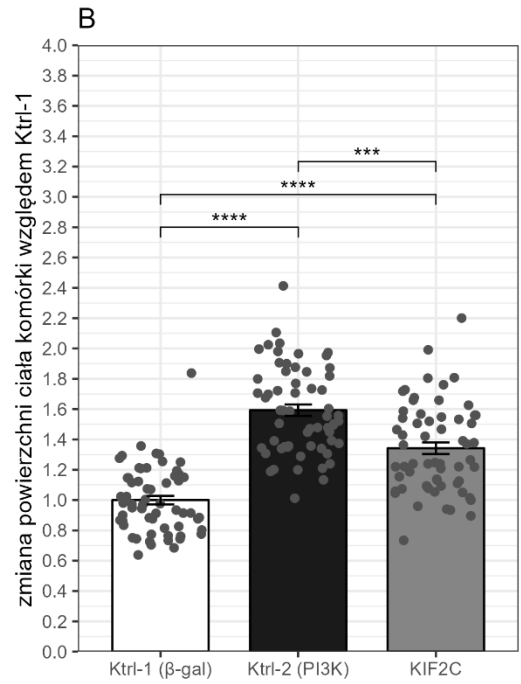
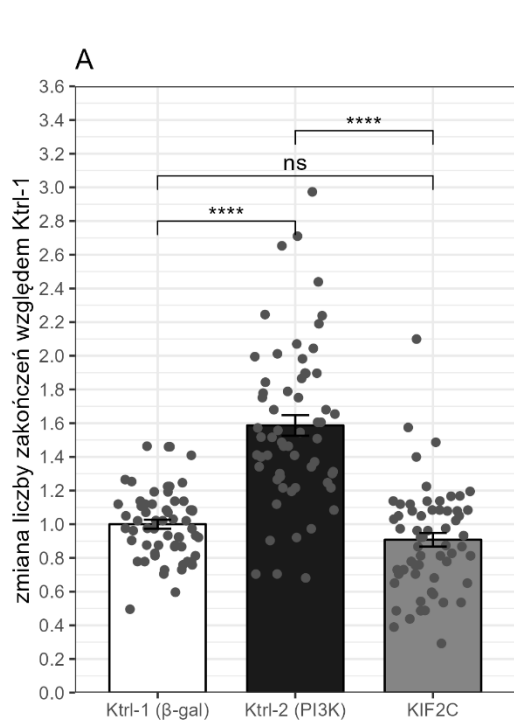


Ryc. 4.3.3

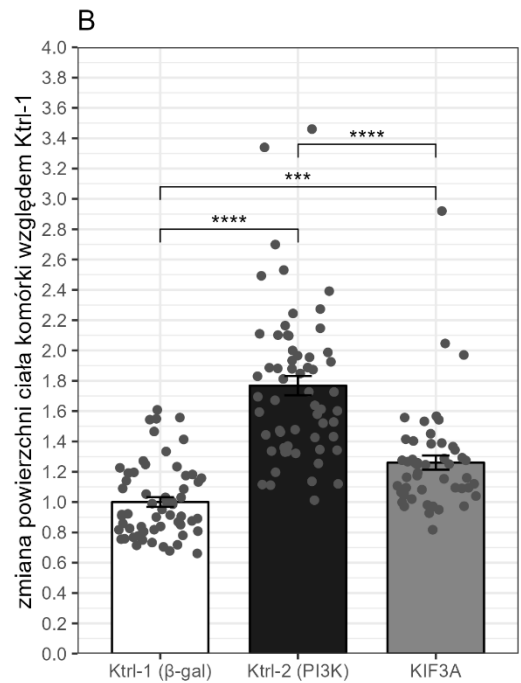
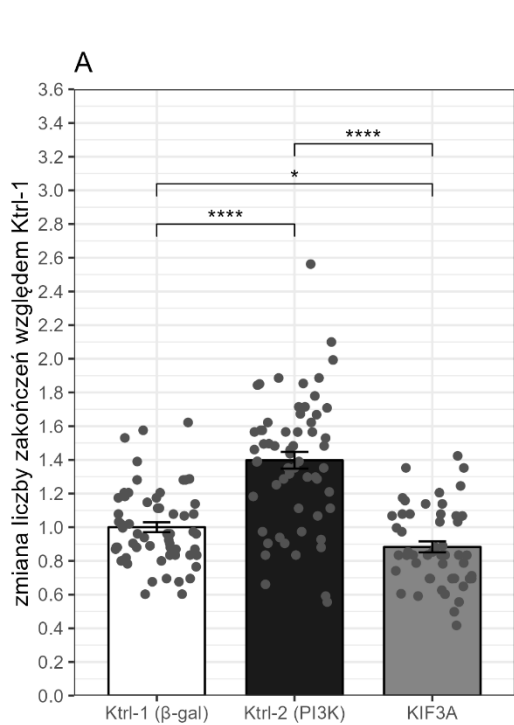
KIF2B



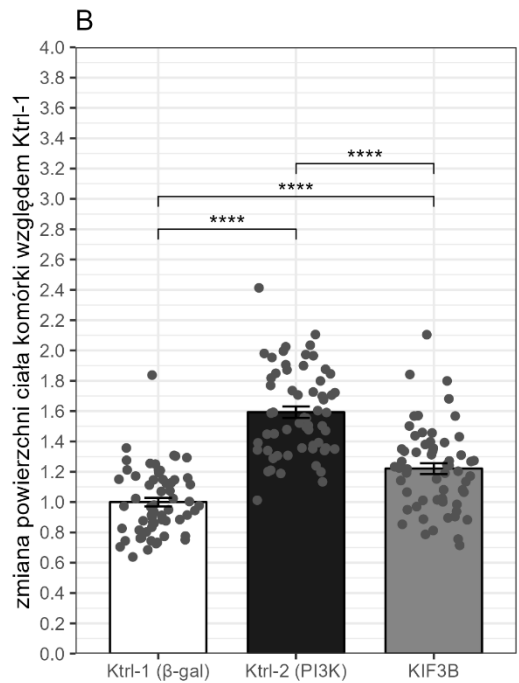
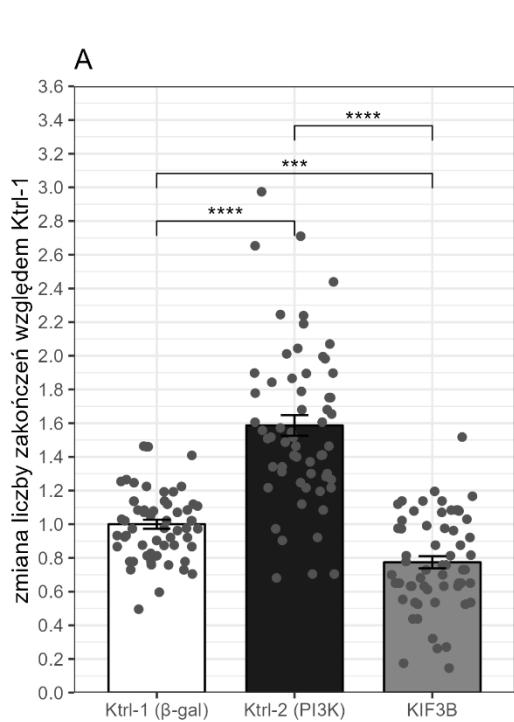
Ryc. 4.3.4



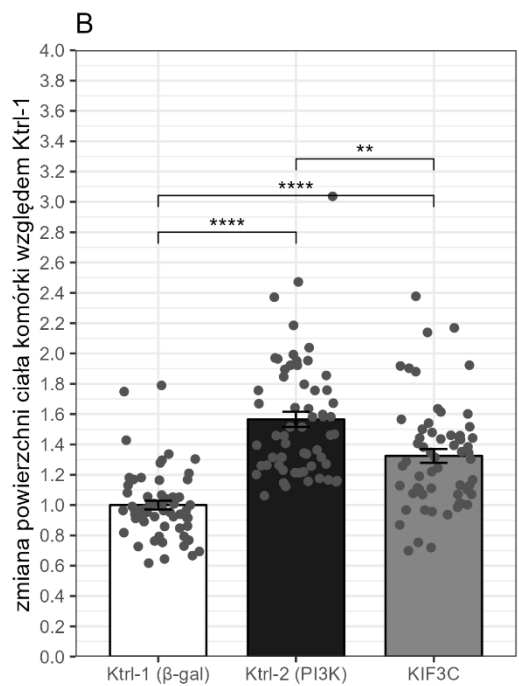
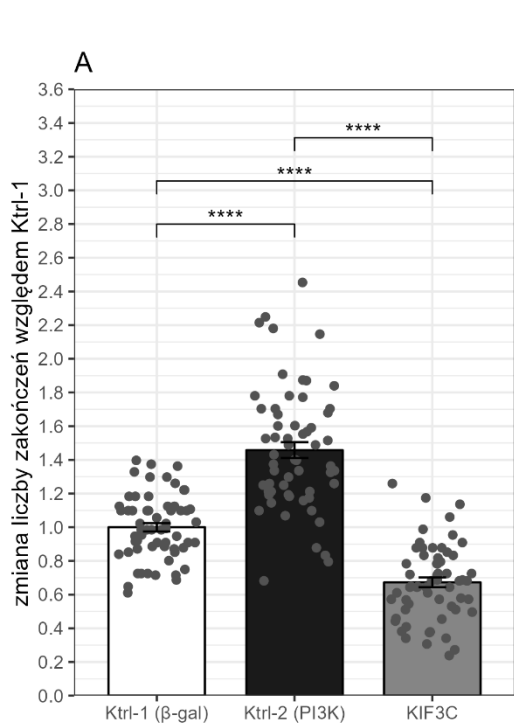
Ryc. 4.3.5



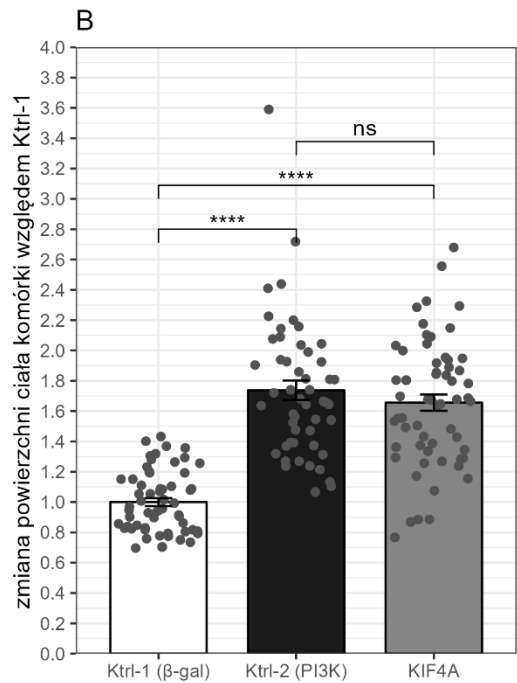
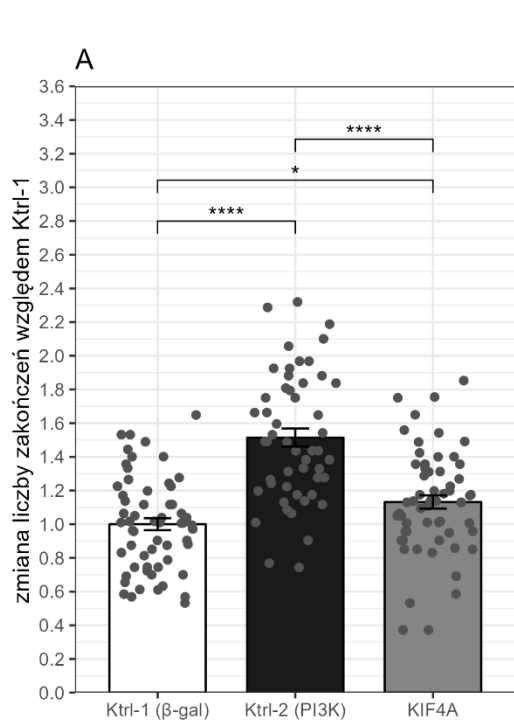
Ryc. 4.3.6



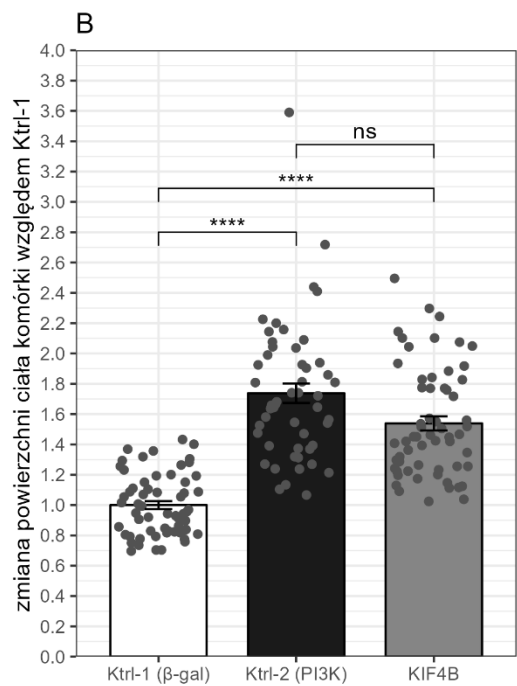
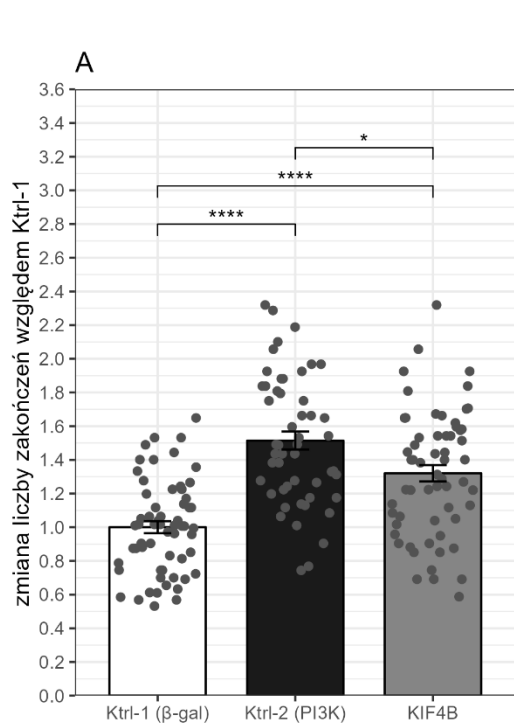
Ryc. 4.3.7



Ryc. 4.3.8

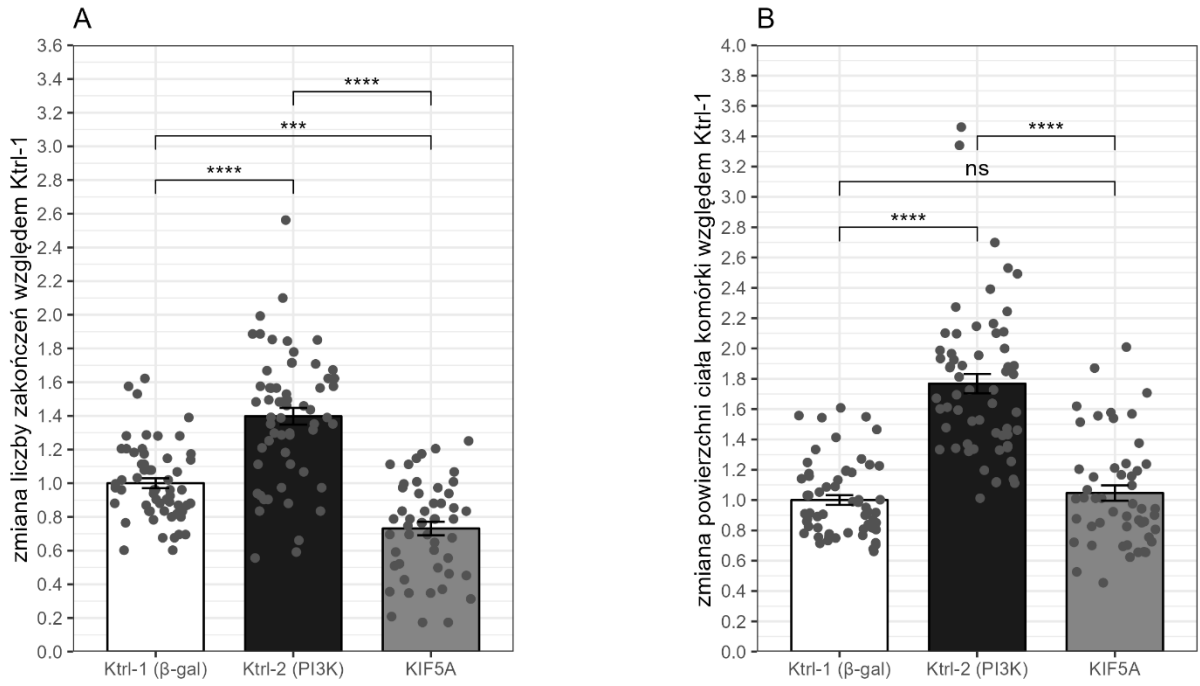


Ryc. 4.3.9



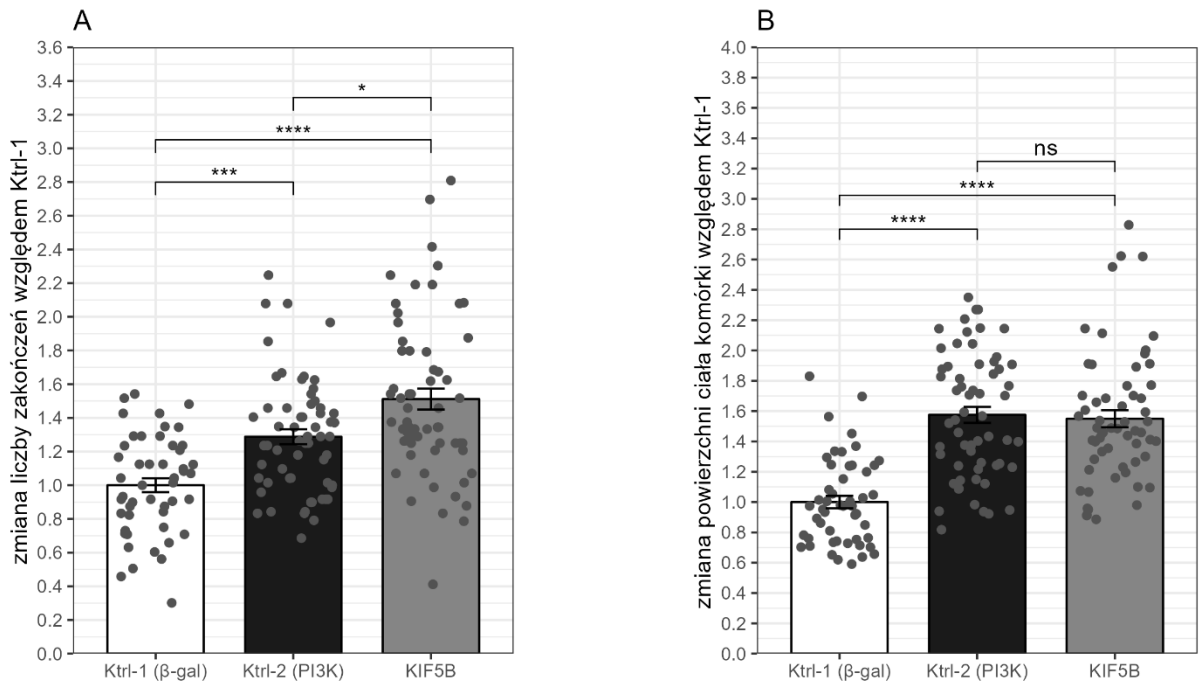
Ryc. 4.3.10

KIF5A

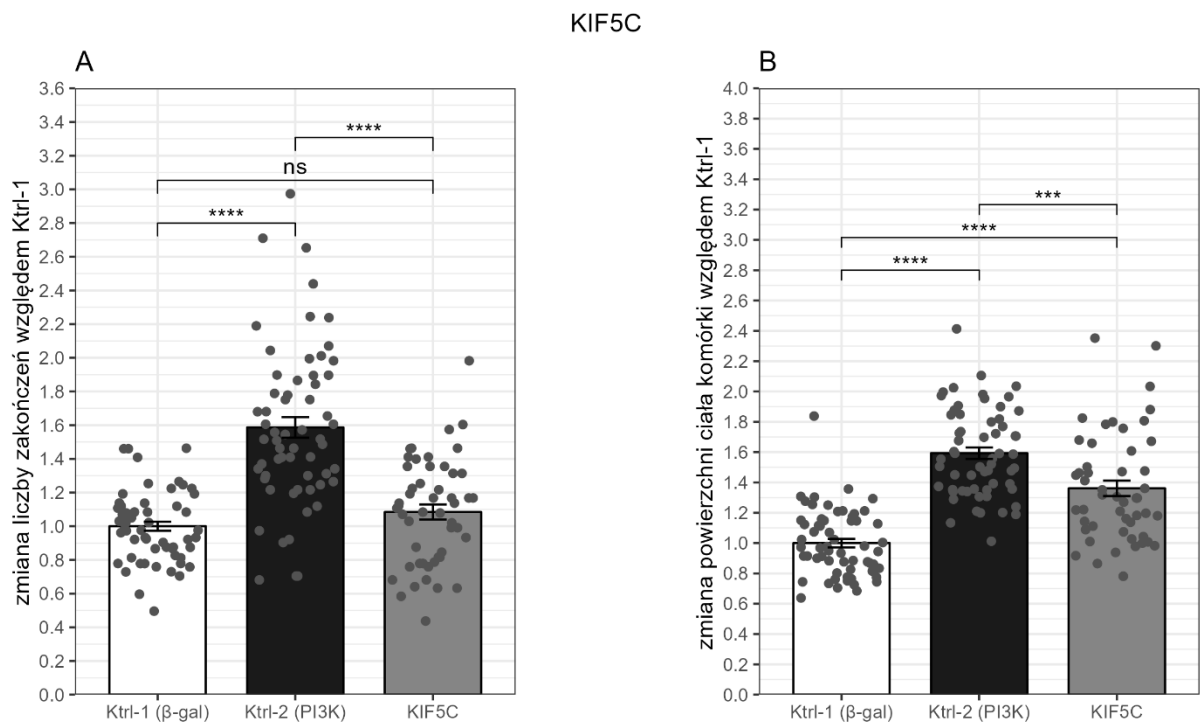


Ryc. 4.3.11

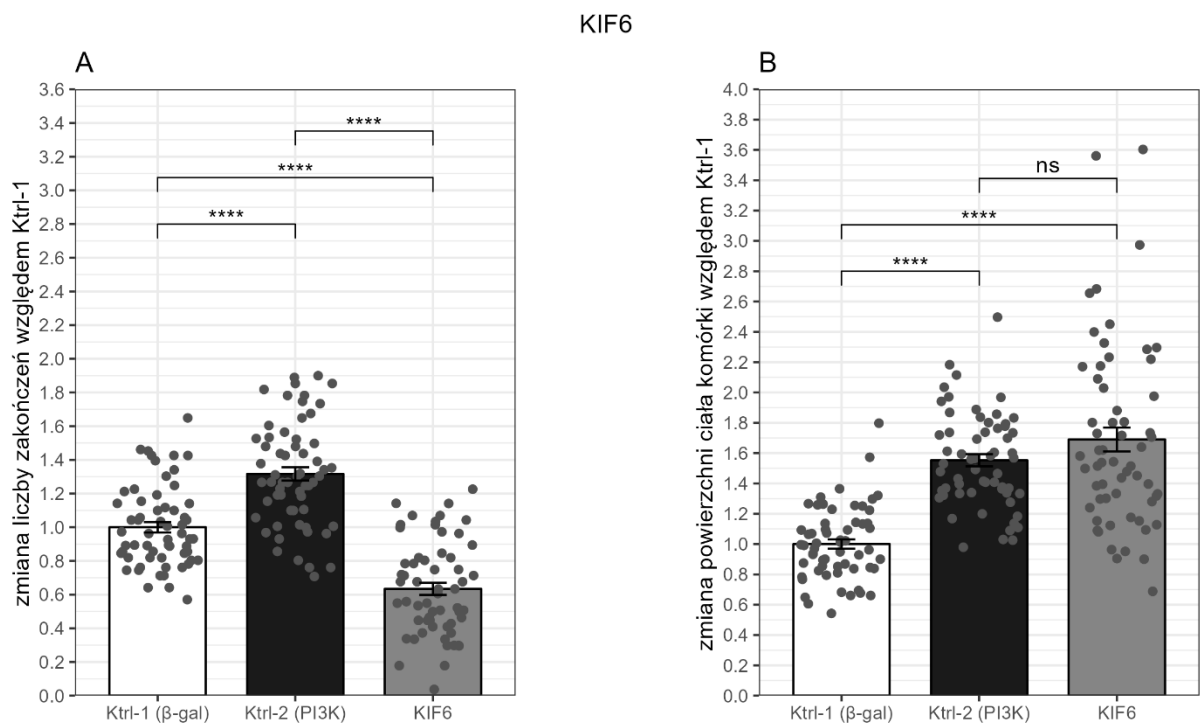
KIF5B



Ryc. 4.3.12

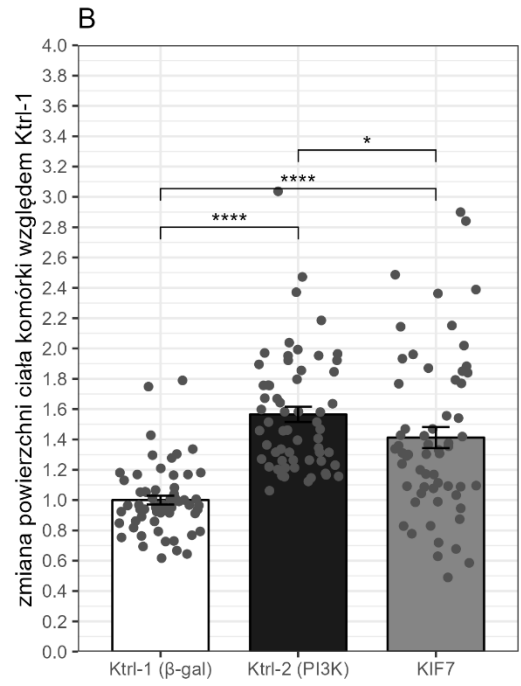
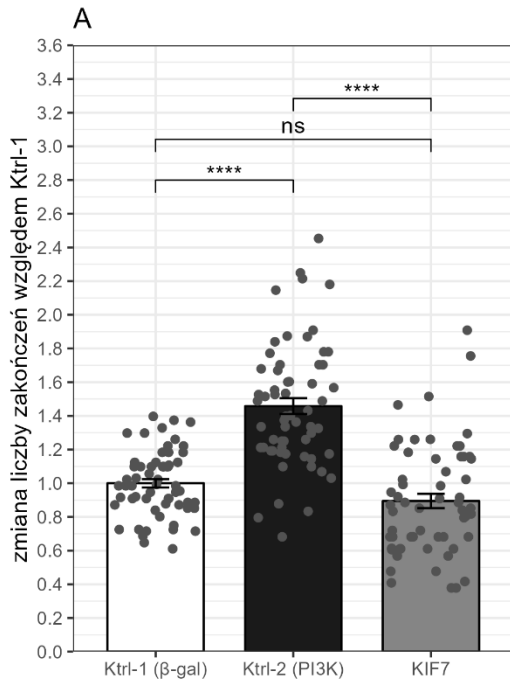


Ryc. 4.3.13



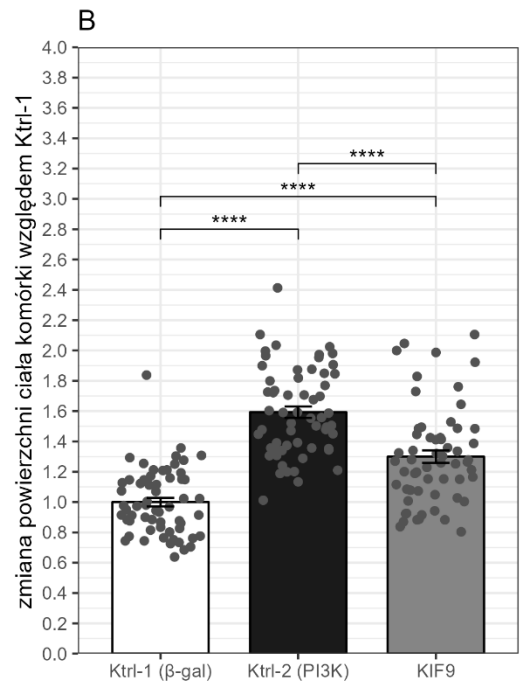
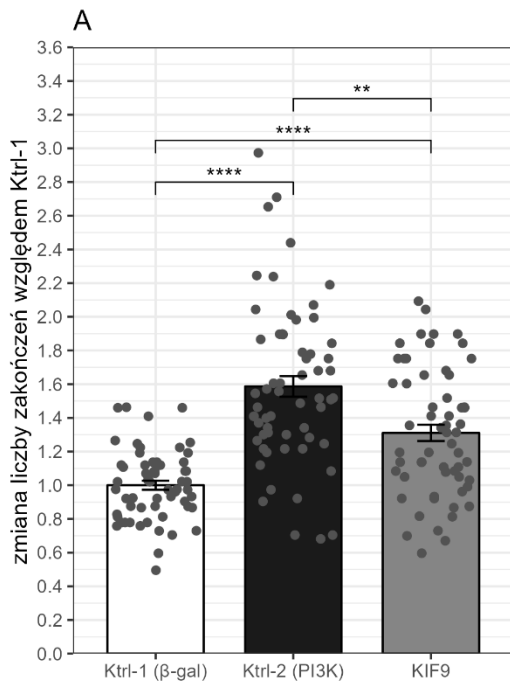
Ryc. 4.3.14

KIF7



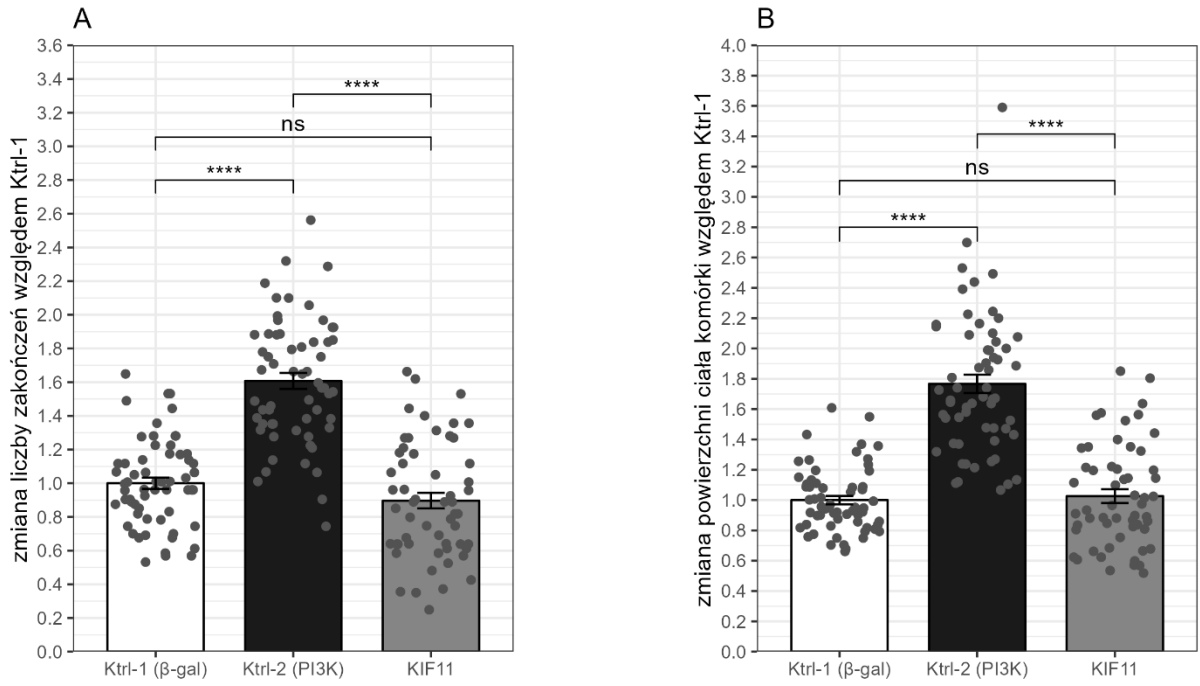
Ryc. 4.3.15

KIF9



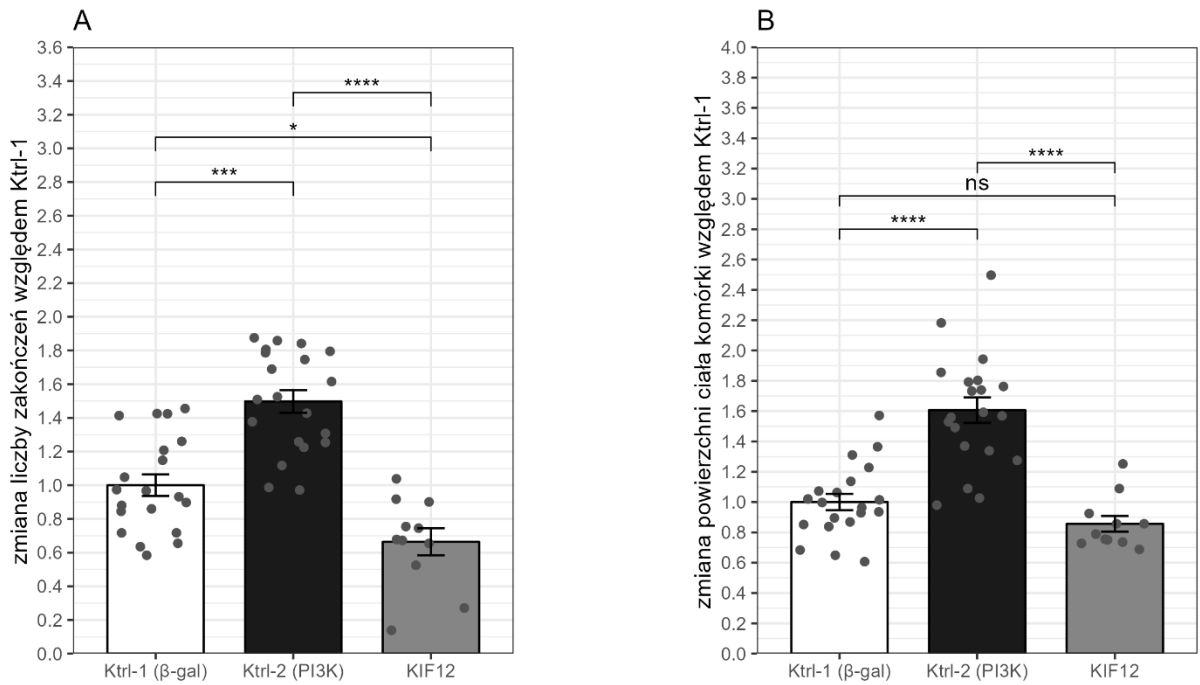
Ryc. 4.3.16

KIF11



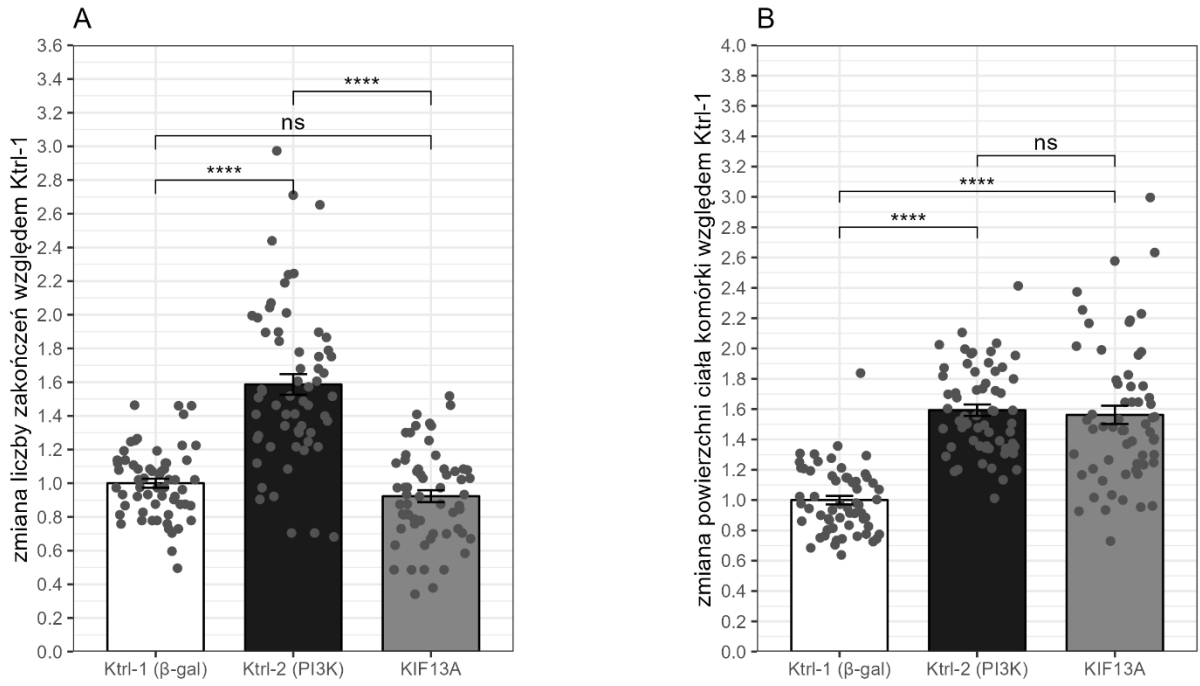
Ryc. 4.3.17

KIF12



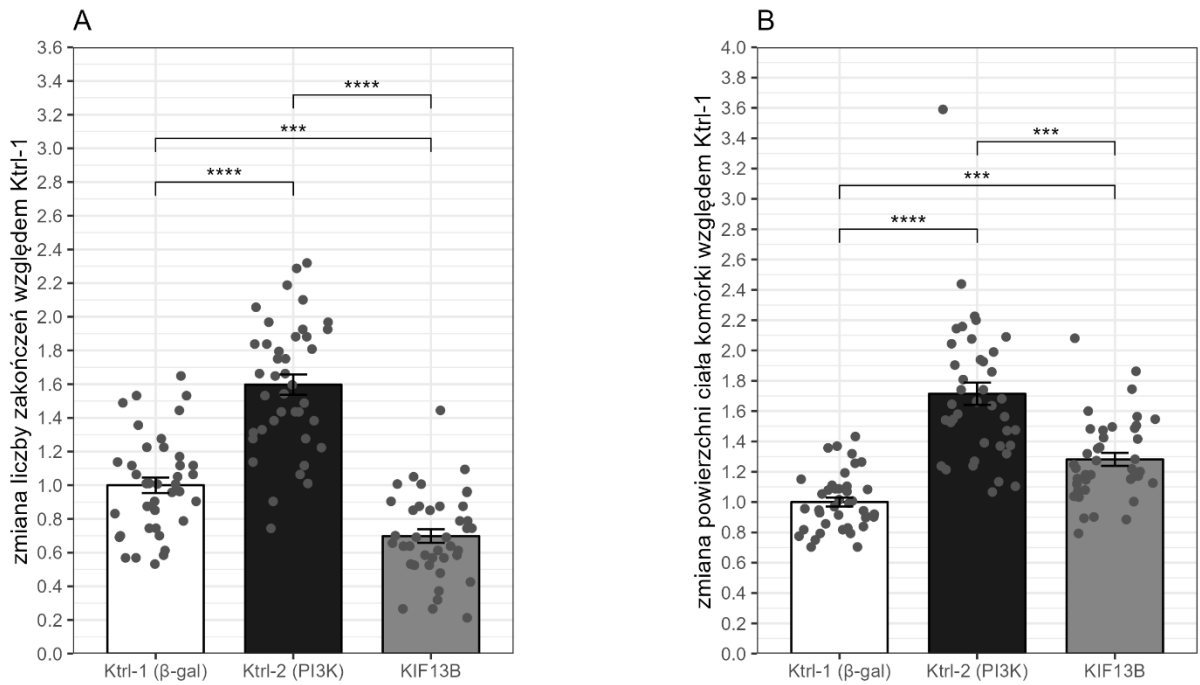
Ryc. 4.3.18

KIF13A



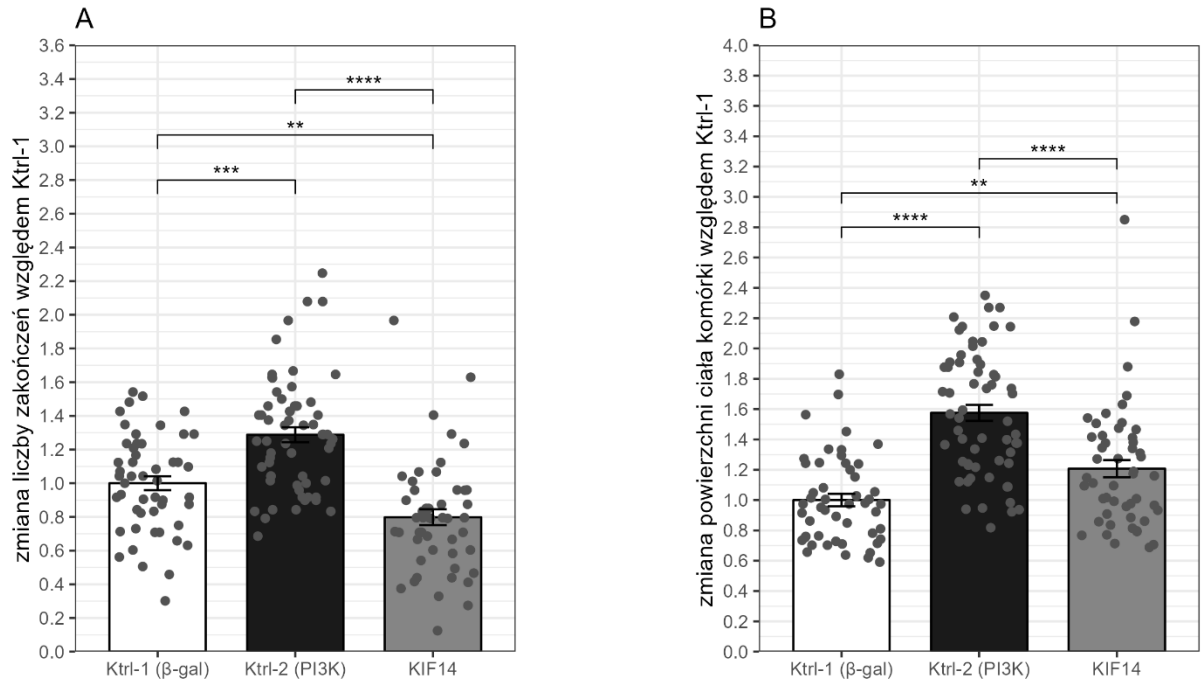
Ryc. 4.3.19

KIF13B



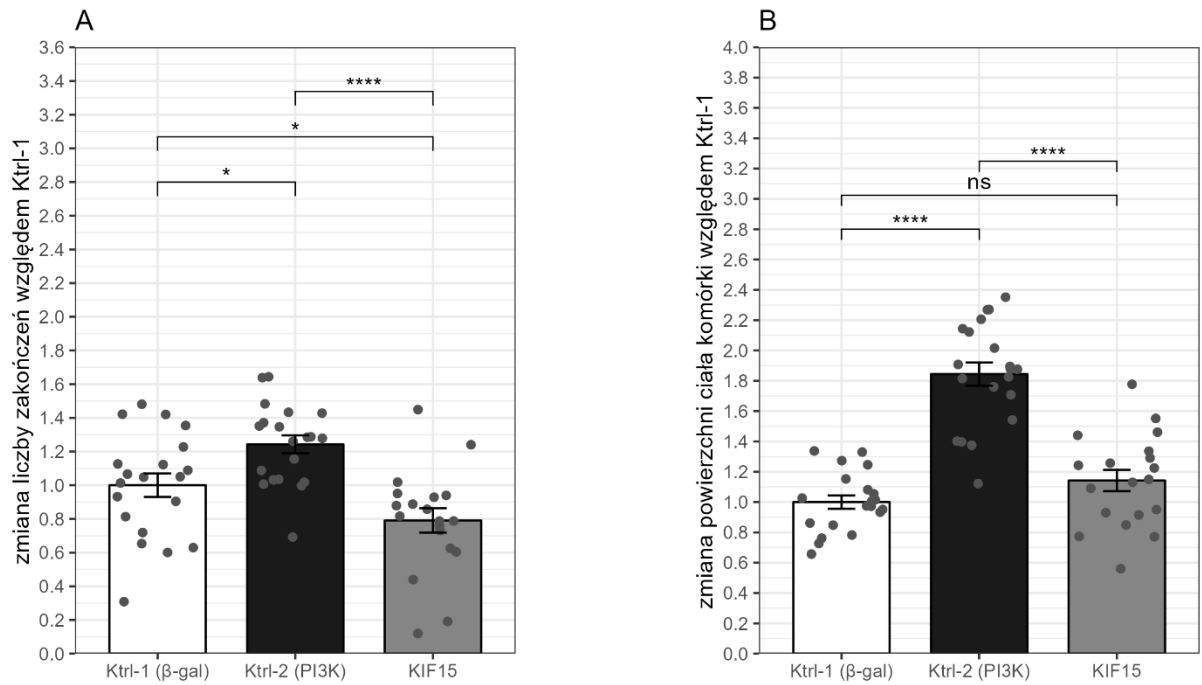
Ryc. 4.3.20

KIF14



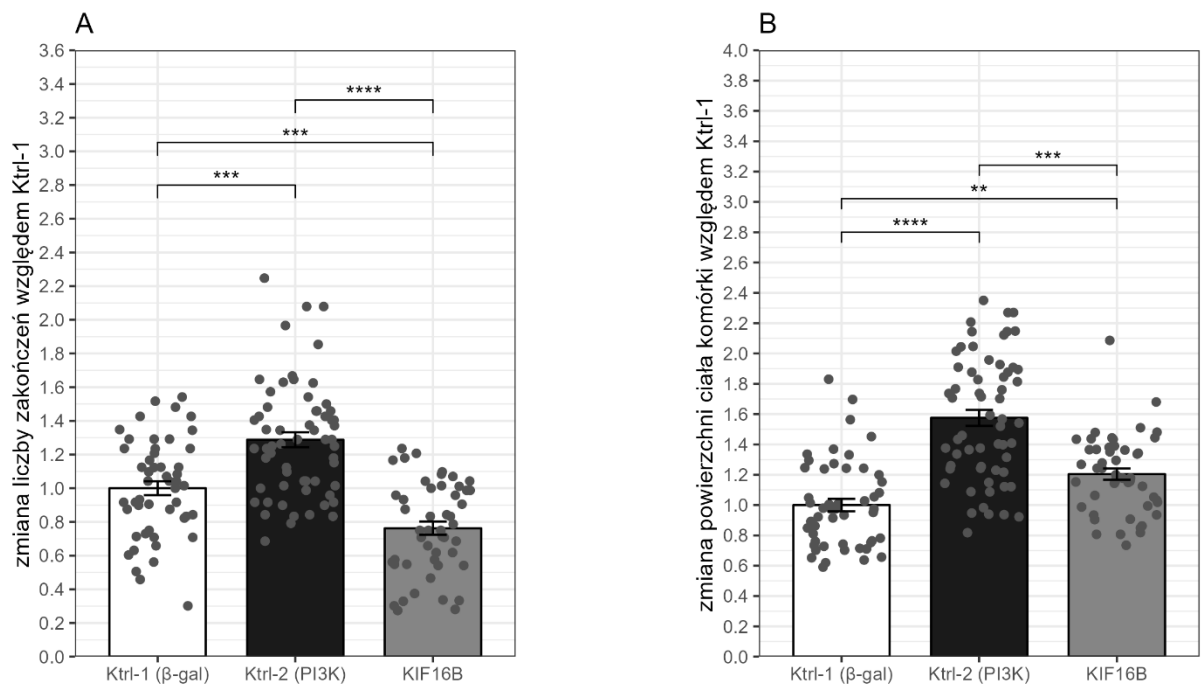
Ryc. 4.3.21

KIF15



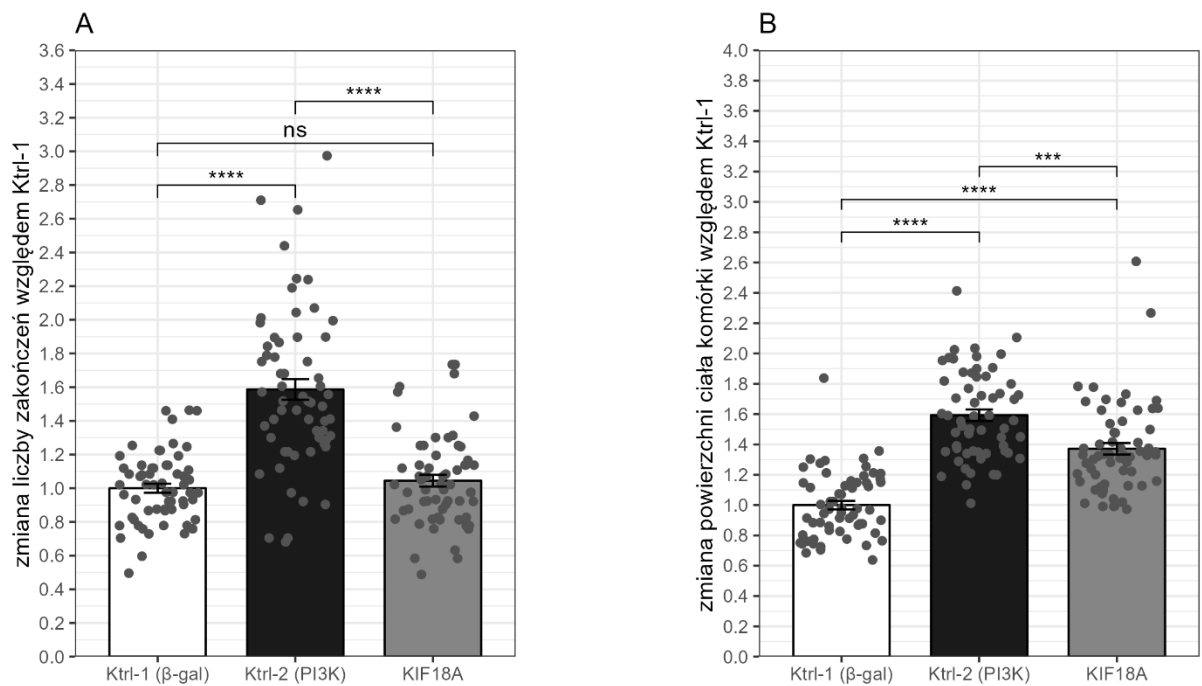
Ryc. 4.3.22

KIF16B



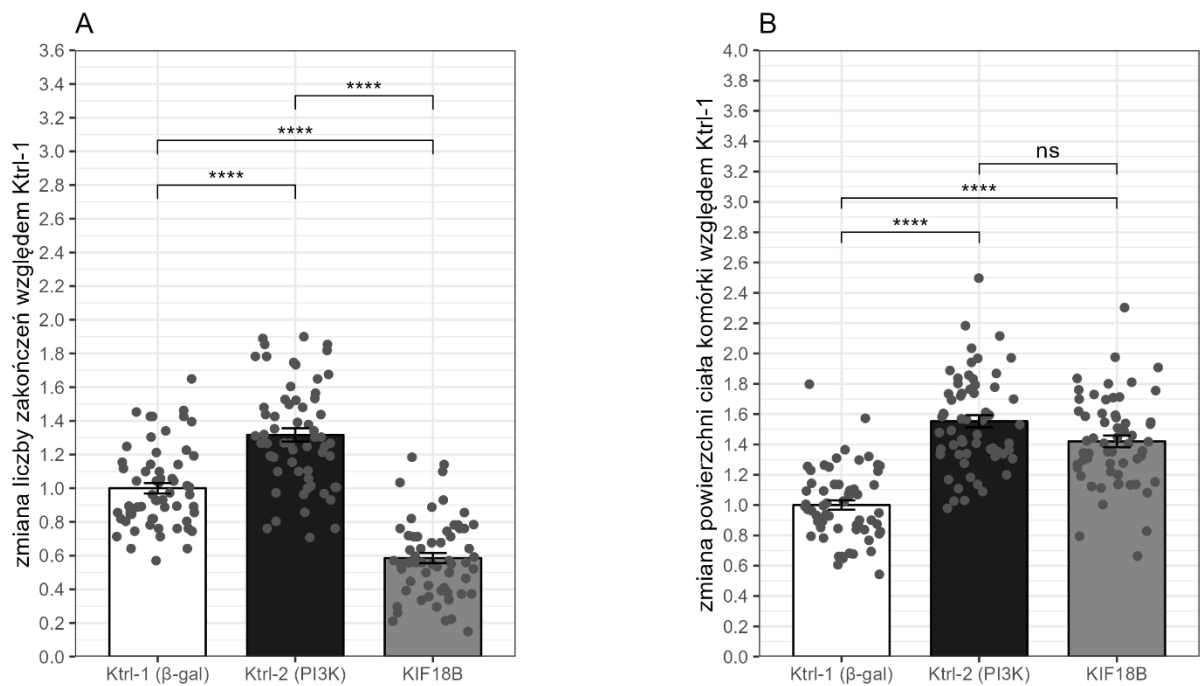
Ryc. 4.3.23

KIF18A



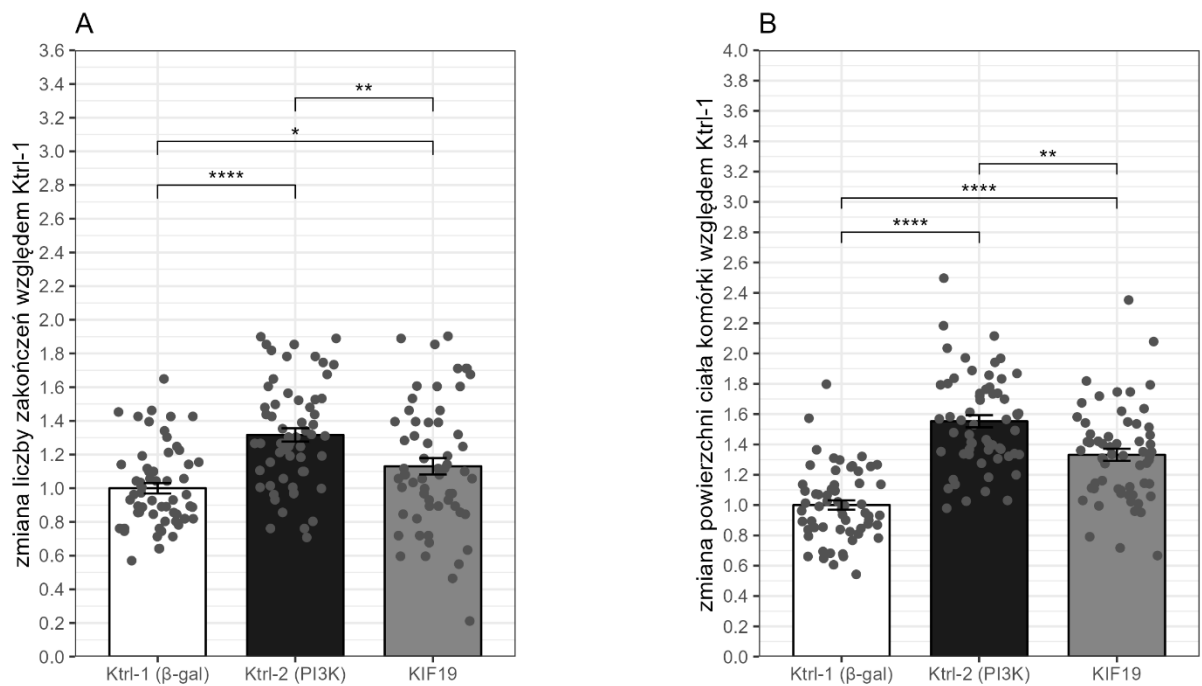
Ryc. 4.3.24

KIF18B



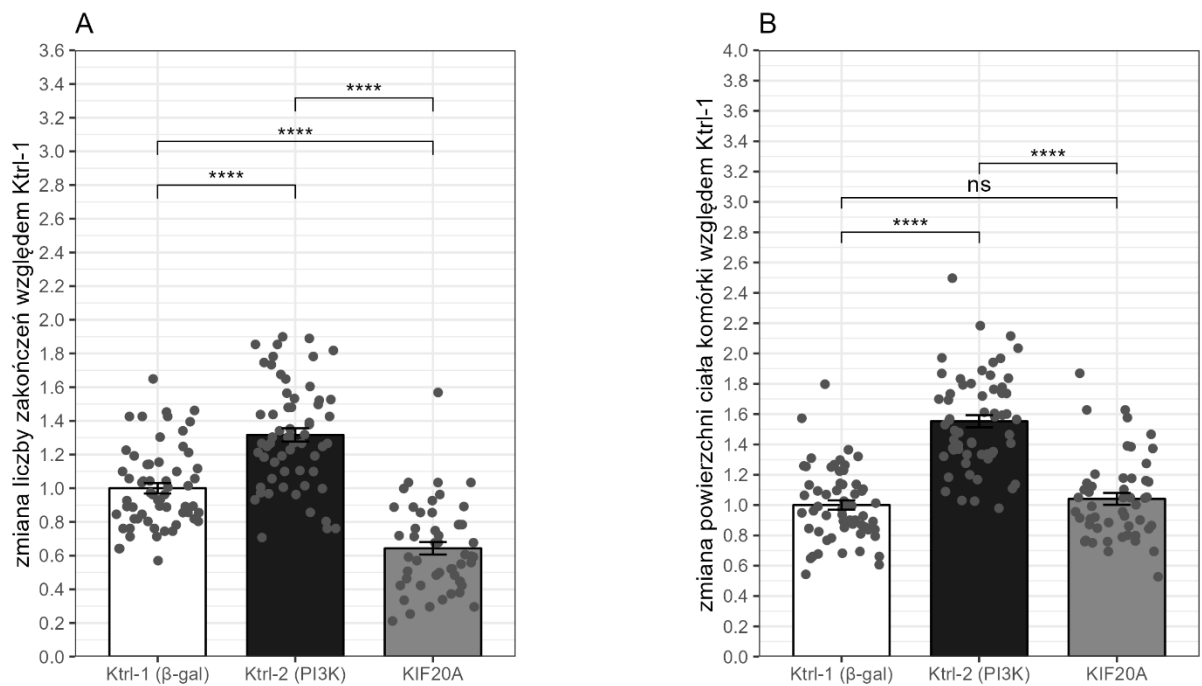
Ryc. 4.3.25

KIF19



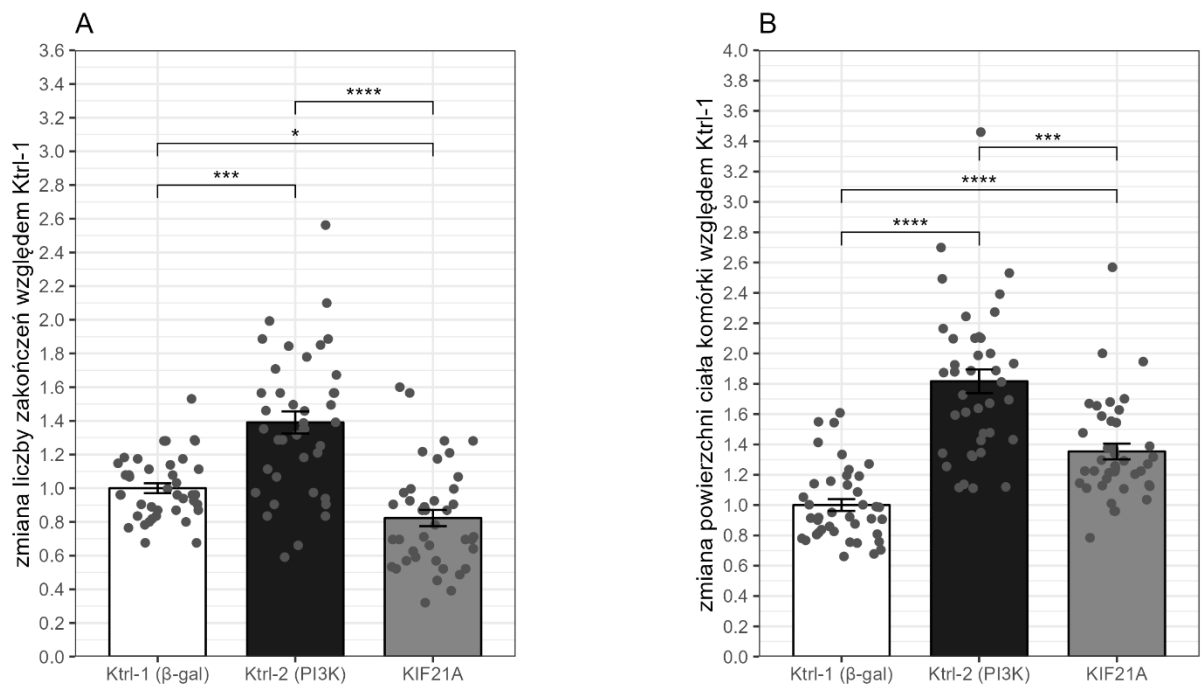
Ryc. 4.3.26

KIF20A



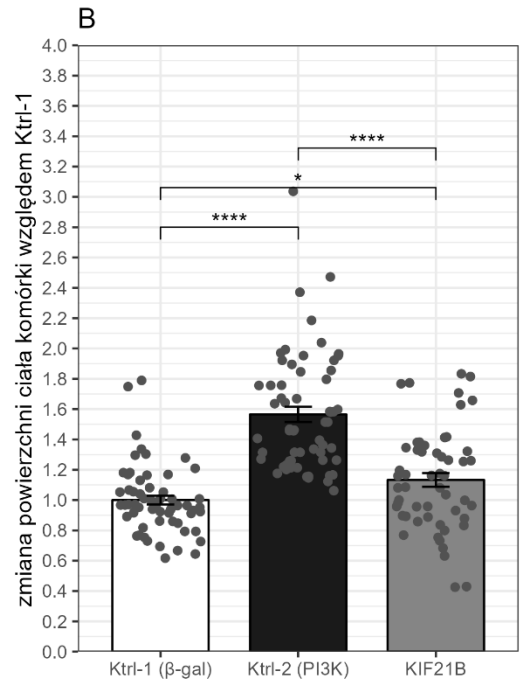
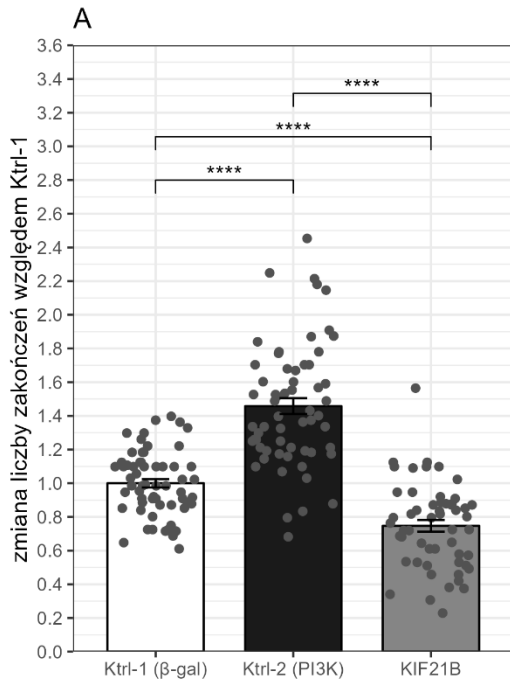
Ryc. 4.3.27

KIF21A



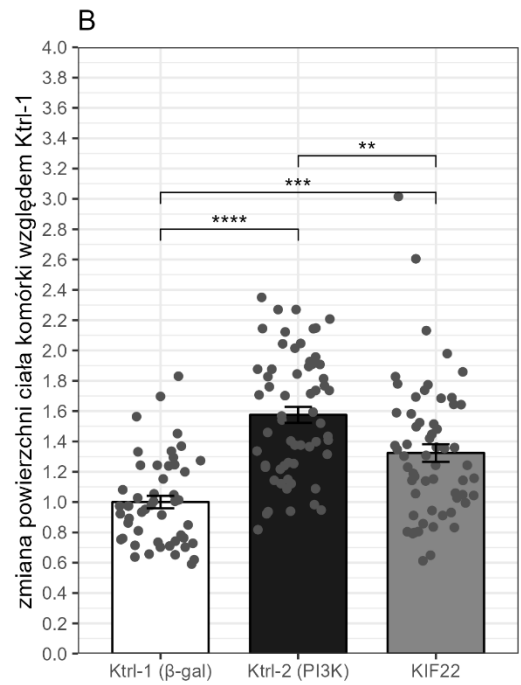
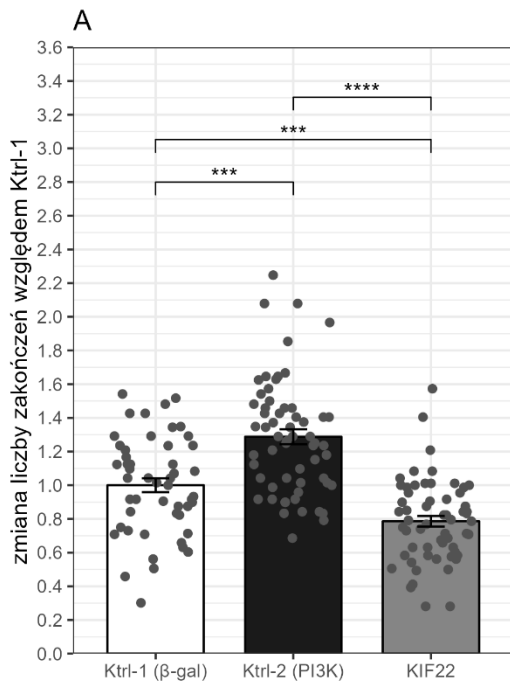
Ryc. 4.3.27

KIF21B



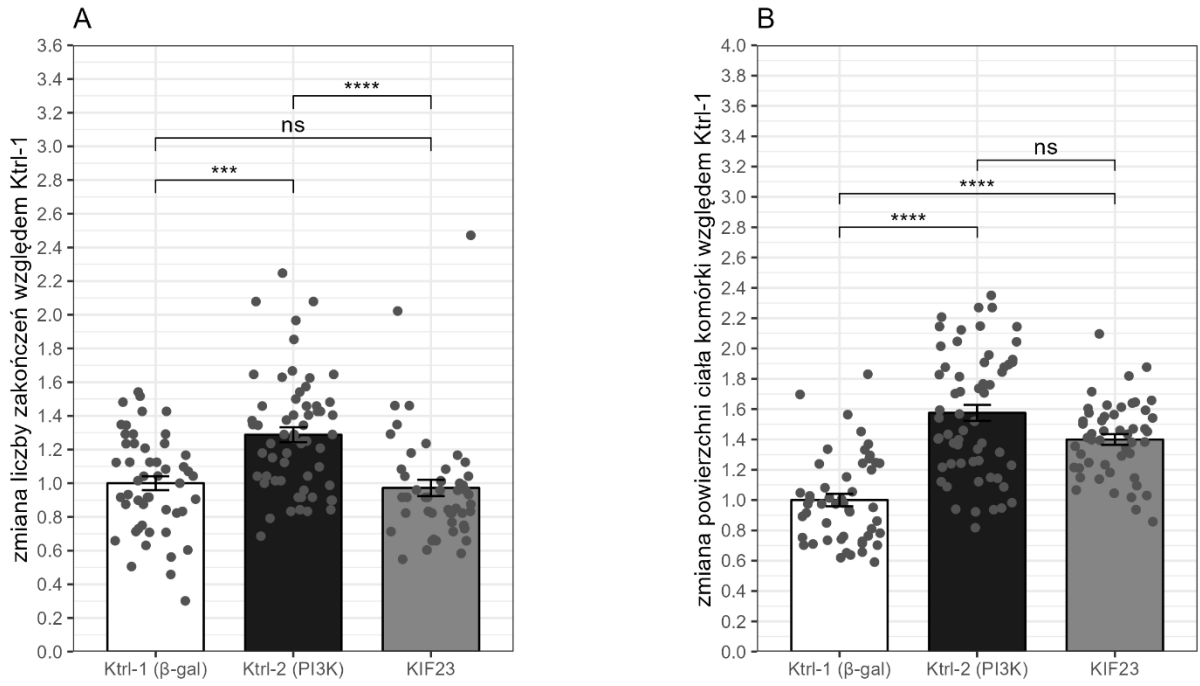
Ryc. 4.3.28

KIF22



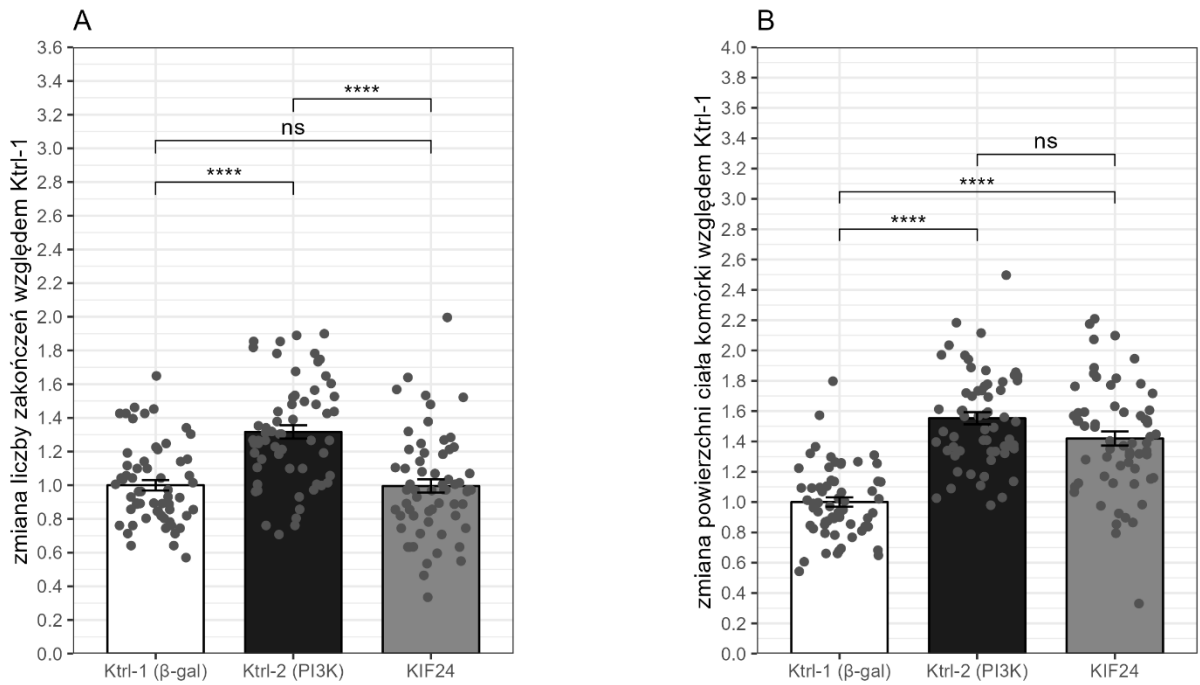
Ryc. 4.3.29

KIF23



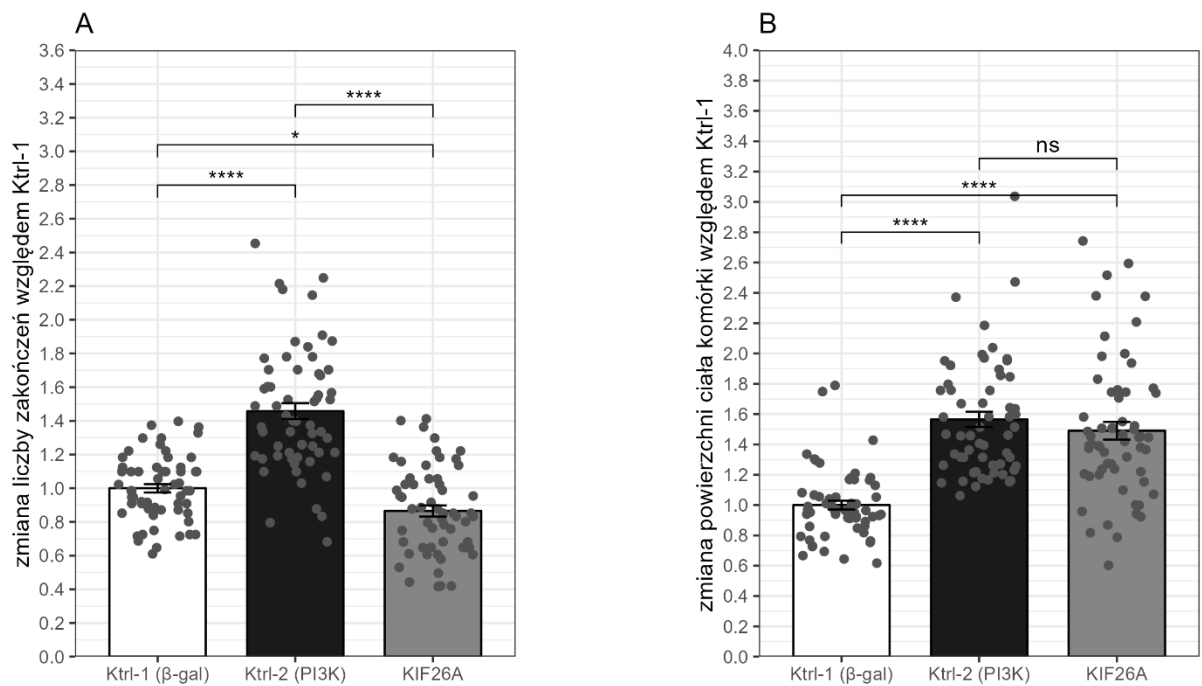
Ryc. 4.3.30

KIF24



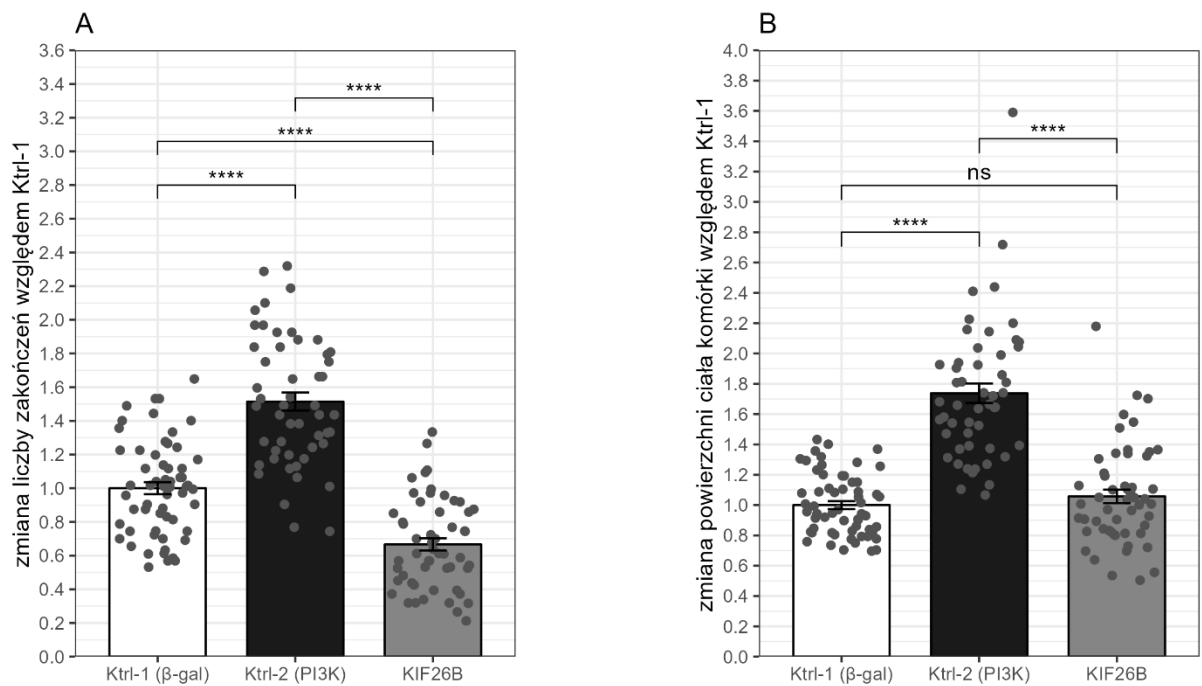
Ryc. 4.3.31

KIF26A



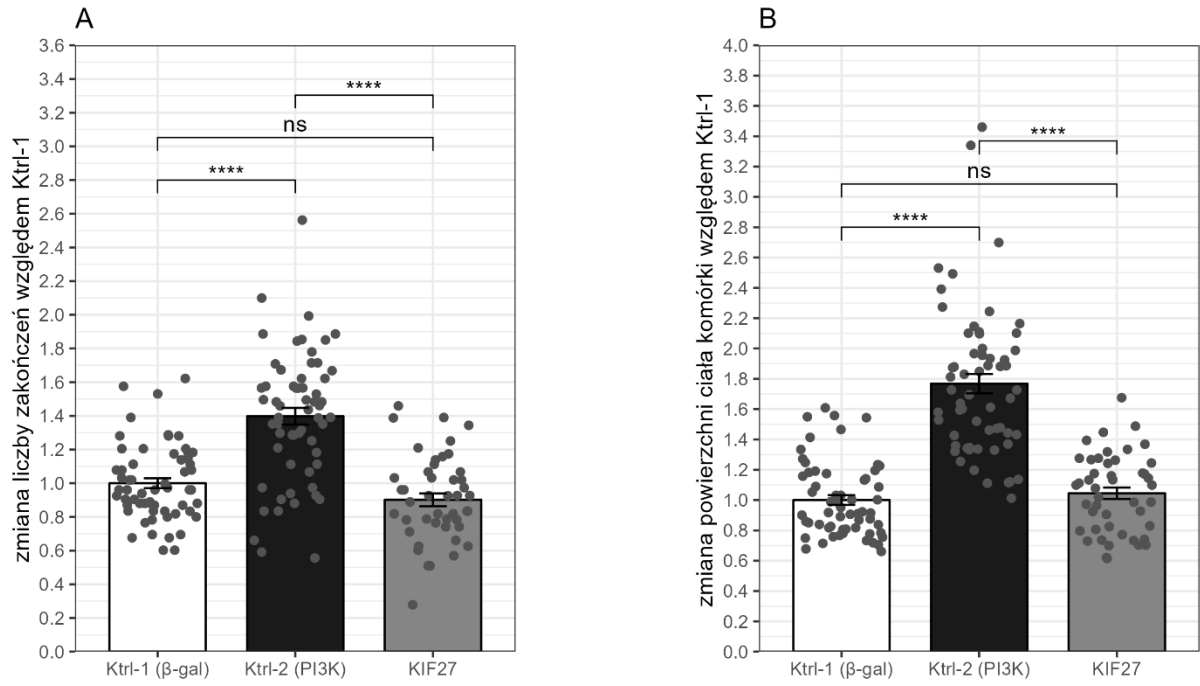
Ryc. 4.3.32

KIF26B



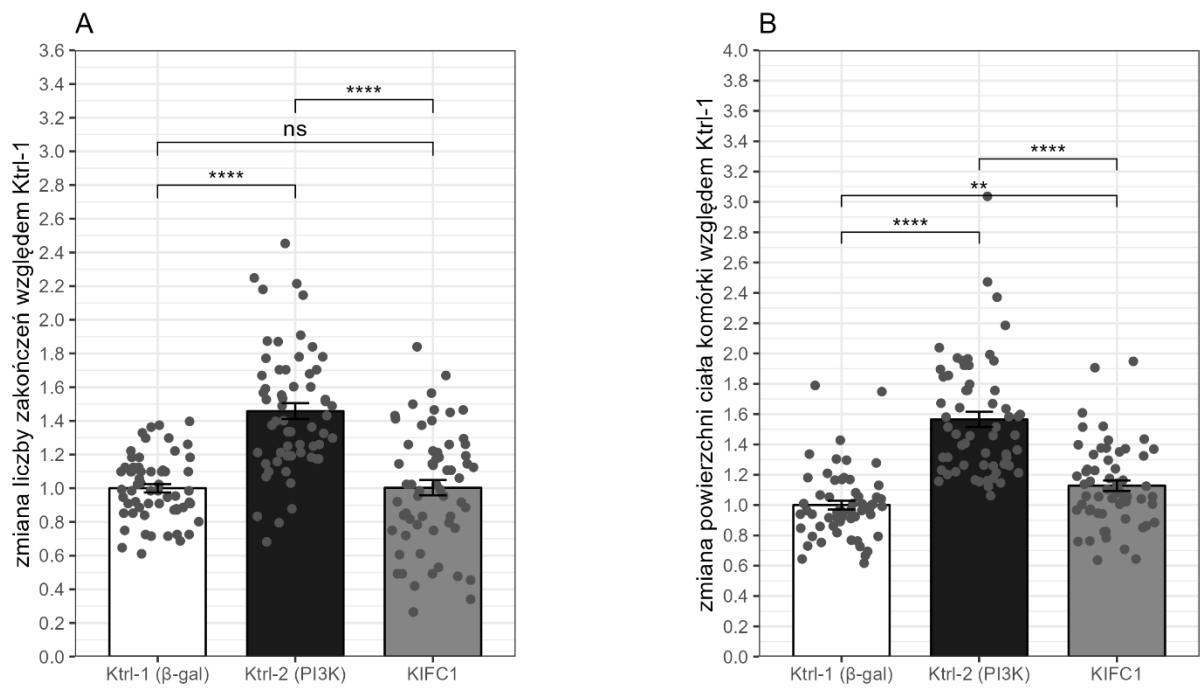
Ryc. 4.3.33

KIF27



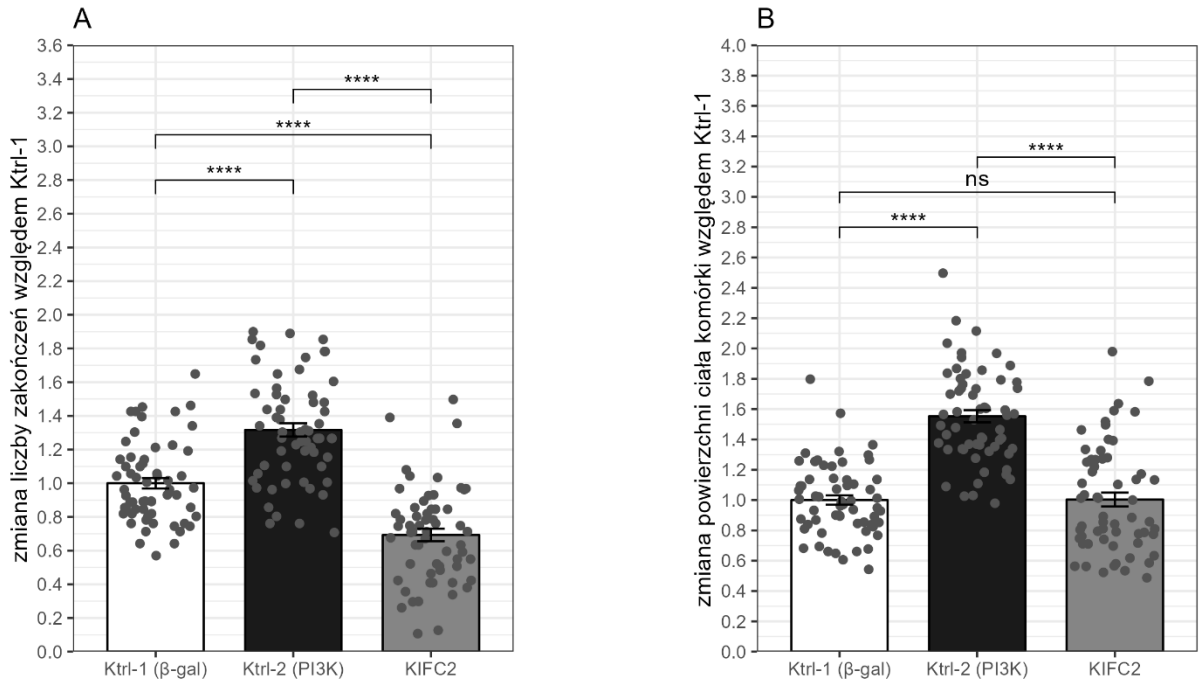
Ryc. 4.3.34

KIFC1



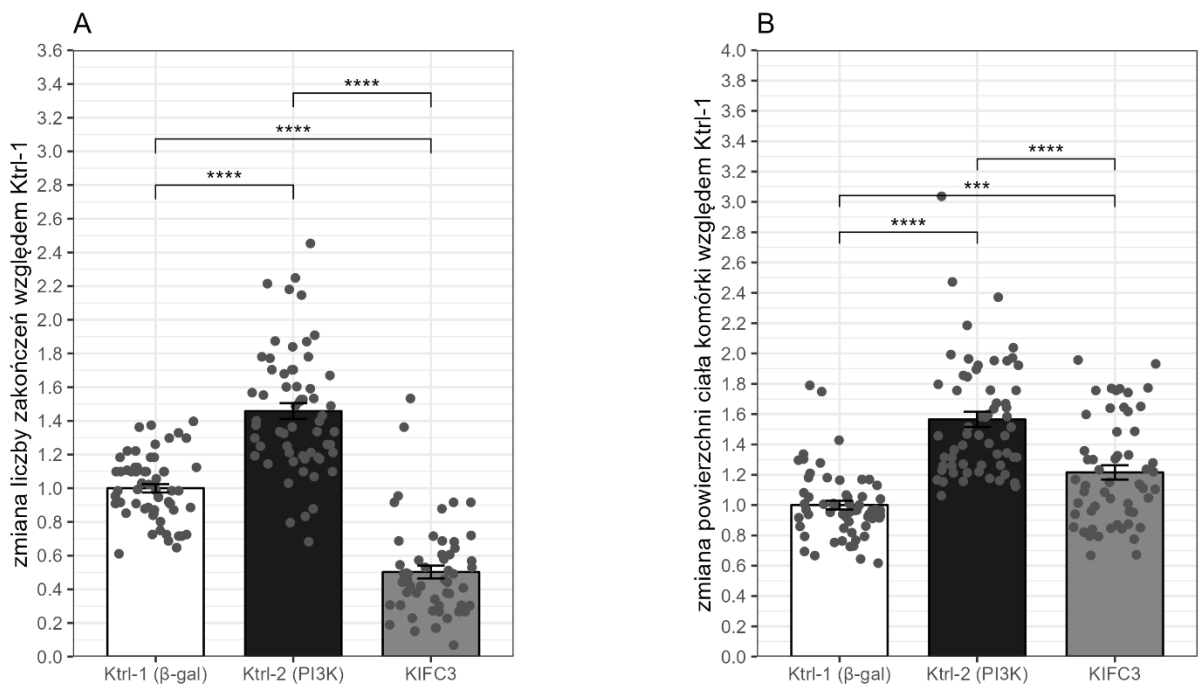
Ryc. 4.3.35

KIFC2



Ryc. 4.3.36

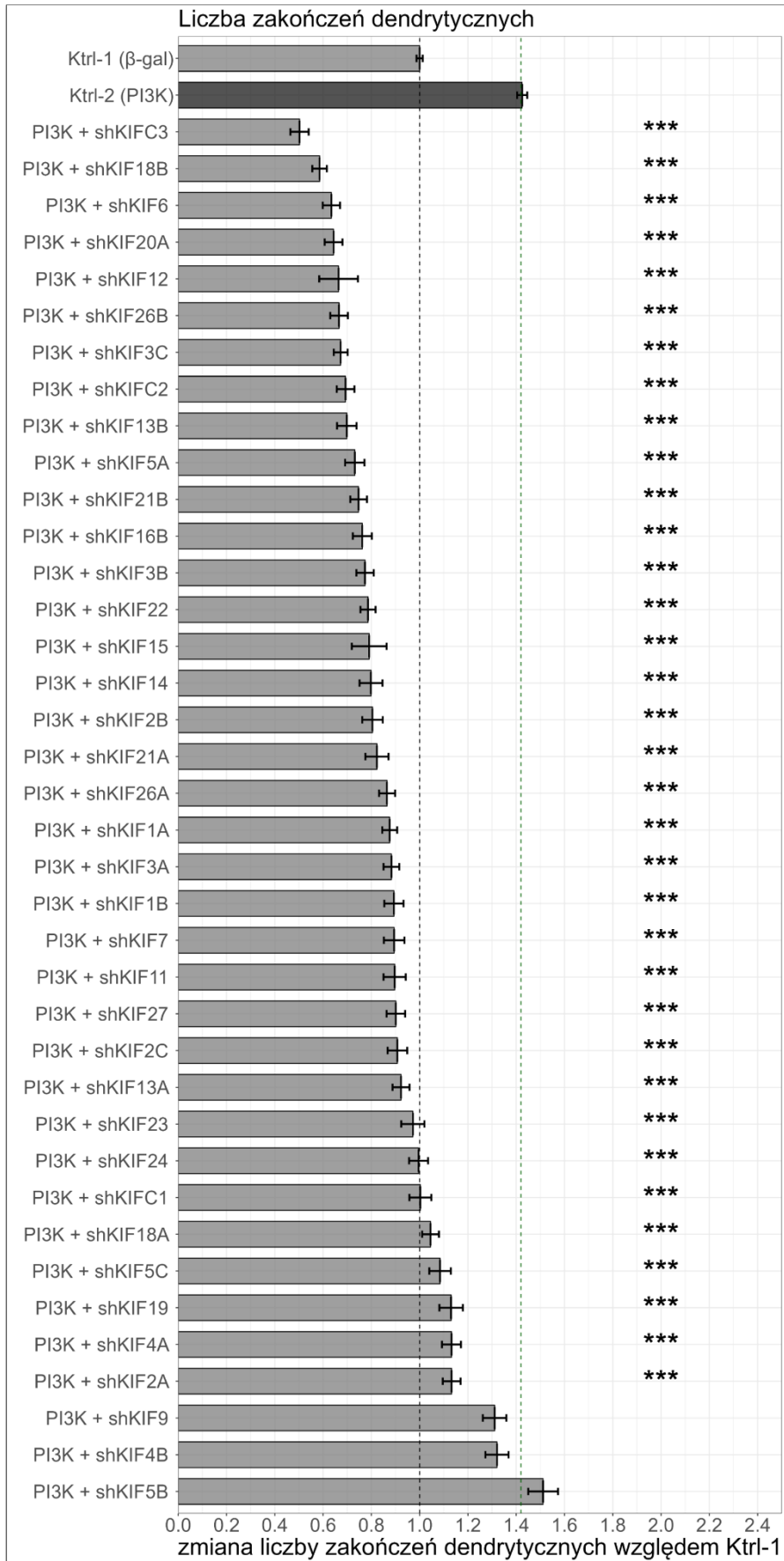
KIFC3

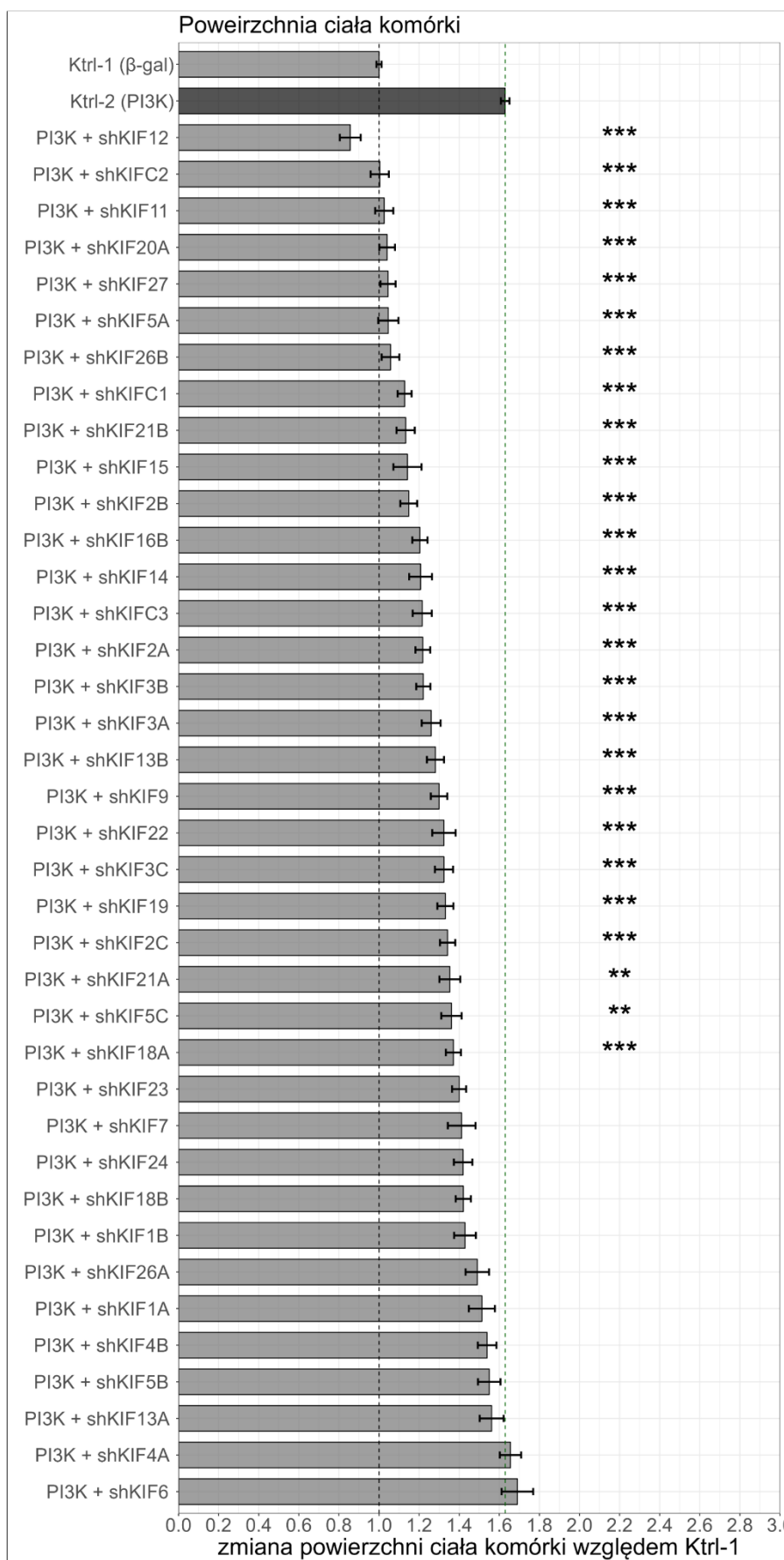


Ryc. 4.3.37

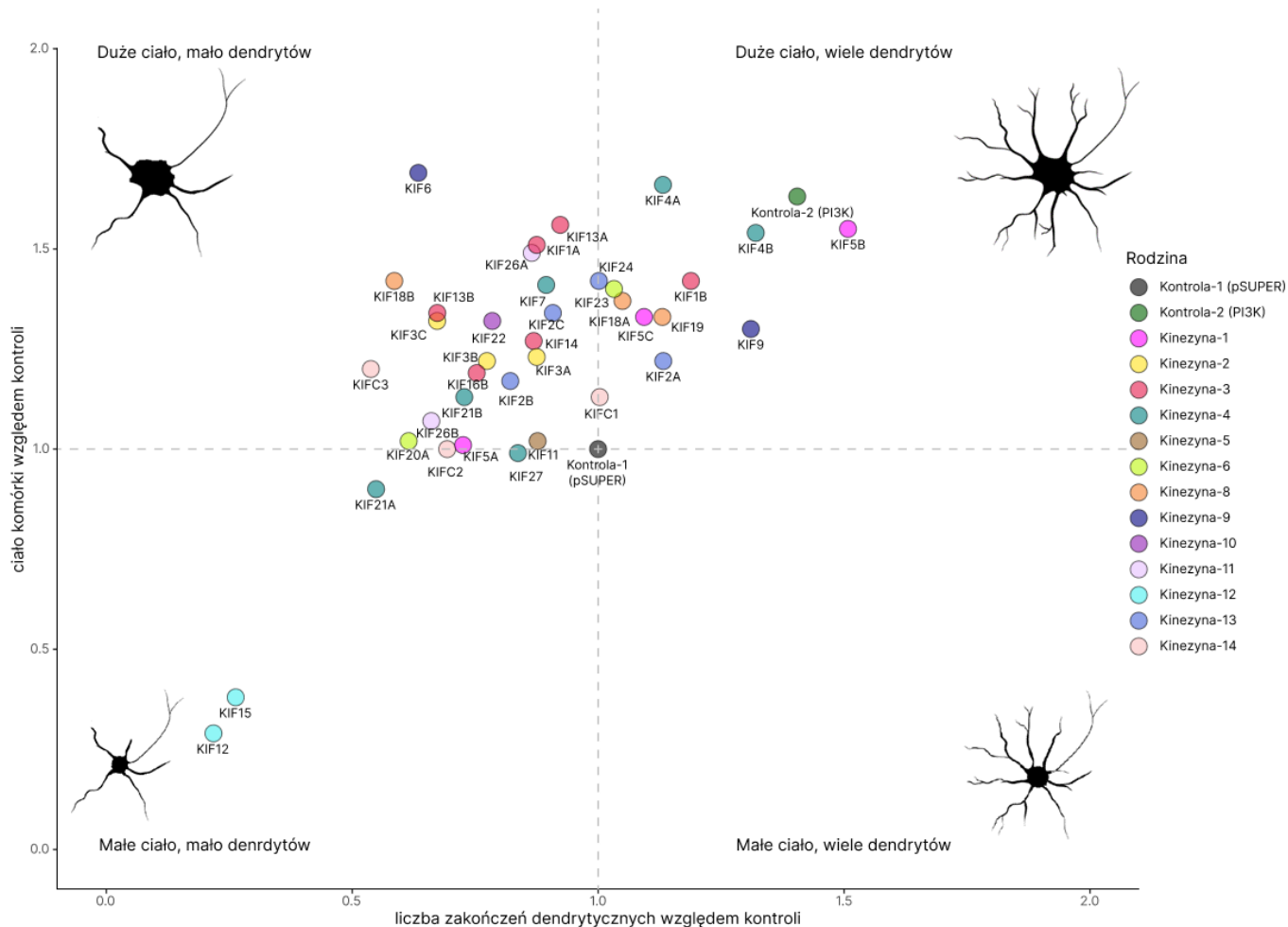
Ryiny 4.3.1 – 4.3.37 Analiza wpływu wyciszenia ekspresji genów wybranych kinezyn, na wzrost neuronu indukowany PI3K.

A. Wyniki pomiarów liczby zakończeń dendrytycznych, neuronów transfekowanych plazmidami kodującymi PI3K oraz trzy shRNA przeciwko wybranym kinezynom. **B.** Wyniki pomiarów powierzchni ciała komórki, neuronów transfekowanych jak w A. Porównanie do Ktrl-1 (β -gal zamiast PI3K, pSUPER zamiast shRNA) oraz Ktrl-2 (pSUPER zamiast shRNA). Wszystkie pomiary zostały znormalizowane przez podzielenie przez średnią wartość Ktrl-1 z danego eksperymentu. Dla obu kontroli, na pojedynczym wykresie przedstawiono jedynie pomiary z płytek, na których znajdowały się próbki z badaną kinezyną. Wykresy słupkowe przedstawiają średnią, zaś słupkami błędów oznaczono SEM. Pomiar istotności statystycznej testem Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunn i poprawką Holma. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Liczba powtórzeń (N): 3 dla każdej kinezyny. Dokładna liczba pomiarów (n): Ktrl-1 (60), Ktrl-2 (60), shKIF11 (56), shKIF12 (11), shKIF13A (60), shKIF13B (40), shKIF14 (50), shKIF15 (19), shKIF16B (48), shKIF18A (61), shKIF18B (60), shKIF19 (60), shKIF1A (60), shKIF1B (60), shKIF20A (50), shKIF21A (40), shKIF21B (54), shKIF22 (60), shKIF23 (50), shKIF24 (61), shKIF26A (60), shKIF26B (54), shKIF27 (46), shKIF2A (60), shKIF2B (51), shKIF2C (60), shKIF3A (51), shKIF3B (60), shKIF3C (60), shKIF4A (60), shKIF4B (60), shKIF5A (50), shKIF5B (60), shKIF5C (50), shKIF6 (60), shKIF7 (60), shKIF9 (60), shKIFC1 (60), shKIFC2 (60), shKIFC3 (55).

A

B

Ryc. 4.4. Wyniki pierwszorzędowego badania przesiewowego przedstawione razem. Wykres przedstawia zebrane razem wyniki z ryc. 4.3.1-4.3.37 **A.** Pomiary liczby zakończeń dendrytycznych. **B.** Pomiary powierzchni ciała komórki. Wszystkie pomiary zostały znormalizowane poprzez podzielenie przez średnie wartości Ktrl-1 (β -gal) z danych eksperymentów. Wykresy przedstawiają średnie wartości, słupki błędów wyznaczają SEM. Istotności statystyczne wyliczono przez niezależne porównania z Ktrl-2 (PI3K) jako modelem nadmiernie aktywnego mTOR. Zastosowano test Manna-Whitneya z poprawką Bonferroni’ego dla wielokrotnych porównań. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Dla każdej kinezyny wykonano trzy niezależne powtórzenia ($N = 3$). Dokładna liczba obserwacji (n) to: Ktrl-1 (60), Ktrl-2 (60), shKIF11 (56), shKIF12 (11), shKIF13A (60), shKIF13B (40), shKIF14 (50), shKIF15 (19), shKIF16B (48), shKIF18A (61), shKIF18B (60), shKIF19 (60), shKIF1A (60), shKIF1B (60), shKIF20A (50), shKIF21A (40), shKIF21B (54), shKIF22 (60), shKIF23 (50), shKIF24 (61), shKIF26A (60), shKIF26B (54), shKIF27 (46), shKIF2A (60), shKIF2B (51), shKIF2C (60), shKIF3A (51), shKIF3B (60), shKIF3C (60), shKIF4A (60), shKIF4B (60), shKIF5A (50), shKIF5B (60), shKIF5C (50), shKIF6 (60), shKIF7 (60), shKIF9 (60), shKIFC1 (60), shKIFC2 (60), shKIFC3 (55)



Ryc. 4.5. Wykres punktowy przedstawiający wyniki pierwszorzędowego badania przesiewowego względem Ktrl-1. Punkty prezentują zebrane wyniki pomiarów neuronów transfekowanych w dniu 8-mym PI3K, mieszanymi shRNA przeciwko wybranym kinezyinom oraz GFP. Ktrl-1 zamiast PI3K zawierała plazmid kodujący β -gal, oraz pusty plazmid pSUPER. Ktrl-2 zawierała PI3K, oraz pusty plazmid pSUPER. Komórki utrwalano w dniu 13-nastym. Umieszczenie na osi X zależy od średniej liczby zakończeń dendrytycznych względem Ktrl-1 (1), zaś na osi Y od średniej powierzchni ciała komórki względem Ktrl-1 (1). Liczba niezależnych powtórzeń dla każdej kinezyiny (N) wynosiła 3. W przypadku braku żywych neuronów w danym powtórzeniu, do średniej wliczano 0.

4.1.2 Wybór kinezyin do dalszych badań

Wyboru kinezyin do dalszej pracy, dokonano poprzez poszukiwanie w wynikach uzyskanych z pierwszorzędowego badania przesiewowego wariantów, w których zarówno wielkość ciała komórki (Ryc.4.3. B oraz Ryc. 4.4 B), jak i liczba zakończeń dendrytycznych (Ryc. 4.3 panel A oraz Ryc. 4.4 panel A) byłyby zbliżone do Ktrl-1 (β -gal), pomimo jednoczesnej transfekcji plazmidem kodującym PI3K. Jednocześnie wybór poparto danymi literaturowymi, poszukując dostępnych informacji zarówno na temat wpływu kinezyin na rozwój neuronu, jak również ich relacji ze ścieżką mTOR. Tym samym

do dalszej pracy wybrano: KIFC2, KIF3A, KIF3C, KIF5A, KIF11, KIF20A, KIF21B, KIF26B oraz KIF27. Przy czym zastosowanie shRNA przeciwko KIF11 i KIF27 w największym stopniu zbliżyły liczbę zakończeń dendrytycznych, zaś shRNA przeciwko KIFC2, KIF11, KIF26B, KIF5A oraz KIF20A powierchnię ciała komórki do Ktrl-1. Zaobserwowano jednocześnie, że wszystkie próbki zawierające shRNA powodowały spadek liczby zakończeń dendrytycznych względem Ktrl-2 (PI3K).

Wybrane kinezyiny wraz z krótkim opisem zawarto w Tabeli 4.1.

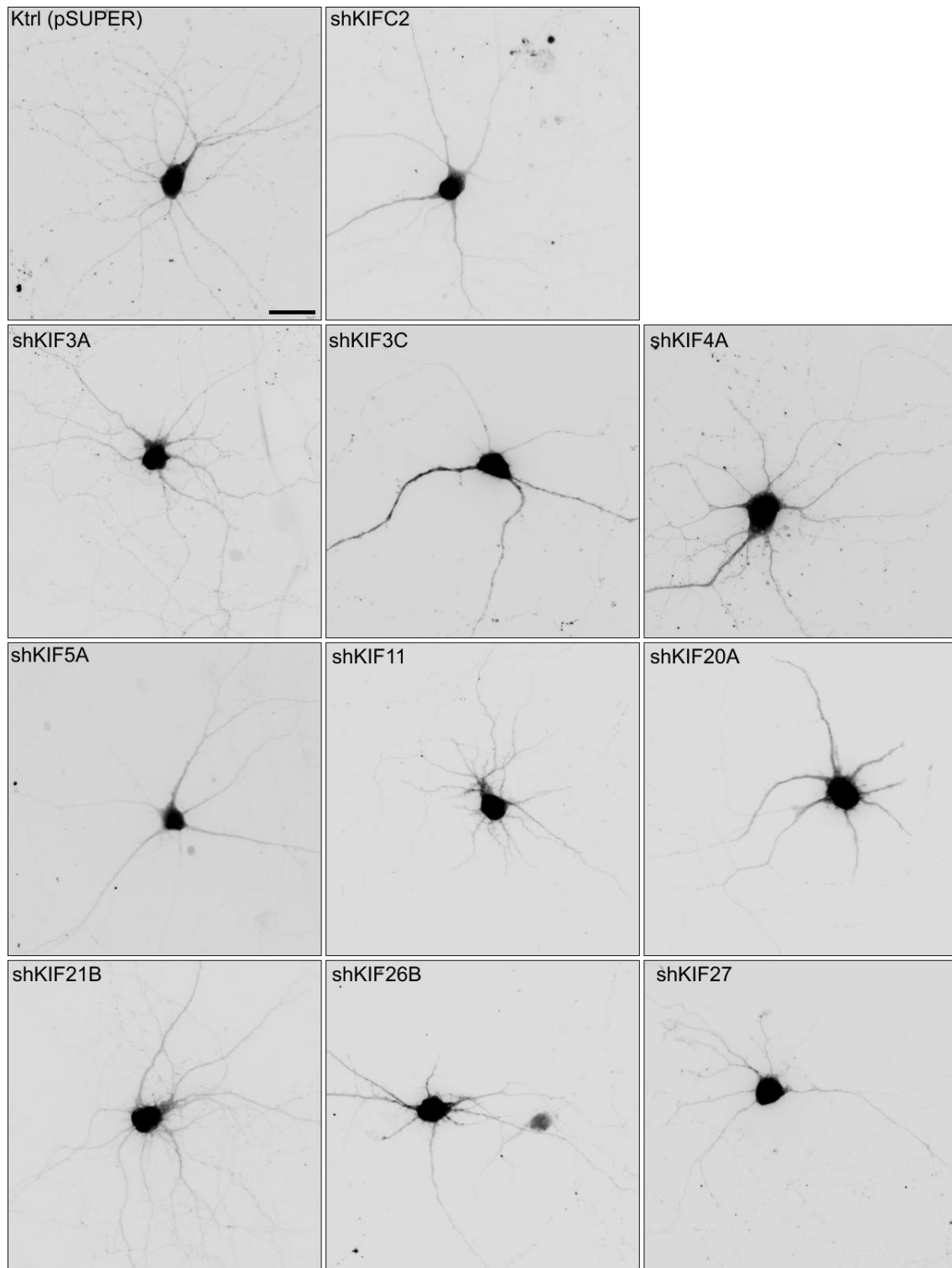
Tabela 4.1. Kinezyiny wybrane do dalszej pracy po pierwszorzędownym badaniu przesiewowym.

Kinezyina	Rodzina	Charakterystyka
KIF5A	Kinezyiny-1	Łańcuch ciężki tzw. konwencjonalnej kinezyiny, istotnej w transporcie aksonalnym (Nakajima i in. 2012).
KIF26B	Kinezyiny-11	Istotna w rozwoju wielu nowotworów. Prawdopodobnie ma wpływ na aktywację ścieżki PI3K/AKT (Y. Liu i in. 2022).
KIFC2	Kinezyiny-14B	C-kinezyina, porusza się w kierunku końca „-” mikrotubul, podobnie jak dyneina. (Hanlon, Yang, i Goldstein 1997)
KIF3A	Kinezyiny-2	Tworzy heterotrimer razem z KIF3C oraz białkiem KAP3. Kluczowa dla rozwoju pierwotnych rzęsek oraz transportu wewnątrz-rzęskowego (F. Lin i in. 2003).
KIF3C	Kinezyiny-2	Tworzy heterotrimer razem z KIF3A lub KIF3B oraz białkiem KAP3. Kluczowa dla rozwoju pierwotnych rzęsek oraz transportu wewnątrz-rzęskowego (Quinn i in. 2020).
KIF27	Kinezyiny-4	Regulacja wzrostu mikrotubul (Yue i in. 2018). Zaangażowana w ruch rzęsek. Powiązana ze ścieżką Sonic hedgehog (Shh) (Rink i in. 2009).
KIF21B	Kinezyiny-4	Bardzo procesywna kinezyina odpowiedzialna za transport dendrytyczny i aksonalny, (Asselin i in. 2020a), jednocześnie istotna w regulacji dynamiki mikrotubul i tworzeniu synaps (Muhia i in. 2016).
KIF11 (Eg5)	Kinezyiny-5	Kinezyina o budowie homotetrameru, z dwoma parami połączonych anty-równolegle domen wiążących mikrotubule. Odpowiada za przesuwanie fragmentów mikrotubul względem siebie (Ostergaard i in. 2012).
KIF20A	Kinezyiny-6	Transport pęcherzyków zawierających Rab6. (Miserey-Lenkei i in. 2017); udział w asymetrycznym podziale neuroprogenitorów (Geng i in. 2018).

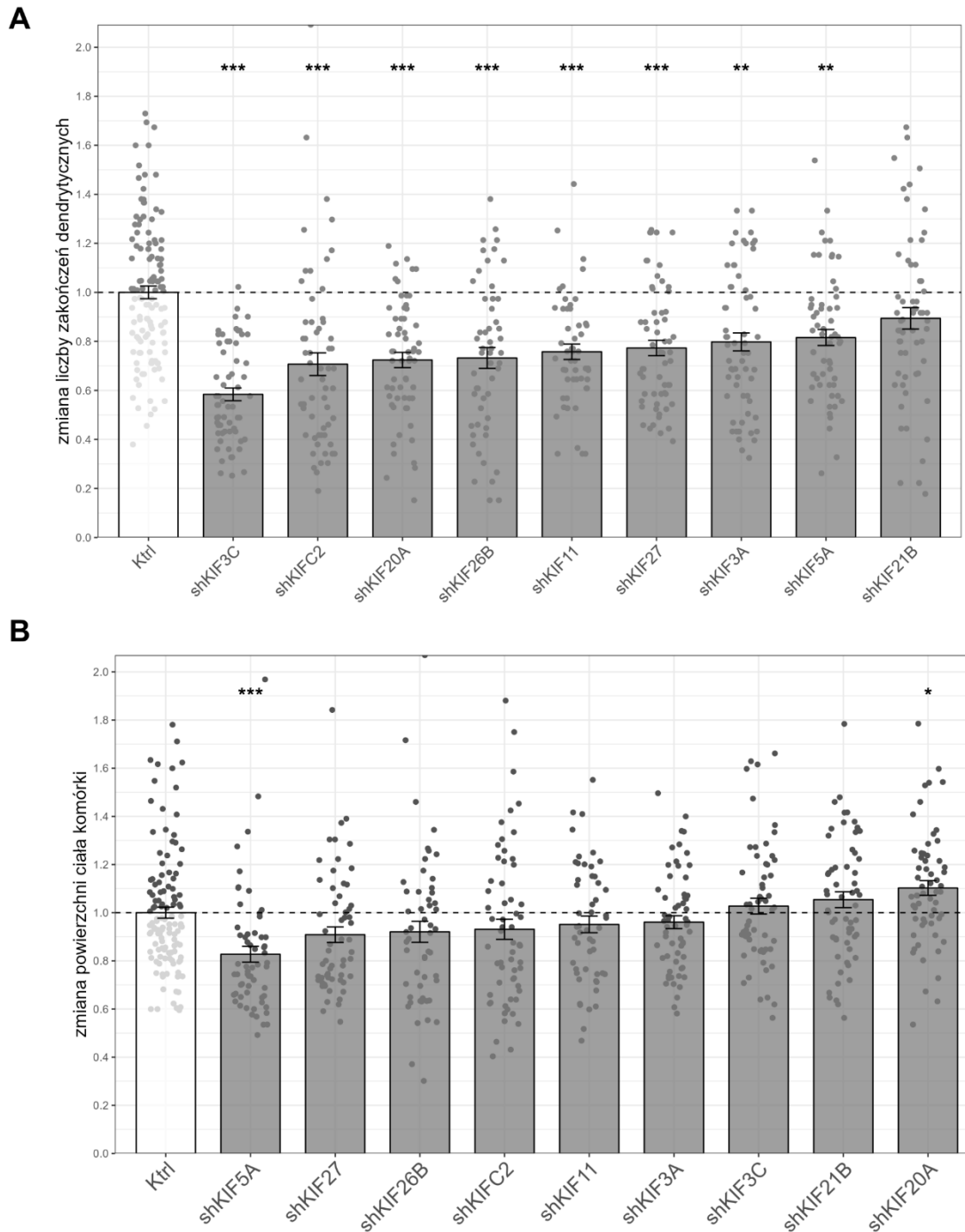
4.1.3 Badanie wpływu wyciszenia wybranych kinezyń na rozwój neuronu w warunkach bazowej aktywności ścieżki PI3K-mTOR.

Przeprowadzone pierwszorzędowe badanie przesiewowe pozwoliło wybrać z początkowych 38-miu białek, dziewięć potencjalnie interesujących z punktu widzenia zagadnienia badawczego. Jednakże zaobserwowany efekt użytych shRNA przeciwko kinezyńom na ograniczenie fenotypu spowodowanego transfekcją PI3K, mógł wynikać nie tyle z zatrzymania efektów nadaktywnej ścieżki PI3K, co raczej z zaburzenia kluczowych funkcji jakie kinezyńy pełnią w komórce. Aby wykluczyć taką możliwość, zaprojektowano kolejne badanie, w którym użyto shRNA przeciwko 9 wybranym w poprzednim etapie kinezyńom, tym razem w komórkach z bazową aktywnością PI3K (nie transfekowanych jej konstytutywnie aktywną formą). W tym celu, podobnie jak w poprzednim eksperymencie (punkt 4.1.) neurony w 8-mym dniu hodowli transfekowano mieszaniną trzech plazmidów pSUPER kodujących shRNA przeciwko sekwencjom mRNA wybranych kinezyń (po 100 ng), plazmidem kodującym GFP (300 ng) oraz aby odwzorować warunki Ktrl-1 z poprzedniego badania również plazmidem kodującym β -gal (300 ng). Podane wartości w nanogramach dotyczą ilości DNA w przeliczeniu na jeden dołek na płycie 24-dolkowej. Neurony utrwalano w dniu 13-nastym, a następnie rejestrowano obrazy przy użyciu mikroskopii świetlnej zgodnie z opisem w punkcie 3.8.1. Na uzyskanych obrazach mierzono powierzchnię ciała komórki oraz liczbę zakończeń dendrytycznych.

Wyniki uzyskane dla 9 wybranych kinezyń przedstawiono na Ryc. 4.6. Spośród zbadanych kinezyń tylko wyciszenie KIF5A spowodowało statystycznie istotny spadek wielkości ciała komórki względem Ktrl (Ryc. 4.6. B). W przypadku liczby zakończeń dendrytycznych, wyciszenie niemal wszystkich badanych kinezyń z wyjątkiem KIF21B skutkowało spadkiem względem Ktrl (Ryc. 4.6. A). Obserwacja ta wskazuje na bazowy, obniżający efekt wyciszenia kinezyń na drzewko dendrytyczne w użytym modelu. Ponieważ utrudniałoby to wnioskowanie na temat wpływu kinezyń na rozwój neuronu, w dalszej części pracy zdecydowano skupić się jedynie na wpływie na ciało komórki.



Ryc. 4.6. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe neuronów z bazowym poziomem aktywacji mTOR, transfekowanych shRNA przeciwko wybranym kinezytom. Neuronów hipokampalne transfekowano w dniu 8-mym plazmidami kodującymi β -gal, mieszankę trzech shRNA przeciwko kinezytom oraz GFP. Kontrola (Ktrl) zamiast shRNA zawierała plazmid pSUPER bez wstawki. Komórki utrwalane w 13-nastym dniu hodowli. Skala 10 μ m.



Ryc. 4.7. Analiza morfologii neuronów transfekowanych shRNA przeciwko wybranym kinezydom przy bazowym poziomie aktywacji mTOR. Analiza liczby zakończeń dendrytycznych i powierzchni ciała neuronów, których przykładowe mikrofotografie przedstawiono na Ryc.4.6. **A.** Pomiar liczby zakończeń dendrytycznych. **B.** Pomiar powierzchni ciała komórki. Szarymi punktami oznaczono pojedyncze pomiary, które zostały znormalizowane poprzez podzielenie przez średnią wartość Ktrl z danej płytki eksperymentalnej. Wykresy przedstawiają średnią, słupki błędów oznaczają SEM. Czarna, przerywana, pozioma linia reprezentuje poziom Ktrl (1). Liczba powtórzeń dla każdej kinezyminy wykonano trzy niezależne powtórzenia (N = 3). Istotności statystyczne wyliczone poprzez niezależne porównanie każdej próbki z wyciszoną kinezyzną do pomiarów Ktrl z tej samej płytki eksperymentalnej za pomocą testu Manna-Whitneya uwzględniając poprawkę Bonferroniego dla wielokrotnych

porównań. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$. Łączna liczba obserwacji (n) przedstawiona na wykresie: KIF11 (51), KIF20A (60), KIF21B (60), KIF26B (53), KIF27 (60), KIF3A (60), KIF3C (60), KIF5A (60), KIFC2 (60), Ktrl (pSUPER) (120).

4.1.4 Drugorzędowe badanie przesiewowe

Użycie w pierwszorzędownym badaniu przesiewowym PI3K, będącej silnym aktywatorem ścieżki mTOR, skutkowało znaczną zmianą fenotypu neuronu, co pozwoliło wyłonić z obszernej rodziny kinezyn kilka najbardziej obiecujących białek potencjalnie zaangażowanych w ten proces. Jednakże aktywna forma PI3K oprócz ścieżki mTOR, wpływa również na inne szlaki sygnałowe takie jak choćby GSK3 czy NF- κ B (Duda i in. 2020; Hoesel i Schmid 2013). Tym samym w kolejnym kroku, na wyłonionych kinezynach zaplanowano drugorzędowe badanie przy wykorzystaniu bardziej bezpośredniego aktywatora mTOR. Do tego celu postanowiono wykorzystać zjawisko interferencji RNA, wyciszając ekspresję genów *Tsc1/Tsc2* w szczurzych neuronach hipokampalnych. Stanowi to jednocześnie model stwardnienia guzowatego, choroby intensywnie badanej w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej (opisane w punkcie 1.3.8). Warto zaznaczyć jednak, w przypadku wyciszania *Tsc1* lub *Tsc2* oczekiwano znacznie subtelniejszego efektu na fenotyp komórki niż w badaniu pierwszorzędownym, które zostało wykonane z bardziej ogólnym aktywatorem (Malik i in. 2015).

4.1.4.1 Ustalanie warunków dla drugorzędowego badania przesiewowego

Pierwszym krokiem przy projektowaniu drugorzędowego badania przesiewowego, było sprawdzenie, jak wyciszenie *Tsc1* oraz *Tsc2* wpłynie na rozmiar ciała komórki, w badanym modelu szczurzych neuronów hipokampalnych, oraz efekt którego z nich będzie większy. Do tego celu zostały wykorzystane plazmidy z kolekcji Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej: pSUPER-shTSC1 nazywany dalej w pracy shTSC1 oraz pSUPER-shTSC2#2 (Malik i in. 2015) nazywany dalej shTSC2. Są to wektory kodujące shRNA przeciwko mRNA odpowiednio hamartyny i tuberyny. Użyte plazmidy opisano w Tabeli 3.6. Jednocześnie, ponieważ jak wspomniano w punkcie 4.1.4 spodziewany efekt wzrostu ciała komórki miał być słabszy niż przy użyciu PI3K, postanowiono znaleźć optymalny wiek hodowli i czas transfekcji, po którym różnica powierzchni ciała komórki względem kontroli byłaby największa. Zaplanowane warunki hodowli opisano w Tabeli 4.2.

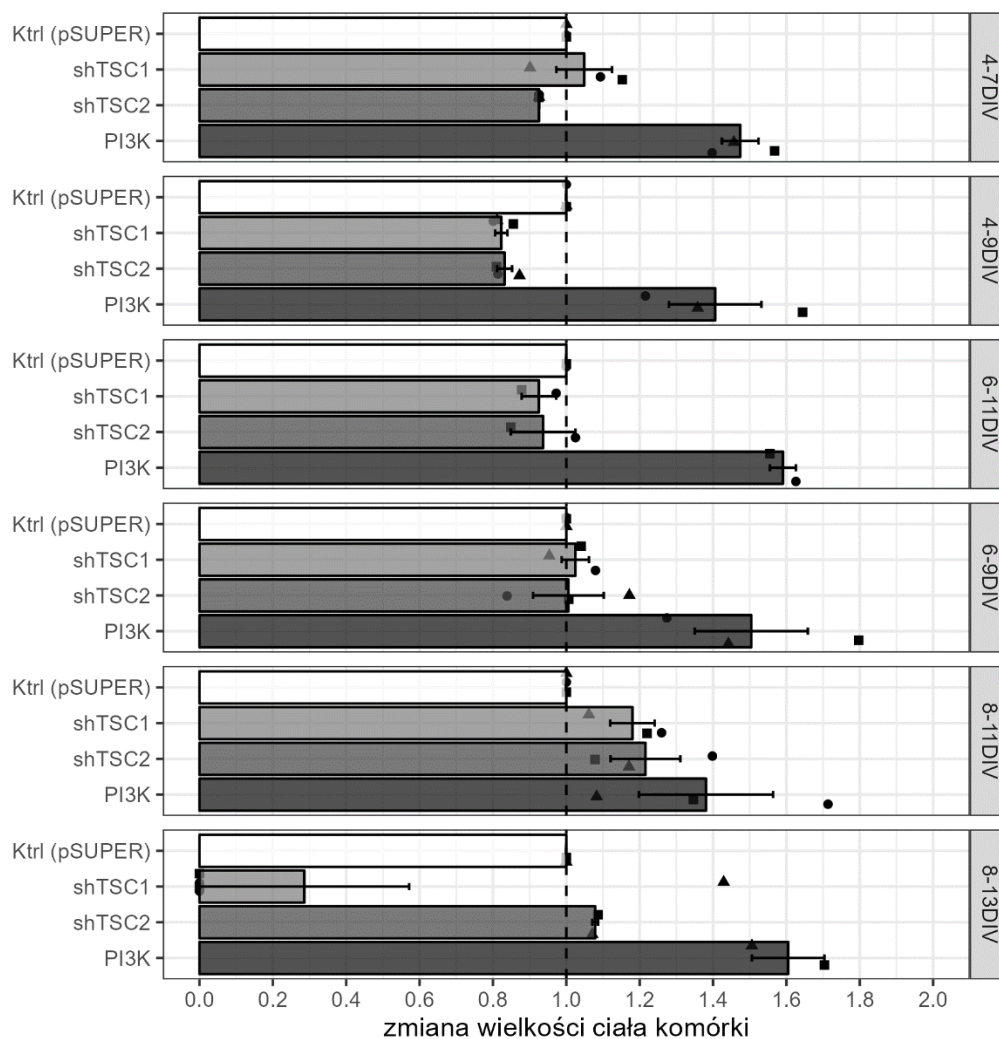
Tabela 4.2. Warunki prowadzenia hodowli w celu znalezienia najsilniejszego fenotypu

Symbol	Dzień transfekcji (DIV)	Dzień utrwalania (DIV)	Czas trwania ekspresji shRNA
4-7DIV	dzień 4	dzień 7	3 dni
4-9DIV	dzień 4	dzień 9	5 dni
6-9DIV	dzień 6	dzień 9	3 dni
6-11DIV	dzień 6	dzień 11	5 dni
8-11DIV	dzień 8	dzień 11	3 dni
8-13DIV	dzień 8	dzień 13	5 dni

Neurony pochodzące z pierwotnych hodowli hipokampalnych transfekowano zgodnie z metodą opisaną w punkcie 3.5.2. Mieszaniny plazmidów użyte w doświadczeniu przedstawiono w Tabeli 3.13. Podobnie jak w przypadku pierwszorzędownego badania, użyto 300 ng plazmidu kodującego shRNA w przeliczeniu na dołek na płytce 24-dołkowej, zachowując całkowitą sumę użytego DNA jako 900 ng. Oprócz shRNA przeciwko mRNA genów *Tsc1* lub *Tsc2*, wykorzystano również wariant z PI3K aby umożliwić porównanie z efektem zaobserwowanym w pierwszorzędownym badaniu przesiewowym. Z tego samego powodu w mieszankach DNA znalazł się również plazmid kodujący β -gal. Kontrola (Ktrl) zamiast pSUPER-shRNA zawierała plazmid pSUPER bez wstawki. Jak wspomniano powyżej, sprawdzano również wiek hodowli i wpływ czasu po transfekcji (Tabela 4.2). Zdjęcia preparatów użyte do analiz uzyskano przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej.

Ryc. 4.8. przedstawia średnie wyniki pomiarów powierzchni ciała komórki transfekowanych neuronów, zebrane z trzech powtórzeń. Zgodnie z oczekiwaniami, transfekcja PI3K skutkowała podobnie jak w pierwszorzędownym badaniu około 60 % wzrostem ciała komórki względem kontroli, z niewielkimi wahaniami zależnie od czasu hodowli. Zarówno przypadku wyciszenia *Tsc1*, jak i *Tsc2* największy wzrost (około 18 % dla shTSC1 oraz 22 % dla shTSC2) względem kontroli uzyskano w przypadku transfekcji w dniu ósmym i utrwalania w dniu jedenastym. Co ważne jednak, stosowanie shTSC1 wiązało się z obecnością licznych komórek na różnych etapach apoptozy. Efekt ten nasilał się wraz z wydłużeniem czasu hodowli, w przypadku transfekcji w dniu ósmym i utrwalania w dniu 13-nastym, żywe neurony udało się zebrać jedynie w jednym powtórzeń. W celu zobrazowania tego zjawiska, na Ryc. 4.8. takie powtórzeń wliczono do średniej jako 0.

Wysoka śmiertelność neuronów w wariantach shTSC1 mogła wynikać zarówno z toksyczności samego shRNA przeciwko hamartynie, jak i efektów wyciszenia genu *Tsc1* w badanym modelu. Niemniej, biorąc pod uwagę wspomniany efekt oraz fakt, że to przy shTSC2 uzyskano największy wzrost ciała komórki, zdecydowano się na przeprowadzenie drugorzędownego badania z wyciszeniem *Tsc2*, jako modelem hipertrofii obserwowanej w TSC w wyniku nadmiernej aktywności mTORC1. Jednocześnie warunki hodowli wybrane do doświadczenia to transfekcja dniu ósmym i utrwalanie w dniu 11-nastym, jako że w tych warunkach wzrost ciała komórki względem kontroli był największy.



Ryc. 4.8. Poszukiwanie warunków hodowli, w których zmiana powierzchni ciała komórki neuronu względem kontroli, na skutek transfekcji plazmidami shTSC1 lub shTSC2 byłaby największa. Szczurze neurony hipokampalne zostały stransfekowane w 4, 6 lub 8-mym dniu hodowli plazmidami shTSC1/shTSC2/ PI3K, lub plazmidem pSUPER bez wstawki jako Kontrola (Ktrl). Utrwalane następowało po 3 lub 5-ciu dniach. Na wykresie przedstawiono średnie pomiary ciała komórki, zależnie od transfekcji oraz czasu hodowli. Słupki błędów oznaczają SEM. Pojedyncze pomiary były normalizowane poprzez podzielenie przez średnią wartość Ktrl z danej płytki eksperymentalnej. Dane zebrane z trzech powtórzeń (N = 3). Czarne punkty wyznaczają średnią z pojedynczego powtórzenia. Do średniej wliczano 0, w przypadku powtórzenia, w którym nie zaobserwowano żywych komórek. Dokładna liczba obserwacji (n) wyniosła:

Hodowle 4-7DIV: Ktrl (100), shTSC1 (70), shTSC2 (88), PI3K (70).

Hodowle 4-9DIV: Ktrl (106), shTSC1 (68), shTSC2 (91), PI3K (71).

Hodowle 6-9DIV: Ktrl (80), shTSC1 (80), shTSC2 (80), PI3K (74).

Hodowle 6-11DIV: Ktrl (60), shTSC1 (52), shTSC2 (60), PI3K (54).

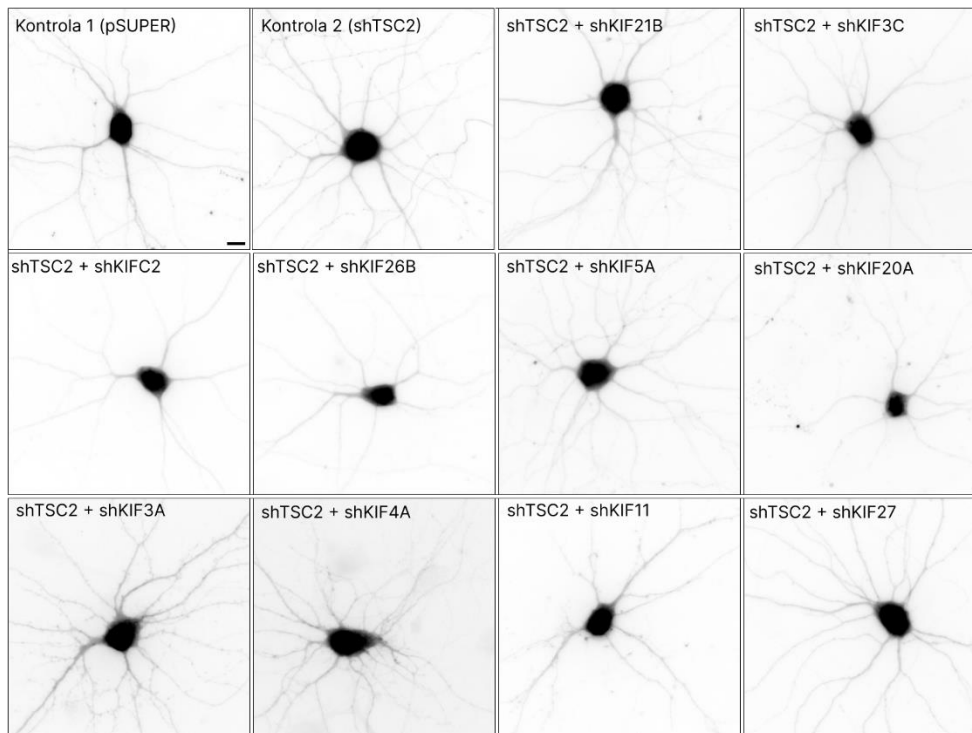
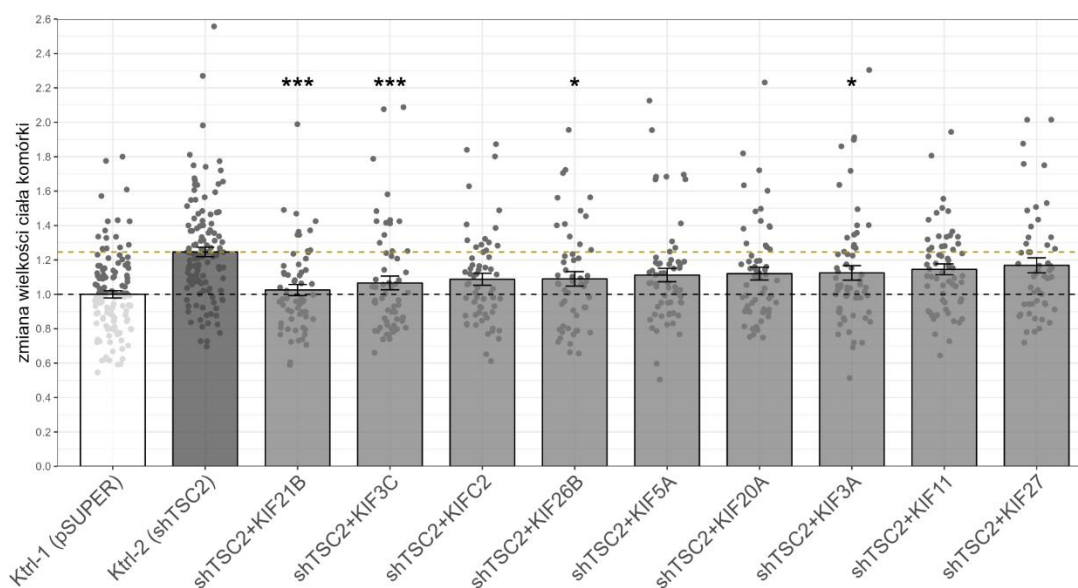
Hodowle 8-11DIV: Ktrl (60), shTSC1 (59), shTSC2 (60), PI3K (51).

Hodowle 8-13DIV: Ktrl (40), shTSC1 (10), shTSC2 (40), PI3K (27).

4.1.4.2 Wpływ transfekcji shRNA przeciwko wybranym kinezydom, na powierzchnię ciała komórki, neuronów z wyciszoną ekspresją *Tsc2*.

Dla kinezydom wybranych w pierwszorzędownym badaniu przesiewowym (punkt 4.1.2.), czyli: KIFC2, KIF3A, KIF3C, KIF5A, KIF11, KIF20A, KIF21B, KIF26B oraz KIF27 zaprojektowano drugorzędowe badanie przesiewowe z użyciem warunków wyłonionych w punkcie 4.1.4.1. W tym celu neurony pochodzące z pierwotnych hodowli neuronów hipokampalnych transfekowano mieszankami trzech shRNA przeciwko wybranym kinezydom, jednocześnie z shRNA przeciwko *Tsc2* oraz plazmidem kodującym GFP. W przeliczeniu na dołek na płycie 24-dołkowej stosowano po 100 ng każdego shRNA przeciw KIF, 300 ng shTSC2 oraz 300 ng GFP. Zastosowano dwie kontrole, Ktrl-1 zamiast shRNA przeciwko kinezydom oraz shTSC2 zawierała plazmid pSUPER bez wstawki, oraz Ktrl-2, w której skład wchodziło shTSC2, jednak była pozbawiona shRNA przeciwko kinezydom. Informacje o zawartości mieszanek DNA zawarto w Tabeli 3.14. Komórki utrwalano w dniu 11-nastym, czyli trzy dni po transfekcji, a następnie obrazowano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach. Na Ryc. 4.9. na panelu A, zaprezentowano przykładowe obrazy mikroskopowe uzyskane w eksperymencie.

Panel B. Ryc. 4.9 przedstawia pomiary powierzchni ciała komórki neuronów w doświadczeniu. Zgodnie z oczekiwaniami, neurony pochodzące z Ktrl-2, w której wyciszono ekspresję *Tsc2* ale nie użyto shRNA przeciwko kinezydom, miały średnio o 20 % większą powierzchnię ciała komórki w stosunku do Ktrl-1. We wszystkich wariantach, u których zastosowano shRNA przeciwko kinezydom razem z shTSC2, zaobserwowano zmniejszenie powierzchni ciała komórki poniżej poziomu Ktrl-2. Aby wykazać, które warianty różniły się od Ktrl-2 w sposób istotny statystycznie, porównywano wartości uzyskane dla danych kinezydom, z wartościami Ktrl-2 z tych samych płytek eksperymentalnych. Tym samym dla shKIF21B, shKIF3C, shKIF26B oraz shKIF3A zmiana ta była istotna statystycznie.

A**B**

Ryc. 4.9 Wyniki drugorzędowego badania przesiewowego dla wybranych wcześniej kinezynach.

A. Przykładowe obrazy mikroskopowe neuronów uzyskanych w eksperymencie. Szczurze neurony hipokampalne transfekowano mieszankami DNA opisanymi w Tabeli 3.14 w ósmym dniu hodowli, zaś utrwalano w dniu jedenastym. **B.** Wyniki pomiarów powierzchni ciała komórki neuronów traktowanych jak w A. Czarna, przerywana linia wyznacza średnią wartość Ktrl-1 (1), zaś przerywana, złota linia - średnią wartość uzyskaną w pomiarach Ktrl-2 (1,22 poziomu Ktrl-1). Wykres przedstawia średnie wartości, zaś szarymi punktami oznaczono pojedyncze pomiary ze wszystkich eksperymentów dla

danego wariantu, znormalizowane poprzez podzielenie przez średnią wartość Ktrl-1 z danego eksperymentu. Wskazane asteryskami poziomy istotności odnoszą się do porównań z Ktrl-2 (shTSC2). Słupki błędów wyznaczają SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Test Manna–Whitneya z poprawką dla wielokrotnych porównań Bonferroniego. Dla każdego wariantu wykonano trzy niezależne powtórzenia ($N = 3$). Dokładne liczby pomiarów (n) przedstawione na rycinie wyniosły: KIF11 (60), KIF20A (60), KIF21B (60), KIF26B (50), KIF27 (51), KIF3A (60), KIF3C (60), KIF4A (60), KIF5A (60), KIFC2 (60), Ktrl-1 (pSUPER) (120), Ktrl-2 (shTSC2) (120).

4.1.5. Wybór kinezyn do dalszej pracy i walidacja założonego modelu

Na podstawie dwóch wykonanych badań przesiewowych jako najbardziej obiecujące pod względem zatrzymania wzrostu neuronu powodowanego nadmierną aktywnością mTOR okazały się: KIF3A, KIF3C, KIF21B oraz KIF26B. Ponieważ następny zaplanowany cel pracy wiązał się z przebadaniem funkcji pełnionych przez wybrane motory w warunkach modelu stwardnienia guzowego, przeszukano literaturę w poszukiwaniu funkcji pełnionych przez te kinezyiny w układzie nerwowym. Podczas gdy zarówno dla tandemu KIF3A/KIF3C, jak i KIF21B znaleziono szereg istotnych funkcji w neuronie (szeroko opisane w punktach 1.2.2, 1.2.3, 1.2.4 oraz podsumowane w Tabeli 4.1), w literaturze nie znajdowało się wiele informacji na temat KIF26B. Z tego powodu w dalszej części pracy zdecydowano się zbadać jedynie: KIF3A, KIF3C oraz KIF21B.

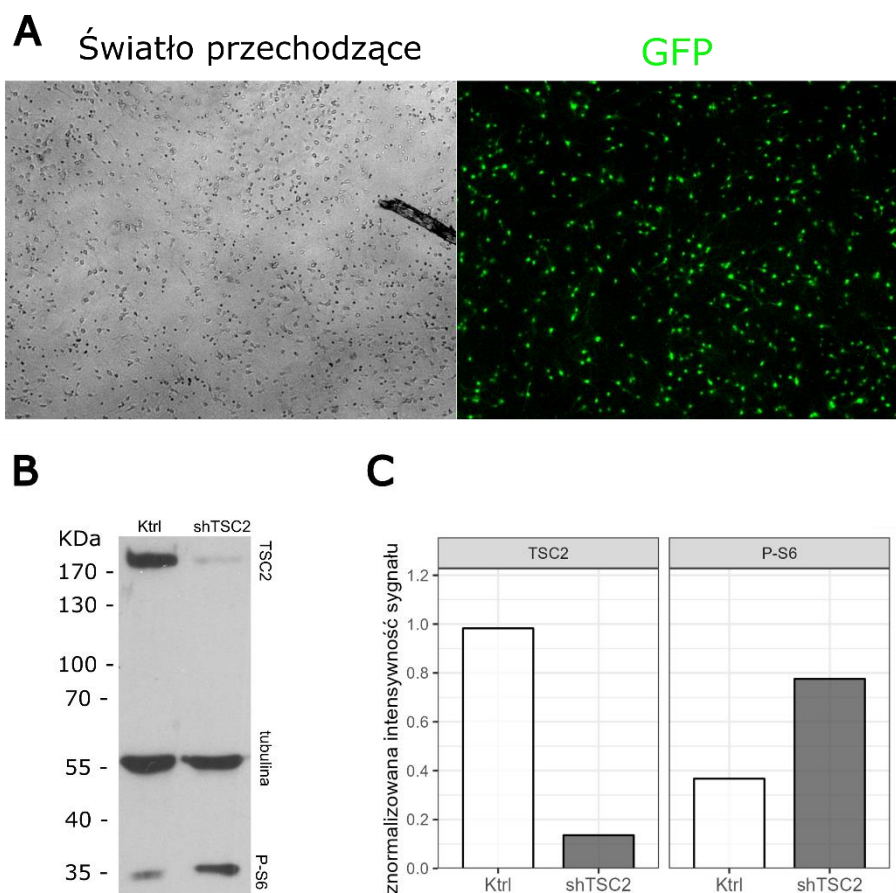
4.1.5.1 Walidacja modelu obniżonej ekspresji TSC2 w neuronach hipokampalnych

Podczas gdy zastosowana w opisanych badaniach przesiewowych lipofekcja, jest skuteczną i nieskomplikowaną metodą wprowadzania DNA do komórek nerwowych, jej wydajność w opisanych eksperymentach była niska. Pozostawała ona na zadowalającym poziomie do zastosowania w przypadku technik mikroskopowych, gdzie możliwa jest łatwa selekcja stransfekowanych komórek, jednakże niewystarczająca w przypadku technik biochemicznych, wrażliwych na obecność tł. Z tego powodu zdecydowano się na skonstruowanie wektorów lentiwirusowych niosących geny kodujące shRNA przeciwko *Tsc2* oraz wybranym kinezyinom, zgodnie z protokołem zawartym w punkcie 3.5.3.

Uzyskane w ten sposób lentiwirusy zostały wykorzystane w celu potwierdzenia, że zastosowanym modelem szczurzych pierwotnych hodowli neuronalnych, shRNA przeciwko TSC2 prowadzi do zmniejszenia produkcji tuberyny, a w konsekwencji również do hiperaktywacji ścieżki mTORC1. W tym celu neurony hipokampalne transdukowano wektorem lentiwirusowym pULTRA-shTSC2 (określanym dalej jako shTSC2) oraz wektorem lentiwirusem niekodującym żadnego shRNA (określanym dalej jako Ktrl). Jednocześnie, lentiwirusy powstałe na bazie plazmidu pULTRA pozwalają na łatwą ocenę skuteczności transdukcji, dzięki jednoczesnej produkcji białka GFP. Eksperyment przeprowadzono w analogicznych punktach czasowych, jak w drugorzędowym badaniu przesiewowym.

Tym samym transdukcja odbyła się w dniu ósmym, zaś komórki zbierano po trzech dniach, w dniu 11-nastym. Zgodnie z oczekiwaniami, transdukcja skutkowała znacznie większą wydajnością w porównaniu do lipofekcji, zależnie od pola widzenia sięgając nawet 90 % (Ryc. 4.10 A).

Tak uzyskany materiał przebadano techniką Western blot, używając przeciwciał rozpoznających tuberynę, oraz fosforylowane białko rybosomalne S6 (P-S6, seryny 235/236). Jak przedstawiono na Ryc. 4.10. w neuronach transdukowanych wirusem shTSC2, doszło do około 80 % spadku poziomu tuberyny w porównaniu do komórek transdukowanych wirusem kontrolnym. Jednocześnie, poziom P-S6, będący kanoniczną metodą badania aktywności mTORC1 (Switon i in. 2017) uległ zwiększeniu o około 35% w wariancie shTSC2 względem kontroli.



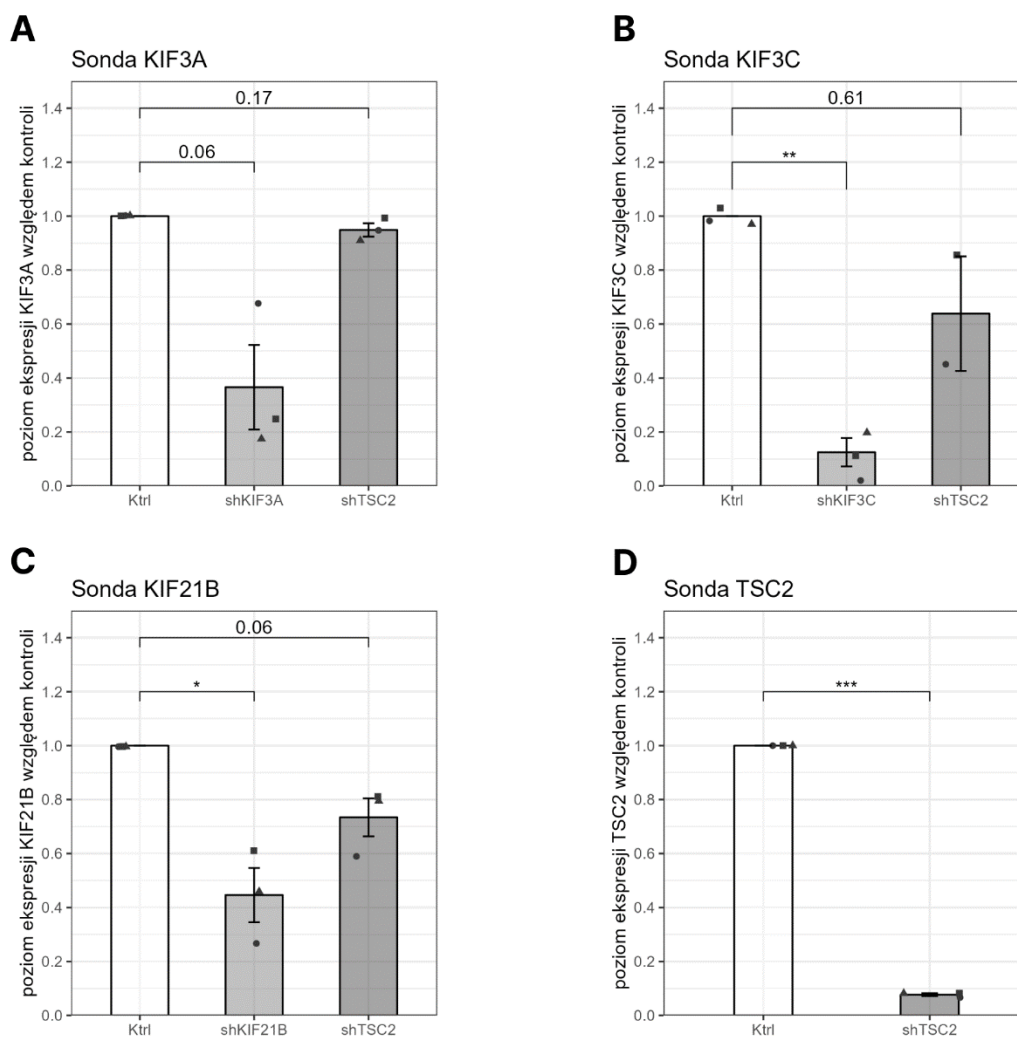
Ryc. 4.10. Analiza poziomu białek TSC2 oraz P-S6 w neuronach transdukowanych przygotowanymi wektorami lentiwirusowymi. A. Przykładowy obraz z mikroskopii przyżyciowej ilustrujący wydajność transdukcji. Komórki wykazują fluorescencję GFP na skutek zakażenia wirusem pULTRA. **B.** Reprezentatywny wynik analizy Western blot. Pomiar poziomu białek: tuberyny, P-S6 (ser. 235/236) oraz tubuliny, w neuronach hipokampalnych transdukowanych w 8-mym dniu hodowli wirusem pULTRA-shTSC2 (shTSC2) lub pULTRA nie kodującym shRNA (Ktrl) i utrwalanych w dniu

11-tym. C. Wynik pomiarów densytometrycznych, prążków widocznych na B. Wykres przedstawia średnią intensywność pikseli w obszarze odpowiadającym prążkom odpowiednio dla TSC2 i P-S6. W celu zniwelowania różnic wynikających z nierównej ilości materiału nałożonego na żel, wartości zostały znormalizowane poprzez podzielenie przez średnią intensywność prążków tubuliny z danego wariantu.

4.1.5.2 Walidacja używanych sekwencji shRNA, oraz pomiar ekspresji genów kinezyn w modelu komórek nerwowych shTSC2

Aby sprawdzić czy zaobserwowany w poprzednich doświadczeniach efekt użycia shRNA przeciwko KIF3A/3C oraz KIF21B na wzrost ciała komórki w neuronach transfekowanych PI3K (Ryc. 4.4. panel B) oraz shTSC2 (Ryc. 4.9 panel B), wiąże się rzeczywiście z wyciszeniem wybranych genów, postanowiono zbadać ich ekspresję przy pomocy techniką qPCR przy użyciu sond TaqMan. Jednocześnie, postawiono pytanie, czy w neuronach z wyciszoną ekspresją *Tsc2* dochodzi do istotnej zmiany ekspresji genów wybranych kinezyn.

W tym celu neurony hipokampalne w 8-mym dniu hodowli transdukowano wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA przeciwko jednej z trzech wybranych kinezyn, TSC2 lub niezawierającym żadnej sekwencji shRNA jako kontrolą (Ktrl). Następnie po trzech dniach, w 11-nastym dniu hodowli zbierano materiał, z którego izolowano RNA, syntetyzowano cDNA po czym przeprowadzano reakcję RT-qPCR zgodnie z protokołem opisanym w punktach 3.2.8 – 3.2.11. Do badania poziomu ekspresji genów wykorzystano sondy TaqMan wykrywające transkrypty: KIF3A, KIF3C, KIF21B, TSC2 oraz GAPDH.



Ryc. 4.11. Analiza efektywności użytych shRNA i pomiar ekspresji genów kinezyn w neuronach 8-11 DIV metodą RT-qPCR. Neurony transdukowano w ósmym dniu hodowli wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA przeciwko wybranym kinezynom lub przeciwko TSC2. Jako Kontrola (Ktrl) wykorzystano wektor lentiwirusowy niekodujący shRNA. Materiał zbierano po 72 godz. w dni 11-nastym. Na osi poziomej opisano z jakiego wariantu pochodzi materiał użyty do analizy. Na osi pionowej oznaczono poziom ekspresji mRNA obliczony metodą $\Delta\Delta C_t$, na podstawie sygnału z sond wykrywających transkrypty: **A.** KIF3A. **B.** KIF3C. **C.** KIF21B. **D.** TSC2. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach ($N = 3$), dodatkowo w każdym stosując trzy powtórzenia techniczne ($n = 9$). Pomiary w obrębie każdego powtórzenia zostały znormalizowane poprzez podzielenie przez poziom ekspresji badanego genu względem poziomu GAPDH w próbce Kontroli (Ktrl). Punktami oznaczono znormalizowane wyniki z pojedynczego powtórzenia. W celu zobrazowania różnicy w ekspresji badanych genów względem kontroli, wszystkie pomiary dodatkowo podzielono przez wartość Ktrl z danego eksperymentu. Pomiar istotności statystycznej wykonano przy pomocy testu t studenta jednej próby, poprzez porównanie do 1. W przypadku braku istotności wartość p podano nad wykresem, w pozostałych przypadkach oznaczono gwiazdką, gdzie: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$.

Jak wskazują wyniki przedstawione na Ryc. 4.11. użyte wektory lentiwirusowe kodujące shRNA przeciwko mRNA KIF3A, KIF3B, KIF21B oraz TSC2 doprowadziły w badanych warunkach do spadku poziomu mRNA, przeciwko którym zostały zaprojektowane. Jednakże należy zaznaczyć, że w przypadku shKIF3A wynik pozostał nieznacznie poniżej poziomu istotności statystycznej.

Jednocześnie nie wykazano, aby w komórkach z wyciszoną ekspresją *Tsc2* doszło do istotnej zmiany w poziomie ekspresji, któregośkolwiek z badanych genów kinezyń.

4.2. Poszukiwanie funkcji wybranych kinezyń, mogących ulegać zaburzeniu w komórkowym modelu stwardnienia guzowatego.

W opisanych do tej pory eksperymentach wykazano, że obniżenie poziomu ekspresji niektórych genów kinezyń, zdaje się skutkować zatrzymaniem nadmiernego wzrostu ciała komórki neuronu w modelu stwardnienia guzowatego. Jednocześnie, jak opisano we wstępie, kinezyńy pełnią w komórce nerwowej szereg funkcji koniecznych dla jej rozwoju. Oprócz kanonicznego transportu aksonalnego i dendrytycznego, można wymienić choćby regulowanie dynamiki cytoszkieletu, utrzymanie pierwotnych rzęsek, czy wpływ na ścieżki sygnałowe.

W związku z tym, w drugiej części pracy postanowiono zbadać, czy zaobserwowaną zmianę w fenotypie komórki można powiązać, z którąś ze znanych funkcji pełnionych przez kinezyńy, oraz czy wspomniane funkcje ulegają zaburzeniu w modelu wyciszenia *Tsc2*.

4.2.1 Analiza mobilności wybranych kinezyń w komórkach neuronalnych z wyciszoną ekspresją *Tsc2*

Pierwszym pytaniem jakie zostało postawione w kontekście funkcji wybranych kinezyń było, czy wyciszenie *Tsc2* będzie skutkowało zmianą w efektywności lub prędkości ich ruchu. W tym celu wykorzystano plazmidy znajdujące się w kolekcji laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej: KIF21B^{truncated}-GFP, KIF3A^{truncated}-GFP oraz KIF3C^{truncated}-GFP nazywane dalej dla uproszczenia: KIF21Bt-GFP, KIF3At-GFP i KIF3Ct-GFP. Plazmidy te kodują formę skróconą (ang. *truncated*) łańcuchów ciężkich kinezyń, zawierającą jedynie domenę motoryczną w fuzji białkiem zielonej fluorescencji. W ten sposób, niemożliwe staje się wejście przez te kinezyńy w występujący naturalnie stan auto-inhibicji i pozostają one w stanie aktywnym.

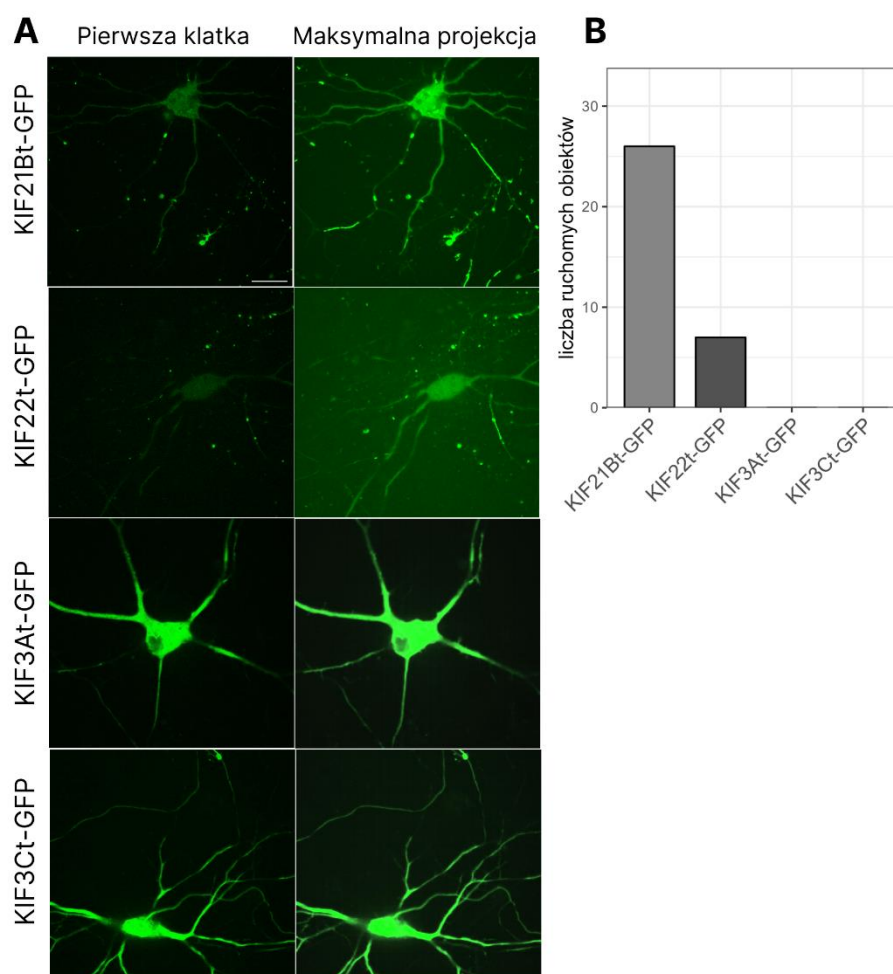
Jednym z wyzwań w projektowaniu opisanego eksperymentu był fakt, że potencjalnie zaobserwowane zmiany w ruchu kinezyń, mogłyby wynikać nie tyle z ich specyficznego oddziaływania z mTOR, co być objawem ogólnego wzrostu aktywności metabolicznej wynikającej z obniżenia ekspresji *Tsc2*. Aby zaadresować ten problem zdecydowano o włączeniu dodatkowej kontroli w postaci konstrukt kinezyńy, której wyciszenie nie wydaje się wpływać na rozwój neuronu w modelu nadaktywnego mTOR (zgodnie z obserwacjami z punktu 4.1.1). Do tego celu wybrano konstrukt KIF22^{truncated}-GFP (KIF22t-GFP)

Doświadczenie przeprowadzono transfekując neurony hipokampalne w ósmym dniu hodowli plazmidami KIF21Bt-GFP, KIF3At-GFP, KIF3Ct-GFP lub KIF22t-GFP wraz z pSUPER-shTSC2 lub pSUPER nie kodującym shRNA jako kontrolą (Ktrl). Po trzech dniach od transfekcji, w dniu 11-nastym, komórki obrazowano przeźyciowo przy użyciu systemu ANDOR spinning disc zgodnie z opisem zawartym w punkcie 3.8.3. Analiza fluorescencji GFP wykazała skuteczną produkcję wszystkich rekombinowanych białek po transfekcji. Jednakże, tylko w przypadku KIF21Bt-GFP oraz KIF22t-GFP możliwe było zaobserwowanie wyraźnych, ruchomych punktów (Ryc. 4.12), umożliwiających dalszą analizę ich mobilności. Zdecydowano się zatem analizować jedynie ruch KIF21Bt-GFP oraz KIF22t-GFP. Dodatkowo, postanowiono przeprowadzić analizę mobilności jedynie w aksonach, ze względu na jednorodną orientację mikrotubul, a co za tym idzie bardziej przewidywalny model ruchu białek motorycznych (opis w punkcie 1.2.2.). Aksony identyfikowano przeźyciowo, dodając do pożywki przed obrazowaniem przeciwciało rozpoznające neurofascynę, sprzężone z barwnikiem CF640R. Na uzyskanych filmach, przy pomocy rozszerzenia KymographClear do oprogramowania ImageJ, analizowano prędkość, czas trwania ruchu, liczbę przerw oraz średnią odległość pokonaną przez obiekty poruszające się wzdłuż aksonu (zgodnie z opisem w punkcie 3.9.2). Przykładowe filmy zawarto na załączonej pamięci USB, oraz pod adresami internetowymi poniżej:

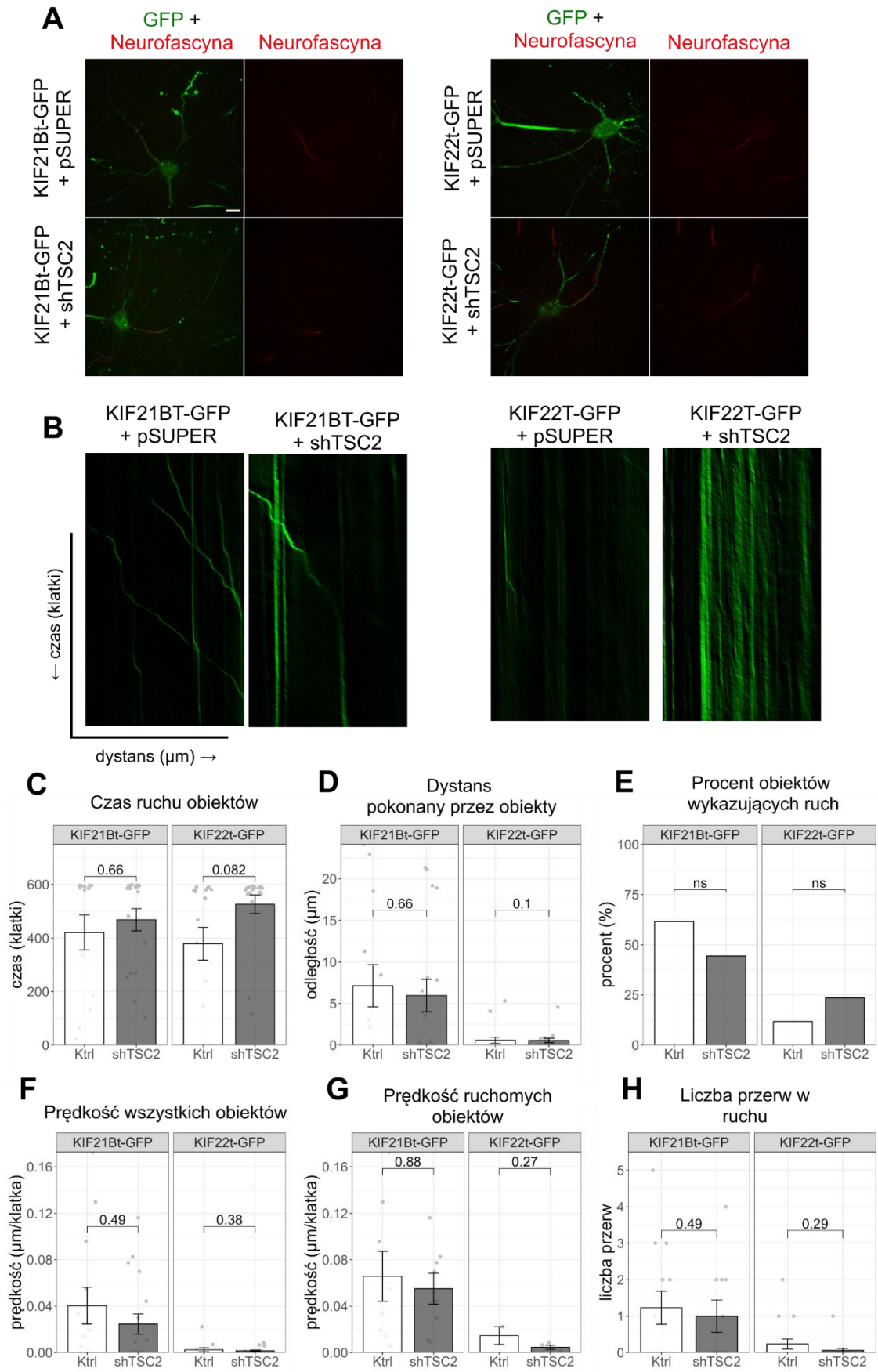
Film 1. KIF21Bt-GFP: <https://youtu.be/Z8YHShEFiaA>

Film 2. KIF22t-GFP: <https://youtu.be/61qCMVI4TmE>

Zarówno w przypadku KIF21Bt-GFP jak i KIF22t-GFP w obrębie aksonu zaobserwowano liczne obiekty, dające się wyróżnić jako pojedyncze punkty. Przy czym w przypadku KIF21Bt-GFP znacznie większa część mierzonych obiektów (około 60 %) cechowała się mobilnością w porównaniu z KIF22t-GFP gdzie było to około 12 % w Ktrl. Podobnie, obiekty w wariantach Ktrl dla KIF21Bt-GFP wykazywały się większą prędkością (Ryc. 4.13 F i G), pokonaną odległością (Ryc. 4.13 D), jak również większą liczbą przerw w ruchu (Ryc. 4.13. H) w porównaniu dla analogicznych wariantów KIF22t-GFP. Jednakże, sam czas trwania ruchu obiektów (Ryc. 4.13 C) był podobny dla KIF21Bt-GFP (421 klatek) i KIF22t-GFP (379 klatek). Jednocześnie ani dla obiektów KIF21Bt-GFP, ani KIF22t-GFP nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy wariantami Ktrl, a tymi transfekowanymi shRNA przeciwko *Tsc2*, w żadnym z badanych parametrów (Ryc. 4.13. C-H). Zaskakująco, na wszystkich zarejestrowanych filmach, w obrębie obszaru rozpoznanego jako akson, dzięki barwieniu przeciwciałem rozpoznającym neurofascynę, zaobserwowane obiekty GFP wypadkowo poruszały się w kierunku ciała komórki. Jest to efekt przeciwny od spodziewanego dla konstruktów kinezyn, których aktywny ruch odbywa się w kierunku wierzchołka aksonu. Możliwe przyczyny omówiono w dyskusji.



Ryc. 4.12. Porównanie poziomu produkcji i mobilności konstruktyw kinezyń z metką GFP nadprodukowanych w neuronach hipokampalnych. Szczurze neurony hipokampalne transfekowane były w ósmym dniu hodowli plazmidami kodującymi fuzyjne białka w postaci skróconych form kinezyń z metką GFP. Obrazowanie prowadzone było w dniu jedenastym przy użyciu systemu ANDOR spinning disc. **A.** Pierwsze klatki oraz projekcje maksymalnej intensywności z filmów poklatkowych. **B.** Liczba ruchomych obiektów GFP wykrytych przez rozszerzenie „TrackMate” do oprogramowania ImageJ, przy progu wykrycia ustawionym na 1 i średnicy obiektu 20 pikseli.



Ryc. 4.13. Analiza mobilności konstruktów kinezyń z metką GFP, w neuronach hipokampalnych w warunkach wyciszenia TSC2. Neurony hipokampalne transfekowano w 8-mym dniu hodowli plazmidami kodującymi skrócone formy kinezyń KIF21B lub KIF22 w fuzji z GFP, wraz z shTSC2 lub pSUPER (Ktrl). Obrazowane przy użyciu systemu ANDOR spinning disc po trzech dniach, w 11-nastym dniu hodowli. **A.** Pierwsza klatka z przykładowych filmów poklatkowych. Akson został uwidoczniiony poprzez użycie przeciwciała sprzężonego z barwnikiem CF640R rozpoznającego neurofascynę. Skala – 10 μm **B.** Przykładowe kymogramy powstałe jako wizualizacja ruchu obiektów kinezyń-GFP wzdłuż aksonu komórek transfekowanych jak w A. Ruch obiektów był mierzony na odcinku 23,66 μm , przez 3 min. (600 klatek). **C.** Średni czas trwania ruchu obiektów mierzony w klatkach (jedna klatka = 0,3 sek.). Słupki błędów wyznaczają SEM. Istotności statystyczne wyznaczone testem Manna-Whitneya. **D.** Średnia odległość pokonana przez objekty mierzona w μm . Słupki błędów oznaczają SEM, istotności statystyczne wskazane na wykresie wyliczone testem Manna-Whitneya. **E.** Procent ruchomych obiektów. ns – brak istotności statystycznej. Liczone za pomocą dokładnego testu Fishera. **F.** Średnia prędkość wszystkich obiektów w $\mu\text{m}/\text{klatkę}$. Słupki błędów wyznaczają SEM. Istotności statystyczne wyznaczone testem Manna-Whitneya. **G.** Średnia prędkość ruchomych obiektów w $\mu\text{m}/\text{klatkę}$. Słupki błędów wyznaczają SEM. Istotności statystyczne wyznaczone testem Mann'a-Whitneya. **H.** Średnia liczba przerw w ruchu obiektów. Słupki błędów wyznaczają SEM. Istotności statystyczne wyznaczone testem Manna-Whitneya. Liczba obserwacji (n) w grupach: KIF21Bt-GFP-Ktrl (6), KIF21Bt-GFP-shTSC2 (7), KIF22t-GFP-Ktrl (7), KIF22t-GFP-shTSC2 (7).

4.2.2 Analiza wpływu obniżenia poziomu KIF21B na dynamikę mikrotubul w komórkach nerwowych o wyciszonej ekspresji *Tsc2*

Ze względu na niesatysfakcjonujące działanie konstruktów kinezyń z metką GFP w zakładanym modelu (Ryc. 4.12, 4.13), w dalszej części pracy postanowiono skupić się na niezwiązanych bezpośrednio z transportem, a zatem niekanonicznych funkcjach kinezyń.

Jedną z wspomnianych niekanonicznych funkcji KIF21B, jest regulacja dynamiki mikrotubul (opisane w punkcie 1.2.4.). Jednocześnie, poprawna organizacja cytoszkieletu odgrywa zasadniczą rolę we wzroście neuronu. Tym samym postanowiono sprawdzić, czy w modelu komórek nerwowych o ograniczonej ekspresji *Tsc2* można zaobserwować różnice w dynamice mikrotubul, oraz czy jednoczesne wyciszenie *Kif21b* wpłynie na ten fenotyp. W tym celu wykorzystano plazmid kodujący białko EB3 należące do białek śledzących „+” koniec mikrotubul, w fuzji z GFP. Nadprodukcja wspomnianego białka, umożliwia śledzenie na żywo mikrotubul w fazie wzrostu, co objawia się charakterystycznym obrazem w trakcie mikroskopii przeżywczej, określanym w literaturze jako „komety” (Jaworski 2018). Jednocześnie wcześniejsze doświadczenia prowadzone przy okazji badań do niniejszej pracy doktorskiej, wykazały, że dynamika ta jest trudna do obserwacji w starszych

neuronach. Z tego względu zdecydowano, aby w doświadczeniu wykorzystać komórki świeżo wyizolowane z mózgow embrionów szczurzych, uzyskiwane przy okazji zakładania standardowych pierwotnych hodowli neuronalnych. Taki wybór pozwala na obserwację dynamiki na wcześniejszym etapie rozwoju neuronów. Jednocześnie, aby wprowadzić rekombinowane DNA w jak najwcześniejszym stadium wzrostu, zamiast transfekcji przy użyciu Lipofektaminy 2000 zastosowano technikę nukleofekcji za pomocą elektroporacji (opisana w punkcie 3.5.2), co pozwoliło na transfekcję komórek jeszcze przed wysianiem na szkiełka hodowlane. Ze względu jednak na konieczność użycia znacznej liczby komórek (5 mln na wariant), zamiast komórek pochodzących z hipokampu, postanowiono użyć komórek z kory mózgowej, które dostępne są w znacznie większej liczbie w momencie zakładania pierwotnej hodowli neuronalnej. Tym samym, w kontraście do badań przedstawionych w punktach 4.1.1 oraz 4.14., gdzie modelem były 8-mio dniowe neurony hipokampalne, w opisywanym tu eksperymencie wykorzystano neurony korowe w dniu ich izolacji, co zostało opisane jako dzień 0. Mieszanki DNA używane do nukleofekcji przedstawiono w Tabeli 3.17.

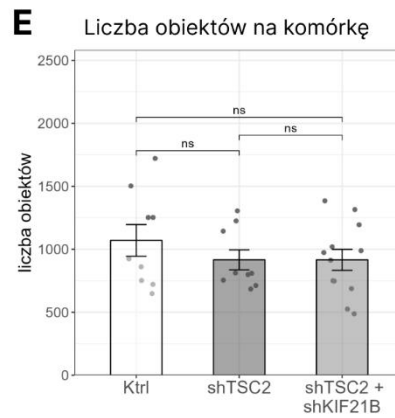
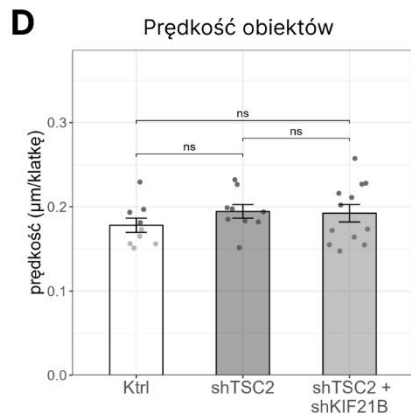
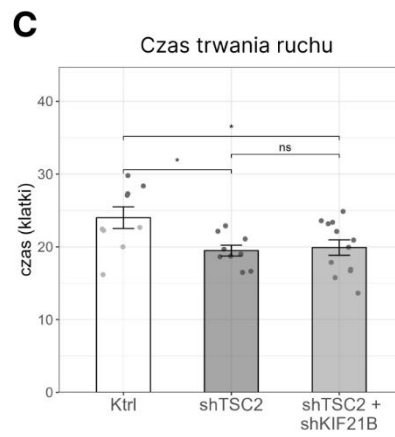
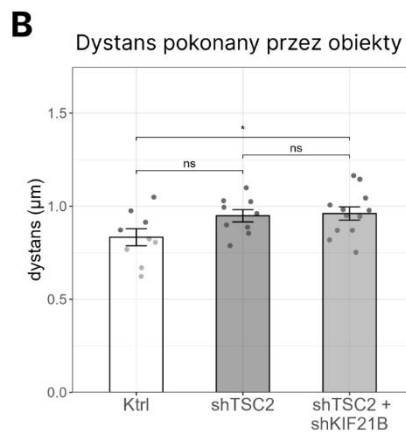
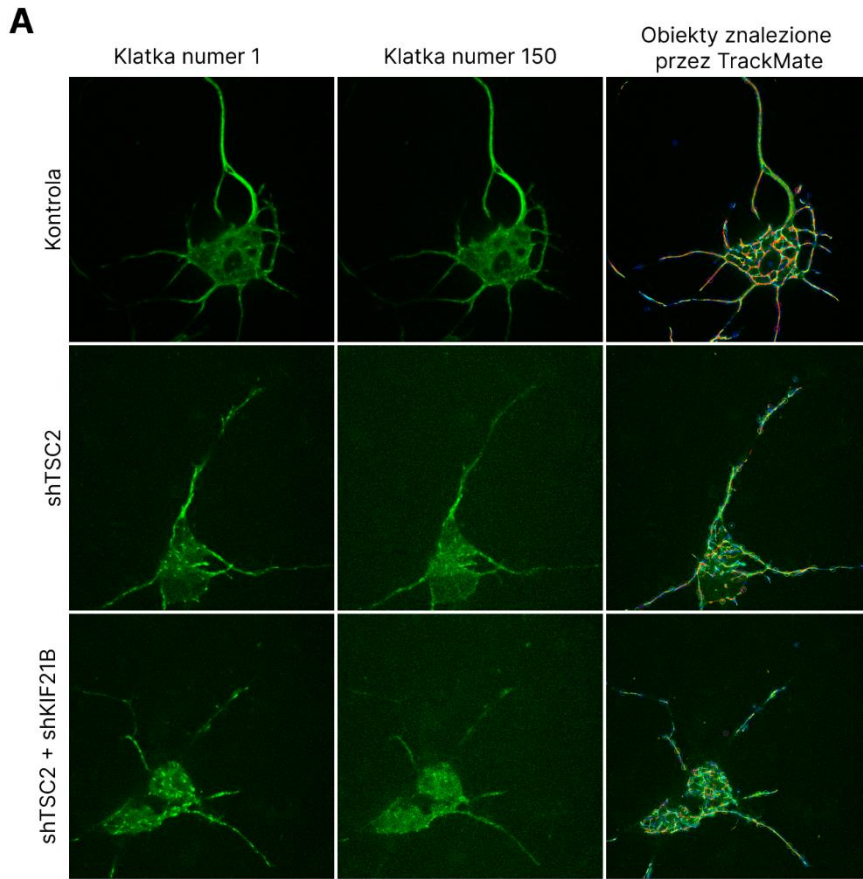
Po 3 dniach od elektroporacji, w trzecim dniu hodowli, komórki obrazowano przeżyciowo zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.8.3. Na uzyskanych filmach poklatkowych, można było zauważyć silne wypalenie sygnału fluorescencyjnego (ang. *photo-bleaching*), szybko postępujące wraz z przebiegiem nagrania, co utrudniało analizę. Z tego powodu zdecydowano się nie analizować pełnej długości filmów, a jedynie ich połowę, czyli 300 klatek zebranych w czasie 90 sek. Obraz analizowano przy pomocy rozszerzenia TrackMate do programu ImageJ, zbierając dane o długości ruchów, prędkości oraz liczbie ruchomych obiektów. Przykładowe filmy, przyspieszone 9-krotnie względem prawdziwego czasu, zawarto na załączonej pamięci USB, oraz pod podanymi adresami internetowymi:

Film 3: Ktrl <https://youtu.be/CKSdLpNjL3E>

Film 4: shTSC2 <https://youtu.be/ESEfsp146aM>

Film 5: shTSC2 + shKIF21B <https://youtu.be/txpNcTe3fDE>

W analizowanym materiale, “komety” rosnących mikrotubul wykazywały się nieco dłuższą przebytą drogą przed zaniknięciem w wariantach transfekowanych shTSC2 względem Ktrl, przy czym jedynie w przypadku wariantu shTSC2+shKIF21B różnica ta była istotna statystycznie. Co ważne jednak, pomiędzy wariantami shTSC2 a shTSC2+shKIF21B różnice nie występowały, a średnia odległość była niemal identyczna (Ryc. 4.14 B). Czas trwania wzrostu pojedynczych ‘+’ końców mikrotubul, okazał się również być nieco krótszy dla wariantów transfekowanych shTSC2 względem Ktrl (Ryc. 4.14 C), jednak ponownie, równoczesna transfekcja shKIF21B zdaje się nie mieć żadnego wpływu. Co ciekawe, pomimo nieco dłuższej zmierzonej odległości na jaką rosły pojedyncze mikrotubule i krótszego czasu trwania tego zjawiska w wariantach shTSC2 względem Ktrl, uśrednione różnice w prędkości okazały się nie istotne statystycznie (Ryc. 4.14 D). Również zmierzona liczba ruchomych obiektów w przeliczeniu na komórkę wydaje się nie różnić pomiędzy wariantami (Ryc. 4.14 E). Przeprowadzone eksperymenty nie wykazały istotnego wpływu wyciszania *Kif21b* na badane procesy w komórce nerwowej, niezależnie od jednoczesnego wyciszania *Tsc2*.



Ryc. 4.14. Analiza dynamiki rosnących mikrotubul, w neuronach korowych transfekowanych EB3-GFP wraz z shTSC2 i shKIF21B. Zaraz po izolacji, komórki pochodzące ze szczurzej, embrionalnej kory mózgowej zostały poddane nukleofekcji, plazmidami EB3-GFP, oraz zależnie od wariantu pSUPER (Ktrl), shTSC2, shKIF21B lub ich kombinacją (opisane na osi poziomej), a następnie obrazowano przyżyciowo po 3 dniach od nukleofekcji. **A.** Obrazy pochodzące z uzyskanych filmów poklatkowych. W pierwszej kolumnie zaprezentowana pierwsza klatka z przykładowego filmu. W drugiej kolumnie klatka numer 150, ukazująca postęp wypalenia sygnału fluorescencyjnego. Trzecia kolumna przedstawia wszystkie trajektorie obiektów znalezionych przez algorytm TrackMate na przykładowych filmach. Skala = 10 μm . **B.** Średni dystans pokonany przez obiekty EB3-GFP przed zaniknięciem. **C.** Czas trwania ruchu wykrytych obiektów EB3-GFP przed zaniknięciem. **D.** Średnia prędkość znalezionych obiektów. **E.** Średnia liczba obiektów na filmie, zidentyfikowanych przez TrackMate jako ruchome. Wszystkie przedstawione wykresy ukazują średnią, przy czym szarymi punktami oznaczono uśrednione wartości dla pojedynczych komórek, zaś słupki błędów wyznaczają SEM. Poziom istotności wyliczony przez test t studenta. * $p < 0,5$; ns – brak istotności. Dokładna liczba obrazowanych komórek (n) wyniosła odpowiednio: Ktrl (9), shTSC2 (9), shTSC2 + shKIF21B (13).

4.2.3. Wpływ wyciszenia KIF3A oraz KIF3C na rozwój rzęsek, w neuronach o ograniczonej ekspresji *Tsc1/Tsc2*

Jak wspomniano we wstępie (punkt 1.2.4) KIF3A wraz z KIF3C, pełnią istotną rolę w transporcie rzęskowym. Większość badań opisuje kompleks KIF3A i KIF3C jako heterotrimer wraz z białkiem KAP3, choć KIF3C może również funkcjonować jako homodimer (Quinn i in. 2020). Jednocześnie, pierwotne rzęski pełnią istotną rolę w rozwoju i kontrolowaniu ścieżek sygnałowych w neuronie (Lepanto, Badano, i Zolessi 2016), zaś w literaturze można znaleźć liczne informacje o ich powiązaniu ze ścieżką mTOR (Lai i Jiang 2020; Boehlke i in. 2010b). Co więcej, niektóre badania sugerują własny, niekiedy różny wpływ TSC1 oraz TSC2 na rozwój rzęsek, być może na skutek mechanizmu niezależnego od mTOR (Rosengren i in. 2018; Armour, Carson, i Ess 2012; DiBella, Park, i Sun 2009). Przy czym praca Rosengren i wsp. (2018) sugeruje, że brak TSC1 skutkuje dłuższymi rzęskami, zaś brak TSC2 krótszymi. Z tego powodu postanowiono sprawdzić po pierwsze, jak wyciszenie zarówno badanego do tej pory *Tsc2*, jak i *Tsc1* wpływa na długość i obecność rzęsek w modelu neuronów hipokampalnych, po drugie zaś czy fenotyp ten ulega zmianie przy jednoczesnym wyciszeniu ekspresji *Kif3a* lub *Kif3c*.

4.2.3.1 Wpływ wyciszenia KIF3A oraz KIF3C na rozwój rzęsek, w neuronach hipokampalnych o ograniczonej ekspresji *Tsc1/Tsc2* w dniach 8 - 11 hodowli.

Dla spójności z wcześniej przeprowadzonymi eksperymentami, doświadczenie postanowiono przeprowadzić w przedziale czasowym odpowiadającym drugorzędowemu badaniu przesiewowemu (punkt 4.1.4). Tym samym, neurony hipokampalne transfekowano w 8-mym dniu hodowli mieszankami plazmidów przedstawionymi w Tabeli 3.15. zaś utrwalano je w dniu 11-nastym. Uzyskane preparaty barwiono przy wykorzystaniu przeciwciała rozpoznającego białko cyklazę adenylową 3 (ang. *adenyly*

cyclase 3, AC3 będące specyficznym markerem neuronalnych, pierwotnych rzęsek. W planie doświadczenia zakładano również dołączenie wariantów hodowanych w warunkach głodzenia, przez zmniejszenie o 90 % stężenia B27 w pożywce, jako że rzęski są silnie regulowane przez autofagię (S. Wang i in. 2015). W eksperymencie pilotażowym nie udało się jednak uzyskać żywych neuronów w tych warunkach, jako że wszystkie ulegały apoptozie.

Preparaty obrazowano przy użyciu mikroskopii konfokalnej (opisane w punkcie 3.8.2) zbierając po 24 zdjęcia w osi Z, w celu pełnego uwidocznienia rzęsek, które mogły układać się w różnych płaszczyznach względem komórki. Jednocześnie w trakcie zbierania stwierdzono, że niektóre z rzęsek mogą układać się prostopadle do komórki, w orientacji „na sztorc”. W ten sposób ich pełna długość nie byłaby widoczna na rutynowo stosowanej projekcji maksymalnej intensywności (ang. *maximum intensity projection*, MIP). Z tego powodu, wykorzystując uzyskane serie zdjęć, wygenerowano modele trójwymiarowe komórek, na których następnie mierzono długość rzęsek pod różnymi kątami obracając wzdłuż osi Y. Przykładowe filmy ilustrujące obrót uzyskanych modeli, które posłużyły do stworzenia Ryc. 4.15 zawarto na dołączonej pamięci USB, oraz pod adresami:

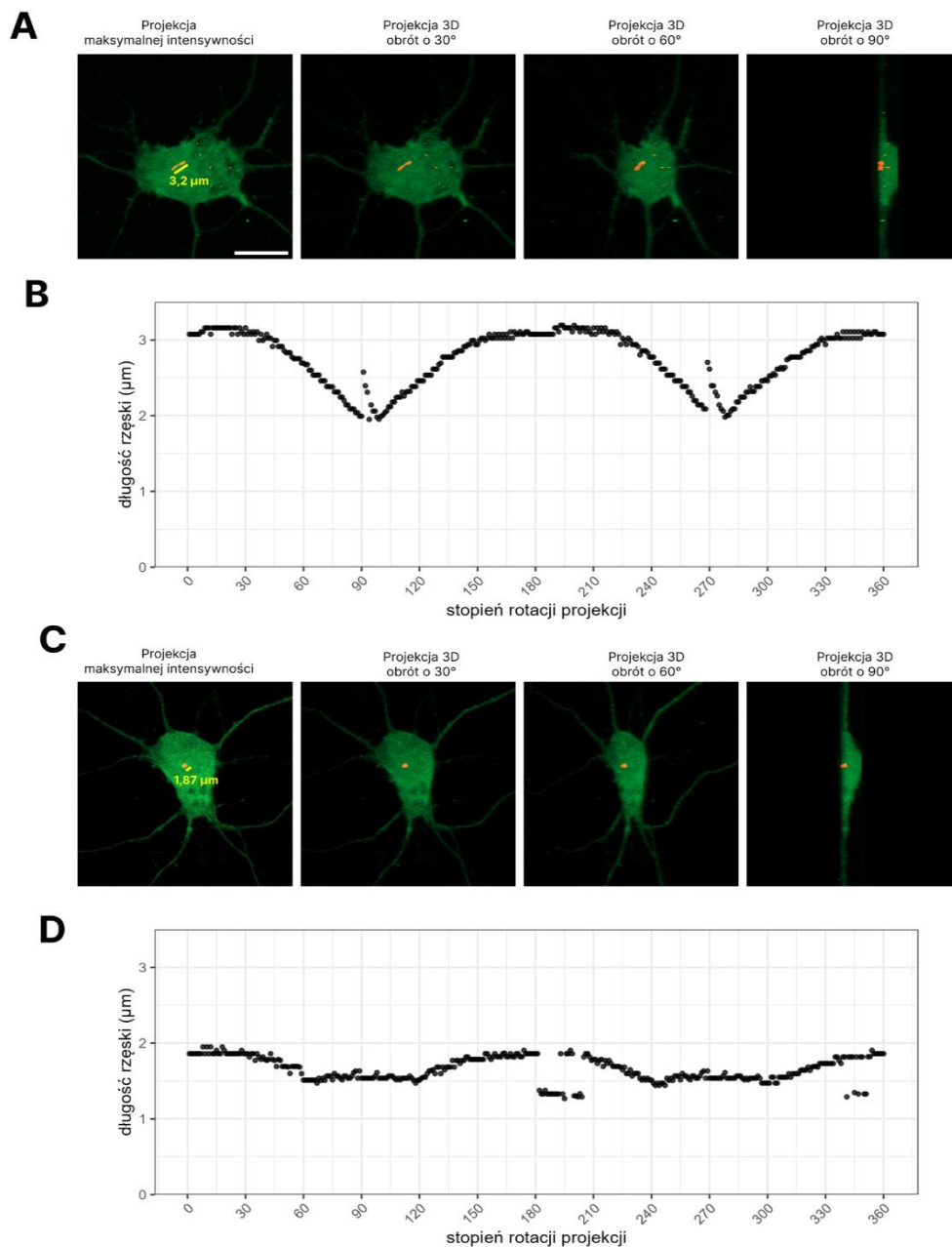
Film 6: Obrót projekcji 3D neuronu numer 1 <https://youtu.be/DHVhLtEFGg>

Film 7: Obrót projekcji 3D neuronu numer 2 https://youtu.be/2C_tfwuJ26E

Jak przedstawiono na rycinie 4.15., zależnie od kąta pomiaru, długość rzęski ulegała zmniejszeniu lub pozostawała zbliżona do pomiaru wykonanego na dwuwymiarowej projekcji maksymalnej intensywności. Tym samym, ze względu na brak korzyści w postaci dodatkowych informacji oraz dużą czasochłonność przygotowywania modeli trójwymiarowych, w eksperymencie postanowiono wykonywać pomiary na dwuwymiarowych projekcjach maksymalnej intensywności.

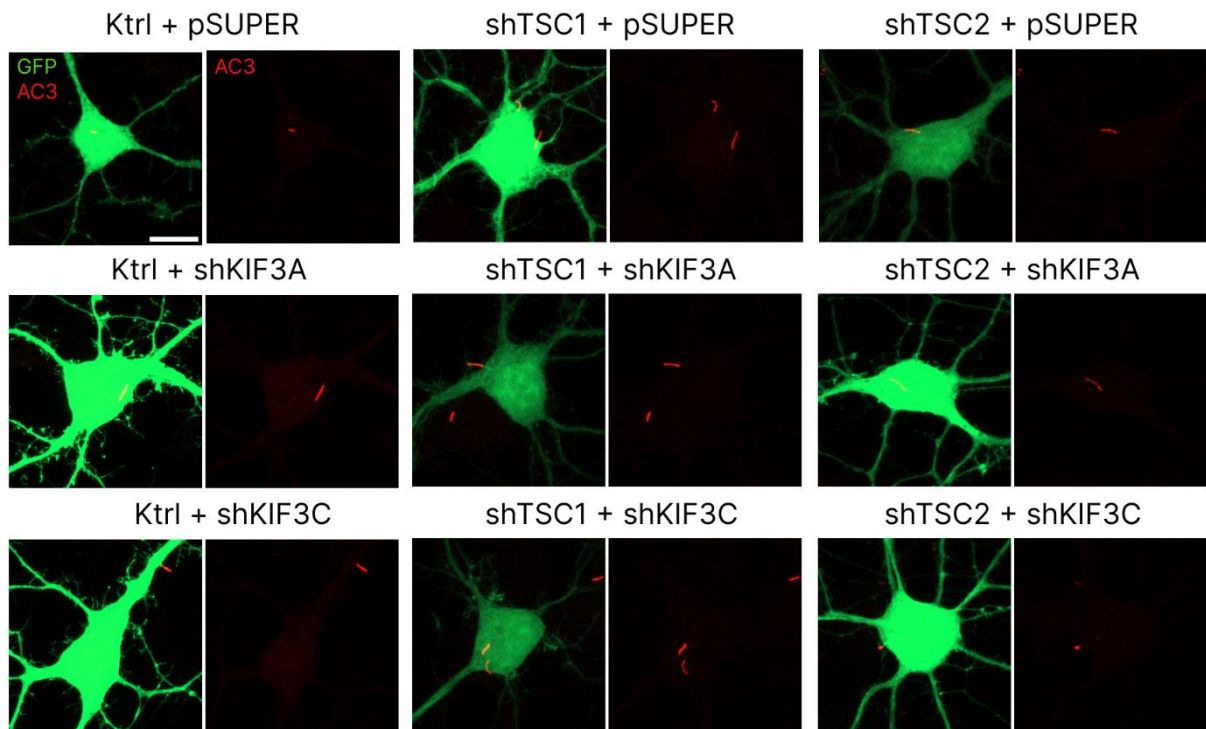
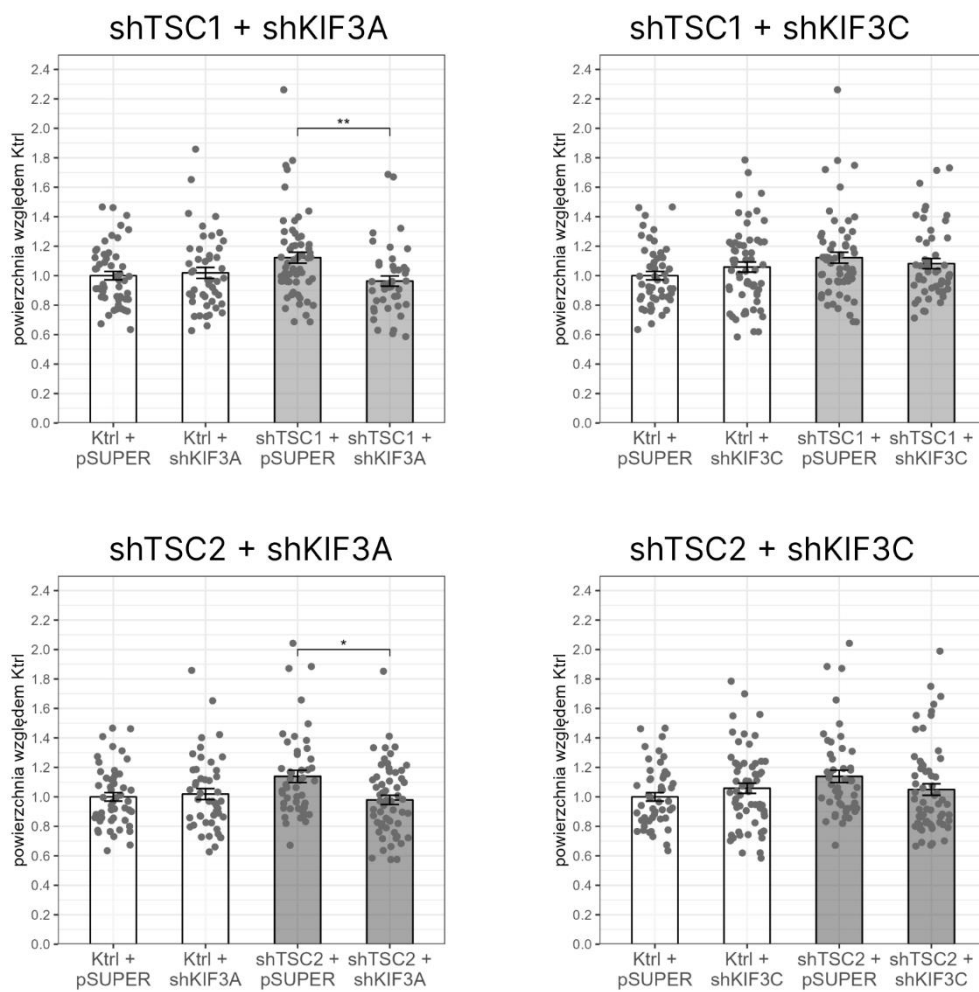
Wyniki eksperymentu przedstawiono na Ryc. 4.16. Zgodnie z oczekiwaniami, zastosowanie shRNA przeciwko *Tsc2* jak i *Tsc1*, skutkowało zwiększeniem powierzchni ciała komórki względem kontroli transfekowanej pSUPER, choć zmiany te okazały się nie istotne statystycznie. Jednocześnie, pomimo zastosowania podobnych warunków jak w eksperymencie opisanym w punkcie 4.1.4 zmiana powodowana transfekcją shTSC2 była wyraźnie mniejsza. Co ważne jednak, jednoczesna transfekcja zarówno shTSC1/shTSC2 razem z shRNA przeciwko kinezyom skutkowała mniejszą powierzchnią ciała komórki niż w przypadku jedynie shRNA wyciszającego *Tsc1* lub *Tsc2*. Zmiana ta jednak okazała się istotna statystycznie jedynie dla shKIF3A (Ryc. 4.16 B). W przypadku pomiarów rzęsek, transfekcja samym shRNA przeciwko *Tsc1* jak i *Tsc2* zdawała się nie wpływać na ich długość w stosowanym modelu. Co zaskakujące jednak, uzyskane pomiary sugerują, że zastosowanie zarówno shKIF3A, jak i shKIF3C powoduje zwiększenie długości rzęsek względem kontroli, choć nieistotne statystycznie. Jednakże w przypadku shKIF3A, jednoczesna transfekcja z shTSC1 wydaje się wzmacniać ten efekt, który osiąga wtedy poziom istotności statystycznej. W wariancie shTSC2 dla tej kinezyony taki efekt nie wystąpił. W przypadku shKIF3C, jednoczesne wyciszanie *Tsc1* wydaje się mieć niewielki efekt na skrócenie rzęski względem samego wyciszenia kinezyony, jednakże połączenie z shTSC2 okazywało się skutkować już znacznie mniejszą długością rzęski, zarówno względem transfekcji samym shKIF3C jak

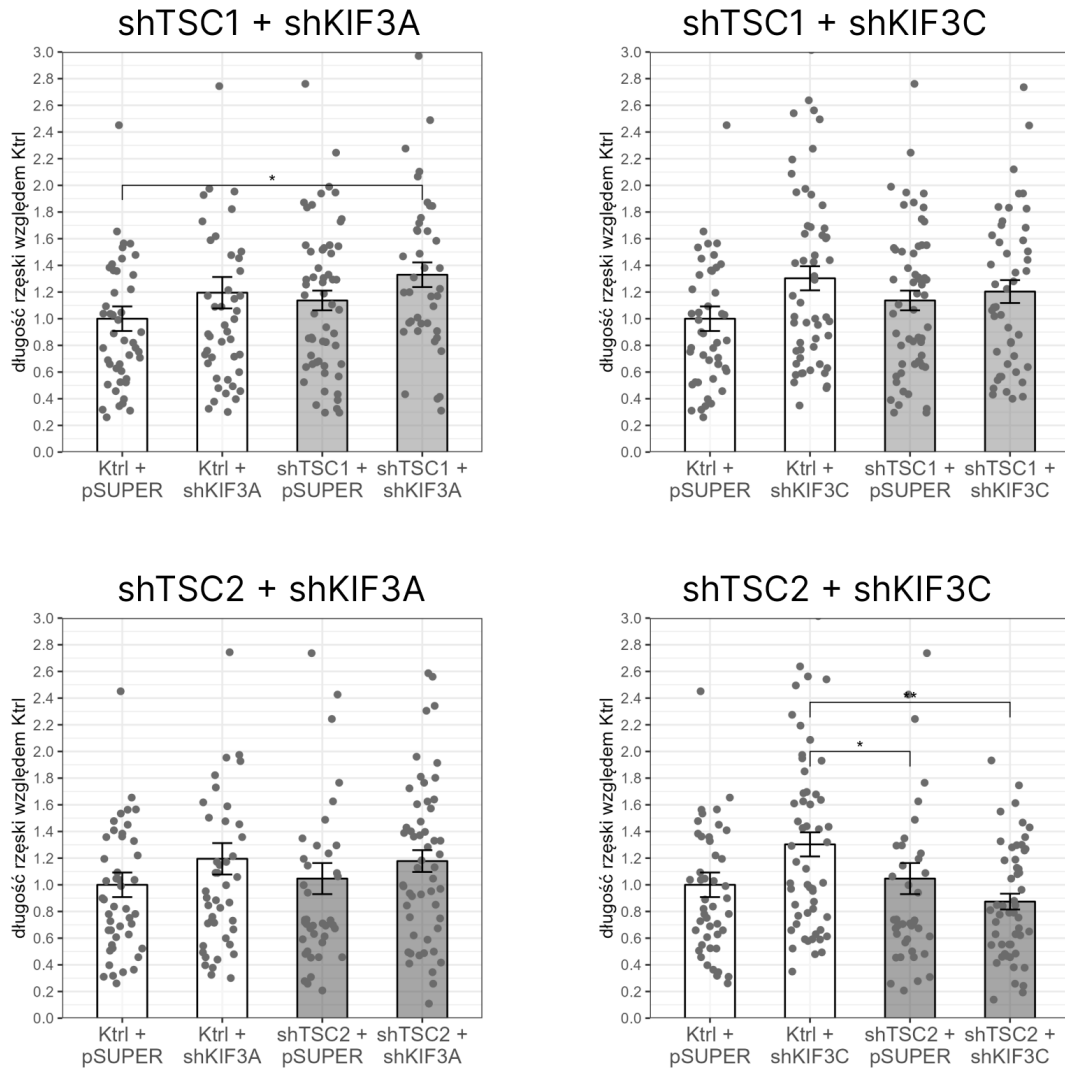
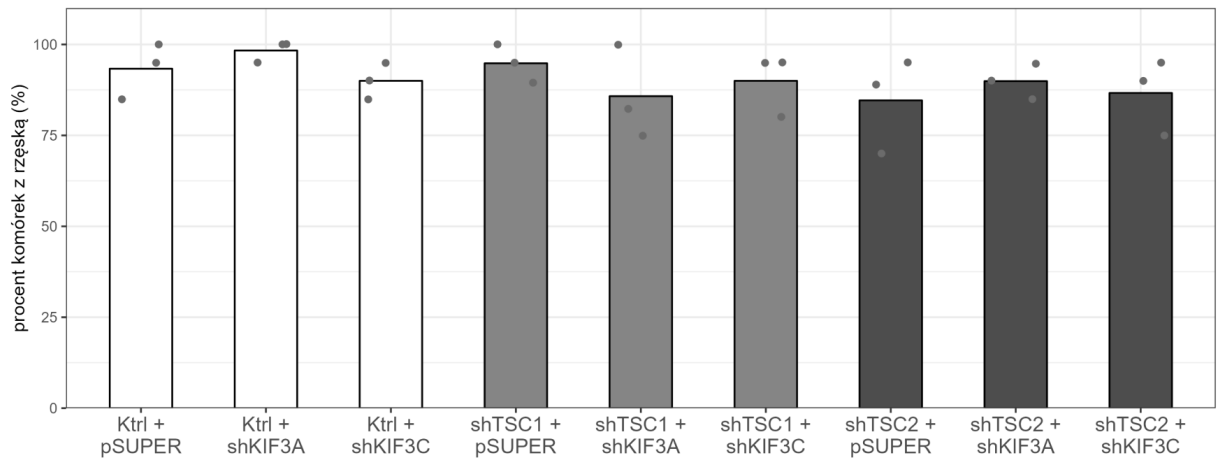
i samym shTSC2, niejako sugerując możliwe działanie synergiczne (Ryc. 4.16 C). Jak wynika z pomiarów przedstawionych na Ryc. 4.16 D, znaczna większość badanych komórek posiadała co najmniej jedną rzęskę ($> 85\%$). Nie wykazano również, aby w obrębie grup występowała różnica względem proporcji komórek posiadających przynajmniej jedną rzęskę, do nieposiadających.



Ryc. 4.15. Porównanie pomiarów rzęsek prowadzonych na płaskiej projekcji maksymalnej intensywności oraz modelach trójwymiarowych. Neurony transfekowane plazmidem kodującym GFP, z widocznymi rzęskami wybarwionymi immunofluorescencyjnie przeciwciałem anti-AC3. **A.**

Przykładowy neuron z rzęska pozornie ułożoną płasko. Pierwszy obraz od lewej przedstawia projekcję maksymalnej intensywności stworzoną z 42 zdjęć zebranych w płaszczyźnie osi Z. Złotą linią zaznaczono widoczną rzęskę, wraz z pomiarem jej długości (3,2 μm). Kolejne trzy obrazy przedstawiają odpowiednio obrót o 30, 60 oraz 90 stopni, projekcji trójwymiarowej uzyskanej z tego samego zestawu zdjęć. **B.** Wykres przedstawiający pomiar długości rzęski widocznej na A, zależnie od stopnia obrotu wzdłuż osi Y. **C.** Przykładowy neuron z rzęską pozornie ustawioną prostopadle do płaszczyzny zdjęcia. Obraz pierwszy od lewej przedstawia projekcję maksymalnej intensywności uzyskaną z 42 zdjęć zebranych w płaszczyźnie osi Z. Złotą linią oznaczono widoczną na zdjęciu rzęskę, wraz z pomiarem jej długości (1,87 μm). Kolejne obrazy przedstawiają obrót projekcji trójwymiarowej, o odpowiednio: 30, 60 i 90 stopni. **D.** Wykres przedstawiający wynik pomiaru długości rzęski na projekcji trójwymiarowej, zależnie od obrotu wzdłuż osi Y.

A**B**

C**D**

Ryc. 4.16. Analiza morfometryczna neuronów transfekowanych kombinacjami shTSC1/shTSC2 oraz shKIF3A/shKIF3C. Neurony hipokampalne transfekowane w 8-mym dniu hodowli, zaś utrwalane w dniu 11-nastym. Barwienie na rzęski przy pomocy przeciwciała rozpoznającego AC3. **A.** Przykładowe obrazy neuronów uzyskanych w doświadczeniu. Rzęski wybarwione na czerwono przy

użyciu przeciwciała rozpoznającego AC3. Projekcja maksymalnej intensywności uzyskana z zebranych 24-zdjęć w płaszczyźnie osi Z. Skala = 10 μm . **B.** Pomiary powierzchni ciała komórek, znormalizowane poprzez podzielenie przez wartości uzyskane dla Ktrl + pSUPER na danej płytce eksperymentalnej. Dla zwiększenia czytelności rozdzielone na podstawie stosowanych shRNA. Wykresy przedstawia średnią, szarymi punktami oznaczono pojedyncze pomiary. Słupki błędów przedstawiają SEM. Analiza statystyczna poprzez test Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. **C.** Pomiary długości rzęsek, wykonane na MIP i znormalizowane przez podzielenie przez wartości uzyskane dla Krl + pSUPER z danej płytki eksperymentalnej. Do obliczeń wykorzystano jedynie komórki posiadające przynajmniej jedną rzęskę. Dla zwiększenia czytelności rozdzielone na podstawie stosowanych shRNA Wykresy przedstawia średnią, szarymi punktami oznaczono pojedyncze pomiary. Słupki błędów przedstawiają SEM. Grupy porównane między sobą testem Kruskala-Wallisa wraz z testem *post-hoc* Dunn z poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. **D.** Procent komórek z przynajmniej jednym obiektem rozpoznany jako rzęska. Szarymi punktami oznaczono wyniki z pojedynczych powtórzeń. Analiza statystyczna wykonana poprzez dokładny test Fishera. Na panelach B, C oraz D oznaczono jedynie różnice, które były statystycznie istotne. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Eksperyment wykonany w trzech niezależnych powtórzeniach ($N = 3$). Dokładna liczba obserwacji: Ktrl + pSUPER (50), Ktrl + shKIF3A (47), Ktrl + shKIF3C (60), shTSC1 + pSUPER (59), shTSC1 + shKIF3A (45), shTSC1 + shKIF3C (50), shTSC2 + pSUPER (48), shTSC2 + shKIF3A (59), shTSC2 + shKIF3C (60).

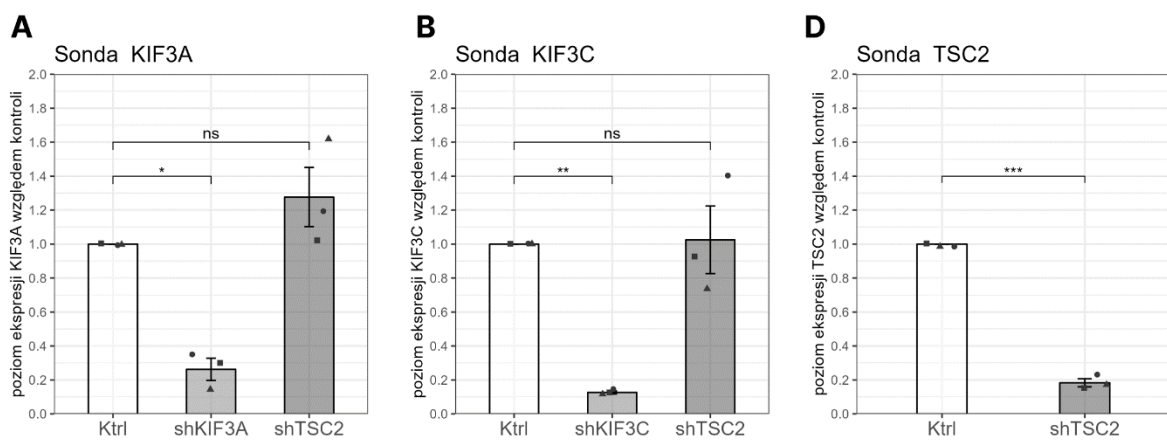
4.2.3.2 Wpływ wyciszenia *Kif3a* oraz *Kif3c* na rozwój rzęsek, w neuronach korowych o ograniczonej ekspresji *Tsc1/Tsc2* w dniach 0 - 4 hodowli.

Ponieważ pierwotna rzęska powstaje na etapie różnicowania się neuronu (J. H. Lee i Gleeson 2010; Lepanto, Badano, i Zolessi 2016; Di Nardo i Sahin 2018), tym samym powstało przypuszczenie, że nawet jeżeli w warunkach badanych w punkcie 4.2.3.1, dochodzi do zaburzenia ścieżek sygnałowych związanych z rozwojem lub funkcjonowaniem rzęski, może to nie objawiać się w jej długości. Z tego powodu, postanowiono sprawdzić wpływ wyciszenia wybranych kinezyń oraz *Tsc2* na długość rzęski, w młodszych neuronach. W tym celu zdecydowano się wykorzystać stworzone przy okazji punktu 4.1.5.1 wektory lentiwirusowe, do transdukcji komórek świeżo wyizolowanych z embrionalnej kory mózgowej szczura. Podobnie jak w przypadku eksperymentu z punktu 4.2.3, użyto materiału pochodzącego z kory mózgowej, a nie hipokampa, ze względu na konieczność użycia znacznej liczby komórek na jeden wariant. Tym samym jako dzień transdukcji przyjęto dzień 0, zaś zdecydowano się utrzymywać w dniu czwartym. Jednocześnie z powodu braku wektora lentiwirusowego kodującego shRNA przeciwko *Tsc1*, w tym eksperymencie sprawdzono jedynie wpływ wyciszania *Tsc2*. Ze względu na uproszczenie procedury eksperymentalnej, zrezygnowano również z wariantów, w których wyciszano jedynie kinezyń bez wyciszenia *Tsc2*.

4.2.3.2.1 Walidacja modelu transdukcji neuronów w 0 - 4 DIV.

Aby upewnić się, że w planowanym modelu neuronów korowych, rzeczywiście dochodzi do wyciszenia badanych genów na skutek transdukcji użytymi lentiwirusami, przeprowadzono walidację

modelu przy pomocy techniki RT-qPCR i sond TaqMan podobnie jak w punkcie 4.1.5 dla neuronów hipokampalnych. Komórki korowe zaraz po wyizolowaniu, transdukowano lentiwirusami: shTSC2, shKIF3A, shKIF3C lub wirusem nie kodującym shRNA (Ktrl). Następnie po 4 dniach hodowli, zbierano materiał, z którego izolowano całkowite RNA zgodnie z protokołem opisanym w punkcie 3.2.8, które następnie analizowano zgodnie z procedurą opisaną w punktach 3.2.9 - 3.2.11. Jak przedstawia Ryc. 4.17 A-C, transdukcja wirusami niosącymi shRNA zarówno przeciwko *Tsc2* jak i kinezyom, prowadziła do istotnego spadku ekspresji badanych genów testowanym modelem. Jednocześnie na tym samym materiale postanowiono sprawdzić czy w przypadku komórek o wyciszonym *Tsc2* dochodzi do zmian ekspresji *Kif3a* lub *Kif3c*, jednakże nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian.



Ryc. 4.17. Pomiar poziomu mRNA badanych genów w neuronach korowych transdukowanych w dniu izolacji i zbieranych w dniu czwartym. Komórki pochodzące ze szczurzej embrionalnej kory mózgowej zostały zaraz po izolacji poddane transdukcji wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA przeciwko genom: *Kif3a*, *Kif3c* lub *Tsc2*, oraz wektorem lentiwirusowym na bazie plazmidu pULTRA-Chili nie kodującym shRNA jako kontrolą (Ktrl). Po czterech dniach od transdukcji, z materiału izolowano RNA, na którym przeprowadzono RT-qPCR przy wykorzystaniu sond TaqMan. **A.** Wyniki pomiaru materiału sondą rozpoznającą transkrypt *Kif3a*. **B.** Wyniki pomiaru materiału sondą rozpoznającą transkrypt *Kif3c*. **C.** Wyniki pomiaru materiału sondą rozpoznającą transkrypt *Tsc2*. Dla każdej sondy wykonano trzy niezależne powtórzenia ($N = 3$), w obrębie których wykonano po trzy powtórzenia techniczne ($n = 9$). Poziom ekspresji mierzony był przy pomocy metody $\Delta\Delta Ct$, wykorzystując sondę GAPDH w celu normalizacji wyników pomiaru ekspresji. Dla zniwelowania znacznych różnic pomiędzy powtórzeniami, wyniki dodatkowo znormalizowano przez podzielenie przez wartości Ktrl, nadając jej bazową wartość równą 1 i badając w ten sposób stosunek poziomu sygnału w próbkach shRNA względem Ktrl. Czarnymi punktami oznaczono wyniki pojedynczych powtórzeń, słupki błędów wyznaczają SEM. Pomiar istotności statystycznej przeprowadzony testem t

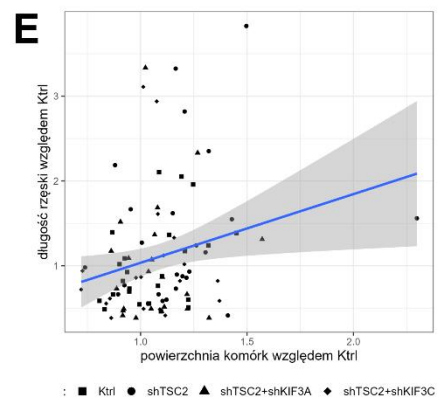
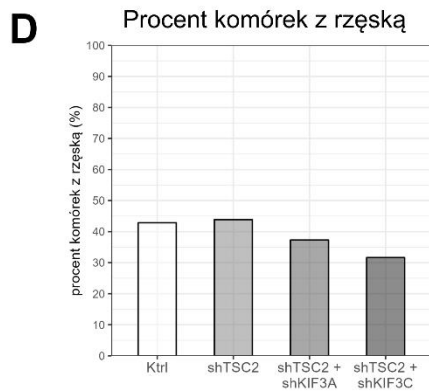
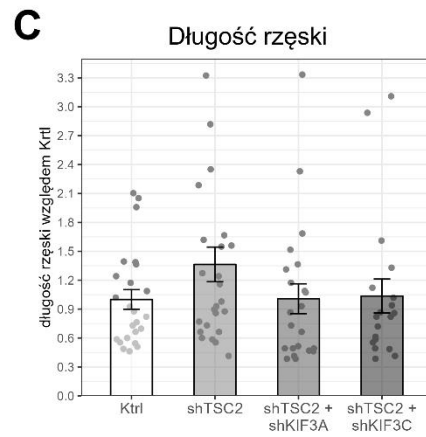
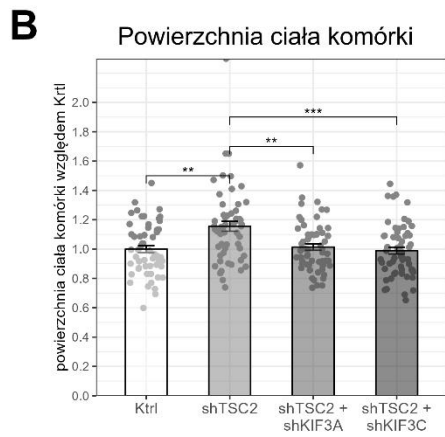
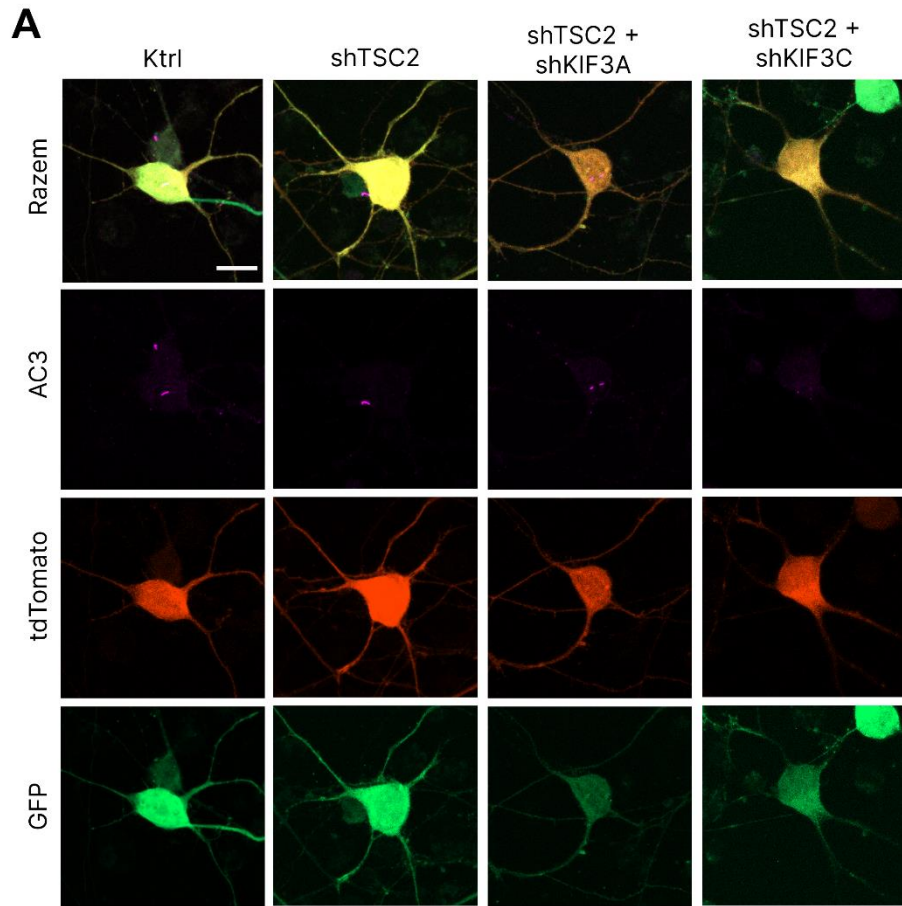
studenta jednej próby, porównując uzyskane pomiary do 1. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns - brak istotności.

4.2.3.2.2 Pomiary powierzchni oraz długości rzęsek neuronów korowych transdukowanych w dniach 0-4 wektorami lentiwirusowymi: shTSC2, shKIF3a oraz shKIF3C

W celu uzyskania pomiarów rzęsek w neuronach, u których wyciszenie genów następowało jeszcze przed zróżnicowaniem, świeżo wyizolowane komórki korowe transdukowano, mieszanką dwóch wektorów lentiwirusowych, zgodnie z Tabelą 4.3. Utrwalanie następowało po 4-ech dniach od transdukcji. Następnie preparaty barwiono immunofluorescencyjnie przeciwko AC3, podobnie jak w punkcie 4.2.3.1 i obrazowano przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Ponieważ shTSC2 zostało wklonowane do wektora pULTRA kodującego GFP, zaś shKIF do wektora pULTRA-Chili kodującego tdTomato, możliwa była identyfikacja komórek, które uległy podwójnej transdukcji. Tym samym do analiz wybierano jedynie neurony wykazujące jednocześnie fluorescencję GFP i tdTomato (panel A Ryc. 4.18). Jak można zaobserwować na panelu B Ryc. 4.18, komórki transdukowane jedynie shRNA przeciwko *Tsc2* cechowały się około 16 % większą powierzchnią ciała komórki niż komórki kontrolne (Ktrl). Natomiast jednoczesna transdukcja shTSC2 wraz z shRNA przeciwko KIF3A jak i KIF3C zdawała się niwelować te różnice, skutkując fenotypem zbliżonym do Ktrl, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w drugorzędowym badaniu przesiewowym opisanym w punkcie 4.14. Podobny trend można zauważyć w przypadku długości rzęsek, gdzie ich średnia długość w wariacie shTSC2 wydaje się być większa niż w Ktrl, zaś podobna w komórkach transdukowanych jednocześnie shRNA przeciwko kinezytom (Ryc. 4.18 panel C). Jednak w przypadku długości rzęsek, rozrzut wartości w obrębie wariantu okazał się bardzo znaczny, a co za tym idzie różnice w długości nie były istotne statystycznie. Co ciekawe, w przypadku tego modelu jedynie 35 – 40 % komórek posiadało rzęskę, co jest wynikiem znacznie niższym niż w punkcie 4.2.3, gdzie obrazowano starsze neurony hipokampalne. Jednocześnie proporcje komórek posiadających przynajmniej jedną rzęskę, do nieposiadających nie różniły się pomiędzy wariantami jak zmierzono dokładnym testem Fishera (Ryc. 4.18 D). Ponieważ wariant shTSC2 cechował się zarówno większą powierzchnią komórki (Ryc. 4.18 B) jak i dłuższymi rzęskami niż pozostałe (Ryc. 4.18 C), postanowiono policzyć korelację pomiędzy powierzchnią ciała komórki a długością rzęski dla wszystkich zbadanych komórek posiadających przynajmniej jedną rzęskę. Wykres punktowy przedstawiający to zestawienie umieszczono na Ryc. 4.18 E. Jak wykazała analiza przy pomocy modelu regresji liniowej, pomiędzy długością rzęski a powierzchnią komórki występuje mała, (zwiększenie ciała komórki o 0,07 na każde zwiększenie długości rzęski o 1 przy $R^2 = 0.0568$ co oznacza, że zastosowany model skutecznie przewiduje jedynie około 5,7% zaobserwowanych pomiarów), ale statystycznie istotna zależność (wartość $p = 0,0237$).

Tabela 4.3. Wektory lentiwirusowe wykorzystane do transdukcji komórek korowych

Wariant	Lentiwirus 1 (kodujący GFP)	Lentiwirus 2 (kodujący tdTomato)
Ktrl	pULTRA	pULTRA-Chili
shTSC2	pULTRA-shTSC2	pULTRA-Chili
shTSC2 + shKIF3A	pULTRA-shTSC2	pULTRA-Chili-shKIF3A#2
shTSC2 + shKIF3C	pULTRA-shTSC2	pULTRA-Chili-shKIF3C#3



Ryc. 4.18. Analiza morfometryczna neuronów korowych, transdukowanych kombinacjami wektorów lentiwirusowych kodujących shRNA przeciwko *Tsc2* oraz wybranym kinezyom.

Świeżo wyizolowane (DIV0) komórki kory embrionalnej szczura, zostały poddane podwójnej transdukcji, wektorami lentiwirusowymi, kodującymi shRNA przeciwko *Tsc2* wraz z białkiem GFP (shTSC2) oraz wektorami lentiwirusowymi kodującymi shRNA przeciwko KIF3A, lub shKIF3 wraz z białkiem tdTomato (shKIF3A/3C). Wariant kontrolny (Ktrl) transdukowano wektorami wirusowym kodującym jedynie białka fluorescencyjne. Komórki utrwalano po 4 dniach, a uzyskane preparaty barwiono immunofluorescencyjnie na obecność AC3. **A.** Projekcje maksymalnej intensywności, przykładowych obrazów mikroskopowych przedstawiających podwójnie transdukowane komórki korowe, z rozdzieleniem na pojedyncze kanały. Skala = 10 μ m. **B.** Średnie wyniki pomiarów powierzchni ciała komórki, znormalizowane poprzez podzielenie przez wartości uzyskane dla Ktrl z danej płytki eksperymentalnej. Wszystkie wartości znormalizowane poprzez podzielenie przez średnie wartości Ktrl z danej płytki eksperymentalnej. Szare punkty wyznaczają pojedyncze wartości. Słupki błędów oznaczają SEM. Analiza statystyczna przeprowadzona testem Kruskala-Wallisa, z testem *post-hoc* Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. Na wykresie oznaczono jedynie statystycznie istotne porównania. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Dokładna liczba obserwacji (n): Ktrl (56), shTSC2 (57), shTSC2 + shKIF3A (59), shTSC2 + shKIF3C (60). **C.** Średnie pomiary długości rzęski, znormalizowane poprzez podzielenie przez średnią wartość Ktrl z danej płytki eksperymentalnej. W wyliczeniach uwzględniono jedynie komórki, które posiadały przynajmniej jedną rzęskę. Szare punkty oznaczają pojedyncze wartości, słupki błędów wyznaczają SEM. Analiza statystyczna przy pomocy testu Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. Wynik żadnego z porównań nie okazał się istotny statystycznie. Liczba obserwacji (n): Ktrl (24), shTSC2 (25), shTSC2 + shKIF3A (22), shTSC2 + shKIF3C (19). **D.** Procent komórek, u których stwierdzono obecność przynajmniej jednej rzęski. Porównanie grup, w celu oceny różnic w proporcji komórek posiadających/nieposiadających rzęski, przeprowadzone dokładnym testem Fishera. Eksperyment wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach (N = 3). **E.** Wykres punktowy ilustrujący korelację powierzchni ciała komórki i długości rzęski liczoną jak w B i C. Do obliczeń użyto jedynie pomiarów z komórek, u których obecna była przynajmniej jedna rzęska. Na niebiesko zaznaczono linie trendu, szare obszary odpowiadają przedziałom ufności. Kształty punktów odpowiadają wariantom eksperymentalnym.

4.3 Analiza funkcji wybranych kinezyn w modelu TSC w komórkach nieneuronalnych.

Pomimo, że pierwotne hodowle neuronalne stanowią dobrze opisany i zoptymalizowany model w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, posiadają pewne ograniczenia, przez które obserwacja niektórych funkcji kinezyn jest utrudniona. Można tu wyróżnić trudność w uzyskaniu dostatecznej jakości sygnału w następstwie nadprodukcji białka fluorescencyjnego w obrazowaniu przyżyciowym (jak zaobserwowano w punkcie 4.2.3), czy problem z wykonaniem eksperymentów z głodzeniem, na które neurony są szczególnie wrażliwe. Z tego powodu zdecydowano się przeprowadzić badania również na komórkach nieneuronalnych. Do tego celu wybrano linię unieśmiertelnionych, szczurzych fibroblastów Rat2. Komórki te wybrano ze względu na szybki wzrost oraz łatwość transfekcji, jak i hodowli. Dodatkowo, szczurze pochodzenie tej linii pozwoliło na wykorzystanie tych

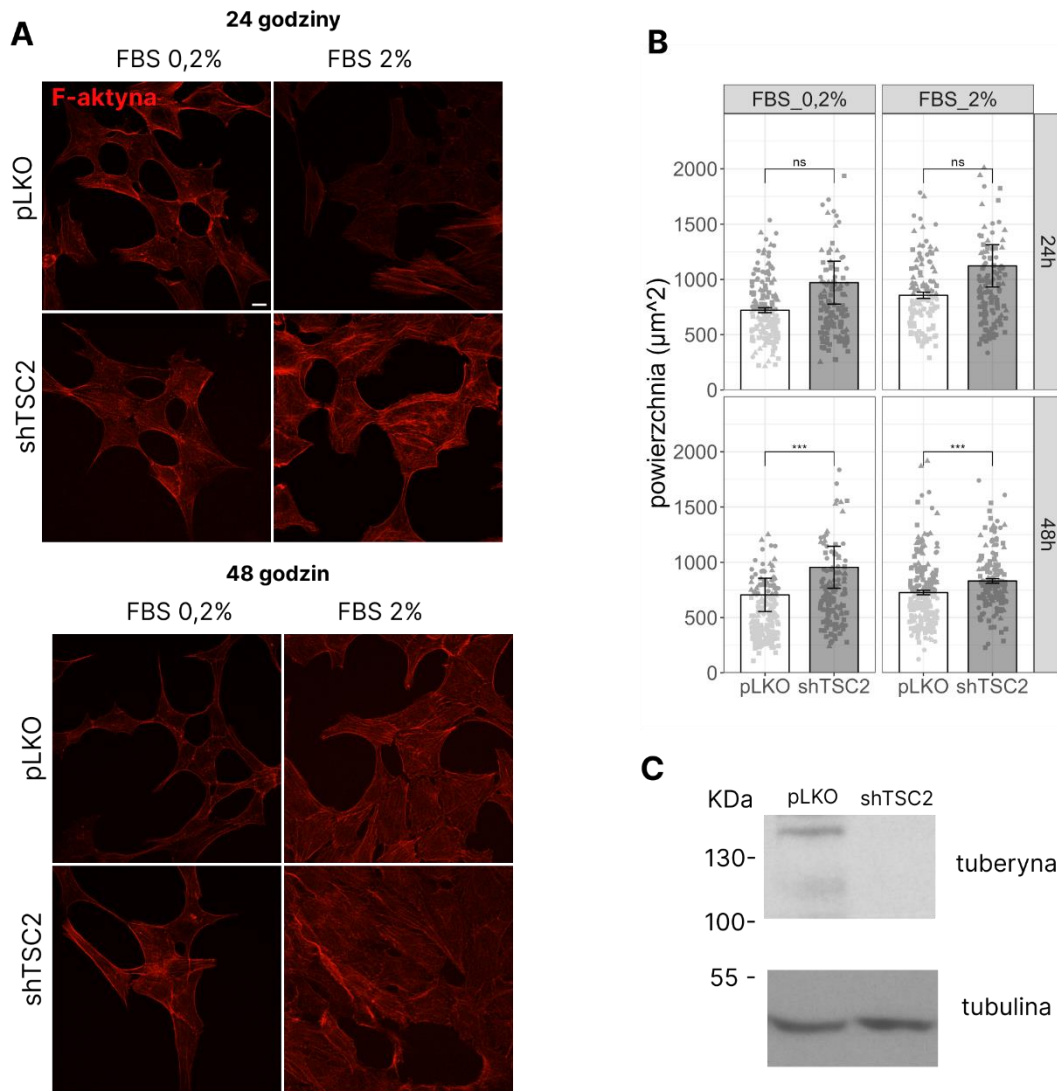
samych sekwencji shRNA, które zostały już zweryfikowane w komórkach nerwowych. Ponieważ jednak kinezyzna KIF21B, będąca jednym z charakterystycznych motorów układu nerwowego, nie ulega, bądź ulega bardzo słabej ekspresji w fibroblastach (<https://www.proteinatlas.org/search/kif21b>), zdecydowano się na kontynuację badań jedynie nad kinezynami KIF3A oraz KIF3C.

4.3.1 Tworzenie i walidacja linii stabilnych komórek Rat2

Dokładną procedurę uzyskiwania linii stabilnych opisano w punkcie 3.5.5. W pierwszym kroku komórki linii Rat2 transdukowano wektorami lentiwirusowym stworzonym na bazie plazmidu pLKO-shTSC2#2 (w dalszej części pracy dla uproszczenia nazywanym shTSC2) lub pLKO.1-TRC nie kodującym shRNA, jako kontrolą (w dalszej części pracy nazywanym pLKO). Następnie transdukowane komórki selekcjonowano poprzez hodowlę w pożywce z puromycyną. Skuteczność wyciszenia zweryfikowano sprawdzając poziom tuberyny metodą Western blot. Dodatkowo, sprawdzono, czy występują różnice w wielkości komórek pomiędzy linią kontrolną, a linią o wyciszonej ekspresji *Tsc2*. Ponieważ, w literaturze powszechny jest pogląd, że komórki z nadaktywną ścieżką mTOR rosną w warunkach głodzenia szybciej, i efektywniej niż komórki typu dzikiego. Tym samym, aby uwypuklić możliwe różnice w powierzchni komórki, postanowiono obniżyć zawartość surowicy w pożywce hodowlanej. Sprawdzono dwa stężenia 2 % oraz 0,2 %, będące odpowiednio 5-krotnie oraz 50-krotnie mniejszymi niż stosowane rutynowo. Zaplanowano również dwa punkty czasowe: 24 oraz 48 godz. od rozpoczęcia hodowli, po których utrwalano komórki. Miało to na celu znalezienie optymalnych warunków dla przyszłych eksperymentów. Utrwalone preparaty barwiono falloidyną sprzężoną z barwnikiem AlexaFluor 568, co pozwoliło na wizualizację kształtu komórek.

Jak przedstawia Ryc. 4.19 panel B, komórki linii shTSC2 cechowały się większą średnią powierzchnią niż komórki linii kontrolnej pLKO. Jednakże różnice te okazały się statystycznie istotne jedynie w przypadku hodowli przez 48 godz. Uzyskane wyniki były zbliżone niezależnie od stosowanego stężenia surowicy.

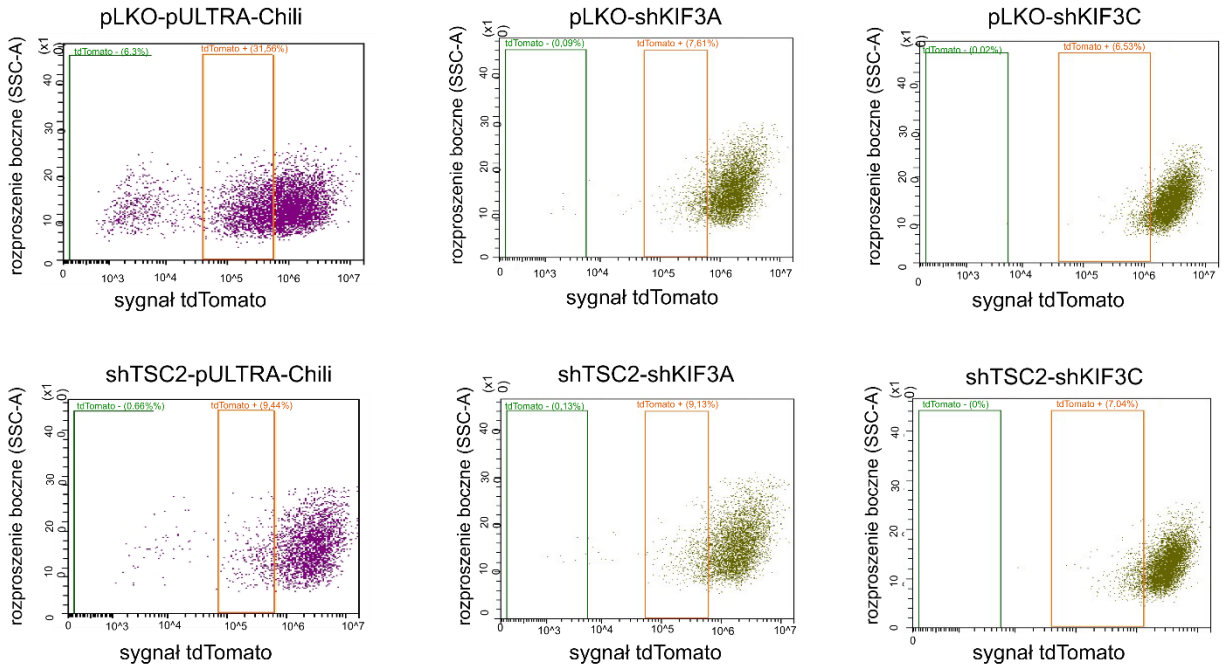
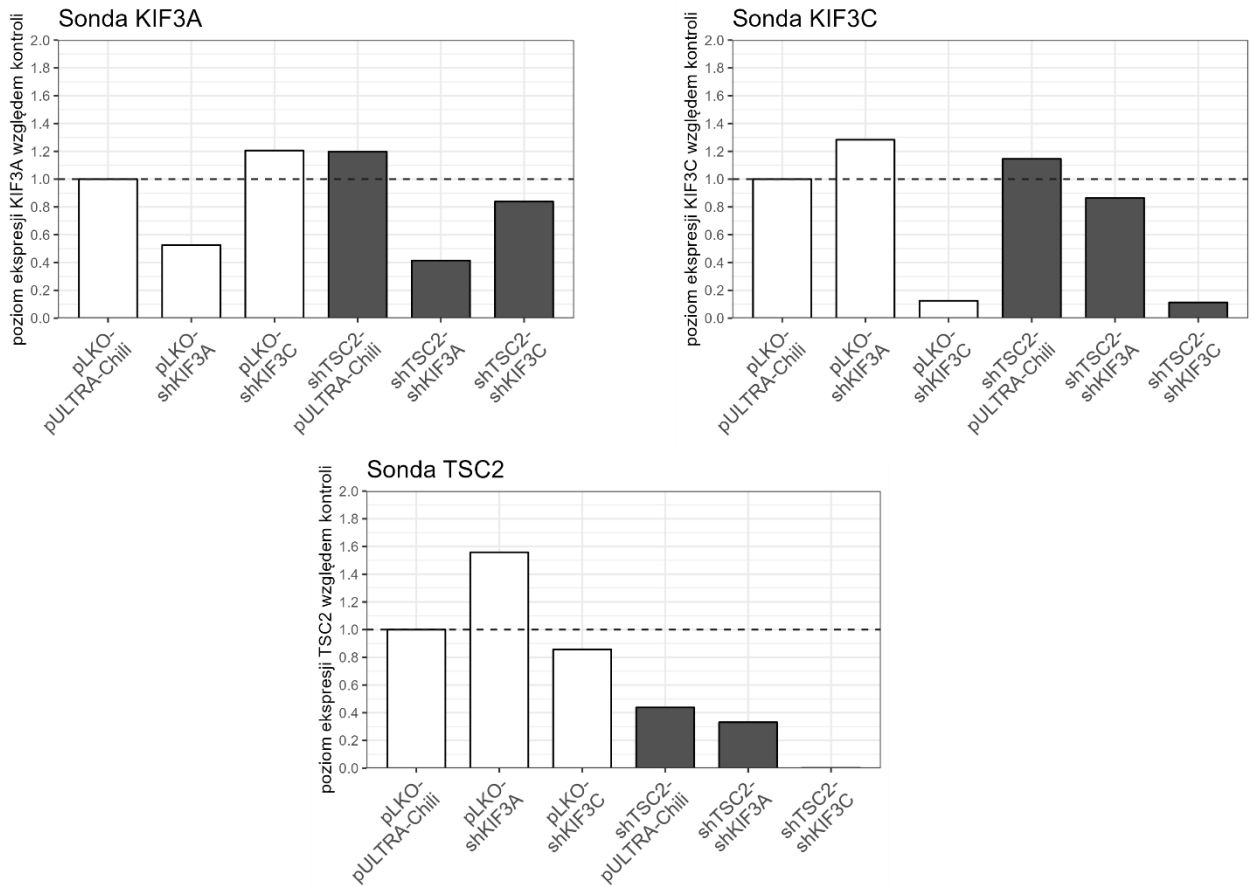
Jak wykazała analiza metodą Western blot, w komórkach linii shTSC2, produkcja tuberyny była wyraźnie niższa niż w linii pLKO, co pozwala sądzić, że nastąpiło skuteczne wyciszenie ekspresji genu *Tsc2* (Ryc. 4.19. C).



Ryc. 4.19. Wstępna charakterystyka otrzymanych linii pLKO i shTSC2. Komórki uzyskanych linii hodowane pożywcze o obniżonej zawartości FBS – 2 % oraz 0,2 %, utrwalane po 24 oraz 48 godz., i barwione falloidyną sprzężoną z AlexaFluor 592 w celu uwidocznienia kształtu komórki. **A.** Reprezentatywne obrazy mikroskopowe komórek uzyskanych linii. Skala: 10 µm. **B.** Średnia powierzchnia komórek, podzielone na osobne panele na podstawie stężenia surowicy w pożywce oraz czasu utrwalania. Mierzono tylko obiekty dające się wyróżnić jak pojedyncza komórka. Szare punkty przedstawiają pojedyncze pomiary, zaś słupki błędów SEM. Istotność statystyczna policzona została testem Manna – Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns – brak istotności. Dane zebrane z trzech eksperymentów ($N = 3$). Liczba analizowanych komórek (n) wynosi, dla: FBS 2% 24 godz.: pLKO (118), shTSC2 (130), FBS 2 %, 48 godz. pLKO (211), shTSC2 (160), FBS 0,2% 24 godz. pLKO (152), shTSC2 (129), FBS 0,2 %, 48 godz. pLKO (167), shTSC2 (160). **C.** Skan kliszy fotograficznej przedstawiającej wyniki pomiarów poziomu białek tuberyny oraz tubuliny w liniach pLKO oraz shTSC2 metodą Western blot.

W następnym kroku, w celu uzyskania linii o zmniejszonej ekspresji genów wybranych kinezyń, linie pLKO oraz shTSC2, poddano drugiej z kolei transdukcji wektorami lentiwirusowymi, tym razem

na bazie plazmidów: pULTRA-Chili-shKIF3A, pULTRA-Chili-shKIF3C oraz pULTRA-Chili nie kodującym shRNA. Uzyskane linie przesortowano przy użyciu cytometrii przepływowej na podstawie sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z TdTomato. Przy określaniu progu sortowania, zdecydowano o odrzuceniu komórek o największej intensywności fluorescencji (Ryc. 4.20 panel A). Decyzja ta wynikała z faktu, iż w systemie lentiwirusowym opartym o plazmid pULTRA, produkcja białka fluorescencyjnego oraz shRNA odbywa się z osobnych promotorów. Tym samym silna fluorescencja nie gwarantuje skutecznego wyciszenia interesującego genu, a może świadczyć o wielokrotnym włączeniu DNA wirusa do genomu komórki, co nie jest pożądane. Jednocześnie zaobserwowano, że najsilniejszą fluorescencją cechuje się linia kontrolna, zapewne w związku z brakiem ekspresji shRNA, a w efekcie mniejszym stresem metabolicznym wywieranym na transdukowane komórki. Tym samym próg odcięcia podczas sortowania został ustawiony na podstawie pozostałych linii. Spis stworzonych linii znajduje się w Tabeli 3.8. W celu potwierdzenia wyciszenia badanych genów w stworzonych liniach, wyizolowano z nich RNA, które posłużyło jako materiał do badania techniką RT-qPCR (opisane w punktach 3.2.8 – 3.2.11) przy użyciu sond TaqMan wykrywających transkrypty *Kif3a*, *Kif3c* oraz *Tsc2*. Wykazano, że w liniach pLKO-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3A ekspresja *Kif3a* wynosi około 50 % poziomu z linii pLKO-pULTRA-Chili. W przypadku ekspresji *Kif3c*, liniach pLKO-shKIF3C i shTSC2-shKIF3C spadek względem linii kontrolnej wyniósł około 90 %. Jednocześnie potwierdzono, że we wszystkich trzech liniach na bazie pierwotnej linii shTSC2, występuje spadek ekspresji genu kodującego tuberynę względem kontrolnej linii pLKO-pULTRA-Chili (Ryc. 4.20. B).

A**B**

Ryc. 4.20. Pomiary intensywności fluorescencji podczas cytometrii przepływowej oraz poziomu mRNA w uzyskanych liniach komórkowych: pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C **A.** Wykresy punktowe uzyskane w trakcie cytometrii przepływowej, przedstawiające rozkład intensywności fluorescencji TdTomato, w komórkach uzyskanych linii. Pomarańczowa ramka wyznacza zakres w obrębie, którego komórki zostały przesortowane. **B.** Wyniki badania poziomu ekspresji genów *Kif3a*, *Kif3c* oraz *Tsc2* metodą RT-qPCR przy użyciu sond TaqMan w materiale pochodzącym z uzyskanych linii. Analiza wykonana metodą $\Delta\Delta C_T$. Przedstawione wyniki zostały znormalizowane, poprzez podzielenie przez wartość uzyskaną dla linii pLKO-pULTRA-Chili przyjętą jako linia kontrolna. Dla każdej grupy wykonano trzy powtórzenia techniczne ($n = 3$).

4.3.2 Analiza tempa podziałów komórkowych i powierzchni komórek uzyskanych linii.

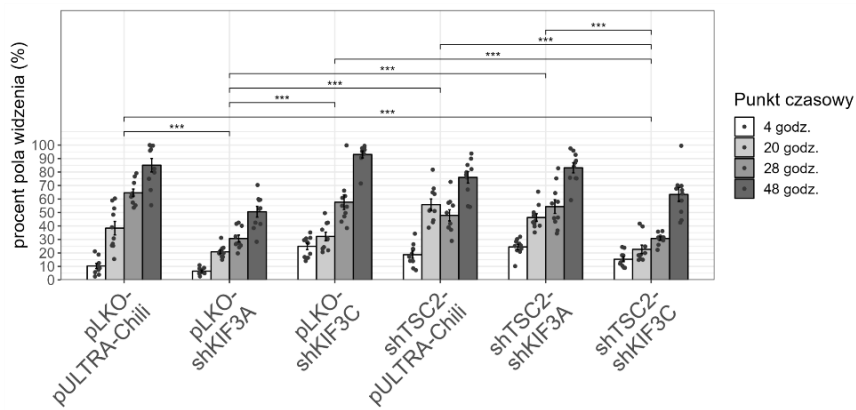
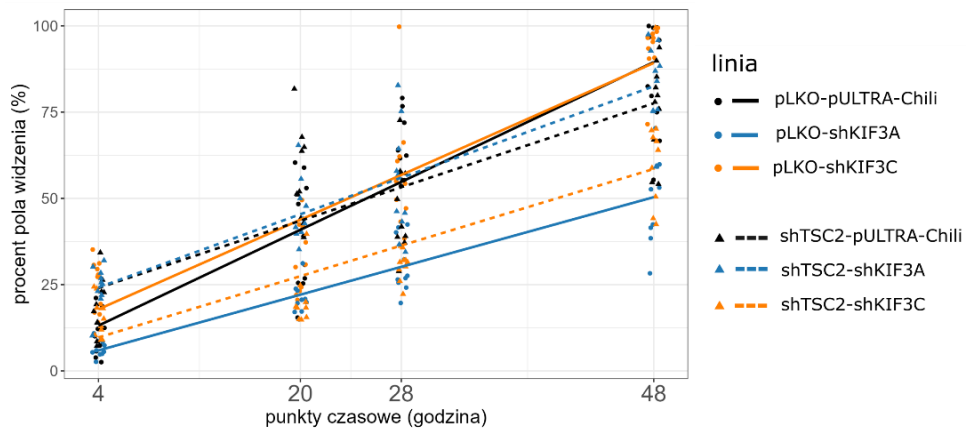
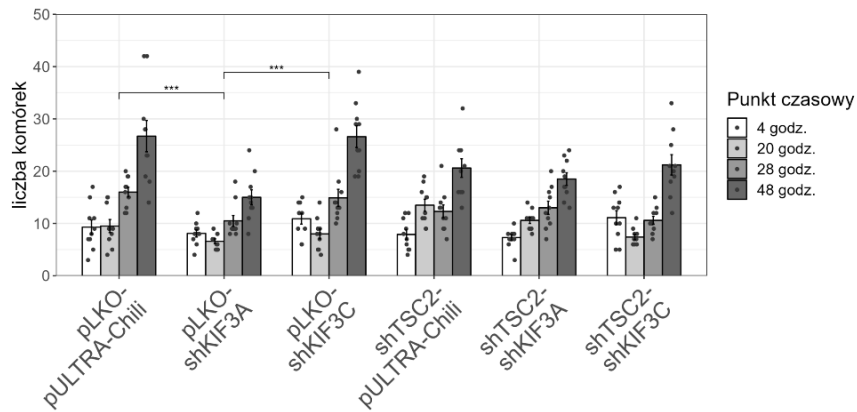
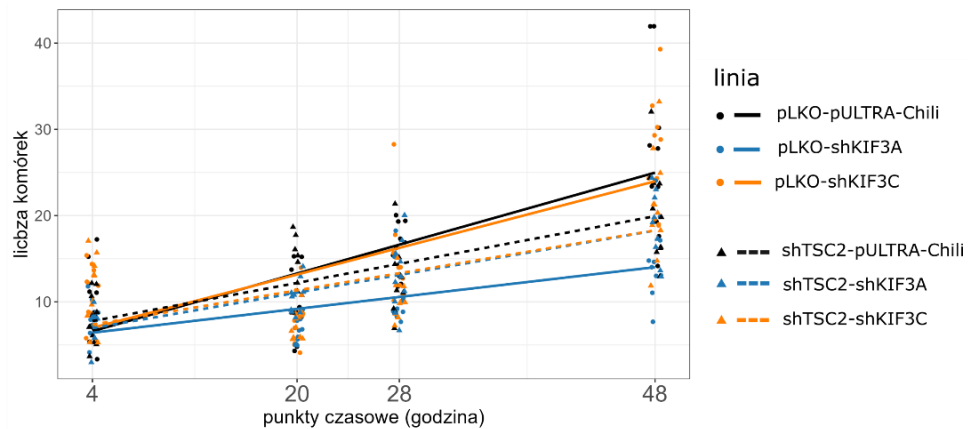
W trakcie hodowli, zauważono, że komórki należące do niektórych z otrzymanych linii, ulegają podziałom wolniej od pozostałych jak, i cechują się mniejszą powierzchnią. Jako że zarówno tempo podziałów komórkowych i jak wzrostu powierzchni komórki są procesami ściśle powiązаныmi z aktywnością mTOR, postanowiono zbadać zaobserwowane różnice. W tym celu komórki wszystkich linii wysiano w dokładnie wyliczonej, równej liczbie 50 tys. na dołek, na płytce 24-dołkowej. Komórki utrwalano w następujących punktach czasowych: 4 godz., 20 godz., 28 godz. oraz 48 godz. Na zebranych zdjęciach analizowano pole widzenia zajęte przez komórki oraz ich liczbę. Następnie przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji, zbadano czy pomiędzy liniami występują statystycznie istotne różnice uwzględniając zmianę pomiędzy punktami czasowymi.

Z pomiarów zmiany pola widzenia zajętego przez komórki w czasie, wynika, że linie pLKO-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C cechowały się znacznie wolniejszym wzrostem od pozostałych, nie różniąc statystycznie jedynie od siebie nawzajem. (Ryc. 4.21. A, B), ze względu na dużą liczbę porównań wyniki przedstawione na Ryc. 4.21 A, zostały również zawarte w Tabeli 4.4. Jednocześnie pomiędzy pozostałymi liniami nie stwierdzono różnic. W przypadku pomiarów liczby komórek w kolejnych punktach czasowych (Ryc. 4.21 C oraz D), jedyne statystycznie istotne różnice zanotowano pomiędzy linią pLKO-shKIF3A a pozostałymi dwiema liniami bez ekspresji shTSC2, czyli pLKO-shKIF3C oraz kontrolną pLKO-pULTRA-Chili. Otrzymane wyniki sugerują, że podczas gdy komórki linii pLKO-shKIF3A rosną istotnie wolniej od linii kontrolnych, komórki linii shTSC2-shKIF3C dzielą się w podobnym tempie, pozostają jednak znacznie mniejsze.

Tabela 4.4. Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji pomiarów powierzchni pola widzenia zajmowanych przez linie.

Grupa 1	Grupa 2	Wielkość efektu (grupa1 – grupa 2)	Wartość p
pLKO-pULTRA-Chili	pLKO-shKIF3A	22,44	< 0,01
pLKO-pULTRA-Chili	pLKO-shKIF3C	-2,35	0,93
pLKO-pULTRA-Chili	shTSC2-pULTRA-Chili	-0,02	1

pLKO-pULTRA-Chili	shTSC2-shKIF3A	-2,45	0,92
pLKO-pULTRA-Chili	shTSC2-shKIF3C	16,57	< 0,01
pLKO-shKIF3A	pLKO-shKIF3C	-24,79	< 0,01
pLKO-shKIF3A	shTSC2-pULTRA-Chili	-22,46	< 0,01
pLKO-shKIF3A	shTSC2-shKIF3A	-24,88	< 0,01
pLKO-shKIF3A	shTSC2-shKIF3C	-5,87	0,17
pLKO-shKIF3C	shTSC2-pULTRA-Chili	2,33	0,93
pLKO-shKIF3C	shTSC2-shKIF3A	-0,09	1
pLKO-shKIF3C	shTSC2-shKIF3C	18,92	< 0,01
shTSC2-pULTRA-Chili	shTSC2-shKIF3A	-2,43	0,92
shTSC2-pULTRA-Chili	shTSC2-shKIF3C	16,59	< 0,01
shTSC2-shKIF3A	shTSC2-shKIF3C	19,02	< 0,01

A**B****C****D**

Ryc. 4.21. Analiza tempa wzrostu komórek Rat2 linii stabilnych pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C. Komórki wszystkich badanych linii zostały wysiane w równej liczbie, po czym utrwalane w czterech punktach czasowych: 4, 20, 28 oraz 48 godz. **A.** Pomiar pola widzenia zajmowanego przez komórki, przedstawione jako średnie wartości procentowych. Słupki w różnych odcieniach szarości oznaczają średnie pomiary w kolejnych punktach czasowych w obrębie jednej linii. Punktami oznaczono pojedyncze pomiary, słupki błędów wyznaczają SEM. Na wykresie oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy liniami, wyliczone przy pomocy dwuczynnikowej analizy wariancji, uwzględniając punkty czasowe w obrębie linii. *** $p < 0,001$. Wyniki tej analizy przedstawiono również w Tabeli 4.4. **B.** Wykres liniowy, wyliczony na podstawie tych samych pomiarów co w A. Punkty ukazują pojedyncze pomiary w danych punktach czasowych, które posłużyły do wyliczenia linii trendu. **C.** Średnia liczba komórek widoczna w polu widzenia. Słupki w różnych odcieniach szarości oznaczają średnie pomiary w obrębie jednej linii. Punktami oznaczono pojedyncze pomiary, słupki błędów wyznaczają SEM. Na wykresie oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy liniami, wyliczone przy pomocy dwuczynnikowej analizy wariancji, uwzględniając punkty czasowe w obrębie linii. *** $p < 0,001$. **D.** Wykres liniowy opracowany na podstawie tych samych danych co C. Punktami oznaczono pojedyncze pomiary w danych punktach czasowych, które posłużyły do wyliczenia linii trendu. Liczba pomiarów (n) dla każdej badanej grupy w każdym punkcie czasowym była równa i wynosiła 10.

4.3.3. Analiza powierzchni komórek oraz występowania i długości rzęsek w uzyskanych liniach komórkowych pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C.

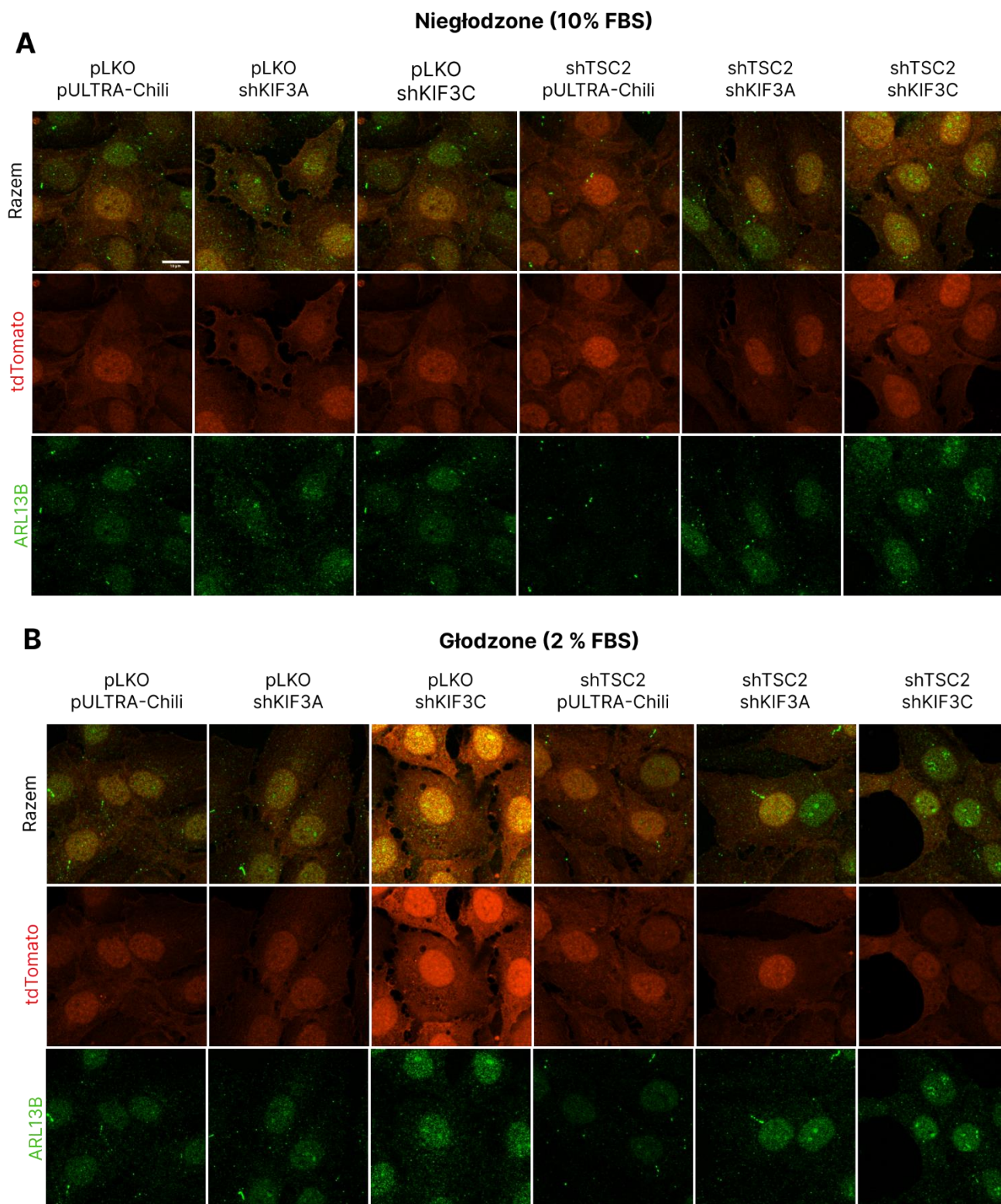
Jak wspomniano we wstępie, w punkcie 1.2.4 oraz przy opisie wyników z punktu 4.2.3, KIF3A oraz KI3C pełnią kluczową rolę w transporcie rzęskowym, a co za tym idzie prawidłowym funkcjonowaniu pierwotnych rzęsek. Pierwotne rzęski natomiast, pełnią istotną rolę w autofagii, będącej jednym z procesów regulowanych przez kinazę mTOR (punkt 1.3.3). Z tego powodu postanowiono sprawdzić czy pomiędzy stworzonymi liniami można wykazać różnice w występowaniu, oraz długości rzęsek, analogicznie do eksperymentów przeprowadzonych na neuronach (punkt 4.2.3). Co więcej, zastosowanie nieneuronalnych linii komórkowych umożliwia przeprowadzenie eksperymentów w warunkach obniżonej zawartości surowicy (nazywanej dalej warunkami głodzącymi), co okazało się wcześniej niemożliwe w prowadzonych eksperymentach na hodowlach neuronalnych. Jednocześnie postanowiono sprawdzić czy w badanych liniach, wystąpią również różnice w powierzchni komórek, jako że stymulacja wzrostu komórki, nawet przy ograniczonej dostępności substancji odżywczych jest jedną z charakterystycznych cech hiperaktywacji ścieżki mTOR (Guertin i Sabatini 2007).

W tym celu, komórki wszystkich linii zostały wysiane w dwóch wariantach hodowlanych, w pożywce o standardowej (10 %) oraz obniżonej (2 %) zawartości surowicy. Wybór łagodniejszych warunków głodzenia (2 % zamiast 0,2 % jak na Ryc. 4.19) wynikał z słabszego tempa wzrostu linii shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C (Ryc. 4.21). Po 48 godz. komórki zostały utrwalone, a następnie wybarwione immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała rozpoznającego białko ARL13B, będące swoistym markerem pierwotnych rzęsek w fibroblastach, a następnie obrazy komórek

zebrano przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Przykładowe zdjęcia przedstawiono na Ryc. 4.22. Na zebranych fotografiach zmierzono powierzchnię, długość rzęsek oraz intensywność fluorescencji. Ze względu na znaczną liczbę pomiarów pojedynczych komórek (opis Ryc. 4.23), w celu zminimalizowania ryzyka błędu I rodzaju, które rośnie wraz z liczbą obserwacji, na potrzeby obliczeń statystycznych zdecydowano się na uśrednienie wartości na pojedynczą komórkę.

Jak zaprezentowano na Ryc. 4.23 A, warunki głodzenia nie wpłynęły znacznie na powierzchnię komórki. W żadnym ze scenariuszy komórki linii shTSC2-pULTRA-Chili nie okazały się większe w porównaniu do kontrolnej linii pLKO-pULTRA-Chili. Jednocześnie zarówno w przypadku warunków głodzenia jak i standardowych, największą powierzchnią cechowały się komórki należące do linii shTSC-KIF3A. Co interesujące, głodzenie zdawało się wpłynąć w największym stopniu na linię shTSC2-shKIF3C, której komórki w tych warunkach cechowały się najmniejszą powierzchnią.

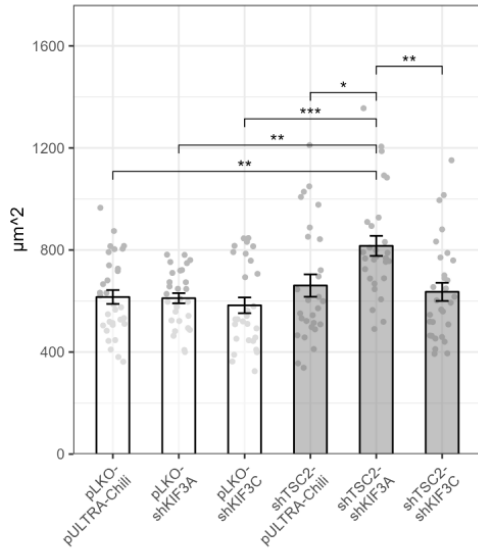
W przypadku pomiarów rzęsek, nie stwierdzono istotnych różnic w ich długości pomiędzy wariantami, niezależnie od głodzenia (ryc. 4.23 B). Jednakże, pomiędzy liniami wystąpiły znaczne różnice w proporcjach komórek posiadających rzęski do nie posiadających (Ryc. 4.23 C). W przypadku hodowli w standardowej pożywce, około 30 % komórek zarówno kontrolnej linii pLKO-pULTRA-Chili, jakii linii pLKO-shKIF3A posiadało obiekt zidentyfikowany jako rzęska, to w przypadku linii pLKO-shKIF3C było to tylko 15 %. W przypadku linii shTSC2-pULTRA-Chili było to aż 47%, jednak dla linii shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C odpowiednio 22% i 25%. Sugeruje to możliwy efekt wyciszenia *Tsc2* na zwiększenie liczby komórek z rzęską, który zdaje się znosić jednoczesne wyciszenie zarówno *Kif3a* jak i *Kif3c*. W warunkach głodzących, znacznie większy procent (58,7 %) komórek linii kontrolnej pLKO-pULTRA-Chili posiadał rzęskę co jest obserwacją zgodną z danymi literaturowymi (Pierce i Nachury 2013), w tym przypadku niemal zrównując się z linią shTSC2-pULTRA-Chili (59,5 %). Co ciekawe, w tych warunkach zarówno w liniach kontrolnych pLKO, jak i tych na bazie shTSC2 dodatkowe wyciszenie *Kif3a*, jak i *Kif3c* skutkowało znacznym zmniejszeniem proporcji komórek z rzęską (20 – 30 %).



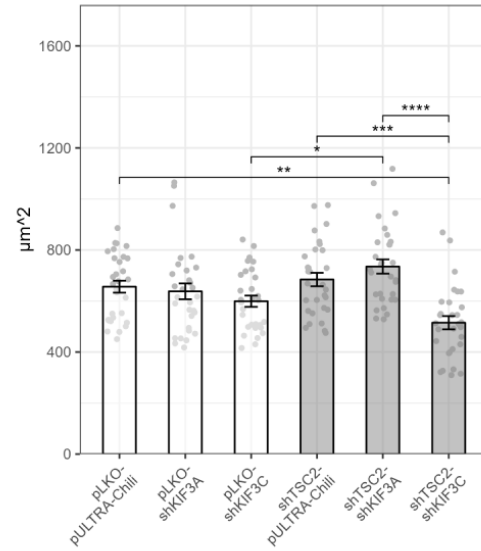
Ryc. 4.22. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe komórek Rat2 linii: pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C hodowanych w pożywce o standardowej oraz obniżonej zawartości surowicy. Komórki linii Rat2 zostały wysiane w pożywce o standardowej (10%) lub obniżonej (2%) zawartości FBS. Po 48 godz. komórki utrwalono i barwiono immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała rozpoznającego ARL13B **A.** Przykładowe obraz mikroskopowe komórek hodowanych w standardowej pożywce. **B.** Przykładowe obrazy mikroskopowe komórek hodowanych w pożywce o obniżonej zawartości FBS.

A

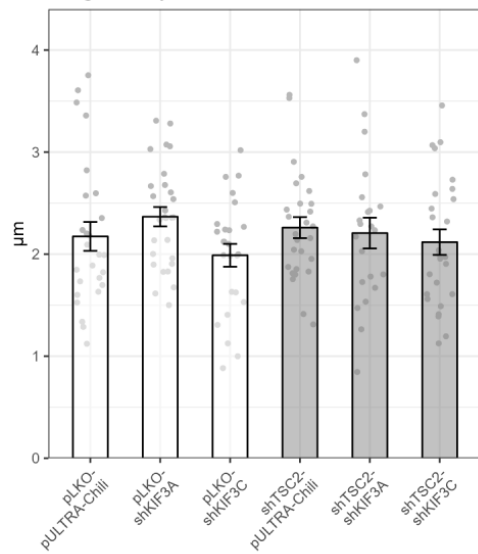
Komórki niegłodzone (FBS 10 %)
Powierzchnia komórki



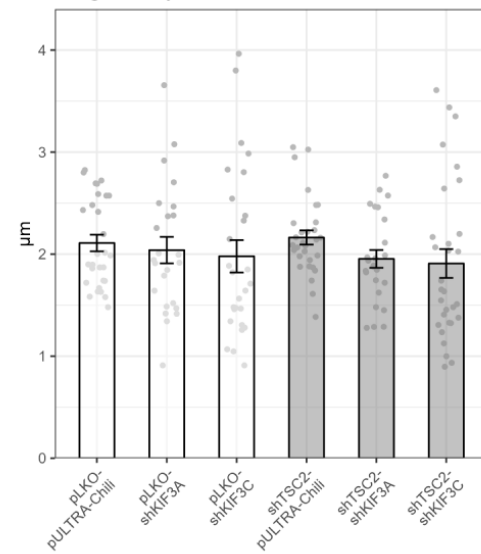
Komórki głodzone (FBS 2 %)
Powierzchnia komórki

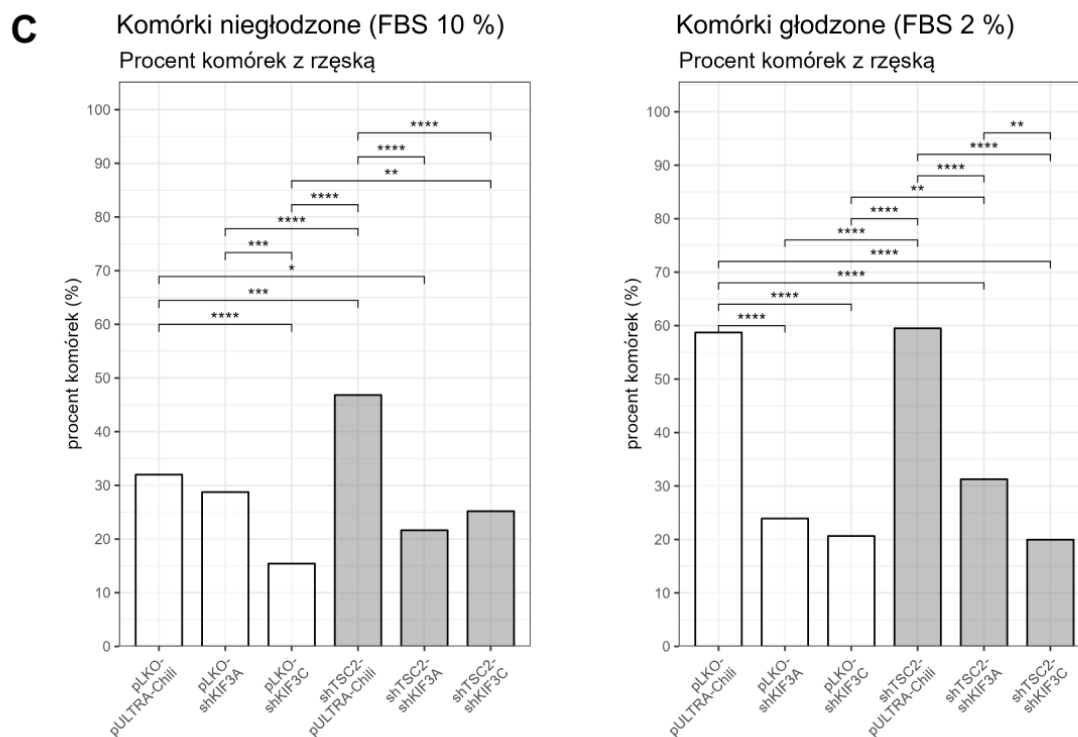
**B**

Komórki niegłodzone (FBS 10 %)
Długość rzęski



Komórki głodzone (FBS 2 %)
Długość rzęski





Ryc. 4.23. Pomiary powierzchni oraz długości rzęsek u komórek Rat2 pochodzących ze stabilnych linii: pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C hodowanych w warunkach standardowych oraz głodzenia. Komórki wszystkich linii były hodowane w pożywce o standardowym (10 %) albo obniżonym (2 %) stężeniu surowicy. **A.** Pomiar powierzchni komórek. Wykresy przedstawiają średnią, słupki błędów oznaczają SEM. Szarymi punktami zaznaczono uśrednione pomiary dla pojedynczych zdjęć, na podstawie których liczone były też statystyki. Poziom istotności statystycznej wyliczono testem Kruskala-Wallisa wraz z testem post-hoc Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. Zaznaczono jedynie statystycznie istotne porównania. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. **B.** Pomiar długości rzęski. Wykresy przedstawiają średnią, słupki błędów oznaczają SEM. Do obliczeń brano jedynie pod uwagę komórki posiadające przynajmniej jedną rzęskę. Szarymi punktami oznaczono uśrednione wartości dla pojedynczych zdjęć, na podstawie których liczone były też statystyki. Istotności wyliczono poprzez test Kruskala-Wallisa wraz z testem post-hoc Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. Zaznaczono jedynie statystycznie istotne porównania. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. **C.** Procent komórek z przynajmniej jedną rzęską. Porównania pomiędzy grupami zostały wyliczone dokładnym testem Fishera, zaznaczono jedynie statystycznie istotne porównania. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Eksperyment wykonano w trzech, niezależnych powtórzeniach ($N = 3$). W przypadku, kiedy jako pojedynczy pomiar traktowano średnią wartość ze zdjęcia (A oraz B) liczba dokładna liczba pomiarów (n) wyniosła: Dla komórek głodzonych: pLKO-pULTRA-Chili (30), pLKO-shKIF3A (30), pLKO-shKIF3C (30), shTSC2-pULTRA-Chili (30), shTSC2-shKIF3A (30), shTSC2-shKIF3C (30). Dla komórek niegłodzonych: pLKO-pULTRA-Chili (32), pLKO-shKIF3A (30), pLKO-shKIF3C (29), shTSC2-pULTRA-Chili (28), shTSC2-shKIF3A (28), shTSC2-shKIF3C (30). W przypadku C, gdzie pojedynczym pomiarem była jedna komórka, liczba pomiarów (n) wynosiła dla komórek głodzonych: pLKO-pULTRA-Chili: (356), pLKO-shKIF3A:

(276), pLKO-shKIF3C: (373), shTSC2-pULTRA-Chili: (353), shTSC2-shKIF3A: (355), shTSC2-shKIF3C: (436). Dla komórek niegłodzonych: pLKO-pULTRA-Chili: (375), pLKO-shKIF3A: (348), pLKO-shKIF3C: (389), shTSC2-pULTRA-Chili: (346), shTSC2-shKIF3A: (282), shTSC2-shKIF3C: (385).

4.3.4 Analiza ruchu pęcherzyków zawierających LAMP1-GFP w uzyskanych liniach Rat2 pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C.

Jak opisano we wstępie, w punkcie 1.3.3, autofagia jest jednym z najbardziej rozpoznawalnych i najlepiej opisanych procesów kontrolowanych przez mTOR (Switon i in. 2017). Kluczowym zjawiskiem w tym procesie jest transport pęcherzykowy, którego przykładem jest aktywny transport wzdłuż mikrotubul lizosomów, których charakterystycznym markerem jest białko LAMP1. Jednocześnie wpływ ścieżki mTORC1 na ruch wspomnianych pęcherzyków był badany w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej w kontekście oddziaływania dyneiny z kompleksem AP2 (Tempes i in. 2024), zaś niektóre badania sugerują, że kinezy-2 mogą być odpowiedzialne za ruch lizosomów w stronę peryferii komórek (Brown i in. 2005). Jednocześnie jak wspomniano wcześniej, należące do kinezyn-2 KIF3A oraz KIF3C, są kluczowe dla funkcjonowania pierwotnych rzęski, będących organellami silnie powiązаныmi z regulacją autofagii. Z tego powodu postanowiono sprawdzić, przy wykorzystaniu stworzonych linii komórkowych, czy wyciszenie *Tsc2* wpłynie na prędkość lub wydajność ich transportu, oraz jak zmieni się to przy jednoczesnym wyciszeniu badanych kinezyn. W tym celu zaprojektowano doświadczenie analogiczne do opisanego w (Tempes i in. 2024), wykorzystując plazmid kodujący fuzyjne białko LAMP1 z metką GFP. W celu przeprowadzenia doświadczenia, komórki wszystkich linii poddano nukleofekcji przy pomocy elektroporacji (zgodnie z punktem 3.5.2) plazmidem LAMP1-GFP, następnie obrazowano przyżyciowo zgodnie z 3.8.3. Ze względu na silny sygnał fluorescencyjny obecny już kilka godzin po transfekcji, zdecydowano się na obrazowanie przyżyciowe po 20 godz. Przykładowe filmy zawarto na załączonej pamięci USB, oraz pod poniższymi adresami internetowymi:

Film 8. LAMP1-GFP w pLKO-pULTRA-Chili: <https://youtu.be/foB0k6SoW9U>

Film 9. LAMP1-GFP w pLKO-shKIF3A: https://youtu.be/QsP_jQMhX5k

Film 10. LAMP1-GFP w pLKO-shKIF3C: <https://youtu.be/47sQg6nnIa4>

Film 11. LAMP1-GFP w shTSC2-pULTRA-Chili: https://youtu.be/QQN6_sXGZ3o

Film 12. LAMP1-GFP w shTSC2-shKIF3A: <https://youtu.be/7CaN24uA9-U>

Film 13. LAMP1-GFP w shTSC2-shKIF3C: https://youtu.be/TW_VysjgX0

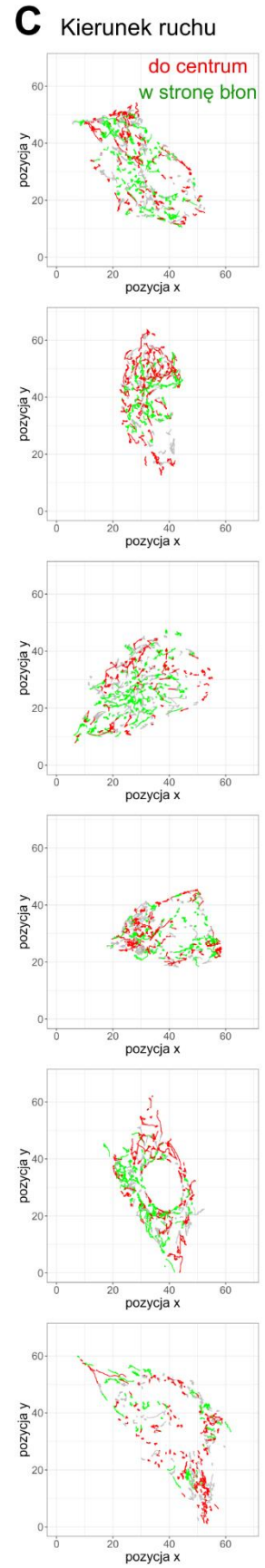
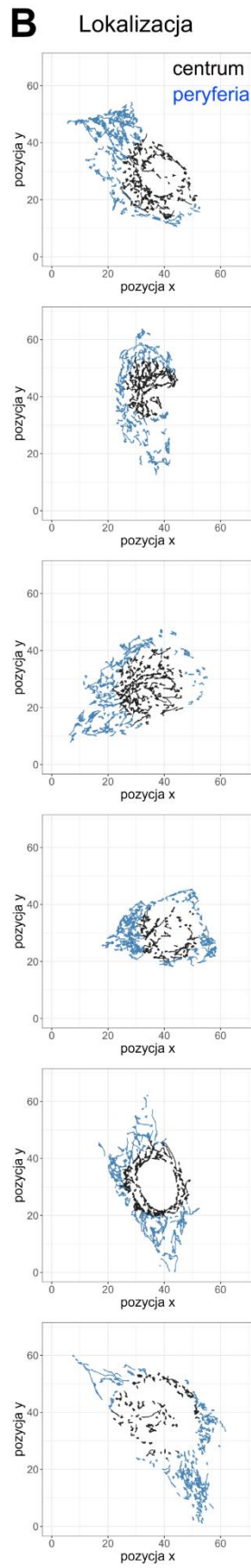
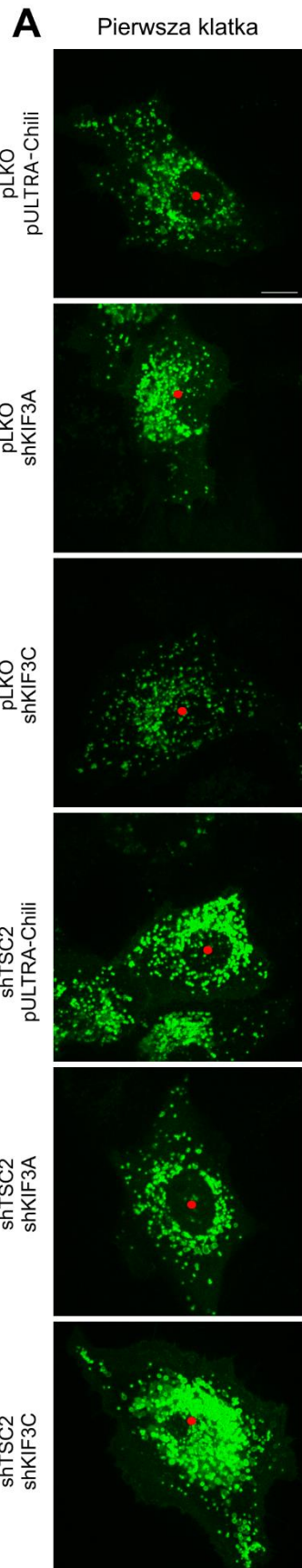
Na poklatkowych filmach zarejestrowanych podczas obserwacji komórek, w których doszło do nadprodukcji LAMP1-GFP, można zaobserwować, nagromadzenie się większości GFP-pozytywnych pęcherzyków w pobliżu jądra w formie dużych skupisk (Ryc. 4.24 A), co jest zgodne z danymi literaturowymi (Wong i in. 2008). Jednocześnie wciąż wiele pojedynczych pęcherzyków

przemieszczało się od centrum komórki w stronę błon, jak i w przeciwnym kierunku. Ze względu na trudność w obserwowaniu ruchu obiektów w rejonie wspomnianych skupisk, zdecydowano się na podzielenie znalezionych przez wtyczkę TrackMate (proces opisany w 3.9.2) trajektorii ruchu na dwie lokalizacje – centrum, oraz peryferia komórki. Podziału dokonano na podstawie odległości od centralnego punktu komórki. Trajektorie, których odległość od centralnego punktu była większa niż średnia odległości wszystkich trajektorii, uznano za obecne na peryferiach komórki, pozostałe zaś, których odległość była mniejsza, uznano za obecne w centrum i nie były włączane do obliczeń. Przykłady takiego podziału zaprezentowano na Ryc. 4.24 B. Natomiast wypadkowy kierunek ruchu pęcherzyków (w stronę centrum lub w stronę błon), wyliczono na podstawie korelacji Pearsona zmiany odległości od centrum w czasie. Przykłady oznaczania trajektorii, jak i opis klasyfikacji kierunku przedstawia Ryc. 4.24 C.

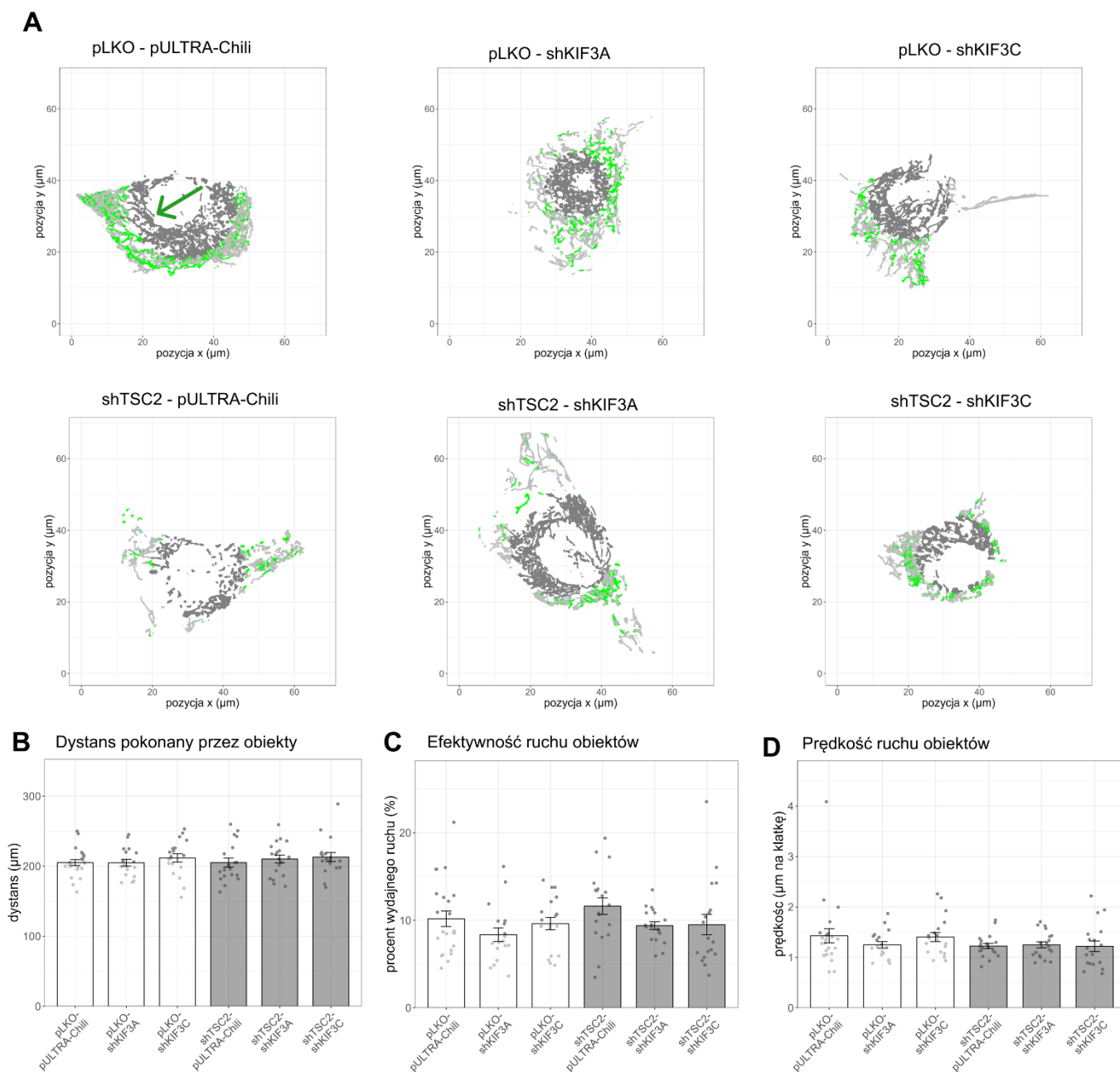
Ponieważ mikrotubule w fibroblastach ułożone są „plus” końcem na zewnątrz od centrosomu, podejrzewano, że KIF3A oraz KIF3C mogą odpowiadać za ruch pęcherzyków LAMP1-GFP w kierunku od centrum komórki do błony komórkowej (Ryc. 4.25 A). Tym samym w pierwszej kolejności zmierzono całkowitą drogę pokonaną przez pęcherzyki (Ryc. 4.25 B). Jednocześnie, nawet pośród pęcherzyków wypadkowo, sprawnie poruszających się w kierunku błony, następują okazjonalne ruchy w kierunku przeciwnym. Może to wynikać z mechanizmu „przeciągania liny” między kinezynami a połączoną z tymi samymi pęcherzykami dyneiną (Munoz i Klumpp 2022). Z tego powodu sprawdzono, czy pomiędzy liniami można zauważyć różnice w efektywności ruchu, mierzonej jako iloraz zmiany położenia (rozumianej jako dystans między pozycją początkową a końcową) i całkowitej drogi przebytej przez obiekt (Ryc. 4.25 C). Oprócz tego zmierzono również prędkość, wyrażoną jako droga przebyta przez pęcherzyk w czasie, w którym był widoczny (Ryc. 4.25 D). Dla żadnego ze zmierzonych parametrów nie stwierdzono różnic pomiędzy analizowanymi liniami komórkowymi.

Następnie w podobny sposób przeanalizowano również, jak wyciszenie wybranych kinezyn oraz *Tsc2* wpłynęło na ruch pęcherzyków w kierunku od krawędzi komórki, do centrum (Ryc. 4.26 A). Nie stwierdzono jednak różnic w długości (Ryc. 4.26 B), efektywności (Ryc. 4.26 C) ani prędkości ruchu obiektów LAMP1-GFP (Ryc. 4.26 D).

Podczas analizy uzyskanych filmów, oprócz dużego skupiska GFP w centrum komórki, zaobserwowano też mniejsze zagęszczenia na obrzeżach. Ponieważ jak sugerują niektóre dane z literatury, z tworzeniem się takich skupisk mogą być powiązane kinezyny-2 (Brown i in. 2005), postanowiono sprawdzić czy pomiędzy uzyskanymi liniami występują w tym względzie różnice. W tym celu przeanalizowano pierwsze klatki uzyskanych filmów, na których obliczono intensywność fluorescencji w obszarze poza centralnym skupiskiem (Ryc. 4.27 A). Jak pokazano na Ryc. 4.27 B, w liniach o wyciszonej ekspresji *Kif3a* (pLKO-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3A), zaobserwowano spadek fluorescencji na obszarze peryferii komórki, względem odpowiadających im linii kontrolnych (o około 30 % dla linii pLKO-shKIF3A, oraz 20 % dla shTSC2-shKIF3A). Różnice te nie były jednak istotne statystycznie.

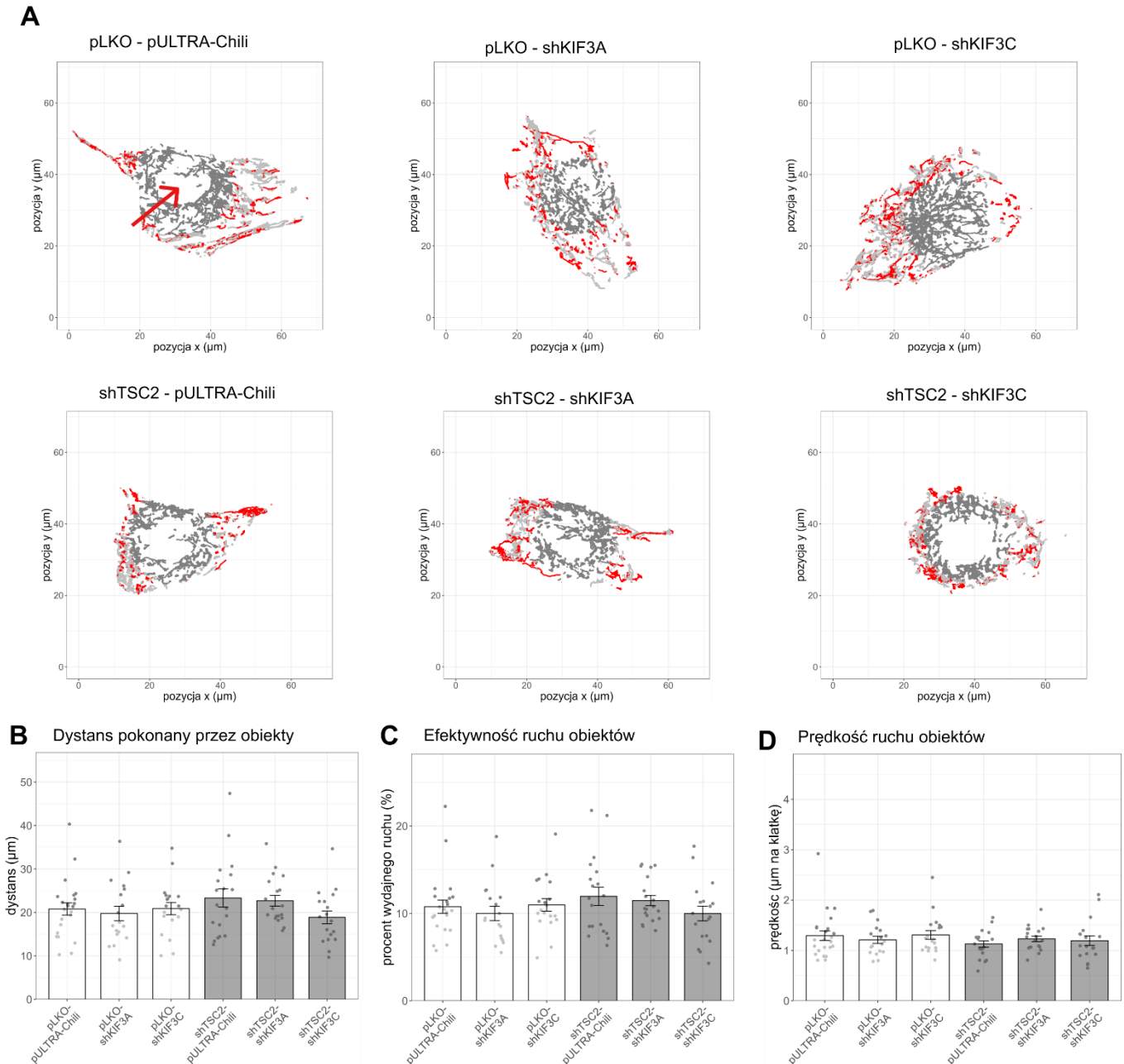


Ryc. 4.24. Schemat analizy ruchu pęcherzyków w komórkach linii pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C transfekowanych plazmidem LAMP1-GFP. Komórki linii stabilnych Rat2 transfekowano plazmidem kodującym LAMP1-GFP, a po upływie 20 godz. obrazowano przyżyciowo. **A.** Pierwsze klatki z przykładowych filmów poklatkowych uzyskanych w trakcie obserwacji. Czerwonym punktem oznaczono manualnie wybrany punkt centralny, na podstawie którego wyznaczono granice centrum komórki. **B.** Trajektorie ruchu pęcherzyków LAMP1-GFP wyliczone przez program TrackMate. Kolorami oznaczono przypisaną trajektorii lokalizację, obliczoną na podstawie odległości od centralnego punktu komórki. Jeżeli dla danej trajektorii odległość była mniejsza niż średnia wszystkich odległości trajektorii, oznaczono ją jako centrum (kolor czarny). Jeżeli była większa, przypisywano ją do peryferiów (kolor niebieski). **C.** Trajektorie ruchu pęcherzyków LAMP1-GFP wyliczone przez program TrackMate. Kolorami oznaczono wypadkowy kierunek ruchu. Jeżeli odległość od centralnego punktu komórki rosła w czasie (korelacja Pearsona w zakresie od 0,5 do 1), to kierunek ruchu określano jako do błony komórkowej (kolor zielony). Jeżeli odległość od centrum malała w czasie (korelacja Pearsona od -0,5 do -1), kierunek ruchu określano jako do centrum (kolor czerwony). Jeżeli dla danego punktu, współczynnik korelacji Pearsona dla zmiany odległości w czasie zawierał się w przedziale od -0,5 do 0,5, ruch określano jako oscylujący i nie włączano do obliczeń (kolor szary).



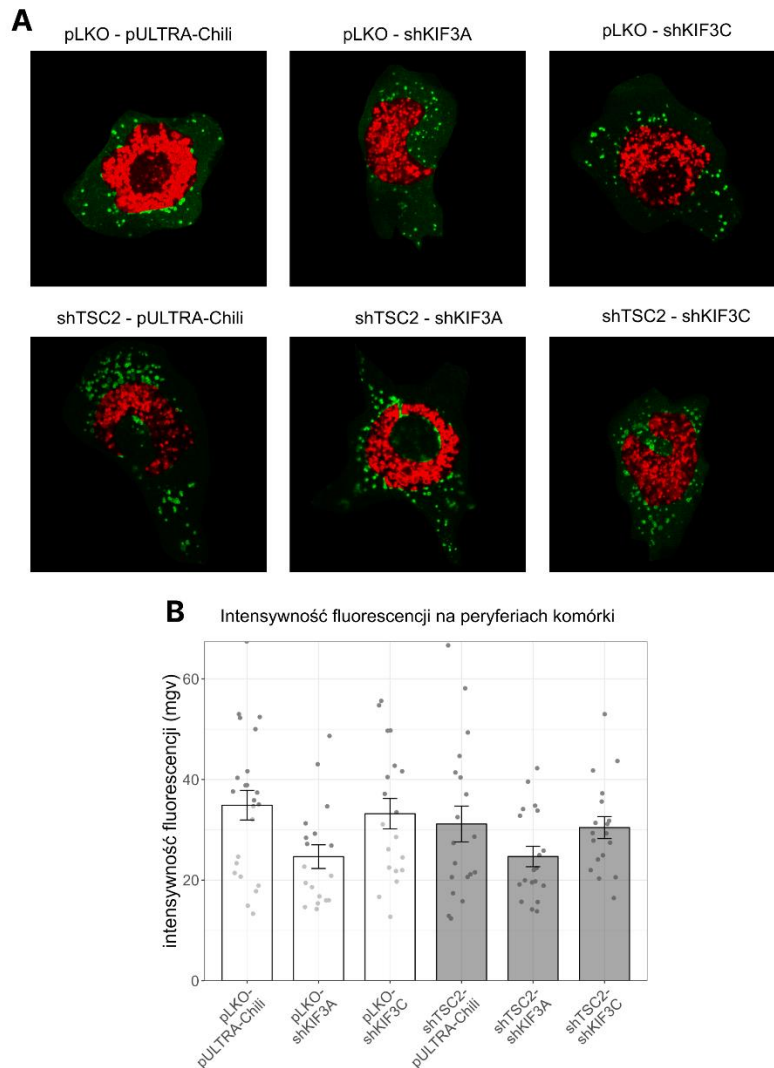
Ryc. 4.25. Analiza ruchów obiektów LAMP1-GFP w obrębie peryferiów komórki, w kierunku błon. **A.** Naniesione na wykresy przykładowe trajektorie znalezione na reprezentatywnych komórkach z badanych linii. Do obliczeń włączano jedynie obiekty poruszające się wypadkowo w stronę granicy błony komórki (na schemacie kolor zielony). Kolorem jasnoszarym oznaczono pozostałe trajektorie w obrębie peryferii komórki, zaś kolorem ciemnoszarym centralne skupisko GFP w pobliżu centrum komórki. **B.** Średnia z całkowitego dystansu pokonanego przez obiekty LAMP1-GFP, uwzględniając ruchy wsteczne i oscylacje. **C.** Efektywność ruchu obiektów LAMP1-GFP, liczona jako iloraz zmiany dystansu na początku i na końcu filmu i całkowitej drogi. Wyrażony jako procent. **D.** Prędkość ruchu obiektów LAMP1-GFP, obliczona jako iloraz całkowitej pokonanej drogi, i liczby klatek, na której obiekt był widoczny. Na wszystkich wykresach szarymi punktami oznaczono uśrednione pomiary z pojedynczych komórek, słupki błędów wyznaczają SEM. Porównań między grupami dokonywano testem Kruskala-Wallisa, z testem *post-hoc* Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. Dane

pochodzą z dwóch (N = 2) niezależnych eksperymentów. Pojedynczą obserwacją (n) była jedna komórka. Dokładna liczba: pLKO-pULTRA-Chili (23), pLKO-shKIF3A (18), pLKO-shKIF3C (19), shTSC2-pULTRA-Chili (19), shTSC2-shKIF3A (19), shTSC2-shKIF3C (18).



Ryc. 4.26. Analiza ruchów obiektów LAMP1-GFP w obrębie peryferii komórki, w kierunku centrum. **A.** Naniesione na wykresy przykładowe trajektorie znalezione na reprezentatywnych komórkach z badanych linii. Do obliczeń włączano jedynie obiekty poruszające się wypadkowo w stronę centrum (na wykresie kolor czerwony). Kolorem jasnoszarym oznaczono pozostałe trajektorie w obrębie peryferii komórki, zaś kolorem ciemnoszarym centralne skupisko GFP w pobliżu centrum komórki. **B.** Średnia z całkowitego dystansu pokonany przez obiekty LAMP1-GFP, uwzględniając ruchy wsteczne i oscylacje. **C.** Efektywność ruchu obiektów LAMP1-GFP, obliczona jako iloraz zmiany dystansu na początku i na końcu filmu i całkowitej drogi. Wyrażony jako procent. **D.** Prędkość ruchu

obiektów LAMP1-GFP, obliczona jako iloraz całkowitej pokonanej drogi, i liczby klatek, na której obiekt był widoczny. Na wszystkich wykresach szarymi punktami oznaczono uśrednione pomiary z pojedynczych komórek, słupki błędów wyznaczają SEM. Porównań między grupami dokonywano testem Kruskala-Wallisa, z testem *post-hoc* Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. Dane pochodzą z dwóch (N = 2) niezależnych eksperymentów, pojedynczą obserwacją (n) była jedna komórka. Dokładna liczba: pLKO-pULTRA-Chili (23), pLKO-shKIF3A (18), pLKO-shKIF3C (19), shTSC2-pULTRA-Chili (19), shTSC2-shKIF3A (19), shTSC2-shKIF3C (18).



Ryc. 4.27. Analiza intensywności fluorescencji LAMP1-GFP na peryferiach komórki. Na pierwszych klatkach filmów przedstawiających komórki linii stabilnych Rat2, transfekowane plazmidem LAMP1-GFP, mierzono sygnał fluorescencyjny wyznaczony wyrażony jako mgv jedynie w obszarze poza centralnym skupiskiem GFP. **A.** Schematyczne przedstawienie sposobu wykonania pomiaru. Czerwonym kolorem zaznaczono obszar rozpoznany jako zagęszczone białka w pobliżu jądra komórki, który nie był brany do obliczeń. Na zielono zaś, pozostała część komórki uznawaną za peryferia. **B.** Pomiary średniej intensywności fluorescencji GFP w obszarze komórki określanym jako peryferia. Szarymi punktami oznaczono pojedyncze obserwacje, słupki błędów wyznaczają SEM. Porównań między grupami dokonano testem Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunn i poprawką Holma dla wielokrotnych porównań. Dane pochodzą z dwóch niezależnych eksperymentów (N = 2).

Dokładna liczba obserwacji (n): pLKO-pULTRA-Chili (23), pLKO-shKIF3A (18), pLKO-shKIF3C (19), shTSC2-pULTRA-Chili (19), shTSC2-shKIF3A (19), shTSC2-shKIF3C (18).

Uzyskane wyniki pomiarów ruchu pęcherzyków LAMP1-GFP-pozytywnych w stabilnych liniach Rat2, nie wykazały, aby wyciszenie *Kif3a* lub *Kif3c* miało wpływ na transport lizosomów niezależnie od jednoczesnego wyciszenia ekspresji *Tsc2*, lub jej braku. Pomędzy liniami występowały jednak pewne różnice w rozmieszczeniu skupisk LAMP1-GFP, choć nie okazały się one statystycznie istotne.

5. DYSKUSJA

Wynikający z hiperaktywacji mTOR, nadmierny wzrost komórek nerwowych, jak i niekontrolowane rozgałęzienie drzewka dendrytycznego, przyczynia się do objawów ze strony układu nerwowego obserwowanych w stwardnieniu guzowatym, takich jak niepełnosprawność intelektualna i epilepsja. Ponieważ stosowanie typowych inhibitorów mTOR jak rapamycyna, wiąże się z licznymi skutkami ubocznymi, pożądane jest poszukiwanie nowych środków terapeutycznych poprzez lepsze zrozumienie zjawisk zachodzących w zmienionych neuronach. Jednym z obiecujących, lecz słabo zbadanych w tym kontekście procesów, jest transport mikrotubularny. Tym samym, głównym celem przedstawionej pracy, było sprawdzenie czy którekolwiek z białek motorycznych należących do licznej rodziny kinezyn, odgrywa istotną rolę w nadmiernym wzroście neuronu, spowodowanym hiperaktywacją mTOR, charakterystyczną dla stwardnienia guzowatego. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że wyciszenie ekspresji genów: *Kif3a*, *Kif3b* oraz *Kif21b* wpływało na istotne zmniejszenie powierzchni ciała komórki neuronu, pomimo jednoczesnego obniżenia ekspresji *Tsc2*, zastosowanego w celu modelowania TSC. Dodatkowo podjęto próbę wyjaśnienia zaobserwowanych wyników, zarówno w komórkach neuronalnych, jak i stworzonej specjalnie na potrzeby pracy liniach komórek Rat2. W dalszej części rozdziału, przedyskutowano uzyskane wyniki w kontekście dostępnej wiedzy literaturowej.

5.1 Rola kinezyn we wzroście neuronu spowodowanym aktywacją mTOR

W 2017 roku badania Kononenko i wsp. wykazały, że transport amifisomów zawierających zinternalizowany kompleks TrkB-BDNF przez kompleks dyneiny-dynaktyny jest zależny od kompleksu adaptorowego AP2. (Kononenko i in. 2017). Dalsze badania prowadzone w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej wykazały zaś, że wiązanie AP2 do podjednostki p150^{glued} dynaktyny jest nasilone w przypadku traktowania komórek rapamycyną, sugerując przynajmniej pośredni udział mTOR w regulowaniu tego procesu (Tempes i in. 2024). Jako że dyneina jest białkiem transportującym ładunki w kierunku „-” końca mikrotubul, postawiono pytanie czy podobne powiązanie ze ścieżką mTOR można zaobserwować również dla drugiej grupy motorów mikrotubularnych, czyli poruszających się w większości w kierunku przeciwnym kinezyn. Jednocześnie, ponieważ kinezyny należą do obszernej rodziny, zawierającej przynajmniej 45 genów u człowieka (Konjikusic, Gray, i Wallingford 2020), stąd poszukiwanie potencjalnie interesujących w kontekście TSC rozpoczęto od dwóch badań przesiewowych.

5.1.1 Pierwszorzędowe badanie przesiewowe

W pierwszorzędowym badaniu przesiewowym, wykorzystano PI3-kinazę, której wpływ na nadmierny rozwój neuronu, jak i aktywację ścieżki mTOR jest dobrze opisany (Jaworski i in. 2005).

Istotnie, w pilotażowym eksperymencie na komórkach pochodzących ze szczurzych hodowli neuronalnych, wykazano, że transfekcja konstytutywnie aktywną formą PI3K skutkowało około 60% zwiększeniem powierzchni ciała komórki i 40% wzrostem liczby zakończeń dendrytycznych (Ryc. 4.1). Następnie zbadano, czy wyciszanie kinezyn poprzez użycie shRNA przy jednoczesnej stymulacji PI3-kinazą będzie skutkowało zmianą tego fenotypu, co przedstawiono na Ryc. 4.3.1 – 4.3.37, oraz zbiorczo na Ryc. 4.4 – 4.5. W przypadku liczby zakończeń dendrytycznych, spadek względem Ktrl-2 nie zawierającej shRNA zanotowano dla wariantów: KIF11, KIF12, KIF13A, KIF13B, KIF14, KIF15, KIF16B, KIF18A, KIF18B, KIF19, KIF1A, KIF1B, KIF20A, KIF21A, KIF21B, KIF22, KIF23, KIF24, KIF26A, KIF26B, KIF27, KIF2A, KIF2B, KIF2C, KIF3A, KIF3B, KIF3C, KIF4A, KIF5A, KIF5C, KIF6, KIF7, KIFC1, KIFC2, KIFC3, czyli niemal wszystkich z wyjątkiem: KIF9, KIF4B oraz KIF5B. Co więcej, w wielu przypadkach liczba zakończeń spadała poniżej poziomu Ktrl-1, którą stanowiły neurony nie transfekowane aktywną formą PI3K (Ryc. 4.4 A). W przypadku powierzchni ciała komórki istotnie statystyczny efekt odnotowano dla: KIF21A, KIF5C, KIF11, KIF12, KIF13B, KIF14, KIF15, KIF16B, KIF18A, KIF19, KIF20A, KIF21B, KIF22, KIF26B, KIF27, KIF2A, KIF2B, KIF2C, KIF3A, KIF3B, KIF3C, KIF5A, KIF9, KIFC1, KIFC2 oraz KIFC3. Jednocześnie tylko dla KIF12 powierzchnia ciała komórki spadła poniżej poziomu Ktrl-1 (Ryc. 4.4 B). Tym samym, w opisanym eksperymencie, obniżający efekt na liczbę zakończeń dendrytycznych, wydaje się być wspólny dla wyciszania ekspresji większości z genów kinezyn, zaś fakt, że liczba ta spadała niejednokrotnie poniżej Ktrl-1, może sugerować również efekt samego stosowanego shRNA na drzewko dendrytyczne. W przypadku powierzchni ciała komórki, wyciszanie wielu z badanych kinezyn powodowało obniżenie powierzchni do poziomu niemal równego Ktrl-1 (z czego KIF11, KIF20A, KIF26B, KIF27, KIF5A, KIFC2 nie wykazywały istotnych statystycznie różnic), zaś jak wspomniano tylko dla KIF12 odnotowano spadek poniżej tego poziomu. Warto jednak dodać, że wyciszanie ekspresji *Kif12* podobnie jak również należącego do tej samej rodziny (kinezyn-12) *Kif15*, powodowało znaczną śmiertelność wśród badanych neuronów. Z tego względu, dla tych dwóch kinezyn, niemożliwe było zebranie oczekiwanej liczby zdjęć mikroskopowych (opis do Ryc. 4.4). Może to oznaczać zarówno fakt, że wyciszanie tych kinezyn jest potencjalnie letalne dla komórek nerwowych, jak i toksyczności zastosowanych sekwencji shRNA. Jednocześnie jednak sprawia to, że same pomiary komórek z wariantów shKIF12 oraz shKIF15 obciążone są dużym błędem, ze względu na fakt, że zdjęcia które udało się wykonać prawdopodobnie obrazują neurony, o niższym poziomie transfekcji. Dla zilustrowania tego faktu, w danych użytych do stworzenia zbiorczej Ryc. 4.5 za każde zdjęcie brakujące do uzyskania liczby 60-ciu na wariant, wliczano do średniej 0, znacznie obniżając uzyskany pomiar ciała komórki i liczby zakończeń dendrytycznych. Spośród genów kinezyn, których wyciszenie skutkowało istotną statystycznie zmianą fenotypu względem Ktrl-2, wybrano te, których potencjalna rola we wzroście neuronu wydała się najbardziej obiecująca na podstawie dostępnej literatury. Tym samym do dalszej pracy wyłoniono KIF5A, KIF26B, KIFC2, KIF3A, KIF3C, KIF27, KIF21B, KIF11 oraz KIF20A. Ogólny opis wybranych kinezyn zawarto w Tabeli 4.1.

5.1.2 Wpływ wyciszania wybranych genów kinezyn na neurony o bazowym poziomie aktywności mTOR

Jak ilustruje Ryc. 4.5 w pierwszorzędownym badaniu przesiewowym, nie wykazano przypadków, w których dochodziłoby do zmniejszenia ciała komórki przy jednoczesnym zachowaniu złożonego drzewka dendrytycznego. Istotnie, eksperyment, w którym wyciszano jedynie ekspresję kinezyn, bez transfekcji konstytutywnie aktywnej form PI3K, wykazał, że wszystkie zastosowane shRNA przeciwko kinezynom powodowały uproszczenie drzewka dendrytycznego, z czego jedynie dla shKIF21B efekt ten nie był statystycznie istotny (punkt 4.1.3, Ryc 4.7). Sugeruje to, że w badanym modelu, efekt samych shRNA przeciwko kinezynom mógł mieć większy wpływ na rozwój drzewka dendrytycznego niż hamowanie działania PI3K. Interesujące jest, że to brak KIF21B jako jedyny nie powodował statystycznie istotnego zmniejszenia drzewka dendrytycznego, jako, że jest to kinezyna opisana w literaturze jako czynnik hamujący wzrost mikrotubul, będących podstawowym budulcem dendrytów (van Riel i in. 2017; Hooikaas i in. 2020). Możliwe zatem, że w badanym modelu występowały przeciwstawne efekty - niespecyficzny, hamujący na rozwój drzewka dendrytycznego przez samo zastosowanie shRNA, oraz promujący na skutek zmniejszenia aktywności KIF21B. Jednakże, w pierwszorzędownym badaniu przesiewowym, wyciszenie *Kif21b* z jednoczesną transfekcją PI3K obniżało liczbę zakończeń poniżej Ktrl-1 (Ryc. 4.3.28), co więcej Muhia i wsp. sugerują, że całkowity brak KIF21B w mysich neuronach skutkuje znacznym uproszczeniem drzewka dendrytycznego (Muhia i in. 2016). W przypadku powierzchni ciała komórki, jedynie dla shKIF5A zanotowano istotny statystycznie spadek (~20 %) względem kontroli, zaś w pozostałych wariantach powierzchnia ta oscylowała wokół wartości Ktl-1. Nie jest jasne dlaczego spośród 9 zbadanych kinezyn tylko dla shKIF5A wykazano obniżający efekt na ciało komórki. KIF5A jest kluczową kinezyną w transporcie aksonalnym (punk 1.2.2), zaś mutacje w kodującym to białko genie powiązane z wieloma chorobami (Cozzi i in. 2024), jednakże wpływ jego niedoboru na wielkość komórki nie został zbadany. Uzyskane wyniki pozwalały jednak założyć, że poza wspomnianym shKIF5A, same shRNA przeciwko kinezynom nie wpływały na wielkość ciała komórki przy bazowym poziomie mTOR. Tym samym, ze względu na prawdopodobnie niespecyficzny efekt shRNA na drzewko dendrytyczne w badanym modelu, postanowiono zrezygnować z badania liczby zakończeń dendrytycznych, zaś w drugorzędownym badaniu przesiewowym skupić się jedynie na powierzchni ciała komórki.

5.1.3 Drugorzędowne badanie przesiewowe

Zaplanowanie drugorzędownego badania ze użyciem shRNA przeciwko *Tsc1* lub *Tsc2* w miejsce PI3K, miało dwa powody: po pierwsze, stanowiło model stwardnienia guzowatego, którego badanie stanowiło jedno z założeń tej pracy, po drugie aktywna forma PI3-kinazy wpływa również na aktywność innych ścieżek sygnałowych, co utrudniałoby powiązanie obserwowanych zmian w fenotypie z działaniem mTOR. Zgodnie z oczekiwaniami jednak, zastosowane shRNA przeciwko *Tsc1* oraz *Tsc2*

skutkowało znacznie mniejszym wzrostem ciała komórki w porównaniu do PI3K. W najlepszym wypadku (hodowla pomiędzy 8 – 11 dniem *in vitro*) około ~24 % wzrost wobec 60 % dla PI3K (Ryc. 4.8). Jednocześnie jak opisano w punkcie 4.1.4.1 stosowanie shTSC1 wiązało się z dużą śmiertelnością komórek, która nasilała się wraz z czasem hodowli. Nie jest to typowy efekt wyciszenia *Tsc1*, jako że w literaturze nie brakuje przeprowadzonych z sukcesem eksperymentów polegających na zmniejszaniu bądź całkowitym pozbawieniu ekspresji *Tsc1* w hodowlach neuronalnych, jak i eksperymentach na zwierzętach (Malik i in. 2015; Feliciano i in. 2011). Możliwe więc, że duża śmiertelność wynikała z działania użytego do transfekcji plazmidu. Niemniej z tego względu, w drugorzędowym badaniu przesiewowym postanowiono zastosować shTSC2. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów (Ryc. 4.9), wykazano, że równoległe wyciszenie wraz z *Tsc2* genów kinezy: *Kif21b*, *Kif3c*, *Kifc2*, *Kif26b*, *Kif5a*, *Kif20a*, *Kif11* oraz *Kif27* skutkuje obniżeniem powierzchni ciała komórki względem Ktrl-2 (shTSC2 bez shKIF) średnio o 14 %. Jednakże jedynie dla KIF21B, KIF3A, KIF3C oraz KIF26B efekt ten okazał się statystycznie istotny, przy czym największy dla KIF21B (~22 %, niemal do poziomu Ktrl-1). Jednocześnie zadano pytanie, jakie mogą być przyczyny, dla których obniżenie poziomu badanych kinezy skutkowało zmniejszeniem powierzchni neuronu mimo wyciszenia *Tsc2*.

5.2 Rola badanych kinezy w patologicznym wroście neuronu

W wyniku dwóch badań przesiewowych wyłoniono KIF21B, KIF3A, KIF3C oraz KIF26B jako kinezy najbardziej obiecujące w kontekście roli we wroście neuronu w patologii TSC, jako że ich brak, skutkowało statystycznie istotnym zatrzymaniem wzrostu powierzchni ciała komórki, zarówno u neuronów transfekowanych PI3K, jak i shTSC2. W drugiej części pracy, podjęto próbę znalezienia mechanizmu odpowiadającego za tę zależność. Jak opisano w punkcie 4.1.5, o ile w momencie projektowania dalszych eksperymentów, w literaturze można było znaleźć znaczną liczbę informacji na temat roli KIF3A, KIF3B oraz KIF21B w rozwoju komórki nerwowej, dla KIF26B jedyną istotną informacją była publikacja o jego roli w transporcie Abi-1 (ang. *Abelson interactor 1*) będącego jednym z białek gęstości postsynaptycznych (Heinrich i in. 2012). Z tego powodu zdecydowano się przeprowadzić jedynie eksperymenty badające rolę KIF3A, KIF3C oraz KIF21B w modelu TSC, których wyniki przedyskutowano w następujących podrozdziałach.

5.2.1 Walidacja zastosowanych sekwencji shRNA i badanie zmian w ekspresji genów kinezy w komórkach shTSC2

Badanie przy pomocy sond TaqMan techniką RT-PCR potwierdziło, że w stosowane sekwencje shRNA przeciwko *Tsc2*, *Kif3a*, *Kif3c* oraz *Kif21b* powodują spadek poziomu mRNA kodującego wybrane geny (Ryc 4.11) w komórkach neuronalnych, w założonym czasie (72 godziny). W przypadku shKIF3A, spadek ten był nieco poniżej poziomu istotności statystycznej (wartość $p = 0,06$ dla testu t studenta jednej próby), wynikało to jednak najprawdopodobniej z dużego odchylenia jednego z

powtórzeń względem pozostałych (Ryc. 4.11 panel A). Jednocześnie jak ukazuje Ryc. 4.11 nie wykazano, aby w neuronach o obniżonej ekspresji *Tsc2* dochodziło do równoległej zmiany w poziomie ekspresji genów badanych kinezyń. Można jednak zauważyć, że w przypadku *Kif21b*, zanotowano spadek w komórkach shTSC2 względem kontroli, będący na granicy istotności statystycznej (wartość $p = 0,06$).

5.2.2 Wybrane funkcje KIF21B w modelu TSC w neuronach

Fakt, że w przypadku zmniejszenia ekspresji *Kif21b* nie zaobserwowano wzrostu powierzchni ciała komórek, pomimo transfekcji PI3K/shTSC2, może wynikać z dwóch powodów:

Po pierwsze KIF21B jest jedną z najlepiej opisanych kinezyń zaangażowanych w transport zarówno aksonalny, jak i dendrytyczny (Lipka i in. 2016; Gromova i in. 2018; Asselin i in. 2020b). Mimo iż, nie jest jasne w jaki dokładnie sposób zaburzenie transportu pełnionego przez KIF21B mogłoby wpłynąć na powierzchnię ciała komórki, istnieją badania wiążące te kinezyne z transportem BDNF-TrkB (Ghiretti i in. 2016). Tym samym ograniczenie transportu tego kompleksu, a być może również innych neurotrofin, mogłoby skutkować spadkiem sygnałów stymulujących do wzrostu. Mogłoby to tłumaczyć również, czemu w przypadku zastosowania shKIF21B nie zaobserwowano spadku powierzchni ciała komórek w neuronach o bazowym poziomie mTOR (Ryc. 4.7 B). Możliwe, że neurony pochodzące z hodowli, w 8 DIV osiągają już docelowy rozmiar ciała komórki i bez dodatkowych sygnałów stymulujących nie będą zwiększać powierzchni ponad ten poziom, jednakże samo zaburzenie transportu zależne od KIF21B nie wpływa na nie toksycznie. Ponieważ ruch procesywnych kinezyń takich jak KIF21B, można z łatwością obserwować przy użyciu rekombinowanych białek z metką GFP (Lipka i in. 2016), podjęto próbę przeprowadzenia eksperymentu z pochodzącą z kolekcji LNMiK skróconą wersją KIF21B wraz z metką GFP (KIF21Bt-GFP). Jak przedstawiono na Ryc. 4.13 okazała się ona jednak niekonkluzywna. O ile można było zaobserwować bardzo procesywne, GFP-pozytywne punkty, poruszały się one w aksonie, kierunku do ciała komórki, czyli w przeciwnym od oczekiwanego dla KIF21B (Film 1). Może to wynikać po pierwsze, z faktu, że GFP-pozytywne białka były w istocie transportowane przez inny motor, poruszający się w kierunku ‘-’ mikrotubul, np. dyneinę. W sprawdzonym modelu, widoczne punkty GFP mogły nie być nawet funkcjonalnymi kinezynami, a jedynie skupiskami niepoprawnie zwiniętego białka. Występowała jednak znaczna różnica w ruchliwości pomiędzy KIF21Bt-GFP, a kontrolną KIF22t-GFP (Ryc. 4.13 D), co jest zgodne z badaniami Lipki i wsp. (Lipka i in. 2016). Sugeruje, to że być może rekombinowane białka były w istocie funkcjonalne, jednak transportowane biernie. Powodem odwrotnego od spodziewanego kierunku ruchu mógł być również zaburzony, nieprawidłowy układ mikrotubul w neuronach uzyskanych z hodowli (mieszany, zamiast ustawionych „+” końcem do wierzchołka aksonu) lub akumulacja neurofascyny poza aksonem, co doprowadziło do jego nieprawidłowego oznaczenia. Niemniej, ponieważ trudności te uniemożliwiałyby wnioskowanie, zdecydowano o rezygnacji

z kontynuacji tego eksperymentu. W celu dalszego zbadania tego zjawiska interesujące byłoby zmierzenie ruchu wyznakowanego fluorescencyjnie TrkB w neuronach o zmniejszonej ekspresji *Kif21b* i *Tsc2*, przy jednoczesnej stymulacji BDNF, co ze względu na ograniczenia czasowe nie znalazło się w tej pracy.

Drugim powodem, dla którego KIF21B może być istotne w nadmiernym wzroście neuronu obserwowanym na skutek aktywacji mTOR, jest jego wpływ na dynamikę mikrotubul. Jak wspomniano w punkcie 5.1.2 przy okazji dyskusji wyników pierwszorzędowego badania przesiewowego, KIF21B jest kinezyną szeroko opisywaną w literaturze, jako regulującą dynamikę mikrotubul (co opisano również w punkcie 1.2.4). Jak sugeruje Muhia i wsp. niedobór KIF21B jest powiązany ze zmniejszeniem liczby katastrof, wolniejszym wzrostem oraz dłuższym dystansem, na jaki rosną dynamiczne końce mikrotubul (Muhia i in. 2016). Ponieważ sieć mikrotubul jest jednym z głównych budulców komórki, tego rodzaju zaburzenia mogłyby wpływać na zatrzymanie wzrostu neuronu spowodowanego nadaktywnością mTOR. Podobnie jednak, jak omówiony wpływ na transport, efekt ten musiałby być na tyle delikatny, żeby nie wywołać spadku wielkości ciała komórki poniżej Ktrl w komórkach o bazowym poziomie aktywności mTOR (Ryc. 4.7 B). Badanie dynamiki mikrotubul poprzez zastosowanie rekombinowanego, sprzężonego z GFP białka +TIP, takiego jak EB3-GFP, jest metodą rutynowo stosowaną w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej (Tempes i in. 2024). Jednakże wspomniana publikacja Tempes i wsp., odnosi się do badań w liniach komórkowych Rat2, w których możliwe było uzyskanie znacznego poziomu produkcji rekombinowanego białka EB3-GFP, na skutek elektroporacji komórek znaczną (10 µg na 1 mln. Komórek) ilością plazmidu. Próby transfekcji neuronów plazmidem EB3-GFP przy użyciu lipofektaminy (nieopublikowane) nie wiązały się z obecnością sygnału GFP możliwego do zaobserwowania w mikroskopii przyżyciowej. Z tego powodu zdecydowano się na próbę elektroporacji świeżo wyizolowanych komórek, z embrionalnej tkanki kory mózgowej szczura (punkt 4.2.2). Pomimo skutecznej produkcji rekombinowanego białka EB3-GFP w rozwijających się po transfekcji neuronach korowych, sygnał fluorescencyjny był stosunkowo słaby. Ponadto ulegał on szybkiemu wypaleniu, wraz z postępem obrazowania (opisane w punkcie 4.2.2, widoczne na Filmie 3 oraz Filmie 4). Wiązało się to z dużą liczbą artefaktów na obrazie, oraz niskim stosunkiem sygnału do szumu (ang. *signal to noise ratio*). Z tego powodu, wykrywanie ruchu dynamicznych końców mikrotubul poprzez zastosowany algorytm TrackMate, obarczone było dużym błędem. Niski poziom produkcji rekombinowanego białka, wynikał najprawdopodobniej z wciąż słabej wydajności transfekcji. Co więcej, elektroporacja jest wysoce inwazyjną techniką, zastosowaną w tym przypadku na pierwotnie wyizolowanych komórkach, które zostały wcześniej poddane czasochłonnej procedurze izolacji ze zwierząt. Przy zastosowanych proporcjach 5 mln komórek na wariant, jedynie około 50 – 70 tys. ulegało przyklejeniu do dna naczynia hodowlanego. Jednocześnie możliwe, że jedynymi komórkami, które przeżyły proces były te, które uległy słabszej transfekcji np. na skutek mniejszych zaburzeń ciągłości błon. Wyniki obserwacji skutecznie transfekowanych komórek (Ryc.4.14), wykazały jakoby warianty shTSC2 oraz shTSC2+shKIF21B cechowały się nieco dłuższym

dystansem ruchu, oraz krótszym czasem jego trwania. Co istotne nie wykazano jednak różnic pomiędzy samymi wariantami shTSC2 oraz shTSC2+shKIF21B. Możliwe zatem, że obserwowany rezultat wynikał jedynie z wyciszenia *Tsc2*. W opisanym eksperymencie nie zastosowano jednak wariantu komórek elektroporowanych jedynie shKIF21B, stąd wniosek ten wymagałby dodatkowego potwierdzenia. Jednocześnie ze względu na opisane trudności w czasochłonnym procesie nukleofekcji przez elektroporację, oraz małej wiarygodności uzyskanych filmów poklatkowych, nie zdecydowano się na kontynuację eksperymentu podobnie jak w przypadku 4.2.1.

5.2.3 Wybrane funkcje KIF3A/KIF3C w modelu TSC w neuronach

Ze względu na kilkakrotnie wspomniany fakt, że KIF3A oraz KIF3C tworzą razem wspólny kompleks (punkty 1.2.1 oraz 1.2.4) wszystkie eksperymenty dla tych kinezyn prowadzone były razem. Podobnie jak w przypadku KIF21B (5.2.2) badania rozpoczęto od prób obserwacji ruchu rekombinowanych białek w neuronach. Jak jednak ukazano na Ryc. 4.12, w przeciwieństwie do KIF21bt-GFP, nie wykazano dla KIF3At-GFP ani KIF3Ct-GFP żadnych wyraźnych, pojedynczych punktów, które nadawałyby się do obserwacji. Sądząc po znacznym, równomiernym rozłożeniu sygnału GFP w całej komórce, możliwe jest, że białko to ulegało nadmiernej produkcji, lub też ulegało zlepianiu w większe, niefunkcjonalne struktury. Próby zastosowania mniejszego stężenia plazmidu do transfekcji, skutkowały jedynie mniejszą liczbą podobnie stransfekowanych komórek. Z tego względu w dalszej części, skupiono się na najbardziej znanej roli kinezyn-2 czyli zaangażowaniu w rozwój rzęsek pierwotnych.

5.2.3.1 Badanie wpływu wyciszenia KIF3A/KIF3C na rzęski w starszych neuronach (8-11 DIV)

Podczas planowania eksperymentów, nie wykazano jakoby pomiary rzęsek na modelach 3D uzyskanych z obrazów z mikroskopii konfokalnej, wiązały się z różnicami względem pomiarów płaskich projekcji (Ryc. 4.15). Wynika to najprawdopodobniej ze sposobu w jaki przygotowywano preparaty, w których na skutek działań mechanicznych rzęski ustawione na sztorc mogły w większości ulegać złamaniu. Stąd możliwe jest, że najdłuższe zaobserwowane rzęski, to te które ułożyły się wzdłuż neuronu. Z tego względu jednak, zdecydowano się na pomiary jedynie na płaskich projekcjach maksymalnej intensywności. Decyzja o wyborze warunków hodowli w DIV 8 – 11 (transfekcja – utrwalanie) w pierwszym eksperymencie opisanym w 4.2.3.1, wynikała z chęci zachowania ciągłości z drugorzędowym badaniem przesiewowym. Jednocześnie zdecydowano się na włączenie również wariantów z shTSC1 ze względu na interesujące różnice we wpływie hamarytyny oraz tuberyny na rzęski pierwotne, jak opisano w punkcie 1.3.8.

Jak zaobserwowano, neurony transfekowane jedynie shTSC1, jak i shTSC2 cechowały się większą, średnią powierzchnią ciała komórki niż kontrola (Ktrl) (o około 14%) jednakże efekty te nie były statystycznie istotne. Możliwe jednak, że wynikało to z dużego rozrzutu danych, co widać na

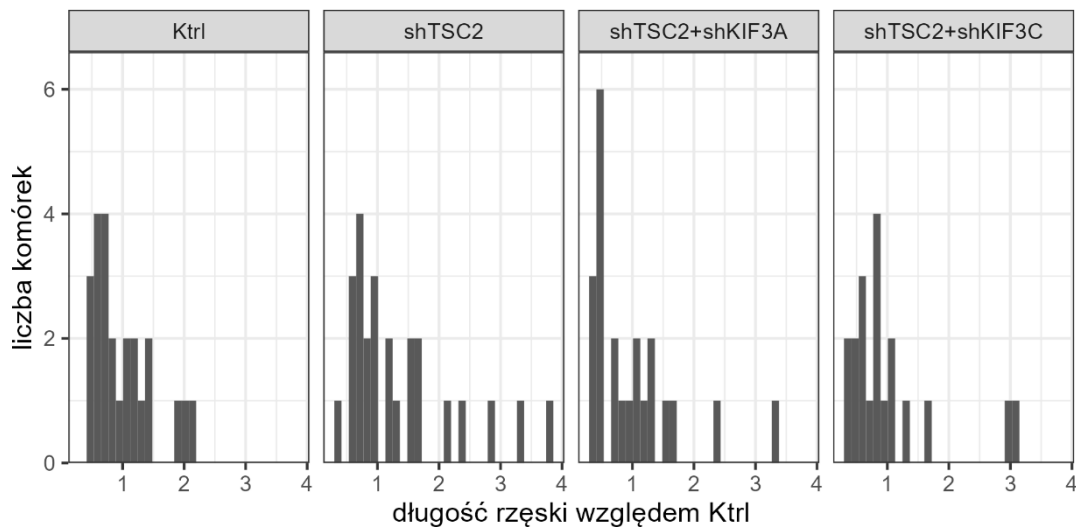
podstawie punktów reprezentujących pojedyncze pomiary (Ryc. 4.16 B), oraz ze stosunkowo słabej jakości hodowli neuronalnych, uzyskanych w momencie prowadzenia eksperymentu. Z tych samych powodów może wynikać obserwacja, że spadek powierzchni komórki względem komórek transfekowanych shTSC1/shTSC2 przy jednoczesnym wyciszaniu kinezyn był istotny tylko dla KIF3A. Interesująca jest obserwacja, że o ile sam fakt wyciszania TSC1/TSC2 w tych warunkach hodowli, wydaje się nie mieć znaczącego wpływ na długość rzęsek, to wyciszanie badanych kinezyn powoduje już pewne zwiększenie ich średniej długości. Szczególnie wyraźnie widać to dla shTSC1+shKIF3A oraz Ktrl+shKIF3C (Ryc. 4.16. C). Jest to nieintuicyjne, biorąc pod uwagę że zarówno KIF3A jak i KIF3C są kinezynami kluczowymi dla transportu rzęskowego i ich brak jest łączony w literaturze ze spadkiem wzrostu rzęsek. Możliwe jest jednak zupełnie inne wytłumaczenie. Do obliczeń przedstawionych na Ryc. 4.16 C, aby uniknąć wartości „0” wliczanych do średniej, włączano jedynie neurony, u których można było wyróżnić przynajmniej jeden obiekt przypominający rzęskę. Tym samym możliwy byłby scenariusz, w którym neurony o wysokim poziomie ekspresji shRNA przeciwko KIF3A/KIF3C tracą w ciągu badanych 72 godz. rzęskę zupełnie, jeżeli była ona krótka, zaś zachowują, jeżeli była odpowiednio długa by mieć pewną odporność na zaburzenia transportu. Jak pokazuje jednak Ryc. 4.16 D nie wykazano, aby pomiędzy wariantami dochodziło do różnic w liczbie neuronów z rzęską. Przede wszystkim jednak, z badań wyłaniał się obraz niewielkich zmian względem długości rzęsek w badanych warunkach, co powiązано z zaawansowanym stadium rozwoju komórek. Prawdopodobne jest, że rzęska jako organelum powstające od nowa po podziale komórkowym, w przypadku niedzielących się komórek jak neurony, w ósmym dniu hodowli jest w małym stopniu podatne na zmiany związane z zastosowanym shRNA (Lepanto, Badano, i Zolessi 2016).

5.2.3.2 Badanie wpływu wyciszania KIF3A/KIF3C na rzęski w młodych neuronach (0-4 DIV)

W celu zbadania rzęsek u jak najmłodszych neuronów, zdecydowano się na transdukcję świeżo wyizolowanych komórek korowych specjalnie do tego celu przygotowanymi wektorami lentiwirusowymi (punkt 4.2.3.2). W przypadku tego modelu, po 4 dniach hodowli wykazano statystycznie istotny wzrost powierzchni ciała komórki w komórkach transdukowanych wektorem kodującym shTSC2, który nie wystąpił, jeżeli komórki dodatkowo transdukowano wirusami shKIF3A lub shKIF3C (Ryc. 4.18). Jest to zgodne z wynikami otrzymanymi w drugorzędowym badaniu przesiewowym (Ryc. 4.9) pomimo zastosowania innego modelu oraz sposobu wprowadzania shRNA do komórek (neurony korowe zamiast hipokampalnych oraz wektory lentiwirusowe zamiast transfekcji lipofektaminą). W przeciwieństwie do eksperymentu prowadzonego w 8 – 11 DIV ukazanego na Ryc. 4.16, w młodszych neuronach dało się zauważyć znaczny wzrost średniej długości rzęski na skutek wyciszenia *Tsc2* względem kontroli (Ryc. 4.18 C), nie okazał się on jednak statystycznie istotny. Brak istotności jednak, wynika najpewniej jednak z faktu, że największa grupa komórek we wszystkich grupach posiada rzęskę w przedziale 1 – 2 długości średniej wartości kontroli. Warto zauważyć jednak,

że jedyne w wariantach transdukowanych wektorem lentiwirusowym kodującym shTSC2 zanotowano rzęski o wartości ponad 2 średnich długości kontroli (Ryc. 4.18 B, dodatkowo zilustrowane na Ryc. 5.1). Co istotne, podobnie jak w przypadku powierzchni komórki, jednoczesna transdukcja wraz z shTSC2 wektorami lentiwirusowymi shKIF3A, jak i shKIF3C, zbliżała długość rzęsek do tych zaobserwowanych u kontroli. Co więcej, u komórek posiadających przynajmniej jedną rzęskę, wzrost długości rzęski korelował z wzrostem powierzchni ciała komórki (Ryc. 4.18 E). Tym samym, prawdopodobna wydaje się hipoteza jakoby zastosowanie shRNA przeciwko *Kif3a* oraz *Kif3c* skutkowało zatrzymaniem wzrostu rzęski w neuronach o obniżonej ekspresji *Tsc2*, a w konsekwencji również zatrzymaniem wzrostu całej komórki. W literaturze można znaleźć doniesienia o związku pomiędzy zaburzeniem rozwoju rzęsek na skutek niedoboru kinezyn, a rozmiarem komórki, na ogół donoszą one jednak o zwiększeniu rozmiaru komórek, w przeciwieństwie do zaobserwowanego spadku. Kluczowy może być tu jednak fakt, że wspomniane badania odnoszą się do całkowitego usunięcia aktywności KIF3A (Boehlke i in. 2010a; Snedeker i in. 2017), podczas gdy zastosowane w eksperymencie shRNA cechowało się znacznym (60 – 80 %), ale nie całkowitym spadkiem ekspresji *Kif3a*, jak i *Kif3c* (Ryc. 4.17). Możliwe zatem, że zaburzenia transportu wewnątrz-rzęskowego na skutek zmniejszenia dostępnych KIF3A oraz KIF3C skutkują zupełnie innym efektem na rozmiar komórki niż ich całkowity brak.

Pozostaje pytanie, dlaczego korelację tę zaobserwowano jedynie w młodszych neuronach, podczas gdy spadek rozmiaru ciała komórki na skutek użycia shKIF3A/shKIF3C został zauważony w pierwszo i drugorzędowych badaniach przesiewowych wykonanych w odpowiednio 8 – 13, oraz 8 - 11 DIV (Ryc. 4.4 oraz Ryc. 4.9). Może to wynikać po pierwsze z faktu, że jak wspomniano w punkcie 5.2.3.1, w starszych neuronach rzęska była już rozwinięta w momencie transfekcji i nawet jeżeli dochodziło do zmian lub zaburzeń w IFT, nie objawiały się one w jej długości. Po drugie zaś, na Ryc. 4.16 D sam wzrost ciała komórki na skutek transfekcji shTSC2 względem kontroli był niższy niż na Ryc. 4.9, możliwe zatem, że w tym eksperymencie skuteczność shRNA była słaba, prawdopodobnie ze względu na gorszą jakość neuronów pochodzących z hodowli. Aby rozwiązać tego rodzaju wątpliwości cenne byłoby powtórne przeprowadzenie eksperymentu w neuronach 8 – 11 DIV z immunobarwieniem na P-S6, aby zbadać powierzchnię i długość rzęsek jedynie u neuronów, u których z pewnością doszło do aktywacji mTORC1. Interesujące byłoby również zbadanie rzęsek w neuronach, u których wzrost ciała komórki wynosił ponad 60% na skutek transfekcji PI3K jak w pierwszorzędowym badaniu przesiewowym (Ryc. 4.4). Pewną dozę informacji mogłyby również przynieść eksperymenty z obniżeniem stężenia substancji odżywczych w pożywce neuronalnej (głodzenie). Takie warunki nie tylko zwiększyłyby kontrast pomiędzy komórkami u których doszło do nadmiernej aktywacji mTOR a kontrolą, ale dodatkowo doprowadziły do stymulacji autofagii, która promuje powstawanie rzęsek. Jednakże próby wykonania eksperymentów z głodzeniem przeprowadzone przy okazji pisania pracy, zakończyły się porażką na skutek wysokiej śmiertelności hodowanych neuronów (nieopublikowane).



Ryc. 5.1 Histogram przedstawiający liczbę komórek w danym przedziale długość rzęski dla każdego wariantu osobno. Długość rzęski wyrażona jako iloczyn średniej długości rzęski w Ktrl. Opracowane na podstawie danych użytych do stworzenia Ryc. 4.18.

5.2.4. Wybrane funkcje KIF3A/KIF3C w modelu TSC w komórkach nieneuronalnych

Opisane w poprzednich rozdziałach trudności, szczególnie te związane z obrazowaniem przyżyciowym oraz eksperymentami związanymi z głodzeniem, zdecydowały o włączeniu do rozprawy drugiego modelu – komórek nieneuronalnych (punkt 4.3). W pierwszym kroku, potwierdzono przy pomocy techniki Western blot znaczny spadek produkcji tuberyny w liniach transdukowanych wektorem lentiwirusowym kodującym shTSC2 względem linii kontrolnych (Ryc. 4.19 C). Jednocześnie w pilotażowym eksperymencie zaobserwowano, że hodowane w pożywce o obniżonej zawartości surowicy, komórki linii shTSC2 cechują się większą powierzchnią niż komórki kontrolne (Ryc. 4.19). Do wyciszenia ekspresji kinezyn użyto wktorów lentiwirusowych, które zostały zwalidowane podczas przeprowadzania eksperymentu opisanego w punkcie 4.2.3.2. Wykonano jednak dodatkowe, kontrolne badanie techniką RT-PCR, które potwierdziło spadek mRNA genów kinezyn w liniach transdukowanych shKIF3A/shKIF3C względem linii kontrolnej pLKO-pULTRA.Chili (Ryc. 4.20 B). Podobnie jak w przypadku Ryc. 4.11 nie wykazano jednocześnie, aby sam fakt wyciszenia *Tsc2* wpływał na ekspresję kinezyn (Ryc. 4.20 B). Uzyskane linie Rat2: pLKO-pULTRA-Chili, pLKO-shKIF3A, pLKO-shKIF3C, shTSC2-pULTRA-Chili, shTSC2-shKIF3A oraz shTSC2-shKIF3C posłużyły do przeprowadzenia eksperymentów, których wyniki poddano dyskusji w kolejnych podrozdziałach.

5.2.4.1 Morfologia, tempo wzrostu i długość rzęsek komórek uzyskanych linii

Podczas hodowli dało się zauważyć, że komórki uzyskanych linii nie rosły w identycznym tempie. W przypadku pomiaru stopnia zapełniania dostępnej przestrzeni na naczyniu hodowlanym, linie pLKO-shKIF3A oraz shTSC-shKIF3C, wyraźnie ostawały od pozostałych (średnio 35 % zajętej powierzchni po dwóch dniach w stosunku do średnio około 85 % dla pozostałych linii), cechując się znacznie wolniejszym wzrostem (Ryc. 4.21 A oraz B). Również po przeliczeniu liczby komórek na pole widzenia, najniższy wynik w ostatnim punkcie czasowym, czyli po 48 godz. hodowli, odnotowano dla linii pLKO-shKIF3A (średnio 15 komórek wobec średniej 22,7 dla pozostałych linii), co sugeruje, że linia ta cechowała się najwolniej dzielącymi się, najmniejszymi komórkami (Ryc. 4.21 C oraz D). Co ciekawe, u komórek linii shTSC2-shKIF3A można było zauważyć szybkie tempo zajmowania pola widzenia (83 % po 48 godz.), przy jednocześnie stosunkowo małej liczbie komórek (średnio 18,5 na pole widzenia), wskazując, że komórki tej linii mogą cechować się wyjątkowo dużym rozmiarem przy jednocześnie wolniejszym tempie podziału (Ryc.4.21). Istotnie, jak pokazuje Ryc. 4.23 A, bezpośrednie pomiary komórek należących do uzyskanych linii wykazały, że linia shTSC2-shKIF3A cechowała się większym rozmiarem komórki, zarówno w warunkach bazowych, jak i głodzenia. Najmniejszą powierzchnię zaobserwowano u linii shTSC2-shKIF3C, co było szczególnie widoczne w warunkach głodzenia (Ryc. 4.23 A). Nie wykazano jednocześnie, aby komórki linii shTSC2-pULTRA.Chili miały większą powierzchnię niż komórki linii pLKO-pULTRA.Chili.

Bezpośrednie pomiary pierwotnych rzęsek na projekcjach maksymalnej intensywności, powstałych ze zdjęć komórek badanych linii, nie wykazały różnic w długości rzęski pomiędzy liniami. (Ryc. 4.23 B). Nie zaobserwowano również, aby najdłuższe rzęski występowały jedynie u komórek transdukowanych wektorem lentiwirusowym kodującym shTSC2, jak miało to miejsce w przypadku neuronów (Ryc. 4.18). Podobnie jednak jak w eksperymentach na neuronach (punkty 4.2.3.1 oraz 4.2.3.2), do pomiarów wliczano jedynie komórki, u których stwierdzono przynajmniej jeden obiekt rozpoznany jako rzęska. Tymczasem pomiary stosunku komórek posiadających rzęskę do nieposiadających, ujawniły znaczne różnice między liniami, nasilone jeszcze przez warunki głodzenia (Ryc. 4.23 C). Jednym z możliwych wyjaśnień jest, że populacja komórek uzyskanych linii jest heterogeniczna, cechując się różnym stopniem wyciszenia badanych genów. Mogłoby to powodować, że komórki o niskim stopniu ekspresji shRNA przeciwko kinezynom cechowały się obecnością rzęski o typowej długości, podczas gdy u komórek o większym poziomie ekspresji shRNA, dochodziłoby do całkowitej utraty tego organellum. Jednocześnie obserwacja, że stosunek komórek z rzęską gwałtownie wzrasta w linii kontrolnej na skutek głodzenia, jest zgodny z szeroko opisywanym w literaturze zjawiskiem promowania powstawania rzęsek na skutek autofagii (Pampliega i in. 2013; Z. Tang i in. 2013; Yamamoto i Mizushima 2021). W komórkach dzielących się, jest to jeden z mechanizmów odpowiadających za zatrzymanie cyklu komórkowego przy niedostatecznej dostępności substancji odżywczych. W wynikach przedstawionych na Ryc. 4.23 C, interesująca jest natomiast obserwacja, iż u komórek linii shTSC2-pULTRA.Chili liczba komórek z rzęską pozostaje wysoka nawet podczas hodowli ze standardowym stężeniem surowicy, ulegając jeszcze nieznacznemu zwiększeniu na skutek

głodzenia. W przeciwieństwie do zmian omówionych dla linii kontrolnej, w linii pLKO-shTSC2 wysoka liczba komórek z rzęską najprawdopodobniej nie jest spowodowana procesem autofagii, jako że aktywacja mTOR na skutek wyciszenia *Tsc2* powinna prowadzić do osłabienia tego procesu (punkt 1.3.3). Jednym z możliwych wyjaśnień jest wspomniany już mechanizm obniżania aktywności mTOR przez *Lkb1* na skutek mechanicznego drażnienia rzęski (Boehlke i in. 2010a). Istnieje możliwość, że większa liczba komórek z rzęską jest skutkiem działania sprzężenia zwrotnego mającego ograniczyć aktywność ścieżki mTOR nadmiernie aktywowanej na skutek wyciszenia *Tsc2*. Nie jest jasne, jaki dokładnie mechanizm mógłby za to odpowiadać. Jednakże argumentem na korzyść tej hipotezy, jest obserwacja, że różnica powierzchni komórek pomiędzy pLKO-shTSC2 a pLKO-pULTRA.Chili jest niewielka, podczas gdy u komórek linii shTSC2-shKIF3A następuje zarówno spadek liczby komórek z rzęską, jak i wzrost powierzchni komórki zarówno względem pLKO-pULTRA.Chili, jak i shTSC2-pULTRA.Chili. Efekt ten jest najbardziej widoczny u komórek hodowanych w standardowej pożywce (10 % FBS). Wydaje się on występować również u komórek hodowanych w pożywce z obniżonym stężeniem surowicy, jednak dużo słabiej. Hipotezę tę podważa jednak obserwacja, że w przypadku shTSC2-shKIF3C, zaobserwowano jedynie spadek liczby komórek z rzęską, jednak już nie wzrost powierzchni. Możliwe jednak, że niedobór KIF3C ma inne konsekwencje na wzrost komórki, szczególnie biorąc pod uwagę, że jak ukazano na Ryc. 4.21 B, shTSC2-shKIF3C pozostawała najslabiej rosnącą linią spośród wariantów o obniżonej ekspresji *Tsc2*.

5.2.4.2 Analiza ruchu pęcherzyków LAMP1-GFP pozytywnych w komórkach uzyskanych linii.

W danych literaturowych można znaleźć przesłanki, jakoby KIF3A oraz KIF3C mogły być motorami odpowiedzialnymi za transport lizosomów, w kierunku błon komórki, a tym samym zaangażowane w proces autofagii (Brown i in. 2005; S. Wang i in. 2015). Byłoby to interesujące w kontekście badanego zagadnienia, jako że autofagia jest silnie powiązana z aktywnością mTOR, oraz jest procesem istotnym w TSC. Z tego powodu postanowiono zbadać, czy w komórkach uzyskanych linii będą występowały różnice w ruchu pęcherzyków wyznakowanych poprzez będące lizosomalnym markerem białko LAMP1 sprzężone z metką GFP (punkt 4.3.4). Podobny eksperyment opublikowano już wcześniej w Tempes i wsp. dla komórek traktowanych rapamycyną, nie wykazując jednak różnic względem kontroli w postaci DMSO (Tempes i in. 2024). Ponieważ produkcja rekombinowanego białka LAMP1-GFP w elektroporowanych komórkach okazała się być bardzo wysoka, komórki obrazowano już po 20 godz., aby uniknąć nadmiernego tła związanego ze zbyt dużym poziomem sygnału GFP. Jednocześnie, w pobliżu środka obserwowanych komórek, naokoło jądra, znajdowało się duże skupisko GFP-pozytywnych białek (Ryc. 4.24). Obserwacja ta jest zgodna z danymi literaturowymi wskazującymi na gromadzenie się lizosomów w pobliżu centrosomu, dokąd dostarczane są przez dyneinę (Falcón-Pérez i in. 2005; Pu i in. 2016). Ze względu jednak na duże nasilenie sygnału GFP, niemożliwe było rozróżnienie pojedynczych obiektów w tym rejonie (Ryc. 4.24, Filmy 9-13). Z tego

względu, zdecydowano się na obserwacje obiektów jedynie na zewnętrznym obszarze komórki, nazywanym peryferiami.

Jak przedstawiono na Ryc. 4.25 nie wykazano, aby w dystansie pokonanym przez obiekty, efektywności ani prędkości ruchu w kierunku błon komórki występowały istotne statystycznie różnice pomiędzy liniami. Jednocześnie zmiana prędkości, dystansu lub efektywności ruchu w kierunku przeciwnym (do centrum komórki) mogłaby oznaczać, że przy niedoborze KIF3A i KIF3C, motory transportujące pęcherzyki w kierunku „-” końca mikrotubul (min. dyneina) zyskują na procesywności na skutek braku konkurujących białek w procesie „przeciągania liny”. Jednak podobna analiza, tym razem w kierunku centrum komórki, również nie wykazała różnic w żadnym z badanych parametrów (Ryc. 4.26). Jak opisano w punkcie 4.3.4, w trakcie analizy filmów poklatkowych (przykłady na Filmach 9-13), zaobserwowano również pewne skupiska sygnału GFP na peryferiach komórki. Pomiarzy średniej jasności sygnału fluorescencyjnego na obrzeżach komórek wykazały pewien spadek sygnału dla linii o obniżonej ekspresji *Kif3a* (pLKO-KIF3A oraz shTSC2-shKIF3A) względem pozostałych. Mogłoby to świadczyć o mniejszej liczbie lizosomów dostarczanych na peryferia komórki ze względu na brak transportującego je KIF3A. Wspomniane różnice nie okazały się jednak istotne statystycznie. Co więcej nie wykazano żadnych różnic pomiędzy pLKO-pULTRA.Chili, a shTSC2-pULTRA.Chili, co sprawiało, że nie są to interesujące wyniki w kontekście badanego zagadnienia (Ryc. 4.27).

5.3 Podsumowanie dyskusji

W niniejszej pracy wykazano potencjalnie istotną rolę białek motorycznych należących do rodziny kinezyn w nadmiernym wzroście ciała komórki na skutek hiperaktywacji mTOR. W przypadku silnego stymulatora jakim była aktywna forma PI3-kinazy, aż 35 z 45 sprawdzonych białek skutkowało obniżeniem powierzchni ciała komórki. W neuronalnym modelu TSC, zaprojektowanym jako wyciszenie ekspresji *Tsc2*, jednoczesne obniżenie poziomu: KIF3A, KIF3C, KIF21B oraz KIF26B skutkowało zatrzymaniem nadmiernego wzrostu neuronu. Próby znalezienia mechanizmu KIF21B poprzez badanie jego ról w transporcie dendrytycznym oraz regulowaniu dynamiki mikrotubul nie dały konkluzywnych rezultatów. W przypadku działających zazwyczaj jako tandem KIF3A/KIF3C, wystąpiły pewne przesłanki mogące łączyć ich rolę w transporcie wewnątrz rzęskowym z obserwowanym wzrostem neuronu w modelu TSC. Dowiedzenie tej zależności wymaga jednak dalszych badań.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie wyników przedstawionych w rozprawie, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Obniżenie poziomu kinezyn: KIF21A, KIF5C, KIF11, KIF12, KIF13B, KIF14, KIF15, KIF16B, KIF18A, KIF19, KIF20A, KIF21B, KIF22, KIF26B, KIF27, KIF2A, KIF2B, KIF2C, KIF3A, KIF3B, KIF3C, KIF5A, KIF9, KIFC1, KIFC2 oraz KIFC3, skutkuje zatrzymaniem nadmiernego wzrostu komórki nerwowej spowodowanego obecnością konstytutywnie aktywnej formy PI3K.
2. Obniżenie poziomu kinezyn: KIF3A, KIF3C, KIF21B oraz KIF26B skutkuje zatrzymaniem nadmiernego wzrostu neuronu w modelu wyciszenia *Tsc2*.
3. Po transfekcji u młodych (0 DIV), ale nie starszych (8 DIV) neuronów shRNA przeciwko *Tsc2* oraz *Kif3a* lub *Kif3c* występuje korelacja między długością rzęski a powierzchnią komórki.
4. Wyciszenie *Tsc2* skutkuje zwiększeniem liczby komórek posiadających rzęskę w linii pochodzącej od fibroblastów, ale nie w komórkach neuronalnych.
5. Obniżenie poziomu KIF3A oraz KIF3C zmniejsza liczbę komórek z rzęską w warunkach głodzenia w liniach komórek nieneuronalnych, zarówno w komórkach kontrolnych, jak i tych o obniżonej ekspresji *Tsc2*.
6. Ograniczenie ekspresji *Tsc2*, *Kif3a* ani *Kif3c*, nie wpływa istotnie na ruch pęcherzyków wyznakowanych LAMP1-GFP w komórkach nieneuronalnych, jednakże obniżenie poziomu *Kif3a* powodowało zmniejszenie jasności skupisk na peryferiach komórki.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Akhmanova, Anna, i Michel O. Steinmetz. 2008. „Tracking the Ends: A Dynamic Protein Network Controls the Fate of Microtubule Tips”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (4): 309–22. <https://doi.org/10.1038/nrm2369>.
2. Allen, Nicola J., i David A. Lyons. 2018. „Glia as Architects of Central Nervous System Formation and Function”. *Science (New York, N.Y.)* 362 (6411): 181–85. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>.
3. Alushin, Gregory M., Gabriel C. Lander, Elizabeth H. Kellogg, Rui Zhang, David Baker, i Eva Nogales. 2014. „High-Resolution Microtubule Structures Reveal the Structural Transitions in A β -Tubulin upon GTP Hydrolysis”. *Cell* 157 (5): 1117–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.053>.
4. Andersen, Søren S. L., i Guo-qiang Bi. 2000. „Axon Formation: A Molecular Model for the Generation of Neuronal Polarity”. *BioEssays* 22 (2): 172–79. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200002\)22:2<172::AID-BIES8>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<172::AID-BIES8>3.0.CO;2-Q).
5. Anderson, Charles T., i Tim Stearns. 2009. „Centriole Age Underlies Asynchronous Primary Cilium Growth in Mammalian Cells”. *Current Biology: CB* 19 (17): 1498–1502. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.034>.
6. Angliker, Nico, i Markus A Rüegg. 2013. „In vivo evidence for mTORC2-mediated actin cytoskeleton rearrangement in neurons”. *BioArchitecture* 3 (4): 113–18. <https://doi.org/10.4161/bioa.26497>.
7. Anvarian, Zeinab, Kirk Mykytyn, Saikat Mukhopadhyay, Lotte Bang Pedersen, i Søren Tvorup Christensen. 2019. „Cellular Signalling by Primary Cilia in Development, Organ Function and Disease”. *Nature Reviews. Nephrology* 15 (4): 199–219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>.
8. Armour, Eric A., Robert P. Carson, i Kevin C. Ess. 2012. „Cystogenesis and elongated primary cilia in Tsc1-deficient distal convoluted tubules”. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 303 (4): F584–92. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00141.2012>.
9. Asselin, Laure, José Rivera Alvarez, Solveig Heide, Camille S. Bonnet, Peggy Tilly, Hélène Vitet, Chantal Weber, i in. 2020a. „Mutations in the KIF21B Kinesin Gene Cause Neurodevelopmental Disorders through Imbalanced Canonical Motor Activity”. *Nature Communications* 11 (1): 2441. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16294-6>.
10. Atherton, Joseph, Irene Farabella, I-Mei Yu, Steven S Rosenfeld, Anne Houdusse, Maya Topf, i Carolyn A Moores. 2014. „Conserved mechanisms of microtubule-stimulated ADP release, ATP binding, and force generation in transport kinesins”. Zredagowane przez Anthony A Hyman. *eLife* 3 (wrzesień):e03680. <https://doi.org/10.7554/eLife.03680>.

11. Avasthi, Prachee, i Wallace F. Marshall. 2012. „Stages of Ciliogenesis and Regulation of Ciliary Length”. *Differentiation* 83 (2): S30–42. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.015>.
12. Ayloo, Swathi, Pedro Guedes-Dias, Amy E. Ghiretti, i Erika L. F. Holzbaur. 2017. „Dynein Efficiently Navigates the Dendritic Cytoskeleton to Drive the Retrograde Trafficking of BDNF/TrkB Signaling Endosomes”. *Molecular Biology of the Cell* 28 (19): 2543–54. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0068>.
13. Baas, Peter W., i Shen Lin. 2011. „Hooks and Comets: The Story of Microtubule Polarity Orientation in the Neuron”. *Developmental Neurobiology* 71 (6): 403–18. <https://doi.org/10.1002/dneu.20818>.
14. Baffi, Timothy R., Gema Lordén, Jacob M. Wozniak, Andreas Feichtner, Wayland Yeung, Alexandr P. Kornev, Charles C. King, i in. 2021. „mTORC2 Controls PKC and Akt by Phosphorylating a Conserved TOR-Interaction Motif”. *Science signaling* 14 (678): eabe4509. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abe4509>.
15. Basto, Renata, Joyce Lau, Tatiana Vinogradova, Alejandra Gardiol, C. Geoffrey Woods, Alexey Khodjakov, i Jordan W. Raff. 2006. „Flies without Centrioles”. *Cell* 125 (7): 1375–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.025>.
16. Barbari, Nicolas F., Andrew D. Johnson, Jacqueline S. Lewis, Candice C. Askwith, i Kirk Mykytyn. 2008. „Identification of Ciliary Localization Sequences within the Third Intracellular Loop of G Protein-coupled Receptors”. *Molecular Biology of the Cell* 19 (4): 1540–47. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0942>.
17. Bieling, Peter, Ivo A. Telley, i Thomas Surrey. 2010. „A Minimal Midzone Protein Module Controls Formation and Length of Antiparallel Microtubule Overlaps”. *Cell* 142 (3): 420–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.033>.
18. Bisbal, Mariano, José Wojnacki, Diego Peretti, Andrea Ropolo, Juliana Sesma, Ignacio Jausoro, i Alfredo Cáceres. 2009. „KIF4 Mediates Anterograde Translocation and Positioning of Ribosomal Constituents to Axons”. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (14): 9489–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808586200>.
19. Blangy, A., H. A. Lane, P. d’Hérin, M. Harper, M. Kress, i E. A. Nigg. 1995. „Phosphorylation by P34cdc2 Regulates Spindle Association of Human Eg5, a Kinesin-Related Motor Essential for Bipolar Spindle Formation in Vivo”. *Cell* 83 (7): 1159–69. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90142-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90142-6).
20. Blazejczyk, Magdalena, Matylda Macias, Michal Korostynski, Marcelina Firkowska, Marcin Piechota, Agnieszka Skalecka, Aleksandra Tempes, i in. 2017. „Kainic Acid Induces mTORC1-Dependent Expression of Elmo1 in Hippocampal Neurons”. *Molecular Neurobiology* 54 (4): 2562–78. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9821-6>.

21. Boehlke, Christopher, Fruzsina Kotsis, Vishal Patel, Simone Braeg, Henriette Voelker, Saskia Bredt, Theresa Beyer, i in. 2010a. „Primary Cilia Regulate mTORC1 Activity and Cell Size through Lkb1”. *Nature Cell Biology* 12 (11): 1115–22. <https://doi.org/10.1038/ncb2117>.
22. Boland, Barry, Asok Kumar, Sooyeon Lee, Frances M. Platt, Jerzy Wegiel, W. Haung Yu, i Ralph A. Nixon. 2008. „Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer’s Disease”. *The Journal of Neuroscience* 28 (27): 6926. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0800-08.2008>.
23. Brachet, Anna, Argentina Lario, Alba Fernández-Rodrigo, Frank F. Heisler, Yolanda Gutiérrez, Clara Lobo, Matthias Kneussel, i José A. Esteban. 2021. „A Kinesin 1-Protrudin Complex Mediates AMPA Receptor Synaptic Removal during Long-Term Depression”. *Cell Reports* 36 (5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109499>.
24. Bradke, F., i C. G. Dotti. 2000. „Establishment of Neuronal Polarity: Lessons from Cultured Hippocampal Neurons”. *Current Opinion in Neurobiology* 10 (5): 574–81. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00124-0](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00124-0).
25. Bringmann, Henrik, Georgios Skiniotis, Annina Spilker, Stefanie Kandels-Lewis, Isabelle Vernos, i Thomas Surrey. 2004. „A Kinesin-like Motor Inhibits Microtubule Dynamic Instability”. *Science* 303 (5663): 1519–22. <https://doi.org/10.1126/science.1094838>.
26. Brown, Christa L., Kerstin C. Maier, Tobias Stauber, Laura M. Ginkel, Linda Wordeman, Isabelle Vernos, i Trina A. Schroer. 2005. „Kinesin-2 Is a Motor for Late Endosomes and Lysosomes”. *Traffic* 6 (12): 1114–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00347.x>.
27. Cai, Dawen, Adam D. Hoppe, Joel A. Swanson, i Kristen J. Verhey. 2007. „Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells”. *The Journal of Cell Biology* 176 (1): 51–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605097>.
28. Cai, Dawen, Dyke P. McEwen, Jeffery R. Martens, Edgar Meyhofer, i Kristen J. Verhey. 2009. „Single Molecule Imaging Reveals Differences in Microtubule Track Selection Between Kinesin Motors”. Zredagowane przez Manfred Schliwa. *PLoS Biology* 7 (10): e1000216. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000216>.
29. Cai, Qian, Ping-Yue Pan, i Zu-Hang Sheng. 2007. „Syntabulin–Kinesin-1 Family Member 5B-Mediated Axonal Transport Contributes to Activity-Dependent Presynaptic Assembly”. *The Journal of Neuroscience* 27 (27): 7284–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0731-07.2007>.
30. Campbell, D. S., i C. E. Holt. 2001. „Chemotropic Responses of Retinal Growth Cones Mediated by Rapid Local Protein Synthesis and Degradation”. *Neuron* 32 (6): 1013–26. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00551-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00551-7).
31. Campellone, Kenneth G., i Matthew D. Welch. 2010. „A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly”. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (4): 237–51. <https://doi.org/10.1038/nrm2867>.

32. Carpenter, Brandon S., Renee L. Barry, Kristen J. Verhey, i Benjamin L. Allen. 2015. „The Heterotrimeric Kinesin-2 Complex Interacts with and Regulates GLI Protein Function”. *Journal of Cell Science* 128 (5): 1034–50. <https://doi.org/10.1242/jcs.162552>.
33. Chakravarthy, Balu, Chantal Gaudet, Michel Ménard, Leslie Brown, Trevor Atkinson, Frank M. LaFerla, Shingo Ito, Ubaldo Armato, Ilaria Dal Prà, i James Whitfield. 2012. „Reduction of the immunostainable length of the hippocampal dentate granule cells’ primary cilia in 3xAD-transgenic mice producing human A β 1-42 and tau”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 427 (1): 218–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.056>.
34. Chauvin, C., V. Koka, A. Nouschi, V. Mieulet, C. Hoareau-Aveilla, A. Dreazen, N. Cagnard, i in. 2014. „Ribosomal Protein S6 Kinase Activity Controls the Ribosome Biogenesis Transcriptional Program”. *Oncogene* 33 (4): 474–83. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.606>.
35. Chaya, Taro, Yoshihiro Omori, Ryusuke Kuwahara, i Takahisa Furukawa. 2014. „ICK Is Essential for Cell Type-Specific Ciliogenesis and the Regulation of Ciliary Transport”. *The EMBO Journal* 33 (11): 1227–42. <https://doi.org/10.1002/embj.201488175>.
36. Chen, Chien-Hung, Tattym Shaikenov, Timothy R. Peterson, Rakhan Aimbetov, Amangeldy K. Bissenbaev, Szu-Wei Lee, Juan Wu, Hui-Kuan Lin, i Dos D. Sarbassov. 2011. „ER Stress Inhibits mTORC2 and Akt Signaling Through GSK-3 β -Mediated Phosphorylation of Rictor”. *Science Signaling* 4 (161): ra10–ra10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001731>.
37. Chen, Chuan, Jinghua Hu, i Kun Ling. 2022. „The Role of Primary Cilia-Associated Phosphoinositide Signaling in Development”. *Journal of Developmental Biology* 10 (4): 51. <https://doi.org/10.3390/jdb10040051>.
38. Chen, Ming, Ziheng Chen, Yueying Wang, Zheng Tan, Chongzhuo Zhu, Yanjun Li, Zhe Han, i in. 2016. „Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy”. *Autophagy* 12 (4): 689–702. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1151580>.
39. Chen, Yanmin, i Zu-Hang Sheng. 2013. „Kinesin-1–syntaphilin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport”. *The Journal of Cell Biology* 202 (2): 351–64. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302040>.
40. Chidambaram, Saravana Babu, A. G. Rathipriya, Srinivasa Rao Bolla, Abid Bhat, Bipul Ray, Arehally Marappa Mahalakshmi, Thamilarasan Manivasagam, i in. 2019. „Dendritic spines: Revisiting the physiological role”. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 92 (czerwiec):161–93. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>.
41. Choi, Jae H., Paula G. Bertram, Ryan Drenan, John Carvalho, Heather H. Zhou, i X.F. Steven Zheng. 2002. „The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase”. *EMBO Reports* 3 (10): 988–94. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf197>.
42. Choi, Yong-Jin, Alessia Di Nardo, Ioannis Kramvis, Lynsey Meikle, David J. Kwiatkowski, Mustafa Sahin, i Xi He. 2008. „Tuberous Sclerosis Complex Proteins Control Axon Formation”. *Genes & Development* 22 (18): 2485–95. <https://doi.org/10.1101/gad.1685008>.

43. Chong-Kopera, Huiru, Ken Inoki, Yong Li, Tianqing Zhu, Francesc R. Garcia-Gonzalo, Jose Luis Rosa, i Kun-Liang Guan. 2006. „TSC1 Stabilizes TSC2 by Inhibiting the Interaction between TSC2 and the HERC1 Ubiquitin Ligase*”. *Journal of Biological Chemistry* 281 (13): 8313–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500451200>.
44. Chresta, Christine M., Barry R. Davies, Ian Hickson, Tom Harding, Sabina Cosulich, Susan E. Critchlow, John P. Vincent, i in. 2010. „AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with in Vitro and in Vivo Antitumor Activity”. *Cancer Research* 70 (1): 288–98. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1751>.
45. Chua, Boon Tin, David Gallego-Ortega, Ana Ramirez de Molina, Axel Ullrich, Juan Carlos Lacal, i Julian Downward. 2009. „Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by Choline kinase in breast carcinoma cells”. *Molecular Cancer* 8 (grudzień):131. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-131>.
46. Clancy, Bason E., William M. Behnke-Parks, Johan O. L. Andreasson, Steven S. Rosenfeld, i Steven M. Block. 2011. „A Universal Pathway for Kinesin Stepping”. *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (9): 1020–27. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2104>.
47. Cloëtta, Dimitri, Venus Thomanetz, Constanze Baranek, Regula M. Lustenberger, Shuo Lin, Filippo Oliveri, Suzana Atanasoski, i Markus A. Ruegg. 2013. „Inactivation of mTORC1 in the Developing Brain Causes Microcephaly and Affects Gliogenesis”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (18): 7799–7810. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3294-12.2013>.
48. Cochran, Jared C., Joseph E. Gatial, Tarun M. Kapoor, i Susan P. Gilbert. 2005. „Monastrol Inhibition of the Mitotic Kinesin Eg5”. *The Journal of biological chemistry* 280 (13): 12658–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413140200>.
49. Cooper, Jonathan A. 2013. „Mechanisms of cell migration in the nervous system”. *Journal of Cell Biology* 202 (5): 725–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305021>.
50. Cozzi, Marta, Stefania Magri, Barbara Tedesco, Guglielmo Patelli, Veronica Ferrari, Elena Casarotto, Marta Chierichetti, i in. 2024. „Altered Molecular and Cellular Mechanisms in KIF5A-Associated Neurodegenerative or Neurodevelopmental Disorders”. *Cell Death & Disease* 15 (9): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-07096-5>.
51. Curatolo, P., M. Verdecchia, i R. Bombardieri. 2001. „Vigabatrin for Tuberous Sclerosis Complex”. *Brain & Development* 23 (7): 649–53. [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(01\)00290-x](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(01)00290-x).
52. Curatolo, Paolo, Roberta Bombardieri, i Sergiusz Jozwiak. 2008. „Tuberous Sclerosis”. *Lancet (London, England)* 372 (9639): 657–68. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61279-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61279-9).

53. Daigneault, Bradford W., i David J. Miller. 2021. „Transient Receptor Potential Polycystin-2 (TRPP2) Regulates Motility and Intracellular Calcium of Porcine Sperm”. *Andrologia* 53 (8). <https://doi.org/10.1111/and.14124>.
54. Davis, M. Wayne, i Erik M. Jorgensen. 2022. „ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program”. *Frontiers in Bioinformatics* 2:818619. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619>.
55. DeBerg, Hannah A., Benjamin H. Blehm, Janet Sheung, Andrew R. Thompson, Carol S. Bookwalter, Seyed F. Torabi, Trina A. Schroer, i in. 2013. „Motor Domain Phosphorylation Modulates Kinesin-1 Transport”. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (45): 32612–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515510>.
56. Desai, A., S. Verma, T. J. Mitchison, i C. E. Walczak. 1999. „Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes”. *Cell* 96 (1): 69–78. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80960-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80960-5).
57. Di Nardo, Alessia, i Mustafa Sahin. 2018. „mTOR’ing across the Cortex by Chopping the Cilia”. *Neuron* 99 (1): 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.042>.
58. DiBella, Linda M., Alice Park, i Zhaoxia Sun. 2009. „Zebrafish Tsc1 reveals functional interactions between the cilium and the TOR pathway”. *Human Molecular Genetics* 18 (4): 595–606. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn384>.
59. Dixit, Ram, Jennifer L. Ross, Yale E. Goldman, i Erika L. F. Holzbaur. 2008. „Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau”. *Science (New York, N.Y.)* 319 (5866): 1086–89. <https://doi.org/10.1126/science.1152993>.
60. Dotti, C. G., C. A. Sullivan, i G. A. Banker. 1988. „The Establishment of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 8 (4): 1454–68. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988>.
61. Dotti, Carlos G., i Gary A. Banker. 1987. „Experimentally Induced Alteration in the Polarity of Developing Neurons”. *Nature* 330 (6145): 254–56. <https://doi.org/10.1038/330254a0>.
62. Du, Wanqing, Qian Peter Su, Yang Chen, Yueyao Zhu, Dong Jiang, Yueguang Rong, Senyan Zhang, i in. 2016. „Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation”. *Developmental Cell* 37 (4): 326–36. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.014>.
63. Du, Zhenfang, i Christine M. Lovly. 2018. „Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer”. *Molecular Cancer* 17 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
64. Duda, Przemysław, Shaw M. Akula, Stephen L. Abrams, Linda S. Steelman, Alberto M. Martelli, Lucio Cocco, Stefano Ratti, i in. 2020. „Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer”. *Cells* 9 (5): 1110. <https://doi.org/10.3390/cells9051110>.
65. Endres, Nicholas F., Craig Yoshioka, Ronald A. Milligan, i Ronald D. Vale. 2006. „A Lever-Arm Rotation Drives Motility of the Minus-End-Directed Kinesin Ncd”. *Nature* 439 (7078): 875–78. <https://doi.org/10.1038/nature04320>.

66. Ersahin, Tulin, Nurcan Tuncbag, i Rengul Cetin-Atalay. 2015. „The PI3K/AKT/mTOR Interactive Pathway”. *Molecular BioSystems* 11 (7): 1946–54. <https://doi.org/10.1039/C5MB00101C>.
67. Falcón-Pérez, Juan M., Ramin Nazarian, Chiara Sabatti, i Esteban C. Dell’Angelica. 2005. „Distribution and dynamics of Lamp1-containing endocytic organelles in fibroblasts deficient in BLOC-3”. *Journal of Cell Science* 118 (22): 5243–55. <https://doi.org/10.1242/jcs.02633>.
68. Falnikar, Aditi, Shubha Tole, i Peter W. Baas. 2011. „Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration”. *Molecular Biology of the Cell* 22 (9): 1561–74. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-11-0905>.
69. Feliciano, David M. 2020. „The Neurodevelopmental Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Complex (TSC)”. *Frontiers in Neuroanatomy* 14 (lipiec):39. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00039>.
70. Feliciano, David M., Tiffany V. Lin, Nathaniel W. Hartman, Christopher M. Bartley, Cathryn Kubera, Lawrence Hsieh, Carlos Lafourcade, Rachel A. O’Keefe, i Angelique Bordey. 2013. „A Circuitry and Biochemical Basis for Tuberous Sclerosis Symptoms: From Epilepsy to Neurocognitive Deficits”. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31 (7): 667–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.02.008>.
71. Feliciano, David M., Tiffany Su, Jean Lopez, Jean-Claude Platel, i Angélique Bordey. 2011. „Single-Cell Tsc1 Knockout during Corticogenesis Generates Tuber-like Lesions and Reduces Seizure Threshold in Mice”. *The Journal of Clinical Investigation* 121 (4): 1596. <https://doi.org/10.1172/JCI44909>.
72. Ferguson, Shawn M. 2018. „Axonal Transport and Maturation of Lysosomes”. *Current opinion in neurobiology* 51 (sierpień):45–51. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.020>.
73. Ferrer, Isidre, Pooja Mohan, Helen Chen, Joan Castellsague, Laia Gómez-Baldó, Marga Carmona, Nadia García, i in. 2014. „Tubers from Patients with Tuberous Sclerosis Complex Are Characterized by Changes in Microtubule Biology through ROCK2 Signalling”. *The Journal of Pathology* 233 (3): 247–57. <https://doi.org/10.1002/path.4343>.
74. Fleming, Angeleen, i David C. Rubinsztein. 2020. „Autophagy in Neuronal Development and Plasticity”. *Trends in Neurosciences* 43 (10): 767–79. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.07.003>.
75. Friel, Claire T., i Jonathon Howard. 2011. „The Kinesin-13 MCAK Has an Unconventional ATPase Cycle Adapted for Microtubule Depolymerization”. *The EMBO Journal* 30 (19): 3928–39. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.290>.
76. Fu, Meng-meng, i Erika L. F. Holzbaur. 2014. „Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins”. *Trends in cell biology* 24 (10): 564–74. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.05.002>.

77. Fu, Meng-meng, Jeffrey J. Nirschl, i Erika L. F. Holzbaur. 2014. „LC3 Binding to the Scaffolding Protein JIP1 Regulates Processive Dynein-Driven Transport of Autophagosomes”. *Developmental cell* 29 (5): 577–90. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.015>.
78. Funabashi, Teruki, Yohei Katoh, Saki Michisaka, Masaya Terada, Maho Sugawa, i Kazuhisa Nakayama. 2017. „Ciliary Entry of KIF17 Is Dependent on Its Binding to the IFT-B Complex via IFT46-IFT56 as Well as on Its Nuclear Localization Signal”. *Molecular Biology of the Cell* 28 (5): 624–33. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-09-0648>.
79. Gabriel, Elke, Arpit Wason, Anand Ramani, Li Ming Gooi, Patrick Keller, Andrei Pozniakovsky, Ina Poser, i in. 2016. „CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool”. *The EMBO Journal* 35 (8): 803–19. <https://doi.org/10.15252/embj.201593679>.
80. Gana, Simone, Valentina Serpieri, i Enza Maria Valente. 2022. „Genotype-Phenotype Correlates in Joubert Syndrome: A Review”. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* 190 (1): 72–88. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31963>.
81. Ganchala, Danny, Daniel Pinto-Benito, Elisa Baidés, Isabel Ruiz-Palmero, Daniela Grassi, i Maria Angeles Arevalo. 2023. „Kif21B mediates the effect of estradiol on the morphological plasticity of mouse hippocampal neurons”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 16 (kwiecień):1143024. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1143024>.
82. Ganley, Ian G., Du H. Lam, Junru Wang, Xiaojun Ding, She Chen, i Xuejun Jiang. 2009. „ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy*”. *Journal of Biological Chemistry* 284 (18): 12297–305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>.
83. Gao, Yang, Hui Zheng, Liangdong Li, Changshuai Zhou, Xin Chen, Xiaoyan Zhou, i Yiqun Cao. 2020. „KIF3C Promotes Proliferation, Migration, and Invasion of Glioma Cells by Activating the PI3K/AKT Pathway and Inducing EMT”. Zredagowane przez Wan-Liang Lu. *BioMed Research International* 2020 (październik):1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/6349312>.
84. Gąssowska-Dobrowolska, Magdalena, Grzegorz A. Czapski, Magdalena Cieślík, Karolina Zajdel, Małgorzata Frontczak-Baniewicz, Lidia Babiec, i Agata Adamczyk. 2023. „Microtubule Cytoskeletal Network Alterations in a Transgenic Model of Tuberous Sclerosis Complex: Relevance to Autism Spectrum Disorders”. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (8): 7303. <https://doi.org/10.3390/ijms24087303>.
85. Geng, Anqi, Runxiang Qiu, Kiyohito Murai, Jiancheng Liu, Xiwei Wu, Heying Zhang, Henry Farhoodi, i in. 2018. „KIF20A/MKLP2 Regulates the Division Modes of Neural Progenitor Cells during Cortical Development”. *Nature Communications* 9 (1): 2707. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05152-1>.

86. Ghiretti, Amy E., Edda Thies, Mariko K. Tokito, Tianming Lin, E. Michael Ostap, Matthias Kneussel, i Erika L.F. Holzbaur. 2016. „Activity-Dependent Regulation of Distinct Transport and Cytoskeletal Remodeling Functions of the Dendritic Kinesin KIF21B”. *Neuron* 92 (4): 857–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.003>.
87. Goldstein, L. S. 1991. „The Kinesin Superfamily: Tails of Functional Redundancy”. *Trends in Cell Biology* 1 (4): 93–98. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(91\)90036-9](https://doi.org/10.1016/0962-8924(91)90036-9).
88. Gonçalves, João, i Laurence Pelletier. 2017. „The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate”. *Molecules and Cells* 40 (4): 243–53. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0054>.
89. Goncharova, Elena, Dmitry Goncharov, Daniel Noonan, i Vera P. Krymskaya. 2004. „TSC2 Modulates Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion through TSC1-Binding Domain and the Rac1 GTPase”. *The Journal of Cell Biology* 167 (6): 1171–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405130>.
90. Gong, Yuqi, Lingna Zhou, Liya Ding, Jing Zhao, Zhe Wang, Guoping Ren, Jing Zhang, Zhengrong Mao, i Ren Zhou. 2022. „KIF23 is a potential biomarker of diffuse large B cell lymphoma”. *Medicine* 101 (24): e29312. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000029312>.
91. Griffey, Christopher J., i Ai Yamamoto. 2022. „Macroautophagy in CNS Health and Disease”. *Nature Reviews. Neuroscience* 23 (7): 411–27. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00588-3>.
92. Gromova, Kira V., Mary Muhia, Nicola Rothhammer, Christine E. Gee, Edda Thies, Irina Schaefer, Sabrina Kress, i in. 2018. „Neurobeachin and the Kinesin KIF21B Are Critical for Endocytic Recycling of NMDA Receptors and Regulate Social Behavior”. *Cell Reports* 23 (9): 2705–17. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.112>.
93. Guedes-Dias, Pedro, i Erika L. F. Holzbaur. 2019. „Axonal transport: Driving synaptic function”. *Science (New York, N.Y.)* 366 (6462): eaaw9997. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9997>.
94. Guedes-Dias, Pedro, Jeffrey J. Nirschl, Nohely Abreu, Mariko K. Tokito, Carsten Janke, Maria M. Magiera, i Erika L. F. Holzbaur. 2019. „Kinesin-3 Responds to Local Microtubule Dynamics to Target Synaptic Cargo Delivery to the Presynapse”. *Current Biology: CB* 29 (2): 268-282.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.065>.
95. Guertin, David A., i David M. Sabatini. 2007. „Defining the Role of mTOR in Cancer”. *Cancer Cell* 12 (1): 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.008>.
96. Guertin, David A., Deanna M. Stevens, Carson C. Thoreen, Aurora A. Burds, Nada Y. Kalaany, Jason Moffat, Michael Brown, Kevin J. Fitzgerald, i David M. Sabatini. 2006. „Ablation in Mice of the mTORC Components *raptor*, *riCTOR*, or *mLST8* Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1”. *Developmental Cell* 11 (6): 859–71. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>.

97. Guillaud, Laurent, Christophe Bosc, Anne Fourest-Lieuvin, Eric Denarier, Fabienne Pirollet, Laurence Lafanechère, i Didier Job. 1998. „STOP Proteins are Responsible for the High Degree of Microtubule Stabilization Observed in Neuronal Cells”. *The Journal of Cell Biology* 142 (1): 167–79.
98. Guo, Jiami, James M. Otis, Holden Higginbotham, Chase Monckton, JrGang Cheng, Aravind Asokan, Kirk Mykytyn, Tamara Caspary, Garret D. Stuber, i E. S. Anton. 2017. „Primary Cilia Signaling Shapes the Development of Interneuronal Connectivity”. *Developmental Cell* 42 (3): 286-300.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.010>.
99. Guo, Jiami, James M. Otis, Sarah K. Suciu, Christy Catalano, Lei Xing, Sandii Constable, Dagmar Wachten, i in. 2019. „Primary Cilia Signaling Promotes Axonal Tract Development and Is Disrupted in Joubert Syndrome-Related Disorders Models”. *Developmental Cell* 51 (6): 759-774.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.11.005>.
100. Guo, Xiuhong, Li Zhou, Yuening Wu, i Jingxiang Li. 2022. „KIF11 As a Potential Pan-Cancer Immunological Biomarker Encompassing the Disease Staging, Prognoses, Tumor Microenvironment, and Therapeutic Responses”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2022 (grudzień):2764940. <https://doi.org/10.1155/2022/2764940>.
101. Gutiérrez, Yolanda, Sergio López-García, Argentina Lario, Silvia Gutiérrez-Eisman, Cédric Delevoye, i José A. Esteban. 2021. „KIF13A Drives AMPA Receptor Synaptic Delivery for Long-Term Potentiation via Endosomal Remodeling”. *The Journal of Cell Biology* 220 (6): e202003183. <https://doi.org/10.1083/jcb.202003183>.
102. Gwinn, Dana M., David B. Shackelford, Daniel F. Egan, Maria M. Mihaylova, Annabelle Mery, Debbie S. Vasquez, Benjamin E. Turk, i Reuben J. Shaw. 2008. „AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint”. *Molecular Cell* 30 (2): 214–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>.
103. Han, Boran, Ruobo Zhou, Chenglong Xia, i Xiaowei Zhuang. 2017. „Structural Organization of the Actin-Spectrin-Based Membrane Skeleton in Dendrites and Soma of Neurons”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (32): E6678–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705043114>.
104. Han, Juliette M., i Mustafa Sahin. 2011. „TSC1/TSC2 Signaling in the CNS”. *FEBS letters* 585 (7): 973–80. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.001>.
105. Hancock, William O. 2014. „Bidirectional Cargo Transport: Moving beyond Tug of War”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (9): 615–28. <https://doi.org/10.1038/nrm3853>.
106. Handel, Mary Ann, i John R. Kennedy. 1984. „Situs inversus in homozygous mice without immotile cilia”. *Journal of Heredity* 75 (6): 498. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109995>.

107. Hanlon, David W., Zhaohuai Yang, i Lawrence S. B. Goldstein. 1997. „Characterization of KIFC2, a Neuronal Kinesin Superfamily Member in Mouse”. *Neuron* 18 (3): 439–51. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81244-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81244-1).
108. Hannan, Katherine M., Yves Brandenburger, Anna Jenkins, Kerith Sharkey, Alice Cavanaugh, Lawrence Rothblum, Tom Moss, i in. 2003. „mTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar Transcription Factor UBF”. *Molecular and Cellular Biology* 23 (23): 8862–77. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8862-8877.2003>.
109. Hartman, Tiffiney R., Dongyan Liu, Jack T. Zilfou, Victoria Robb, Tasha Morrison, Terry Watnick, i Elizabeth P. Henske. 2009. „The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway”. *Human Molecular Genetics* 18 (1): 151–63. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn325>.
110. He, Liu, Robbelien Kooistra, Ravi Das, Ellen Oudejans, Eric van Leen, Johannes Ziegler, Sybren Portegies, i in. b.d. „Cortical anchoring of the microtubule cytoskeleton is essential for neuron polarity”. *eLife* 9:e55111. <https://doi.org/10.7554/eLife.55111>.
111. He, Mu, Radhika Subramanian, Fiona Bangs, Tatiana Omelchenko, Karel F. Liem, Tarun M. Kapoor, i Kathryn V. Anderson. 2014. „The Kinesin-4 Protein Kif7 Regulates Mammalian Hedgehog Signalling by Organizing the Cilium Tip Compartment”. *Nature Cell Biology* 16 (7): 663–72. <https://doi.org/10.1038/ncb2988>.
112. Heinrich, J., C. Proepper, T. Schmidt, L. Linta, S. Liebau, i T. M. Boeckers. 2012. „The Postsynaptic Density Protein Abelson Interactor Protein 1 Interacts with the Motor Protein Kinesin Family Member 26B in Hippocampal Neurons”. *Neuroscience* 221 (wrzesień):86–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.055>.
113. Heintz, Tristan G., Janosch P. Heller, Rongrong Zhao, Alfredo Caceres, Richard Eva, i James W. Fawcett. 2014. „Kinesin KIF4A transports integrin β 1 in developing axons of cortical neurons”. *Molecular and Cellular Neuroscience* 63 (listopad):60–71. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.09.003>.
114. Hendricks, Adam G., Eran Perlson, Jennifer L. Ross, Harry W. Schroeder, Mariko Tokito, i Erika L. F. Holzbaur. 2010. „Motor Coordination via a Tug-of-War Mechanism Drives Bidirectional Vesicle Transport”. *Current Biology: CB* 20 (8): 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.058>.
115. Henske, Elizabeth P., Sergiusz Józwiak, J. Christopher Kingswood, Julian R. Sampson, i Elizabeth A. Thiele. 2016. „Tuberous Sclerosis Complex”. *Nature Reviews Disease Primers* 2 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.35>.
116. Hirokawa, Nobutaka. 2000. „Stirring up Development with the Heterotrimeric Kinesin KIF3”. *Traffic* 1 (1): 29–34. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010105.x>.

117. ———. 2006. „mRNA Transport in Dendrites: RNA Granules, Motors, and Tracks”. *The Journal of Neuroscience* 26 (27): 7139–42. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1821-06.2006>.
118. Hirokawa, Nobutaka, Yasuko Noda, Yosuke Tanaka, i Shinsuke Niwa. 2009. „Kinesin Superfamily Motor Proteins and Intracellular Transport”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (10): 682–96. <https://doi.org/10.1038/nrm2774>.
119. Hirokawa, Nobutaka, i Yosuke Tanaka. 2015. „Kinesin Superfamily Proteins (KIFs): Various Functions and Their Relevance for Important Phenomena in Life and Diseases”. *Experimental Cell Research* 334 (1): 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.016>.
120. Hoerndli, Frédéric J., Dane A. Maxfield, Penelope J. Brockie, Jerry E. Mellem, Erica Jensen, Rui Wang, David M. Madsen, i Andres V. Maricq. 2013. „Kinesin-1 Regulates Synaptic Strength by Mediating the Delivery, Removal, and Redistribution of AMPA Receptors”. *Neuron* 80 (6): 1421–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.050>.
121. Hoesel, Bastian, i Johannes A Schmid. 2013. „The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer”. *Molecular Cancer* 12 (sierpień):86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>.
122. Holland, Andrew J., Daniele Fachinetti, Sandrine Da Cruz, Quan Zhu, Benjamin Vitre, Mariana Lince-Faria, Denaly Chen, i in. 2012. „Polo-like kinase 4 controls centriole duplication but does not directly regulate cytokinesis”. *Molecular Biology of the Cell* 23 (10): 1838–45. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1043>.
123. Holt, Christine E., Kelsey C. Martin, i Erin M. Schuman. 2019. „Local Translation in Neurons: Visualization and Function”. *Nature Structural & Molecular Biology* 26 (7): 557–66. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0263-5>.
124. Holz, Marina K., Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, i John Blenis. 2005. „mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events”. *Cell* 123 (4): 569–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>.
125. Hooikaas, Peter Jan, Hugo GJ Damstra, Oane J. Gros, Wilhelmina E. van Riel, Maud Martin, Yesper Th Smits, Jorg van Loosdregt, Lukas C. Kapitein, Florian Berger, i Anna Akhmanova. 2020. „Kinesin-4 KIF21B Limits Microtubule Growth to Allow Rapid Centrosome Polarization in T Cells”. *eLife* 9 (grudzień):e62876. <https://doi.org/10.7554/eLife.62876>.
126. Horiguchi, Kaori, Toshihiko Hanada, Yasuhisa Fukui, i Athar H. Chishti. 2006. „Transport of PIP3 by GAKIN, a kinesin-3 family protein, regulates neuronal cell polarity”. *The Journal of Cell Biology* 174 (3): 425–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604031>.
127. Howard, Jonathon, i Anthony A Hyman. 2007. „Microtubule polymerases and depolymerases”. *Current Opinion in Cell Biology*, Cell structure and dynamics, 19 (1): 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.12.009>.

128. Huang, Chun-fang, i Gary Banker. 2012. „The Translocation Selectivity of the Kinesins that Mediate Neuronal Organelle Transport”. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (4): 549–64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01325.x>.
129. Huang, Jingxiang, Christian C. Dibble, Mika Matsuzaki, i Brendan D. Manning. 2008. „The TSC1-TSC2 Complex Is Required for Proper Activation of mTOR Complex 2”. *Molecular and Cellular Biology* 28 (12): 4104–15. <https://doi.org/10.1128/MCB.00289-08>.
130. Huang, Wei, Ping Jun Zhu, Shixing Zhang, Hongyi Zhou, Loredana Stoica, Mauricio Galiano, Krešimir Krnjević, Gregg Roman, i Mauro Costa-Mattioli. 2013. „mTORC2 Controls Actin Polymerization Required for Consolidation of Long-Term Memory”. *Nature Neuroscience* 16 (4): 441–48. <https://doi.org/10.1038/nn.3351>.
131. Hung, Chien-Min, Luisa Garcia-Haro, Cynthia A. Sparks, i David A. Guertin. 2012. „mTOR-Dependent Cell Survival Mechanisms”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (12): a008771. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008771>.
132. Inoki, Ken, Yong Li, Tian Xu, i Kun-Liang Guan. 2003. „Rheb GTPase Is a Direct Target of TSC2 GAP Activity and Regulates mTOR Signaling”. *Genes & Development* 17 (15): 1829–34. <https://doi.org/10.1101/gad.1110003>.
133. Inoki, Ken, Tianqing Zhu, i Kun-Liang Guan. 2003. „TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival”. *Cell* 115 (5): 577–90. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2).
134. Iwanski, Malina K., i Lukas C. Kapitein. 2023. „Cellular cartography: Towards an atlas of the neuronal microtubule cytoskeleton”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11 (marzec):1052245. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1052245>.
135. Jacinto, Estela, Robbie Loewith, Anja Schmidt, Shuo Lin, Markus A. Rueegg, Alan Hall, i Michael N. Hall. 2004. „Mammalian TOR Complex 2 Controls the Actin Cytoskeleton and Is Rapamycin Insensitive”. *Nature Cell Biology* 6 (11): 1122–28. <https://doi.org/10.1038/ncb1183>.
136. Jang, Yoon-Gu, Yujin Choi, Kyoungho Jun, i Jongkyeong Chung. 2020. „Mislocalization of TORC1 to Lysosomes Caused by KIF11 Inhibition Leads to Aberrant TORC1 Activity”. *Molecules and Cells* 43 (8): 705–17. <https://doi.org/10.14348/molcells.2020.0089>.
137. Janke, Carsten, i Matthias Kneussel. 2010. „Tubulin Post-Translational Modifications: Encoding Functions on the Neuronal Microtubule Cytoskeleton”. *Trends in Neurosciences* 33 (8): 362–72. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.05.001>.
138. Janke, Carsten, i Guillaume Montagnac. 2017. „Causes and Consequences of Microtubule Acetylation”. *Current Biology* 27 (23): R1287–92. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.044>.
139. Jaworski, J. 2005. „Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway”. *Journal of Neuroscience* 25 (49): 11300–312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-05.2005>.

140. Jaworski, Jacek. 2018. „Białka z rodziny +TIP – «agenci» śledzący mikrotubule w rozwoju i plastyczności neuronów”. *Kosmos* 67 (1): 139–49. https://doi.org/10.36921/kos.2018_2374.
141. Jaworski, Jacek, Lukas C. Kapitein, Susana Montenegro Gouveia, Bjorn R. Dortland, Phebe S. Wulf, Ilya Grigoriev, Paola Camera, i in. 2009. „Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity”. *Neuron* 61 (1): 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.013>.
142. Jaworski, Jacek, Samantha Spangler, Daniel P. Seeburg, Casper C. Hoogenraad, i Morgan Sheng. 2005. „Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase–Akt–Mammalian Target of Rapamycin Pathway”. *The Journal of Neuroscience* 25 (49): 11300–312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-05.2005>.
143. Ji, Ze, Xing Pan, Yan Shang, Dian-Tao Ni, i Feng-Lei Wu. 2019. „KIF18B as a regulator in microtubule movement accelerates tumor progression and triggers poor outcome in lung adenocarcinoma”. *Tissue and Cell* 61 (grudzień):44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2019.09.001>.
144. Jiang, Haibin, i Zhiyuan Zeng. 2015. „Dual mTORC1/2 Inhibition by INK-128 Results in Antitumor Activity in Preclinical Models of Osteosarcoma”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468 (1–2): 255–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.119>.
145. Jiang, Xiuyun, i Raymond S. Yeung. 2006. „Regulation of Microtubule-Dependent Protein Transport by the TSC2/Mammalian Target of Rapamycin Pathway”. *Cancer Research* 66 (10): 5258–69. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4510>.
146. Jolly, Amber L, i Vladimir I Gelfand. 2010. „Cytoplasmic microtubule sliding”. *Communicative & Integrative Biology* 3 (6): 589–91. <https://doi.org/10.4161/cib.3.6.13212>.
147. Jolly, Amber L., Hwajin Kim, Divya Srinivasan, Margot Lakonishok, Adam G. Larson, i Vladimir I. Gelfand. 2010. „Kinesin-1 Heavy Chain Mediates Microtubule Sliding to Drive Changes in Cell Shape”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (27): 12151–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004736107>.
148. Jossin, Yves, i André M. Goffinet. 2007. „Reelin Signals through Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt to Control Cortical Development and through mTor to Regulate Dendritic Growth”. *Molecular and Cellular Biology* 27 (20): 7113–24. <https://doi.org/10.1128/MCB.00928-07>.
149. Kaan, Hung Yi Kristal, David D. Hackney, i Frank Kozielski. 2011. „The structure of the kinesin-1 motor-tail complex reveals the mechanism of autoinhibition”. *Science (New York, N.y.)* 333 (6044): 883–85. <https://doi.org/10.1126/science.1204824>.
150. Kahn, Olga I., Vandana Sharma, Christian González-Billault, i Peter W. Baas. 2015. „Effects of kinesin-5 inhibition on dendritic architecture and microtubule organization”. *Molecular Biology of the Cell* 26 (1): 66–77. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-08-1313>.

151. Kalantari, Silvia, i Isabel Filges. 2020. „‘Kinesinopathies’: emerging role of the kinesin family member genes in birth defects”. *Journal of Medical Genetics* 57 (12): 797–807. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106769>.
152. Kanai, Yoshimitsu, Naoshi Dohmae, i Nobutaka Hirokawa. 2004. „Kinesin Transports RNA: Isolation and Characterization of an RNA-Transporting Granule”. *Neuron* 43 (4): 513–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.022>.
153. Kapitein, Lukas C., i Casper C. Hoogenraad. 2015. „Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton”. *Neuron* 87 (3): 492–506. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.046>.
154. Kapitein, Lukas C., Erwin J. G. Peterman, Benjamin H. Kwok, Jeffrey H. Kim, Tarun M. Kapoor, i Christoph F. Schmidt. 2005. „The Bipolar Mitotic Kinesin Eg5 Moves on Both Microtubules That It Crosslinks”. *Nature* 435 (7038): 114–18. <https://doi.org/10.1038/nature03503>.
155. Kapitein, Lukas C., Max A. Schlager, Marijn Kuijpers, Phebe S. Wulf, Myrrhe van Spronsen, Frederick C. MacKintosh, i Casper C. Hoogenraad. 2010. „Mixed Microtubules Steer Dynein-Driven Cargo Transport into Dendrites”. *Current Biology* 20 (4): 290–99. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.052>.
156. Kelleher, Raymond J., i Mark F. Bear. 2008. „The Autistic Neuron: Troubled Translation?” *Cell* 135 (3): 401–6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.017>.
157. Kelliher, Michael T., Yang Yue, Ashley Ng, Daichi Kamiyama, Bo Huang, Kristen J. Verhey, i Jill Wildonger. 2018. „Autoinhibition of kinesin-1 is essential to the dendrite-specific localization of Golgi outposts”. *The Journal of Cell Biology* 217 (7): 2531–47. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708096>.
158. Kevenaar, Josta T., Sarah Bianchi, Myrrhe van Spronsen, Natacha Olieric, Joanna Lipka, Cátia P. Frias, Marina Mikhaylova, i in. 2016. „Kinesin-Binding Protein Controls Microtubule Dynamics and Cargo Trafficking by Regulating Kinesin Motor Activity”. *Current Biology: CB* 26 (7): 849–61. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.048>.
159. Kim, Jynho, Elaine Y. C. Hsia, Amira Brigui, Anne Plessis, Philip A. Beachy, i Xiaoyan Zheng. 2015. „The role of ciliary trafficking in Hedgehog receptor signaling”. *Science signaling* 8 (379): ra55. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa5622>.
160. Kintner, Chris. 2002. „Neurogenesis in Embryos and in Adult Neural Stem Cells”. *The Journal of Neuroscience* 22 (3): 639–43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00639.2002>.
161. Kiprilov, Enko N., Aashir Awan, Romain Desprat, Michelle Velho, Christian A. Clement, Anne Grete Byskov, Claus Y. Andersen, i in. 2008. „Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery”. *The Journal of Cell Biology* 180 (5): 897–904. <https://doi.org/10.1083/jcb.200706028>.

162. Kirkpatrick, Laura L., i Scott T. Brady. 1999. „Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton”. W *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th Edition*. Lippincott-Raven. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28122/>.
163. Knudson, Alfred G. 2001. „Two Genetic Hits (More or Less) to Cancer”. *Nature Reviews Cancer* 1 (2): 157–62. <https://doi.org/10.1038/35101031>.
164. Konjikusic, Mia J., Ryan S. Gray, i John B. Wallingford. 2020. „The Developmental Biology of Kinesins”. *Developmental Biology* 469 (wrzesień):26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.09.009>.
165. Kononenko, Natalia L., Gala A. Claßen, Marijn Kuijpers, Dmytro Puchkov, Tanja Maritzen, Aleksandra Tempes, Anna R. Malik, i in. 2017. „Retrograde Transport of TrkB-Containing Autophagosomes via the Adaptor AP-2 Mediates Neuronal Complexity and Prevents Neurodegeneration”. *Nature Communications* 8 (kwiecień):14819. <https://doi.org/10.1038/ncomms14819>.
166. Koscielny, Alicja, Anna R. Malik, Ewa Liszewska, Justyna Zmorzynska, Aleksandra Tempes, Bartosz Tarkowski, i Jacek Jaworski. 2017. „Adaptor Complex 2 Controls Dendrite Morphology via mTOR-Dependent Expression of GluA2”. *Molecular Neurobiology* 55 (2): 1590. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0436-3>.
167. Kreft, Karim L., Marjan van Meurs, Annet F. Wierenga-Wolf, Marie-Jose Melief, Miriam E. van Strien, Elly M. Hol, Ben A. Oostra, Jon D. Laman, i Rogier Q. Hintzen. 2014. „Abundant kif21b is associated with accelerated progression in neurodegenerative diseases”. *Acta Neuropathologica Communications* 2 (1): 144. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0144-4>.
168. Kull, F. J., R. D. Vale, i R. J. Fletterick. 1998. „The Case for a Common Ancestor: Kinesin and Myosin Motor Proteins and G Proteins”. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 19 (8): 877–86. <https://doi.org/10.1023/a:1005489907021>.
169. Kumar, Vikas, Ming-Xiang Zhang, Michael W. Swank, Jeannette Kunz, i Gang-Yi Wu. 2005. „Regulation of Dendritic Morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK Signaling Pathways”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (49): 11288–99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005>.
170. Kumari, Shikha, i Amy L. Brewster. 2023. „Exploring Dendritic and Spine Structural Profiles in Epilepsy: Insights From Human Studies and Experimental Animal Models”. *Epilepsy Currents* 24 (1): 40–46. <https://doi.org/10.1177/15357597231218603>.
171. Labonté, Dorthe, Edda Thies, i Matthias Kneussel. 2014. „The Kinesin KIF21B Participates in the Cell Surface Delivery of $\Gamma 2$ Subunit-Containing GABAA Receptors”. *European Journal of Cell Biology* 93 (8): 338–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.007>.
172. Lai, Yandong, i Yu Jiang. 2020. „Reciprocal Regulation between Primary Cilia and mTORC1”. *Genes* 11 (6): 711. <https://doi.org/10.3390/genes11060711>.

173. Land, Stephen C., i Andrew R. Tee. 2007. „Hypoxia-Inducible Factor 1 α Is Regulated by the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) via an mTOR Signaling Motif *”. *Journal of Biological Chemistry* 282 (28): 20534–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611782200>.
174. Laplante, Mathieu, i David M. Sabatini. 2012. „mTOR signaling in growth control and disease”. *Cell* 149 (2): 274–93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
175. Lawrence, Carolyn J., R. Kelly Dawe, Karen R. Christie, Don W. Cleveland, Scott C. Dawson, Sharyn A. Endow, Lawrence S.B. Goldstein, i in. 2004. „A Standardized Kinesin Nomenclature”. *Journal of Cell Biology* 167 (1): 19–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408113>.
176. Lee, Cheng-Che, Chiung-Chun Huang, Mei-Ying Wu, i Kuei-Sen Hsu. 2005. „Insulin Stimulates Postsynaptic Density-95 Protein Translation via the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway”. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (18): 18543–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414112200>.
177. Lee, Jeong Ho, i Joseph G. Gleeson. 2010. „The Role of Primary Cilia in Neuronal Function”. *Neurobiology of Disease* 38 (2): 167–72. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.12.022>.
178. Lee, Won Suk, Won-Ha Lee, Yong Chul Bae, i Kyoungho Suk. 2019. „Axon Guidance Molecules Guiding Neuroinflammation”. *Experimental Neurobiology* 28 (3): 311–19. <https://doi.org/10.5607/en.2019.28.3.311>.
179. Leitch, Carmen C., i Norann A. Zaghoul. 2014. „BBS4 Is Necessary for Ciliary Localization of TrkB Receptor and Activation by BDNF”. *PLoS ONE* 9 (5): e98687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098687>.
180. Lenz, Guido, i Joseph Avruch. 2005. „Glutamatergic Regulation of the p70S6 Kinase in Primary Mouse Neurons”. *Journal of Biological Chemistry* 280 (46): 38121–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500363200>.
181. Lepanto, Paola, Jose L. Badano, i Flavio R. Zolessi. 2016. „Neuron’s Little Helper: The Role of Primary Cilia in Neurogenesis”. *Neurogenesis* 3 (1): e1253363. <https://doi.org/10.1080/23262133.2016.1253363>.
182. Li, Zhi, Hai-Yan Yang, Xiao-Lan Zhang, Xu Zhang, Yu-Zhou Huang, Xin-Yuan Dai, Liang Shi, Guo-Ren Zhou, Ji-Fu Wei, i Qiang Ding. 2022. „Kinesin Family Member 23, Regulated by FOXM1, Promotes Triple Negative Breast Cancer Progression via Activating Wnt/ β -Catenin Pathway”. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 41 (1): 168. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02373-7>.
183. Liang, Ya-Jing, Jia-Hao Ni, Lan-Min Wang, Fu-Qing Tan, i Wan-Xi Yang. 2020. „KIF3A Regulates the Wnt/ β -Catenin Pathway via Transporting β -Catenin during Spermatogenesis in Eriocheir Sinensis”. *Cell and Tissue Research* 381 (3): 527–41. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03220-x>.

184. Liang, Ya-Jing, i Wan-Xi Yang. 2019. „Kinesins in MAPK Cascade: How Kinesin Motors Are Involved in the MAPK Pathway?” *Gene* 684 (lut):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.042>.
185. Lim, Angeline, Andreas Rechtsteiner, i William M. Saxton. 2017. „Two kinesins drive anterograde neuropeptide transport”. *Molecular Biology of the Cell* 28 (24): 3542–53. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-12-0820>.
186. Lin, F., T. Hiesberger, K. Cordes, A.M. Sinclair, L.S.B. Goldstein, S. Somlo, i P. Igarashi. 2003. „Kidney-Specific Inactivation of the KIF3A Subunit of Kinesin-II Inhibits Renal Ciliogenesis and Produces Polycystic Kidney Disease”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5286–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0836980100>.
187. Lin, Tiffany V., Lawrence Hsieh, Tomoki Kimura, Taylor J. Malone, i Angélique Bordey. 2016. „Normalizing Translation through 4E-BP Prevents mTOR-Driven Cortical Mislamination and Ameliorates Aberrant Neuron Integration”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (40): 11330–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605740113>.
188. Liot, Géraldine, Diana Zala, Patrick Pla, Guillaume Mottet, Matthieu Piel, i Frédéric Saudou. 2013. „Mutant Huntingtin Alters Retrograde Transport of TrkB Receptors in Striatal Dendrites”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (15): 6298–6309. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2033-12.2013>.
189. Lipka, Joanna, Lukas C Kapitein, Jacek Jaworski, i Casper C Hoogenraad. 2016. „Microtubule-binding Protein Doublecortin-like Kinase 1 (DCLK1) Guides Kinesin-3-mediated Cargo Transport to Dendrites”. *The EMBO Journal* 35 (3): 302–18. <https://doi.org/10.15252/emj.201592929>.
190. Liu, Grace Y., i David M. Sabatini. 2020. „mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease”. *Nature reviews. Molecular cell biology* 21 (4): 183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>.
191. Liu, Yajun, Xi Zhang, Ruihan Pan, Xiaolong Liang, Qichang Liu, Chao Yang, i Xu Li. 2022. „KIF26B Is Overexpressed in Medulloblastoma and Promotes Malignant Progression by Activating the PI3K/AKT Pathway”. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)* 2022 (lipiec):2552397. <https://doi.org/10.1155/2022/2552397>.
192. Lo, K. Y., A. Kuzmin, S. M. Unger, J. D. Petersen, i M. A. Silverman. 2011. „KIF1A Is the Primary Anterograde Motor Protein Required for the Axonal Transport of Dense-Core Vesicles in Cultured Hippocampal Neurons”. *Neuroscience Letters* 491 (3): 168–73. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.01.018>.
193. Lozovaya, N., S. Gataullina, T. Tsintsadze, V. Tsintsadze, E. Pallesi-Pocachard, M. Minlebaev, N. A. Goriounova, i in. 2014. „Selective suppression of excessive GluN2C expression rescues early epilepsy in a tuberous sclerosis murine model”. *Nature Communications* 5 (sierpień):4563. <https://doi.org/10.1038/ncomms5563>.

194. Lu, Shimin, Yinghui Liu, Shan Tian, Yang He, i Weiguo Dong. 2023. „KIFC3 regulates progression of hepatocellular carcinoma via EMT and the AKT/mTOR pathway”. *Experimental Cell Research* 426 (1): 113564. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113564>.
195. Lu, Wen, Margot Lakonishok, i Vladimir I. Gelfand. 2015. „Kinesin-1-Powered Microtubule Sliding Initiates Axonal Regeneration in Drosophila Cultured Neurons”. *Molecular Biology of the Cell* 26 (7): 1296–1307. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-10-1423>.
196. Lyons, David A., Stephen G. Naylor, Anja Scholze, i William S. Talbot. 2009. „Kif1b Is Essential for mRNA Localization in Oligodendrocytes and Development of Myelinated Axons”. *Nature Genetics* 41 (7): 854–58. <https://doi.org/10.1038/ng.376>.
197. Ma, Li, Zhenbang Chen, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, i Pier Paolo Pandolfi. 2005. „Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis”. *Cell* 121 (2): 179–93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.031>.
198. Maday, Sandra, i Erika L. F. Holzbaur. 2014. „Autophagosome Biogenesis in Primary Neurons Follows an Ordered and Spatially Regulated Pathway”. *Developmental Cell* 30 (1): 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.001>.
199. Maday, Sandra, Karen E. Wallace, i Erika L.F. Holzbaur. 2012. „Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons”. *The Journal of Cell Biology* 196 (4): 407–17. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106120>.
200. Magri, Laura, Marco Cambiaghi, Manuela Cominelli, Clara Alfaro-Cervello, Marco Cursi, Mauro Pala, Alessandro Bulfone, i in. 2011. „Sustained Activation of mTOR Pathway in Embryonic Neural Stem Cells Leads to Development of Tuberous Sclerosis Complex-Associated Lesions”. *Cell Stem Cell* 9 (5): 447–62. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.008>.
201. Magri, Laura, Manuela Cominelli, Marco Cambiaghi, Marco Cursi, Letizia Leocani, Fabio Minicucci, Pietro Luigi Poliani, i Rossella Galli. 2013. „Timing of mTOR Activation Affects Tuberous Sclerosis Complex Neuropathology in Mouse Models”. *Disease Models & Mechanisms* 6 (5): 1185–97. <https://doi.org/10.1242/dmm.012096>.
202. Malik, Anna R., Ewa Liszewska, Agnieszka Skalecka, Malgorzata Urbanska, Anand M. Iyer, Lukasz J. Swiech, Malgorzata Perycz, i in. 2015. „Tuberous Sclerosis Complex Neuropathology Requires Glutamate-Cysteine Ligase”. *Acta Neuropathologica Communications* 3 (1): 48. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0225-z>.
203. Malik, Anna R., Malgorzata Urbanska, Agata Gozdz, Lukasz J. Swiech, Andrzej Nagalski, Malgorzata Perycz, Magdalena Blazejczyk, i Jacek Jaworski. 2013. „Cyr61, a Matricellular Protein, Is Needed for Dendritic Arborization of Hippocampal Neurons”. *Journal of Biological Chemistry* 288 (12): 8544–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.411629>.
204. Mangeol, Pierre, Bram Prevo, i Erwin J. G. Peterman. 2016. „KymographClear and KymographDirect: two tools for the automated quantitative analysis of molecular and cellular

- dynamics using kymographs". *Molecular Biology of the Cell* 27 (12): 1948–57. <https://doi.org/10.1091/mbc.e15-06-0404>.
205. Marcotte, Leah, Eleonora Aronica, Marianna Baybis, i Peter B. Crino. 2012. „Cytoarchitectural Alterations Are Widespread in Cerebral Cortex in Tuberous Sclerosis Complex". *Acta Neuropathologica* 123 (5): 685–93. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0950-3>.
206. Marszalek, J. R., X. Liu, E. A. Roberts, D. Chui, J. D. Marth, D. S. Williams, i L. S. Goldstein. 2000. „Genetic Evidence for Selective Transport of Opsin and Arrestin by Kinesin-II in Mammalian Photoreceptors". *Cell* 102 (2): 175–87. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00023-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00023-4).
207. Mayer, C, i I Grummt. 2006. „Ribosome Biogenesis and Cell Growth: mTOR Coordinates Transcription by All Three Classes of Nuclear RNA Polymerases". *Oncogene* 25 (48): 6384–91. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209883>.
208. May-Simera, Helen L., i Matthew W. Kelley. 2012. „Cilia, Wnt Signaling, and the Cytoskeleton". *Cilia* 1 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-7>.
209. Miao, Linqing, Liu Yang, Haoliang Huang, Feisi Liang, Chen Ling, i Yang Hu. 2016. „mTORC1 is necessary but mTORC2 and GSK3 β are inhibitory for AKT3-induced axon regeneration in the central nervous system". Zredagowane przez Nahum Sonenberg. *eLife* 5 (marzec):e14908. <https://doi.org/10.7554/eLife.14908>.
210. Midorikawa, Ryosuke, Yosuke Takei, i Nobutaka Hirokawa. 2006. „KIF4 Motor Regulates Activity-Dependent Neuronal Survival by Suppressing PARP-1 Enzymatic Activity". *Cell* 125 (2): 371–83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.039>.
211. Miller, Kyle E., Jamin DeProto, Nancy Kaufmann, Bharatkumar N. Patel, April Duckworth, i David Van Vactor. 2005. „Direct Observation Demonstrates That Liprin-Alpha Is Required for Trafficking of Synaptic Vesicles". *Current Biology: CB* 15 (7): 684–89. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.061>.
212. Miserey-Lenkei, Stéphanie, Hugo Bousquet, Olena Pylypenko, Sabine Bardin, Ariane Dimitrov, Gaëlle Bressanelli, Raja Bonifay, i in. 2017. „Coupling fission and exit of RAB6 vesicles at Golgi hotspots through kinesin-myosin interactions". *Nature Communications* 8 (listopad):1254. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01266-0>.
213. Mishra, Rishi Kumar, Ayushi Datey, i Tanweer Hussain. 2020. „mRNA Recruiting eIF4 Factors Involved in Protein Synthesis and Its Regulation". *Biochemistry* 59 (1): 34–46. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00788>.
214. Mitchell, David R. 2010. „Polyglutamylation: The Glue that makes Microtubules Sticky". *Current Biology* 20 (5): R234–36. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.008>.
215. Mlostek, Magdalena, Juan Zeng, Malgorzata Urbanska, i Jacek Jaworski. 2023. „Dendritic Arbor Dynamics and Stability in Health and Disease". *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 83 (4): 331–58. <https://doi.org/10.55782/ane-2023-2456>.

216. Monroy, Brigitte Y., Danielle L. Sawyer, Bryce E. Ackermann, Melissa M. Borden, Tracy C. Tan, i Cassandra M. Ori-McKenney. 2018. „Competition between Microtubule-Associated Proteins Directs Motor Transport”. *Nature Communications* 9 (1): 1487. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03909-2>.
217. Monroy, Brigitte Y., Tracy C. Tan, Janah May Oclaman, Jisoo S. Han, Sergi Simó, Shinsuke Niwa, Dan W. Nowakowski, Richard J. McKenney, i Cassandra M. Ori-McKenney. 2020. „A Combinatorial MAP Code Dictates Polarized Microtubule Transport”. *Developmental cell* 53 (1): 60-72.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.029>.
218. Morfini, Gerardo A, Yi-Mei You, Sarah L Pollema, Agnieszka Kaminska, Katherine Liu, Katsuji Yoshioka, Benny Björkblom, i in. 2009. „Pathogenic Huntingtin Inhibits Fast Axonal Transport by Activating JNK3 and Phosphorylating Kinesin”. *Nature neuroscience* 12 (7): 864–71. <https://doi.org/10.1038/nn.2346>.
219. Morfini, Gerardo, Györgyi Szebenyi, Hannah Brown, Harish C. Pant, Gustavo Pigino, Scott DeBoer, Uwe Beffert, i Scott T. Brady. 2004. „A Novel CDK5-Dependent Pathway for Regulating GSK3 Activity and Kinesin-Driven Motility in Neurons”. *The EMBO Journal* 23 (11): 2235–45. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600237>.
220. Muhia, Mary, Edda Thies, Dorthe Labonté, Amy E. Ghiretti, Kira V. Gromova, Francesca Xompero, Corinna Lappe-Siefke, i in. 2016. „The Kinesin KIF21B Regulates Microtubule Dynamics and Is Essential for Neuronal Morphology, Synapse Function, and Learning and Memory”. *Cell Reports* 15 (5): 968–77. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.086>.
221. Mul, Wouter, Aniruddha Mitra, i Erwin J. G. Peterman. 2022. „Mechanisms of Regulation in Intraflagellar Transport”. *Cells* 11 (17): 2737. <https://doi.org/10.3390/cells11172737>.
222. Munoz, Omar, i Stefan Klumpp. 2022. „Tug-of-War and Coordination in Bidirectional Transport by Molecular Motors”. *The Journal of Physical Chemistry B* 126 (40): 7957–65. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c05194>.
223. Murakami, Mirei, Tomoko Ichisaka, Mitsuyo Maeda, Noriko Oshiro, Kenta Hara, Frank Edenhofer, Hiroshi Kiyama, Kazuyoshi Yonezawa, i Shinya Yamanaka. 2004. „mTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells”. *Molecular and Cellular Biology* 24 (15): 6710–18. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004>.
224. Musah, Aminat S., Tanya L. Brown, Marisa A. Jeffries, Quan Shang, Hirokazu Hashimoto, Angelina V. Evangelou, Alison Kowalski, Mona Batish, Wendy B. Macklin, i Teresa L. Wood. 2020. „Mechanistic Target of Rapamycin Regulates the Oligodendrocyte Cytoskeleton during Myelination”. *The Journal of Neuroscience* 40 (15): 2993–3007. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1434-18.2020>.
225. Muzio, Maria Rosaria, i Marco Cascella. 2023. „Histology, Axon”. W *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554388/>.

226. Myers, Kenneth A., i Peter W. Baas. 2007. „Kinesin-5 regulates the growth of the axon by acting as a brake on its microtubule array”. *The Journal of Cell Biology* 178 (6): 1081–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702074>.
227. Nabb, Alec T., Madeline Frank, i Marvin Bentley. 2020. „Smart Motors and Cargo Steering Drive Kinesin-Mediated Selective Transport”. *Molecular and Cellular Neurosciences* 103 (marzec):103464. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.103464>.
228. Nakajima, Kazuo, Xiling Yin, Yosuke Takei, Dae-Hyun Seog, Noriko Homma, i Nobutaka Hirokawa. 2012. „Molecular Motor KIF5A Is Essential for GABAA Receptor Transport, and KIF5A Deletion Causes Epilepsy”. *Neuron* 76 (5): 945–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.012>.
229. Nangaku, M., R. Sato-Yoshitake, Y. Okada, Y. Noda, R. Takemura, H. Yamazaki, i N. Hirokawa. 1994. „KIF1B, a Novel Microtubule plus End-Directed Monomeric Motor Protein for Transport of Mitochondria”. *Cell* 79 (7): 1209–20. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90012-4).
230. Nazio, Francesca, i Francesco Cecconi. 2013. „mTOR, AMBRA1, and autophagy: An intricate relationship”. *Cell Cycle* 12 (16): 2524–25. <https://doi.org/10.4161/cc.25835>.
231. Ni, Songjia, Jianjun Li, Sujun Qiu, Yingming Xie, Kaiqin Gong, i Yang Duan. 2021. „KIF21B Expression in Osteosarcoma and Its Regulatory Effect on Osteosarcoma Cell Proliferation and Apoptosis Through the PI3K/AKT Pathway”. *Frontiers in Oncology* 10 (styczeń):606765. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.606765>.
232. Nie, Duyu, Alessia Di Nardo, Juliette M. Han, Hasani Baharanyi, Ioannis Kramvis, Thanhthao Huynh, Sandra Dabora, i in. 2010. „Tsc2-Rheb Signaling Regulates EphA-Mediated Axon Guidance”. *Nature Neuroscience* 13 (2): 163–72. <https://doi.org/10.1038/nn.2477>.
233. Nie, Tiejian, Lin Zhu, i Qian Yang. 2021. „The Classification and Basic Processes of Autophagy”. W *Autophagy: Biology and Diseases: Technology and Methodology*, zredagowane przez Zhiping Xie, 3–16. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2830-6_1.
234. Nievergelt, Adrian Pascal, Iliia Zykov, Dennis Diener, Aditya Chhatre, Tim-Oliver Buchholz, Markus Delling, Stefan Diez, Florian Jug, Luděk Štěpánek, i Gaia Pigino. 2022. „Conversion of Anterograde into Retrograde Trains Is an Intrinsic Property of Intraflagellar Transport”. *Current Biology* 32 (18): 4071-4078.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.07.033>.
235. Nishimura, Takashi, Katsuhiko Kato, Tomoya Yamaguchi, Yuko Fukata, Shigeo Ohno, i Kozo Kaibuchi. 2004. „Role of the PAR-3–KIF3 Complex in the Establishment of Neuronal Polarity”. *Nature Cell Biology* 6 (4): 328–34. <https://doi.org/10.1038/ncb1118>.
236. Niwa, Shinsuke, Yosuke Tanaka, i Nobutaka Hirokawa. 2008. „KIF1B β - and KIF1A-Mediated Axonal Transport of Presynaptic Regulator Rab3 Occurs in a GTP-Dependent Manner through DENN/MADD”. *Nature Cell Biology* 10 (11): 1269–79. <https://doi.org/10.1038/ncb1785>.

237. Nobes, Catherine D, i Alan Hall. 1995. „Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia”. *Cell* 81 (1): 53–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4).
238. Ogawa, Tadayuki, i Nobutaka Hirokawa. 2015. „Microtubule Destabilizer KIF2A Undergoes Distinct Site-Specific Phosphorylation Cascades That Differentially Affect Neuronal Morphogenesis”. *Cell Reports* 12 (11): 1774–88. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.018>.
239. Oguchi, Yusuke, Seiichi Uchimura, Takashi Ohki, Sergey V. Mikhailenko, i Shin’ichi Ishiwata. 2011. „The Bidirectional Depolymerizer MCAK Generates Force by Disassembling Both Microtubule Ends”. *Nature Cell Biology* 13 (7): 846–52. <https://doi.org/10.1038/ncb2256>.
240. Okada, Y., H. Yamazaki, Y. Sekine-Aizawa, i N. Hirokawa. 1995. „The Neuron-Specific Kinesin Superfamily Protein KIF1A Is a Unique Monomeric Motor for Anterograde Axonal Transport of Synaptic Vesicle Precursors”. *Cell* 81 (5): 769–80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90538-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90538-3).
241. Orhon, Idil, Nicolas Dupont, Mohamad Zaidan, Valérie Boitez, Martine Burtin, Alain Schmitt, Thierry Capiod, i in. 2016. „Primary-Cilium-Dependent Autophagy Controls Epithelial Cell Volume in Response to Fluid Flow”. *Nature Cell Biology* 18 (6): 657–67. <https://doi.org/10.1038/ncb3360>.
242. Ostergaard, Pia, Michael A. Simpson, Antonella Mendola, Pradeep Vasudevan, Fiona C. Connell, Andreas van Impel, Anthony T. Moore, i in. 2012. „Mutations in KIF11 Cause Autosomal-Dominant Microcephaly Variably Associated with Congenital Lymphedema and Chorioretinopathy”. *American Journal of Human Genetics* 90 (2): 356–62. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.018>.
243. Ostroff, Linnaea E., Emanuela Santini, Robert Sears, Zachary Deane, Rahul N. Kanadia, Joseph E. LeDoux, Tenzin Lhakhang, Aristotelis Tsirigos, Adriana Heguy, i Eric Klann. 2019. „Axon TRAP Reveals Learning-Associated Alterations in Cortical Axonal mRNAs in the Lateral Amygdala”. *eLife* 8 (grudzień):e51607. <https://doi.org/10.7554/eLife.51607>.
244. Pampliega, Olatz, Idil Orhon, Bindi Patel, Sunandini Sridhar, Antonio Díaz-Carretero, Isabelle Beau, Patrice Codogno, Birgit Satir, Peter Satir, i Ana Maria Cuervo. 2013. „Functional interaction between autophagy and ciliogenesis”. *Nature* 502 (7470): 194–200. <https://doi.org/10.1038/nature12639>.
245. Pankiv, Serhiy, Terje Høyvarde Clausen, Trond Lamark, Andreas Brech, Jack-Ansgar Bruun, Heidi Outzen, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, i Terje Johansen. 2007. „p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy*[”]. *Journal of Biological Chemistry* 282 (33): 24131–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>.
246. Parato, Julie, i Francesca Bartolini. 2021. „The Microtubule Cytoskeleton at the Synapse”. *Neuroscience letters* 753 (maj):135850. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135850>.

247. Paridaen, Judith T. M. L., Michaela Wilsch-Bräuninger, i Wieland B. Huttner. 2013. „Asymmetric Inheritance of Centrosome-Associated Primary Cilium Membrane Directs Ciliogenesis after Cell Division”. *Cell* 155 (2): 333–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.060>.
248. Park, Sang Min, Jae Seok Lim, Suresh Ramakrishna, Se Hoon Kim, Woo Kyeong Kim, Junehawk Lee, Hoon-Chul Kang, i in. 2018. „Brain Somatic Mutations in MTOR Disrupt Neuronal Ciliogenesis, Leading to Focal Cortical Dyslamination”. *Neuron* 99 (1): 83-97.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.039>.
249. Parkhitko, Andrey, Faina Myachina, Tasha A. Morrison, Khadijah M. Hindi, Neil Auricchio, Magdalena Karbowiczek, J. Julia Wu, i in. 2011. „Tumorigenesis in Tuberous Sclerosis Complex Is Autophagy and P62/Sequestosome 1 (SQSTM1)-Dependent”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (30): 12455–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104361108>.
250. Peña-Llopis, Samuel, Silvia Vega-Rubin-de-Celis, Jacob C Schwartz, Nicholas C Wolff, Tram Anh T Tran, Lihua Zou, Xian-Jin Xie, David R Corey, i James Brugarolas. 2011. „Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1”. *The EMBO Journal* 30 (16): 3242–58. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.257>.
251. Peretti, Diego, Leticia Peris, Silvana Rosso, Santiago Quiroga, i Alfredo Cáceres. 2000. „Evidence for the Involvement of Kif4 in the Anterograde Transport of L1-Containing Vesicles”. *The Journal of Cell Biology* 149 (1): 141–52.
252. Perluigi, Marzia, Fabio Di Domenico, i D. Allan Butterfield. 2015. „mTOR Signaling in Aging and Neurodegeneration: At the Crossroad between Metabolism Dysfunction and Impairment of Autophagy”. *Neurobiology of Disease* 84 (grudzień):39–49. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.014>.
253. Perycz, Malgorzata, Anna S. Urbanska, Pawel S. Krawczyk, Kamil Parobczak, i Jacek Jaworski. 2011. „Zipcode Binding Protein 1 Regulates the Development of Dendritic Arbors in Hippocampal Neurons”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (14): 5271–85. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2387-10.2011>.
254. Pierce, Nathan W., i Maxence V. Nachury. 2013. „Cilia Grow by Taking a Bite out of the Cell”. *Developmental Cell* 27 (2): 126–27. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.013>.
255. Polleux, F., i William Snider. 2010. „Initiating and Growing an Axon”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (4): a001925. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001925>.
256. Porstmann, Thomas, Claudio R. Santos, Beatrice Griffiths, Megan Cully, Mary Wu, Sally Leever, John R. Griffiths, Yuen-Li Chung, i Almut Schulze. 2008. „SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth”. *Cell Metabolism* 8 (3–3): 224–36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.007>.

257. Portran, Didier, Laura Schaedel, Zhenjie Xu, Manuel Théry, i Maxence V. Nachury. 2017. „Tubulin Acetylation Protects Long-Lived Microtubules against Mechanical Ageing”. *Nature Cell Biology* 19 (4): 391–98. <https://doi.org/10.1038/ncb3481>.
258. Pópulo, Helena, José Manuel Lopes, i Paula Soares. 2012. „The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer”. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (2): 1886–1918. <https://doi.org/10.3390/ijms13021886>.
259. Pu, Jing, Carlos M. Guardia, Tal Keren-Kaplan, i Juan S. Bonifacino. 2016. „Mechanisms and functions of lysosome positioning”. *Journal of Cell Science* 129 (23): 4329–39. <https://doi.org/10.1242/jcs.196287>.
260. Puri, Dharmendra, Keerthana Ponniah, Kasturi Biswas, Atrayee Basu, Swagata Dey, Erik A. Lundquist, i Anindya Ghosh-Roy. 2021. „Wnt Signaling Establishes the Microtubule Polarity in Neurons through Regulation of Kinesin-13”. *The Journal of Cell Biology* 220 (9): e202005080. <https://doi.org/10.1083/jcb.202005080>.
261. Qiang, Liang, Wenqian Yu, Athena Andreadis, Minhua Luo, i Peter W. Baas. 2006. „Tau Protects Microtubules in the Axon from Severing by Katanin”. *The Journal of Neuroscience* 26 (12): 3120–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5392-05.2006>.
262. Quinlan, Robyn J., Jonathan L. Tobin, i Philip L. Beales. 2008. „Modeling Ciliopathies: Primary Cilia in Development and Disease”. *Current Topics in Developmental Biology* 84:249–310. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00605-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00605-4).
263. Quinn, Sean M., Troy Vargason, Nilisha Pokhrel, Edwin Antony, Juergen Hahn, i Susan P. Gilbert. 2020. „KIF3A accelerates KIF3C within the kinesin-2 heterodimer to generate symmetrical phosphate release rates for each processive step”. *The Journal of Biological Chemistry* 296 (listopad):100020. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015272>.
264. Rashid, D. J., J. Bononi, B. P. Tripet, R. S. Hodges, i D. W. Pierce. 2005. „Monomeric and Dimeric States Exhibited by the Kinesin-Related Motor Protein KIF1A”. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society* 65 (6): 538–49. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2005.00255.x>.
265. Rathgeber, Louisa, Kira V. Gromova, Irina Schaefer, Petra Breiden, Christian Lohr, i Matthias Kneussel. 2015. „GSK3 and KIF5 regulate activity-dependent sorting of gephyrin between axons and dendrites”. *European Journal of Cell Biology* 94 (3): 173–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.01.005>.
266. Reis, Larissa Brussa, Eduardo C. Filippi-Chiela, Patricia Ashton-Prolla, Fernanda Visioli, i Clévia Rosset. 2021. „The Paradox of Autophagy in Tuberous Sclerosis Complex”. *Genetics and Molecular Biology* 44 (2): e20200014. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0014>.
267. Rędownicz, Maria Jolanta. 2018. „Modyfikacje potranslacyjne aktyny”. *Kosmos* 67 (1): 43–55. https://doi.org/10.36921/kos.2018_2367.

268. Riel, Wilhelmina E van, Ankit Rai, Sarah Bianchi, Eugene A Katrukha, Qingyang Liu, Albert JR Heck, Casper C Hoogenraad, Michel O Steinmetz, Lukas C Kapitein, i Anna Akhmanova. 2017. „Kinesin-4 KIF21B Is a Potent Microtubule Pausing Factor”. *eLife* 6 (marzec):e24746. <https://doi.org/10.7554/eLife.24746>.
269. Rink, Jochen C., Kyle A. Gurley, Sarah A. Elliott, i Alejandro Sánchez Alvarado. 2009. „Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia”. *Science (New York, N.Y.)* 326 (5958): 1406–10. <https://doi.org/10.1126/science.1178712>.
270. Ritter, Andreas, Nina-Naomi Kreis, Frank Louwen, Linda Wordeman, i Juping Yuan. 2016. „Molecular Insight into the Regulation and Function of MCAK”. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 51 (4): 228–45. <https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1178705>.
271. Roll-Mecak, Antonina. 2020. „The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding”. *Developmental Cell* 54 (1): 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.008>.
272. Rosa-Ferreira, Cláudia, i Sean Munro. 2011. „Arl8 and SKIP Act Together to Link Lysosomes to Kinesin-1”. *Developmental Cell* 21 (6): 1171–78. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.007>.
273. Rosengren, Thomas, Lasse Jonsgaard Larsen, Lotte Bang Pedersen, Søren Tvorup Christensen, i Lisbeth Birk Møller. 2018. „TSC1 and TSC2 Regulate Cilia Length and Canonical Hedgehog Signaling via Different Mechanisms”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (14): 2663–80. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2761-8>.
274. Roy, Subhojit. 2014. „Seeing the Unseen: The Hidden World of Slow Axonal Transport”. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 20 (1): 71–81. <https://doi.org/10.1177/1073858413498306>.
275. Ruvinsky, Igor, Nitzan Sharon, Tal Lerer, Hannah Cohen, Miri Stolovich-Rain, Tomer Nir, Yuval Dor, Philip Zisman, i Oded Meyuhas. 2005. „Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis”. *Genes & Development* 19 (18): 2199–2211. <https://doi.org/10.1101/gad.351605>.
276. Sancak, Ozgur, Mark Nellist, Miriam Goedbloed, Peter Elfferich, Cokkie Wouters, Anneke Maat-Kievit, Bernard Zonnenberg, Senno Verhoef, Dicky Halley, i Ans van den Ouweland. 2005. „Mutational Analysis of the TSC1 and TSC2 Genes in a Diagnostic Setting: Genotype--Phenotype Correlations and Comparison of Diagnostic DNA Techniques in Tuberous Sclerosis Complex”. *European Journal of Human Genetics: EJHG* 13 (6): 731–41. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201402>.
277. Sarbassov, Dos D., Siraj M. Ali, Shomit Sengupta, Joon-Ho Sheen, Peggy P. Hsu, Alex F. Bagley, Andrew L. Markhard, i David M. Sabatini. 2006. „Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB”. *Molecular Cell* 22 (2): 159–68. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>.

278. Sarlo, Gabrielle L., i Kathleen F. Holton. 2021. „Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review”. *Seizure* 91 (październik):213–27. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.06.028>.
279. Sasai, Noriaki, i James Briscoe. 2012. „Primary Cilia and Graded Sonic Hedgehog Signaling: Primary Cilia and Graded Sonic Hedgehog Signaling”. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1 (5): 753–72. <https://doi.org/10.1002/wdev.43>.
280. Schicknick, Horst, Björn H. Schott, Eike Budinger, Karl-Heinz Smalla, Anett Riedel, Constanze I. Seidenbecher, Henning Scheich, Eckart D. Gundelfinger, i Wolfgang Tischmeyer. 2008. „Dopaminergic Modulation of Auditory Cortex-Dependent Memory Consolidation through mTOR”. *Cerebral Cortex* 18 (11): 2646–58. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn026>.
281. Schneider, A., U. Plessmann, R. Felleisen, i K. Weber. 1998. „Posttranslational Modifications of Trichomonad Tubulins; Identification of Multiple Glutamylation Sites”. *FEBS Letters* 429 (3): 399–402. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00644-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00644-9).
282. Schneider, Linda, Michael Cammer, Jonathan Lehman, Sonja K. Nielsen, Charles F. Guerra, Iben R. Veland, Christian Stock, i in. 2010. „Directional Cell Migration and Chemotaxis in Wound Healing Response to PDGF-AA Are Coordinated by the Primary Cilium in Fibroblasts”. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 25 (2–3): 279–92. <https://doi.org/10.1159/000276562>.
283. Schrott, Gerhard M., Elizabeth A. Nigh, Wen G. Chen, Linda Hu, i Michael E. Greenberg. 2004. „BDNF Regulates the Translation of a Select Group of mRNAs by a Mammalian Target of Rapamycin-Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathway during Neuronal Development”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (33): 7366–77. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1739-04.2004>.
284. Setou, Mitsutoshi, Dae-Hyung Seog, Yosuke Tanaka, Yoshimitsu Kanai, Yosuke Takei, Masahiko Kawagishi, i Nobutaka Hirokawa. 2002. „Glutamate-Receptor-Interacting Protein GRIP1 Directly Steers Kinesin to Dendrites”. *Nature* 417 (6884): 83–87. <https://doi.org/10.1038/nature743>.
285. Sheu, Shu-Hsien, Srigokul Upadhyayula, Vincent Dupuy, Song Pang, Fei Deng, Jinxia Wan, Deepika Walpita, i in. 2023. „A Serotonergic Axon-Cilium Synapse Drives Nuclear Signaling to Maintain Chromatin Accessibility”. *Microscopy and Microanalysis* 29 (Supplement_1): 1091. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozad067.561>.
286. Shigeoka, Toshiaki, Jane Jung, Christine E. Holt, i Hosung Jung. 2018. „Axon-TRAP-RiboTag: Affinity Purification of Translated mRNAs from Neuronal Axons in Mouse In Vivo”. W *RNA Detection*, zredagowane przez Imre Gaspar, 1649:85–94. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7213-5_5.

287. Shor, Boris, Jiang Wu, Quazi Shakey, Lourdes Toral-Barza, Celine Shi, Max Follettie, i Ker Yu. 2010. „Requirement of the mTOR Kinase for the Regulation of Maf1 Phosphorylation and Control of RNA Polymerase III-dependent Transcription in Cancer Cells”. *Journal of Biological Chemistry* 285 (20): 15380–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.071639>.
288. Siljee, Jacqueline E., Yi Wang, Adelaide A. Bernard, Baran A. Ersoy, Sumei Zhang, Aaron Marley, Mark Von Zastrow, Jeremy F. Reiter, i Christian Vaisse. 2018. „Subcellular Localization of MC4R with ADCY3 at Neuronal Primary Cilia Underlies a Common Pathway for Genetic Predisposition to Obesity”. *Nature Genetics* 50 (2): 180–85. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0020-9>.
289. Skalecka, Agnieszka, Ewa Liszewska, Robert Bilinski, Christos Gkogkas, Arkady Khoutorsky, Anna R. Malik, Nahum Sonenberg, i Jacek Jaworski. 2016. „mTOR Kinase Is Needed for the Development and Stabilization of Dendritic Arbors in Newly Born Olfactory Bulb Neurons”. *Developmental Neurobiology* 76 (12): 1308–27. <https://doi.org/10.1002/dneu.22392>.
290. Snedeker, John, Elizabeth N. Schock, Jamie N. Struve, Ching-Fang Chang, Megan Cionni, Pamela V. Tran, Samantha A. Brugmann, i Rolf W. Stottmann. 2017. „Unique Spatiotemporal Requirements for Intraflagellar Transport Genes during Forebrain Development”. *PLoS ONE* 12 (3): e0173258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173258>.
291. Song, Yuyu, Laura L. Kirkpatrick, Alexander B. Schilling, Donald L. Helseth, Nicolas Chabot, Jeffrey W. Keillor, Gail V. W. Johnson, i Scott T. Brady. 2013. „Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules”. *Neuron* 78 (1): 109–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.036>.
292. Srsen, Vlastimil, Nicole Gnad, Alexander Dammermann, i Andreas Merdes. 2006. „Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle”. *Journal of Cell Biology* 174 (5): 625–30. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606051>.
293. Stacchiotti, Alessandra, i Giovanni Corsetti. 2020. „Natural Compounds and Autophagy: Allies Against Neurodegeneration”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (wrzesień):555409. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555409>.
294. Stepanova, Tatiana, Jenny Slemmer, Casper C. Hoogenraad, Gideon Lansbergen, Bjorn Dortland, Chris I. De Zeeuw, Frank Grosveld, Gert van Cappellen, Anna Akhmanova, i Niels Galjart. 2003. „Visualization of Microtubule Growth in Cultured Neurons via the Use of EB3-GFP (End-Binding Protein 3-Green Fluorescent Protein)”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (7): 2655–64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02655.2003>.
295. Stoeckli, Esther T. 2018. „Understanding Axon Guidance: Are We Nearly There Yet?” *Development (Cambridge, England)* 145 (10): dev151415. <https://doi.org/10.1242/dev.151415>.
296. Sweeney, H. Lee, i Erika L.F. Holzbaur. 2018. „Motor Proteins”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (5): a021931. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021931>.

297. Swiech, Lukasz, Magdalena Blazejczyk, Malgorzata Urbanska, Patrycja Pietruszka, Bjorn R. Dordland, Anna R. Malik, Phebe S. Wulf, Casper C. Hoogenraad, i Jacek Jaworski. 2011. „CLIP-170 and IQGAP1 Cooperatively Regulate Dendrite Morphology”. *Journal of Neuroscience* 31 (12): 4555–68. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6582-10.2011>.
298. Switon, Katarzyna, Katarzyna Kotulska, Aleksandra Janusz-Kaminska, Justyna Zmorzynska, i Jacek Jaworski. 2016. „Tuberous Sclerosis Complex: From Molecular Biology to Novel Therapeutic Approaches”. *IUBMB Life* 68 (12): 955–62. <https://doi.org/10.1002/iub.1579>.
299. ———. 2017. „Molecular Neurobiology of mTOR”. *Neuropsychologia* 341 (styczeń): 112–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>.
300. Szyk, Agnieszka, Alexandra M. Deaconescu, Jeffrey Spector, Benjamin Goodman, Max L. Valenstein, Natasza E. Ziolkowska, Vasilisa Kormendi, Nikolaus Grigorieff, i Antonina Roll-Mecak. 2014. „Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase”. *Cell* 157 (6): 1405–15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.061>.
301. T, Galbaugh, Cerrito Mg, Jose Cc, i Cutler Ml. 2006. „EGF-Induced Activation of Akt Results in mTOR-Dependent p70S6 Kinase Phosphorylation and Inhibition of HC11 Cell Lactogenic Differentiation”. *BMC Cell Biology* 7 (wrzesień). <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-34>.
302. Takei, N., N. Inamura, M. Kawamura, H. Namba, K. Hara, K. Yonezawa, i H. Nawa. 2004. „Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Mammalian Target of Rapamycin-Dependent Local Activation of Translation Machinery and Protein Synthesis in Neuronal Dendrites”. *Journal of Neuroscience* 24 (44): 9760–69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004>.
303. Tan, Zhu-Jun, Yun Peng, He-Ling Song, Jing-Jing Zheng, i Xiang Yu. 2010. „N-Cadherin-Dependent Neuron-Neuron Interaction Is Required for the Maintenance of Activity-Induced Dendrite Growth”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (21): 9873–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003480107>.
304. Tang, Guomei, Kathryn Gudsnuk, Sheng-Han Kuo, Marisa L. Cotrina, Gorazd Rosoklija, Alexander Sosunov, Mark S. Sonders, i in. 2014. „Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits”. *Neuron* 83 (5): 1131–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>.
305. Tang, Zaiming, Mary Grace Lin, Timothy Richard Stowe, She Chen, Muyuan Zhu, Tim Stearns, Brunella Franco, i Qing Zhong. 2013. „Autophagy Promotes Primary Ciliogenesis by Removing OFD1 from Centriolar Satellites”. *Nature* 502 (7470): 254–57. <https://doi.org/10.1038/nature12606>.
306. Tarkowski, Bartosz, Kinga Kuchcinska, Magdalena Blazejczyk, i Jacek Jaworski. 2019. „Pathological mTOR mutations impact cortical development”. *Human Molecular Genetics* 28 (13): 2107–19. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz042>.

307. Tas, Roderick P., Anaël Chazeau, Bas M. C. Cloin, Maaïke L. A. Lambers, Casper C. Hoogenraad, i Lukas C. Kapitein. 2017. „Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport”. *Neuron* 96 (6): 1264-1271.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.018>.
308. Tempes, Aleksandra, Karolina Bogusz, Agnieszka Brzozowska, Jan Weslawski, Matylda Macias, Oliver Tkaczyk, Aleksandra Lew, i in. 2023. „Autophagy Initiation Triggers p150Glued-AP-2 β Interaction on the Lysosomes to Facilitate Their Transport”. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.06.19.496704>.
309. Tempes, Aleksandra, Karolina Bogusz, Agnieszka Brzozowska, Jan Weslawski, Matylda Macias, Oliver Tkaczyk, Katarzyna Orzoł, i in. 2024. „Autophagy initiation triggers p150Glued-AP-2 β interaction on the lysosomes and facilitates their transport”. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 81 (1): 218. <https://doi.org/10.1007/s00018-024-05256-6>.
310. Tempes, Aleksandra, Jan Weslawski, Agnieszka Brzozowska, i Jacek Jaworski. 2020. „Role of Dynein-Dynactin Complex, Kinesins, Motor Adaptors, and Their Phosphorylation in Dendritogenesis”. *Journal of Neurochemistry* 155 (1): 10–28. <https://doi.org/10.1111/jnc.15010>.
311. Teng, Junlin, Tatemitsu Rai, Yosuke Tanaka, Yosuke Takei, Takao Nakata, Motoyuki Hirasawa, Ashok B. Kulkarni, i Nobutaka Hirokawa. 2005. „The KIF3 Motor Transports N-Cadherin and Organizes the Developing Neuroepithelium”. *Nature Cell Biology* 7 (5): 474–82. <https://doi.org/10.1038/ncb1249>.
312. Terenzio, Marco, Sandip Koley, Nitzan Samra, Ida Rishal, Qian Zhao, Pabitra K. Sahoo, Anatoly Urisman, i in. 2018. „Locally translated mTOR controls axonal local translation in nerve injury”. *Science (New York, N.Y.)* 359 (6382): 1416–21. <https://doi.org/10.1126/science.aan1053>.
313. Thomanetz, Venus, Nico Angliker, Dimitri Cloëtta, Regula M. Lustenberger, Manuel Schweighauser, Filippo Oliveri, Noboru Suzuki, i Markus A. Rüegg. 2013. „Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology”. *The Journal of Cell Biology* 201 (2): 293–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205030>.
314. Tinevez, Jean-Yves, Nick Perry, Johannes Schindelin, Genevieve M. Hoopes, Gregory D. Reynolds, Emmanuel Laplantine, Sebastian Y. Bednarek, Spencer L. Shorte, i Kevin W. Eliceiri. 2017. „TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking”. *Methods, Image Processing for Biologists*, 115 (luty):80–90. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.09.016>.
315. Truong, Melissa E., Sara Bilekova, Semil P. Choksi, Wan Li, Lukasz J. Bugaj, Ke Xu, i Jeremy F. Reiter. 2021. „Vertebrate Cells Differentially Interpret Ciliary and Extraciliary cAMP”. *Cell* 184 (11): 2911-2926.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.002>.

316. Tsai, Victoria, Whitney E. Parker, Ksenia A. Orlova, Marianna Baybis, Anthony W.S. Chi, Benjamin D. Berg, Jacqueline F. Birnbaum, i in. 2014. „Fetal Brain mTOR Signaling Activation in Tuberous Sclerosis Complex”. *Cerebral Cortex (New York, NY)* 24 (2): 315–27. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs310>.
317. Tsai, Yung-Chieh, Tian-Ni Kuo, Yu-Ying Chao, Pei-Rong Lee, Ruei-Ci Lin, Xiao-Yi Xiao, Bu-Miin Huang, i Chia-Yih Wang. 2023. „PDGF-AA Activates AKT and ERK Signaling for Testicular Interstitial Leydig Cell Growth via Primary Cilia”. *Journal of Cellular Biochemistry* 124 (1): 89–102. <https://doi.org/10.1002/jcb.30345>.
318. Twelvetrees, Alison E., Stefano Pernigo, Anneri Sanger, Pedro Guedes-Dias, Giampietro Schiavo, Roberto A. Steiner, Mark P. Dodding, i Erika L. F. Holzbaur. 2016. „The Dynamic Localization of Cytoplasmic Dynein in Neurons Is Driven by Kinesin-1”. *Neuron* 90 (5): 1000–1015. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.046>.
319. Tylkowski, Marco A., Kefei Yang, Sigrid Hoyer-Fender, i Anastassia Stoykova. 2015. „Pax6 Controls Centriole Maturation in Cortical Progenitors through Odf2”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (9): 1795–1809. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1766-1>.
320. Umberger, Nicole L., i Tamara Caspary. 2015. „Ciliary transport regulates PDGF-AA/ α signaling via elevated mammalian target of rapamycin signaling and diminished PP2A activity”. *Molecular Biology of the Cell* 26 (2): 350–58. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-05-0952>.
321. Urbanska, Anna S., Aleksandra Janusz-Kaminska, Katarzyna Switon, Alicia L. Hawthorne, Malgorzata Perycz, Malgorzata Urbanska, Gary J. Bassell, i Jacek Jaworski. 2017. „ZBP1 Phosphorylation at Serine 181 Regulates Its Dendritic Transport and the Development of Dendritic Trees of Hippocampal Neurons”. *Scientific Reports* 7 (1): 1876. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01963-2>.
322. Urbanska, Malgorzata, Agata Gozdz, Lukasz J. Swiech, i Jacek Jaworski. 2012. „Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) Control the Dendritic Arbor Morphology of Hippocampal Neurons”. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (36): 30240–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374405>.
323. Uysal, gaba, i Mustafa Şahin. 2020. „Tuberous Sclerosis: A Review of the Past, Present, and Future”. *Turkish Journal of Medical Sciences* 50 (SI-2): 1665–76. <https://doi.org/10.3906/sag-2002-133>.
324. Vaart, Babet van der, Wilhelmina E. van Riel, Harinath Doodhi, Josta T. Kevenaar, Eugene A. Katrukha, Laura Gummy, Benjamin P. Bouchet, i in. 2013. „CFEOM1-Associated Kinesin KIF21A Is a Cortical Microtubule Growth Inhibitor”. *Developmental Cell* 27 (2): 145–60. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.010>.
325. Vale, Ronald D. 2003. „The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport”. *Cell* 112 (4): 467–80. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00111-9).

326. van Spronsen, Myrre, Marina Mikhaylova, Joanna Lipka, Max A. Schlager, Dave J. van den Heuvel, Marijn Kuijpers, Phebe S. Wulf, i in. 2013. „TRAK/Milton Motor-Adaptor Proteins Steer Mitochondrial Trafficking to Axons and Dendrites”. *Neuron* 77 (3): 485–502. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.027>.
327. Verhey, Kristen J., i Jennetta W. Hammond. 2009. „Traffic Control: Regulation of Kinesin Motors”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (11): 765–77. <https://doi.org/10.1038/nrm2782>.
328. Vries, Petrus J. de, Vicky H. Whittemore, Loren Leclezio, Anna W. Byars, David Dunn, Kevin C. Ess, Dena Hook, Bryan H. King, Mustafa Sahin, i Anna Jansen. 2015. „Tuberous Sclerosis Associated Neuropsychiatric Disorders (TAND) and the TAND Checklist”. *Pediatric Neurology* 52 (1): 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.10.004>.
329. Wang, Bingjie, Lili Hu, Zehui Sun, i Yan Zhang. 2019. „Cilia Function Is Associated with Axon Initial Segment Morphology”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 516 (1): 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.172>.
330. Wang, Shixuan, Man J Livingston, Yunchao Su, i Zheng Dong. 2015. „Reciprocal regulation of cilia and autophagy via the MTOR and proteasome pathways”. *Autophagy* 11 (4): 607–16. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1023983>.
331. Wang, Xinnan, i Thomas L. Schwarz. 2009. „The Mechanism of Ca²⁺-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility”. *Cell* 136 (1): 163–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.046>.
332. Wang, Zhou-Guang, Hao Li, Yan Huang, Rui Li, Xiao-Fan Wang, Li-Xia Yu, Xue-Qiang Guang, i in. 2016. „Nerve growth factor-induced Akt/mTOR activation protects the ischemic heart via restoring autophagic flux and attenuating ubiquitinated protein accumulation”. *Oncotarget* 8 (3): 5400–5413. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14284>.
333. Webb, Stephanie, Aakash G. Mukhopadhyay, i Anthony J. Roberts. 2020. „Intraflagellar transport trains and motors: Insights from structure”. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 107 (listopad):82–90. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.021>.
334. Wehland, J., i K. Weber. 1987. „Turnover of the Carboxy-Terminal Tyrosine of Alpha-Tubulin and Means of Reaching Elevated Levels of Detyrosination in Living Cells”. *Journal of Cell Science* 88 (Pt 2) (wrzesień):185–203. <https://doi.org/10.1242/jcs.88.2.185>.
335. Wei, Shi, Miaomiao Dai, Chi Zhang, Kai Teng, Fengwei Wang, Hongbo Li, Weipeng Sun, i in. 2021. „KIF2C: A Novel Link between Wnt/β-Catenin and mTORC1 Signaling in the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma”. *Protein & Cell* 12 (10): 788–809. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00766-y>.
336. Welburn, Julie P I. 2013. „The Molecular Basis for Kinesin Functional Specificity During Mitosis”. *Cytoskeleton (Hoboken, N.j.)* 70 (9): 476–93. <https://doi.org/10.1002/cm.21135>.

337. Wickstead, Bill, Keith Gull, i Thomas A Richards. 2010. „Patterns of kinesin evolution reveal a complex ancestral eukaryote with a multifunctional cytoskeleton”. *BMC Evolutionary Biology* 10 (kwiecień):110. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-110>.
338. Williams, Philip R., Larry I. Benowitz, Jeffrey L. Goldberg, i Zhigang He. 2020. „Axon Regeneration in the Mammalian Optic Nerve”. *Annual Review of Vision Science* 6 (1): 195–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-022720-094953>.
339. Wong, Esther S.P., Jeanne M.M. Tan, Wen-E Soong, Kamila Hussein, Nobuyuki Nukina, Valina L. Dawson, Ted M. Dawson, Ana Maria Cuervo, i Kah-Leong Lim. 2008. „Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon”. *Human Molecular Genetics* 17 (16): 2570–82. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn157>.
340. Xia, Chun-Hong, Elizabeth A. Roberts, Lu-Shiun Her, Xinran Liu, David S. Williams, Don W. Cleveland, i Lawrence S. B. Goldstein. 2003. „Abnormal Neurofilament Transport Caused by Targeted Disruption of Neuronal Kinesin Heavy Chain KIF5A”. *The Journal of Cell Biology* 161 (1): 55–66. <https://doi.org/10.1083/jcb.200301026>.
341. Xu, Ke, Guisheng Zhong, i Xiaowei Zhuang. 2013. „Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons”. *Science (New York, N.Y.)* 339 (6118): 452–56. <https://doi.org/10.1126/science.1232251>.
342. Yamamoto, Yasuhiro, i Noboru Mizushima. 2021. „Autophagy and Ciliogenesis”. *JMA Journal* 4 (3): 207–15. <https://doi.org/10.31662/jmaj.2021-0090>.
343. Yan, Jing, Dan L Chao, Shiori Toba, Kotaro Koyasako, Takuo Yasunaga, Shinji Hirotsune, i Kang Shen. 2013. „Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in *Caenorhabditis elegans*”. *eLife* 2 (marzec):e00133. <https://doi.org/10.7554/eLife.00133>.
344. Ye, Peiying, Yu Liu, Chong Chen, Fei Tang, Qi Wu, Xiang Wang, Chang-Gong Liu, i in. 2015. „An mTORC1-Mdm2-Drosha Axis for miRNA Biogenesis in Response to Glucose- and Amino Acid-Deprivation”. *Molecular Cell* 57 (4): 708–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.034>.
345. Yin, Xiling, Yosuke Takei, Mizuho A. Kido, i Nobutaka Hirokawa. 2011. „Molecular Motor KIF17 Is Fundamental for Memory and Learning via Differential Support of Synaptic NR2A/2B Levels”. *Neuron* 70 (2): 310–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.049>.
346. Yogevev, Shaul, Roshni Cooper, Richard Fetter, Mark Horowitz, i Kang Shen. 2016. „Microtubule organization determines axonal transport dynamics”. *Neuron* 92 (2): 449–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.036>.
347. Yonehara, Ryo, Shigeyuki Nada, Tomokazu Nakai, Masahiro Nakai, Ayaka Kitamura, Akira Ogawa, Hirokazu Nakatsumi, i in. 2017. „Structural Basis for the Assembly of the Regulator-Rag GTPase Complex”. *Nature Communications* 8 (1): 1625. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01762-3>.

348. Yuan, Elizabeth, Peter T. Tsai, Emily Greene-Colozzi, Mustafa Sahin, David J. Kwiatkowski, i Izabela A. Malinowska. 2012. „Graded loss of tuberlin in an allelic series of brain models of TSC correlates with survival, and biochemical, histological and behavioral features”. *Human Molecular Genetics* 21 (19): 4286–4300. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds262>.
349. Yue, Yang, T. Lynne Blasius, Stephanie Zhang, Shashank Jariwala, Benjamin Walker, Barry J. Grant, Jared C. Cochran, i Kristen J. Verhey. 2018. „Altered chemomechanical coupling causes impaired motility of the kinesin-4 motors KIF27 and KIF7”. *The Journal of Cell Biology* 217 (4): 1319–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708179>.
350. Yue, Yang, Martin F. Engelke, T. Lynne Blasius, i Kristen J. Verhey. 2022. „Hedgehog-induced ciliary trafficking of kinesin-4 motor KIF7 requires intraflagellar transport but not KIF7’s microtubule binding”. *Molecular Biology of the Cell* 33 (1): br1. <https://doi.org/10.1091/mbc.E21-04-0215>.
351. Zhang, Bo, Sharon S. McDaniel, Nicholas R. Rensing, i Michael Wong. 2013. „Vigabatrin Inhibits Seizures and mTOR Pathway Activation in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis Complex”. *PLoS One* 8 (2): e57445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057445>.
352. Zhang, Kai, Wen-Han Hu, Chao Zhang, Fan-Gang Meng, Ning Chen, i Jian-Guo Zhang. 2013. „Predictors of Seizure Freedom after Surgical Management of Tuberous Sclerosis Complex: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Epilepsy Research* 105 (3): 377–83. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.02.016>.
353. Zhao, Chunjie, Junko Takita, Yosuke Tanaka, Mitsutoshi Setou, Terunaga Nakagawa, Sen Takeda, Hong Wei Yang, i in. 2001. „Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2A Caused by Mutation in a Microtubule Motor KIF1B β ”. *Cell* 105 (5): 587–97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00363-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00363-4).
354. Zheng, Rui, Yonglan Du, Xintai Wang, Tailin Liao, Zhe Zhang, Na Wang, Xiumao Li, i in. 2022. „KIF2C Regulates Synaptic Plasticity and Cognition in Mice through Dynamic Microtubule Depolymerization”. *eLife* 11 (luty):e72483. <https://doi.org/10.7554/eLife.72483>.
355. Zinsmaier, Konrad E., Milos Babic, i Gary J. Russo. 2009. „Mitochondrial Transport Dynamics in Axons and Dendrites”. *Results and Problems in Cell Differentiation* 48:107–39. https://doi.org/10.1007/400_2009_20.

8. PUBLIKACJE DOKTORANTA

1. Tempes A*, Bogusz K*, Brzozowska A*, Weslawski J*, Macias M, Tkaczyk O, Orzol K, Lew A, Calka-Kresa M, Bernas T, Szepankiewicz A.A, Mlostek M, Kumari S, Liszewska E, Machnicka K, Bakun M, Rubel T, Malik A.R, Jaworski J. (2024) **Autophagy initiation triggers p150^{Glued}-AP-2 β interaction on the lysosomes and facilitates their transport.** *Cell. Mol. Life Sci.*, 81(1):218 .
2. Janusz-Kaminska A, Brzozowska A, Tempes A, Urbanska M, Blazejczyk M, Milek J, Kuzniewska B, Zeng J, Weslawski J, Kisielewska K, Bassell G.J, Jaworski J. (2024) **Rab11 regulates autophagy at dendritic spines in an mTOR- and NMDA-dependent manner.** *Mol. Biol. Cell*, 35(3):ar43.
3. Panasiuk M, Chraniuk M, Zimmer K, Hovhannisyan L, Krapchev V, Peszynska-Sularz G, Narajczyk M, Weslawski J, Konopacka A, Gromadzka B. (2023) **Characterization of surface-exposed structural loops as insertion sites for foreign antigen delivery in calicivirus-derived VLP platform.** *Front.Microbiol.*, 14:1111947.
4. Tempes A*, Weslawski J*, Brzozowska A, Jaworski J. (2020) **Role of dynein-dynactin complex, kinesins, motor adaptors and their phosphorylation in dendritogenesis.** *J. Neurochemistry*, 155(1):10-28.

* równy wkład pracy

9. SPIS FILMÓW

Rozdział	Film	Opis	Link
4.2.2	Film 1	Analiza mobilności wybranych kinezyń w neuronach - KIF21Bt-GFP	https://youtu.be/Z8YHShEFiaA
4.2.2	Film 2	Analiza mobilności wybranych kinezyń w neuronach- KIF22t-GFP	https://youtu.be/61qCMVI4TmE
4.2.3	Film 3	Dynamika komet EB3-GFP w neuronach- Ktrl	https://youtu.be/CKSdLpNjL3E
4.2.3	Film 4	Dynamika komet EB3-GFP w neuronach - shTSC2	https://youtu.be/ESEfspi46aM
4.2.3	Film 5	Dynamika komet EB3-GFP w neuronach-shTSC2+shKIF21B	https://youtu.be/txpNcTe3fDE
4.2.3.1	Film 6	Modele 3D rzęsek - obrót projekcji 3D neuronu numer 1	https://youtu.be/DHVhLltEFGg
4.2.3.1	Film 7	Modele 3D rzęsek - obrót projekcji 3D neuronu numer 2	https://youtu.be/2C_tIwuJ26E
4.3.4	Film 8	Ruch LAMP1-GFP w Rat2 - pLKO-pULTRA	https://youtu.be/foBOK6SoW9U
4.3.4	Film 9	Ruch LAMP1-GFP w Rat2 - pLKO-shKIF3A	https://youtu.be/QsP_jQMHX5k
4.3.4	Film 10	Ruch LAMP1-GFP w Rat2 - pLKO-shKIF3C	https://youtu.be/47sQg6nnIa4
4.3.4	Film 11	Ruch LAMP1-GFP w Rat2- shTSC2-pULTRA	https://youtu.be/QQN6_sXGZ3o
4.3.4	Film 12	Ruch LAMP1-GFP w Rat2 - shTSC2-shKIF3A	https://youtu.be/7CaN24uA9-U
4.3.4	Film 13	Ruch LAMP1-GFP w Rat2- shTSC2-shKIF3C	https://youtu.be/TW_VysjgxX0