



instytut biologii doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego PAN

Beata Kliszcz

**Mechanizm przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie
przez kinezynę-1 oraz znaczenie wybranych modyfikacji
potranslacyjnych tubuliny w tym procesie**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Białek Motorycznych

Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Andrzej A. Kasprzak

Warszawa, 2022

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim, dzięki którym ta praca powstała. Szczególne wyrazy wdzięczności kieruję wobec promotora niniejszej pracy – Pana prof. Andrzeja Kasprzaka przede wszystkim za umożliwienie mi prowadzenia badań w Pracowni Białek Motorycznych, za opiekę naukową, merytoryczne wsparcie i dyskusje w trakcie wykonywania badań i przygotowywania rozprawy, cenne wskazówki organizacyjne, a także za cierpliwość, wyrozumiałość, życzliwość, motywowanie mnie do sceptycznego podejścia w badaniach naukowych oraz rozwijania ciekawości naukowej.

Dziękuję byłym pracownikom i doktorantom Pracowni Białek Motorycznych za koleżeńską atmosferę sprzyjającą pracy badawczej i rozwojowi, a także: dr Ewie Szczęsnej za wprowadzenie mnie w metodykę dotyczącą mikrotubul, motorów molekularnych oraz mikroskopii TIRF, dr Jarosławowi Grzędzielowi za pomoc w klonowaniu niektórych konstruktów użytych w niniejszej pracy, dr Michałowi Szkopowi za liczne dyskusje naukowe, inspirację do nieszablonowego podejścia w pracy badawczej, a w szczególności za owocną współpracę w ustawieniu testu ruchu mikrotubula-mikrotubula dla kinezy-1, który stanowi podstawę niniejszej pracy.

Chciałabym również wyrazić głęboką wdzięczność Pani prof. Marii Jolancie Rędownicz przede wszystkim za możliwość kontynuacji pracy w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, za pomocne wskazówki organizacyjne, a także za życzliwość, wsparcie i troskę. Dziękuję również pracownikom i doktorantom Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych – dr Lili Lehkiej, mgr Dominice Wojton, dr Annie Grabowskiej oraz dr Olenie Karatsai za miłą atmosferę w pracowni.

Pragnę jeszcze osobno wyrazić wdzięczność Pani dr Dorocie Włodze oraz Panu prof. Krzysztofowi Skowronkowi za wskazówki merytoryczne i praktyczne, które pomogły rozwiązać niektóre problemy techniczne w biologii molekularnej i produkcji białek. Dziękuję również Pani dr Hannie Nieznańskiej za zobrazowanie mikrotubul używanych w badaniach z niniejszej pracy za pomocą mikroskopii elektronowej.

Równie ważne podziękowania pragnę złożyć moim bliskim – dzięki Waszej obecności wytrzymałam do końca. Dziękuję Rodzicom za niezawodne wsparcie i motywowanie mnie do rozwijania się, Rodzeństwu – Gabrysi, Kamilowi i Karolowi za to, że zawsze mogłam na Was liczyć, moim Przyjaciołom – Ewie, Gosi, Samowi, Nikeshowi, Tomowi, Bartkowi i Oldze za wsparcie oraz entuzjazm, który mnie napędzał do działania.

Beata Kliszcz

Spis treści

Wykaz skrótów.....	7
1. Wstęp.....	8
1.1 Mikrotubule	9
1.1.1 Dynamiczna niestabilność mikrotubul	10
1.1.2 Nukleacja mikrotubul	11
1.1.3 Kod tubulinowy. Izotypy tubuliny	12
1.1.4 Kod tubulinowy. Modyfikacje potranslacyjne tubuliny	14
1.1.5 Tyrozynacja i detyrozynacja	16
1.1.6 Glutamylicacja	17
1.1.7 Inne modyfikacje potranslacyjne tubuliny.....	19
1.1.8 Białka wiążące mikrotubule	21
1.2 Kinezyzny	22
1.2.1 Ogólna charakterystyka kinezyzn i ich funkcje	22
1.2.2 Parametry charakteryzujące ruch kinezyzn	24
1.2.3 Budowa, właściwości i funkcje kinezyzny-1.....	25
1.2.4 Mechanizm generacji ruchu przez kinezyzę-1.....	27
1.2.5 Autoregulacja aktywności kinezyzny	30
1.3 Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie jest generowane przez kilka białek motorycznych.....	31
1.3.1 Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyzę-1	38
1.4 Transport ładunków przez grupy kinezyzn	42
1.5 Regulacja aktywności motorów molekularnych przez modyfikacje potranslacyjne tubuliny	45
2. Cel pracy.....	49
3. Materiały.....	50
3.1 Szczepy bakterii.....	50
3.2 Plazmidy do nadprodukcji białek	50
3.3 Pożywki do hodowli bakteryjnych.....	51
3.4 Bufory.....	51
4. Metody.....	54
4.1 Przygotowywanie konstruktów DNA do produkcji białek rekombinowanych.....	54
4.1.1 Hodowla bakteryjna	54
4.1.2 Izolacja DNA plazmidowego.....	54
4.1.3 Przygotowanie bakterii chemokompetentnych i transformacja wybranym plazmidem.....	54
4.1.4 Klonowanie molekularne	55

4.1.5	Mutageneza ukierunkowana	56
4.1.6	Łańcuchowa reakcja polimerazy	56
4.1.7	Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	57
4.1.8	Elektroforeza agarozowa	58
4.1.9	Izolacja DNA z żelu	58
4.1.10	Fosforylacja DNA	58
4.1.11	Ligacja	59
4.2	Produkcja i oczyszczanie białek	59
4.2.1	Chromatografia powinowactwa	59
4.3	Podstawowe metody analizy białek	60
4.3.1	Rozdział białek w żelu poliakryloamidowym	60
4.3.2	Western blot	61
4.3.3	Oznaczenie stężenia białek metodą Bradforda	62
4.4	Tubulina	62
4.4.1	Oczyszczanie tubuliny w formie natywnej	62
4.4.2	Znakowanie fluorescencyjne tubuliny	63
4.4.3	Przyłączanie biotyny do reszt aminowych tubuliny	64
4.4.4	Dodatkowe oczyszczanie tubuliny na poduszce glicerolowej	65
4.4.5	Mikrotubule do mikroskopii TIRF	66
4.4.6	Przygotowanie polarnie znakowanych mikrotubul	67
4.5	Mikroskopia elektronowa	68
4.6	Przeprowadzanie modyfikacji potranslacyjnych tubuliny <i>in vitro</i>	68
4.6.1	Tyrozynacja	68
4.6.2	Detyrozynacja	70
4.6.3	Glutamylicacja	71
4.7	Ekspresja i oczyszczanie kinezy-1 pełnej długości i jej wariantu bez zawiasu-2	72
4.7.1	Test wiązania kinezy-1 do mikrotubul	75
4.8	Mikroskopia TIRF – badanie podstawowych parametrów ruchu kinezy-1	79
4.8.1	Opis mikroskopii TIRF	79
4.8.2	Przygotowanie szkiełek silanizowanych	81
4.8.3	Przygotowanie szkiełek niehydrofobowych	83
4.8.4	Przygotowanie mikrokanalów ze szkiełek do badań	83
4.8.5	Ruch pojedynczych cząsteczek kinezy-1 po mikrotubulach	84
4.8.6	Test gliding	85
4.8.7	Test wygaszania pojedynczych cząsteczek	87
4.8.8	Mikroskopia TIRF - przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1	88

4.8.9	Wpływ stężenia kinezy-1 na wybrane parametry przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie.....	89
4.9	Metody używane do obliczeń uzyskanych wyników.....	89
5.	Wyniki	91
5.1	Testy ruchliwości kinezy-1 – gliding oraz analiza pojedynczych cząsteczek	91
5.2	Opracowanie powtarzalnych warunków eksperymentalnych testu przesuwania mikrotubul przez kinezynę-1.....	96
5.2.1	Eksperyment kontrolny ruchu mikrotubula-mikrotubula.....	98
5.3	Wpływ stężenia kinezy-1 na wybrane parametry przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie.....	101
5.3.1	Długość przebiegu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie	101
5.3.2	Czas trwania ruchu mikrotubula-mikrotubula	102
5.3.3	Analiza szybkości przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie	103
5.3.4	Przerwy podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula.....	104
5.3.5	Liczba zdarzeń przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie a stężenie kinezy-1	105
5.4	Wpływ długości mikrotubul na parametry przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie	106
5.5	Fluktuacje szybkości transportu mikrotubul oraz przerwy w ruchu w teście przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1.....	109
5.6	Wpływ elastycznego zawiasu-2 kinezy-1 w ruchu mikrotubula-mikrotubula.....	112
5.7	Kierunek transportu mikrotubul przez kinezynę-1 podczas testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie	118
5.8	Użycie mikrotubul znakowanych umożliwiło określenie wzajemnej orientacji mikrotubul podczas ruchu	121
5.9	Wiązki mikrotubul	131
5.10	Kinezy-1 organizuje mikrotubule <i>in vitro</i> . Obracanie mikrotubul i zmiana kierunku transportu tej samej mikrotubuli.....	137
5.11	Modyfikacje potranslacyjne tubuliny	145
5.11.1	Tyrozynacja i detyrozynacja tubuliny	145
5.11.2	Glutamylicacja tubuliny	148
6.	Dyskusja	151
6.1	Molekularne aspekty przesuwania i reorientacji mikrotubul przez pojedyncze cząsteczki lub grupy kinezyn <i>in vitro</i>	151
6.2	Zależność parametrów ruchu mikrotubula-mikrotubula od stężenia kinezy-1	158
6.3	Kinezy-1 podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula transportuje zarówno antyrównoległe, jak i równoległe mikrotubule.....	161
6.4	Znaczenie elastycznego zawiasu-2 kinezy-1 w przesuwaniu dwóch mikrotubul względem siebie.....	166
6.5	Znaczenie zjawisk opisanych w obecnej pracy.....	167

6.6 Regulacja ruchu mikrotubula-mikrotubula napędzanego przez kinezyne-1. Znaczenie modyfikacji potranslacyjnych mikrotubul.....	169
7. Wnioski	172
8. Spis filmów	173
9. Streszczenie.....	176
10.Summary	178
11.Spis publikacji doktoranta i źródła finansowania.....	180
Cytowane prace	181

Wykaz skrótów

ATP - adenozyno-5'-trifosforan

BCIP - 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan

BSA – surowicza albumina wołowa

DMSO – dimetylosulfotlenek

DTT – ditiotreitrol

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EGTA – kwas etylenoglikolo-O-O'-bis(2-aminoetylo)-N,N,N',N'-tetraoctowy

GTP – guanozyno-5'-trifosforan

IPTG – izopropylotiogalaktozyd

kDa – kilodalton

kpz – 1000 par zasad

NBT - błękit nitrotetrazolowy – chlorek, ang. *nitro blue tetrazolium*

Ncd – kinezyrna-14; ang. *non-claret disjunctional*

PIPES – kwas piperazylo-N,N'-bis(2-etanosulfonowy)

PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PMSF – fluorek fenylometylosulfonylu

rpm – obroty na minutę

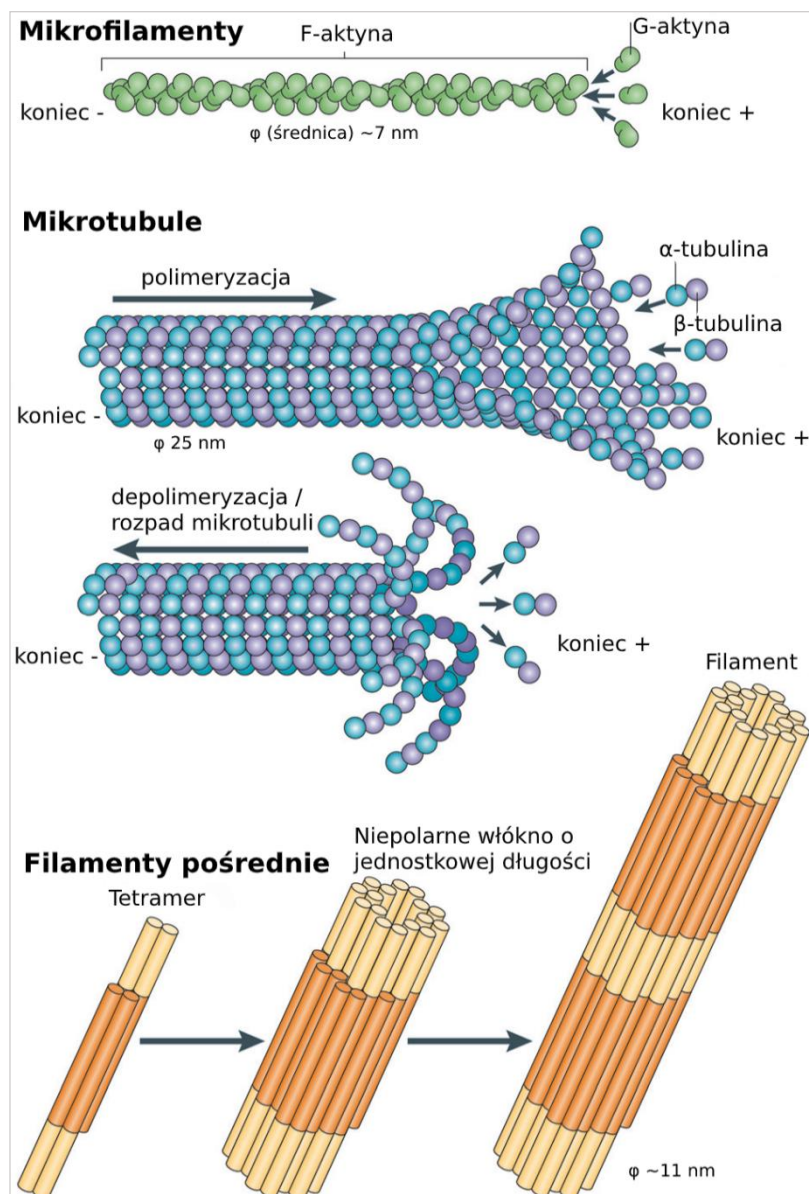
Tris – tris(hydroksymetylo)aminometan

v/v - stężenie objętościowo-objętościowe

w/v – stężenie wagowo-objętościowe

1. Wstęp

Każdy organizm funkcjonuje dzięki jego podstawowym elementom, czyli komórkom. Pojedynczą komórkę można porównać do miasta, działającego w sposób wysoce uporządkowany, co jest możliwe m.in. dzięki sprawnemu transportowi wewnątrzkomórkowemu. Ze względu na to, że dyfuzja jest efektywna tylko na małe odległości, komórki wykształciły w toku ewolucji białka wyspecjalizowane w transporcie, czyli białka motoryczne oddziałujące z elementami cytoszkieletu. Cytoszkielet składa się z trzech komponentów: filamentów pośrednich, mikrofilamentów (filamentów aktynowych) i mikrotubul (Ryc. 1.1). Z kolei wśród białek motorycznych wyróżnia się: kinezy i dyneiny, które oddziałują z mikrotubulami oraz miozyny związane z mikrofilamentami.



Ryc. 1.1 Elementy cytoszkieletu (Mostowy i Cossart, 2012; zmienione)

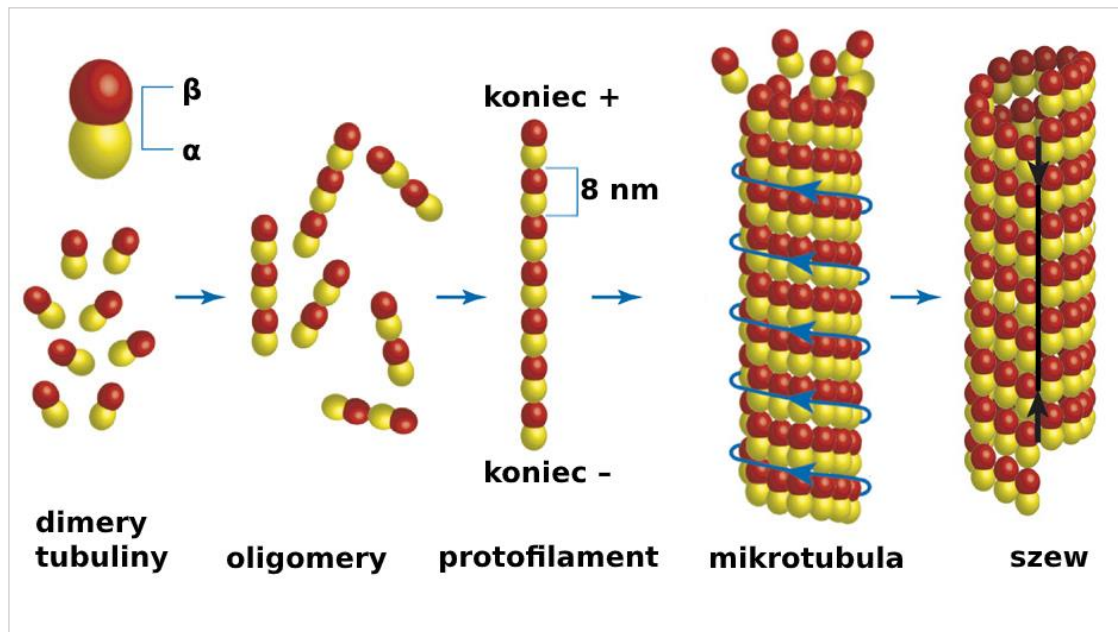
Poza transportem, cytoszkielet pełni również funkcję podporową, nadaje kształt komórce, umożliwia podział komórki, a także ruch i migrację całych komórek. Składniki cytoszkieletu składają się z monomerów i mają charakter dynamiczny, co pozwala na wymianę podjednostek albo przebudowę istniejącej sieci filamentów lub mikrotubul (Ryc. 1.1). Ponadto, mikrotubule, mikrofilamenty i filamenty pośrednie są ze sobą połączone za pośrednictwem oddziałujących z nimi białek, co sprawia, że cytoszkielet stanowi funkcjonalną całość. Cechy te w konsekwencji umożliwiają płynną odpowiedź na bodźce zewnątrzkomórkowe lub wewnątrzkomórkowe albo też przenoszenie informacji (Finkenstaedt-Quinn i wsp., 2016; Fabczak i wsp., 2018; Kliszcz i wsp., 2018). W dalszej części niniejszej pracy zostaną omówione zagadnienia związane z mikrotubulami i kinezynami.

1.1 Mikrotubule

Mikrotubule są polimerami heterodimerów tubuliny, składającej się z podjednostek α i β . Tubulina jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych białek u organizmów wyższych. Wyróżnia się kilka rodzin tubuliny: α , β , γ , δ , ϵ , ζ i η -tubulinę, z czego α , β i γ są obecne u wszystkich eukariotów (McKean i wsp., 2001). Sekwencja tubuliny α i β jest w wysokim stopniu zachowana w ewolucji (Findeisen i wsp., 2014). Poza tym, podjednostki tubuliny, każda o masie cząsteczkowej ok. 55 kDa są w 36–42% identyczne, a w 63% homologiczne (Little i wsp., 1988; Burns, 1991). Tubulina składa się z globularnej części, tzw. „ciała/rdzenia”, liczącej ok. 430-440 aminokwasów i nieustrukturyzowanego, naładowanego ujemnie ogona na końcu karboksylowym, o długości 10-12 aminokwasów w podjednostce α i 16-22 w podjednostce β (Nogales i wsp., 1998; Roll-Mecak, 2015).

Heterodimery α i β -tubuliny łączą się w liniowy polimer, czyli protofilament, a około 11-16 takich protofilamentów tworzy mikrotubulę (Ryc. 1.2). Protofilamenty, jak i mikrotubule mają naturę polarną, tzn. na końcu minus jest α , a na końcu plus β -tubulina. Na końcu plus obserwuje się szybszą polimeryzację. Rdzeń tubuliny uczestniczy w interakcjach między podjednostkami α i β -tubuliny w dimerze, ale też między dimerami z sąsiednich protofilamentów w mikrotubuli (Ryc. 1.2). Z kolei ogony C-końcowe każdej z podjednostek są położone na zewnętrznej powierzchni mikrotubuli i uczestniczą w interakcjach z motorami molekularnymi i białkami związanymi

z mikrotubulami (tzw. MAPs, ang. *microtubule-associated proteins*) (Roll-Mecak, 2020; Janke i Magiera, 2020).



Ryc. 1.2 Struktura mikrotubuli (Pampaloni i Florin, 2008; zmienione)

W komórkach o wydłużonym kształcie, np. neuronach lub komórkach naskórka, mikrotubule są ułożone liniowo, a nie promieniście jak ma to miejsce w komórkach o okrągłym kształcie. W dodatku, albo są one równoległe z końcami plus skierowanymi jednolicie w kierunku dystalnej części komórki lub na odwrót, albo też antyrównoległe, czyli część mikrotubul ma końce plus skierowane w kierunku ciała komórki, a reszta w kierunku dystalnego obszaru komórki (Sanchez i Feldman, 2017; Kliszcz i Kasprzak, 2018).

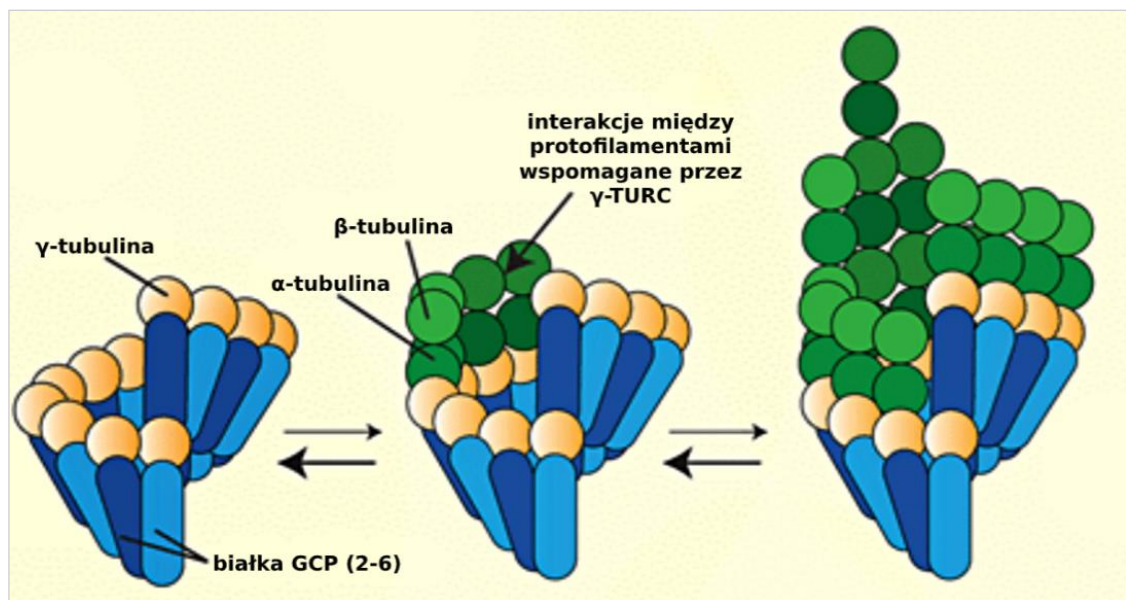
1.1.1 Dynamiczna niestabilność mikrotubul

Zarówno α , jak i β -tubulina wiążą GTP, przy czym w podjednostce α jest on niewymienialny. Podczas przyłączenia (do tworzącej się mikrotubuli) α,β -tubuliny zawierającej GTP w podjednostce β , nukleotyd jest hydrolizowany, co jest podstawą dynamicznej niestabilności (Mitchison i Kirschner, 1984). Precyzując, dynamiczna niestabilność mikrotubul jest związana z tym, że przechodzą one stochastycznie okresy wzrostu i skracania się, co pozwala komórce na szybką reorganizację cytoszkieletu, gdy jest to konieczne. Dynamiczne mikrotubule mają krótki czas trwania i są stale w procesie odtwarzania. Wzrost i kurczenie się mikrotubul mogą być szybkie, rzędu kilku minut (Brouhard i Rice, 2018).

Dimer GTP tubuliny ma prostą, niezakrzywioną konformację i wpasowuje się w ścianę mikrotubuli, natomiast wskutek hydrolizy GTP konformacja tubuliny ulega zmianie. GDP-tubulina jest zakrzywiona i skierowana na zewnątrz od powierzchni mikrotubuli. W konsekwencji całe protofilamenty złożone z GDP-tubuliny odginają się (por. Ryc. 1.1), co prowadzi do szybkiego i nagłego rozpadu mikrotubuli, czyli tzw. „katastrofy” (Coombes i wsp., 2013).

1.1.2 Nukleacja mikrotubul

Ważnym elementem sieci mikrotubul w komórce są centra nukleacji (ang. *microtubule-organizing center*, *MTOC*), czyli miejsce startu polimeryzacji mikrotubuli. Głównym nukleotorem mikrotubul jest tzw. pierścień nukleacji (ang. *γ -tubulin ring complex*, *γ -TuRC*), czyli wielobiałkowy kompleks γ -tubuliny i białek GPC2-6, ułożonych razem w kształt otwartego pierścienia (Ryc. 1.3).



Ryc. 1.3 Kompleks pierścieniowy γ -tubuliny (Tovey i Conduit, 2018; zmienione)

Kompleks γ TuRC może być rekrutowany do różnych centrów nukleacji, takich jak centrosom, aparat Golgiego, otoczka jądrowa, kora komórki, mitochondrium, a nawet powierzchnia istniejących mikrotubul przy udziale białka augminy (Tovey i Conduit, 2018). W dzielących się komórkach zwierzęcych głównym centrum nukleacji jest centrosom, a w zróżnicowanych – w większości niecentrosomalne centra nukleacji. W neuronach w początkowych fazach różnicowania centrosom nadal pełni funkcję centrum nukleacji, a powstające mikrotubule są przycinane przez białka tnące mikrotubule (np. kataninę i spastynę) i transportowane do dystalnych części komórki przez białka motoryczne.

Białka tnące mikrotubule – katanina i spastyna mogą również „odcinać” fragmenty już istniejących mikrotubul w dystalnych częściach neuronu. Jednym z celów takiego zabiegu (poza precyzyjną reorganizacją sieci mikrotubul) jest promocja polimeryzacji nowych mikrotubul z użyciem odciętych fragmentów. Wiele badań potwierdza ten model (Yu i wsp., 2008; McNally i Roll-Mecak, 2018; Kuo i wsp., 2019).

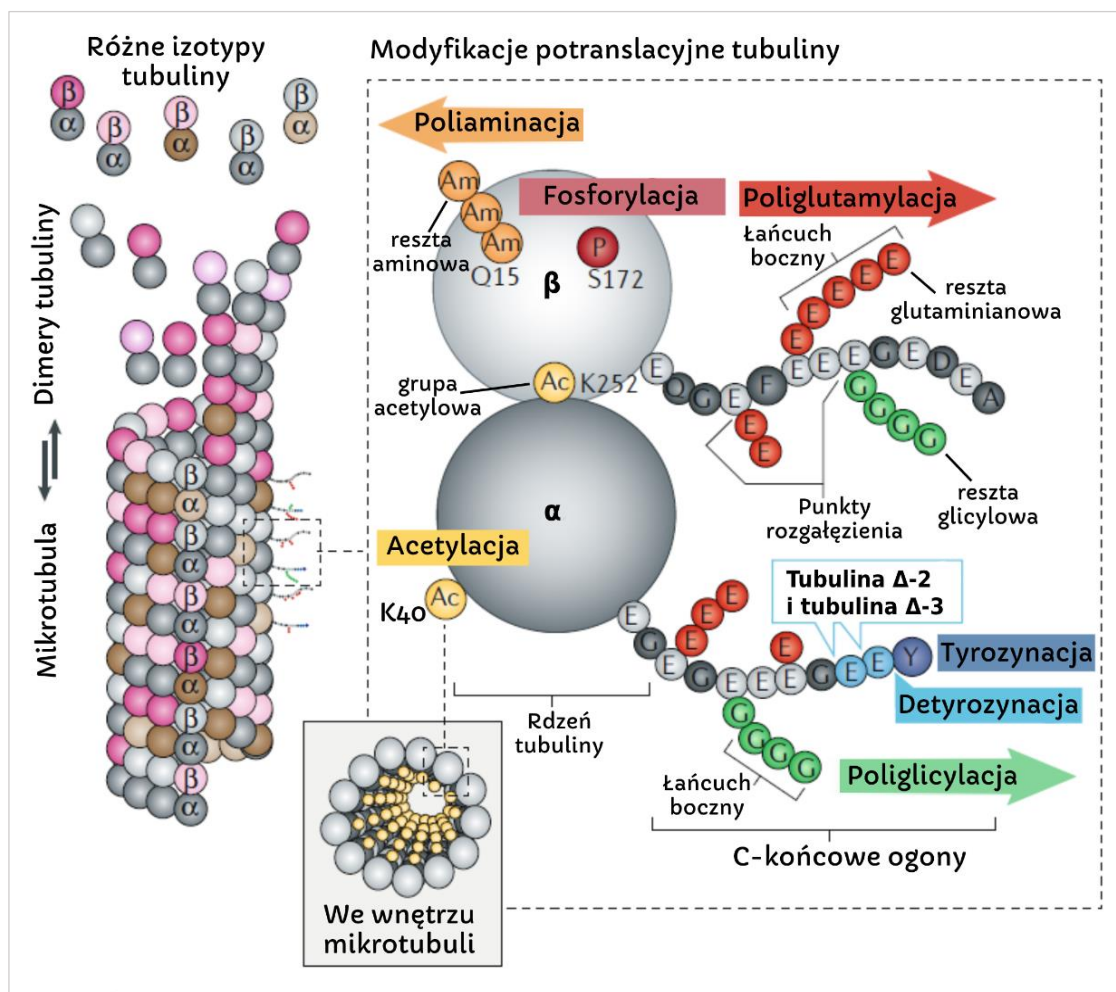
1.1.3 Kod tubulinowy. Izotypy tubuliny

Tubuliny mają wysoki stopień homologii strukturalnej, szczególnie, jeśli chodzi o rdzeń cząsteczki (ang. *tubulin body*), ale różnią się od siebie sekwencjami na końcu karboksylowym (C-końcowy ogon, ang. *C-terminal tail*, *CTT*), co stanowiło podstawę do wyodrębnienia różnych izotypów tubuliny (Ryc. 1.4).

α-tubulina		β-tubulina	
TubA1A	DMAALEKDYEEVGVDS VEGEGEEEGEEY	TubB1	YQQYQDATA EEEEDFGEEAEEEA
TubA1B	DMAALEKDYEEVGVDS VEGEGEEEGEEY	TubB2A	YQQYQDATA DEQGEFEEEEGEDEA
TubA1C	DMAALEKDYEEVGVDS ADGEDEGEEY	TubB2B	YQQYQDATA DEQGEFEEEEGEDEA
TubA3C	DLAALEKDYEEVGVDS VEAEAEEGEEY	TubB3	YQQYQDATA EEEGEMYEDDEEESEAQGPK
TubA3E	DLAALEKDC EEVGVDSVEAEAEEGEAY	TubB4A	YQQYQDATA EEGEGEFAEEEA
TubA4A	DMAALEKDYEEVGVDS YEDEDEGEE	TubB4B	YQQYQDATA EEGEGEFAEEEA
TubA8	DLAALEKDYEEVGVDS FEENEGEREF	TubB5	YQQYQDATA NDGEEAFEDDEEIDG
		TubB6	YQQ FQDAKAVLEEDDEEVTEEAEMEPEDKGH
		TubB8	YQQYQDATA EEEEDEEYAEEEVA

Ryc. 1.4 Różnorodność sekwencji ogonów ludzkiej tubuliny w różnych izotypach (Prassanawar i Panda, 2019); czerwonym kolorem zaznaczono różnice w sekwencji

U ludzi scharakteryzowano jak dotychczas 9 genów kodujących różne izotypy α -tubuliny i 9 dla β -tubuliny (Breuss i wsp., 2017; Janke i Magiera, 2020; Roll-Mecak, 2020). Obecność izotypów tubuliny (w obrębie każdej rodziny tubulin) i modyfikacji potranslacyjnych, jakim ulega tubulina, jest zależna od typu tkanki, a nawet komórki. W konsekwencji, obserwuje się różnice między mikrotubulami występującymi w poszczególnych tkankach, komórkach czy nawet obszarach w obrębie jednej komórki. To zjawisko zostało określone „kodem tubulinowym”, przez analogię do kodu histonowego (Verhey i Gaertig, 2007).



Ryc. 1.5 Kod tubulinowy (Janke i Magiera, 2020; zmienione)

Większość mikrotubul stanowi mozaikę różnych izotypów tubuliny i modyfikacji potranslacyjnych (Ryc. 1.5), lecz niektóre z nich charakteryzują się dominacją jednego z izotypów lub modyfikacji. Umożliwia to spełnianie rozmaitych funkcji przez mikrotubule: transport wewnątrzkomórkowy, podział komórki, polaryzacja komórek (Desai i Mitchison, 1997; Barlan i Gelfand, 2017; Prosser i Pelletier, 2017). Ponadto, kod tubulinowy odpowiada za zmienną odporność różnych rodzajów mikrotubul na czynniki fizyczne, w tym niską temperaturę, czynniki chemiczne, np. leki przeciwnowotworowe takie, jak taksol i kolchicyna, a także mechaniczne, np. wyginanie mikrotubul (Baas, 2013; Xu i wsp., 2017; Kliszcz i wsp., 2018; La Regina i wsp., 2019).

Tubulina β VI (gen TUBB1) jest niezbędna dla prawidłowego kształtu płytek krwi, które w formie nieaktywnej mają kształt dysku (Schwer i wsp., 2001). Tubulina β III (gen TUBB3) z kolei jest charakterystyczna dla neuronów, a ekspresja tego izotypu w nieneuronalnych tkankach zachodzi tylko podczas nowotworzenia. Mutacje opisane dla tego izotypu powodują, m.in. wady rozwojowe związane z migracją neuronów i defektami różnicowania (Poirier i wsp., 2010; Roll-Mecak, 2019). Jak dotychczas,

pod kątem chorób i konkretnych mutacji lepiej przebadano tubulinę β . Istnieje także kilka przykładów dla α -tubuliny, m.in. $\alpha 4a$ (gen TUBA4A) występująca w mięśniach szkieletowych, w której kilka mutacji jest związanych z pojawieniem się stwardnienia zanikowego bocznego (Smith i wsp., 2014).

Różne izotypy także wpływają na dynamikę mikrotubul, m.in. nieneuronalne warianty (βI , II lub IV) polimeryzują szybciej, ale są mniej dynamiczne niż frakcje neuronalnej tubuliny zawierające βIII (Vemu i wsp., 2017). Szczegółowe informacje na temat poszczególnych izotypów można znaleźć w literaturze (Ludueña i Banerjee, 2008).

1.1.4 Kod tubulinowy. Modyfikacje potranslacyjne tubuliny

Modyfikacje potranslacyjne tubuliny pozwalają na natychmiastowe dopasowanie własności tubuliny do zapotrzebowania komórki w danej chwili. Zachodzą one przy udziale odpowiednich enzymów, a duża część z nich jest odwracalna (Tab. 1.1). Włączenie do polimeru poszczególnych izotypów tubuliny, opisanych w poprzednim podrozdziale, również może spełniać funkcje regulacyjne, ale nie jest to tak szybki sposób jak modyfikacje potranslacyjne (Janke i Magiera, 2020; Kliszcz i wsp., 2018).

Tab. 1.1 Modyfikacje potranslacyjne tubuliny

Modyfikacja	Miejsce modyfikacji	Enzym odpowiedzialny	Enzym katalizujący reakcję odwrotną
Acetylacja	Lys40 α -tubuliny	Acetylotransferaza 1 α -tubuliny (ATAT1)	Deacetylaza histonów 6 (HDAC6); sirtuina 2 (SIRT2)
	Lys252 β -tubuliny	Acetylotransferaza San	<i>Nieznany</i>
Metylacja	Lys40 α -tubulina	Białko zawierające domenę SET 2 (SET2)	<i>Nieznany</i>
Detyrozynacja	Tyrozyna z końca ogona CTT α -tubuliny	Białka wazohibin (VASH) w kompleksie z małym białkiem wiążącym wazohibinę (SVBP) i detyrozynaza MATCAP	Ligaza tyrozynowa tubuliny
Tubulina Δ-2 i Δ-3	Ostatnia i przedostatnia reszta glutaminianowa w CTT (dostępna po detyrozynacji)	Karboksypeptydazy cytoplazmatyczne	Reakcja odwrotna nie jest znana, tubulina Δ -2 nie ulega tyrozynacji

Glutamylacja i poliglutamylacja	γ - karboksylowa grupa glutaminianu w ogonie CTT α - i β - tubuliny, dalsza elongacja łańcucha przez dodawanie kolejnych reszt glutamianowych	Enzymy podobne do ligazy tyrozynowej tubuliny; u ssaków 9 enzymów TTLL	Karboksypeptydazy
Glicylacja i poliglicylacja	Identyczne miejsce jak w przypadku glutamylacji	Białka TTLL, u ssaków znane są 3 glicylazy	Reakcja odwrotna nie jest znana, podobnie enzymy
Poliaminacja	Grupa karboksamidowa Gln15 α - i β - tubuliny	Transglutaminazy	Nieznana reakcja ani enzym
Fosforylacja	Ser172 β -tubuliny	Zależna od cykliny kinaza 1	<i>Nieznane</i>
		kinaza tyrozynowa-(Y)	<i>Nieznane</i>
	Ser444 tubuliny β 3	Nieznany enzym	<i>Nieznane</i>
	Tyro432 α -tubuliny	kinaza tyrozynowa śledzionowa (ang. <i>spleen tyrosine kinase</i> , SYK)	<i>Nieznane</i>
	Tyrozyny w α - i β - tubulinie, nadal niezidentyfikowane	Protoonkogen, tyrozynowa kinaza białkowa Src	<i>Nieznane</i>
Ubikwitynylacja	Lys304 α -tubuliny	<i>Nieznany</i>	<i>Nieznane</i>
Sumoilacja	Lizyna α -tubuliny, niezidentyfikowane	<i>Nieznany</i>	<i>Nieznane</i>
Palmitylacja	Lys376 α -tubuliny	<i>Nieznany</i>	<i>Nieznane</i>

Modyfikacje potranslacyjne mają wpływ na właściwości mikrotubul, takie jak: stabilność, elastyczność, dynamikę (polimeryzacja/depolimeryzacja), a także wiązanie i aktywność motorów molekularnych (Kliszcz i wsp., 2018; Janke i Magiera, 2020; Roll-Mecak, 2020). Dodatkowo, wpływają one na interakcje mikrotubul zarówno z białkami tnącymi mikrotubule, jak i stabilizującymi powierzchnię mikrotubul, np. tau (Boucher i wsp., 1994). Również mają one znaczenie w nawigacji komórkowej, np. pozwalają rozróżnić motorom molekularnym mikrotubule dendrytowe od aksonalnych (Konishi

i Setou, 2009) lub pełnią rolę w segregacji chromosomów podczas podziału komórki (Barisic i wsp., 2015).

Modyfikacje potranslacyjne mogą działać jak binarne przełączniki (sygnały włącz-wyłącz) poprzez dodanie lub usunięcie pojedynczych grup funkcyjnych (acetylacja, fosforylacja, detyrozynacja). Istnieje też możliwość stopniowego modulowania siły ich sygnału poprzez dodanie różnej liczby grup, np. w przypadku poliaminacji, poliglutamylacji i poliglicylacji (Ryc. 1.5). Polimodyfikacje są inicjowane przez wygenerowanie punktu rozgałęzienia, z którego łańcuchy boczne są dalej wydłużane (Janke i Magiera, 2020; Kliszcz i wsp., 2018). Poszczególne modyfikacje potranslacyjne tubuliny będą opisane w kolejnych podrozdziałach, z czego opis tyrozynacji, detyrozynacji oraz glutamylacji będą zawierały więcej szczegółów, ponieważ stanowiły one obiekt badań w niniejszej pracy.

1.1.5 Tyrozynacja i detyrozynacja

Tyrozynacja i detyrozynacja to modyfikacje polegające odpowiednio na wbudowaniu lub usunięciu tyrozyny, która jest ostatnim aminokwasem na końcu karboksylowym łańcucha polipeptydowego α -tubuliny (Nieuwenhuis i Brummelkamp, 2019). Reakcje modyfikacji zachodzą cyklicznie i są katalizowane przez enzymy: tyrozynacja przez ligazę tyrozynową tubuliny, w skrócie TTL (ang. *tubulin tyrosine ligase*) (Arce i wsp., 1975), a detyrozynacja przez wazohibiny VASH1 lub VASH2 w kooperacji z SVBP (Aillaud i wsp., 2017; Nieuwenhuis i wsp., 2017) oraz detyrozynazę MATCAP (Landskron i wsp., 2022). Wszystkie izotypy α -tubuliny mają C-końcową tyrozynę, poza wyjątkiem TUBA4A pozbawionej tego aminokwasu oraz TUBA8, która ma fenyloalaninę na końcu karboksylowym (Janke, 2014). Ligaza tyrozynowa łączy się tylko z wolnymi dimerami tubuliny, tzn. niewbudowanymi w mikrotubule (Beltramo i wsp., 1987). W przeciwieństwie do tyrozynacji, detyrozynacja zachodzi głównie na mikrotubulach, z możliwością interakcji z wolnymi heterodimerami (Kumar i Flavin, 1980). Co ciekawe, detyrozynacja jest unikalna dla tubuliny, wobec czego może stanowić interesujący cel ewentualnych terapii chorób związanych z układem nerwowym (Moutin i wsp., 2020). Tubulina może zostać wyeliminowana z cyklu detyrozynacji/tyrozynacji poprzez odcięcie jednej lub dwóch reszt kwasu glutaminowego, które po eliminacji Tyr, stają się resztami C-końcowymi. Modyfikacje te określane odpowiednio Δ -2 i Δ -3, są nieodwracalne (Paturle-Lafanechere i wsp., 1991).

Zaobserwowano, że mikrotubule zawierające głównie tyrozynowaną tubulinę są bardziej dynamiczne, czyli częściej polimeryzują i depolimeryzują, a te z przewagą detyrozynowanej charakteryzują się długim czasem trwania (Geuens i wsp., 1986; Gundersen i Bulinski, 1986). Zgodnie z tymi własnościami, w stożkach wzrostu aksonów i w dendrytach znaleźć można tyrozynowane mikrotubule, których duża dynamika zapewnia szybką reorganizację cytoszkieletu w odpowiedzi na sygnały komórkowe (Baas i wsp., 2016). Z kolei w przeważającej części dojrzałego aksonu są detyrozynowane mikrotubule, charakteryzujące się wysoką stabilnością (Sánchez-Huertas i wsp., 2016; Moutin i wsp., 2020).

Cykl tyrozynacji/detyrozynacji pełni szczególną rolę w rozwoju układu nerwowego. Myszy, które zostały pozbawione genu kodującego TTL umierały przedwcześnie (w okresie okołoporodowym). Charakteryzowały się one słabo rozwiniętymi korą mózgową i sieciami neuronów (Erck i wsp., 2005). Peris i wsp. (2022) dowiedli, że cykl tyrozynacji i detyrozynacji jest niezbędny dla utrzymania plastyczności synaptycznej oraz chroni przed uszkodzeniami wywołanym przez amyloid β . Kolejną opisaną funkcją tej modyfikacji jest regulacja wiązania białek MAP, a także wpływ na aktywność białek motorycznych (opisane w podrozdziale 1.5).

1.1.6 Glutamylicacja

Modyfikacja ta polega na przyłączaniu reszt kwasu glutaminowego do grupy γ -karboksylowej jednego z glutaminianów (Glu) wchodzących w skład C-końcowego ogona tubuliny, zarówno alfa i beta. Jest ona powszechna w neuronach oraz w rzęskach i wiciach. Glutamylicacja katalizowana jest przez grupę enzymów TTLL (ang. *tubulin tyrosine ligase-like*), które działają preferencyjnie na mikrotubulach (Regnard i wsp., 1998). Najpierw dołączana jest jedna reszta Glu – inicjująca glutamylicację, a potem dodawane są kolejne w procesie elongacji, przy czym większość enzymów TTLL może katalizować tylko jeden z wymienionych etapów, a jeden z wyjątków stanowi TTLL7 (Włoga i wsp., 2017). Modyfikacja ta jest odwracalna, a deglutamylicacja zachodzi przy udziale deglutamylaz – enzymów należących do grupy karboksypeptydaz cytoplazmatycznych, zarówno na mikrotubulach, jak i na wolnych dimerach tubuliny (Audebert i wsp., 1993). Długość łańcucha bocznego wynosi 1-6 reszt glutaminianu w neuronach (Audebert i wsp., 1994), lub więcej w przypadku rzęsek i wici (Geimer i wsp., 1997), co pozwala utworzyć specyficzny wzór rozpoznawany przez odpowiednie

białka MAP. Przykładowo powinowactwo MAP1B, MAP2 i tau wzrasta stopniowo w przypadku tubulin zawierających łańcuchy z 1–3 resztami kwasu glutaminowego, podczas gdy maleje ono w przypadku poliglutamylacji z dłuższymi łańcuchami (Boucher i wsp., 1994; Bonnet i wsp., 2001).

Poliglutamylacja reguluje aktywność białek tnących mikrotubule, w tym promuje przyłączanie się tych białek (Lacroix i wsp., 2010). Jednym z takich przykładów jest spastyna, białko istotne m.in. w procesie neurogenezy, regeneracji aksonów oraz mitozy (Sherwood i wsp., 2004; Zhang i wsp., 2007; Stone i wsp., 2012). Stopniowe zwiększenie poziomu glutamylacji korelowało z podwyższeniem aktywności spastyny, ale do pewnej granicy, czyli 8-9 reszt glutaminianu na β -tubulinie. Dalsza akumulacja modyfikacji miała już efekt hamujący spastynę. Co ciekawe, tylko glutamylacja β -tubuliny miała znaczenie i była kluczowa dla regulacji spastyny. W przypadku α -tubuliny, poliglutamylacja nie miała wpływu na aktywność spastyny (Valenstein i Roll-Mecak, 2016).

W badaniach przeprowadzonych przez Magierę i wsp. (2018), opisano nadmierną glutamylację mikrotubul w komórkach, czyli hiperglutamylację. Hiperglutamylacja spowodowana mutacją w obrębie genu kodującego deglutamylazę CCP1 (karboksypeptydaza 1) lub brakiem tego enzymu, prowadziła do zaburzenia transportu ładunków, a to z kolei do neurodegeneracji (Shashi i wsp., 2018). Te same badania jasno wykluczyły enzymy tnące mikrotubule, które są specyficznym ukierunkowane na poliglutamylowane mikrotubule (Magiera i wsp., 2018). Delecja głównej glutamylazy w mózgu (TTLL1), wystarczyła, aby zapobiec śmierci komórek nerwowych, a w przypadku wyciszenia spastyny nie zaobserwowano takiego efektu (Magiera i wsp., 2018). Bodakuntla i wsp. (2021) pokazali, że glutamylazy TTLL1 i TTLL7 generują odmienne wzory glutamylacji oraz, że w warunkach fizjologicznych modyfikują odpowiednio α - i β -tubulinę. Ponadto wykazali, że u myszy bez glutamylazy CCP1 delecja TTLL1 zapobiega degeneracji komórek Purkinjego i mielinowanych aksonów w nerwach obwodowych.

Inni badacze zwrócili uwagę na różnice jakie występują w transporcie różnych organelli wraz z rozwojem neuronu i zbadali jego powiązanie ze zmianami w glutamylacji, które też towarzyszą różnicowaniu i wzrostowi komórek nerwowych (Bodakuntla i wsp., 2020). Przykładowo, transport mitochondriów ulegał spowolnieniu, a transport pęcherzyków zawierających BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) stawał się coraz szybszy (Moutaux i wsp., 2018). Hiperglutamylacja spowodowana

brakiem enzymu CCP1 zaburzyła transport w obie strony mitochondriów, lizosomów oraz pęcherzyków z BDNF. W przypadku mitochondriów czas spędzony w ruchu zmniejszył się o połowę, przy jednoczesnym braku zmian w długości przebiegu czy szybkości transportu. Mitochondria i lizosomy transportuje kinezyrna-1 (w kierunku synapsy), a pęcherzyki z BDNF kinezyrna-3. Widać tu więc generalny mechanizm regulacji motorów (transportu) przez glutamylację (Bodakuntla i wsp., 2020). Z kolei myszy wykazujące hipoglutamylację spowodowaną eliminacją jednej z glutamylaz (TTL7) w komórkach nerwowych, miały zmniejszone powinowactwo wiązania kinezyrny-3 do mikrotubul (Ikegami i wsp., 2007).

1.1.7 Inne modyfikacje potranslacyjne tubuliny

Poliaminacja jest katalizowana przez enzym transglutaminazę (izofর্মę 2 w przypadku mózgu). Transglutaminaza katalizuje zależną od wapnia reakcję transamidacji poprzez przeniesienie reszty acylowej między grupą γ -amidową glutaminy (donor reszty acylowej) a grupą ϵ -aminową lizyny (akceptor), w wyniku czego powstaje γ -glutamyl-lizynowe wiązanie izopeptydowe (Griffin i wsp., 2002). Transglutaminazy mają też inne enzymatyczne aktywności – izomerazy mostków disiarczkowych (Hasegawa i wsp., 2003), GTPazy (Feng i wsp., 1999), oraz kinazy (Mishra i wsp., 2006). Jeśli chodzi o transamidację, to akceptorami grupy acylowej są różne substancje, np. poli- lub monaminy (np. histamina), aminokwasy, drugie białko, a nawet reszta lizyny w obrębie tego samego białka, ale głównymi substratami fizjologicznymi dla transglutaminazy są poliaminy: putrescyna, spermina i spermidyna, powstałe z L-ornityny (Song i wsp., 2013; Lesort i wsp., 2000). W przypadku tubuliny reakcja poliaminacji polega na kowalencyjnym przyłączeniu amin do reszty glutaminowej w tubulinie. Ponadto, jeśli brakuje amin, transglutaminaza może sieciować mikrotubule. Główne miejsce aminacji tubuliny to glutamina-15 β -tubuliny, ale nie jest ono jedyne i specyficzne. Aminacja jest reakcją nieodwracalną, a enzym reaguje zarówno z wolnymi dimerami, jak i mikrotubulami (Song i wsp., 2013).

Tubulina poddana reakcji z transglutaminazą w obecności poliamin miała zdolność późniejszej polimeryzacji do mikrotubul. Jeśli nie dodano poliamin, nie obserwowano tworzenia mikrotubul, co oznacza, że tubulina uległa sieciowaniu (Song i wsp., 2013). Aminowane mikrotubule charakteryzują się większą stabilnością i odpornością na depolimeryzację wywołaną niską temperaturą lub wyższym stężeniem jonów wapnia

(obniżona dynamika), ale jednocześnie mają niższą rozpuszczalność (łatwo agregują) i są odporne na proteolizę (Brady i wsp., 1984; Song i wsp., 2013). Takie stabilne mikrotubule są szczególnie charakterystyczne dla neuronów (Webb i Wilson, 1980; Brady i wsp., 1984). Badacze zaobserwowali, że aktywność transglutaminazy wzrastała dwukrotnie podczas rozwoju neuronów (Maccioni i Seeds, 1986), a zablokowanie jej aktywności prowadziło do powstawania o połowę krótszych wypustek nerwowych (Song i wsp., 2013). Jednakże, nie musi to być związane tylko z modyfikacją mikrotubul, ponieważ transglutaminaza ma wiele innych substratów (Beninati i wsp., 1988; Kliszcz i wsp., 2018). Co ciekawe, w mózgach osób chorych na Alzheimera aktywność transglutaminazy była trzykrotnie wyższa niż u osób zdrowych (Johnson i wsp., 1997). Zaobserwowano też, że poziom ekspresji transglutaminazy i jej aktywność wzrastała z wiekiem w mysim modelu choroby Alzheimera oraz u osobników z łagodnymi zaburzeniami procesów poznawczych (w porównaniu do zdrowych jednostek), a zasugerowano, że może to mieć związek z sieciowaniem białek właśnie przez transglutaminazę (amyloidu β , białka tau, czy neurofilamentów) (Zhang i wsp., 2016).

Acetylacja jest modyfikacją katalizowaną przez acetylotransferazy, z czego aTAT1 dostaje się do wnętrza mikrotubuli i reaguje z resztą Lys-40 α -tubuliny (L'Hernault i Rosenbaum, 1985), a acetylotransferaza San modyfikuje Lys-252 β -tubuliny i działa wyłącznie na wolne dimery (Chu i wsp., 2011). Modyfikacja Lys-40 jest odwracalna i przeprowadzana przez deacetylazę histonów 6 (Hubbert i wsp., 2002) oraz sirtuinę 2 (North i wsp., 2003). Acetylacja występuje w rzęskach (LeDizet i Piperno, 1986), ale również jest powszechna w długich mikrotubulach aksonów i dendrytów neuronów ssaczych (Hammond i wsp., 2010). Saunders i wsp. (2022) wykazali, że acetylacja Lys-394 reguluje morfogenezę zakończeń synaptycznych w neuronach ruchowych poprzez wpływ na stabilność mikrotubul. Co ciekawe, stabilne mikrotubule mają większą podatność na acetylację, ale nie wiadomo czy stabilność to faktycznie czynnik sprawczy (A i wsp., 2020). Acetylacja osłabia interakcje między protofilamentami, co z jednej strony sprawia, że mikrotubule są bardziej odporne na stres mechaniczny (autorzy użyli też określenia „*mechanical aging*”, czyli starzenie mechaniczne), m.in. wyginanie mikrotubul, które może prowadzić do ich złamania (Portran i wsp., 2017). Jednocześnie acetylacja przyspiesza depolimeryzację mikrotubul oraz redukuje częstość nukleacji (Portran i wsp., 2017). Jeśli chodzi o funkcje fizjologiczne, to acetylacja nie jest

niezbędna do przeżycia, ale co ciekawe powoduje np. zaburzenia odczuwania dotyku u *Caenorhabditis elegans* i myszy (Akella i wsp., 2010; Shida i wsp., 2010; Morley i wsp., 2016).

Glicylacja jest modyfikacją występującą wyłącznie w rzęskach (Bré i wsp., 1996) i jest podobnie jak glutamylacja katalizowana przez enzymy z rodziny TTL (por. podrozdział 1.1.6), (Włoga i wsp., 2009; Kliszcz i wsp., 2018). Modyfikacja ta zajmuje również to samo miejsce w łańcuchu C-końcowym tubuliny co glutamylacja, więc obie modyfikacje konkurują ze sobą (Rogowski i wsp., 2009). Glicylacja ma wpływ na stabilność i utrzymanie prawidłowej struktury rzęsek, a także ich powstawanie (Włoga i wsp., 2009; Bosch Grau i wsp., 2013; Rocha i wsp., 2014) oraz regulację długości rzęski pierwotnej (Gadadhar i wsp., 2017). Ponadto, zmiany w równowadze glicylacji i glutamylacji tubuliny w fotoreceptorach prowadzą do zwyrodnienia siatkówki (Bosch Grau i wsp., 2017). Najnowsze badania pokazują, że glicylacja tubuliny reguluje ruch wici u ssaków poprzez modulowanie aktywności dyneiny w aksonemie, a brak glicylacji prowadzi do zaburzonej ruchliwości plemników i obniżonej płodności samców myszy (Gadadhar i wsp., 2021).

Jeśli chodzi o inne modyfikacje potranslacyjne tubuliny, to przykładowo fosforylacja ma raczej wpływ na dynamikę mikrotubul w zależności od miejsca modyfikacji. Fosforylacja seryny-172 β -tubuliny hamuje inkorporację dimerów tubuliny w mikrotubule, czyli obniża dynamikę mikrotubul (Fourest-Lieuvin i wsp., 2006). Z kolei fosforylacja seryny-165 α -tubuliny powoduje, że szybkość polimeryzacji mikrotubul się zwiększa (De i wsp., 2014).

1.1.8 Białka wiążące mikrotubule

Białka wiążące mikrotubule lub inaczej – białka związane z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated proteins*, MAPs) to cała grupa białek wchodzących w interakcje z mikrotubulami. Podczas preparatyki tubuliny zauważono, że białka te oczyszczają się jako frakcja towarzysząca podczas cykli polimeryzacji i depolimeryzacji tubuliny (Borisov i wsp., 1975). Początkowo funkcje białek związanych z mikrotubulami powiązano ze stabilizacją mikrotubul. Jednakże, z czasem kolejne badania doprowadziły do odkrycia wielu funkcji, jakie są spełniane przez te białka:

- a) motory molekularne – kinezy (Hirokawa i wsp., 2009), dyneiny (Bhabha i wsp., 2016)

- b) białka depolimeryzujące, np. MCAK (ang. *mitotic-centromere associated kinesin*) (Moore i Wordeman, 2004) lub tnące mikrotubule – katanina, spastyna (Yu i wsp., 2008)
- c) białka wiążące koniec plus (EB1, XMAP215, CLIP-170) lub minus mikrotubuli (γ -TuRC, patronina, statmina) (Goodson i Jonasson, 2018)
- d) białka uczestniczące w nukleacji mikrotubul – γ -TuRC, XMAP215, TPX2, patronina (Wu i Akhmanova, 2017)
- e) strukturalne – ważne dla stabilności mikrotubuli, jednocześnie mogą też promować tworzenie wiązek, np. tau (Drechsel i wsp., 1992) lub zapobiegać temu zjawisku, np. MAP4 (Barlow i wsp., 1994)
- f) pośredniczące w interakcjach między mikrotubulami a filamentami aktynowymi, np. MACF1 i MACF2 (Leung i wsp., 1999)

Jednakże, białka MAP spełniają także inne funkcje, np. tau dodatkowo chroni mikrotubule przed białkami tnącymi mikrotubule (Qiang i wsp., 2006), ale też jego obecność hamuje wiązanie kinezy-1 do mikrotubul (Siahaan i wsp., 2019).

1.2 Kinezyzny

1.2.1 Ogólna charakterystyka kinezyzn i ich funkcje

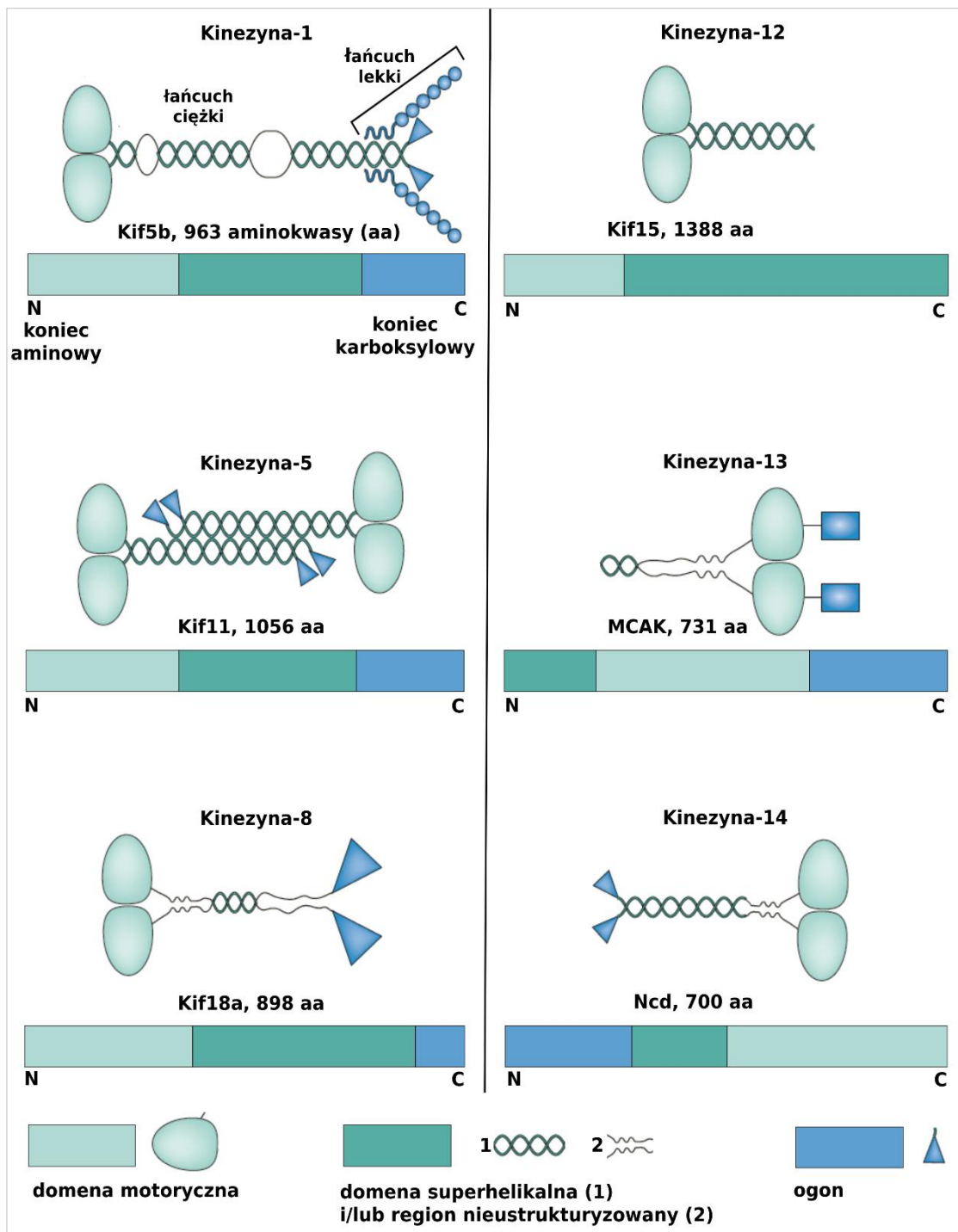
Kinezyzny stanowią grupę białek motorycznych oddziałujących z mikrotubulami. Kinezyzny pełnią istotne role w komórce, takie jak transport białek, pęcherzyków, organelli (Guedes-Dias i Holzbaur, 2019), mRNA (Kanai i wsp., 2004), depolimeryzacja mikrotubul (Friel i Welburn, 2018), a także uczestniczą w podziale komórki (Cross i McAinsh, 2014; Camlin i wsp., 2017), inicjacji powstawania aksonu i innych wypustek komórkowych (Oelz i wsp., 2018) oraz w rozwoju zarodkowym (Konjikusic i wsp., 2021).

Odkrycie białek rodziny kinezyzn zaczęło się od wyizolowania kinezy-1 po raz pierwszy z aksonów olbrzymich kałamarnicy w 1985r. (Vale i wsp., 1985; Brady, 1985). Celem była identyfikacja elementów odpowiedzialnych za aktywny (związany z hydrolizą ATP) i ukierunkowany transport organelli, który obserwowano już wcześniej w aksonach (Allen i wsp., 1982; Murphy i wsp., 1983). Nazwa „kinezyzna” pochodzi od greckiego słowa *kinein*, czyli poruszać się. Analizy sekwencji genomowych różnych organizmów np. *Drosophila* i myszy doprowadziły do odkrycia kolejnych kinezyzn (Yang i wsp., 1989; Aizawa i wsp., 1992). Kinezyzny tworzą nadrodzinę białek, która składa się z 14 strukturalnie i funkcjonalnie podobnych rodzin (Lawrence i wsp., 2004; Hirokawa i wsp.,

2009). Jak dotychczas u człowieka zidentyfikowano 45 genów kodujących kinezyiny (Hirokawa i wsp., 2009), z czego 38 jest ekspresjonowanych w tkance nerwowej (np. Ncd).

Wiele kinezyin występuje w postaci dimeru (np. kinezyina-4, kinezyina-6, kinezyina-14), ale są też cząsteczki monomeryczne (kinezyina-3 Unc104), trimeryczne (kinezyina-2) i tetrameryczne (kinezyina-1, kinezyina-5) (Endow i wsp., 2010).

Większość kinezyin jest zbudowana według podobnego planu: domena motoryczna (tzw. „główka”), domena superhelikalna oraz ogon (Ryc. 1.6 i 1.7). Domena motoryczna jest dobrze zachowana w ewolucji i generuje ruch, którego energia pochodzi z hydrolizy ATP. Wśród 14 wspomnianych rodzin ze względu na umiejscowienie domeny motorycznej wyróżnia się 3 grupy: kinezyiny typu N, M i C (Hirokawa, 1989; Lawrence i wsp., 2004). Kinezyiny typu N mają domeny motoryczne w obrębie końca aminowego sekwencji, poruszają się do końca plus mikrotubuli i stanowią najliczniejszą grupę, do której należą: kinezyina-1 (KIF5B), kinezyina-2 oraz kinezyina-3 (Ryc. 1.6). Kinezyiny typu M mają domeny motoryczne w środku sekwencji, jedynym reprezentantem jest kinezyina-13 (np. MCAK), która depolimeryzuje mikrotubule (Konjikusic i wsp., 2021). Z kolei w przypadku motorów typu C (rodzina 14) domena motoryczna jest na końcu karboksylowym i te białka jako jedyne wędrują do końca minus mikrotubuli (Miki i wsp., 2001).



Ryc. 1.6 Organizacja strukturalna wybranych kinezyn (Verhey i Hammond, 2009; zmienione)

1.2.2 Parametry charakteryzujące ruch kinezyn

Ruchliwość kinezyn opisują różnorodne parametry: szybkość, długość przebiegu (droga przebyta przez konkretny motor bez oderwania od mikrotubuli), procesywność, kierunkowość, a także powinowactwo (siła wiązania) do mikrotubul, czas oddziaływania z mikrotubulą. Procesywność to zdolność do wykonania określonej liczby kroków bez dysocjacji od mikrotubuli. Białko nieprocesywne po wykonaniu jednego kroku dysocjuje, a procesywne rozpoczyna następny krok (Romberg i wsp. 1998; Hancock i Howard,

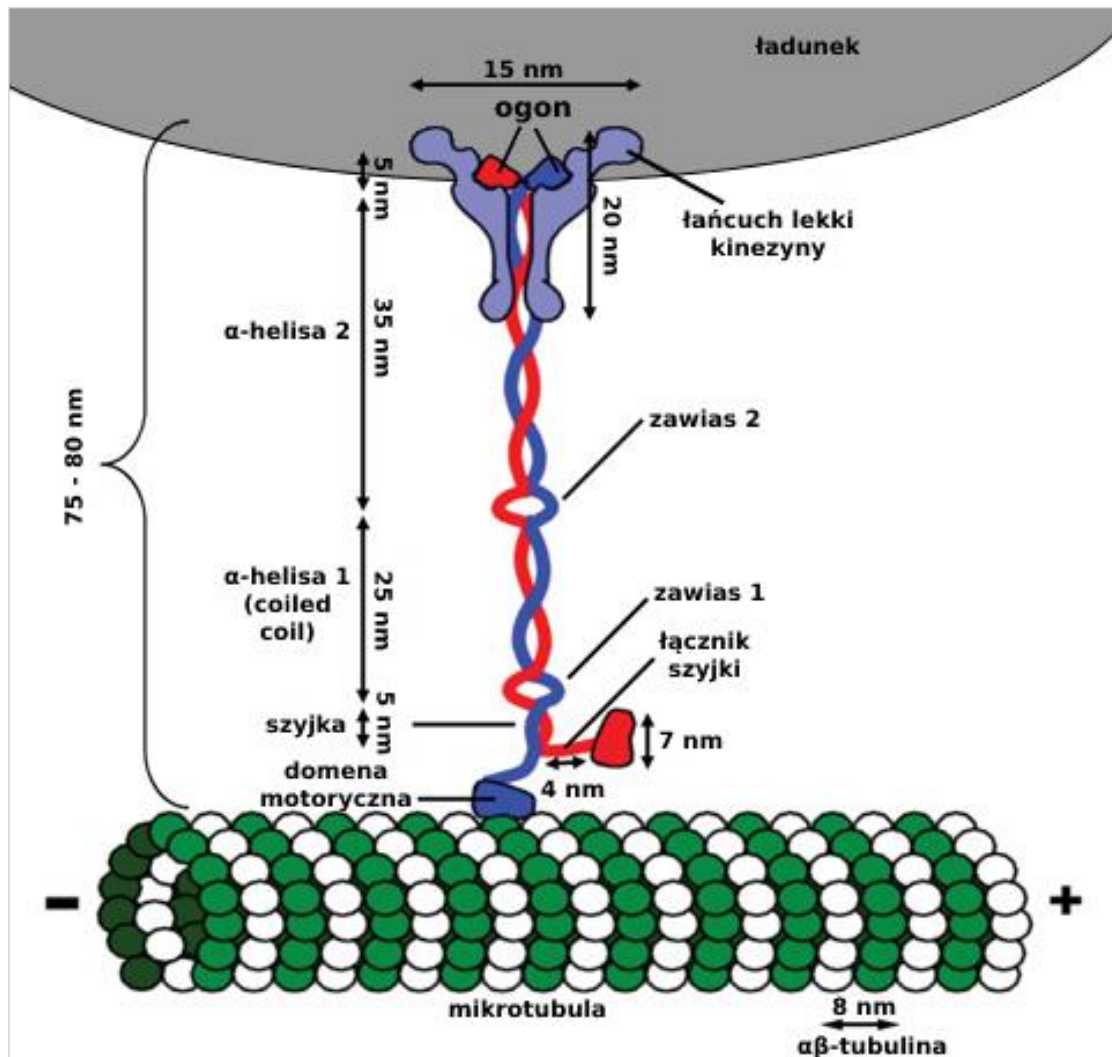
1999). Kinezyzna-1 jest wysoce procesywna, ponieważ wykonuje ponad 100 kroków bez dysocjacji od mikrotubuli, (Hackney, 1995; Toprak i wsp., 2009). Natomiast kinezyzna-14 z *Drosophila melanogaster* (Ncd) funkcjonuje w sposób nieprocesywny, czyli po każdym wykonanym kroku odłącza się od mikrotubuli (Foster i Gilbert, 2000).

1.2.3 Budowa, właściwości i funkcje kinezyzny-1

Kinezyzna-1 jest heterotetramerem zbudowanym z dwóch łańcuchów ciężkich (każdy o masie 115-130 kDa) i dwóch lekkich (62-70 kDa), (Vale i wsp., 1985), cała cząsteczka ma więc M_r ok. 300 kDa (Ryc. 1.7). Ten motor molekularny jest o wiele mniejszym białkiem niż dyneina i niektóre miozyny, które mają masy odpowiednio ok. ~1 MDa (Kardon i Vale, 2009) i ~530 kDa (miozyna II, Rayment i wsp., 1993).

Ważnym elementem budowy kinezyzny-1 jest łącznik szyjki (Ryc. 1.7), czyli elastyczna część łańcucha polipeptydowego o długości ok. 15 reszt aminokwasowych, która jest niezbędna do generacji ruchu (Budaitis i wsp., 2019) oraz pozwala na synchronizację dwóch domen motorycznych, a także jest odpowiedzialna za kierunkowość (Rosenfeld i wsp., 2003). Następnie szyjka, która umożliwia dimeryzację (Marx i wsp., 1998), a jej elastyczność poprawia ruchliwość kinezyzny-1 przy dużym obciążeniu zewnętrznym, np. ładunkiem (Jaud i wsp., 2006). Za szyjką znajdują się kolejno domena superhelikalna oraz ogon, który jest odpowiedzialny za wiązanie ładunków i autoregulację kinezyzny (Scholey i wsp., 1989; Seeger i Rice, 2010). W zależności od rodzaju kinezyzny, powyższe domeny mogą być przedzielone elastycznymi sekwencjami, tzw. zawiasami 1 i 2 (Ryc. 1.7), które np. w przypadku kinezyzny-1 są potrzebne do optymalnego ruchu tego białka (Grummt i wsp., 1998; Barlan i wsp., 2013; Kelliher i wsp., 2018). Delecja zawiasu-1 (aminokwasy 372-446) prowadziła do obniżenia szybkości przesuwania mikrotubul przez kinezyznę-1 w teście gliding (Grummt i wsp., 1998; Crevenna i wsp., 2008). Jednocześnie, brak zawiasu-1 nie miał wpływu na szybkość poruszania się pojedynczych cząsteczek, co wskazuje na istotne znaczenie zawiasów w pracy zespołowej motorów (Crevenna i wsp., 2008). Natomiast, eliminacja zawiasu-2 (aminokwasów 505-610) uniemożliwiła autoinhibicję kinezyzny-1 (zjawisko wyjaśnione w podrozdziale 1.2.5) i taki mutant wykazywał ruchliwość podobną do typu dzikiego bez delecji, a nawet poruszał się szybciej w teście pojedynczych cząsteczek niż typ dziki (Friedman i Vale, 1999). Jednakże w teście gliding zaobserwowano, że przy wysokich gęstościach cząsteczek kinezyzny-1 (na powierzchni szkiełka) brak zawiasu-2 powodował obniżenie szybkości (Bieling i wsp.,

2008b). Friedman i Vale (1999) również zanotowali nieznaczne obniżenie szybkości w teście gliding dla kinezy-1 bez zawiasu-2.



Ryc. 1.7 Budowa kinezy-1 (Jeppesen i Hoerber, 2012; zmienione)

Kinezy-1, jako białko procesywne wykonuje ok. 100 kroków bez odłączania od mikrotubuli, a każdy krok odpowiada przeprowadzeniu jednego cyklu chemicznego, czyli hydrolizie jednej cząsteczki ATP (Schnitzer i Block, 1997; Vale i wsp., 1996; Hackney, 1995; Kawaguchi, 2008). Długość kroku kinezy-1 mierzona jako odległość, którą pokonuje środek ciężkości białka, wynosi ok. 8 nm. Precyzując, jedna z główek wykonuje krok o długości 16 nm (zob. Ryc. 1.8, panel 4, główka A), co skutkuje przemieszczeniem superhelisy o 8 nm. Wartości te pokrywają się z odlegościami pomiędzy takimi samymi punktami (podjednostkami heterodimeru tubuliny) wzdłuż protofilamentu mikrotubuli (Coy i wsp., 1999; Schnitzer i Block, 1997; Mickolajczyk i wsp., 2019). Szybkość poruszania się pojedynczego motoru na mikrotubuli *in vitro* wynosi 800 nm/s, a długość przebiegu ok. 1 μm (Block i wsp., 1990; Budaitis i wsp., 2019). Do podrodziny kinezy-1 należą 3 geny: występujące w neuronach kinezy-1

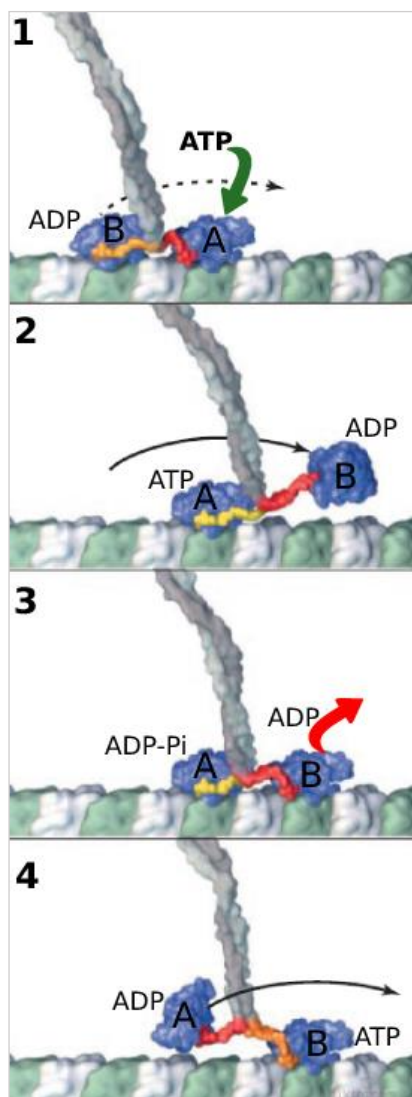
KIF5A i KIF5C, a także ekspresjonowana w wielu tkankach (również w neuronach) kinezyrna KIF5B (Miki i wsp., 2001).

Główną funkcją kinezyzny-1 jest transport ładunków w komórkach, w tym w aksonach komórek nerwowych. Motor ten transportuje mitochondria (Pilling i wsp., 2006), autofagosomy (Cardoso i wsp., 2009), neurofilamenty (Lee i wsp., 2011), krótkie mikrotubule (Wang i Brown, 2002), mRNA (Kanai i wsp., 2004), receptory (Saez i wsp., 2020), kompleksy białek i lipidów (Vale i Milligan, 2000; Kliszcz i Kasprzak, 2018) od ciała komórki do dystalnych części aksonu, a cytoplazmatyczna dyneina w drugą stronę (Bhabha i wsp., 2016). Transport przeprowadzany przez kinezyne-1 jest niezbędny, ponieważ większość ww. organelli powstaje w ciele komórki. Za wiązanie białek adaptorowych i ładunków odpowiada część C-końcowa kinezyzny, czyli ogon oraz łańcuchy lekkie, przyłączone w pobliżu końca karboksylowego (Blasius i wsp., 2007, Pernigo i wsp., 2018; Ryc. 1.7).

1.2.4 Mechanizm generacji ruchu przez kinezyne-1

Kinezyrna-1 jest zdolna do przekształcenia energii chemicznej (pochodzącej z hydrolizy ATP) w mechaniczną, a porusza się zgodnie z mechanizmem „ręka w rękę” (ang. *hand-over-hand*), w którym reakcje chemiczne i zjawiska mechaniczne w obu główkach zachodzą sekwencyjnie i są zsynchronizowane (Skowronek i wsp., 2007). W trakcie ruchu jedna główka jest przyłączona do mikrotubuli, a druga pokonuje odległość 16 nm i dodatkowo obraca się o 180° w stosunku do poprzedniego położenia (Yildiz i wsp., 2004; Ryc. 1.8).

Sekwencyjne przyłączanie się i dysocjacja główek zachodzą, ponieważ powinowactwo domeny motorycznej kinezyzny-1 do mikrotubuli jest zależne od rodzaju nukleotydu, jaki znajduje się w główce. Brak nukleotydu lub obecność ATP/ADP-Pi powoduje silne wiązanie do mikrotubuli. W przypadku ADP domena motoryczna wiąże się słabiej albo odłącza się od mikrotubuli (Rosenfeld i wsp., 1996; Shang i wsp., 2014), co jest pokazane na Ryc. 1.8.



Ryc. 1.8 Model ruchu kinezy-1 (Vale i Milligan, 2000)

Energia hydrolizy ATP w główce kinezy-1 jest sprzężona ze zmianami konformacji łącznika szyjki, który albo wiąże się do główki (w obecności ATP w główce), albo pozostaje nieustrukturyzowany (z ADP) (Rice i wsp., 1999; Tomishige i wsp., 2006). Domeny motoryczne kinezy nie związanej z mikrotubulą, albo zawierają ADP, albo nie mają wcale nukleotydu. Łączniki szyjek są wtedy ruchome (Ryc. 1.8, łącznik szyjki zabarwiony na czerwono) i pozwalają na swobodne ruchy domenom motorycznym. Przyłączenie jednej z domen motorycznych do mikrotubuli przyspiesza uwolnienie ADP z tej główki (wiodącej, A) około tysiąckrotnie, w porównaniu do spontanicznej dysocjacji ADP (Hackney, 1988; Cross, 2004), który praktycznie natychmiast jest wymieniany na ATP. Powoduje to silne związanie główki A do mikrotubuli (Ryc. 1.8, panel 1). Główka tylna natomiast, mająca ADP w rdzeniu katalitycznym jest słabiej związana z mikrotubulą. Związanie ATP w główce A prowadzi do ułożenia się łącznika szyjki na rdzeniu katalitycznym tej główki, a to z kolei powoduje przerzucenie tylnej główki (B)

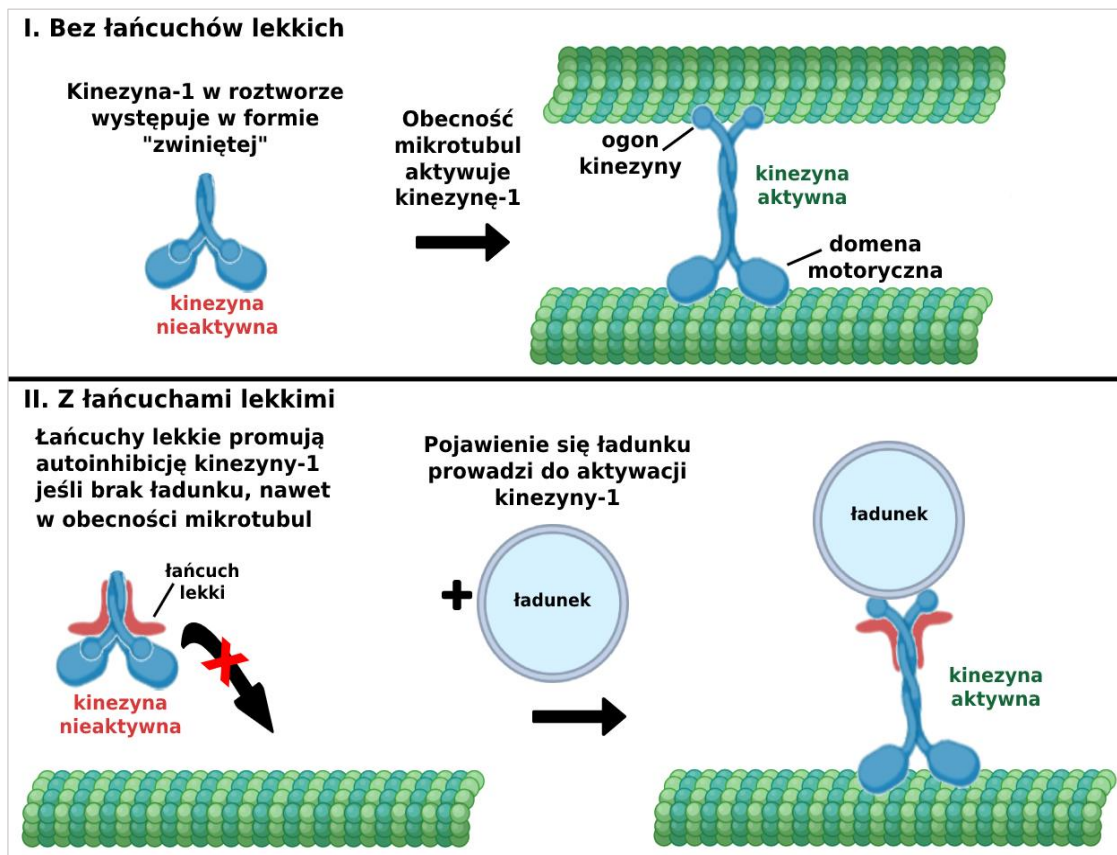
do przodu, która przez dyfuzję „szuka” najbliższego miejsca wiązania na mikrotubuli (Ryc. 1.8, panel 2), a po związaniu uwalnia ADP i wiąże się silnie do mikrotubuli. Precyzując, dokowanie łącznika szyjki na domenę motorycznej A powoduje zwiększenie naprężenia pomiędzy główkami kinezyiny, które „ciągnie” główkę tylną (B) naprzód. Naprężenie to zapobiega również zbyt szybkiemu przyłączeniu ATP przez główkę przeniesioną do przodu (B). Po hydrolizie ATP w główce A i uwolnieniu fosforanu (Pi), łącznik szyjki odłącza się od rdzenia katalitycznego główki A, a naprężenie między główkami zostaje zniwelowane i główka A zawierająca już tylko ADP ulega odłączeniu od mikrotubuli. Dopiero wtedy, w wyniku zmniejszenia naprężenia łącznika szyjki, w główce B może dojść do przyłączenia ATP. Na panelu 4 Ryc. 1.8 widać, jak łącznik szyjki przy główce B zaczyna układać się na rdzeniu katalitycznym, a w tym samym czasie główka A jest w trakcie przenoszenia jej do przodu. Pełne dokowanie łącznika szyjki na domenę motorycznej zachodzi dopiero podczas hydrolizy ATP, co określono jako mechanizm „bramkowania” (Milic i wsp., 2014). Ewentualny błąd, czyli przyłączenie ATP do główki znajdującej się z przodu zanim tylna uwolni fosforan prowadzi do dysocjacji całej cząsteczki kinezyiny od mikrotubuli, ponieważ hydroliza ATP w obu główkach naraz, prowadzi do obecności ADP w obu główkach i stanu słabego wiązania. Opisane błędne przyłączenie ATP zdarza się raz na 100 kroków kinezyiny-1 (Hackney, 1995; Hancock, 2016). Poza tym, kroki wsteczne, które mogłyby zakłócić ruch w jednym kierunku, występują sporadycznie (Svoboda i Block, 1994; Sasaki i wsp., 2018; Toleikis i wsp., 2020).

Na koniec, warto zwrócić uwagę na trzy właściwości kinezyiny-1: wysoką procesywność, jednokierunkowość generowanego ruchu oraz hydrolizę jednej cząsteczki ATP w trakcie jednego kroku, pomimo, że obie domeny motoryczne posiadają miejsca wiązania nukleotydu. Warunkiem ich zaistnienia jest: po pierwsze wymiana informacji między domenami motorycznymi, a także jednoczesna koordynacja 3 cykli kinezyiny-1: chemicznego (hydroliza ATP), mechanicznego (ruch po mikrotubuli) i strukturalnego (zmiany konformacji w kinezyinie-1) (Hancock i Howard, 1999; Mandelkow i Johnson, 1998; Hancock, 2016; Qin i wsp. 2020). Nadal jednak nie wszystkie aspekty dotyczące ruchu są jasne, np. brakuje szczegółowego mechanizmu hydrolizy ATP katalizowanej przez kinezynę-1.

Mimo wielu wspólnych cech, mechanizmy ruchu różnią się w zależności od rodzaju kinezy. Przykładowo, domena motoryczna MCAK, kinezy-13, która depolimeryzuje mikrotubule, kiedy pozostaje niezwiązana z mikrotubulą, ma ATP w centrum aktywnym, a wiązanie do mikrotubuli powoduje hydrolizę ATP, w odróżnieniu od kinezy-1, która oddziałuje analogicznie, ale gdy w domenie katalitycznej jest ADP (Friel i Howard, 2011).

1.2.5 Autoregulacja aktywności kinezy

Łańcuchy lekkie są potrzebne podczas transportu ładunków (Gindhart i wsp., 1998; Blasius i wsp., 2007), ale także odpowiadają za regulację aktywności kinezy-1. W przypadku braku wiązania ładunku kinezy-1 występuje w złożonej, zwiniętej konformacji (Ryc. 1.9), która poprzez zablokowanie mobilności łącznika szyjki zapobiega niepotrzebnym cyklom hydrolizy ATP (por. podrozdział 1.2.4). Stan ten nazwano „autoinhibicją”, a jest on osiągany przez interakcję między ogonem a główką, w której aminokwasy izoleucyna-alanina-lizyna (IAK) i aminokwasy otaczające motyw IAK w ogonie kinezy wiążą się do domeny motorycznej tej samej cząsteczki.



Ryc. 1.9 Aktywacja kinezy-1, która uległa autoinhibicji (utworzono przy użyciu BioRender.com)

Zaistnienie stanu autoinhibicji, które wymaga mechanicznego „zgięcia się” kinezy-1 jest możliwe dzięki obecności elastycznego regionu, czyli zawiasu-2 (Ryc. 1.7), położonego mniej więcej w połowie długości kinezy-1 (Hirokawa i wsp., 1989; Hisanaga i wsp., 1989; Friedman and Vale, 1999; Kaan i wsp., 2011; Kelliher i wsp., 2018).

Autoinhibicja zostaje zniesiona dopiero w wyniku związania z białkami adaptorowymi oraz ładunkiem, co powoduje, że kinezy-1 zmienia konformację do „rozwiniętej” (aktywnej), w wyniku czego jest zdolna do wejścia w cykl hydrolizy ATP i do translokacji wzdłuż mikrotubuli (Friedman i Vale, 1999; Blasius i wsp., 2007). Kilka badań sugeruje, że łańcuchy lekkie zapobiegają interakcji kinezy-1 z mikrotubulami i pomagają w utrzymaniu stanu autoinhibicji, gdy występuje brak ładunku (Friedman i Vale, 1999; Verhey i wsp., 1998; Cai i wsp., 2007a; Wong i Rice, 2010). Autoinhibicja ma kluczowe znaczenie *in vivo*. Oprócz zapobiegania niepotrzebnej aktywności związanej z hydrolizą ATP, autoinhibicja ma związek z odpowiednią lokalizacją kinezy-1 w neuronach. Brak tej regulacji prowadził do błędnej akumulacji tego białka w aksonach razem z ładunkiem (aparatem Golgiego), który miał być dostarczony do dendrytów (kinezy-1 jest aktywna w ograniczonym stopniu również w dendrytach) (Kelliher i wsp., 2018).

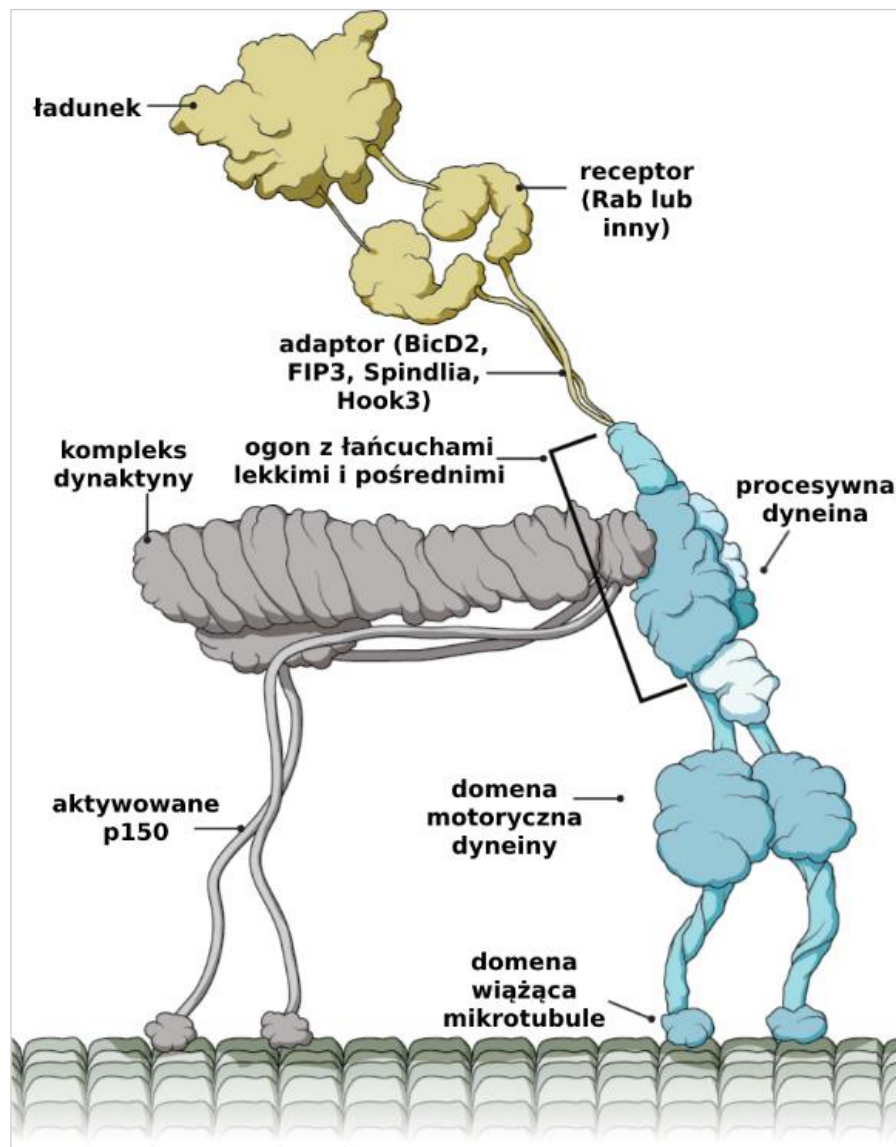
Dodatkowo, zaobserwowano, że domeny ogona kinezy-1 oddziaływały jednocześnie z mikrotubulą oraz z główkami kinezy-1, zapobiegając poruszaniu się. Dietrich i wsp. (2008) sugerowali, że wiązanie ogona do główki hamuje uwolnienie ADP przy kontakcie z mikrotubulą. Inni badacze pokazali, że nawet jedna domena ogona wystarczyła aby zablokować aktywność obu główek (Hackney i wsp., 2009). Nadal jednak nie wiadomo jaką funkcję może spełniać w komórce taki stan zatrzymania się kinezy-1 na mikrotubuli w formie złożonej. Podobnie nie wiadomo, jaki jest mechanizm ponownej jej aktywacji.

1.3 Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie jest generowane przez kilka białek motorycznych

Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie występuje wtedy, gdy motor molekularny generuje ruch między dwiema mikrotubulami, wiążąc się do jednej domeny motoryczną, a do drugiej – ogonem (Fink i wsp., 2009; Jolly i wsp., 2010; Rao i Baas, 2018). Po raz pierwszy takie zjawisko opisano ponad 50 lat temu w rzęskach (Satir, 1968). Zaobserwowano, że przesuwanie względem siebie sąsiadujących par mikrotubul

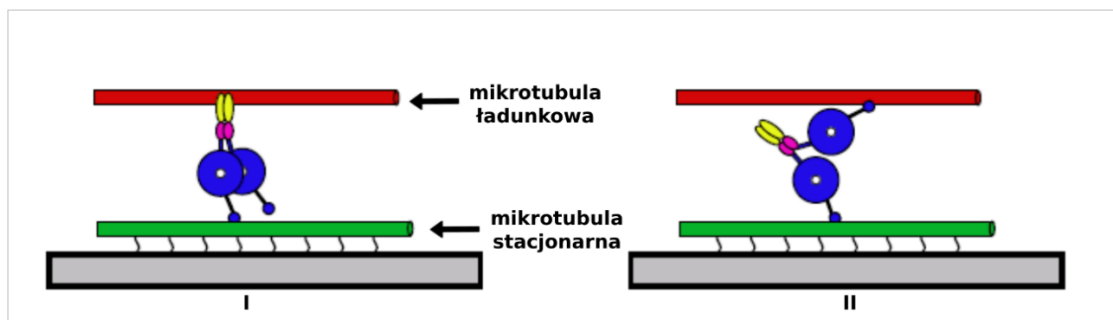
obwodowych w rzęsce przez dyneiny aksonemalne (zorganizowane w ramiona zewnętrzne i wewnętrzne) jest podstawą charakterystycznego ruchu rzęsek (tzw. „bicia”).

Cytoplazmatyczna dyneina jest wielobiałkowym kompleksem o masie cząsteczkowej $M_r \sim 1\,200\,000$ Da, składającym się dwóch łańcuchów ciężkich, łańcuchów lekkich-pośrednich oraz subkompleksu łańcuchów lekkich i pośrednich (Ryc. 1.10). Motor ten porusza się po mikrotubulach, generując ruch w stronę końca minus. Aby dyneina była motorem procesywnym, musi ona utworzyć kompleks z dynaktyną (Ryc. 1.10), która sama składa się z 23 podjednostek (11 różnych polipeptydów) (Reck-Peterson i wsp., 2018).



Ryc. 1.10 Aktywna dyneina w kompleksie z dynaktyną i białkami adaptorowymi (Allan, 2014; zmienione)

W przypadku dyneiny zaproponowano dwa mechanizmy przesuwania mikrotubul. W pierwszym, w oddziaływaniu z transportowaną mikrotubulą uczestniczy ogon dyneiny, a obie domeny motoryczne oddziałują z drugą mikrotubulą (podobnie jak w przypadku kinezy-1, Ryc. 1.11, I). W drugim każda domena motoryczna jednej cząsteczki wiąże i przesuwa inną mikrotubulę (Ryc. 1.11, II), a ogon nie uczestniczy w oddziaływaniach (ang. "split sliding"). Zostało to potwierdzone doświadczalnie – dyneiny nie zawierające ogonów również mogły przesuwać mikrotubule względem siebie (Tanenbaum i wsp., 2013), ale nie wiadomo czy taki mechanizm ma miejsce w komórkach.



Ryc. 1.11 Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez dyneinę – dwa mechanizmy (Tanenbaum i wsp., 2013; zmienione)

Dyneina cytoplazmatyczna poprzez ruch mikrotubula-mikrotubula, uczestniczy m.in. w elongacji wypustek komórkowych, czy organizacji sieci mikrotubul w różnych komórkach. Przykładowo, przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie (zorientowanych antyrównolegle) napędzane przez dyneinę jest źródłem siły niezbędnej do elongacji prołytek krwi (Bender i wsp., 2015). Inny przykład dotyczy miogenezy, gdzie mikrotubule w mioblastach są aranżowane wzdłuż dłuższej osi komórek (z początkowego promienistego ułożenia). W tym procesie kluczową rolę odgrywają 3 białka: oMAP4, dyneina oraz kinezy-1 (Mogessie i wsp., 2015). Dyneina oraz kinezy-1 przesuwały mikrotubule względem siebie, a oMAP4 sieciuje nakładające się na siebie mikrotubule i dzięki temu stabilizuje taki typ sieci mikrotubul, ale też hamuje nadmierne przesuwanie mikrotubul względem siebie (Mogessie i wsp., 2015). Wyciszenie dyneiny i kinezy-1 zredukowało trzykrotnie mobilność mikrotubul i uniemożliwiło prawidłową ich organizację w różnicujących się komórkach mięśniowych (Mogessie i wsp., 2015). Brak samej kinezy-1 prowadził do dezorganizacji mikrotubul w mioblastach, jednak bardziej destrukcyjny efekt miało wyciszenie tylko dyneiny (wtedy oMAP4 sieciowało prostopadle ułożone mikrotubule) lub samego oMAP4

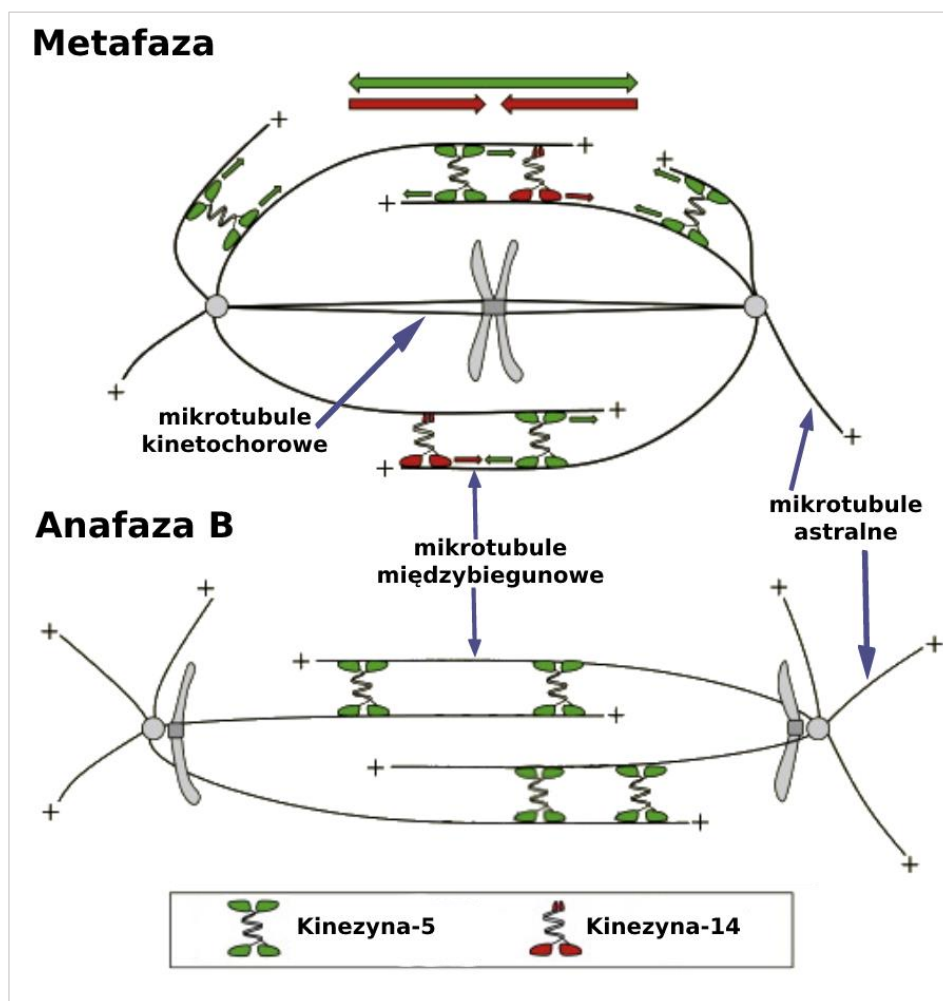
(zaburzenie elongacji komórek i fuzji mioblastów poprzez nadmierne przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie), (Mogessie i wsp., 2015).

Dyneina pełni również kluczową rolę podczas sortowania mikrotubul w rozwijających się neuronach, chociaż wymaga ona dodatkowych białek, m.in. białek sieciujących mikrotubule oraz innych motorów molekularnych (Rao i Baas, 2018; Kliszcz i Kasprzak, 2018). We wczesnych fazach rozwoju wypustki nerwowe w niespolaryzowanym neuronie mają mieszaną orientację mikrotubul, natomiast później, w neurycie, który zostaje aksonem mikrotubule są zorientowane niemal w 100% jednolicie – z końcem plus skierowanym w stronę dystalnej części neuronu (Rao i wsp., 2017). Rao i Baas (2018) proponują, że cytoplazmatyczna dyneina transportuje mikrotubule skierowane końcem minus w stronę zakończenia aksonu – do ciała komórki, a mikrotubule zorientowane odwrotnie – do stożka wzrostu aksonu. Zablockowanie funkcji dyneiny skutkowało zakłóceniem transportu mikrotubul w obu kierunkach i akumulacją mikrotubul skierowanych końcem minus w stronę dystalnej części aksonu, a więc uniemożliwiło polarne sortowanie mikrotubul (Rao i Baas, 2018). Rozważa się różne możliwe mechanizmy sortowania mikrotubul z udziałem dyneiny, jednak za najbardziej dominujący badacze uważają ten, w którym dyneina jest przyłączona ogonem do kory aktynowej aksonu w neuronie poprzez białko spindlię (ang. *spindly*), a przez domeny motoryczne oddziałuje z mikrotubulami, kierując je w odpowiednią stronę (Rao i Baas, 2018; del Castillo i wsp., 2020). Oprócz dyneiny sugerowano także, że kinezyrna-1 może nie tylko w tym procesie uczestniczyć, ale również przejąć funkcję dyneiny, gdy tej ostatniej zaczyna brakować, jak ma to miejsce w różnicujących się komórkach mięśniowych (Mogessie i wsp., 2015).

Dyneina cytoplazmatyczna pełni również ważną rolę podczas mitozy – może przesuwać mikrotubule względem siebie, generując siłę w stronę przeciwną niż kinezyrna-5 (Ferenz i wsp., 2009). Jednakże, to kinezyrny z grupy 14 są uważane za główne źródło siły równoważącej działanie kinezyrny-5 we wrzecionie mitotycznym (Ryc. 1.12), (Mountain i wsp., 1999).

Podczas mitozy ważne jest, aby segregacja chromosomów do dwóch przeciwnych biegunów dzielącej się komórki następowała w sposób skoordynowany. Jest to możliwe dzięki działaniu białek motorycznych transportujących chromosomy do centralnej części wrzeciona (Cross i McAinsh, 2014), tak jak kinezyrna-7 (Schaar i wsp., 1997), a także

przesuwających mikrotubule wrzeciona: ww. dyneina i kinezyna-5, kinezyna-6 (Fu i wsp., 2009), kinezyna-8 (Su i wsp., 2013), kinezyna-12 (Reinemann i wsp., 2017) i kinezyna-14 (Oladipo i wsp., 2007). Drugi komponent to właściwości mikrotubul, które polimeryzują i depolimeryzują pod ścisłą regulacją, w zależności od potrzeby. Przykładowo, główną siłą generującą transport chromosomów do przeciwległych biegunów jest depolimeryzacja mikrotubul kinetochorowych przez kinezynę-13 (Asbury, 2017). Rola białek poruszających się w kierunku końca minus jako transporterów chromosomów (przy centrosomach), np. dyneiny jest jedynie sugerowana (Asbury, 2017).



Ryc. 1.12 Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie podczas mitozy (Peterman i Scholey, 2009; zmienione)

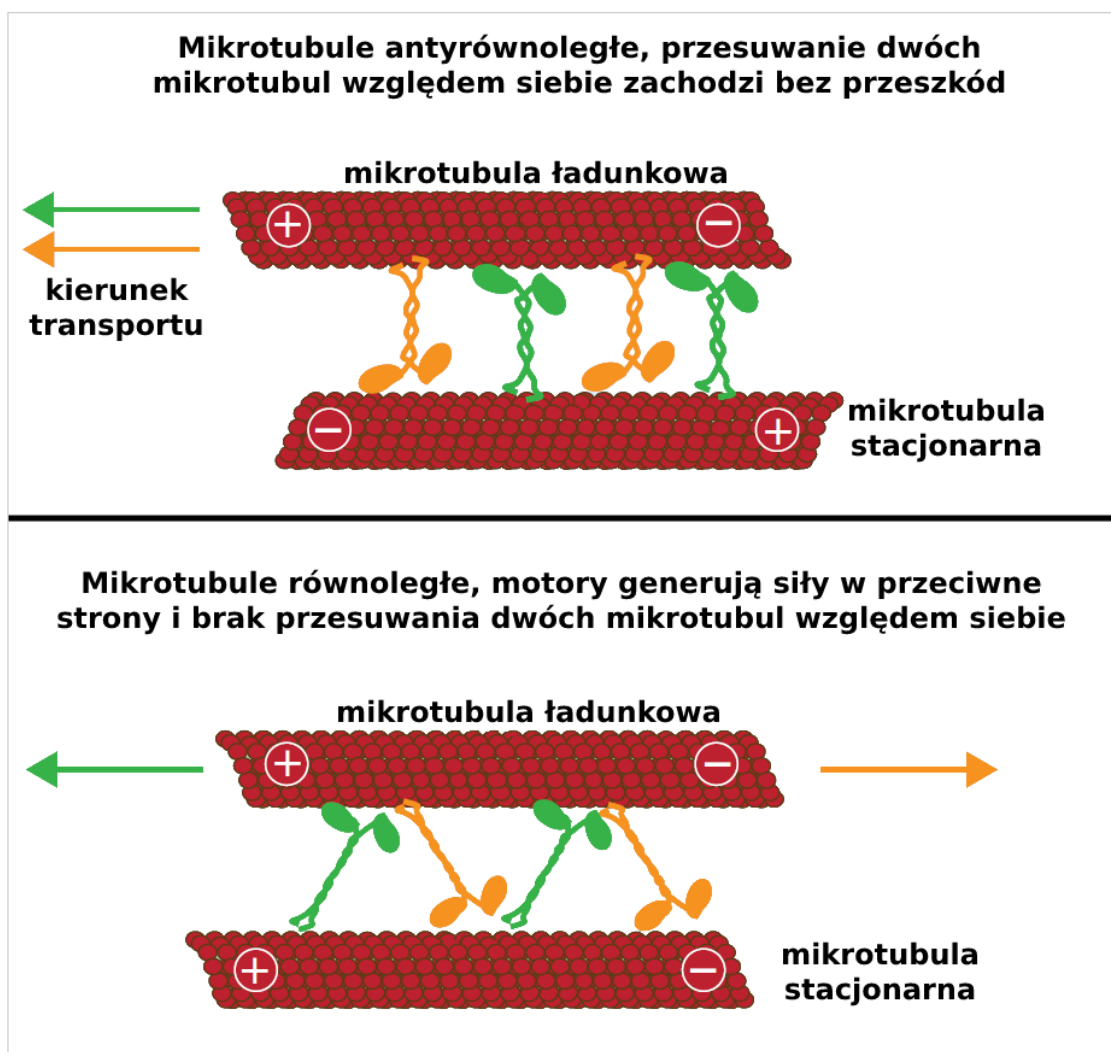
Kinezyna-5 jest homotetramerem z domenami motorycznymi umieszczonymi na każdym końcu długiej osi całej struktury (Ryc. 1.6 i 1.12) (Gordon i Roof, 1999; Shimamoto i wsp., 2015). Kinezyna ta sieciuje i przesuwa antyrównoległe mikrotubule, poruszając się w kierunku końców plus każdej z mikrotubul (Kapitein i wsp., 2005; van den Wildenberg i wsp., 2008). W takim układzie obie mikrotubule służą jednocześnie

jako „ścieżki ruchu” oraz ładunki dla kinezy-5. W przypadku równoległego ułożenia mikrotubul dochodzi do ich sieciowania (Kapitein i wsp., 2005). Wykazano, że Eg5 jest umiarkowanie procesywną i dość powolną kinezyną-5, poruszającą się z prędkością 10 – 40 nm/s (Valentine i wsp., 2006). Ponadto, w badaniach z użyciem pojedynczych cząsteczek wykazano, że homotetramery kinezy-5 wymagają C-końcowej domeny do sieciowania i przesuwania dwóch mikrotubul (Weinger i wsp., 2011). C-końcowa część wzmacnia oddziaływanie kinezy-5 z mikrotubulami bez znacznego zmniejszenia aktywności (Bodrug i wsp., 2020). Weinger i wsp. (2011) sugerują, że jest mało prawdopodobne, aby same domeny motoryczne były w stanie utrzymać trwałe sieciowanie mikrotubul. Zamiast tego, kinezy-5 wykorzystuje niezależne od ATP miejsca wiązania mikrotubul do regulacji dynamiki przyłączania do mikrotubul, umożliwiając ich wydajne ustawianie i sortowanie podczas mitozy.

Najlepiej poznanym białkiem z rodziny 14 kinezyn jest Ncd z *Drosophila melanogaster*. Jest to białko nieprocesywne, dimeryczne, poruszające się w kierunku końca minus mikrotubuli (McDonald i wsp., 1990). Podczas mitozy kinezy-14 sieciuje i przesuwa antyrównoległe mikrotubule w kierunku przeciwnym niż kinezy-5, co pozwala utworzyć i utrzymać prawidłową dwubiegunową strukturę wrzeciona podziałowego, a także zapewnić jego odpowiednią długość (Endow i wsp., 1994; Fink i wsp., 2009).

Mechanizm ruchu kinezy-14 jest inny niż kinezy-1. Nieprocesywna kinezy-14 porusza się, wykorzystując mechanizm dźwigni (podobnie jak miozyna II). W skrócie, domena motoryczna kinezy-14, położona na końcu karboksylowym, przyłącza się do mikrotubuli, co skutkuje uwolnieniem ADP i pociąga za sobą niewielką rotację fragmentu superhelikalnego w kierunku poprzecznym do osi mikrotubuli (Nitzsche i wsp., 2016). W następnym etapie, do kompleksu Ncd na mikrotubuli przyłącza się ATP, co powoduje główny obrót fragmentu superhelikalnego o znaczny kąt ($\sim 70^\circ$) w kierunku równoległym do osi protofilamentu (Endres i wsp., 2006; Nitzsche i wsp., 2016). Gdy ATP ulega hydrolizie, główka odłącza się od mikrotubuli, a fragment superhelikalny wraca do stanu wyjściowego. Między domenami motorycznymi a fragmentem superhelikalnym nie ma elastycznego łącznika sztywny i kinezy-14 nie może przyłączyć się jednocześnie za pomocą dwóch główek, tak jak robi to kinezy-1.

W oddziaływaniach Ncd z mikrotubulami uczestniczy również ogon położony na końcu aminowym tej kinezyzny (Karabay i Walker, 1999). Ponadto wykazano, że pełnej długości Ncd i konstrukt zawierający tylko ogon mają zdolność do dyfuzji po mikrotubulach (Fink i wsp., 2009). Szczesna i Kasprzak (2012) wykazali, że ogon Ncd jest kluczowym elementem w procesie generacji ruchu, a także odpowiada za modulację interakcji między Ncd a mikrotubulą. Ncd przesuwają wyłącznie antyrównoległe mikrotubule, a jeśli są one ustawione równoległe, to ewentualny transport jest bardzo szybko hamowany i dochodzi do sieciowania mikrotubul, albo od razu następuje samo sieciowanie (Fink i wsp., 2009). Dzieje się tak dlatego, że część motorów przyłącza się za pomocą domeny motorycznej, a reszta poprzez ogon (Ryc. 1.13) i w przypadku równoległe zorientowanych mikrotubul różnie ustawione motory generują siły w przeciwne strony, co określono „przeciąganiem liny” (*ang. tug-of-war*) (Fink i wsp., 2009).



Ryc. 1.13 Przesuwanie dwóch mikrotubul przez Ncd (Fink i wsp., 2009; zmienione)

Kinezyzna-12 to procesywny motor, który podczas mitozy przesuwa mikrotubule, a także śledzi rosnące końce plus mikrotubul kinetochorowych, chroniąc je przed depolimeryzacją (Sturgill i Ohi, 2013). Ludzka kinezyzna-12 (hKif15) może występować w formie dimeru (Reinemann i wsp., 2017) oraz podobnie jak kinezyzna-5 – bipolarnego homotetrameru, co nie jest do końca rozstrzygnięte (Drechsler i wsp., 2014; Mann i wsp., 2017). Kinezyzna-12, podobnie jak kinezyzna-1 oprócz domeny motorycznej ma drugie miejsce wiązania mikrotubul niezależne od ATP, ale nie jest to ogon tak jak u kinezyzny-1, tylko część superhelikalna znajdująca się w centrum białka (coil-1, Sturgill i wsp., 2014). W odróżnieniu od kinezyzny-5, kinezyzna-12 najczęściej przesuwa równoległe mikrotubule (Drechsler i McAinsh, 2016). Reinemann i wsp. (2017) wykazali, że Kif15 jest zdolna przesuwać tylko antyrównoległe mikrotubule, ale badali to białko w formie dimerycznej. Z kolei Drechsler i McAinsh (2016) sugerują, że podczas przesuwania równoległych mikrotubul motor ten w formie tetrameru zachowuje się podobnie jak kinezyzna-5, czyli porusza się po obu mikrotubulach, z którymi wchodzi w interakcję, a w przypadku antyrównoległych mikrotubul jedna z par domen motorycznych zostaje inaktywowana, umożliwiając aktywne przesuwanie mikrotubul względem siebie. Drechsler i wsp. (2014) pokazali, że kinezyzna-12 może zmieniać tor ruchu, kiedy napotka przecinające się mikrotubule. Dodatkowo motor ten sieciuje mikrotubule, utrzymując równoległe ustawienie mikrotubul kinetochorowych (Drechsler i McAinsh, 2016).

1.3.1 Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1

Oprócz domeny motorycznej, również ogon kinezyzny-1 ma zdolność wiązania się do mikrotubul, (Ryc. 1.9, panel I) ze stałą dysocjacji $K_d \sim 0.45 \mu\text{M}$ (Navone i wsp., 1992; Seeger i Rice, 2010). Konsekwencją wiązania ogona do mikrotubuli jest to, że pojedyncza cząsteczka kinezyzny-1 może wiązać jednocześnie dwie mikrotubule (Andrews i wsp., 1993; Wang i Brown, 2002; Jolly i wsp., 2010), a także przesuwać je względem siebie.

Podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie jedna mikrotubula jest „torem ruchu”, a druga ładunkiem dla motorów, w tym kinezyzny-1. Ogon kinezyzny-1 zawiera wiele zasadowych reszt aminokwasowych, nadających mu ładunek dodatni, które są zachowane w ewolucji u wielu gatunków (Ryc. 1.14). Może on wiązać się z karboksylowym końcem tubuliny (naładowanym ujemnie) poprzez komplementarne

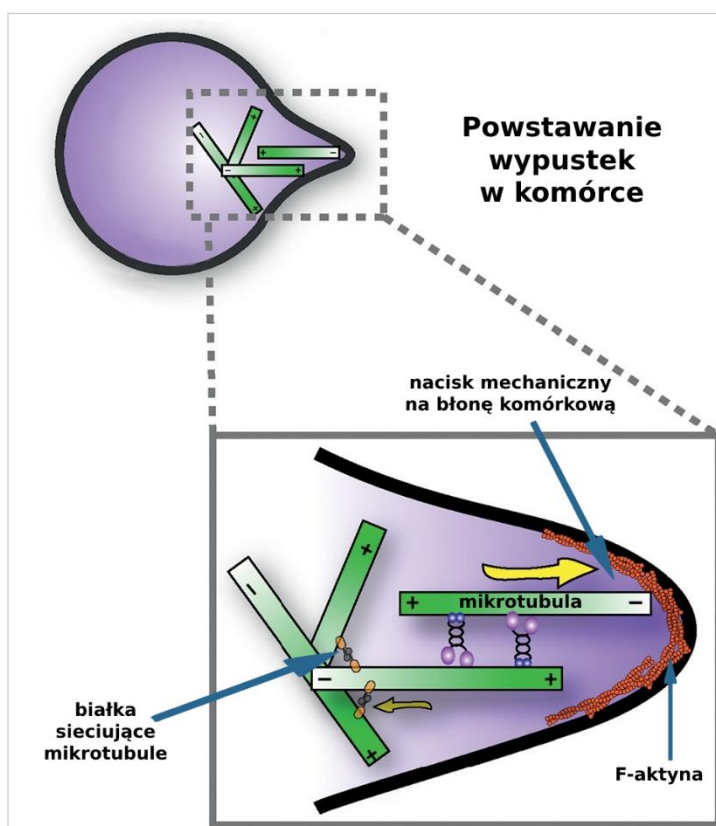
oddziaływania elektrostatyczne (Seeger i Rice, 2010). W przeciwieństwie do domeny motorycznej, oddziaływanie to jest niezależne od obecności ATP (Seeger i Rice, 2010).

DSKORSQAER	RKKYQQE	VERI	KEAVR	QRNM-RRM	<i>Caenorhabditis elegans</i>
EAKEGAMRD	RKRYQYE	VDRI	KEAVR	QKHLGRRG	<i>Drosophila melanogaster</i>
EAKEGAMRD	RKRYQME	VDRI	KEAVR	RORNLARRG	<i>Aplysia californica</i>
DAKEGAMRD	RKRYQHE	VDRI	KEAVR	QKNLARRG	<i>Architeuthis dux</i>
ETKEGAMRD	RKRYQQE	VDRI	EAVR	QRNFARRG	<i>Echinometra viridis</i>
EAKESAMRD	RKKYQQE	VDRI	KEVI	RAKNQSRRN	<i>Danio rerio</i>
EAKENASRD	RKRYQQE	VDRI	KEAVR	SKNMARRG	<i>Xenopus laevis</i>
EAKENAMRD	RKRYQQE	VDRI	KEAVR	AKNMARRA	<i>Gallus gallus domesticus</i>
EAKENASRD	RKRYQQE	VDRI	KEAVR	SKNMARRG	<i>Rattus norvegicus</i>
EAKENASRD	RKRYQQE	VDRI	KEAVR	SKNMARRG	<i>Mus musculus</i>
EAKEGAMKD	KRRYQQE	VDRI	KEAVR	YKSSGKRG	<i>Homo sapiens - KIF5A</i>
EAKENASRD	RKRYQQE	VDRI	KEAVR	SKNMARRG	<i>Homo sapiens - KIF5B</i>
EAKENAMRD	RKRYQQE	VDRI	KEAVR	AKNMARRA	<i>Homo sapiens - KIF5C</i>

Ryc. 1.14 Porównanie sekwencji domeny wiążącej mikrotubule w ogonie kinezy-1 (Lu i Gelfand, 2017; zmienione). Zasadowe reszty aminokwasowe w powyższych sekwencjach, czyli Lys (K) i Arg (R) zaznaczono na czerwono

Zdolność kinezy-1 do przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie zaobserwowano po raz pierwszy *in vitro* w 1991 r. (Urrutia i wsp.). Następnie w badaniach *in vivo* u grzyba *U. maydis* w 2006 (Straube i wsp.) zaobserwowano, że kinezy-1 sieciuje mikrotubule, ale jeśli chodzi o przesuwanie mikrotubul to sugerowano, że kinezy-1 poruszające się do końca plus odpowiadają tylko za 4% zaobserwowanych zjawisk przesuwania dwóch mikrotubul. Dopiero grupa V. Gelfanda (Jolly i wsp. 2010) pokazała, że kinezy-1 generuje przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie podczas powstawania wypustek komórkowych (Ryc. 1.15). Zaobserwowano to w różnych komórkach: w linii komórkowej S2 *Drosophila* (komórki z późnej fazy zarodkowej – 20-24 h), fibroblastach *Xenopus* (płaz), komórkach nabłonkowych torebnika piżmowego (ssak, linia Ptk2). Zahamowanie ekspresji kinezy-1 przez RNAi praktycznie wyeliminowało przesuwanie mikrotubul w tych komórkach (Jolly i wsp., 2010). Ci sami autorzy pokazali też, że kinezy-1 nie wymaga do tego procesu łańcuchów lekkich, a także, że transport mikrotubuli jako ładunku był wolniejszy niż transport innych ładunków przez tę kinezynę. Szybkość przesuwania dwóch mikrotubul przez kinezynę-1 zmierzona dla 23 zdarzeń wynosiła 70 nm/s (Jolly i wsp., 2010) i była ona o wiele niższa niż szybkość poruszania się pojedynczych cząsteczek (800 nm/s; Block i wsp., 1990; Budaitis i wsp., 2019) Wyjaśniono to większą masą, jaką ma mikrotubula, powołując się na badania Visschera i wsp. (1999), które wykazały zależność

szybkości poruszania się kinezy-1 od masy transportowanego ładunku. Dla porównania, szybkość transportu mitochondriów przez kinezy-1 w komórkach wynosi 230 – 280 nm/s (Vagnoni i wsp., 2016; Pilling i wsp., 2006).



Ryc. 1.15 Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezy-1 (Lu i Gelfand, 2017; zmienione)

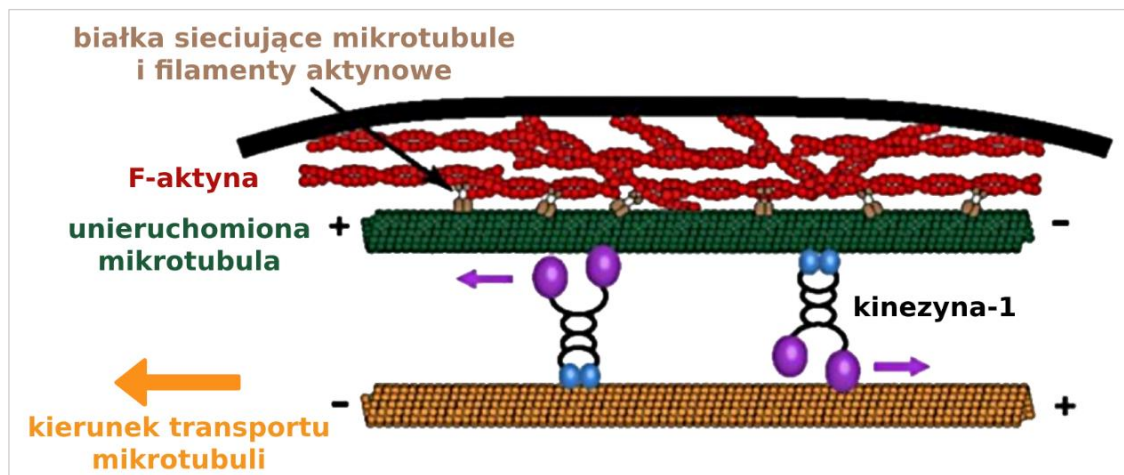
W latach 90-tych Saxton i wsp. (1991) pokazali, że mutacje kinezy-1 u *Drosophila* prowadziły do dysfunkcji synaps, zaburzeń poruszania się, paraliżu i śmierci przed osiągnięciem stadium poczwarki. Z kolei Xia i wsp. (2003) udowodnili, że mutanty *Drosophila* całkowicie pozbawione kinezy-1 umierały tuż po narodzeniu. U kręgowców delecja głównego genu kinezy-1 (KIF5B) prowadziła do dużej śmiertelności zarodków (Tanaka i wsp., 1998). Jednakże, powyższe prace wiązały konsekwencje mutacji lub delecji kinezy-1 wyłącznie z zaburzeniami transportu w aksonie. W 2013 r. Lu i wsp. pokazali, że przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezy-1 stanowi główny mechanizm inicjacji powstawania wypustek nerwowych u *Drosophila*. Ponadto, Lu i wsp. (2013) zaobserwowali, że to przesuwanie mikrotubul względem siebie przez kinezy-1 wywiera nacisk mechaniczny na błonę komórkową rozwijającej się wypustki nerwowej, a sama polimeryzacja mikrotubul okazała się niewystarczająca. Eliminacja kinezy-1 z rozwijających się neuronów

spowodowała znaczące defekty, a wypustki były o wiele krótsze niż w przypadku osobników typu dzikiego (Lu i wsp., 2013).

W dojrzałych neuronach zaobserwowano 50-krotny spadek częstości przesuwania mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 (Lu i wsp., 2013), chociaż białko to ciągle było obecne w komórkach, co prawdopodobnie wskazuje na ścisłą regulację tego zjawiska w neuronach. Ruch dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 został przywrócony w dojrzałym neuronie po przecięciu aksonu u *Drosophila* w celu regeneracji tej wypustki (Lu i wsp. 2015). Przecięcie aksonu wywołało nagły wzrost stężenia jonów wapnia, co doprowadziło do depolimeryzacji mikrotubul w pobliżu miejsca uszkodzenia; następnie powstawały nowe mikrotubule o mieszanej polarności, co kolejno reaktywowało przesuwanie ich przez kinezyne-1 (Lu i wsp., 2015). Mimo iż ci sami badacze czasami obserwowali transport mikrotubul w obu kierunkach, sugerowali oni, że kinezyne-1 przesuwa wyłącznie antyrównoległe mikrotubule, a równoległe sieciuje, podobnie jak Ncd. Po zakończeniu regeneracji proces przesuwania mikrotubul przez kinezyne-1 znów był hamowany. Jeśli chodzi o regulację tego procesu, to del Castillo i wsp. (2015) pokazali, że mitotyczna kinezyne-6 (Pavarotti/ MKLP1) jest czynnikiem hamującym przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 w rozwijających się neuronach. Eliminacja kinezyne-6 skutkowałą powstawaniem zbyt długich wypustek nerwowych, co było wynikiem zwiększonej częstości przesuwania mikrotubul przez kinezyne-1 (del Castillo i wsp., 2015).

Badania przeprowadzone przez Windinga i wsp. (2016) wykazały, że C-końcowy ogon kinezyne-1 jest niezbędny do przesuwania dwóch mikrotubul przez kinezyne-1. Mutacje ogona kinezyne-1, prowadzące do utraty zdolności wiązania ogona do mikrotubul, wpływały nie tylko na zmiany w strukturze aksonów (były krótsze), ale też dendrytów w neuronach czuciowych, które nie były rozgałęzione tak jak u typu dzikiego (Winding i wsp., 2016).

Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 zaobserwowano też w oocytach *Drosophila*, gdzie proces ten odpowiada za cyrkulację cytoplazmy i jej składników, np. mRNA i białek (Lu i wsp., 2016). W tym przypadku jedna mikrotubula jest naturalnie przytwierdzona do aktynowej kory komórki (Ryc. 1.16).



Ryc. 1.16 Cyrkulacja cytoplazmy w oocycie a transport mikrotubul przez kinezynę-1 (Lu i wsp., 2016; zmienione)

Ponadto, nadal nierozstrzygnięta pozostaje kwestia transportu krótkich mikrotubul w komórkach, jako materiału startowego dla nowych mikrotubul lub budulcowego dla przebudowy już istniejących. Niektórzy badacze nie wykryli tego rodzaju transportu w komórkach neuronopodobnych PC-12 (Lim i wsp., 1989), czy w neuronach czuciowych myszy (Okabe i Hirokawa, 1992). Z kolei inni badacze pokazali, że transport krótkich mikrotubul jest możliwy, np. w neuronach szczura (Ahmad i Baas, 1995; Wang i Brown, 2002) czy neuronach *Xenopus* (Tanaka i Kirschner, 1991; Reinsch i wsp., 1991). Wang i Brown (2002) wykazali, że w transporcie mikrotubul prawdopodobnie uczestniczy szybkie białko motoryczne, ale do tej pory nie wiadomo jakie.

1.4 Transport ładunków przez grupy kinezyn

W poprzednim podrozdziale wspomniano, że transport mikrotubuli jako ładunku odbywa się przy udziale więcej niż jednej kinezyny-1. Również transport innych ładunków w komórce rzadko odbywa się przy udziale jednej cząsteczki białka motorycznego, przeważnie wykrywano kilka motorów tego samego, a najczęściej różnych rodzajów białek motorycznych (Kural i wsp., 2005; Levi i wsp., 2006; Reddy i wsp., 2017). Hendricks i wsp. (2010) wyizolowali pęcherzyki transportowane w neuronach i obliczyli, że zawierały one 1-4 cząsteczek dyneiny oraz 1-5 kinezyn przyłączonych do tego samego pęcherzyka. Sugerowano, że ładunki są transportowane w warunkach konkurencji między motorami przemieszczającymi ten sam ładunek w przeciwnych kierunkach (Hendricks i wsp., 2010; De Rossi i wsp., 2017; Guedes-Dias i Holzbaaur, 2019; Monzon i wsp. 2020). W ten sposób o kierunku transportu decyduje wypadkowa siła generowana przez konkurujące grupy motorów, co potwierdzono, np. dla dynein i kinezyn transportujących granule z barwnikiem *in vivo* (Rezaul i wsp.,

2016). Inny model zakłada koordynację białek motorycznych podczas transportu, czyli jeden rodzaj motorów jest inaktywowany na czas transportu w konkretną stronę, np. pokazano, że dyneina pozostawała nieaktywna podczas przemieszczania ładunku do końca plus mikrotubuli (Gross i wsp., 2003; Welte, 2004). W badaniach Serra-Marques i wsp. (2020) pokazano, że podczas transportu pęcherzyków wydzielniczych dochodziło zarówno do generacji sił skierowanych w przeciwnych kierunkach przez kinezyne-1 i dyneinę, ale zaobserwowano też kooperację kinezyne-1 z kinezyną-3 i ta interakcja była ważna dla wydajności transportu.

Zespoły motorów wykazują inne parametry ruchliwości niż pojedyncze cząsteczki. W szczególności obserwowano różnice w długości przebiegu, który był o wiele większy niż dla pojedynczej cząsteczki (Block i wsp., 1990; Vershinin i wsp., 2007). Jednakże, w tych badaniach brakowało dokładnego określenia ilości motorów przyłączonych do ładunku. Dopiero Rogers i wsp. (2009) użyli łącznika składającego się z DNA oraz ligandów białkowych, do którego przyłączyli dwie cząsteczki kinezyne-1. Dwie cząsteczki miały większą długość przebiegu niż jedna (odpowiednio 1380 nm oraz 800 nm). Inne badania wykazały podobną zależność. Derr i wsp. (2012) zbadali parametry ruchliwości dla 1 do 7 cząsteczek motorów. Przy użyciu tego narzędzia wykazali oni, że długość przebiegu kinezyne-1 podczas transportu zwiększa się wraz ze wzrastającą ilością motorów, aż do maksymalnie przez nich zbadanych 7 cząsteczek (Derr i wsp., 2012; Ryc. 6.1). O ile różni badacze są zgodni co do liniowej zależności długości przebiegu od ilości cząsteczek, to nadal nie jest jasne jaki wpływ ma ilość motorów na szybkość transportowanej mikrotubuli. Derr i wsp. (2012) nie zaobserwowali zmian w szybkości w przypadku kinezyne-1, ale np. testy gliding mikrotubul przeprowadzone przez Bielinga i wsp. (2008b) dowiodły, że gęstość cząsteczek kinezyne-1 większa niż ok. 1000 na μm^2 obniża szybkość transportu, co tłumaczono brakiem synchronizacji między kinezynami będącymi w różnych etapach cyklu mechanochemicznego (patrz podrozdział 1.2.4). Również inne badania nie wykazały istnienia synchronizacji między cząsteczkami kinezyne-1 (Jamison i wsp., 2010; Furuta i wsp., 2013). Nie oznacza to bynajmniej, że kooperacja dwóch lub więcej cząsteczek kinezyne-1 jest niemożliwa. Sporadycznie obserwowano takie przypadki w badaniach z wykorzystaniem tzw. „szczypców optycznych” (Vershinin i wsp., 2007; Jamison i wsp., 2010).

W podrozdziałach 1.2.3 i 1.2.5 wspomniano o obecności i istotności elastycznych rejonów w superhelikalnej strukturze kinezy-1, łączącej główkę z ogonem, czyli zawiasów. Brak zawiasów miał wpływ na szybkość w teście gliding, gdzie pracują grupy motorów (Friedman i Vale, 1999; Crevenna i wsp., 2008; Bieling i wsp., 2008b). Ponadto, Bieling i wsp. (2008b) doszli do wniosku, że w zbiorowym transporcie jednej mikrotubuli przez wiele motorów w teście gliding, istotną sprawą jest elastyczność połączenia między główką i ogonem każdego z grupy motorów uczestniczących w transporcie, przyłączonych przez ogony do szkiełka, a przez domeny motoryczne do tej samej mikrotubuli. Ta elastyczność rekompensuje efekty braku synchronizacji pomiędzy motorami, z których każdy znajduje się w innym etapie cyklu mechanochemicznego (podrozdział 1.2.4). W komórkach brak autoinhibicji kinezy-1 miał wpływ na transport ładunków. Kelliher i wsp. (2018) pokazali, że delecja zawiasu-2 w kinezy-1 zaburzała transport aparatu Golgiego do dendrytów i powodowała nadmierną akumulację kinezy-1 w aksonach, co w konsekwencji prowadziło do defektów rozwoju dendrytów.

Jak zachowują się grupy motorów przesuwających dwie mikrotubule względem siebie? Jeśli chodzi o kinezy-1, to nadal nie zostało zbadane jak zachowują się cząsteczki kinezy-1 w grupie podczas przesuwania dwóch mikrotubul. W przypadku ludzkiej kinezy-12 (hKif15) Drechsler i McAinsh (2016) zaobserwowali negatywną kooperatywność między białkami motorycznymi. Podobnie jest z kinezy-1 transportującą ładunek inny niż mikrotubula (Bieling i wsp., 2008b). Drechsler i McAinsh (2016) pokazali, że wraz ze wzrostem ilości cząsteczek hKif15 szybkość przesuwania mikrotubuli maleje, aż w końcu transport zostaje zatrzymany. Analogicznie, większa gęstość cząsteczek ludzkiej kinezy-14 (HSET) między mikrotubulami wynikała podczas „rozjeżdżania się” mikrotubul, czyli zmniejszenia obszaru nakładania się na siebie tych dwóch mikrotubul w płaszczyźnie równoległej między nimi, prowadziła do obniżenia szybkości przesuwania (Braun i wsp., 2017). Poza tym sugerowano dodatkowe fizyczne oddziaływania, które sprzęgają kinezy-12, bo sporadycznie po odłączeniu się mikrotubuli transportowanej obserwowano, że zespół kinezy-12 nadal się poruszał wspólnie (Drechsler i McAinsh, 2016).

Jednym z aspektów ważnych dla regulacji „pracy grupowej” kinezy jest dyfuzja domeny ogona na mikrotubuli podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem

siebie. Udokumentowano to dla ogona kinezy-14 (Lüdecke i wsp., 2018) oraz kinezy-5 Eg5 (Kapitein i wsp., 2008). W kinezy-5, dyfuzja ogona pozwala na utrzymanie wiązania drugiej mikrotubuli w czasie, gdy domena motoryczna „szuka” optymalnego miejsca wiązania do mikrotubuli (Weinger i wsp., 2011). W przypadku kinezy-1 domena motoryczna może dyfundować po mikrotubuli (Lu i wsp., 2009), ale do tej pory nie wiadomo, czy tak może zachowywać się C-końcowy ogon białka.

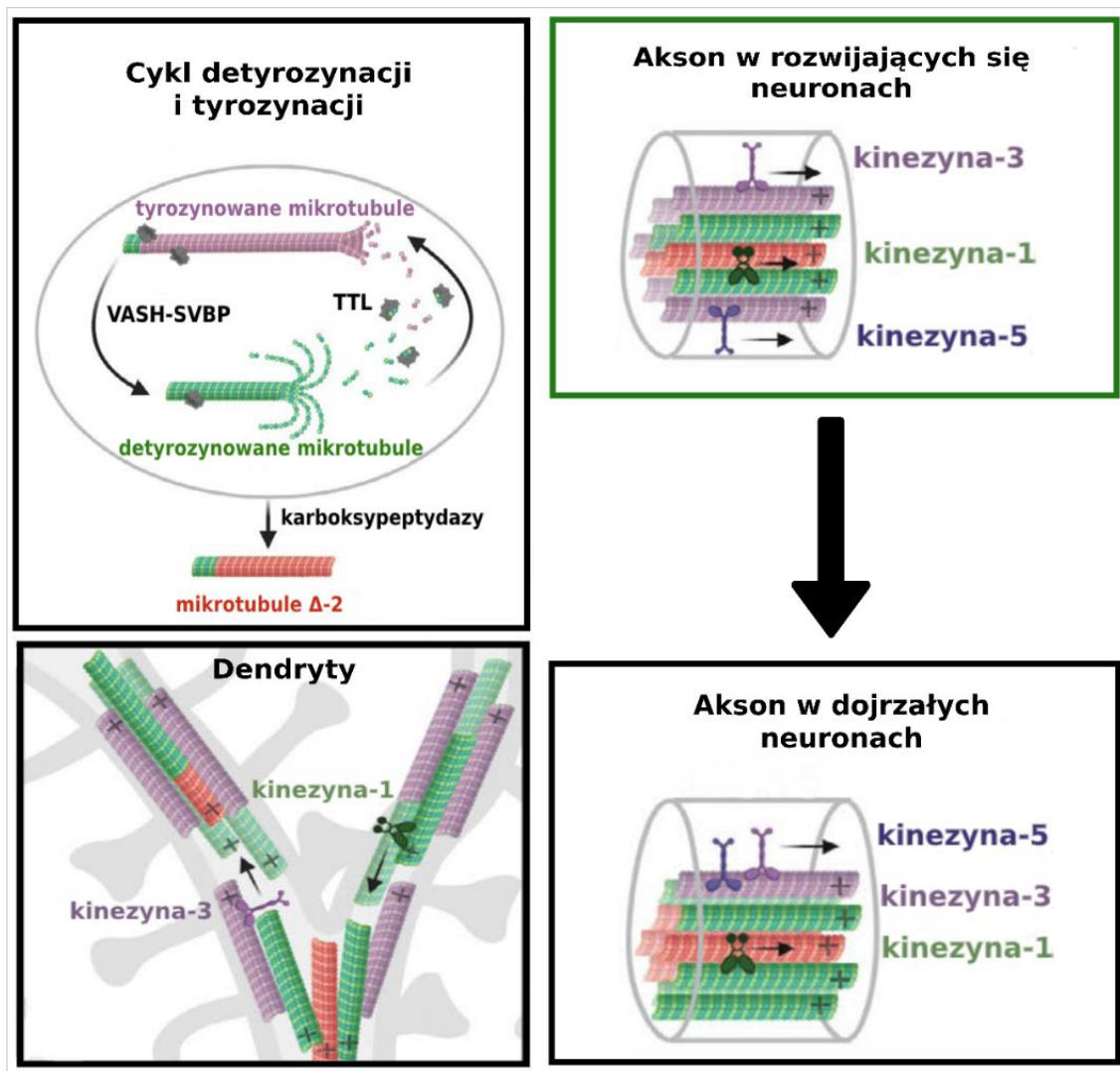
1.5 Regulacja aktywności motorów molekularnych przez modyfikacje potranslacyjne tubuliny

Niewątpliwa i ważna jest rola, jaką odgrywają modyfikacje potranslacyjne tubuliny w modulowaniu aktywności motorów molekularnych. Testy ruchliwości pojedynczych cząsteczek przeprowadzone przez Sirajuddina i wsp. (2014) wykazały, że usunięcie C-końcowych ogonów z obu podjednostek tubuliny, w przypadku kinezy-1 skutkowało obniżeniem szybkości poruszania się motoru o 50%, a jego procesywności o 75%. Dla dyneiny z kolei, zaobserwowano redukcję procesywności o 50%. Co ciekawe, w przypadku kinezy-2 po usunięciu ogonów tubuliny nastąpił dwukrotny wzrost szybkości, natomiast procesywność wzrosła dwa i pół razy. Ponadto, wykazano, że dla kinezy-1 i dyneiny, do niemal 100% przywrócenia standardowych parametrów procesywności i szybkości wystarczy obecność ogona w podjednostce β tubuliny. Dla kinezy-2 procesywność jest zależna od obecności CTT w obu podjednostkach (Wang i Sheetz, 2000; Sirajuddin i wsp., 2014). Wybiórcza zależność aktywności niektórych białek motorycznych od obecności C-końcowych ogonów tubuliny jest szczególnie interesująca, ponieważ fragmenty te stanowią główne miejsca modyfikacji potranslacyjnych tubuliny, co sugeruje, że modyfikacje potranslacyjne tubuliny mogą regulować wiązanie i aktywność motorów molekularnych.

Tyrozynacja stanowi podstawę dla swoistej nawigacji wykazywanej przez kinezynę-1 w neuronach, ponieważ od strony ciała komórki w aksonach dojrzałych neuronów występują głównie mikrotubule detyrozynowane, do których kinezy-1 ma większe powinowactwo niż do tyrozynowanych, które obecne są w stożkach wzrostu. Z kolei w dendrytach, bliżej centrum komórki są mikrotubule tyrozynowane, a detyrozynowane są w części dystalnej (Konishi i Setou, 2009; Kliszcz i Kasprzak, 2018). Domena motoryczna kinezy-1, gromadziła się w aksonach (Nakata i Hirokawa, 2003), a nawet rozpoznawała przyszłe aksony jeszcze przed polaryzacją neuronu (Jacobson i wsp.,

2006). Utrata funkcji tyrozynacji tubuliny w neuronach prowadziła do redystrybucji kinezyny-1 do dendrytów (Konishi i Setou, 2009) i utworzenia w neuronie wielu aksonów zamiast jednego (Erck i wsp., 2005). Warto pamiętać, że w warunkach fizjologicznych kinezyna-1 pełnej długości jest też w ograniczonym stopniu aktywna w dendrytach, a jej „przekierowanie” do odpowiedniego obszaru komórki jest ściśle regulowane. Dynamiczne tyrozynowane mikrotubule i stabilne mikrotubule z modyfikacjami Δ -2 i acetylacją, tworzą w dendrytach nienakładające się wiązki antyrównoległe, w których tyrozynowane mikrotubule mają koniec plus skierowany w kierunku dystalnej części, a acetylowane/ Δ -2 (stabilne) do ciała komórki (Ryc. 1.17). Kinezyna-1 przyłączając się do stabilnych mikrotubul dendrytów jest automatycznie kierowana do ciała komórki, a stamtąd do aksonu (Tas i wsp., 2017). Co ciekawe, zaburzenia tyrozynacji i detyrozynacji tubuliny w neuronach zostały powiązane z defektami plastyczności synaptycznej oraz zaburzoną homeostazą kolców dendrytycznych (Yasuda i wsp., 2017).

W warunkach *in vitro*, a konkretnie z oczyszczonymi białkami, kinezyna-1 nie wykazywała tak wyraźnych preferencji w oddziaływaniu z tyrozynowanymi i detyrozynowanymi mikrotubulami, jak miało to miejsce w komórkach. Nie znaleziono większych różnic w szybkości czy długości przebiegu, ale zaobserwowano większą częstość przyłączania się kinezyny-1 do mikrotubul detyrozynowanych (1.3 zdarzeń na μ m mikrotubuli tyrozynowanej i 1.94 w przypadku detyrozynacji, Kaul i wsp., 2014). Z kolei, w innej publikacji wykazano, że detyrozynacja obniżyła procesywność kinezyny-1 o 25% (Sirajuddin i wsp., 2014). Jeśli chodzi o inne kinezyny, to w przypadku kinezyny-2 detyrozynacja powodowała wzrost szybkości (dwukrotny) i procesywności (2.5 razy) (Sirajuddin i wsp., 2014). Natomiast kinezyna-3 oraz kinezyna-5 preferowały tyrozynowane mikrotubule i w równym stopniu wiązały się do mikrotubul w aksonie i dendrytach (Kahn i wsp., 2015; Tas i wsp., 2017). Kinezyna-13 MCAK, która depolimeryzuje mikrotubule, miała wyższą aktywność wobec tyrozynowanych mikrotubul (Peris i wsp., 2009), nawet 2.5 razy (Sirajuddin i wsp., 2014). Wobec tego, detyrozynacja mikrotubul może zapobiegać depolimeryzacji zależnej od MCAK (Peris i wsp., 2009).



Ryc. 1.17 Rozmieszczenie mikrotubul w neuronie z uwzględnieniem tyrozynacji i detyrozynacji, a także orientacji mikrotubul i dystrybucji wybranych białek MAP – w zależności od stopnia zróżnicowania neuronu (Moutin i wsp., 2020; zmienione). Wraz z rozwojem neuronu zwiększa się udział stabilnych (detyrozynowanych i Δ 2) mikrotubul, co widać zwłaszcza w aksonach. Ponadto, warto zwrócić uwagę na różnice w orientacji mikrotubul w aksonach (jednolicie ułożone), a w dendrytach (naprzemiennie)

Dyneina poruszała się czterokrotnie wolniej na detyrozynowanych mikrotubulach, co jest największym znanym wpływem modyfikacji potranslacyjnych tubuliny na generację ruchu przez motor molekularny (McKenney i wsp., 2016). Tyrozynacja α -tubuliny była wymagana do inicjacji ruchu przez ten kompleks, ale do kontynuacji ruchu już nie (McKenney i wsp., 2016). Tyrozynacja i detyrozynacja mikrotubul są też ważne podczas mitozy. Modyfikacja ta wybiórczo kieruje białkami motorycznymi zaangażowanymi w procesie podziału komórki. Przykładowo, białko CENP-E/Kinezyzna-7 (ang. *centromere-associated protein E*) transportuje chromosomy do płytki metafazowej. Proces ten jest promowany poprzez preferencję CENP-E do transportu po detyrozynowanych mikrotubulach (Barisic i wsp., 2015; Barisic i Maiato, 2016).

Kolejną modyfikacją, która wpływa na aktywność białek motorycznych jest glutamylacja. W badaniach *in vitro* z udziałem oczyszczonych białek dowiedziono, że glutamylacja miała zróżnicowany wpływ na kinezy. W przypadku kinezy-2 wystarczył łańcuch o długości 3 reszt kwasu glutaminowego żeby szybkość i procesywność wzrosła około 1.5 razy. Z kolei, kinezy-1 reagowała podobnym zwiększeniem procesywności dopiero przy 10 resztach glutaminianu. Natomiast, dyneina i depolimeryzująca mikrotubule kinezy-13 nie były wrażliwe na glutamylację. Dodatkowo, kinezy-1 miała trzykrotnie niższą procesywność na mikrotubulach zbudowanych z izotypu $\beta 3$ (TUBB3) z powodu obecności dodatnio naładowanej reszty lizyny w ogonie tubuliny tego wariantu. Zaobserwowano, że glutamylacja – zarówno łańcuch składający się z 3, jak i 10 reszt Glu, niwelowała hamujący wpływ lizyny na kinezy-1 (Sirajuddin i wsp., 2014). Wykazano też, że poliglutamylacja bezpośrednio reguluje interakcję między mikrotubulą a dyneiną, brak tej modyfikacji umiarkowanie osłabiał ruchliwość wici bez zauważalnych zmian strukturalnych (Kubo i wsp., 2010).

Jeśli chodzi o wpływ poliaminacji tubuliny na oddziaływanie z kinezynami, to w jednej publikacji (Del Duca i wsp., 2009) pokazano, że modyfikacja ta obniża zarówno częstotliwość wiązania, jak i szybkość poruszania się kinezy-1 (KIF5C) po mikrotubulach (nawet o 50%).

Acetylacja zwiększała powinowactwo kinezy-1 do mikrotubul i jej szybkość (Reed i wsp., 2006; Cai i wsp., 2009; Tas i wsp., 2017). Poza tym pokazano jej wpływ na transport ładunków w neuronach, ale nie dowiedziono, że sama acetylacja ma takie działanie (Godena i wsp., 2014; Kim i wsp., 2016; Guo i wsp., 2017; Dompierre i wsp., 2007). Badania z użyciem oczyszczonych białek nie dowiodły takiej zależności jak w komórkach i wykazano, że acetylacja nie ma bezpośredniego wpływu na szybkość poruszania się oraz długość przebiegu cząsteczek kinezy po mikrotubulach (Walter i wsp., 2012; Kaul i wsp., 2014). Pozostałe modyfikacje wymienione w tabeli (Tab. 1.1) nie zostały zbadane pod kątem ewentualnego wpływu na aktywność motorów molekularnych.

2. Cel pracy

Mimo, iż kinezyiny mają dobrze zachowaną ewolucyjnie ok. 40-kDa domenę motoryczną, generacja ruchu przez różnych przedstawicieli tej rodziny odbywa się w sposób indywidualny. Najlepiej poznanym białkiem z rodziny kinezyin jest kinezyina-1, która nie tylko transportuje ładunki, lecz również reorganizuje sieć mikrotubul w komórce. Biologiczne znaczenie procesu przesuwania dwóch mikrotubul jest bardzo istotne i dotyczy takich zjawisk, jak podział komórki, powstawanie wypustek komórkowych, np. aksonów, cyrkulacja cytoplazmy w oocytach, a także reorientacja mikrotubul pod względem ich polarności w neuronach, co starałam się przedstawić we Wstępie rozprawy. Jak dotychczas, w przypadku kinezyiny-1 nie jest znany molekularny mechanizm tego zjawiska, w tym parametry takie, jak szybkość przesuwania mikrotubul, ich wzajemna orientacja podczas transportu, możliwości zmiany kierunku ruchu, itp. Wydaje się, że przyczyną braku danych doświadczalnych dotyczących ruchu par mikrotubul przez kinezynę-1 była niedostępność metody obserwacji tego zjawiska *in vitro*.

Dlatego też, pierwszym celem niniejszej pracy było **opracowanie metody**, która umożliwiłaby ilościowe pomiary przesuwania mikrotubul względem siebie napędzanego przez cząsteczki kinezyiny-1 *in vitro*.

Drugim celem pracy były **pomiary szybkości i długości przebiegu mikrotubul transportowanych podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie** w zależności od stężenia kinezyiny-1 pełnej długości, a także przeanalizowanie zmian czasu trwania przerw w trakcie tego rodzaju transportu. Ponadto, w omawianym celu zawierał się także opis i analiza innych zjawisk, które zaobserwowano podczas przesuwania dwóch mikrotubul, takich jak obracanie i zawracanie mikrotubul, czy ich transport w dwóch kierunkach.

Trzecim celem pracy było zbadanie, **czy modyfikacje potranslacyjne tubuliny mają wpływ na przesuwanie mikrotubul** przez kinezynę-1. Do tej pory zostało to ustalone dla samej domeny motorycznej kinezyiny-1, podczas transportu ładunków przez pojedyncze cząsteczki, a wpływ modyfikacji potranslacyjnych tubuliny na zjawisko ruchu par mikrotubul przez kinezynę-1 nigdy nie był badany.

3. Materiały

3.1 Szczepy bakterii

Tab. 3.1 Szczepy bakteryjne

Nazwa szczepu i pochodzenie	Genotyp
<i>E. coli</i> Top10F (Invitrogen)	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i>(StrR) <i>endA1</i> λ-</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS (Novagen)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ (DE3) pLysS(cmR)
<i>E. coli</i> Rosetta (Novagen)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ (DE3) pLysS(cmR) geny kodujące tRNA rzadkich kodonów

3.2 Plazmidy do nadprodukcji białek

Tab. 3.2 Plazmidy do ekspresji białek rekombinowanych

Nazwa	Opis	Oporność	Źródło
pOET1N-Kif5b-eGFP	Plazmid do nadprodukcji białka w komórkach owadzych, zawierający sekwencję kodującą kinezynę-1 pełnej długości typu dzikiego, a także eGFP i metkę polihistydynową na końcu karboksylowym białka.	Ampicylina	Niniejsza praca
pOET1N-Kif5b- Δ H2-eGFP	Plazmid do nadprodukcji białka w komórkach owadzych, zawierający sekwencję kodującą kinezynę-1 bez zawiasu-2, eGFP i metkę polihistydynową na końcu karboksylowym białka.	Ampicylina	Niniejsza praca
pGEX-4T-1-TTL	Plazmid do nadprodukcji białka w komórkach <i>E. coli</i> , zawierający sekwencję kodującą ligazę tyrozynową tubuliny i metkę GST na końcu aminowym białka.	Ampicylina	Niniejsza praca
pGEX-4T-1-TTLL7	Plazmid do nadprodukcji białka w komórkach <i>E. coli</i> , zawierający sekwencję kodującą glutamylazę 7 tubuliny, metkę GST na końcu aminowym białka, a także miejsce rozpoznawane przez proteazę PreScission między metką a białkiem.	Ampicylina	Niniejsza praca

3.3 Pożywki do hodowli bakteryjnych

- **Luria Broth (LB) płynne** – 1% pepton kazeinowy, 1% NaCl, 0.5% ekstrakt drożdżowy, pH 7.2 -7.5
- **LB stałe** – skład jak wyżej, a dodatkowo 1.5% agar
- **SOC (ang. *super optimal catabolite repression*)** – 2% pepton kazeinowy, 0.5% ekstrakt drożdżowy, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM glukoza

3.4 Bufory

Większość odczynników do badań została zakupiona w Sigma-Aldrich (Niemcy) oraz Roth (Niemcy), w przypadku ważniejszych substancji załączono numery katalogowe (nr kat.).

Tab. 3.3 Bufory używane w niniejszej pracy

Nazwa	Skład
Przygotowanie komórek chemokompetentnych	
<i>Bufor K</i>	60 mM CaCl ₂ , 15% glicerol (v/v), 10 mM Pipes, pH 7
Elektroforeza agarozowa	
<i>TAE</i>	40 mM Tris-octan and 1 mM EDTA, pH 8.3
<i>Bufor do próbek DNA, 6x stężony</i>	0,25% błękit bromofenolowy, 30% glicerol
Elektroforeza SDS-PAGE	
<i>Bufor do próbek białkowych, 5x stężony</i>	0.25 M Tris-HCl, 10% SDS, 0.5% błękit bromofenolowy, 50% glicerol (v/v); 0.5 M DTT (przed użyciem)
<i>Bufor glicynowy</i>	0.125 mM Tris (zasada), 1.92 M glicyna, 1% SDS, pH 8.3
Western Blot	
<i>TBST – do transferu</i>	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,4
<i>Bufor substratowy dla alkalicznej fosfatazy</i>	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,5
Preparatyka tubuliny oraz praca z mikrotubulami	
<i>PM bez glicerolu</i>	100 mM PIPES-KOH, 2 mM EGTA, 0,1 mM EDTA; 1 mM ATP i 2 mM DTT (przed użyciem), pH 6,9
<i>PM z glicerolem</i>	100 mM PIPES-KOH, 2 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 30% glicerol (v/v); 1 mM ATP i 2 mM DTT (przed użyciem), pH 6,9

<i>PEM</i>	100 mM PIPES-KOH, 0,5 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 6,85
<i>Brb80</i>	80 mM PIPES-KOH, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 6,9
<i>Brb80-MT</i>	80 mM PIPES-KOH, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 30 μM taksol (Sigma-Aldrich, nr kat. T7191), 1 mM DTT, pH 6,9
Inhibitory proteaz i inne dodatki do dezintegracji komórek	
<i>Stężenia w buforach</i>	1 mM PMSF, 2 ug/ml aprotynina (Sigma-Aldrich, nr kat. A6279), 10 ug/ml pepstatyna A (Roth, nr kat. 2936.2), 50 ug/ml leupeptyna (Roth, nr kat. CN33.4), 3 ug/ml DNAza I (Roche, Szwajcaria nr kat. 10104159001), 8 ug/ml RNAza (Roth, nr kat. 7164.1)
Preparatyka ligazy tyrozynowej i tyrozynacja tubuliny	
<i>TTL-1 (dezintegracja komórek)</i>	1 x PBS (137.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9.55 mM bufor fosforanowy – 10 mM Na ₂ HPO ₄ i 1.8 mM KH ₂ PO ₄), 10 mM MgCl ₂ ; inhibitory proteaz i 5 mM DTT (przed użyciem), pH 7.4
<i>TTL-2 (płukanie)</i>	50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM MgCl ₂ ; 5 mM DTT (przed użyciem), pH 7.5
<i>TTL-3 (elucja)</i>	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM glutation, pH 7.5
<i>Bufor do tyrozynacji</i>	1 x BRB80, 1 mM DTT, 0.3 mM tyrozyna, 2 mM ATP
Preparatyka glutamylazy 7 tubuliny i glutamylacja	
<i>TLL-1 (dezintegracja komórek)</i>	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; inhibitory proteaz (przed użyciem), pH 7.5
<i>TLL-2 (płukanie)</i>	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4
<i>TLL-3 (płukanie i odcinanie metki)</i>	50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4
<i>Bufor A</i>	20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM, MgCl ₂ , 1mM ATP, 1 mM gutaminian, 1 mM DTT, pH 7.0
Preparatyka kinezy-1	
<i>K-1 (dezintegracja komórek)</i>	50 mM Tris, 0.4 M NaCl, 20 mM imidazol, 2 mM MgCl ₂ ; inhibitory proteaz (50 μg/ml leupeptyny), 10 mM 2-merkaptioetanol, 40 uM ATP (przed użyciem)

<i>K-2 (płukanie)</i>	20 mM Tris, 0.3 M NaCl, 10 mM imidazol, 2 mM MgCl ₂ ; inhibitory proteaz (10 µg/ml leupeptyny), 40 uM ATP (przed użyciem)
<i>K-3 (płukanie drugie)</i>	20 mM Tris, 0.2 M NaCl, 30 mM imidazol, 2 mM MgCl ₂ ; inhibitory proteaz (10 µg/ml leupeptyny), 40 uM ATP (przed użyciem)
<i>K-4 (elucja)</i>	20 mM Tris, 0.1 M NaCl, 250 mM imidazol, 2 mM MgCl ₂ ; 5 µg/ml leupeptyny), 40 uM ATP (przed użyciem)
Bufory do testu ruchliwości pojedynczych cząsteczek	
<i>Brb20</i>	20 mM PIPES-KOH, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 6,9
<i>Brb20-S</i>	1x Brb20, 0.05% Pluronic F127, 40 mM glukoza, 0.2 mg/ml kazeina, 50 mM KCl, 20 µM taksol, 1 mM DTT; opcjonalnie antyoksydanty: 20 µg/ml oksydaza glukozy i 8 µg/ml katalaza (Sigma-Aldrich, nr kat. odpowiednio G7141 i C40)
Bufory do testu gliding	
<i>Bufor blokujący</i>	1x Brb20, 0.5 mg/ml kazeina
<i>Bufor G</i>	1 x Brb20, 0.5 mg/ml kazeina, 40 mM glukoza, 20 µM taksol, 1 mM DTT, opcjonalnie antyoksydanty: 20 µg/ml oksydaza glukozy, 8 µg/ml katalaza
Bufory do testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie	
<i>Bufor 1</i>	1 x Brb80, 20 µM taksol, 0.05% Pluronic F127
<i>Bufor 2</i>	1 x Brb20, z 0.075 mg/ml kazeina, 0.05% Pluronic F127, 40 mM glukoza, 20 µM taksol
<i>Bufor 3</i>	Brb20, z 50 mM KCl, 0.075 mg/ml kazeina, 0.05% Pluronic F127, 40 mM glukoza, 20 µM taksol
<i>Bufor 4</i>	Bufor 3, 20 µg/ml oksydaza glukozy, 8 µg/ml katalaza, 10 mM DTT

4. Metody

4.1 Przygotowywanie konstruktów DNA do produkcji białek rekombinowanych

4.1.1 Hodowla bakteryjna

W celu uzyskania pojedynczych kolonii bakterie wysiano na szalki ze stałą pożywką LB, która zawierała 1.5 % agaru oraz odpowiedni antybiotyk, który pozwalał na selekcję, a w konsekwencji wzrost jedynie bakterii z plazmidem niosącym oporność na ten związek chemiczny. Hodowlę prowadzono w 37°C przez 14-16 h. Wybraną pojedynczą kolonię przeniesiono do podłoża płynnego (LB lub inne, jeśli zaznaczono w protokole) z antybiotykiem i hodowano 14-16 h z wytrząsaniem w 37°C. Po tym czasie bakterie wykorzystano jako inokulum do dalszej hodowli w zawieszynie albo materiału do izolacji plazmidów (a konkretnie osad bakterii po zwirowaniu). W celu długotrwałego przechowywania kultur bakteryjnych do zawiesiny bakterii dodano glicerol do stężenia 25-30% i umieszczono w temperaturze -80°C.

4.1.2 Izolacja DNA plazmidowego

Plazmidy izolowano z osadu bakterii przygotowanego jak to opisano w punkcie 4.1.1. Dalsza procedura była wykonana zgodnie z zaleceniami producenta wybranego zestawu do izolacji plazmidowego DNA – Thermo Fisher Scientific, USA (nr kat. K0481) lub EurX, Polska (nr kat. E3500). Oczyszczone plazmidy zawieszano w sterylnej wodzie dejonizowanej i przechowywano w temperaturze -20°C.

4.1.3 Przygotowanie bakterii chemokompetentnych i transformacja wybranym plazmidem

Komórki kompetentne to takie, które są zdolne do pobierania egzogennej DNA (zwykle plazmidowego) ze środowiska. Taka kompetencja może być naturalna (np. u *Bacillus subtilis*) lub wywołana sztucznie w laboratorium. Istnieją dwie metody – elektroporacja i chemokompetencja za pomocą chlorku wapnia. Obie prowadzą do powstania otworów w ścianie komórkowej bakterii, dzięki którym komórka staje się przepuszczalna dla obcego DNA. W niniejszej pracy stosowano metodę chemiczną.

Z całonocnej hodowli bakterii pobrano 1 ml i dodano do 100 ml świeżej pożywki LB. Całość inkubowano z wytrząsaniem w 37°C do $OD_{590} = 0.375$ (ang. *optical density*), co trwało ok. 1.5 – 3 h. Następnie hodowlę przeniesiono do dwóch probówek wirówkowych o objętości 50 ml i inkubowano w lodzie przez 10 min. Potem wirowano

przez 7 min w 4°C przy 1600 x g. Supernatant usunięto, a każdy osad zawieszono delikatnie w 10 ml buforu K (z 60 mM CaCl₂). Zawiesinę ponownie wirowano przez 5 min w 4°C, 1100 x g. Supernatanty oddzielono, a każdy osad delikatnie zawieszono w 10 ml buforu K i inkubowano 30 min w lodzie. Po tym czasie zawiesinę wirowano przez 5 min w 4°C przy 1100 x g. Supernatanty usunięto, a osady zawieszono w 1 ml buforu K każdy. Zawiesiny były łączone, dzielone na porcje do eppendorfów po 50 – 100 µl, mrożone w ciekłym azocie i przechowywane w -80°C.

Do rozmrożonych w lodzie bakterii kompetentnych dodano schłodzone DNA plazmidowe o stężeniu 0.1 ng/µl (3 µl DNA na 50 µl bakterii) i wymieszano bardzo delikatnie bez pipetowania. Zawiesinę pozostawiono na 40 min w lodzie, potem umieszczono w bloku grzejnym i inkubowano w temp. 42°C przez 50 s, po czym przeniesiono do lodu na 2 min. Szok cieplny był wykorzystywany po to, aby czasowo zdestabilizować błonę komórkową bakterii, zwiększając jej przepuszczalność, co w konsekwencji pozwalało na wprowadzenie plazmidowego DNA. Ponowne umieszczenie w lodzie pozwalało na „przywrócenie” struktury podstawowej błony komórkowej, a efekt ten był wzmocniony przez dodanie świeżej pożywki. W niniejszej pracy używano SOC, ogrzanego do temperatury pokojowej w objętości 1 ml na 50 µl zawiesiny bakterii. Taką zawiesinę hodowano przez 1 h w 37°C z wytrząsaniem ok. 200 rpm, a w przypadku „problematycznych” konstruktów w 30-33°C przy 120-140 rpm. Po tym czasie bakterie wirowano przy 10 000 rpm przez 1 min w temperaturze pokojowej. Supernatant usunięto, a osad zawieszono w 50 µl świeżej pożywki i całość wysiano za pomocą głaszczki w podłoże stałe LB, zawierające antybiotyk selekcyjny, odpowiedni dla danego wektora. W przypadku transformacji do szczepu ekspresyjnego bakterie zawieszono w 200 µl i na szalki ze stałym LB naniesiono 5-15 µl zawiesiny. Tak przygotowane szalki z bakteriami inkubowano przez 16h w 37°C lub 30-33°C w przypadku „problematycznych” konstruktów.

4.1.4 Klonowanie molekularne

Procedurę rozpoczynano od projektowania starterów. W niniejszej pracy do tego celu używano programu ApE, A plasmid Editor (dostępny na stronie: <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>). Startery zawierały sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne lub metki pozwalające na późniejsze oczyszczanie białka przez chromatografię powinowactwa, a także ewentualne mutacje.

Wybrany gen amplifikowano przy użyciu PCR i rozdzielano przez elektroforezę agarozową. Po izolacji z żelu powielony fragment i wektor trawiono enzymami restrykcyjnymi, po czym znowu poddawano elektroforezie i oczyszczaniu (izolacji z żelu). Następnie po fosforylacji obu fragmentów łączono je za pomocą ligazy. Mieszaniną po ligacji transformowano bakterie TOP10 i selekcjonowano w hodowli odpowiednimi antybiotykami. Plazmidy izolowano, a następnie sprawdzano za pomocą enzymów restrykcyjnych i elektroforezy agarozowej. Ostatnim etapem było sekwencjonowanie uzyskanego konstrukt DNA. Usługę sekwencjonowania, tak jak i syntezę zaprojektowanych starterów do PCR zrealizowano w firmie Genomed. Wyniki sekwencjonowania analizowano za pomocą programu Clone Manager (Sci-Ed Software, USA). Jeśli sekwencja była poprawna, to wykonywano kolejną transformację – do ekspresyjnego szczepu bakterii (*E. coli* Rosetta lub rzadziej BL21).

4.1.5 Mutageneza ukierunkowana

Jak sama nazwa wskazuje, jest to procedura, której celem jest m.in. wprowadzenie odpowiednich mutacji: punktowych, delecji, insercji w sekwencję kodującą badane białko. Mutacje są wprowadzane na zaprojektowanych wcześniej starterach. W tym przypadku amplifikowany był cały plazmid, a matryca nie zawierająca mutacji była usuwana przez trawienie enzymem DpnI, który trawił metylowane DNA (DNA po PCR nie ma metylacji). Tak uzyskany produkt był poddawany kolejno elektroforezie, izolacji z żelu, fosforylacji, ligacji i transformacji do szczepu TOP10. Dalsza procedura wyglądała identycznie, jak w przypadku standardowego klonowania (4.1.4).

4.1.6 Łańcuchowa reakcja polimerazy

Metoda ta, powszechnie stosowana w laboratoriach, była nieodłącznym elementem niniejszej pracy. W skrócie nazywana PCR (ang. *polymerase chain reaction*) jest cykliczną reakcją powielania DNA w probówce. Najważniejsze komponenty reakcji to, poza DNA matrycowym, termostabilna polimeraza DNA oraz startery, czyli krótkie (20-30 nukleotydów) syntetyczne fragmenty DNA. Startery były dobierane tak, aby otaczały z obu stron fragment DNA, który miał być amplifikowany. W przeważającej części starter składał się z fragmentu komplementarnego do matrycy (ewentualnie mógł zawierać wybraną mutację), a reszta stanowiła np. sekwencję rozpoznawaną przez enzymy restrykcyjne, co z kolei umożliwiało późniejsze włączenie powielonego fragmentu DNA w odpowiednim miejscu w docelowym wektorze plazmidowym.

Reakcję PCR wykonano w oparciu o cykliczne zmiany temperatury (Tab. 4.1), z których każda odpowiadała innemu procesowi:

- 98°C – denaturacja DNA, czyli rozdzielenie podwójnej helisy na dwie nici pojedyncze
- 50 – 65°C – przyłączanie starterów do matrycy, dokładną temperaturę obliczano indywidualnie dla każdej pary starterów
- 72°C – elongacja, podczas której polimeraza syntetyzuje nową nić DNA z nukleotydów dostępnych w mieszaninie reakcyjnej, w kierunku od 5' do 3'

Tab. 4.1 Przykładowy program PCR dla polimerazy Phusion

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
<i>Denaturacja wstępna</i>	98°C	30 s	1
<i>Denaturacja</i>	98°C	7 s	25 - 35
<i>Przyłączanie starterów</i>	50 – 65°C	20 s	
<i>Elongacja</i>	72°C	20 – 30 s / kpz	
<i>Końcowa elongacja</i>	72°C	5 – 10 min	1

Do przeprowadzania reakcji PCR wybrano polimerazę Phusion (Thermo Scientific, nr kat. F534L), ponieważ jest bardzo dokładna – popełnia 50 razy mniej błędów niż klasyczna polimeraza Taq (z *Thermus aquaticus*), a do tego jest szybka.

Jeśli wartość temperatury przyłączania starterów była zbliżona do 72°C, to wtedy ten etap (50-65°C) pomijano. Po końcowej elongacji zwykle dla zabezpieczenia produktów PCR ustawiano chłodzenie (4°C, ∞). Produkty amplifikacji DNA były następnie sprawdzane przez elektroforezę agarozową (punkt 4.1.8) i ewentualnie izolowane z żelu (gdy naniesiono całą objętość reakcji).

4.1.7 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Pochodzące z bakterii endonukleazy restrykcyjne trawią DNA w miejscach odpowiadających specyficznym sekwencjom. Wykorzystywane są zarówno przy rutynowej kontroli DNA plazmidowego wyizolowanego z bakterii, jak i w klonowaniu molekularnym – końce lepkie lub tępe otrzymane po trawieniu pozwalają połączyć

wybrane fragmenty DNA w precyzyjnie określonym miejscu plazmidu (4.1.4). Większość enzymów restrykcyjnych używanych w niniejszej pracy pochodziła z Thermo Scientific. Reakcje przeprowadzono zgodnie zaleceniami producenta, a produkty (fragmenty DNA) rozdzielano przez elektroforezę agarozową.

4.1.8 Elektroforeza agarozowa

Jest to powszechnie znana i stosowana metoda analizy DNA. Oprócz roli typowo kontrolnej pozwala też na dokładne oddzielenie produktu PCR od starterów, czy fragmentów DNA powstałych po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Ujemnie naładowane DNA jest rozdzielane ze względu na rozmiar cząsteczki (długość). Rozdział prowadzono w żelu składającym się z 0.8 – 1% agarozy zawieszanej w buforze TAE. Do płynnego żelu dodano barwnik – Serva DNA Stain Clear G (Serva, Niemcy, nr kat. 39804.01) lub Roti GelStain (Roth, Niemcy, nr kat. 3865.1), który specyficznie wiązał się z DNA i tym samym pozwalał na jego wizualizację poprzez naświetlanie UV (długość fali $\lambda = 260$ nm). Standardowe wymiary żelu jaki stosowano to 0.8 x 7 x 10 cm. Do studzienek naniesiono DNA zawieszane w buforze do próbek (Tab. 3.3). Markerem wielkości był GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, nr kat. SM0311). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100 V przez około 30 min. Po rozdzieleniu żel dokumentowano.

4.1.9 Izolacja DNA z żelu

DNA izolowano z żelu za pomocą zestawu z Thermo Scientific (nr kat. K0692). Procedurę wykonano według wskazówek producenta. Z żelu po elektroforezie wycinano mały bloczek otaczający odpowiedni fragment DNA. Następnie ten fragment agarozy upłynniano i całość наносzono na kolumnienki ze złożem krzemionkowym, które wiązało DNA. Po kilku płukaniach DNA eluowano sterylną wodą dejonizowaną podgrzaną do ok. 40°C.

4.1.10 Fosforylacja DNA

Startery DNA do reakcji PCR zazwyczaj są nieufosforylowane i w konsekwencji produkt PCR nie ma reszty fosforanowej na końcu 5'. Do fosforylacji DNA używano kinazy polinukleotydowej PNK T4 z Thermo Scientific (nr kat. EK0032) i procedurę wykonywano zgodnie z opisem producenta. Etap ten jest ważny, ponieważ ligaza łączy tylko ufosforylowane końce DNA.

4.1.11 Ligacja

Jest to proces łączenia fragmentów DNA, dwóch końców jednego fragmentu albo dwóch osobnych fragmentów – wektora i wstawki, które zawierają komplementarne końce, pozwalające na włączenie wstawki (genu) do wektora w odpowiedniej orientacji. Ligację przeprowadzano za pomocą enzymu – DNA ligazy T4 z Thermo Scientific (nr kat. EL0016). Ważne było m.in. stosowanie odpowiednich proporcji DNA plazmidowego do DNA wstawki (np. 1:3 lub 1:5). Ligację wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. W celu podniesienia wydajności reakcję prowadzono przez 16h w 18°C.

4.2 Produkcja i oczyszczanie białek

Na potrzeby niniejszej pracy wyprodukowano i oczyszczono różne rodzaje białek – zarówno te stanowiące przedmiot badań, m.in. kinezyrna-1 pełnej długości, jak i pomocnicze (enzymy do modyfikacji tubuliny). Ze względu na to, że białka bardzo różnią się między sobą właściwościami, wielkością i kształtem cząsteczki, każde z nich wymaga indywidualnego dopasowania warunków ekspresji i izolacji. W związku z powyższym, dla uproszczenia, szczegóły dotyczące produkcji i oczyszczania zawarto w podrozdziale dotyczącym danego białka.

4.2.1 Chromatografia powinowactwa

Wspólnym elementem łączącym sposób oczyszczania większości białek używanych w niniejszej pracy była metoda znana jako chromatografia powinowactwa. Ogólnie rzecz ujmując, chromatografia to metoda rozdzielania mieszanin, w której poszczególne elementy roztworu są poddawane rozdysponowaniu między fazę stacjonarną (nieruchomą, np. kolumna ze złożem), a fazę mobilną (ruchomą, przykładowo roztwór białka).

Chromatografia powinowactwa stanowi szczególny rodzaj chromatografii kolumnowej. Opiera się na bardzo specyficznych oddziaływaniach. Faza stacjonarna – złożenie w kolumnie zawiera ligand, do którego odwracalnie wiąże się celowo dodany podczas klonowania fragment w białku (tzw. metka).

Materiałem wyjściowym do oczyszczania był zazwyczaj osad komórek (bakteryjnych lub owadzych) uzyskany w wyniku wirowania po ekspresji białka i przechowywany w -80°C. Pierwszym etapem oczyszczania była dezintegracja komórek (liza). Przeważnie posługiwano się w tym celu automatycznym urządzeniem Cell Disruptor firmy Constant

Systems Limited (Wielka Brytania), w którym komórki były poddawane wysokiemu ciśnieniu w obecności inhibitorów proteaz, chroniących izolowane białko przed enzymami proteolitycznymi, obecnymi naturalnie w komórkach. Następnie lizat był wirowany, aby oddzielić fragmenty komórek. Supernatant mieszano ze złożem w odpowiednich proporcjach i inkubowano w 4°C na kołysce laboratoryjnej przez 60-90 min. Alternatywą było powolne przepuszczanie supernatantu przez złożo (np. 0.3 ml/min), ale metoda ta była mniej wydajna. Następnym etapem było płukanie w celu oddzielenia niespecyficznie związanych substancji. Przeważnie wykorzystywano do tego bufor z solą o dość wysokim stężeniu (np. chlorek sodu lub potasu 200-300 mM). Końcowym krokiem była elucja (wmywanie) białka ze złoża przez dodawanie do buforu elucyjnego substancji, która np. ma większe powinowactwo do złoża niż metka danego białka. Bufor do elucji przepuszczono powoli, aby w największym stopniu odzyskać białko. Po elucji opcjonalnie zagęszczano preparat, dodawano glicerolu lub sacharozy w celu krioprezerwacji białka, dzielono na mniejsze porcje do małych probówek typu eppendorf, mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Przykładem używanym w niniejszej pracy jest złożo z jonami niklu (Ni^{2+}) z Thermo Scientific (nr kat. 88221), do którego przyłącza się sekwencja sześciu histydyn (tzw. metka polihistydynowa), a eluentem jest imidazol w stężeniu 200 – 400 mM. Zaletą tej metki jest jej mały rozmiar. Do oczyszczania białek stosowano też złożo z glutationem (zredukowanym) z Thermo Scientific (nr kat. 16101). Do tego liganda ma powinowactwo S-transferaza glutationu (ang. *glutathione S-transferase*, GST), dołączana do rekombinowanego białka jako metka, dodatkowo podnosząca jego ekspresję i rozpuszczalność (rozumianą jako mniejszą skłonność do agregacji). W tym przypadku białko odzyskiwano przez elucję buforem z nadmiarem glutationu, który konkurencyjnie wiąże się z GST białka rekombinowanego i tym samym zastępuje tripeptyd (glutation) immobilizowany na złożu.

4.3 Podstawowe metody analizy białek

4.3.1 Rozdział białek w żelu poliakryloamidowym

Metoda powszechnie znana jako SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) służy do separacji białek pod względem masy cząsteczkowej w warunkach denaturujących (Laemmli, 1970).

Próbki białkowe mieszano w odpowiedniej proporcji ze specjalnym buforem zawierającym SDS, glicerol, czynnik redukujący (DTT lub 2-merkaptoetanol) oraz barwnik – błękit bromofenolowy. Tak przygotowaną próbkę tuż przed nanoszeniem na żel inkubowano w 95-100°C przez 5 min. Wysoka temperatura, SDS oraz czynnik redukujący powodowały rozfałdowanie białek ze struktury przestrzennej w liniową. SDS dodatkowo powlekał łańcuch białkowy ładunkiem ujemnym, który umożliwiał migrację w żelu. Wykorzystywano tu tzw. system nieciągły, w którym białka najpierw ulegały zagęszczeniu migrując przez żel o mniejszym stopniu usieciowania (żel zagęszczający, o zawartości 4% akryloamidu, pH 6.8). Następnym etapem był właściwy rozdział w żelu separującym o wyższym stężeniu akryloamidu (w tej pracy zwykle 12%, pH 8.8). Wspomniany akryloamid to właściwie mieszanina akryloamidu i bisakryloamidu w stosunku 37.5:1 (Roth, nr kat. 3029.1).

Rozdział prowadzono w aparacie firmy Bio-Rad (USA). Próbki z białkami oraz wzorce (Thermo Scientific, nr kat. SM26619) naniesiono do studzienek w żelu, który miał grubość 1 mm. Elektroforeza odbywała się w dwóch etapach, najpierw przy napięciu 90 V przez 20 min, a potem 150 V do momentu wypłynięcia barwnika z żelu (ok. 70 min). Po rozdziale żele barwiono przez ok. 15 h roztworem koloidalnym błękitu brylantynowego RotiBlue (Roth, nr kat. A152.1) w 20% metanolu. Po tym czasie żel odbarwiano w 20% roztworze metanolu i dokumentowano.

4.3.2 Western blot

Metoda ta, określana także jako immunodetekcja białek, pozwala na specyficzne wykrywanie badanego białka za pomocą przeciwciał. Pierwszy etap tej procedury stanowił rozdział w żelu poliakryloamidowym (4.3.1). Następnie białka rozdzielone w żelu przeniesiono na membranę nitrocelulozową (alternatywą jest poliwinylpiperolidion, PVDF). W niniejszej pracy wykonywano transfer „mokry”, tj. żel i membrana były zanurzone w buforze do transferu w trakcie trwania procedury. Transfer odbywał się w aparacie Cleaver Scientific (USA) przy natężeniu 300 mA przez 1 h (aparat wraz z zawartością umieszczono w lodzie) lub 30 mA przez 16-18 h w 4°C. Następnie membranę inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej w TBST z 5% mlekiem w proszku odtłuszczonym w celu zablokowania miejsc, które pozostawały wolne po transferze białek z żelu. Kolejnym etapem była inkubacja membrany z I-rzędowymi przeciwciałami (rozpoznającymi badane białko) w roztworze TBST z 5%

mlekiem przez 1h w temperaturze pokojowej lub przez 16-18 h w 4°C. Potem membranę płukano buforem TBST trzy razy po 10 min w celu usunięcia nadmiaru przeciwciał oraz eliminacji niespecyficznie związanych, które mogłyby zaburzać wynik. Następnie membranę inkubowano w roztworze TBST zawierającym przeciwciała II-rzędowe sprzężone z alkaliczną fosfatazą przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie membranę ponownie płukano trzykrotnie po 10 min buforem TBST. Finalnym etapem była wizualizacja prążków przez reakcję alkalicznej fosfatazy z jej substratami NBT (0.33 mg/ml) z Roth (nr kat. 4421.1) i BCIP (0.165 mg/ml) też z Roth (nr kat. A155.1) w buforze substratowym dla enzymu. W wyniku reakcji powstawał barwny produkt – formazan. Inkubację prowadzono do momentu wybarwienia się prążków na membranie. Tak uzyskany obraz dokumentowano.

4.3.3 Oznaczanie stężenia białek metodą Bradforda

Jest to szybka metoda wymagająca przynajmniej 1 µg białka w próbce, która polega na interakcji pomiędzy błękitem brylantynowym (CBB G-250), a resztami argininy (głównie), histydyny, lizyny, tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny (Bradford, 1976). Są to oddziaływania jonowe i hydrofobowe. Barwnik ten jest zabarwiony na brązowo w kwaśnym środowisku, a po związaniu z białkiem następuje zmiana koloru na niebieski. Intensywność barwy niebieskiej jest proporcjonalna do stężenia białka w roztworze. W niniejszej pracy wykorzystywano komercyjnie dostępny odczynnik Bradford (Bio-Rad, USA, nr kat. 5000205), który w objętości 1 ml mieszano z roztworem białka (20 µl) i inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zmierzono absorbancję próby z białkiem względem próby kontrolnej (zawierającej bufor, w którym zawieszono było białko) przy długości fali $\lambda=595$ nm. Następnie stężenie białka odczytano z krzywej wzorcowej BSA, którą sporządzono na podstawie pomiarów absorbancji przy różnych stężeniach BSA w kilku (2-3) powtórzeniach.

4.4 Tubulina

4.4.1 Oczyszczanie tubuliny w formie natywnej

Tubulinę pozyskiwano z mózgow wieprzowych wykorzystując preparatykę opisaną w literaturze (Mandelkow i wsp., 1985; Borisy i wsp., 1975). W skrócie procedura opiera się na cyklach polimeryzacji i depolimeryzacji tubuliny. Tubulina podczas inkubacji w temperaturze ok. 37°C z dodatkiem GTP polimeryzuje, tworząc mikrotubule.

Natomiast mikrotubule w roztworze poddane niskiej temperaturze (0 – 4°C) ulegają depolimeryzacji do tubuliny (dimerycznej).

Przełukane wodą dejonizowaną mózgi homogenizowano w buforze PM z glicerolem, a potem materiał wirowano przez 15 min przy 11 000 x g w 4°C. Supernatant filtrowano przez jałową gazę, po czym wirowano ponownie przez 30 min z szybkością 30 000 x g w 4°C. Następnie zebrano supernatant, dodano GTP (Roth, K0564) do 0.1 – 0.3 mM, ATP do 1.5 mM (Sigma-Aldrich, nr kat. A26209) oraz MgCl₂ do 4 mM. Mieszaninę ogrzewano pod bieżącą wodą do 35°C, co jakiś czas mieszając, po czym inkubowano przez 60 min w 37°C w łaźni wodnej. Obecność ATP obniżała powinowactwo niektórych białek (zależnych od ATP) do mikrotubul, co w konsekwencji pozwalało na częściowe ich usunięcie (np. białek motorycznych). Następnym krokiem było wirowanie przez 60 min, przy 30 000 x g w 35°C, w ogrzonym rotorze. Mikrotubule znajdujące się w osadzie zawieszono w zimnym buforze PM (bez glicerolu, ale z dodatkiem ATP i DTT) w schłodzonych wcześniej szklanych homogenizatorach ręcznych. Dla skutecznej depolimeryzacji zawiesinę umieszczono w lodzie na ok. 30 min i co jakiś czas homogenizowano. Kolejno całość wirowano w 4°C, przy 91 000 x g, przez 30 min w celu usunięcia agregatów białek i mikrotubul, które nie uległy depolimeryzacji do tubuliny. Supernatant zebrano i dodano ciepły glicerol (pół objętości supernatantu), GTP do 0.5 mM, MgCl₂ do 4 mM, ATP do 1.5 mM. Mieszaninę inkubowano 40 min w 37°C, a potem wirowano 60 min w 35°C przy 98 000 x g. Następnie osad kolejny raz zawieszono w zimnym buforze PM bez glicerolu, w schłodzonych homogenizatorach ręcznych. Całość inkubowano w lodzie przez 40 min i homogenizowano co 3-5 min. Potem wirowano w 4°C przez 30 min przy 91 000 x g. Supernatant zebrano, zmierzono stężenie białka (4.3.3) i zamrożono w -80°C. Jeśli chodzi o tubulinę, to dla uproszczenia przyjmuje się, że 1 mg/ml tubuliny odpowiada stężeniu molowemu 10 μM (w przeliczeniu na dimer tubuliny o masie cząsteczkowej ok. 100 kDa).

4.4.2 Znakowanie fluorescencyjne tubuliny

W celu umożliwienia obserwacji mikrotubul pod mikroskopem konieczne było wprowadzenie do tubuliny barwnika fluorescencyjnego. Wybrano ester bursztynianowy Alexa Fluor 647 (Life Technologies, USA, nr kat. A37573), który reaguje z grupami aminowymi powierzchniowych lizyn w tubulinie (Hyman i wsp., 1991). Jednakże,

aby uniknąć modyfikacji reszt lizyny znajdujących się pomiędzy podjednostkami i które biorą udział w polimeryzacji, barwnik dodano do świeżo spolimeryzowanych mikrotubul. Taką mieszanę poddano dodatkowemu cyklowi depolimeryzacji, polimeryzacji i ponownej depolimeryzacji po to, aby pozbyć się tubuliny, która utraciła zdolność do polimeryzacji.

Tubulinę wyizolowaną według procedury opisanej w podrozdziale 4.4.1 rozmrożono w lodzie, po czym wirowano 10 min przy 20 000 x g w 4°C. Supernatant zebrano i dodano kolejno: PIPES o pH 6.9 do 0.45 M, DMSO do 10%, MgCl₂ do 1 mM oraz GTP do 1 mM. Mieszaninę zostawiono na 2 min w lodzie, przeniesiono do łaźni wodnej i inkubowano 10 min w 37°C. Następnie wirowano 20 min przy 20 000 x g w 37°C, a otrzymane osady mikrotubul zawieszono w zimnym buforze PEM (1/4 wyjściowej objętości tubuliny). Depolimeryzację prowadzono przez 10 min w lodzie i co 2-3 min delikatnie mieszano przez pipetowanie. Potem do roztworu dodano GTP do 1 mM oraz DMSO do 10%, inkubowano 2 min w lodzie, a następnie 10 min w 37°C, po czym dodano ester bursztynianowy Alexa Fluor 647 rozpuszczony w bezwodnym DMSO (Invitrogen, USA, nr kat. D12345). Na 10 mg tubuliny używano 0.5 mg znacznika fluorescencyjnego o stężeniu 20 mg/ml. Mieszaninę delikatnie wymieszano, inkubowano 10 min w 37°C i wirowano 20 min w 37°C przy 20 000 x g. Potem osad zawieszono w zimnym PEM i zostawiono na 10 min w lodzie i co 2-3 min mieszano. Kolejnym krokiem było wirowanie 10 min w 4°C przy 20 000 x g. Do supernatantu dodano GTP do 1 mM i DMSO do 10%, inkubowano 20 min w 37°C, a potem wirowano 20 min w 37°C przy 20 000 x g. Osad zawieszono w zimnym buforze PEM, a po 10 min depolimeryzacji w lodzie wirowano przez 10 min przy 20 000 x g w 4°C. Supernatant podzielono na porcje, zamrożono szybko w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

4.4.3 Przyłączenie biotyny do reszt aminowych tubuliny

Mikrotubule stacjonarne wymagają specyficznego znakowania, które umożliwi selektywne przytwierdzenie ich do powierzchni szkiełka mikroskopowego za pomocą przeciwciał. Stosunkowo prostą metodą jest tzw. biotynylacja, czyli dodawanie estrów sulfobursztynianowych biotyny do reszt aminowych lizyn, znajdujących się na powierzchni tubuliny. W związku z tym, że reakcji ulegają te same grupy funkcyjne, co w znakowaniu fluorescencyjnym Alexa Fluor 647, procedura była przeprowadzana analogicznie. Tubulinę oczyszczoną z mózgow wieprzowych (4.4.1) rozmrożono

w lodzie, oddzielono agregaty białek przez wirowanie, wykonano cykl polimeryzacji w 37°C z 1 mM GTP i 10% DMSO i następnie depolimeryzacji w 4°C. Potem dodano DMSO do 10% i GTP do 1 mM i inkubowano 15 min w 37°C. Kolejno odpowiednią ilość odczynnika EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific, nr kat. A39257) rozpuszczono w wodzie dejonizowanej (Sigma-Aldrich, nr kat. W4502) i dodano do przygotowanej mieszaniny mikrotubul (w proporcji 1 mg odczynnika na 17 mg tubuliny). Roztwór wymieszano delikatnie i inkubowano kolejne 20 min w 37°C. Po wirowaniu na ciepło mikrotubule depolimeryzowano w lodzie, a agregaty i materiał, który nie uległ depolimeryzacji do tubuliny wirowano na zimno. Następnie wykonano kolejny cykl polimeryzacji i depolimeryzacji, a po wirowaniu na zimno zmodyfikowaną tubulinę rozdzielono do probówek typu Eppendorf, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. W celu sprawdzenia, czy biotynylacja powiodła się wykonano test Western Blot (4.3.2) z przeciwciałami rozpoznającymi biotyne.

4.4.4 Dodatkowe oczyszczanie tubuliny na poduszce glicerolowej

Tubulina po izolacji z mózgów wieprzowych (4.4.1) nadal może zawierać domieszki białek towarzyszących mikrotubulom, które mogłyby zaburzać przeprowadzanie doświadczeń albo wpływać na ich wynik. Dlatego też przeprowadza się dodatkowe oczyszczanie na poduszce glicerolowej. W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że mikrotubule są na tyle ciężkie, by podczas wirowania przebić się przez gęstą warstwę glicerolu (60%) i znaleźć się w osadzie, a białka towarzyszące mikrotubulom zostają na granicy faz między glicerolem, a warstwą roztworu wodnego (buforu).

Porcję tubuliny rozmrożono, a jeśli była taka potrzeba to przygotowano odpowiednie mieszaniny z tubuliną znakowaną fluorescencyjnie albo biotynylowaną. Pierwszym krokiem było wirowanie przez 10 min w 4°C przy 20 000 x g, w celu oddzielenia agregatów białkowych. Następnie do supernatantu dodano PIPES-KOH (pH 6.9) do 0.4 M, DMSO do 20%, MgCl₂ do 1 mM oraz GTP do 1 mM. Tak przygotowany roztwór tubuliny inkubowano przez 20 min w 37°C w łaźni wodnej. Potem spolimeryzowane mikrotubule w mieszaninie nawarstwiano starannie na ogrzaną poduszkę glicerolową (60% glicerol w buforze Brb80) i wirowano przy 72 000 x g przez 20 min w 37°C. Następnie usunięto roztwór znad warstwy glicerolowej, którą trzykrotnie płukano ogrzaną wodą i nanoszoną delikatnie dejonizowaną. Potem usunięto poduszkę glicerolową, a osad mikrotubul płukano ciepłym buforem Brb80. Mikrotubule

zawieszono w zimnym buforze Brb80 i depolimeryzowano w lodzie przez 10 min. Roztwór był mieszany przez pipetowanie co około 3 min, aby zwiększyć efektywność depolimeryzacji. Następnie całość wirowano przez 10 min w 4°C przy 20 000 x g. Supernatant podzielono na porcje do próbek, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

4.4.5 Mikrotubule do mikroskopii TIRF

W niniejszej pracy używano głównie dwóch rodzajów mikrotubul – stacjonarnych i ładunkowych. Te określenia pochodzą od funkcji, którą każdy rodzaj mikrotubul pełnił w trakcie testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie. Mikrotubule stacjonarne były przytwierdzone do szkiełka poprzez przeciwciała przeciwko biotynie, dlatego w ich skład wchodziła tubulina biotynylowana (do 10% w/w). Dodatkowo, w celu umożliwienia ich wizualizacji pod mikroskopem, dodawano tubulinę znakowaną Alexa Fluor 647 (do 4% w/w). Resztę mieszaniny stanowiła tubulina nieznakowana (86%). Z kolei mikrotubule ładunkowe składały się z tubuliny nieznakowanej (84%) oraz znakowanej Alexa Fluor 647, ale w tym przypadku 16% w/w, dzięki czemu świeciły intensywniej niż stacjonarne, co pozwalało na odróżnienie tych dwóch rodzajów mikrotubul pod mikroskopem.

Tubulinę z obu rodzajów mieszanin poddano polimeryzacji do mikrotubul, które następnie przepuszczono przez poduszkę glicerolową (4.4.4) i zawieszono w Brb80. Po depolimeryzacji w lodzie roztwory te podzielono na porcje, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Odpowiednią porcję mieszaniny tubuliny przygotowanej według powyższego opisu rozmrożono w lodzie i dodano kolejno: MgCl₂ do 4 mM, GTP do 1 mM oraz DMSO do 20%. Roztwór wymieszano delikatnie i inkubowano w 37°C przez 20 min. Następnie dodano równą objętość ciepłego buforu Brb80 z 20 μM taksolem, który stabilizował mikrotubule i blokował ich dynamikę, wymieszano przez pipetowanie ściętą końcówką pipety i polimeryzowano kolejne 20 min. Potem mikrotubule wirowano w ogrzanej wirówce w 37°C przez 30 min przy 20 000 x g. Supernatant usunięto, a osad zawieszono w ciepłym buforze Brb80-MT z taksolem.

Tak przygotowane mikrotubule wykorzystywano przez około tydzień, tylko zmieniano bufor każdego dnia przed rozpoczęciem eksperymentów (przez

wirowanie w temperaturze pokojowej przy 20 000 x g, 20 min i zawieszenie w świeżym buforze) i przechowywano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.

4.4.6 Przygotowanie polarnie znakowanych mikrotubul

Polarnie znakowane mikrotubule to takie, w których jeden koniec świeci bardziej intensywnie (intencjonalne znakowanie). W niniejszej pracy były one wykorzystywane, aby określić wzajemne ułożenie mikrotubul (równoległe lub antyrównoległe, por. punkt 1.1) podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie.

Niezbędnym komponentem pozwalającym uzyskać te mikrotubule była tubulina znakowana NEM (N-etylomaleimid; Sigma-Aldrich, nr kat. 04259), dodawana w drugim cyklu polimeryzacji. Tubulina-NEM była wbudowywana na końcu minus mikrotubuli w celu zablokowania polimeryzacji tego końca przez pozostałe rodzaje tubuliny. NEM w stężeniu 1 mM dodano do tubuliny (5 – 15 mg/ml) oczyszczonej na poduszce (4.4.4) w obecności 0.5 mM GTP. Taką mieszaninę inkubowano w 4°C przez 10 min, a następnie reakcję zatrzymano przez dodanie 8 mM 2-merkaptoetanolu. Po 10 minutach inkubacji w 4°C tubulinę-NEM podzielono na małe porcje do probówek typu Eppendorf, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Mikrotubule z polarnie znakowanymi końcami przygotowano w dwóch etapach polimeryzacji zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (Szczęsna i Kasprzak, 2012; Roostalu i wsp., 2011). Do przygotowania mikrotubul stacjonarnych mieszano tubulinę nieznakowaną (88%), znakowaną barwnikiem Alexa Fluor 647 (do 2% końcowo), biotynylowaną (do 10%) w buforze Brb80, dodano GMPCPP do 1 mM (guanozyno-5'-[(α,β)-metyleno]trifosforan, wolno hydrolizowany analog GTP, Jena Bioscience, Niemcy, nr kat. NU-405S), $MgCl_2$ do 1 mM, inkubowano 5 minut w lodzie, a potem przez godzinę w 37°C. Uzupełniono objętość ciepłym Brb80 do minimum 50 μ l, wirowano przy 240 000 x g przez 7 min i zawieszono w 50 μ l ciepłego Brb80. Następnie do mikrotubul dodano mieszaninę zawierającą 1.5 μ M tubuliny-NEM oraz 1.5 μ M tubuliny pozostałych rodzajów (10 % biotynylowanej, 10 % tubuliny znakowanej Alexa Fluor 647 i 80% nieznakowanej), a także 0.2 mM GMPCPP i 1 mM $MgCl_2$ w Brb80. Całość inkubowano 15 min w 37°C, a potem wirowano 7 minut przy 20 000 x g w temperaturze pokojowej. Osad mikrotubul zawieszono w ciepłym Brb80-MT i przechowywano w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem.

Jeśli chodzi o mikrotubule łądunkowe, to przygotowano je analogicznie, ale bez tubuliny biotynylowanej oraz z innymi stężeniami tubuliny znakowanej Alexa Fluor 647 (12% w pierwszym etapie polimeryzacji i 24% w drugim), po to, aby umożliwić odróżnienie ich od mikrotubul stacjonarnych.

4.5 Mikroskopia elektronowa

W celu precyzyjnego określenia czy mikrotubule używane w niniejszej pracy tworzyły wiązki, przeprowadzono obserwacje z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Eksperyment ten został wykonany przez dr Hannę Nieznańską z Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, zgodnie z opisaną procedurą (Nieznanska i wsp., 2018). Na specjalne miedziane siatki naniesiono po 10 μ l roztworu mikrotubul w buforze Brb80-MT, o stężeniu ok. 0.1 mg/ml (przygotowane według 4.4.5). Warto tu zaznaczyć, że stężenie mikrotubul używane w niniejszej pracy w mikroskopii TIRF było niższe i wynosiło ok. 0.003 mg/ml (podrozdział 4.8.5). Po 40 s inkubacji na siatkach dodano 2% roztwór octanu uranylu na 25 s, po czym całość suszono. Tak przygotowane preparaty obrazowano za pomocą wysokosprawnego transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1400 (Jeol Co.), wyposażonego w kamerę MORADA G2 o rozdzielczości 11 Mpix.

4.6 Przeprowadzanie modyfikacji potranslacyjnych tubuliny *in vitro*

Do badań używano tubuliny wyizolowanej z mózgów wieprzowych, która stanowiła heterogenną mieszaninę tubulin w różnym stopniu zmodyfikowanych. W celu sprawdzenia czy badana frakcja zawierała np. 100% tubuliny tyrozynowanej lub 100% detyrozynowanej należało przeprowadzić kontrolowane modyfikacje za pomocą enzymów *in vitro*. Większość enzymów pozyskano poprzez produkcję w bakteriach, poza jednym wyjątkiem – karboksypeptydazą A, ponieważ w momencie rozpoczęcia badań enzym odpowiedzialny za tę modyfikację w żywych komórkach nie był znany.

4.6.1 Tyrozynacja

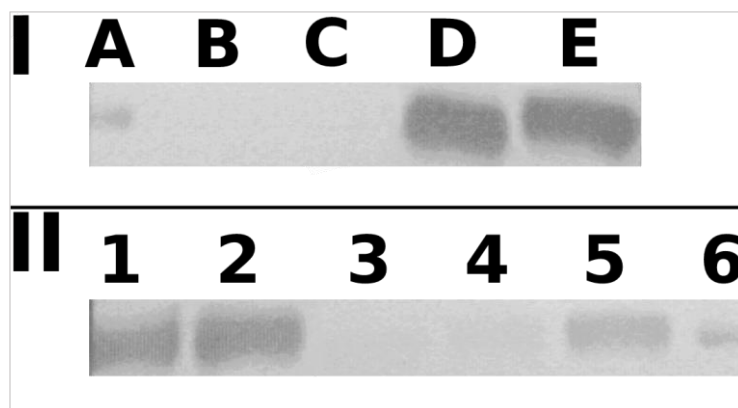
Za tę modyfikację odpowiada ligaza tyrozynowa (TTL). Gen kodujący ludzką wersję tego białka (wybrano ze względu na ówczesną dostępność) zakupiono w firmie OriGene Technologies, Inc., USA (nr kat. SC100834) i wklonowano do wektora ekspresyjnego pGEX4T-1. Plazmid ten miał oporność na ampicylinę oraz sekwencję kodującą GST, która służyła za N-końcową metkę TTL. Wektorem z GST-TTL transformowano szczep *E. coli* Rosetta według protokołu z Metod niniejszej pracy (4.1.3). Z kolei ekspresję enzymu

oraz samą tyrozynację wykonano zgodnie z procedurami opisanymi przez Vemu i wsp. (2014).

Pojedyncze kolonie wykorzystano do przygotowania całonocnych hodowli, które służyły jako inokulum do właściwej hodowli (1 ml do 100 ml świeżej pożywki LB). Zawiesinę komórek inkubowano w 37°C dopóki jej gęstość optyczna (OD_{600}) nie wynosiła 0.4 – 0.5. Wtedy schłodzono hodowlę do temperatury pokojowej, dodano IPTG (izopropylotiogalaktozyd, Roth, nr kat. 2316) do 0.35 mM w celu indukcji ekspresji białka, która odbywała się w 16°C z wytrząsaniem przez 16 h. Po tym czasie zawiesinę wirowano 8 000 x g, przez 30 min w 4°C, zebrano osad, zawieszono w buforze do lizy (TTL-1) z inhibitorami proteaz i zdeintegrowano komórki za pomocą automatycznego urządzenia Cell Disruptor firmy Constant Systems Limited przy 40 kpsi (278.8 MPa). Zawiesinę wirowano przy 31 000 x g przez 45 min w 4°C. W międzyczasie złożę GST-sefaroza równoważono buforem TTL-1. Supernatant po wirowaniu zebrano, wymieszano z przygotowanym złożem i inkubowano 60-90 min na kołyszce laboratoryjnej w 4°C. Następnie zawiesinę przeniesiono do kolumny, oddzielono roztwór po lizie od złoża ze związanym białkiem i płukano buforem TTL-2 w celu eliminacji białek związanych niespecyficznie, z szybkością przepływu 1 ml/min. Ostatnim krokiem była elucja buforem TTL-3 z glutationem (0.3 ml/min). W tym etapie zebrano frakcje i połączono te, które zawierały najwięcej białka. Potem dodano glicerol do 20%, zmierzono stężenie białka (4.3.3), podzielono na porcje do probówek Eppendorf, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Enzym TTL działał preferencyjnie na monomeryczną tubulinę, więc dodano go do mieszanin tubuliny (zawierających tubulinę znakowaną fluorescencyjnie i biotynyłowaną, przygotowanych jak w podrozdziale 4.4.5) w proporcji 1:50 w buforze do tyrozynacji. Całość wymieszano i zostawiono w temperaturze pokojowej na przynajmniej 2 h (do 4 h). Po tym czasie dodano PIPES-KOH pH 6.9 do 0.4 M, DMSO do 20%, $MgCl_2$ do 1 mM oraz GTP do 1 mM i polimeryzowano przez 40 min w 37°C. Następnie mikrotubule przepuszczono przez poduszkę glicerolową (4.4.4). Osad zawieszono w zimnym Brb80 z 1 mM DTT i inkubowano 15 min w 4°C w celu depolimeryzacji mikrotubul do tubuliny. Potem zawiesinę wirowano 20 000 x g przez 10 min w 4°C. Supernatant oddzielono, przeniesiono do probówek (porcje po ok. 5 μ l), zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Rezultat modyfikacji sprawdzono za pomocą Western Blot (4.3.2), z użyciem przeciwciał rozpoznających tubulinę tyrozynowaną (Sigma-Aldrich, nr kat. T9028) oraz drugiego rodzaju skierowanych przeciwko tubulinie detyrozynowanej (Sigma-Aldrich, nr kat. AB3201), które stanowiły kontrolę negatywną. Wynik tyrozynacji przedstawia Ryc. 4.1. Tubulina wyizolowana z mózgow wieprzowych zwykle jest w ok. połowie detyrozynowana i w ok. połowie tyrozynowana, dlatego uznano, że taka tubulina nie będzie najlepszą kontrolą.



Ryc. 4.1 Wynik analizy Western Blot z przeciwciałami rozpoznającymi tubulinę tyrozynowaną (I) i detyrozynowaną (II). Panel I: A – marker białkowy ok. 55 kDa, B – detyrozynowane mikrotubule stacjonarne, C – detyrozynowane mikrotubule ładunkowe, D – tyrozynowane mikrotubule stacjonarne, E - tyrozynowane mikrotubule ładunkowe; Panel II: 1 – detyrozynowane mikrotubule stacjonarne, 2 – detyrozynowane mikrotubule ładunkowe, 3 – tyrozynowane mikrotubule stacjonarne, 4 – tyrozynowane mikrotubule ładunkowe, 5 – tubulina niemodyfikowana, 6 – marker białkowy ok. 55 kDa. Wszystkie próbki zawierały po 2.5 µg białka

4.6.2 Detyrozynacja

W niniejszej pracy do detyrozynacji użyto komercyjnie dostępnego enzymu karboksypeptydazy A (Sigma-Aldrich, nr kat. C9268). Detyrozynację wykonano według procedury opisaną wcześniej (Bieling i wsp., 2008a). Najpierw przygotowano odpowiednie mieszaniny tubuliny nieznakowanej, znakowanej i ewentualnie biotynylowanej, tak jak to opisano w punkcie 4.4.5. Roztwór tubuliny wirowano przy 20 000 x g przez 10 min w 4°C, zebrano supernatant i dodano enzym w proporcji 5 U/mg tubuliny, całość wymieszano i inkubowano przez 5 min w 37°C. Następnie dodano GTP do 1 mM i MgCl₂ do 2 mM i inkubowano 30 min w 37°C, w celu polimeryzacji tubuliny w mikrotubule. Po tym czasie mieszaninę wirowano przez ogrzaną poduszkę glicerolową przy 62 000 x g, 20 min w 37°C (4.4.4). Do osadu mikrotubul dodano zimny bufor PEM (1/4 objętości tubuliny użytej do detyrozynacji), zawieszono dokładnie i depolimeryzowano w 4°C przez 10 min (co 2-3 min mieszano przez pipetowanie). Następnie roztwór wirowano przy 20 000 x g, 20 min w 4°C. Supernatant zebrano,

do dodano równą objętość Brb80 oraz GTP do 1 mM. Roztwór ten inkubowano 30 min w 37°C, a potem wirowano 20 min w 37°C przy 62 000 x g. Osad ponownie depolimeryzowano 10 min w 4°C, w buforze Brb80 (w połowie objętości tubuliny użytej do drugiej polimeryzacji). Potem zawiesinę wirowano przy 20 000 x g, 10 min w 4°C. Supernatant podzielono na porcje, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C. Wynik detyrozynacji sprawdzono przez Western Blot (Ryc. 4.1) używając tego samego zestawu przeciwciał co przy weryfikacji tyrozynacji.

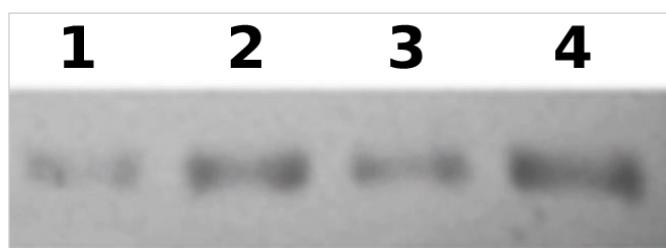
4.6.3 Glutamylicacja

Do przeprowadzenia tej modyfikacji wykorzystano enzym TTLL7, czyli enzym podobny do ligazy tyrozynowej tubuliny. TTLL7 dominuje jako produkt transkrypcji w neuronach wśród rodziny 13 enzymów TTLL, a także ma zdolność przeprowadzania inicjacji glutamylicacji i elongacji (Mukai i wsp., 2009), dlatego też wybrano właśnie ten enzym. Gen kodujący ludzki wariant glutamylazy zakupiono w MyBioSource (USA, nr kat. MBS1265877). W celu podwyższenia wydajności reakcji glutamylicacji wykorzystano fragment odpowiadający aminokwasom 1-609, bez końca karboksylowego (van Dijk i wsp., 2007). Glutamylaza została wklonowana do plazmidu ekspresyjnego pGEX4T-1 z GST. Między genem TTLL7 a GST umieszczono miejsce rozpoznawane przez proteazę PreScission (GE Healthcare, USA, nr kat. 27084301), która posłużyła do odcięcia metki. Ekspresję i oczyszczanie TTLL7 wykonano według procedury z publikacji (Mukai i wsp., 2009). Poszczególne etapy od transformacji do indukcji ekspresji wyglądały analogicznie jak w przypadku TTL (4.6.1). W tym przypadku do hodowli o gęstości optycznej OD₆₀₀ 0.6 – 0.8 dodano IPTG do 0.4 mM. Ekspresję białka przeprowadzono w 26°C przez 16 h, po czym hodowlę wirowano przy 8 000 x g, w 4°C przez 30 min. Osad komórek zdeintegrowano w buforze TTLL7-1 z inhibitorami proteaz za pomocą urządzenia Cell Disruptor, przy 30 kpsi. Uzyskany roztwór wirowano 35 000 x g przez 50 min w 4°C. Supernatant wymieszano ze złożem zrównoważonym wcześniej buforem TTLL7-1 i inkubowano z mieszaniem na kołysce laboratoryjnej w 4°C przez 3 h. Następnie całość przeniesiono do kolumny chromatograficznej i oddzielono frakcję niezwiązaną ze złożem. Kolumnę ze związanym białkiem TTLL7 płukano buforem TTLL7-2 z przepływem 1 ml/min kontrolowanym przez pompę perystaltyczną. Kolejno płukano buforem TTLL7-3, przeniesiono do probówki o objętości 50 ml razem z 10 ml buforu TTLL7-3 (na 2ml złoża), dodano proteazę PreScission (ok 50 ul) i inkubowano przez ok. 16-18 h w 4°C.

Po tym czasie białko oddzielone od metki znajdowało się w roztworze, więc należało odseparować złoże z pozostałymi metkami (przez wirowanie 500 x g ok. 5 min w 4°C lub na kolumnie grawitacyjnie). Oznaczono stężenie białka (4.3.3), w razie potrzeby zagęszczono roztwór, dodano glicerol do 10% i DTT do 1 mM, podzielono na porcje, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

Glutamylicję wykonano według procedury opisanej w literaturze (Vemu i wsp., 2014) i wykorzystano tubulinę wyizolowaną z mózgow wieprzowych. Co prawda taka tubulina jest już glutamylowana, ale zawiera 1 – 6 reszt kwasu glutaminowego zarówno w tubulinie alfa i beta (Audebert i wsp., 2014; Redeker, 2010). Vemu i wsp. (2014) wykazali, że po 6 h glutamylicji z użyciem enzymu TTLL7 β -tubulina zawierała łańcuchy o długości od 11 do 22 reszt glutaminianu zależnie od izotypu.

Procedurę rozpoczęto od przygotowania mikrotubul stacjonarnych i łańcukowych stabilizowanych taksolem (podrozdział 4.4.5), które zawieszono w buforze A do glutamylicji. Kontrolę stanowiły analogiczne próbki, ale bez dodatku enzymu. Potem zmierzono stężenie białka, dodano TTLL7 w stosunku molowym 1:10 (enzym:substrat) i inkubowano 6 h w temperaturze pokojowej. Następnie, w celu usunięcia enzymu od mikrotubul, wykonano wirowanie przez poduszkę glicerolową (4.4.4), po czym osad z mikrotubulami zawieszono w Brb80-MT. Rezultat modyfikacji sprawdzono za pomocą Western Blot (4.3.2) z wykorzystaniem przeciwciał GT335 (AdipoGen, Szwajcaria, nr kat. AG-20B-0020-C100). Ryc. 4.2 przedstawia wynik glutamylicji. Tak przygotowane mikrotubule używano przez 3-4 dni, przy czym codziennie wymieniano bufor na świeży, zgodnie z opisem w ostatnim akapicie podrozdziału 4.4.5.



Ryc. 4.2 Wynik analizy glutamylicji przez Western Blot. 1 – kontrolne mikrotubule stacjonarne, 2 – glutamylowane mikrotubule stacjonarne, 3 – kontrolne mikrotubule łańcukowe, 4 – glutamylowane mikrotubule łańcukowe. Wszystkie próbki zawierały po 0.5 μ g białka

4.7 Ekspresja i oczyszczanie kinezy-1 pełnej długości i jej wariantu bez zawiasu-2

Gen kinezy-1 zamówiono w firmie Addgene (USA, nr kat. 31604) i wklonowano do plazmidu pOET1N (Oxford Expression Technologies, Wielka Brytania,

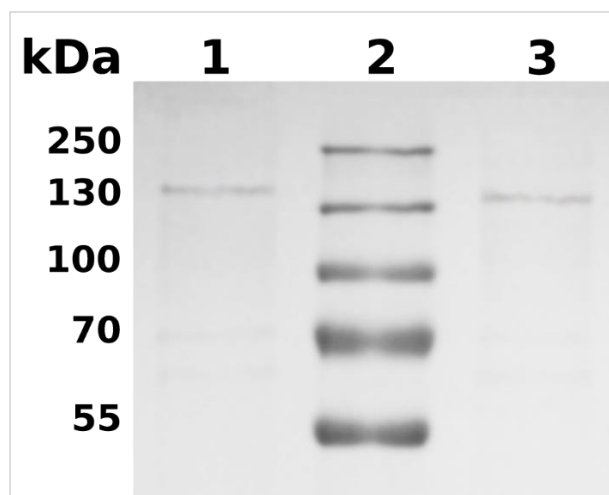
nr kat. 2001011) przystosowanym do amplifikacji w bakteriach, jak również pozwalającym na późniejszą rekombinację z DNA wirusowym, odpowiednim do ekspresji białka w komórkach owadzych. Wektor ten niesie oporność na ampicylinę i ma wbudowaną metkę polihistydynową, czyli ciąg sześciu histydyn, pozwalającą na oczyszczanie białka z użyciem chromatografii powinowactwa (punkt 4.2.1).

Kinezynę-1 bez zawiasu-2 (KΔH2, Δ505-610) przygotowano na bazie posiadanego genu kinezyny-1 pełnej długości typu dzikiego w plazmidzie pOET1N. Zaprojektowano startery otaczające sekwencję, która miała zostać wyeliminowana i za pomocą PCR powielono docelowy fragment DNA. Otrzymano produkt z „tępymi końcami”, który poddano ligacji i następnie transformacji do bakterii TOP10, a po izolacji sprawdzono rezultat przez trawienie enzymami restrykcyjnymi oraz sekwencjonowanie.

Kinezynę-1 pełnej długości (1-963) oraz kinezynę-1 bez zawiasu-2, obie w fuzji z GFP (ang. *green fluorescent protein*) i metką polihistydynową na końcu karboksylowym, wyprodukowano w komórkach owadzych *Trichoplusia ni* (High Five™, Invitrogen) w obecności inhibitora proteaz E-64 (Roth, nr kat. 2935.1). Rekombinacja z DNA wirusowym oraz ekspresja w komórkach owadzych była wykonana przez Pracownię Kultur Tkankowych Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN na zasadzie odpłatnej usługi. Ekspresja była prowadzona z MOI4 (ang. *multiplicity of infection*), w temperaturze 26°C przez 48 h. Osady komórek po zebraniu zamrożono w -80°C. Oczyszczanie białek wykonano według procedury opisanej przez Friedman i Vale (1999) na złożu Ni-NTA. Osad komórek rozmrożono w lodzie, zawieszono w buforze do lizy (K-1) z inhibitorami proteaz i zdeintegrowano komórki za pomocą automatycznego urządzenia Cell Disruptor przy ciśnieniu 15 kpsi (103.4 MPa). Roztwór wirowano przy 31 000 x g przez 45 min w 4°C i następnie przy 100 000 x g, 30 min w 4°C. Supernatant zebrano, wymieszano ze złożem zrównoważonym buforem K-1 i inkubowano 60-90 min w 4°C na kołyszce laboratoryjnej. Po tym czasie zawiesinę przeniesiono do kolumny i przez grawitacyjny przepływ oddzielono roztwór po lizie od złoża. Następnie złożę ze związanym białkiem płukano buforem K-2 i kolejno K-3 w celu eliminacji białek przyłączonych niespecyficznie (1 ml/min). Ostatnim krokiem była elucja buforem K-4 z wyższym stężeniem imidazolu i szybkością przepływu 0.3 ml/min. Po elucji zebrano frakcje i połączono te, które zawierały najwięcej białka. Dodano do nich glicerol do 20%,

zmierzono stężenie białka (podrozdział 4.3.3), podzielono na porcje, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

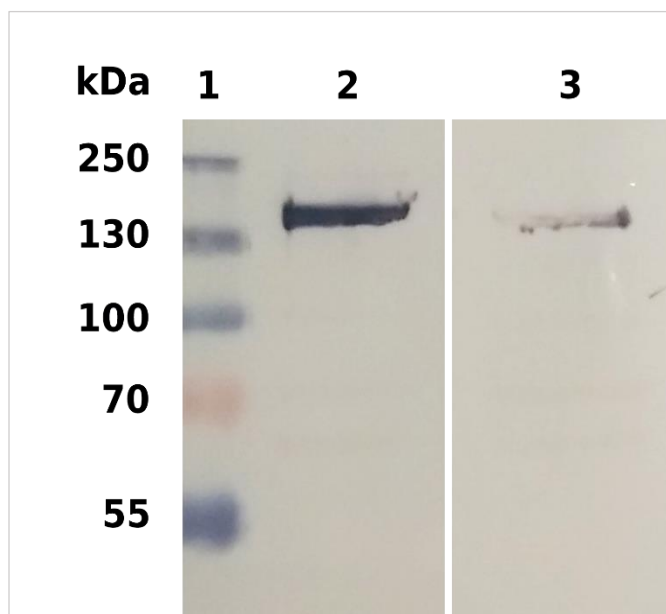
Po oczyszczaniu sprawdzono uzyskany materiał za pomocą SDS-PAGE (punkt 4.3.1) oraz Western Blot (podrozdział 4.3.2). Wynik elektroforezy SDS-PAGE pokazany na Ryc. 4.3 przedstawia oczyszczone kinezyiny, pełnej długości (nr 1 na żelu) oraz wariant bez zawiasu-2 (nr 3 na żelu). Okazało się, że preparat zawiera domieszki zanieczyszczeń, a czystość białka to ok. 65% według analizy densytometrycznej.



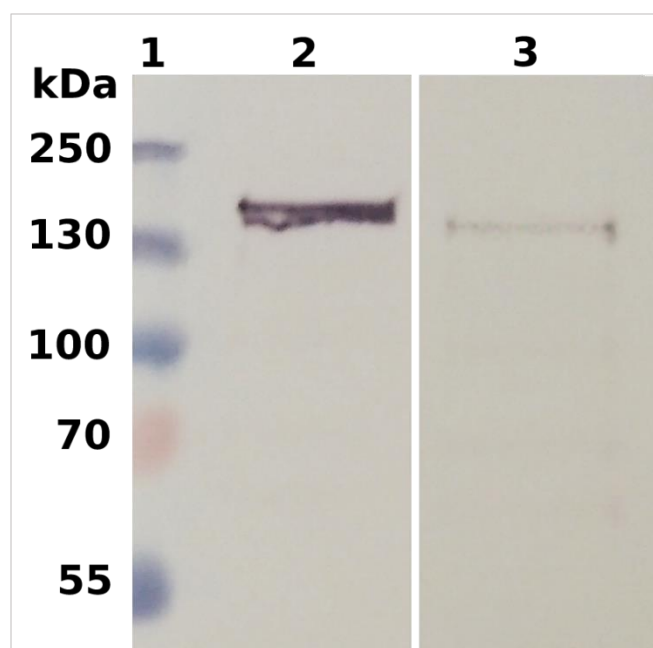
Ryc. 4.3 Żel poliakryloamidowy barwiony błękitem Coomassie (RotiBlue)

Legenda: **1**– kinezyna-1 pełnej długości (ok. 1 µg, monomer ma 140 kDa); **2** – marker białkowy, **3** - kinezyna-1 bez zawiasu-2 (ok. 1 µg, monomer ma ok. 130 kDa); po lewej stronie są wielkości poszczególnych markerów białkowych

Bardzo ważną kontrolę stanowił Western Blot z przeciwciałami przeciwko aminowemu końcowi kinezyiny-1 znajdującemu się w domenie motorycznej (Ryc. 4.4) oraz drugi (Ryc. 4.5), w którym przeciwciała rozpoznawały karboksylowy koniec kinezyiny-1. Oba testy Western Blot pokazały, że uzyskane kinezyiny są kompletne i nadają się do badań.



Ryc. 4.4 Western Blot z przeciwciałami rozpoznającymi koniec aminowy kinezy-1
Legenda: **1** – marker; **2** - kinezy-1 pełnej długości (1 μ g); **3** - kinezy-1 bez zawiasu-2 (0.5 μ g)



Ryc. 4.5 Western Blot z przeciwciałami rozpoznającymi koniec karboksylowy kinezy-1
Legenda: **1** – marker, **2** - kinezy-1 pełnej długości (1 μ g), **3** - kinezy-1 bez zawiasu-2 (0.5 μ g)

4.7.1 Test wiązania kinezy-1 do mikrotubul

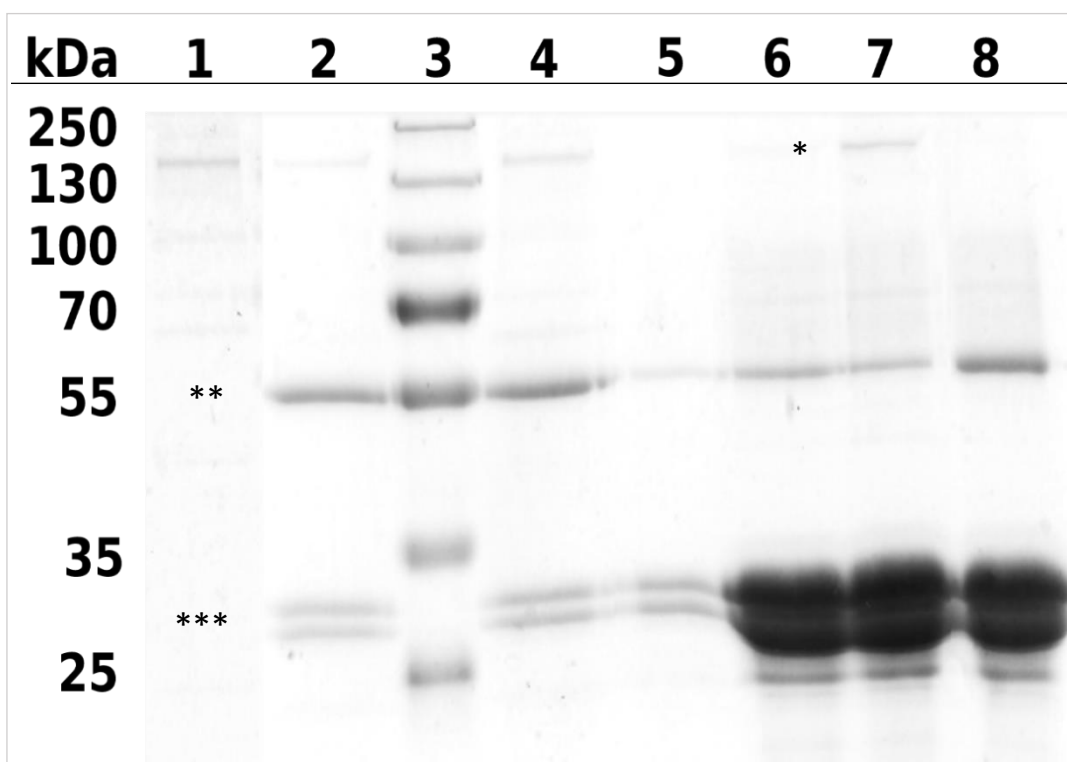
Oczyszczony preparat kinezy-1 zawierał domieszkę zanieczyszczeń białkowych (ok. 35% wg. densytometrii), które są widoczne na żelu z Ryc. 4.3 i 4.6. Wobec tego przeprowadzono poniższy eksperyment w celu weryfikacji, czy te dodatkowe białka mogą wiązać się niespecyficjnie do mikrotubul, a tym samym zaburzać lub blokować wiązanie kinezy-1, co w konsekwencji mogłoby wpływać na jakość uzyskanych

wyników. Test ten polegał na odtworzeniu etapów wykonanych przy mikroskopie TIRF podczas testu przesuwania dwóch mikrotubul przez kinezyne-1, który był głównym badanym zjawiskiem w niniejszej pracy. Użyto proporcjonalnie większych objętości składników po to, aby dało się zaobserwować zachodzące interakcje na żelu. Do badania wybrano 2 różne stężenia kinezyne-1 oraz zastosowano kontrolę niezawierającą tego białka (Tab. 4.2).

Tab. 4.2 Skład badanych próbek

	1	2	3 – kontrola bez kinezyne-1
Kinezyne-1	6 nM	12 nM	-
Mikrotubule	+	+	+
Bufor 2	+	+	+
Objętość (μl)	200	200	200

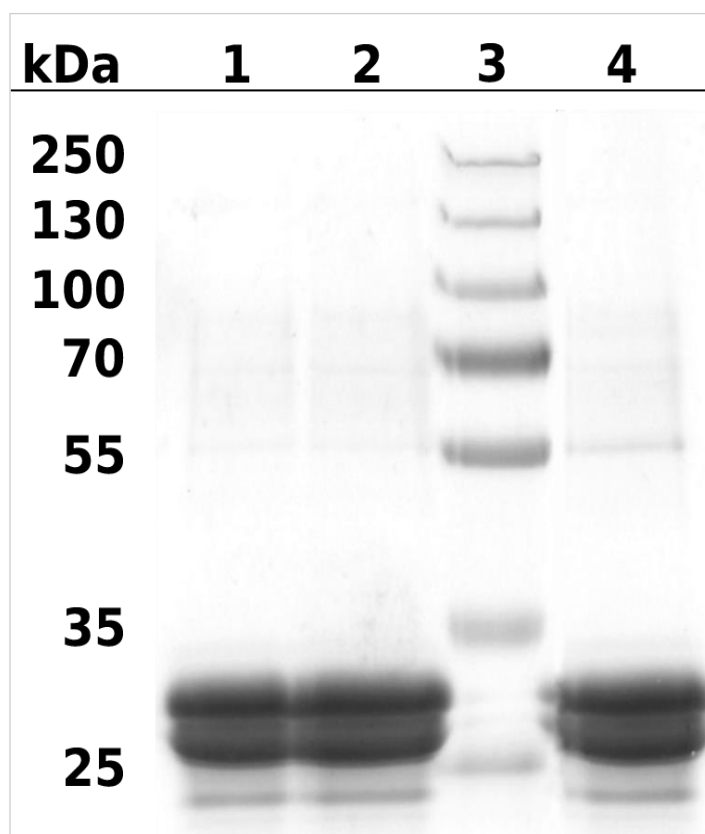
W pierwszym kroku przygotowano mikrotubule w Brb80 z taksolem (4.4.5), wirowano je i zawieszono w Brb20 z taksolem. Potem mikrotubule stacjonarne zawieszono w buforze 2 (bez KCl) i ogrzano do 30°C (ok. 2 minuty w łaźni wodnej). Następnie dodano kinezyne-1 w odpowiednim stężeniu, całość wymieszano delikatnie przez pipetowanie i inkubowano w 30°C przez 10 minut. Po tym czasie wirowano próbki przy 10 000 x g, w 30°C, 10 min. Supernatanty zebrano, a osady zawieszono w buforze 3 (z KCl) ogrzanym do 30°C, który miał za zadanie wyplukać zanieczyszczenia lub niezwiązane cząsteczki kinezyne. Ponownie wirowano próbki, przy 15 000 x g, w 30°C, przez 15 minut. Supernatanty zebrano, a osady zawieszono w niewielkiej objętości buforu 3. Uzyskane osady przez analogię odnoszą się do etapu tuż przed nanoszeniem mikrotubul ładunkowych z ATP, który zapoczątkowuje ruch kinezyne i transport mikrotubul.



Ryc. 4.6 Żel poliakrylamidowy barwiony Coomasie przedstawiający wyniki eksperymentu wiązania kinezyiny do mikrotubul w próbówce – fragment 1

Legenda: 1 – preparat kinezyiny-1 po oczyszczeniu (1 μ g), 3 – marker białkowy; 2, 4, 5 – osady z końcowego etapu eksperymentu, 2 – 6 nM kinezyiny-1, 4 – 12 nM kinezyiny-1, 5 – kontrola bez kinezyiny-1; 6–8 – supernatanty po pierwszym wirowaniu; stężenia kinezyiny-1: 6 – 6 nM, 7 – 12 nM, 8 – kontrola bez kinezyiny

Z uwagi na fakt, że objętość próbek wynosiła 200 μ l (oprócz osadów z końcowego etapu) konieczna była precypitacja acetonem. Do każdej próbki dodano czterokrotną objętość acetonu schłodzonego do -20°C , wymieszano dokładnie i od razu umieszczono w zamrażarce (-20°C) na 14 h. Po tym czasie próbki wirowano przy 14 000 x g w 4°C przez 10 minut. Każdy osad zawieszono w niewielkiej objętości buforu 3 (12 – 16 μ l), a następnie wykorzystano do przygotowania próbek do SDS-PAGE (Ryc. 4.6 i 4.7).



Ryc. 4.7 Żel poliakrylamidowy barwiony Coomassie przedstawiający wyniki eksperymentu wiązania kinezyzny do mikrotubul w próbówce – fragment 2

Legenda: 1, 2 i 4 - supernatanty po drugim wirowaniu; stężenia kinezyzny-1: 1 – 6 nM, 2 – 12 nM, 4 – kontrola bez kinezyzny-1, 3 – marker białkowy

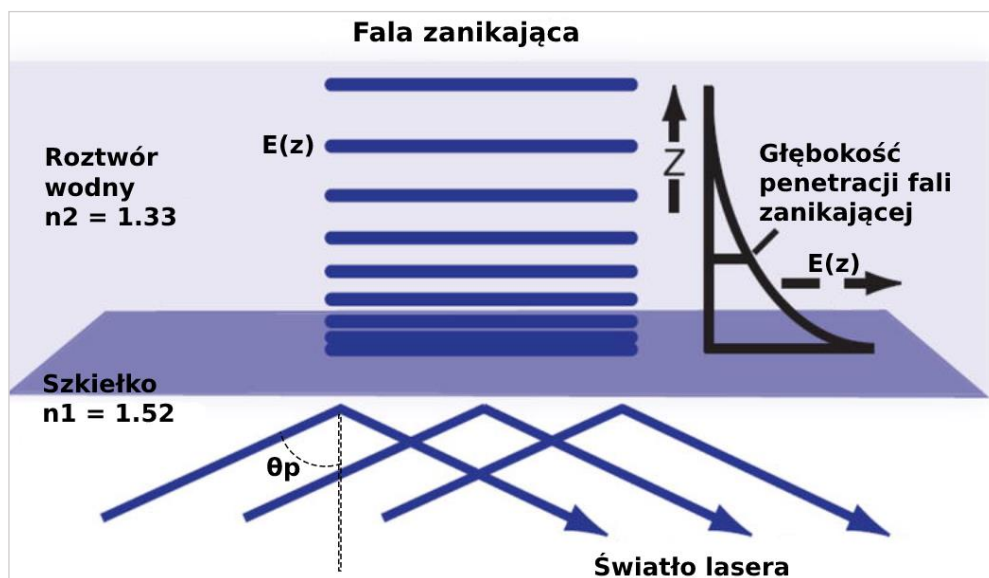
Porównując paski nr 2 oraz 6, albo 4 i 7, widać, że preparaty ostatecznie użyte do doświadczeń są praktycznie wolne od zanieczyszczeń, czyli dodatkowe białka z preparatu nie wpływają na interakcję kinezyzny z mikrotubulami. Ponadto widać, że w przypadku stężenia 12 nM część cząsteczek kinezyzny-1 nie związała się (*, pasek nr 7, Ryc. 4.6) lub po prostu jej część została wyeliminowana podczas płukania. Poza tym, na wysokości $M_r = 55$ kDa jest tubulina (**), której pewna część przedostała się do supernatantu nr 1. Z kolei, między prążkami 25 a 35 kDa widać kazeinę (składnik buforu), której część obserwuje się też w osadzie końcowym (***, 2 i 4, Ryc. 4.6). Również kontrola jest zastanawiająca (paski nr 8 z Ryc. 4.6, oraz nr 4 z Ryc. 4.7). Pomimo, że nie ma tam kinezyzny, zanieczyszczenia (podobne) są widoczne. Pierwsza możliwość to ewentualne przedostanie się cieczy z sąsiednich studzienek, a druga to obecność zanieczyszczeń w buforze, które pozostają w nim pomimo starannego przygotowania i filtrowania wszystkich buforów przez filtry z porami o wielkości $0.22 \mu\text{m}$. Jednakże, najważniejszy wniosek jest taki, że w osadzie końcowym widać głównie kinezyzę, tubulinę i kazeinę, a większość zanieczyszczeń ulega wypłukaniu (paski nr 1 i 2, Ryc. 4.7).

4.8 Mikroskopia TIRF – badanie podstawowych parametrów ruchu kinezy-1

4.8.1 Opis mikroskopii TIRF

Pojawienie się mikroskopii fluorescencyjnej z wykorzystaniem zjawiska całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. *total internal reflection fluorescence, TIRF*) umożliwiło wizualizację procesów biologicznych na poziomie pojedynczej cząsteczki (Axelrod, 1981). Dzięki TIRF możliwe jest oglądanie złożonych zjawisk biologicznych, takich jak transport ładunku przez pojedynczy motor molekularny (Funatsu i wsp., 1997; Conibear i wsp., 1998) lub replikacja DNA w czasie rzeczywistym (Tanner i wsp., 2009). TIRF odegrał kluczową rolę w badaniu oddziaływań *in vitro*, a także został z powodzeniem zastosowany do obrazowania żywych komórek. Wizualizacja struktur cytoszkieletu i dynamiki błony komórkowej, takich jak endocytoza, egzocytoza i adhezja, stała się znacznie łatwiejsza przy użyciu mikroskopii TIRF (Rappoport i Simon, 2003).

Ta technika mikroskopii fluorescencyjnej została opracowana przez Daniela Axelroda (Axelrod, 1981). Mikroskopia TIRF zapewnia obrazy o wyjątkowo wysokiej rozdzielczości (poniżej 100 nm), co umożliwia, m.in. obrazowanie obiektów, znajdujących się blisko granicy faz szkło/roztwór wodny (z próbką). W technice TIRF badane obiekty nie są oświetlane bezpośrednio, tj. wiązka światła (w niniejszej pracy lasera) nie przechodzi przez próbkę, tak jak w mikroskopie konfokalnym. Światło padające jest całkowicie odbijane na granicy dwóch przezroczystych ośrodków o różnych współczynnikach załamania i wtedy to pojawia się fala zanikająca (Ryc. 4.8). Energia fali zanikającej spada wykładniczo wraz z odległością od granicy faz, więc wzbudzone są tylko fluorofory, znajdujące się w pewnej odległości od szkiełka (do 100–200 nm). Pozwala to na tworzenie obrazów o znakomitej jakości, również jeśli chodzi o stosunek sygnału do szumu, ponieważ fluorofory zarówno badanej substancji, jak i te obecne w roztworze jako zanieczyszczenia w pozostałej nieoświetlanej części badanego obszaru nie są wzbudzone.



Ryc. 4.8 Zasada działania mikroskopu TIRF (Fish, 2009; zmienione)

Ilekoć światło napotka granicę pomiędzy dwoma przezroczystymi ośrodkami o różnych współczynnikach załamania światła (refrakcji), zostanie ono załamane, lub odbite. Przy pewnym kącie padania (θ_p), większym niż tzw. kąt graniczny (θ_{gr}), światło zostanie całkowicie odbite. Zjawisko odbicia można zaobserwować tylko wtedy, gdy światło przechodzi z ośrodka o wyższym współczynniku załamania (np. szkło, $n_1 = 1.52$) do ośrodka o niższym współczynniku załamania (np. roztwór wodny, $n_2 = 1.33$). Prawo refrakcji (prawo Snelliusa, Równanie 1) pozwala obliczyć kąt załamania światła (θ_z):

$$n_1 \cdot \sin\theta_p = n_2 \cdot \sin\theta_z$$

Równanie 1 Prawo załamania światła

Kąt graniczny padającego światła (θ_{gr}) to kąt, przy którym załamana wiązka światła biegnie wzdłuż granicy między dwoma ośrodkami, czyli pod kątem 90° do prostopadłej (Równanie 2).

$$\theta_{gr} = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$$

Równanie 2 Obliczenie kąta granicznego z wartości współczynników załamania światła

Podczas wystąpienia całkowitego wewnętrznego odbicia, niewielka część energii padającego światła przechodzi przez granicę faz szkło-woda, tworząc falę zanikającą. Zjawisko to ma charakter kwantowo-mechaniczny i nie wynika np. z niedoskonałości przyrządów optycznych. Powstająca fala zanikająca ma taką samą częstotliwość jak padające światło, a jej amplituda $E(z)$ maleje wykładniczo wraz z głębokością penetracji z :

$$E(z) = E(0)e^{-z/d}$$

Równanie 3 Amplituda fali zanikającej w funkcji odległości od granicy pomiędzy ośrodkami

W przedstawionym Równaniu 3, z oznacza odległość od granicy pomiędzy ośrodkami, a d – głębokość penetracji fali zanikającej; d można obliczyć z Równania 4:

$$d = \frac{\lambda_i}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 \theta_p - n_2^2)^{-1/2}$$

Równanie 4 Głębokość penetracji fali zanikającej; λ_i oznacza długość fali światła padającego

Głębokość penetracji fali zanikającej, tj. gdy $E(z)$ spada do wartości $1/e \cdot E(0)$, zwykle wynosi od 60 do 100 nm, ale może dochodzić do 200 nm. Zależy to od kąta padania światła, długości fali i współczynników załamania światła dwóch ośrodków (np. szkiełka nakrywkowego i próbki). Przykładowo, zwiększenie kąta padania światła prowadzi do zmniejszenia głębokości wnikania światła, a większa długość fali padającego światła zwiększa głębokość jego wnikania (Równanie 4). W mikroskopii TIRF do wytworzenia fali zanikającej o wystarczającej energii wykorzystuje się światło lasera o dość dużej mocy (w przypadku niniejszej pracy laser 649 nm o mocy 30 mW i 488 nm – 100 mW). W używanych obecnie obiektywach TIRF światło laserowe kierowane jest na próbkę przez obiektyw, który również zbiera światło fluorescencyjne emitowane przez próbkę.

Obiektywy mikroskopowe TIRF charakteryzują się dużą aperturą numeryczną (> 1.45 NA), którą można osiągnąć tylko przy użyciu olejku immersyjnego lub innych specjalistycznych płynnych środków. W typowym układzie biologicznym, aby powstała fala zanikająca, światło lasera musi przejść przez obiektyw, olejek immersyjny i szkiełko, po czym zostaje odbite na powierzchni granicznej szkiełka i wody (buforu). Aby uniknąć efektów odbicia i odchylenia, współczynnik załamania światła olejku immersyjnego musi być jak najbliższy współczynnikowi szkiełka (zwykle $n = 1.52$). Dla standardowych olejków immersyjnych współczynnik załamania światła wynosi $n = 1.515 - 1.518$ w 20°C.

4.8.2 Przygotowanie szkiełek silanizowanych

Uzyskanie efektywnego obrazowania w mikroskopii, szczególnie TIRF, zależy od powierzchni szkła, na którym zaadsorbowane są obserwowane obiekty. Przygotowanie szkiełek polega na ich oczyszczeniu z zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych. Najistotniejszym etapem jest funkcjonalizacja powierzchni szkła, np. za pomocą silanu, po czym następuje płukanie i dokładne suszenie szkiełek.

Początkowo korzystano z metody, w której szkiełka silanizowano za pomocą DDS (Gell i wsp., 2010). Jednakże, odczynnik był trwały maksymalnie przez 3 miesiące (zgodnie z obserwacjami). Poza tym, same szkiełka nadawały się do użycia przez ok. 2 tygodnie. Dodatkowo, procedura z DDS wymagała traktowania szkiełek żującym i dość niebezpiecznym roztworem, zwanym „Pirania”, składającym się z 95% kwasu siarkowego (VI) i 30% nadtlenu wodoru (perhydrol) w proporcji 3:7 v/v. Te wszystkie powody doprowadziły do opracowania przez nas nowej metody silanizacji szkiełek (Szkop i wsp., 2018).

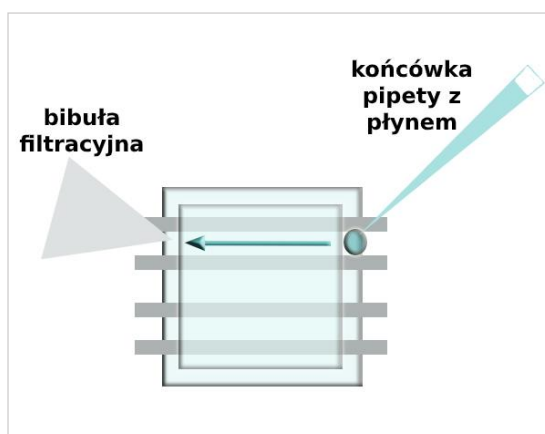
Procedurę silanizacji rozpoczynano od ustawienia szkiełek 22 x 22 mm oraz 18 x 18 mm w teflonowych statywach (w równej ilości). Przygotowano 20% v/v roztwór detergentu Mucasol (Sigma Aldrich, nr kat. Z637181) w szklanym pudełku z pokrywką i umieszczono tam statywy ze szkiełkami. Całość wstawiono do myjki ultradźwiękowej i sonikowano przez 10 min. Następnie szkiełka przeniesiono do innego pojemnika szklanego z wodą dejonizowaną i płukano na kołysce laboratoryjnej przez 3 min, po czym etap powtarzano zmieniając pojemnik i wodę. Potem w celu usunięcia organicznych zanieczyszczeń, szkiełka sonikowano w 100% metanolu przez 10 min. Po sonikacji płukano wodą dejonizowaną, dwa razy po 3 min – jak poprzednio. Następnym etapem było suszenie pod nadmuchem ciepłego powietrza za pomocą suszarki w komorze bezpyłowej, które pozwoliło na dokładne odparowanie resztek wody. Było to bardzo ważne, bo woda zaburza proces silanizacji (reaguje z silanem), a większa jej objętość może nawet zatrzymać reakcję. W osobnym szklanym pojemniku przygotowano 0.54 M roztwór bezwodnego imidazolu (Sigma-Aldrich, nr kat. 792527) w 100% acetonitrylu (Roth, nr kat. AE00) i po rozpuszczeniu umieszczono tam osuszone szkiełka. Następnie za pomocą igły jednorazowej dodano silan – trimetylochlorosilan (Sigma-Aldrich, nr kat. 386529) do stężenia 3.3%. Roztwór mieszano poprzez delikatne poruszanie statywami, po czym zabezpieczono pokrywę parafilmem i umieszczono całość w łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 45°C na 3 h. Po tym czasie szkiełka dwukrotnie sonikowano w 100% metanolu (za każdym razem świeżym) przez 10 min i następnie 15 min. W kolejnym etapie szkiełka były płukane wodą dejonizowaną, dwa razy po 3 min i suszone, jak poprzednio w komorze bezpyłowej. Po ostygnięciu szkiełek pudełko ze szkiełkami zabezpieczano parafilmem i przechowywano przez 6-8 tygodni.

4.8.3 Przygotowanie szkiełek niehydrofobowych

Jest to bardzo prosta metoda czyszczenia szkiełek, określana w literaturze jako „easy-clean”, w której powierzchnia szkła nie jest modyfikowana np. przez silanizację (Groß i wsp., 2018). Szkiełka ustawione w teflonowych statywach i zanurzone w 20% roztworze detergentu Mucasol (z wodą dejonizowaną) sonikowano w myjce ultradźwiękowej przez 15 min. Następnie statywy ze szkiełkami przeniesiono do szklanego pojemnika z wodą dejonizowaną i płukano dwa razy po 3 min, tak jak w punkcie 4.8.2. Kolejnym etapem była sonikacja szkiełek w 98% etanolu w myjce ultradźwiękowej przez 10 min, po czym ponownie płukano wodą dejonizowaną dwukrotnie po 3 min. Potem szkiełka suszono za pomocą sprężonego azotu i przechowywano w szklanym pudełku zabezpieczonym parafilmem.

4.8.4 Przygotowanie mikrokanałów ze szkiełek do badań

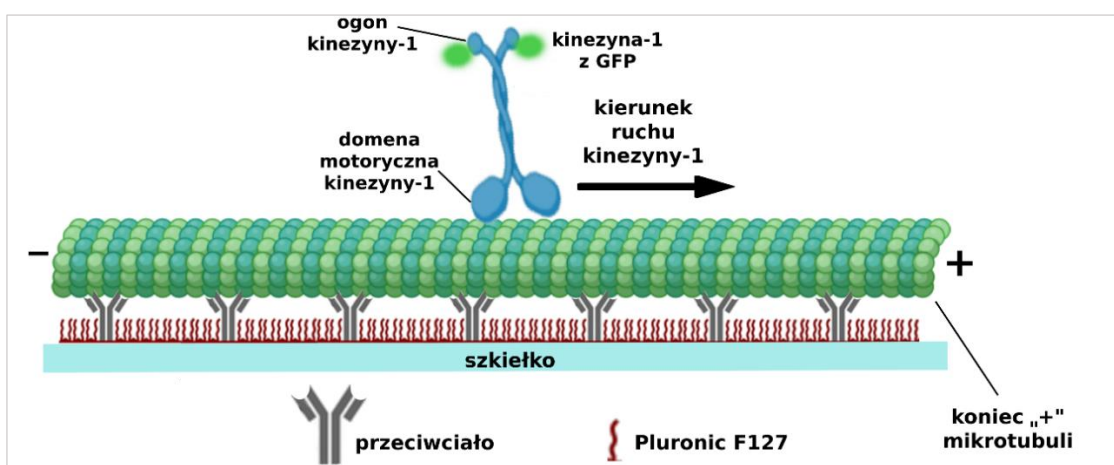
Praktycznie wszystkie testy opierające się na mikroskopii TIRF wymagają przygotowania tzw. celek, które tworzą poprzez połączenie dwóch szkiełek 22 x 22 mm oraz 18 x 18 mm za pomocą czterech dość wąskich (1-2 mm) i cienkich pasków parafilmu, umieszczanych pomiędzy szkiełkami jak to pokazano na Ryc. 4.9. Następnie celki umieszczono na rozgrzanym do ok. 96°C bloku grzejnym, oddzielając szkiełko od metalowego elementu bloku jedynie arkuszem papieru do soczewek. Delikatnie dociskano w miejscach gdzie położono paski parafilmu między szkiełkami tak, aby usunąć pęcherzyki powietrza oraz przez ogrzanie skleić komponenty celek. W ten sposób powstały 3 kanały o objętości ok. 10 μ l każdy, z czego środkowy pozostawał nieużywany i zapobiegał mieszanemu się roztworów z dwóch pozostałych celek. Tak przygotowane szkiełka umieszczono w specjalnych statywach metalowych, kompatybilnych ze stolikiem mikroskopu TIRF.



Ryc. 4.9 Celka mikroskopowa

4.8.5 Ruch pojedynczych cząsteczek kinezy-1 po mikrotubulach

Jest to test pozwalający określić zarówno szybkość, jak i długość przebiegu osiąganą przez pojedyncze cząsteczki motorów molekularnych. Pozwala on ocenić właściwości oczyszczonego białka motorycznego i porównać uzyskane wyniki z danymi z literatury, a innymi słowy to sprawdzenie, czy posiadany motor (np. kinezy-1) nadaje się do przeprowadzenia kolejnych, bardziej skomplikowanych badań. Test ten wykonuje się w oparciu o mikroskopię TIRF. W dużym uproszczeniu, mikrotubule są unieruchamiane za pomocą przeciwciał, a kinezy z roztworu przyłączają się do nich i zaczynają procesywny ruch (Ryc. 4.10). Procedura była wykonana podobnie, jak to opisali Korten i Diez (2008).



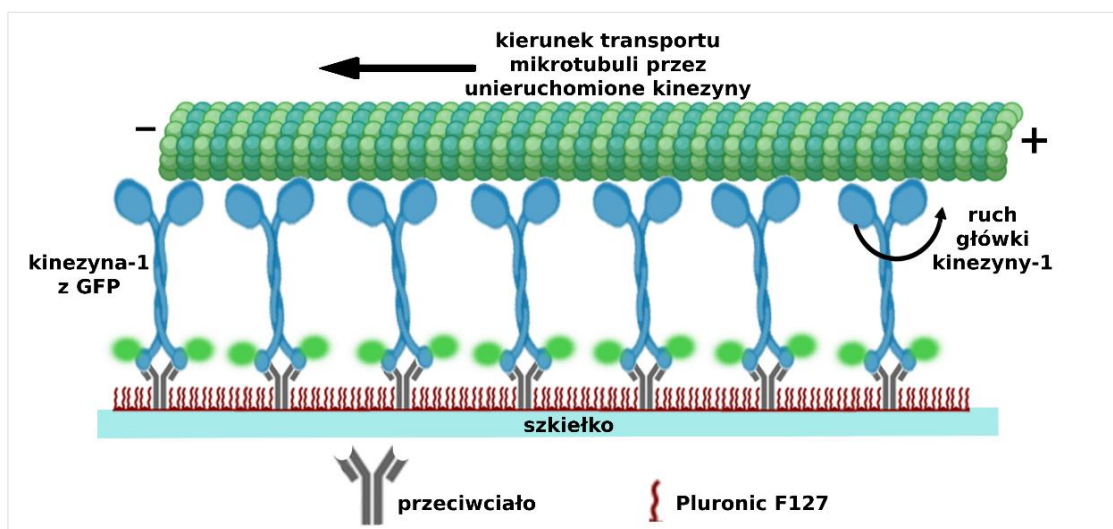
Ryc. 4.10 Poruszanie się pojedynczych cząsteczek kinezy-1 po mikrotubuli

Po wykonaniu celek (jak w punkcie 4.8.4) przez każdą z nich przepuszczono roztwór przeciwciał w PBS, w tym przypadku rozpoznających biotynę (rzadziej inne, skierowane przeciwko tubulinie) w stężeniu 33 $\mu\text{g/ml}$. Z jednej strony celki pozostawiono 20 μl roztworu, a z drugiej przyłożono cienki wężyk od pompy próżniowej i kontrolowano przepływ płynu przez delikatne zaciskanie wężyka palcami. Po 10 min inkubacji wpuszczono do celki 20 μl świeżo rozpuszczonego 1% roztworu Pluronic F127 (Life Technologies, nr kat. P6867), tym razem wymuszano przepływ roztworu przez przyłożenie z drugiej strony skrawka bibuły filtracyjnej lub ręcznika papierowego (Ryc. 4.10) i pozostawiono roztwór na przynajmniej 30 min. Pluronic F127 pełnił rolę substancji blokującej miejsca, które nie zostały zajęte przez przeciwciała. Aby zapobiec odparowaniu wody z tak przygotowanych celek, pozostawiono kroplę roztworu Pluronic F127, a także umieszczono celki w plastikowych szalkach Petriego, a obok celki – mały skrawek wilgotnego ręcznika papierowego.

Wybraną celkę płukano 40 μ l roztworu Brb80-MT. W 20 μ l tego samego buforu przygotowano roztwór mikrotubul, rozcieńczony zależnie od stężenia uzyskanego po przygotowaniu wyjściowego roztworu mikrotubul (4.4.5), zwykle 30-40 razy – do stężenia około 0.003 mg/ml. Unikając zbytniego pipetowania, które mogłoby złamać mikrotubule, roztwór wymieszano delikatnie i naniesiono do celki (przepływ płynu kontrolowano kawałkiem bibuły). Po 2-3 min płukano najpierw 40 μ l Brb80-MT, potem 40 μ l Brb20-S z dodatkiem antyoksydantów, które ograniczały wyświecanie się znaczników fluorescencyjnych. Ustawiono ostrość w mikroskopie TIRF na mikrotubule (laser 639 nm, filtr 77HE, 160nm/piksel), a następnie naniesiono roztwór 0.2 nM kinezy-1 w Brb20-S z 2 mM ATP i antyoksydantami. Sprawdzone, czy widać kinezy-1 poruszające się po mikrotubulach (laser 488 nm, filtr 77HE, 160nm/piksel), zmieniano optowar z 1 na 1.6 (100 nm/piksel) oraz filtr na Endow-GFP i nagrywano 2-3 minuty filmu (200 ms na klatkę). W kolejnej celce powtarzano całą powyższą procedurę.

4.8.6 Test gliding

Jest to najprostszy test ruchliwości motorów molekularnych, w którym są one przytwierdzone do powierzchni szkiełka poprzez fragment niezależny od ATP, w przypadku kinezy-1 przez koniec karboksylowy (Korten i Diez, 2008). Domeny motoryczne wystają wtedy do roztworu i wychwytyją mikrotubule (Ryc. 4.11). Hydroliza ATP i związane z tym zmiany konformacji w domenie motorycznej generują ruch i w efekcie mikrotubule są przesuwane, co można łatwo zaobserwować.

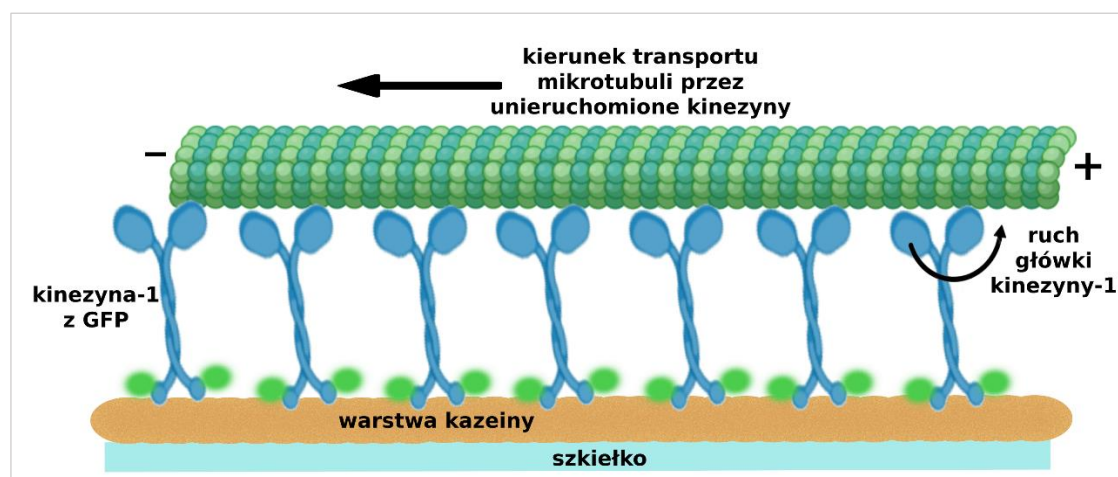


Ryc. 4.11 Schemat testu gliding

W niniejszej pracy kinezy-1 unieruchomiono na szkiełku dwiema metodami. Pierwsza opierała się na użyciu przeciwciał przeciwko C-końcowej części kinezy-1 lub

rozpoznających metkę polihistydynową. W tym przypadku stosowano szkiełka silanizowane (4.8.2). Celki przygotowano tak jak w podrozdziale 4.8.4, a następnie dodano przeciwciała i Pluronic F127 jak w 4.8.5. W kolejnym etapie wybraną celkę płukano buforem Brb20-S (40 μ l), naniesiono 20 μ l roztworu kinezy-1 o stężeniu 10-15 nM w Brb20-S i pozostawiono na 5 minut. Po tym czasie celkę płukano buforem Brb20-S, aby wyeliminować motory niezwiązane z przeciwciałami. Osobno, przygotowano mieszaninę Brb20-S z antyoksydantami i 2 mM ATP, z czego 40 μ l buforu wykorzystano do płukania, a do 50 μ l dodano mikrotubule do stężenia 0.003 mg/ml, całość naniesiono i nagrywano filmy trwające ok. 2-3 min, w kanale dla mikrotubul. W kolejnej celce powtarzano procedurę.

Drugi sposób wykonania testu gliding opiera się na wykorzystaniu szkiełek niehydrofobowych (4.8.3), pokrywanych na świeżo warstwą kazeiny, do której niespecyficznie wiąże się ogon kinezy-1. Fakt ten umożliwia przeprowadzenie testu gliding (Ryc. 4.12).



Ryc. 4.12 Test gliding na szkiełkach hydrofilowych

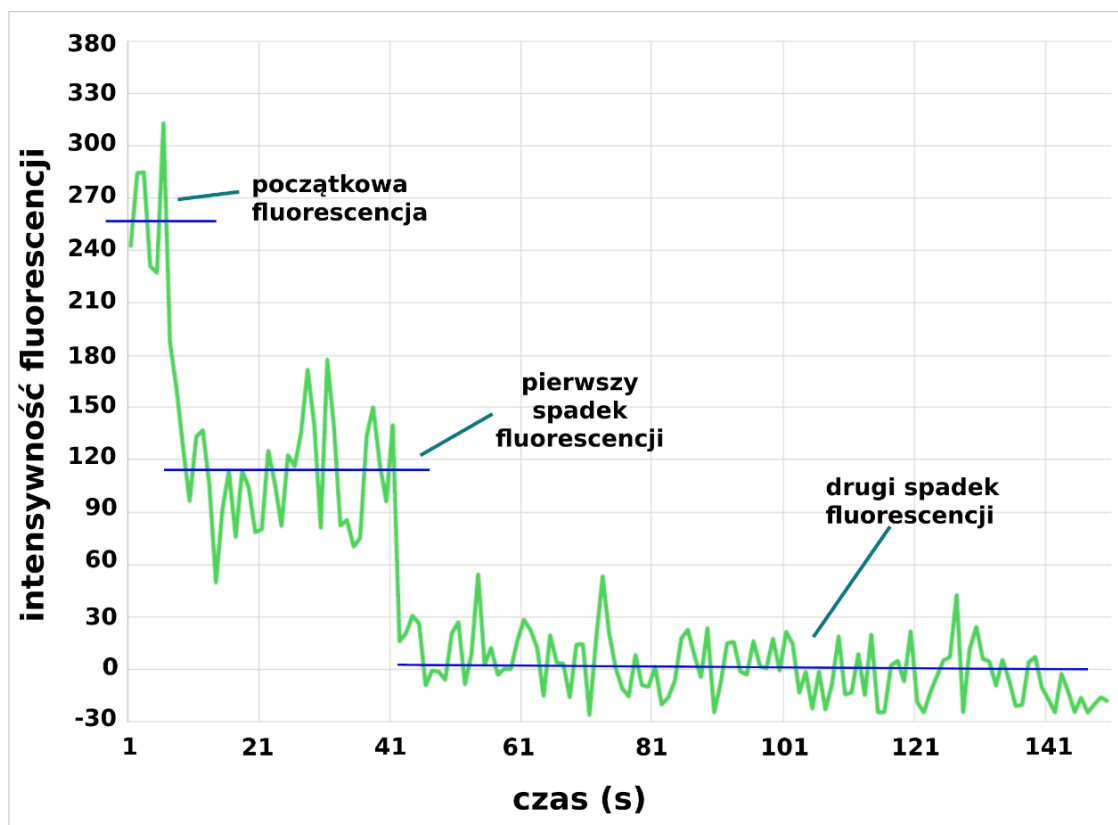
Celki przygotowano tak jak to opisano wyżej (4.8.4), a potem wypełniono je buforem blokującym, wpuszczono kilka objętości celki (50-100 μ l) i zostawiono do inkubacji na 5 minut. W przypadku szkiełek hydrofilowych nie było konieczności używania pompki próżniowej do nanoszenia pierwszego roztworu, ponieważ wpływał on do kanału celki samoistnie. Następnie naniesiono kinezynę-1 (10-15 nM) w buforze blokującym i inkubowano 5 min. Kolejne etapy przeprowadzano identycznie, jak w przypadku testu gliding na szkiełkach silanizowanych i stosowano te same bufory.

4.8.7 Test wygaszania pojedynczych cząsteczek

Eksperyment ten wykonuje się w celu weryfikacji, czy badane białko występuje faktycznie w postaci pojedynczych cząsteczek, czy może obserwuje się grupy cząsteczek lub agregaty.

Kinezyzna-1 w komórkach ma postać heterotetrameru z dwoma łańcuchami ciężkimi i dwoma lekkimi. W niniejszej pracy natomiast używano konstruktów zawierających jedynie łańcuchy ciężkie, tworzące dimery. Do genu kodującego łańcuch ciężki dołączono na końcu karboksylowym sekwencję kodującą GFP, wobec tego na każdą wyprodukowaną cząsteczkę dimerycznej kinezyny przypadają dwie cząsteczki GFP. Fotowygaszanie w tym przypadku powinno przebiegać w dwóch etapach – najpierw wygaszanie jednej cząsteczki GFP (spadek fluorescencji), a następnie drugiej (Ryc. 4.13).

Samo wykonanie przebiegało analogicznie do opisanej wyżej procedury testu gliding na szkiełkach silanizowanych (4.8.6), z tą różnicą, że nie dodawano mikrotubul, ani ATP. Cząsteczki kinezyny-1 przyłączone do przeciwciał były następnie naświetlane laserem o długości fali 488 nm (wzbudza fluorescencję GFP w kinezynie). Filmy (2-3 min) nagrywano z ustawioną dość intensywną mocą lasera, np. 20-30%, podczas gdy w standardowych eksperymentach używano 6-10% mocy (maksymalna moc lasera 488 to 100 mW). Uzyskane nagrania analizowano w programie ImageJ (Schneider i wsp., 2012) i przygotowano wykresy intensywności fluorescencji w funkcji czasu (Ryc. 4.13).

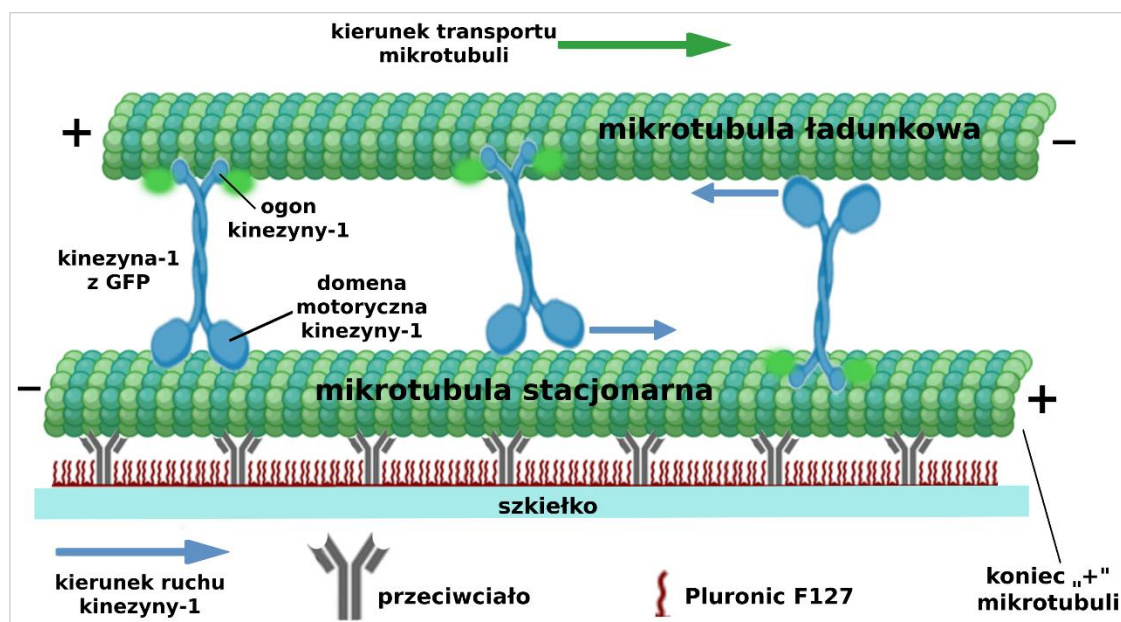


Ryc. 4.13 Reprezentatywny wykres fotowygazania cząsteczki kinezy-1

4.8.8 Mikroskopia TIRF - przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1

Szkiełka przygotowano zgodnie z metodą opisaną wcześniej (podrozdział 4.8.2), a celki tak jak w punkcie 4.8.4. Z kolei mikrotubule – stacjonarne i ładunkowe przygotowano według procedury opisanej w punkcie 4.4.5. Do każdej celki wpuszczono po 20 μ l roztworu przeciwciał rozpoznających biotynę, rozcieńczonych 30 razy w PBS i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do celek wprowadzono 1% roztwór Pluronic F127 w Brb80 na minimum 30 minut. Metalowy statyw z celką umieszczono w komorze mikroskopu TIRF nagrzaną do 30°C. Mikrotubule stacjonarne (4% tubuliny z Alexa Fluor 647 i 10% tubuliny z biotyną) nałożono w ok. 30-krotnym rozcieńczeniu – do stężenia ok. 0.003 mg/ml w buforze 1 i po chwili płukano najpierw buforem 1 (to i pozostałe płukania po 40 μ l buforu), a potem buforem 2. Następnie do celki dodano kinezynę-1 (lub kinezynę-1 bez zawiasu-2) w buforze 2 (bez ATP) w odpowiednim stężeniu i inkubowano 3 minuty. Po tym czasie celkę płukano buforem 3 i następnie buforem 4. Mikrotubule ładunkowe (zawierające 16% tubuliny z Alexa Fluor 647) zawieszono w 40 μ l buforu 4 (końcowe stężenie mikrotubul to ok. 0.001 mg/ml) rozdrabniano na mniejsze fragmenty, przepuszczając je przez cienką igłę do HPLC i unikając tworzenia piany. Następnie do roztworu mikrotubul dodano ATP

do stężenia 2 mM i całość wpuszczono do celki. Filmy nagrywano w dwóch kanałach – dla kinezyiny laser 488 nm i 649 nm dla mikrotubul. Dzięki różnicy w zawartości tubuliny znakowanej Alexa Fluor 647 możliwe było odróżnienie mikrotubul stacjonarnych od ładunkowych podczas przesuwania mikrotubul przez kinezynę-1. Schemat eksperymentu przedstawia Ryc. 4.14.



Ryc. 4.14 Schemat przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1

Inne warianty tego eksperymentu obejmują użycie mikrotubul przygotowanych z tubuliny zmodyfikowanej potranslacyjnie (*in vitro*) – detyrozynowane, tyrozynowane, glutamylowane. Pozwalało to ocenić wpływ (lub jego brak) wymienionych modyfikacji tubuliny na proces przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1.

4.8.9 Wpływ stężenia kinezyiny-1 na wybrane parametry przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie

W ramach tego eksperymentu wykorzystano szereg stężeń kinezyiny-1: 1.5 nM, 3 nM, 4.5 nM, 6 nM, 7.5 nM, 9 nM, 10.5 nM, 12 nM, 18 nM, 24 nM, 30 nM i 45 nM. Każde stężenie zmierzono zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.3.3. Eksperymenty wykonano według procedury zawartej w podrozdziale 4.8.8. Zebrano i policzono parametry dla przynajmniej 40 różnych zdarzeń przesuwania mikrotubul z każdego stężenia, używając programu FIESTA, wersja 1.05.0005 (Ruhnow i wsp., 2011).

4.9 Metody używane do obliczeń uzyskanych wyników

W celu określenia szybkości w testach ruchliwości pojedynczych cząsteczek, gliding i przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1, otrzymane

wyniki analizowano za pomocą rozkładu normalnego (Gaussa). Gęstość prawdopodobieństwa $f(x)$ określa poniższe Równanie 5, gdzie μ oznacza średnią, a σ to odchylenie standardowe (wariancja σ^2).

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right]$$

Równanie 5 Funkcja gęstości prawdopodobieństwa rozkładu normalnego

W celu obliczenia długości przebiegu pojedynczych cząsteczek kinezy-1 oraz wyznaczenia odległości, na jakie były transportowane mikrotubule w teście przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1, używano dystrybuanty (ang. *cumulative distribution function, CDF*). Dystrybuantę opisuje Równanie 6, gdzie L to średnia długość przebiegu, x to długość przebiegu dla poszczególnych cząsteczek/mikrotubul, x_0 to graniczna długość przebiegu, poniżej której pomiar nie jest możliwy (Thorn i wsp., 2000).

$$CDF = 1 - \exp\left[-\frac{(x - x_0)}{L}\right]$$

Równanie 6 Dystrybuanta

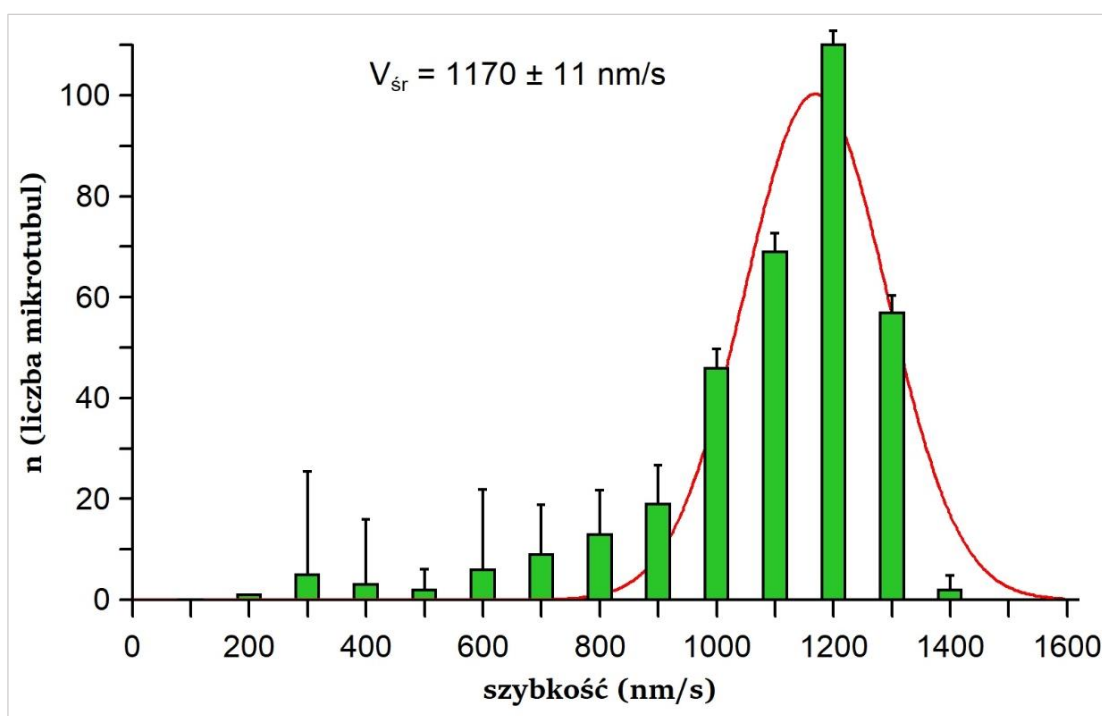
Dopasowanie rozkładu normalnego i dystrybuanty sporządzono w programie DataWnd, opracowanym przez prof. Andrzeja A. Kasprzaka, promotora niniejszej pracy.

5. Wyniki

Do rozprawy dołączono filmy obrazujące ruch mikrotubula-mikrotubula generowany przez kinezyne-1, a także test gliding oraz ruch pojedynczych cząsteczek kinezyne-1 wzdłuż mikrotubuli

5.1 Testy ruchliwości kinezyne-1 – gliding oraz analiza pojedynczych cząsteczek

Przed przystąpieniem do analizy przesuwania mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 ważne było sprawdzenie parametrów ruchu uzyskanej kinezyne-1, czyli określenie szybkości, jakie może osiągać, a także długości przebiegu pojedynczych cząsteczek tego motoru. Innymi słowy, potrzebna była pewność, że parametry te są zgodne z danymi opisanymi w literaturze dla kinezyne-1.



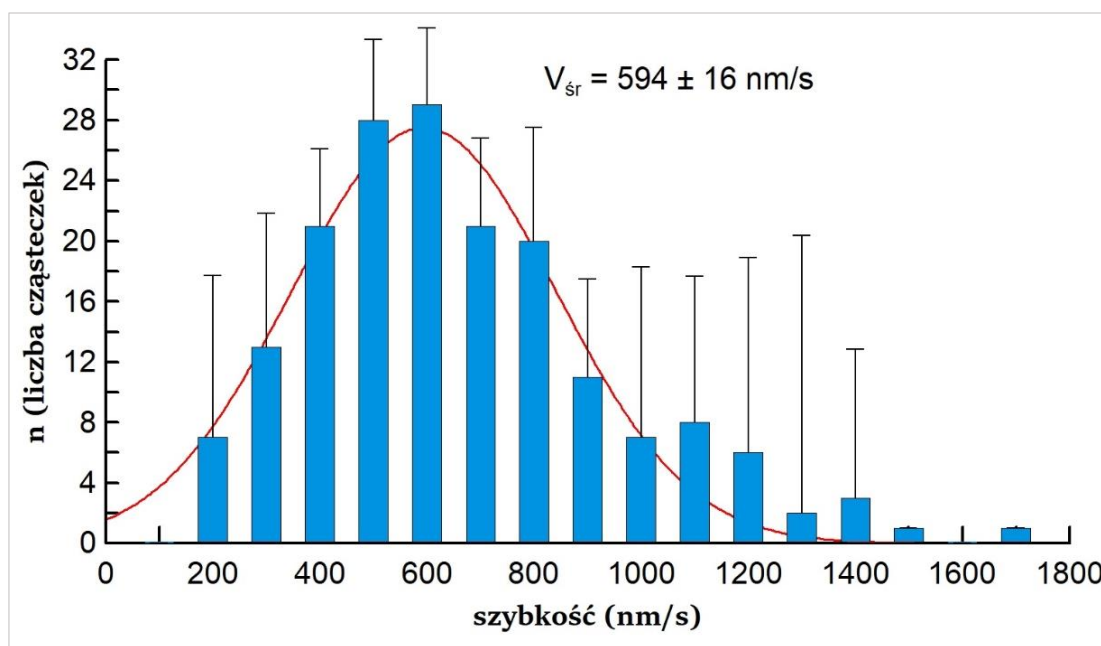
Ryc. 5.1 Histogram przedstawiający szybkości transportu mikrotubul przez kinezyne-1 pełnej długości (50 nM) w teście gliding. Czerwona linia to krzywa rozkładu normalnego. $V_{\text{sr}} = 1170 \pm 11 \text{ nm/s}$ to średnia szybkość występująca w równaniu dla rozkładu normalnego (Równanie 5). Słupki błędów stanowią błędy standardowe (SE) obliczone dla każdego zakresu szybkości (opuszczono zakresy z pojedynczymi wartościami). Parametry dla całej populacji próbek: $n = 342$ mikrotubule; $SD = 122 \text{ nm/s}$

Na początku wykonano test gliding, zgodnie z procedurą opisaną w Metodach w punkcie 4.8.6 (zob. Film 01). Szybkość mikrotubul w teście gliding dla kinezyne-1

pełnej długości w 30°C, otrzymana przez fitowanie danych do rozkładu normalnego (Równanie 5) wynosiła 1170 ± 11 nm/s (Ryc. 5.1).

Szybkości otrzymane z testu gliding dla kinezyiny-1 udokumentowane w literaturze są dość zróżnicowane. Böhm i wsp. (2000) zaobserwowali, że szybkość kinezyiny-1 wyizolowanej z mózgow wieprzowych wynosi w 30°C 800 nm/s i jest wyższa niż w 25°C (650 nm/s). Z kolei, Korten i wsp. (2016) zauważyli, że rekombinowana kinezyina-1 (z *Drosophila*) wyprodukowana w komórkach owadzych wykazuje większą szybkość niż to samo białko wyizolowane z bakterii (odpowiednio 900 nm/s i 755 nm/s). Przywołane przykłady pozwalają wyjaśnić dużą szybkość w teście gliding uzyskaną w niniejszej pracy.

Następnie przystąpiono do zbadania parametrów ruchliwości pojedynczych cząsteczek kinezyiny-1 (Film 02), według procedury opisanej w punkcie 4.8.5. Szybkość, po dopasowaniu do krzywej rozkładu normalnego wynosiła 594 ± 16 nm/s (Ryc. 5.2).

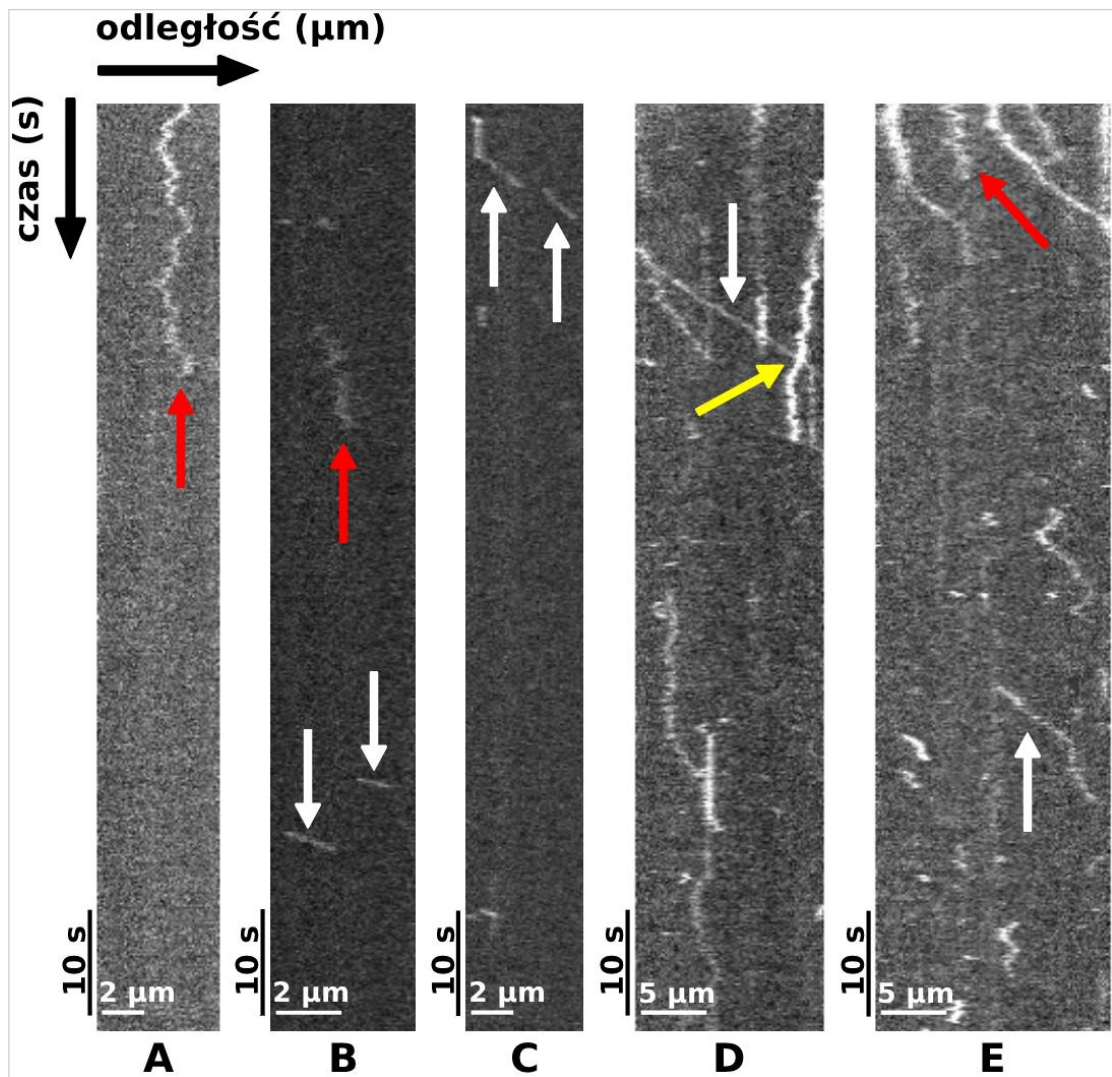


Ryc. 5.2 Wykres szybkości pojedynczych cząsteczek kinezyiny-1 pełnej długości z dopasowaniem krzywej rozkładu normalnego (czerwona linia). Stężenie kinezyiny wynosiło 0.2 nM. $V_{sr} = 594 \pm 16$ nm/s to średnia szybkość występująca w równaniu na rozkład normalny (Równanie 5). Słupki błędów stanowią błędy standardowe (SE) obliczone dla każdego zakresu szybkości (opuszczono zakresy z pojedynczymi wartościami). Parametry dla całej populacji próbek: $n = 178$ cząsteczek; $SD = 247$ nm/s

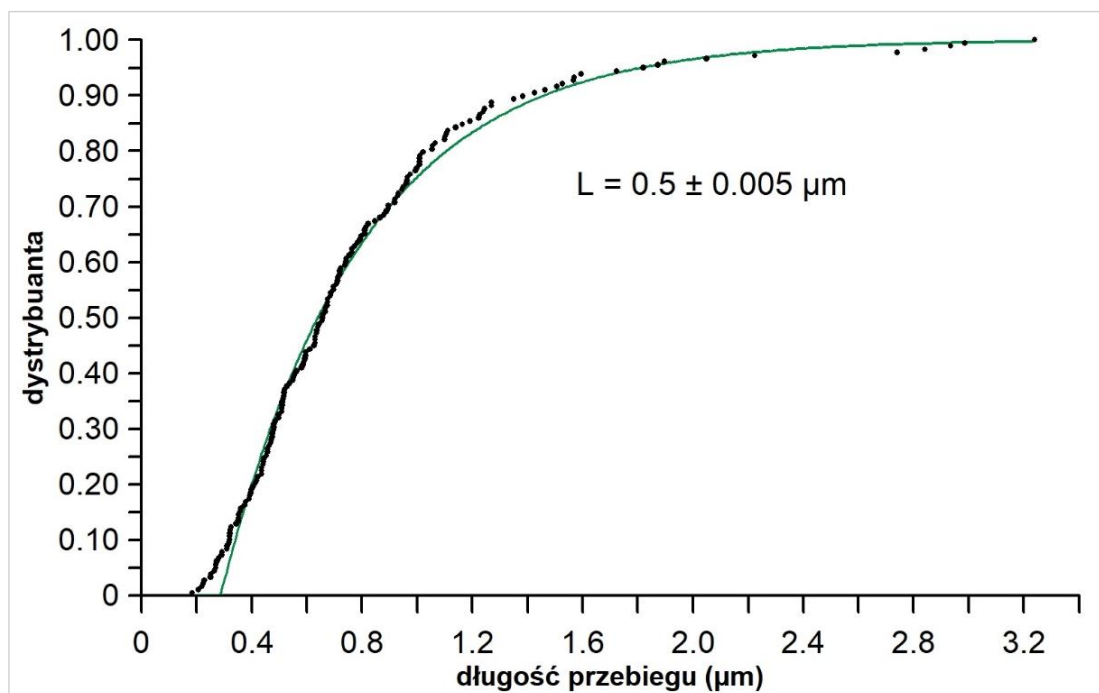
Wartość szybkości poruszania się pojedynczych cząsteczek jest znacznie niższa od tej uzyskanej w teście gliding. Podobne zjawisko różnicy w szybkościach zaobserwowali Friedman i Vale (1999). Ci badacze wskazują na fakt, że kinezyina-1 w teście gliding jest na stałe przytwierdzona do szkiełka i w związku z tym, autoinhibicja kinezyiny-1 (opisana w podrozdziale 1.2.5, Ryc. 1.9) jest zablokowana. Natomiast pojedyncze cząsteczki

kinezy-1 pełnej długości, które po przyłączeniu do mikrotubuli, swobodnie poruszają się po niej, są podatne na autoinhibicję. Ponadto, cząsteczki w formie „złożonej” mogą dyfundować po powierzchni mikrotubuli (Lu i wsp., 2009). Przykład dyfuzji i procesywnego ruchu kinezy-1 widać na kimografie z Ryc. 5.3 (odpowiednio strzałki czerwone i białe). Kimograf stanowi złożenie wszystkich klatek filmu na jednej ilustracji, gdzie skala czasu zaczyna się na górze, a odległości od lewej strony. Kimograf pozwala na analizę całkowitego przebiegu ruchu, w tym przypadku cząsteczek kinezy-1.

Przypuszczalnie, zjawisko autoinhibicji sprawia, że część zablokowanych motorów może stanowić „przeszkody” dla innych, które poruszają się procesywnie. Podobnie, dyfundujące motory mogą stanowić przeszkody dla innych kinezyn, poruszających się procesywnie (przykład na Ryc. 5.3, strzałka żółta). Możliwe, że powoduje to występowanie przerw w ruchu pojedynczych cząsteczek, obniżając średnią wartość szybkości. Identyczny wynik szybkości pojedynczych cząsteczek kinezy-1 pełnej długości jak w niniejszej pracy (600 nm/s) uzyskali Hooikaas i wsp. (2019).



Ryc. 5.3 Kimografy przedstawiające dyfuzję oraz ruch procesywny cząsteczek kinezy-1 (A i B – 0.1 nM, C – 0.2 nM, D i E – 1.5 nM). Strzałki oznaczają kolejno: czerwone – dyfuzja cząsteczek kinezy-1, białe – ruch procesywny motorów, żółta – dyfundująca cząsteczka kinezy-1 (lub grupa cząsteczek) prawdopodobnie przerwała ruch procesywny innej cząsteczki. Różne kąty nachylenia torów ruchu (białe strzałki w B i D) świadczą o różnicach w szybkości poruszania się cząsteczek kinezy-1



Ryc. 5.4 Dystrybuanta długości przebiegu dla pojedynczych cząsteczek kinezy-1 pełnej długości. Stężenie kinezy-1 wynosiło 0.2 nM. $L = 0.5 \pm 0.005 \mu\text{m}$ to długość przebiegu obliczona z Równania 6. Parametry dla całej populacji próbek: $n = 178$ cząsteczek; $SD = 0.5 \mu\text{m}$

Długość przebiegu dla pojedynczych cząsteczek kinezy-1 obliczono z dystrybuanty (ang. *cumulative distribution function, CDF*; Równanie 6) i uzyskano wynik $0.5 \pm 0.005 \mu\text{m}$ (Ryc. 5.4). We wstępie wspomniano, że procesywność pojedynczych cząsteczek kinezy-1 wynosi ok. $0.8 \mu\text{m}$ (Hackney, 1995). Inni badacze uzyskiwali wartości długości przebiegu równe np. $1 \mu\text{m}$ (Hooikaas i wsp., 2019) lub $0.82 \mu\text{m}$ (Chiba i wsp., 2021) dla kinezy-1 pełnej długości.

Friedman i Vale (1999) zmierzili szybkość 135 nm/s dla ludzkiej kinezy-1 pełnej długości, a długość przebiegu $2.5 \mu\text{m}$. Jednakże, używali oni mikrotubul aksonemalnych, które są silnie glutamylowane (do 40 reszt Glu). We wstępie opisano zbadany wpływ glutamylacji – przy 10 resztach Glu długość przebiegu kinezy-1 wzrastała 1.5 razy (podrozdział 1.5).

Reasumując, uzyskane dane pokazują, że otrzymany preparat kinezy-1 jest podobny do tych używanych przez innych badaczy, ponieważ osiąga wartości parametrów ruchu zbliżone do wyników opublikowanych wcześniej (opisane wyżej), a zanieczyszczenia występujące w tym preparacie wydają się nie zaburzać badanych oddziaływań. Ewentualne odchylenia mogą wynikać z różnych warunków eksperymentalnych, siły jonowej buforów, a także drobnych różnic w używanych mikrotubulach (jak u Friedman i Vale, 1999).

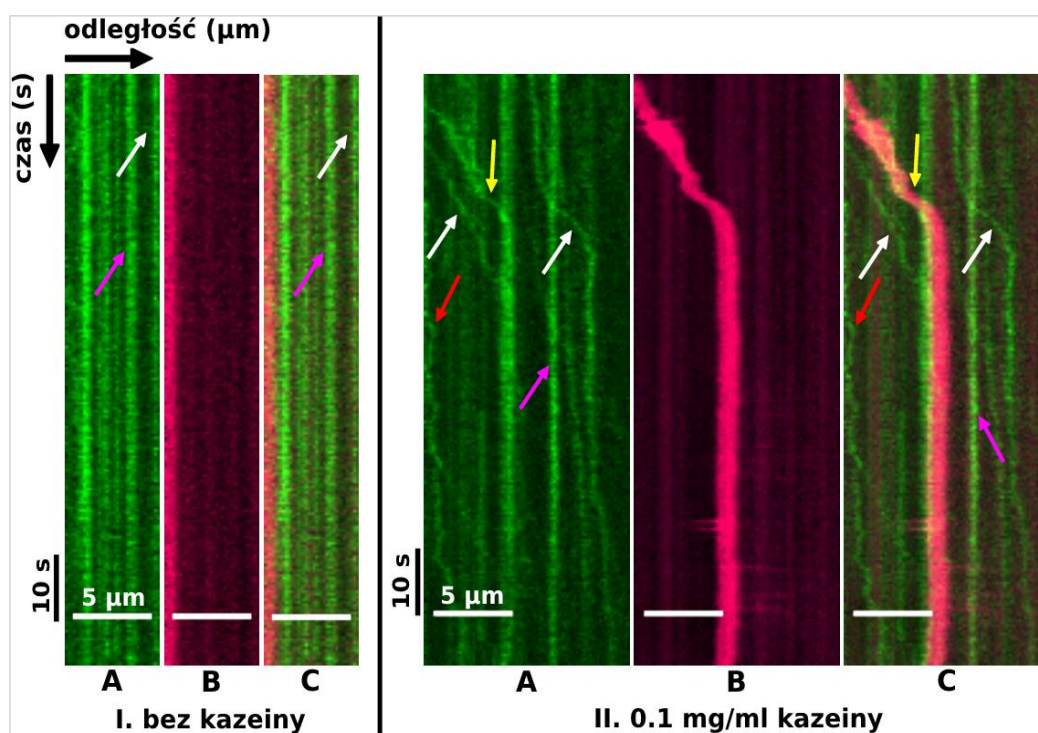
5.2 Opracowanie powtarzalnych warunków eksperymentalnych testu przesuwania mikrotubul przez kinezyne-1

Pomimo dostępności metod wykonania testów przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez motory molekularne *in vitro* (z białkami oczyszczonymi), w literaturze nie było powtarzalnej metody pozwalającej na obserwację ruchu mikrotubula-mikrotubula dla kinezyne-1, a stosowanie warunków, które były optymalne dla innych motorów (np. dla Ncd, Fink i wsp., 2009) kończyły się niepowodzeniem. Próby wykonania testu przesuwania mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 były prowadzone również w podobnych warunkach jak w teście gliding (4.8.6), czy podczas pomiaru ruchliwości pojedynczych cząsteczek (4.8.5). Do testów ruchliwości kinezyne-1, zazwyczaj używa się buforu Brb80 lub Brb20 z dodatkiem 0.2 – 0.5 mg/ml kazeiny (dokładne składy roztworów w punkcie 3.4). Brb20 to bufor o niższej sile jonowej, który pozwala na uzyskanie większej ilości zdarzeń ruchliwości pojedynczych cząsteczek kinezyne-1 przy znacznie niższym stężeniu tego białka niż w przypadku Brb80 (Korten i Diez, 2008). W przypadku niniejszej pracy podobną zależność zaobserwowano w przypadku testu gliding, dlatego wszystkie eksperymenty były robione z użyciem Brb20. Jednakże, warunki eksperymentalne stosowane w testach ruchliwości pojedynczych cząsteczek i gliding również nie pozwoliły zaobserwować przesuwania dwóch mikrotubul przez kinezyne-1.

Nieoczekiwanie, ważnym elementem determinującym, czy proces przesuwania mikrotubul przez kinezyne-1 będzie obserwowany czy nie, okazało się stężenie kazeiny w buforach używanych do badań. Kazeina to białka mleka (fosfoproteiny), a właściwie mieszanka składająca się z typów α_{s1} i α_{s2} , β oraz κ . Dodana do buforów kazeina nie wpływa na funkcjonalność oraz aktywność kinezyne-1. Jednakże, w przypadku testu przesuwania dwóch mikrotubul okazało się, że zbyt wysokie stężenie kazeiny, tj. ok. 0.2 mg/ml, hamuje ten proces lub go uniemożliwia. Dopiero po obniżeniu stężenia kazeiny do 0.1 mg/ml w niniejszej pracy zaobserwowano zjawisko przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 (skład buforu w punkcie 3.4, a opis metody 4.8.8). Kazeina jest używana w teście gliding jako odczynnik blokujący szkiełka hydrofilowe, tworzący warstwę, do której wiążą się cząsteczki kinezyne-1 za pomocą ogonów, a domeny motoryczne są zwrócone do roztworu (Korten i Diez, 2008). Ponadto, w wyniku eksperymentu opisanego w podrozdziale 4.7.1 okazało się, że część kazeiny

zostaje w osadzie razem z mikrotubulami i kinezyną-1, najprawdopodobniej związana z ogonem kinezyny. W stężeniu 0.5 mg/ml β -kazeina tworzy micelle (O'Connell i wsp., 2003). Ponieważ w tej pracy używano niefrakcjonowanej kazeiny, powstało pytanie, czy kinezyna mogła transportować takie micelle zamiast mikrotubul i stąd był brak obserwacji przesuwania dwóch mikrotubul. W opisywanych badaniach był to jednak tylko aspekt techniczny (Szkop i wsp., 2018).

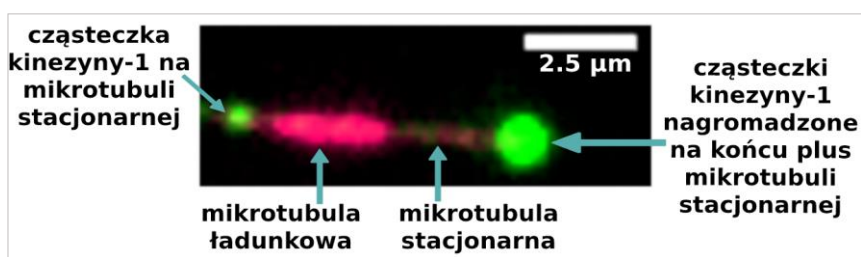
Przeprowadzono test przesuwania mikrotubul przez kinezynę-1 (tak jak to opisano w punkcie 4.8.8) z różnymi stężeniami kazeiny. Co ciekawe, bez kazeiny cząsteczki kinezyny-1 praktycznie nie poruszały się po mikrotubulach (Ryc. 5.5, I), ale sporadycznie mogły wiązać mikrotubule ładunkowe z roztworu. W przypadku stężeń kazeiny większych od 0.2 mg/ml obserwowano tylko ruch procesywny kinezyny-1, a transportu mikrotubul już nie. Dopiero w obecności 0.1 mg/ml kazeiny zaobserwowano zarówno ruch procesywny kinezyny-1 oraz przesuwanie mikrotubul względem siebie (Ryc. 5.5, II). Właśnie w takich warunkach wykonano wszystkie kolejne badania nad przesuwaniem dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1.



Ryc. 5.5 Kimografy przedstawiające wyniki eksperymentu z różnymi stężeniami kazeiny. A – kanał zielony (kinezyny-1), B – kanał czerwony (mikrotubul), C – oba kanały. Do eksperymentu użyto stężenia 6 nM kinezyny-1. Różowymi strzałkami oznaczono nieporuszające się cząsteczki kinezyny-1, białe strzałki wskazują ruch procesywny motorów, czerwone – dyfuzję cząsteczek kinezyny-1, a żółte – kolokalizację procesywnego ruchu cząsteczek z jednoczesnym transportem mikrotubuli ładunkowej wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej przez kinezynę-1. Dla fragmentu I i II panele A, B i C obejmują ten sam obszar, dlatego też skalę barową i skalę czasu opisano tylko w części A

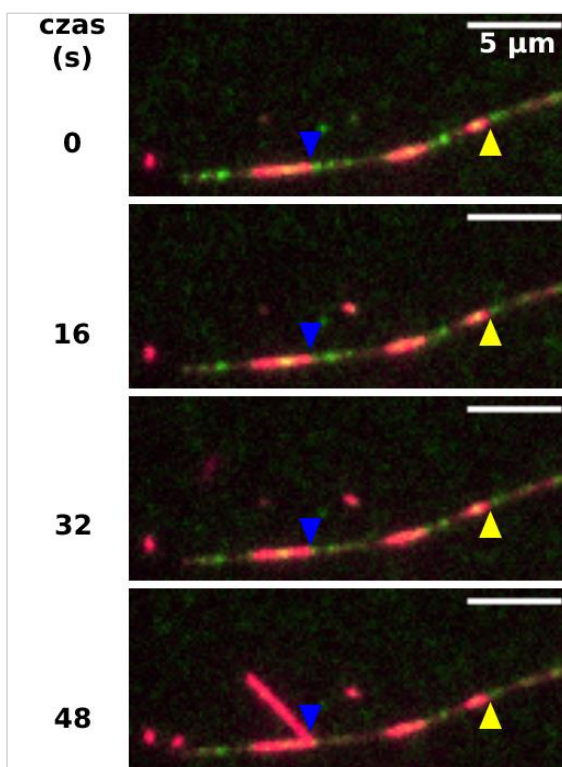
5.2.1 Eksperyment kontrolny ruchu mikrotubula-mikrotubula

W celu sprawdzenia, czy za przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie faktycznie odpowiada kinezyrna-1 przeprowadzono eksperyment, w którym wykonano wszystko według opisu w podrozdziale 4.8.8, ale początkowo mikrotubule ładunkowe nanoszono bez dodatku ATP. Nagrywano filmy o długości 1 – 2 minuty. Następnie do tej samej celki dodano bufor z ATP i nagrywano kolejne filmy. Na potrzeby ułatwienia interpretacji zdjęć – pojedynczych klatek z filmów z mikroskopu TIRF przedstawiających ruch mikrotubula-mikrotubula przygotowano ilustrację (Ryc. 5.6).

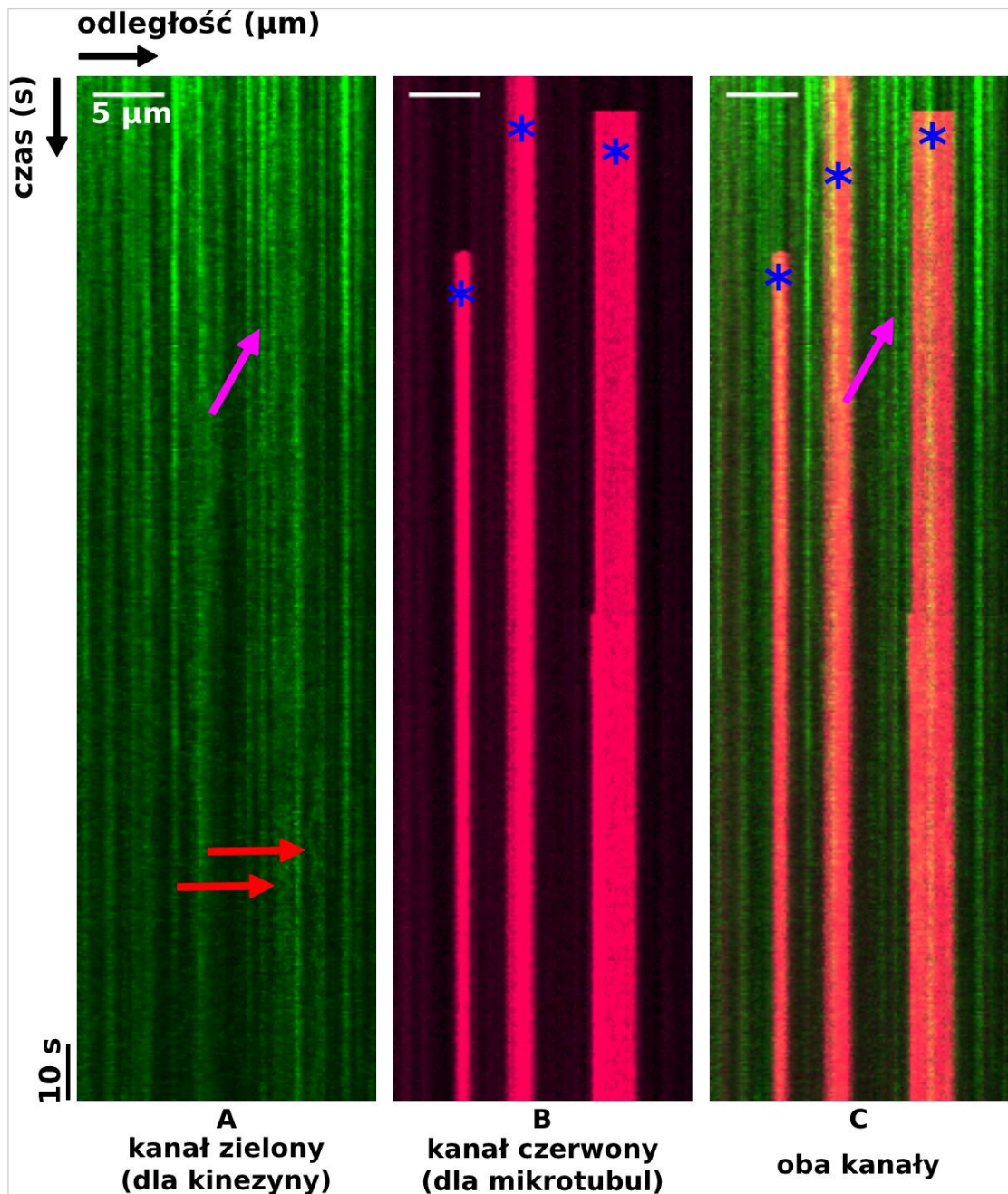


Ryc. 5.6 Ilustracja zawierająca objaśnienie do zdjęć z mikroskopu TIRF

Zgodnie z oczekiwaniami, bez ATP nie zaobserwowano ani procesywnego ruchu kinezy-1, ani ruchu mikrotubula-mikrotubula, co widać zarówno na montażu wybranych klatek z filmu (Ryc. 5.7), jak i na kimografie z tego samego obszaru co montaż (Ryc. 5.8).

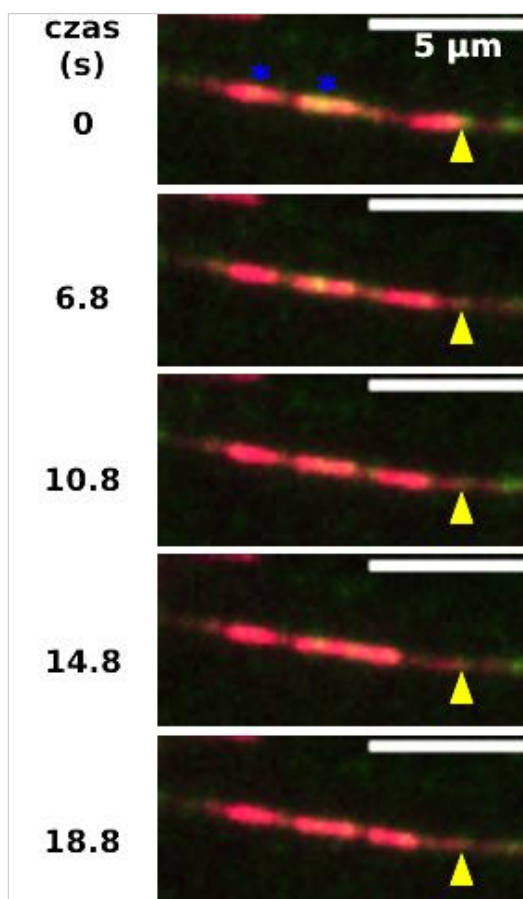


Ryc. 5.7 Montaż z filmu obrazującego pierwszą część eksperymentu kontrolnego bez dodatku ATP. Stężenie kinezy-1 wynosiło 6 nM. Żółtym i niebieskim trójkątem zaznaczono lokalizacje mikrotubul ładunkowych w czasie równym 0 s

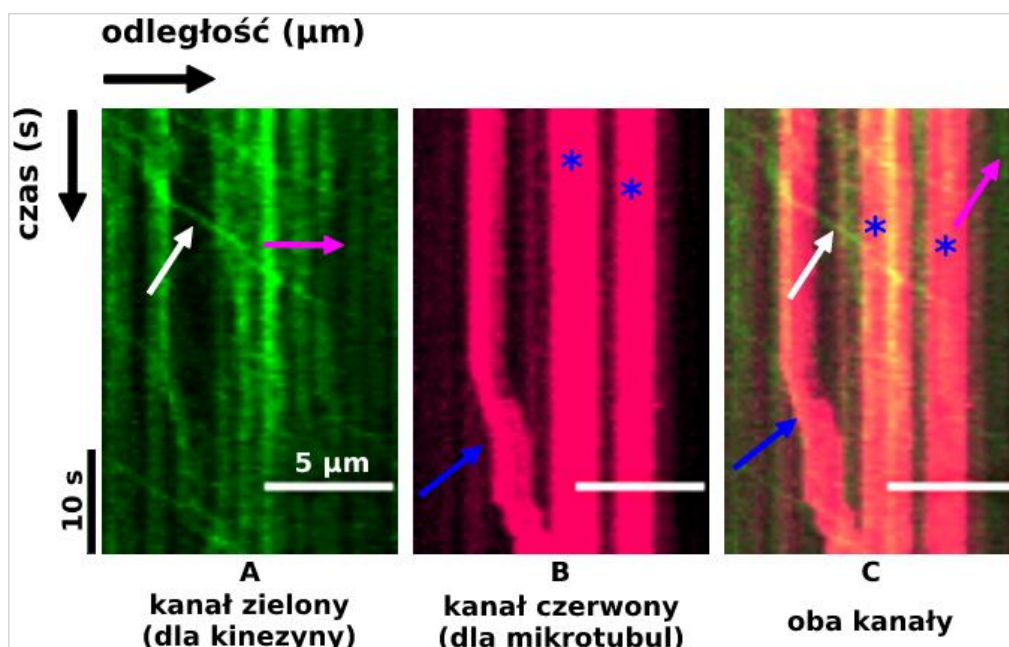


Ryc. 5.8 Kimograf do montażu z Ryc. 5.7, obrazujący pierwszą część eksperymentu kontrolnego bez dodatku ATP. Stężenie kinezy-1 wynosiło 6 nM. Różowymi strzałkami oznaczono cząsteczki kinezy-1 unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, czerwonymi – dyfuzję cząsteczek kinezy-1, a niebieskimi gwiazdkami mikrotubule, które przyłączyły się do cząsteczek kinezy-1, ale nie były transportowane

W drugiej części eksperymentu do tej samej celki dodano bufor zawierający ATP. Wtedy już zaobserwowano zarówno procesywny ruch cząsteczek kinezy-1, jak i przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie. Widać to na montażu (Ryc. 5.9) i na kimografie uzupełniającym ten montaż (Ryc. 5.10).



Ryc. 5.9 Montaż z filmu obrazującego drugą część eksperymentu kontrolnego po dodaniu buforu z ATP. Stężenie kinezy-1 wynosiło 6 nM. Żółtym trójkątem zaznaczono lokalizację wybranej mikrotubuli ładunkowej w czasie 0 s, a niebieskimi gwiazdkami mikrotubule, które nie były transportowane



Ryc. 5.10 Kimograf do montażu z Ryc. 5.9, obrazujący drugą część eksperymentu kontrolnego po dodaniu buforu z ATP. Stężenie kinezy-1 wynosiło 6 nM. Strzałkami oznaczono kolejno: różowymi – cząsteczki kinezy-1 unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, białymi – procesywny ruch cząsteczek kinezy-1, niebieskimi – przemieszczanie mikrotubuli ładunkowej przez kinezę-1. Niebieskimi gwiazdkami zaznaczono mikrotubule ładunkowe, które przyłączyły się do cząsteczek kinezy-1, ale nie były transportowane

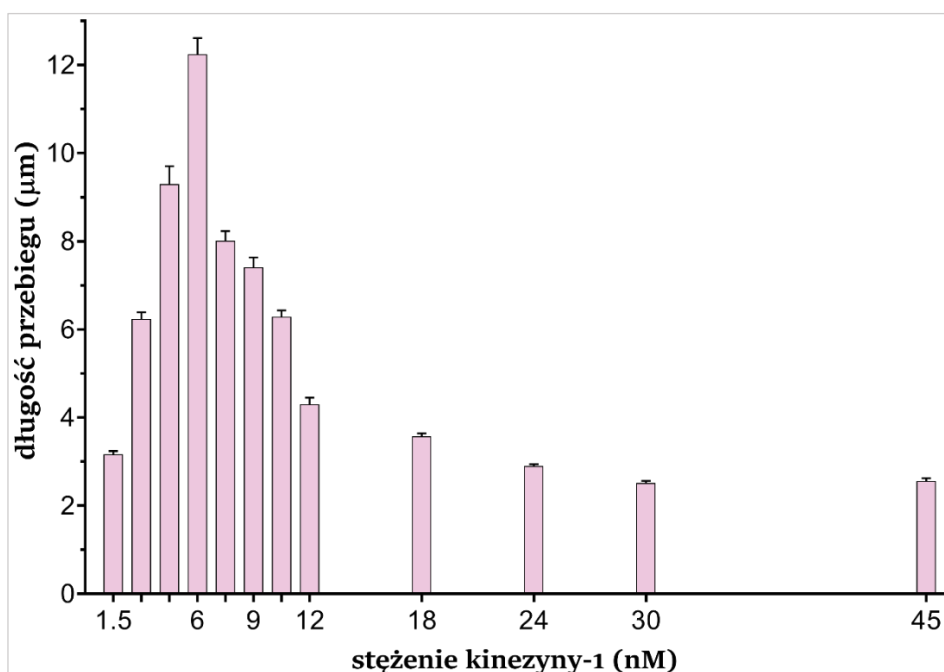
Opisany eksperyment kontrolny pozwolił potwierdzić, że za przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie odpowiadają cząsteczki kinezy-1.

5.3 Wpływ stężenia kinezy-1 na wybrane parametry przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowano, że stężenie kinezy-1 ma wpływ na szybkość, długość przebiegu oraz częstość występowania zdarzeń przesuwania dwóch mikrotubul przez kinezynę-1. W ramach niniejszej pracy omówię kolejno analizowane parametry ruchu mikrotubula-mikrotubula oraz spróbuję wyjaśnić, dlaczego obserwuje się tak wyraźny wpływ stężenia kinezy-1 i jakim zjawiskom mogą podlegać cząsteczki kinezy-1 w różnych zakresach stężeń tego motoru. Eksperymenty wykonano według procedury opisanej w punkcie 4.8.8 i 4.8.9. Film 03 przedstawia porównanie trzech stężeń kinezy-1 (1.5 nM, 6 nM i 45 nM) podczas generacji ruchu mikrotubula-mikrotubula.

5.3.1 Długość przebiegu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie

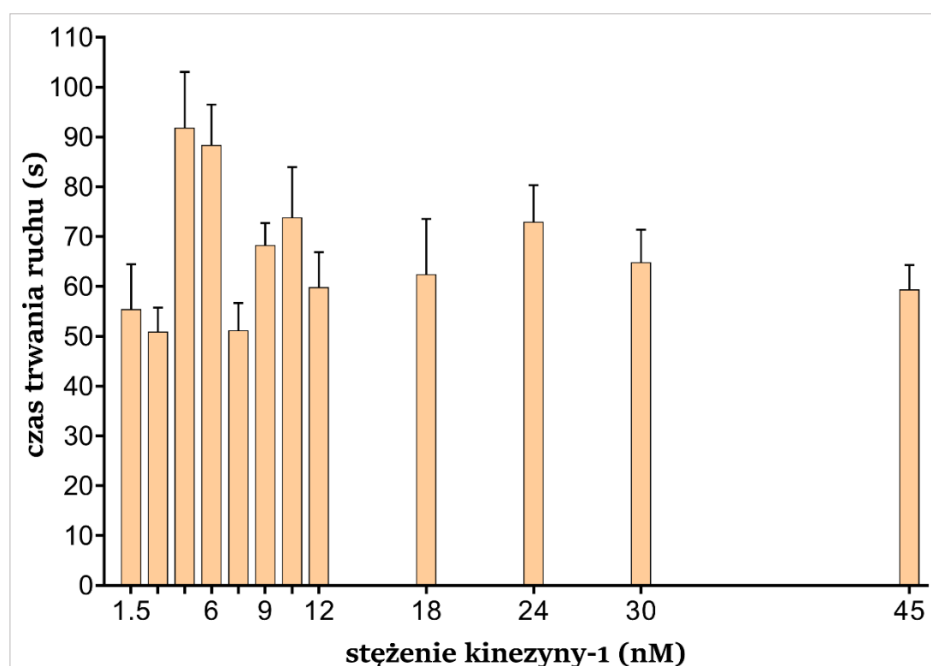
W przypadku przesuwania dwóch mikrotubul, przy stężeniu 6 nM kinezy-1 zanotowano wartość długości przebiegu ok. 12 μm , co stanowiło maksimum w badanym zakresie stężeń (Ryc. 5.11). Obserwowano też pojedyncze zdarzenia przesuwania mikrotubul o długości przebiegu nawet 30 μm . Ponadto, długość przebiegu dla stężenia kinezy-1 1.5 nM była niższa ~ 4 razy niż dla 6 nM, a w przypadku 45 nM wartość ta spadła prawie pięciokrotnie w porównaniu do 6 nM. Test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA z korektą Welcha) wykazał, że różnice między długościami przebiegu w zależności od stężenia kinezy-1 są istotne statystycznie ($p < 0.0001$).



Ryc. 5.11 Długość przebiegu przesuwania mikrotubul w funkcji stężenia kinezy-1 (obliczone jako dystrybuanty dla każdego stężenia z Równania 6). Każdy słupek błędu to błąd standardowy (SE)

5.3.2 Czas trwania ruchu mikrotubula-mikrotubula

Przeanalizowano również czas trwania poszczególnych zdarzeń przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie, lecz nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie ($p = 0.92$, test ANOVA z korektą Welcha). Najwyższe wartości obserwowano przy stężeniach 4.5 nM oraz 6 nM kinezy-1 (Ryc. 5.12).

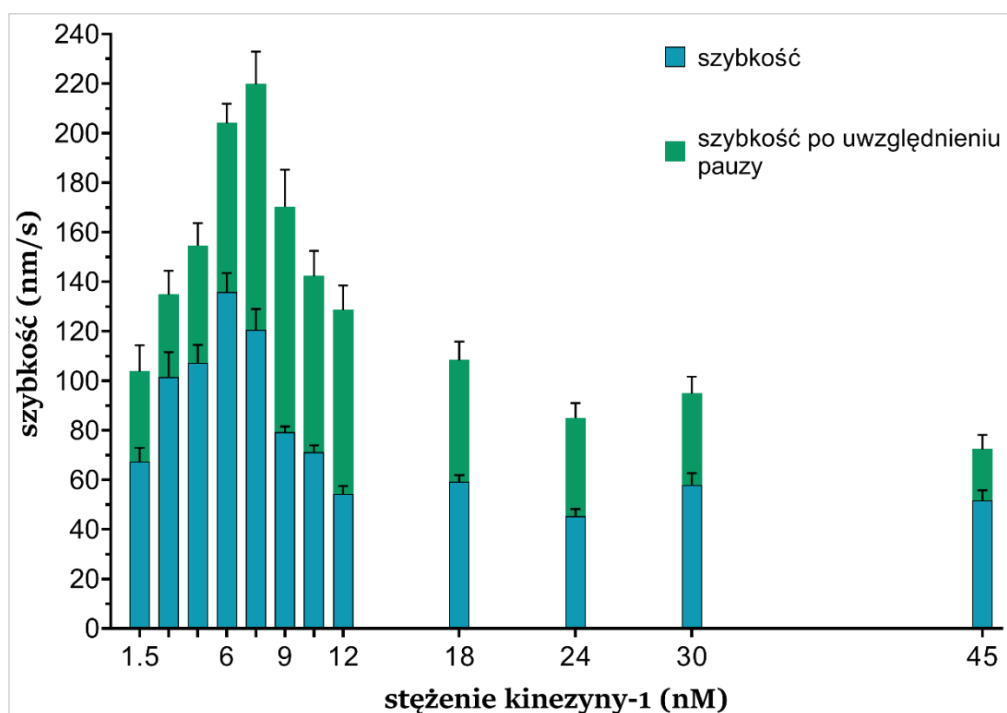


Ryc. 5.12 Zależność czasu trwania przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie od stężenia kinezy-1. Słupki przedstawiają średnie czasu trwania ruchu dla każdego stężenia, które obliczono z równania dla rozkładu normalnego (Równanie 5). Słupki błędów to błędy standardowe (SE)

5.3.3 Analiza szybkości przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie

Szybkości z każdej grupy stężeń zostały obliczone poprzez podzielenie drogi (długości przebiegu, w nm) przez całkowity czas trwania transportu (s). Natomiast szybkość dla każdego stężenia obliczono za pomocą rozkładu normalnego. Wyniki jednoznacznie wskazują, że najwyższe wartości szybkości występują przy 6 nM kinezy-1, czyli analogicznie jak w przypadku długości przebiegu. Maksimum szybkości – przy 6 nM – wynosi 136 nm/s (Ryc. 5.13). Porównano też szybkości między stężeniem 6 nM i dwoma skrajnymi stężeniami, czyli 1.5 nM i 45 nM. W przypadku 1.5 nM szybkość była ~2 razy mniejsza niż dla 6 nM (odpowiednio 67 nm/s i 136 nm/s), a przy 45 nM kinezy-1 zaobserwowano trzykrotny spadek wartości szybkości (52 nm/s).

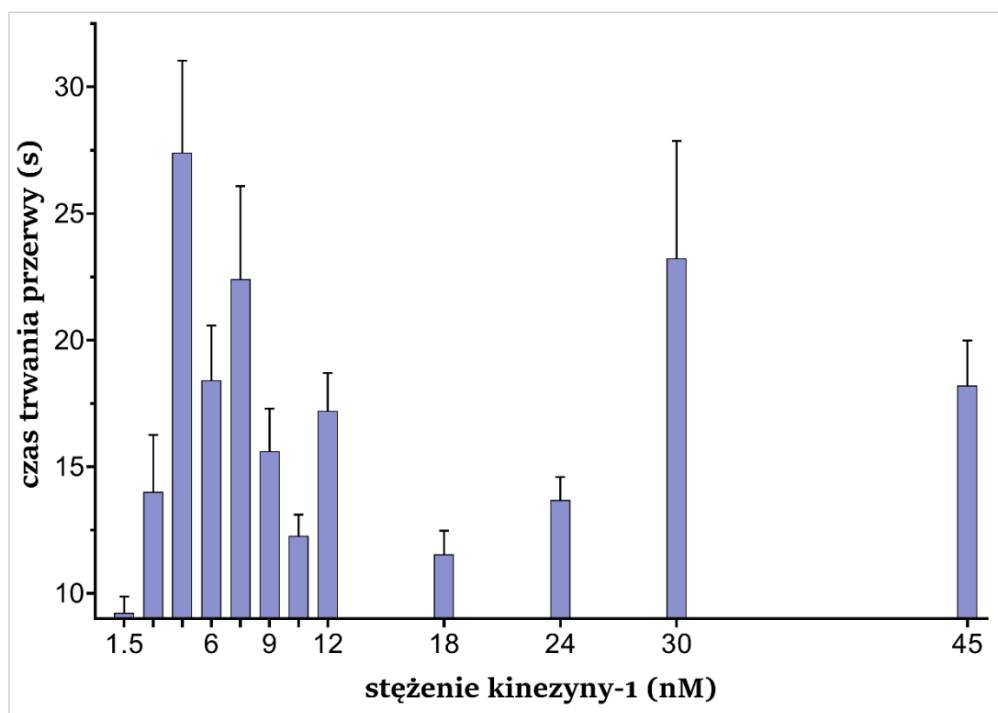
Częstym zjawiskiem podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie były przerwy w transporcie mikrotubul. Porównano więc, jak zmienia się szybkość po uwzględnieniu czasu trwania pauzy (odjęto czas trwania przerwy od całkowitego czasu trwania ruchu). Zgodnie z przewidywaniami, szybkości wzrosły. Ponadto, zaobserwowano przesunięcie maksimum szybkości przesuwania z 6 nM na 7.5 nM (Ryc. 5.13) i wynosiła ona ok. 220 nm/s. Analiza testem ANOVA (z korektą Welcha) wykazała, że różnice szybkości w zależności od stężenia kinezy-1 zarówno z uwzględnieniem przerwy w ruchu, jak i bez, są istotne statystycznie ($p < 0.0001$).



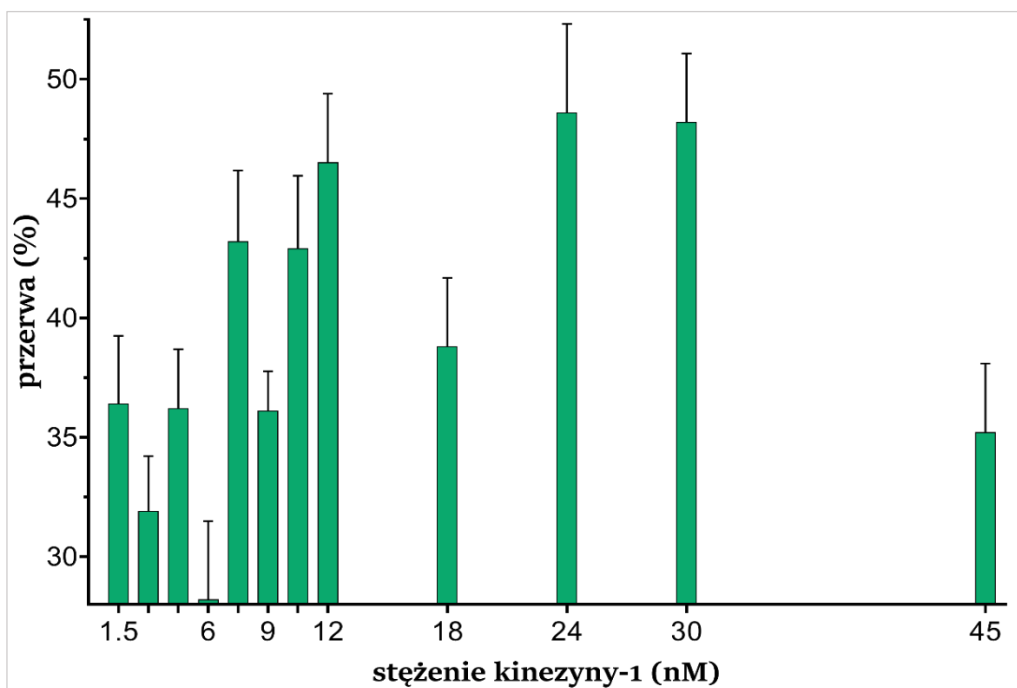
Ryc. 5.13 Zależność szybkości ruchu mikrotubula-mikrotubula od stężenia kinezy-1. Średnie szybkości dla każdego stężenia obliczono z równania dla rozkładu normalnego (Równanie 5). Słupki błędów to błędy standardowe (SE) obliczone dla każdego stężenia osobno

5.3.4 Przerwy podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula

Przesunięcie maksimum szybkości przesuwania z 6 nM na 7.5 nM wskazuje na dłuższe przerwy przy 7.5 nM, a potwierdziły to wyniki analizy długości przerw. W przypadku najkrótszej i najdłuższej przerwy (w sekundach, odpowiednio stężenia 1.5 nM i 4.5 nM) czas i udział procentowy nie pokrywały się, co widać na poniższych wykresach (Ryc. 5.14 i 5.15). Ze względu na to, że poszczególne zdarzenia przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie różniły się od siebie całkowitymi czasami trwania ruchu (Ryc. 5.12), przerwę lepiej opisuje jej procentowy udział w całkowitym czasie trwania danego zdarzenia ruchu mikrotubula-mikrotubula (Ryc. 5.14 i 5.15). Ponadto, test ANOVA (z korektą Welcha) wykazał brak istotności statystycznej dla różnic w długości przerw w sekundach pomiędzy poszczególnymi stężeniami kinezy-1 ($p = 0.13$).



Ryc. 5.14 Czas trwania przerwy (\pm SE) w ruchu a stężenie kinezy-1 (średnie obliczone z Równania 5). Dla ułatwienia obserwacji różnic na wykresie, skala osi y zaczyna się od 9 s

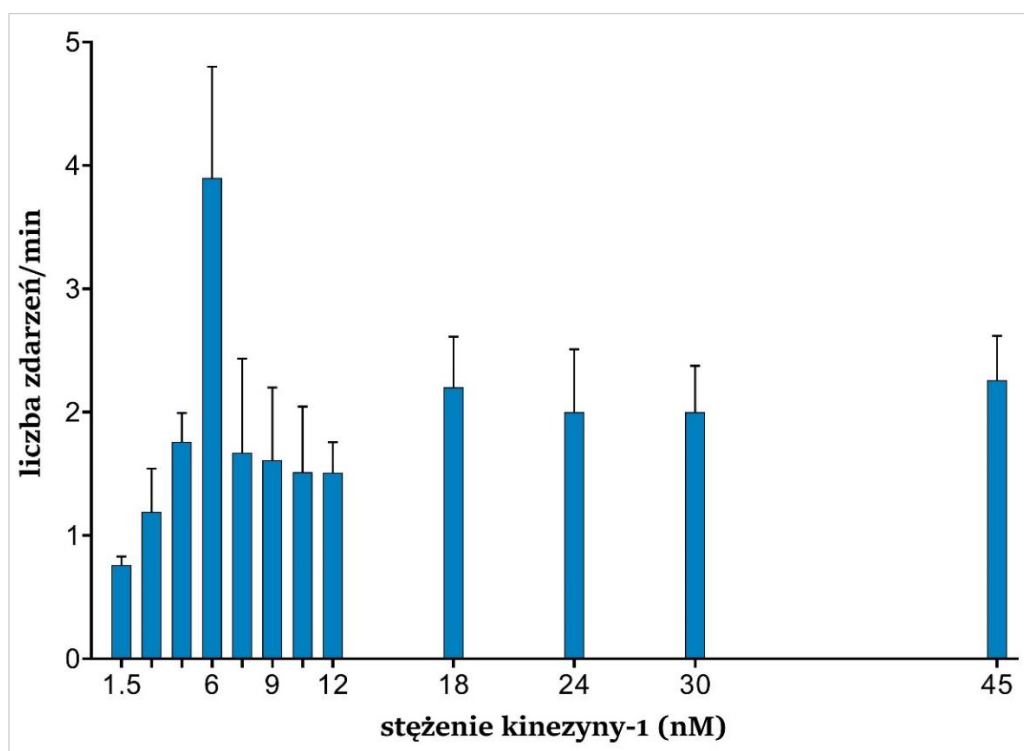


Ryc. 5.15 Przerwa jako procent całkowitego czasu trwania ruchu (średnie obliczone z Równania 5). Dla ułatwienia obserwacji różnic na wykresie, skala osi y zaczyna się od 28%. Każdy słupek błędny to błąd standardowy (SE)

Długość przerwy wyrażona jako procent czasu trwania ruchu nie jest liniowo zależna od stężenia, ale analiza testem ANOVA (z korektą Welcha, w której porównano wszystkie stężenia) wykazała, że obserwowane różnice są istotne statystycznie ($p < 0.0001$). Analizując wykres z Ryc. 5.15 można powiedzieć, że w przypadku większych stężeń kinezy-1 obserwuje się nieco dłuższe przerwy (12, 24 i 30 nM). Jednakże w przypadku 18 i 45 nM te przerwy osiągają wartości podobne lub nawet mniejsze niż w przypadku niższych stężeń kinezy-1 (1.5 – 10.5 nM).

5.3.5 Liczba zdarzeń przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie a stężenie kinezy-1

W trakcie nagrywania filmów z kolejnymi stężeniami trudno było nie zauważyć, że przy niektórych stężeniach przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie było obserwowane o wiele częściej (zob. Film 03). Największa częstotliwość ruchu mikrotubula-mikrotubula wystąpiła przy stężeniu 6 nM (~4 zdarzenia/min, Ryc. 5.16), co pokrywa się z wartościami maksimum uzyskanymi w analogicznej analizie szybkości oraz długości przebiegu (podrozdziały 5.3.1 i 5.3.3). Zaobserwowane różnice są istotne statystycznie ($p = 0.0002$, test ANOVA z korektą Welcha).



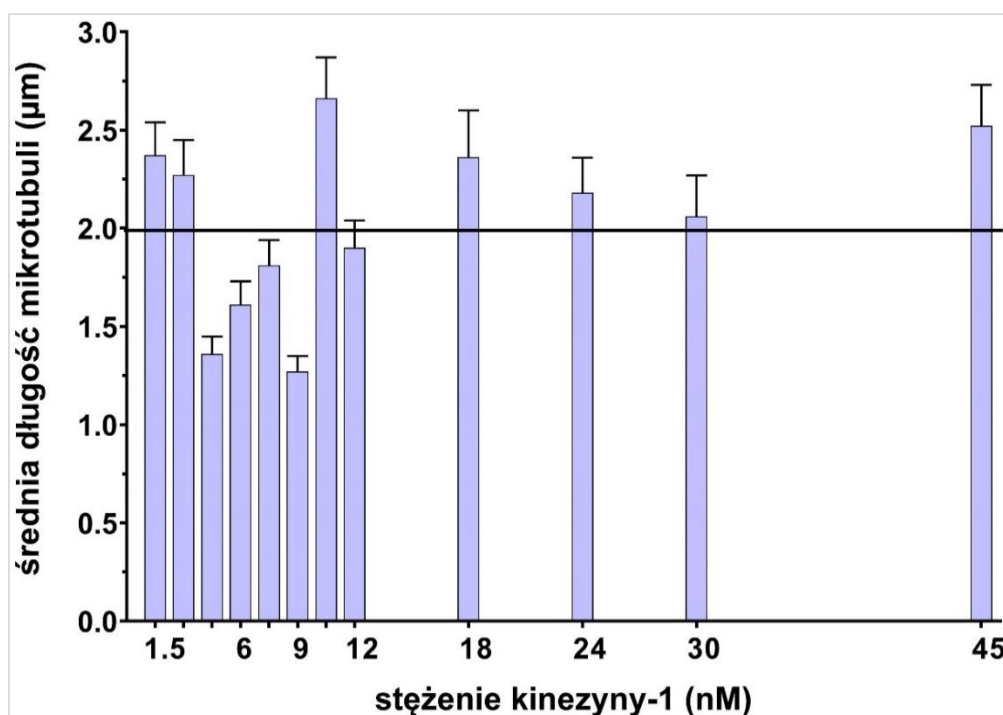
Ryc. 5.16 Liczba zdarzeń przesuwania mikrotubul względem siebie (na minutę) a stężenie kinezy-1. Wykres przedstawia, ile razy średnio w trakcie 1-minutowego filmu obserwowano ruch dwóch mikrotubul względem siebie. Liczby zdarzeń dla wszystkich stężeń kinezy-1 obliczono osobno za pomocą mediany, słupki błędów to błędy standardowe (SE)

5.4 Wpływ długości mikrotubul na parametry przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie

Szybkość oraz długość przebiegu kinezy-1 zmniejszają się wraz ze wzrostem wielkości ładunku, co zostało udowodnione m.in. *in vitro* za pomocą pułapki optycznej (Visscher i wsp., 1999; Guo i wsp., 2019). Ma to swoje odzwierciedlenie w transporcie ładunków *in vivo*, w komórkach, gdzie np. pęcherzyki są transportowane z szybkością ok. $1 \mu\text{m/s}$ (Reis i wsp., 2012; Lim i wsp., 2017), a większe od nich i cięższe mitochondria $0.6 \mu\text{m/s}$ (Niescier i wsp., 2016), przy czym szybkość zależy też od tego ile motorów bierze udział w transporcie. Chociaż mikrotubula ma inny kształt niż pęcherzyk lub mitochondrium, sprawdzono czy istnieje zależność między długością mikrotubul ładunkowych w ruchu mikrotubula-mikrotubula a badanymi parametrami ruchu.

Najpierw obliczono średnią długość mikrotubul ładunkowych dla wszystkich stężeń kinezy-1 analizowanych razem – bez podziału na stężenia, która wynosi $2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ($n = 480$, $SD = 1.3 \mu\text{m}$), a następnie wyznaczono średnie długości mikrotubul dla każdego stężenia kinezy-1 osobno (Ryc. 5.17) za pomocą Równania 5 dla rozkładu normalnego. Pomimo tego, że eksperymenty były wykonywane za każdym razem identycznie (podrozdział 4.8.8), to w przypadku stężeń $4.5 - 9 \text{ nM}$ wykazano, że średnia długość

mikrotubul jest mniejsza niż w przypadku pozostałych stężeń, a zarazem mniejsza niż średnia długość obliczona dla całej populacji próbek. Możliwości są dwie: albo w zakresie stężenia kinezy-1 4.5 – 9 nM preferowany był transport krótszych mikrotubul, albo ta zależność była przypadkowa. Jednakże, mniej więcej dla tego zakresu stężeń kinezy-1 (dokładnie 4.5 – 7.5 nM) uzyskano największe wartości szybkości i długości przebiegu w ruchu mikrotubula-mikrotubula (podrozdział 5.3.1 i 5.3.3). W przypadku pozostałych stężeń kinezy, średnie długości mikrotubul ładunkowych są większe niż wartość średnia dla całej populacji lub znajdują się w zakresach błędów standardowych (Ryc. 5.17, czarna linia).



Ryc. 5.17 Średnie długości mikrotubul ładunkowych obliczone z Równania 5 dla rozkładu normalnego. Dla każdego stężenia $n = 40$, a słupki błędów to błędy standardowe. Czarna linia oznacza średnią odczytaną z rozkładu normalnego dla całego zakresu stężeń kinezy-1 (1.5 – 45 nM)

W celu wyznaczenia zależności między długością mikrotubuli ładunkowej a parametrami ruchu mikrotubula-mikrotubula obliczono współczynniki korelacji zarówno liniowej (Pearsona), jak i nieliniowej (Spearmana). Analiza korelacji wykonana dla całej populacji próbek (stężenia kinezy-1 1.5 – 45 nM, $n = 480$) nie wykazały nawet słabej zależności między długością mikrotubul ładunkowych a parametrami ruchu. Jednakże, zależności obserwowano w przypadku osobno analizowanych stężeń kinezy-1 ($n = 40$ dla każdego stężenia z zakresu 1.5 – 45 nM kinezy-1), a także dla zakresu stężeń z najwyższymi średnimi wartościami szybkości i długości przebiegu (4.5 – 7.5 nM). W Tab. 5.1 wyszczególniono stężenia kinezy-1, w przypadku których

obliczenia wskazują na przynajmniej słabą zależność istotną statystycznie ($p < 0.05$). W przypadku większości stężeń wykazano zależność dla długości przebiegu (Tab. 5.1), ale pozytywną, co oznacza, że wraz ze wzrostem długości mikrotubul ładunkowych wzrasta długość przebiegu. Dla stężenia 7.5 nM jest to nawet zależność umiarkowana (Tab. 5.1). Wykazano też słabą zależność pozytywną między długością mikrotubuli a czasem trwania ruchu mikrotubula-mikrotubula (Tab. 5.1) dla stężeń 6 oraz 7.5 nM.

Tab. 5.1 Korelacje między długością mikrotubul ładunkowych a parametrami ruchu mikrotubula-mikrotubula dla wszystkich badanych stężeń kinezy-1 analizowanych indywidualnie

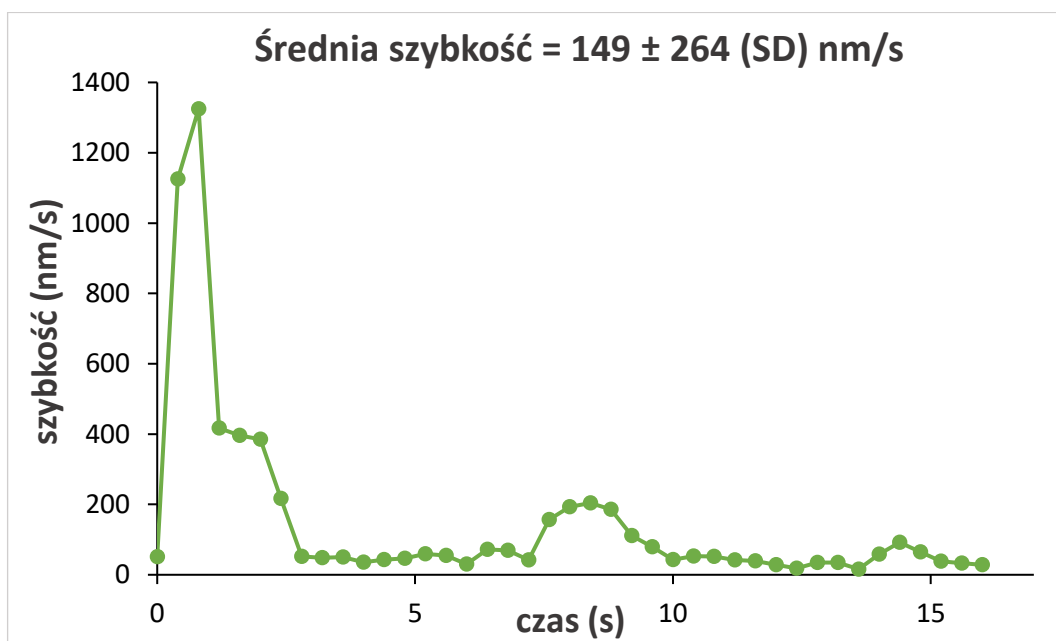
Zależność liniowa (współczynnik korelacji Pearsona)	Stężenia kinezy-1 (nM)
Długość przebiegu – słaba zależność pozytywna (0.3 – 0.49)	4.5, 6, 9, 12, 24, 45
Długość przebiegu – <u>umiarkowana</u> zależność pozytywna (0.5 – 0.69)	7.5
Czas trwania ruchu – słaba zależność pozytywna (0.3 – 0.49)	6, 7.5
Zależność nieliniowa (współczynnik korelacji Spearmana)	Stężenia kinezy-1 (nM)
Szybkość ruchu – słaba zależność pozytywna (0.3 – 0.49)	1.5, 4.5, 12, 24
Szybkość ruchu po uwzględnieniu przerw – słaba zależność pozytywna (0.3 – 0.49)	10.5, 12, 18, 24

Dla niektórych stężeń kinezy-1 wykazano słabą zależność nieliniową (Spearmana) między długością mikrotubuli ładunkowej a szybkością przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie oraz szybkością po uwzględnieniu przerw w ruchu (Tab. 5.1). W tym przypadku jest to również zależność pozytywna, która wskazuje, że wraz ze wzrostem długości mikrotubuli ładunkowej szybkości wzrastają. Obliczone korelacje są słabe, więc długość mikrotubuli ładunkowej nie ma znaczącego wpływu na parametry ruchu

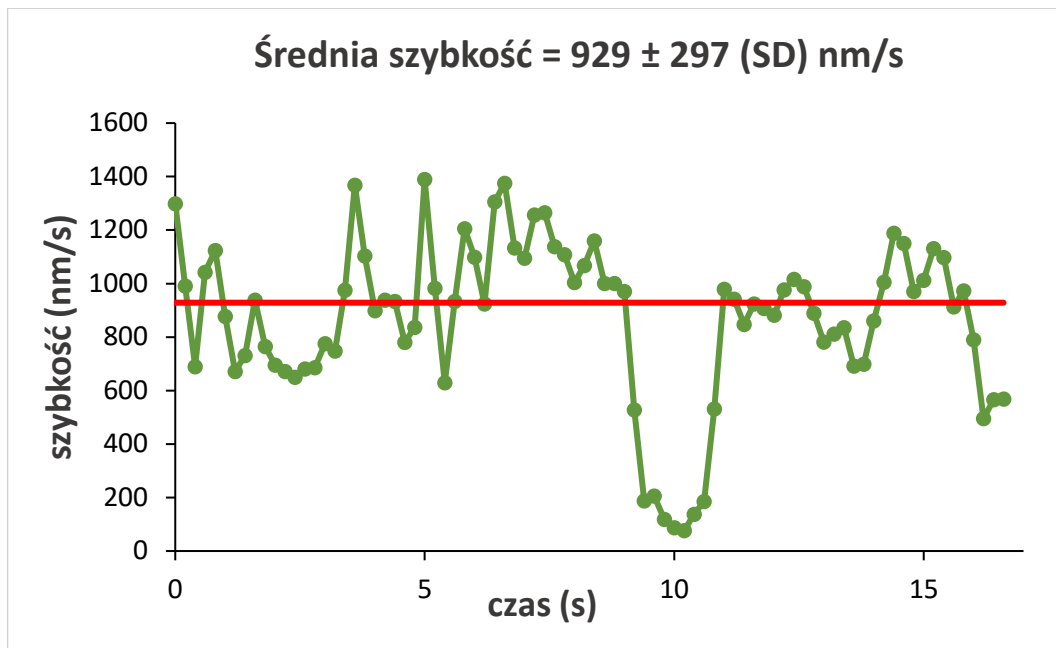
mikrotubula-mikrotubula. Wyjątek stanowi umiarkowana zależność dla długości przebiegu w przypadku stężenia 7.5 nM kinezy-1 (Tab. 5.1).

5.5 Fluktuacje szybkości transportu mikrotubul oraz przerwy w ruchu w teście przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1

Doświadczenia pokazały, że transport mikrotubul podczas testu przesuwania wykazuje duże wahania w szybkości, która może wynosić w jednym momencie ok. 1300 nm/s, a w następnym spada do ok. 400 nm/s albo prawie do 0 (Ryc. 5.18). Te wahania w szybkości znajdują odzwierciedlenie w wartości odchylenia standardowego wyliczonego dla jednej mikrotubuli, które jest wyższe niż mediana szybkości (Ryc. 5.18). Amplituda szybkości dla wybranej mikrotubuli transportowanej przez kinezynę-1 wynosiła ok. 1300 nm/s (Ryc. 5.18). W przypadku testu gliding wahania szybkości również występowały (Ryc. 5.19), co było obserwowane także przez innych badaczy (Tjioe i wsp., 2019). Różnica między testem gliding, a testem przesuwania mikrotubul polega na tym, że w przypadku gliding przeważają wyższe szybkości, a niskie są w mniejszości (Ryc. 5.19) (por. Film 01 oraz Film 03). Z kolei w teście przesuwania mikrotubul jest na odwrót i dominują niższe szybkości (Ryc. 5.18). Porównania z niniejszego podrozdziału dokonano w odniesieniu do ogółów populacji próbek z obu testów.



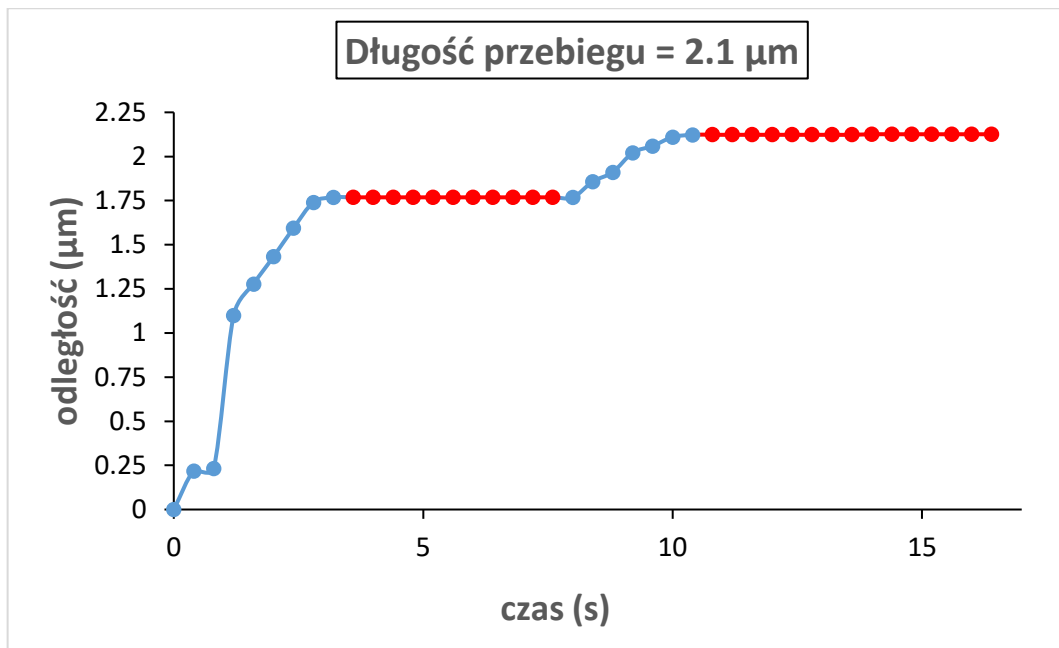
Ryc. 5.18 Szybkość w funkcji czasu podczas testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 (6 nM), wykres dla jednej mikrotubuli ładunkowej. Dla początkowego fragmentu 0 – 3 s średnia wynosi 496 nm/s (SD = 445), a dla odcinka od 3 s do końca średnia szybkość wynosi 65.3 nm/s (SD = 48.9). Za wartości średnie przyjęto mediany



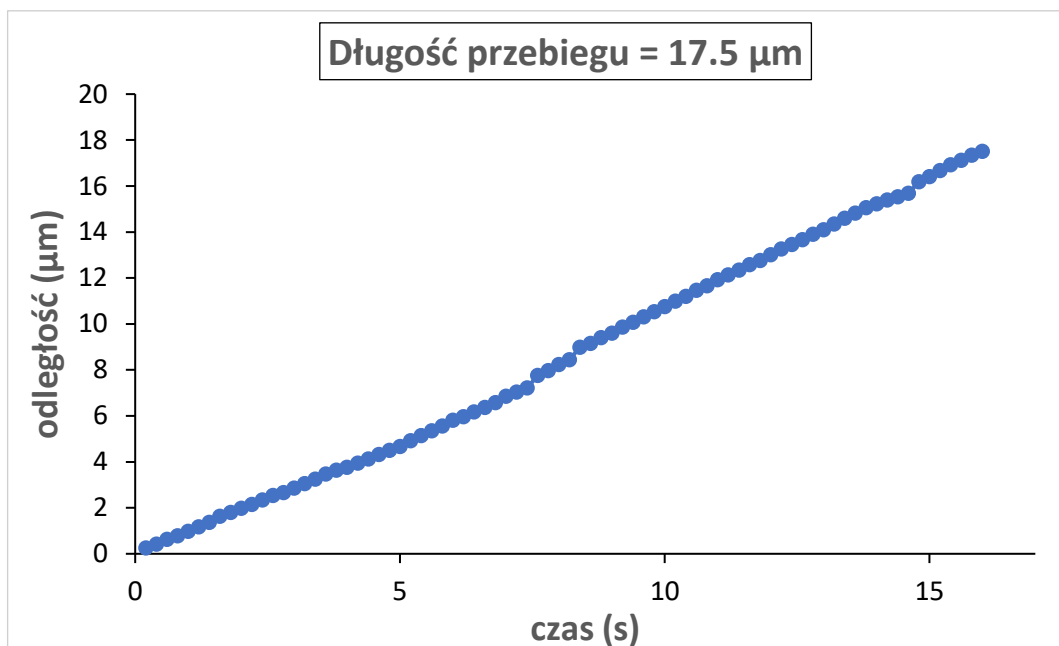
Ryc. 5.19 Przykładowe wahania szybkości w funkcji czasu w teście gliding dla jednej mikrotubuli transportowanej przez kinezyne-1 (50 nM). Czerwona linia pokazuje szybkość średnią. Średnia dla fragmentu z niższą szybkością to 143 nm/s (SD = 47.7), a po oddzieleniu punktów z niższą szybkością wynosi 933 nm/s (SD = 210). Za wartości średnie przyjęto mediany

Przerwy obserwowane podczas transportu jednej mikrotubuli wzdłuż drugiej, unieruchomionej, dotyczyły 97% analizowanych zdarzeń przesuwania mikrotubuli. Przerwa zajmowała ok. 30% czasu trwania ruchu w przypadku stężeń kinezyne-1 4.5 – 7.5 nM. W teście gliding przerwy zdarzały się rzadziej (30% przypadków) i stanowiły niewielki ułamek całkowitego czasu trwania ruchu (3.4%).

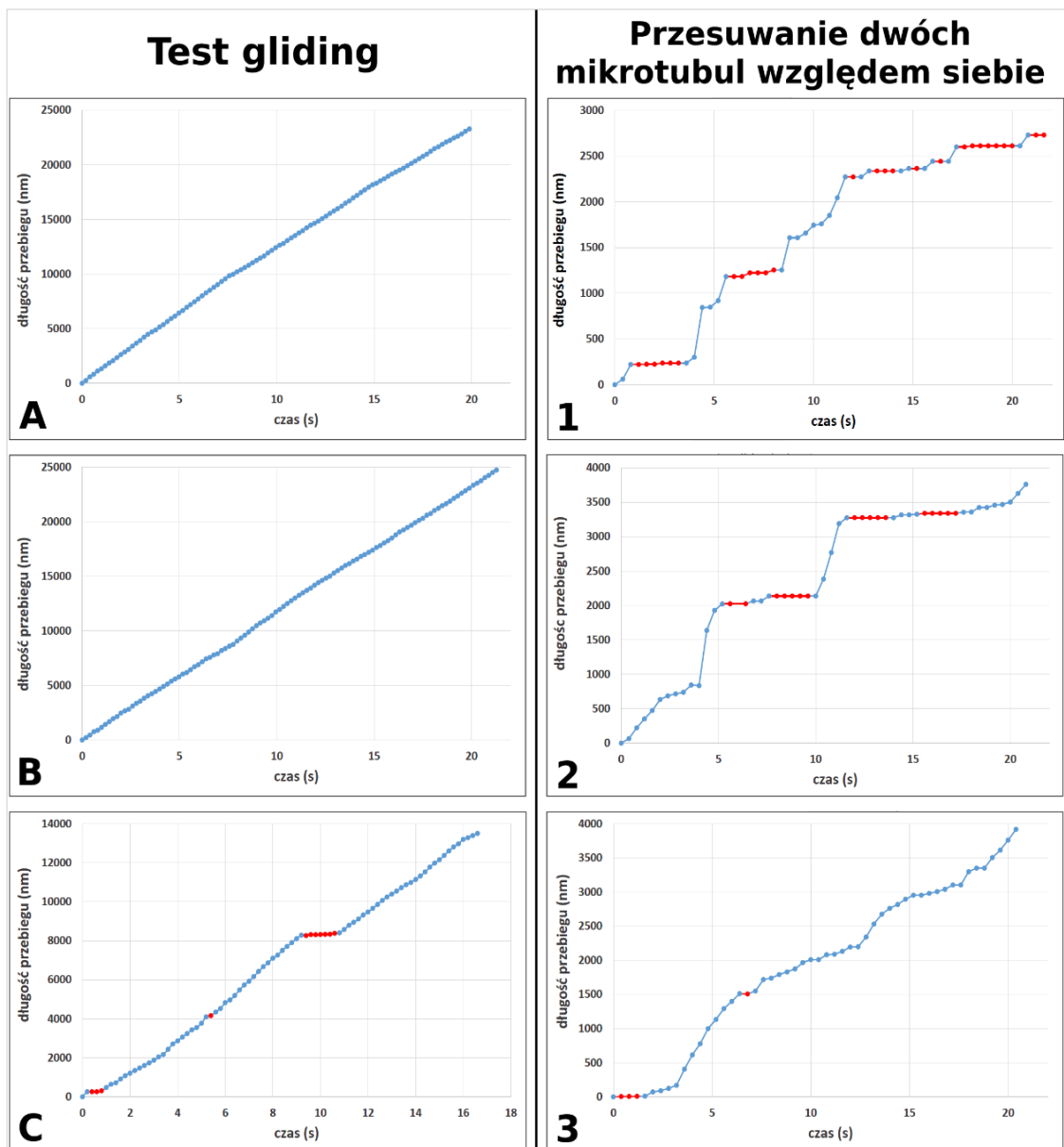
Przerwy w transporcie jednej mikrotubuli wzdłuż drugiej przez kinezyne-1 są wyraźnie widoczne na wykresie przedstawiającym odległość w funkcji czasu, a zaznaczono je na czerwono (Ryc. 5.20). Przerwy w transporcie wybranej mikrotubuli z Ryc. 5.20 trwały łącznie ok. 10 s, co stanowiło ponad 60% czasu trwania ruchu. Obecność przerw sprawia, że wykresy długości przebiegu w funkcji czasu dla testu przesuwania dwóch mikrotubul mają kształt schodkowy, odmienny od większości analogicznych wykresów z testu gliding (por. Ryc. 5.20, 5.21 i 5.22), w którym 70% badanych przypadków miała wykres długości przebiegu o kształcie linii prostej (Ryc. 5.21 i 5.22, panele A i B). W pozostałych 30% zdarzały się przerwy, ale były one krótkie (Ryc. 5.22, panel C).



Ryc. 5.20 Odległość pokonana przez przykładową mikrotubulę podczas testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 (6 nM) w funkcji czasu. Długość przebiegu na wykresie to wartość maksymalnej odległości, na jaką była transportowana wybrana mikrotubula



Ryc. 5.21 Odległość pokonana przez przykładową mikrotubulę transportowaną przez kinezyne-1 (50 nM) podczas testu gliding w funkcji czasu. Długość przebiegu na wykresie to wartość maksymalnej odległości, na jaką była transportowana wybrana mikrotubula

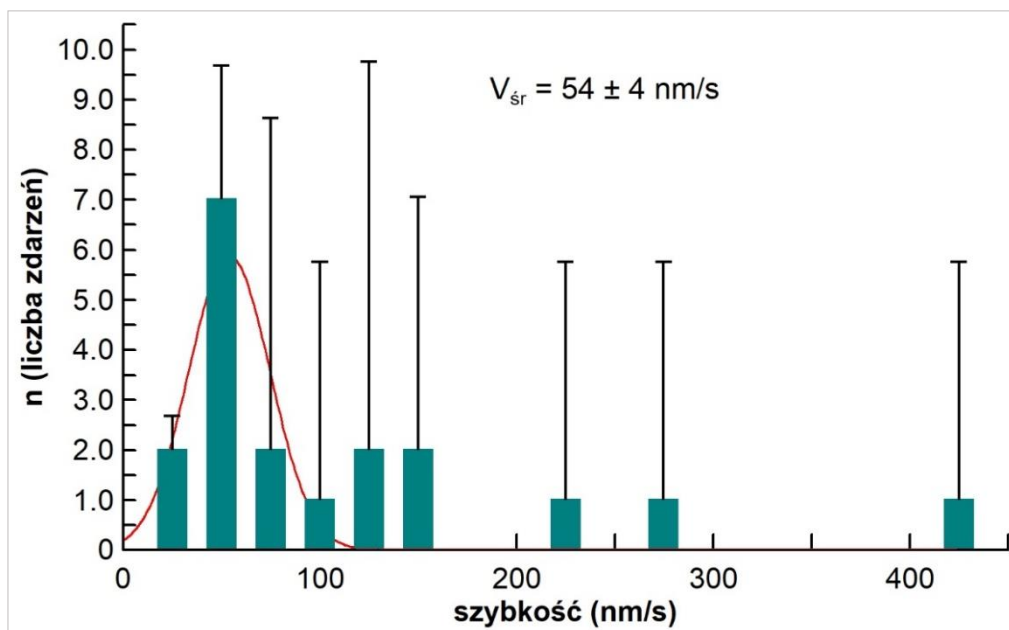


Ryc. 5.22 Wybrane przykłady wykresów długości przebiegu dla testu gliding i przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie obrazujące różnice między tymi dwoma testami. Czerwonym kolorem zaznaczono przerwy w ruchu

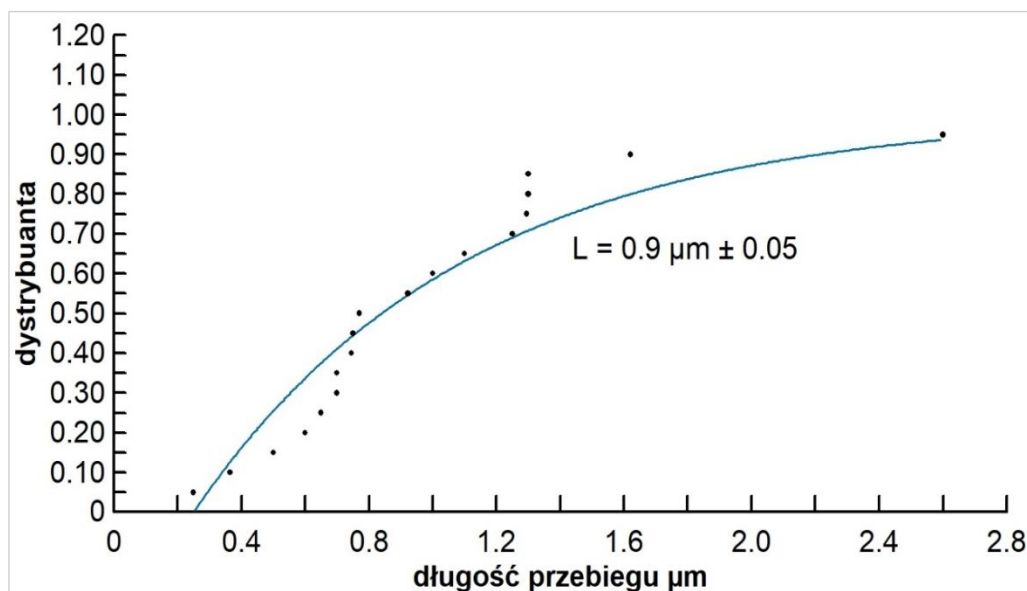
5.6 Wpływ elastycznego zawiasu-2 kinezy-1 w ruchu mikrotubula-mikrotubula

Friedman i Vale'a (1999), pokazali, że elastyczny nieustrukturyzowany region ogona kinezy oddziałuje z domenami motorycznymi w obrębie tej samej cząsteczki, w której konieczne jest mechaniczne zgięcie cząsteczki (w obrębie zawiasu-2) i oddziaływanie główki z ogonem, co skutkuje wystąpieniem zjawiska autoinhibicji (podrozdział 1.2.5). Delecja zawiasu-2 (aminokwasów 505-610) powoduje zwiększenie szybkości w teście ruchliwości pojedynczych cząsteczek ~ 3 razy, zwiększenie częstości zdarzeń procesywnego ruchu cząsteczek przynajmniej ~ 5 razy, ale też obniża długość przebiegu ~ 2 razy (Friedman i Vale, 1999). Pierwotnie założono, że mutant kinezy-1 pozbawiony

zawiasu-2 będzie bardziej „efektywny” w przesuwaniu dwóch mikrotubul względem siebie, szczególnie ze względu na eliminację zjawiska autoinhibicji. Testy przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przeprowadzono analogicznie jak w przypadku kinezy-1 pełnej długości typu dzikiego (procedura w podrozdziale 4.8.8). Jednakże, eksperymenty z użyciem kinezy-1 bez zawiasu-2 pokazały, że motor ten miał 5 razy mniejszą długość przebiegu (por. 5.3.1 i Ryc. 5.24; $p < 0.0001$), natomiast nie zaobserwowano różnic w szybkości dla porównywanego stężenia obu motorów (12 nM, por. 5.3.3 i Ryc. 5.23). Dodatkowo, obliczono, jaki procent mikrotubul, z którymi oddziaływały cząsteczki kinezy-1 uczestniczył w ruchu mikrotubula-mikrotubula. W przypadku 12 nM kinezy-1 bez zawiasu-2 tylko ok. 10% związanych mikrotubul było transportowanych. Natomiast kinezy-1 pełnej długości przesuwała względem siebie ok. 60% mikrotubul (12 nM), z którymi wchodziła w interakcje. Wspomniane wyżej różnice widać na Filmie 04 załączonym do niniejszej rozprawy, w którym porównano ruch mikrotubula-mikrotubula przez kinezynę-1 pełnej długości i jej wariant bez zawiasu-2.

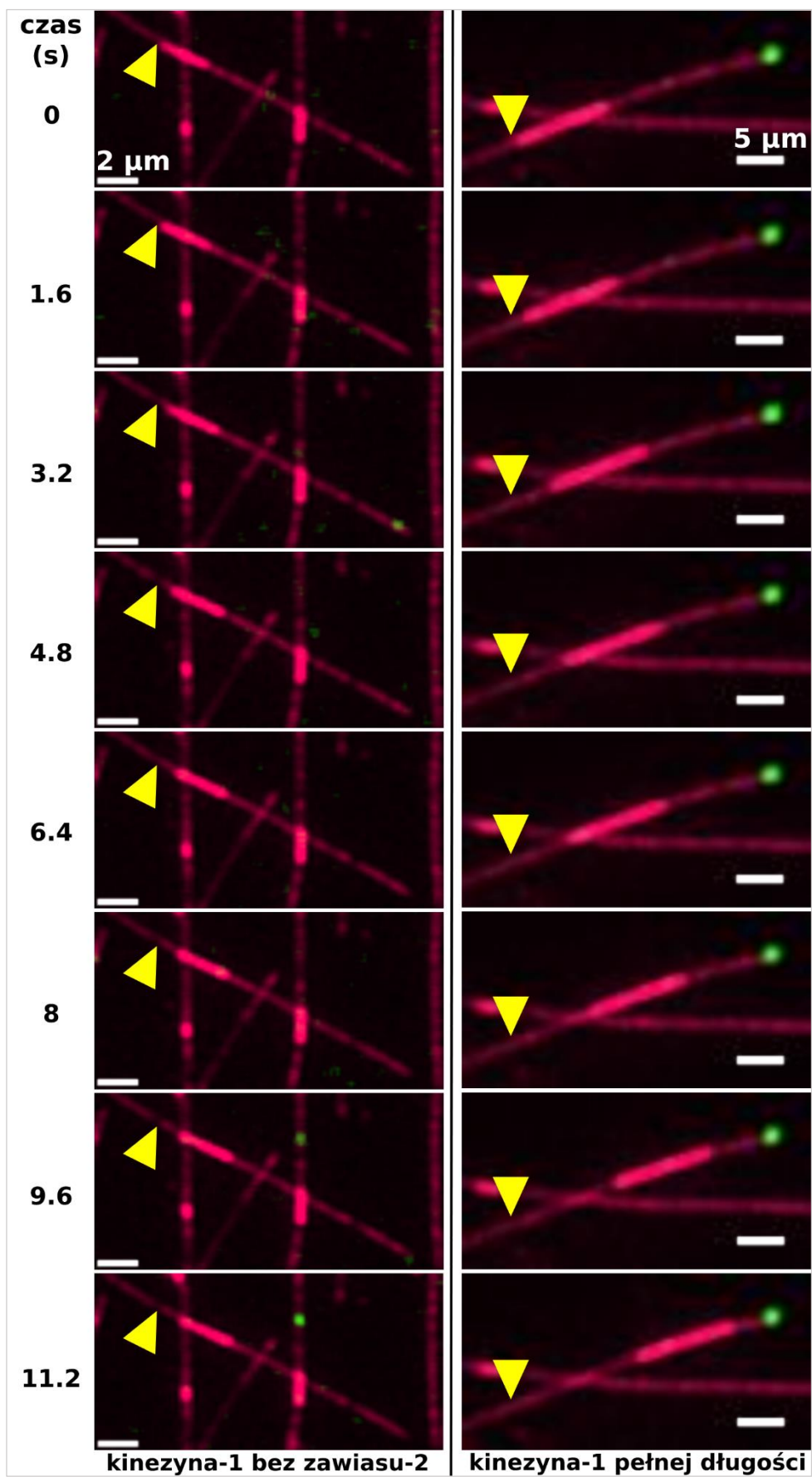


Ryc. 5.23 Wykres szybkości przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 bez zawiasu-2 (12 nM) z dopasowaniem krzywej rozkładu normalnego. $V_{sr} = 54 \pm 4$ nm/s to średnia szybkość obliczona z Równania 5; $n = 19$; $SD = 102$; Słupki błędów to błędy standardowe (SE) obliczone dla każdego zakresu szybkości

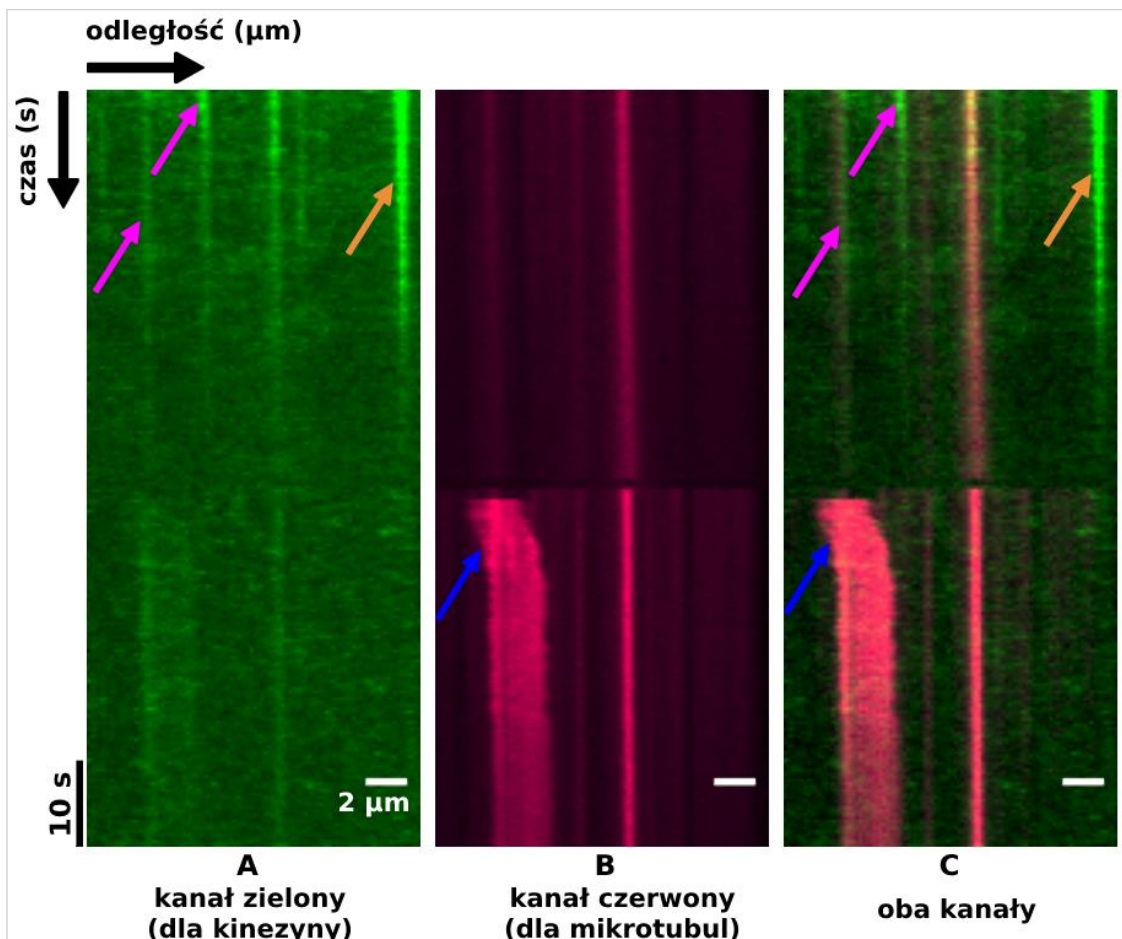


Ryc. 5.24 Dystrybuanta długości przebiegu mikrotubul transportowanych przez kinezyne-1 bez zawiasu-2. Stężenie kinezyne-1 wynosiło 12 nM. Długość przebiegu (L) obliczona z Równania 6 wynosiła $0.9 \pm 0.05 \mu\text{m}$, $n = 19$ mikrotubul; $SD = 0.53 \mu\text{m}$

Ryc. 5.25 zawiera porównanie ruchu mikrotubula-mikrotubula generowanego przez kinezyne-1 bez zawiasu-2 oraz kinezyne-1 pełnej długości. Wyraźnie widać, że delecja zawiasu-2 obniża długość przebiegu. W wybranym przypadku transportu, kinezyne-1 bez zawiasu-2 z Ryc. 5.25 transportowała mikrotubulę ładunkową na odległość ok. $0.6 \mu\text{m}$, a kinezyne-1 pełnej długości na ok. $3 \mu\text{m}$. Na Ryc. 5.25 widać niewiele cząsteczek kinezyne-1, ponieważ większość z nich wyświeciła się, a wybrano klatki z końcowej części filmu. Wyświecanie cząsteczek kinezyne-1 widać też na kimografie (Ryc. 5.26, strzałki różowe i pomarańczowe).



Ryc. 5.25 Wybrane klatki z filmów przedstawiających przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyznę-1 bez zawiasu-2 oraz kinezyznę-1 pełnej długości. Stężenia obu kinezyzn wynosiły po 12 nM. Żółtymi trójkątami zaznaczono miejsce startu mikrotubuli ładunkowej

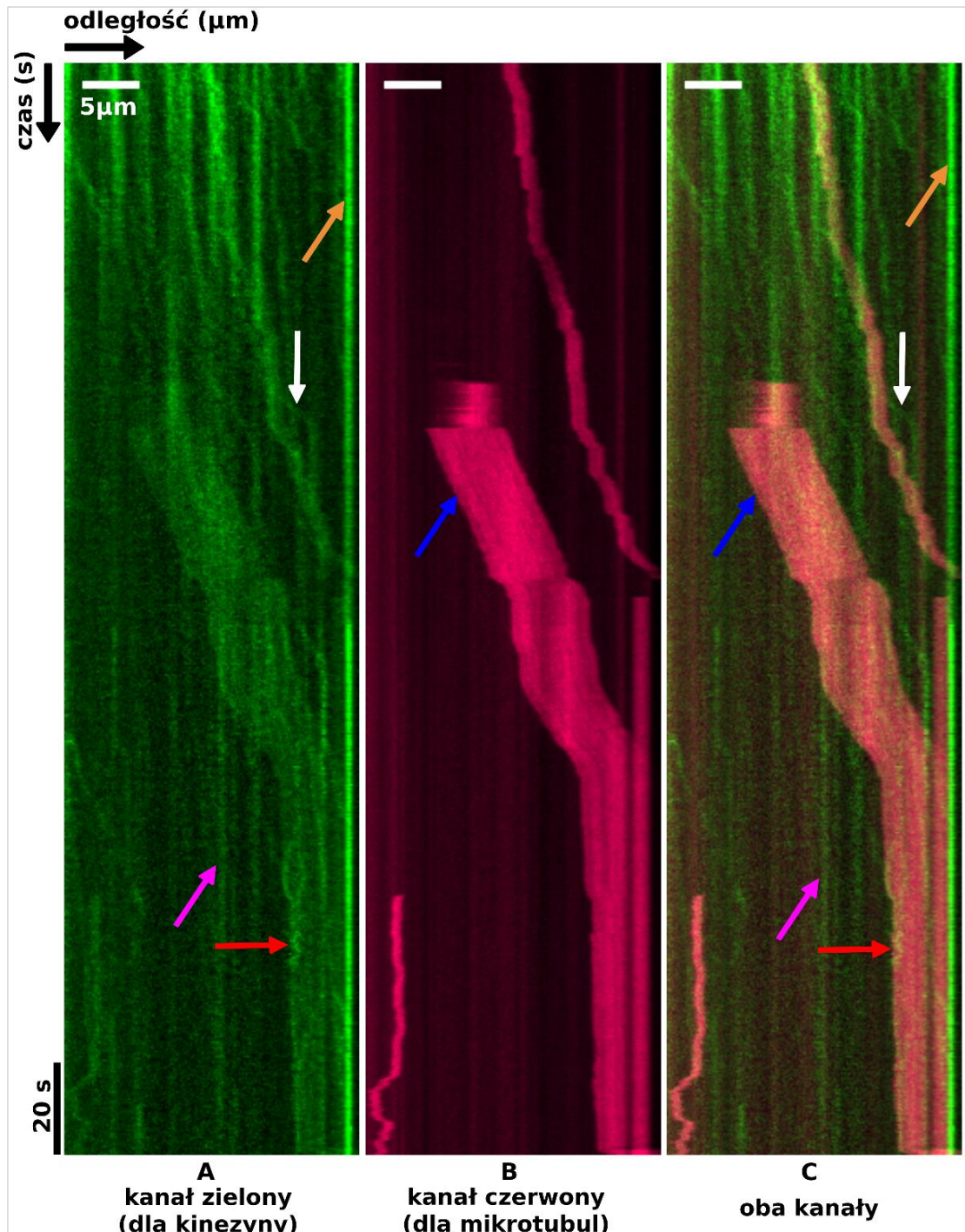


Ryc. 5.26 Kimograf obrazujący ruch mikrotubula-mikrotubula przez kinezynę-1 bez zawiasu-2 (12 nM). Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyny unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyny nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, niebieskie – przemieszczenie mikrotubuli ładunkowej

Kimografy (Ryc. 5.26 i 5.27) pokazują zarówno przemieszczenie mikrotubuli ładunkowej (oś oznaczona jako „odległość”), jak i ruch kinezyn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej lub jego brak. W tym przypadku również widać różnice między kinezynami. Kiedy kinezyna-1 pozbawiona zawiasu-2 przesuwiała mikrotubule to najczęściej była przyłączona przez ogon do mikrotubuli stacjonarnej, co wnioskuję m.in. na podstawie Ryc. 5.26, na którym widać transport mikrotubuli, ale procesywnego ruchu kinezyny wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej już nie. Wobec tego, może tu zachodzić podobna sytuacja jak w teście gliding, gdzie unieruchomione przez ogony kinezyny oddziałują z mikrotubulami przez domeny motoryczne (podrozdział 4.8.6). Jednakże, obserwowano procesywny ruch kinezyny-1 bez zawiasu-2 po mikrotubuli, ale niezależnie od przesuwania mikrotubul względem siebie.

Ryc. 5.27 pokazuje generację ruchu mikrotubula-mikrotubula przez kinezynę-1 pełnej długości. W tym przypadku przesuwaniu mikrotubul towarzyszył procesywny ruch kinezyn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej. Był też możliwy ruch mikrotubula-

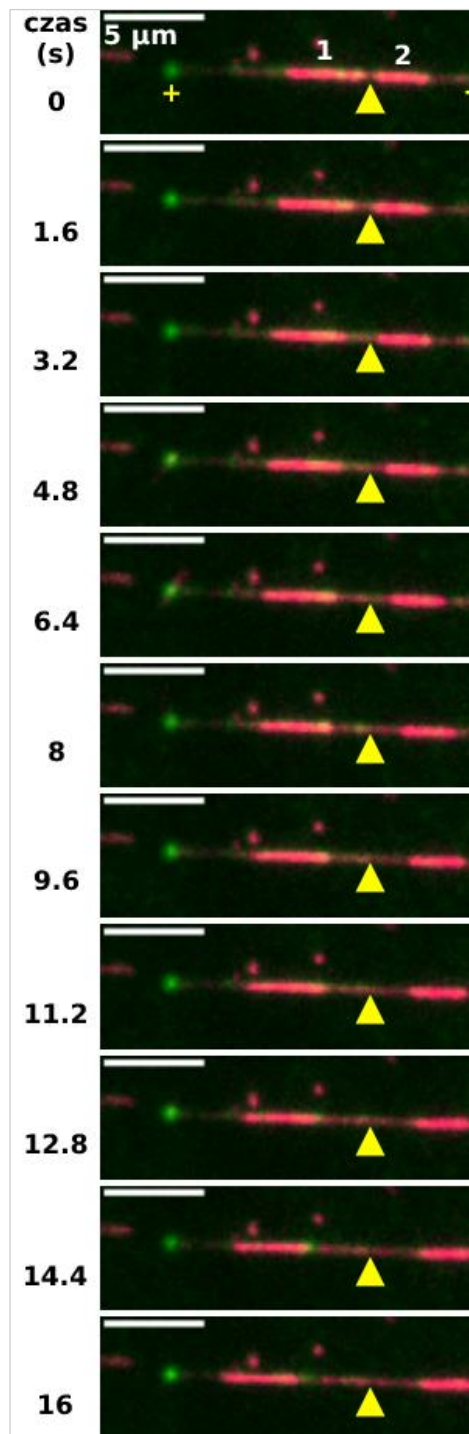
mikrotubula, w którym kinezyiny były związane ogonami do mikrotubuli stacjonarnej (analogicznie jak w przypadku kinezyiny bez zawiasu-2). Jednakże, nie zauważono żeby jeden z opisanych sposobów przesuwania mikrotubul względem siebie występował częściej od drugiego w przypadku kinezyiny pełnej długości.



Ryc. 5.27 Kimograf – przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 pełnej długości (12 nM). Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyiny unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyiny nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, białe – procesywny ruch kinezyn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, czerwone – dyfuzję cząsteczek kinezyiny-1, niebieskie – przemieszczenie mikrotubuli ładunkowej

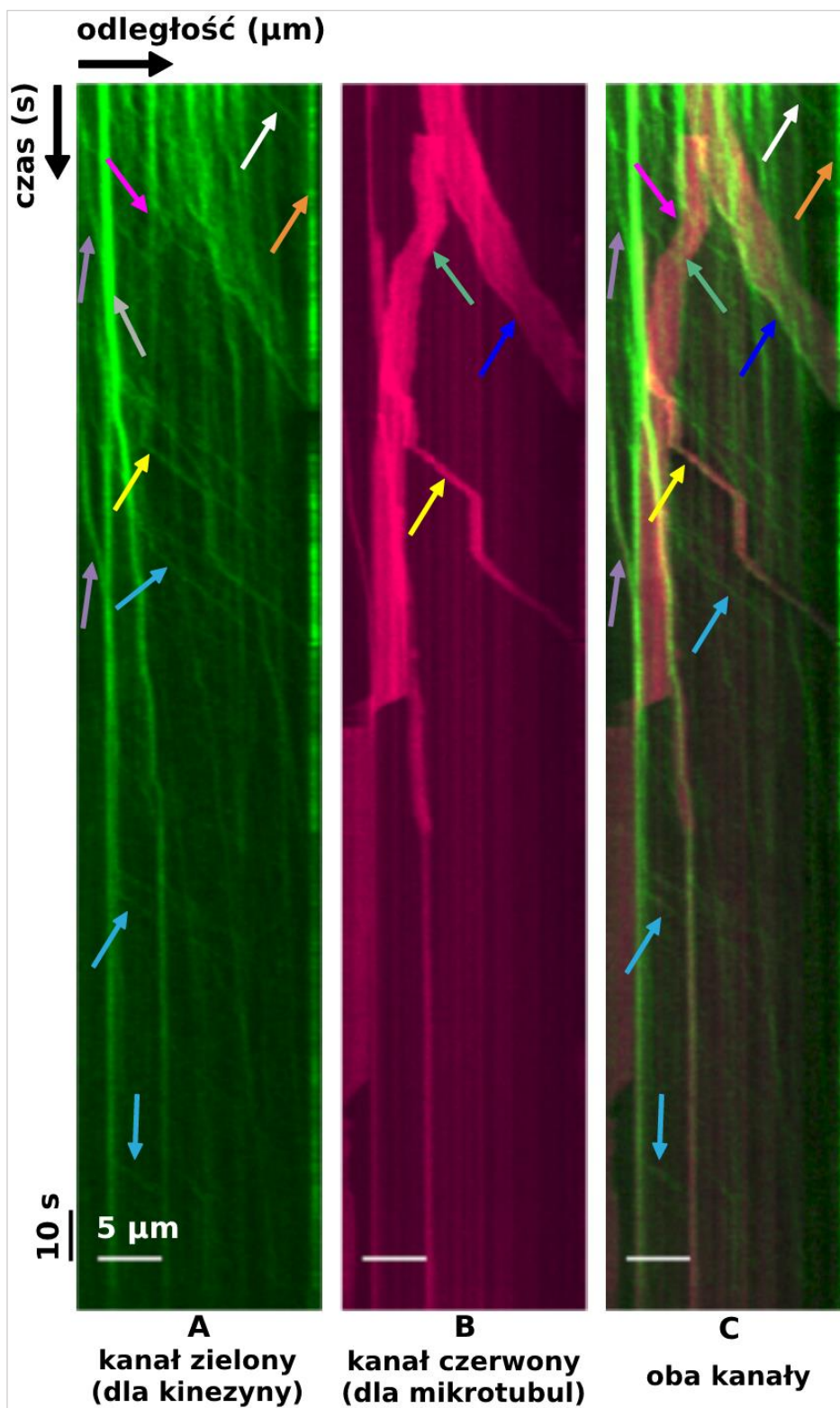
5.7 Kierunek transportu mikrotubul przez kinezynę-1 podczas testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie

Kinezyrna-1 może poruszać się tylko w stronę końca plus mikrotubuli. Podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula zaobserwowano, że mikrotubule ładunkowe przemieszczały się zarówno w stronę końca plus, jak i minus. Film 05 pokazuje przykład transportu dwóch mikrotubul ładunkowych w przeciwne strony mikrotubuli stacjonarnej przez kinezynę-1. Transport mikrotubul ładunkowych w kierunku końca minus mikrotubuli stacjonarnej nie był zjawiskiem wyjątkowym, dla zakresu stężeń kinezyny-1 4.5 – 7.5 nM stanowił ~34% wszystkich zdarzeń ruchu mikrotubula-mikrotubula ($n = 120$). Ryc. 5.28 przedstawia transport dwóch mikrotubul ładunkowych wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej przez kinezynę-1, przy czym mikrotubula nr 1 przemieszczała się w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej, a mikrotubula nr 2 w kierunku końca minus. Na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej wyraźnie widać nagromadzone cząsteczki kinezyny-1 (Ryc. 5.28).



Ryc. 5.28 Wybrane klatki z filmu przedstawiającego ruch mikrotubula-mikrotubula generowany przez kinezynę-1 (3 nM). Żółtymi trójkątami zaznaczono miejsce startu obu mikrotubul ładunkowych. Końce mikrotubuli stacjonarnej zaznaczono symbolami „+” i „-” w pierwszej klatce (czas 0)

Uzupełnieniem montażu z Ryc. 5.28 jest kimograf z Ryc. 5.29, który pozwala zarówno na analizę ruchu mikrotubul, jak i cząsteczek kinezyny-1. Dodatkowo zakres czasu ruchu jest inny, montaż ogranicza się do wybranych 16 sekund transportu, kimograf z kolei obrazuje zjawiska ruchu, które wystąpiły w trakcie całego filmu (240 s).



Ryc. 5.29 Kimograf pokazujący przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 (3 nM) z tego samego obszaru co montaż na Ryc. 5.28. Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyzny unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyzny nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, białe – procesywny ruch kinezyn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, szare – grupa cząsteczek kinezyzny-1 na mikrotubuli, jasnofioletowe – dołączenie kroczących cząsteczek kinezyzny-1 do grupy, błękitne – cząsteczki kinezyzny-1, które wydostały się z obszaru grupy i poruszały się procesywnie, niebieskie – przemieszczenie mikrotubuli ładunkowej nr 1 w kierunku końca plus, zielone – transport mikrotubuli ładunkowej nr 2 w kierunku końca minus, żółte – kolokalizację procesywnego ruchu kinezyzny-1 oraz przemieszczania trzeciej mikrotubuli w kierunku końca plus

Na Ryc. 5.29 koniec plus mikrotubuli jest zaznaczony pomarańczowymi strzałkami, wskazującymi jednocześnie miejsce nagromadzenia się cząsteczek kinezy-1. Widać również, że kinezy-1 wędrowała tylko w jednym kierunku (Ryc. 5.29, białe strzałki). Mikrotubuli transportowanej do końca plus (oznaczonej niebieską strzałką), towarzyszył procesywny ruch kinezy-1, podobnie było w przypadku krótkiej mikrotubuli zaznaczonej żółtą strzałką. Z kolei za ruch mikrotubuli przemieszczanej w stronę końca minus (Ryc. 5.29, zielona strzałka) najprawdopodobniej odpowiadały cząsteczki kinezy-1 przyłączone domenami motorycznymi do mikrotubuli ładunkowej, a ogonami do stacjonarnej, a więc nie poruszały się wzdłuż tej mikrotubuli (Ryc. 5.29, różowe strzałki). Kluczową rolę odgrywała tu wzajemna orientacja mikrotubul, a konkretnie transport w kierunku końca minus jest możliwy jedynie wtedy, gdy mikrotubule są równoległe, co będzie szczegółowo rozważane w dyskusji.

Na kimografie widać również grupę cząsteczek kinezy-1 (Ryc. 5.29, szara strzałka). Niektóre cząsteczki dołączają do tej grupy (fioletowe strzałki), ale są też takie, które mogą się z niej „wydostać” i poruszać się procesywnie (błękitne strzałki), co dowodzi, że obserwowane nagromadzenia cząsteczek nie są agregatami. W literaturze jest to określane jako „zator molekularny” lub „korek” (ang. *molecular crowding*, Leduc i wsp., 2012; Rank i Frey, 2018).

5.8 Użycie mikrotubul znakowanych umożliwiło określenie wzajemnej orientacji mikrotubul podczas ruchu

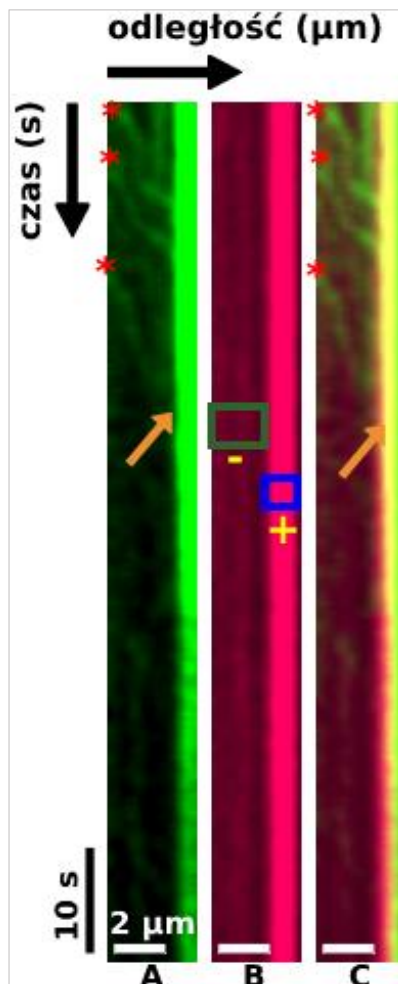
W celu zbadania orientacji mikrotubul podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 przeprowadzono eksperymenty z mikrotubulami polarnie znakowanymi, czyli takimi, w których jeden koniec zawierał więcej tubuliny znakowanej fluorescencyjnie, a więc świecił bardziej intensywnie. Mikrotubule polarnie znakowane przygotowano według protokołu z podrozdziału 4.4.6, a sam test poruszania się kinezy-1 wzdłuż mikrotubuli wykonano według opisu z podrozdziału 4.8.5, używając 12 nM kinezy-1.

Pierwsze eksperymenty wykazały, że mikrotubule polarnie znakowane były o wiele krótsze (ok. 10 razy) niż te przygotowywane do pozostałych eksperymentów (wg. protokołu z podrozdziału 4.4.5), co widać na poniższej ilustracji (Ryc. 5.30). W przypadku mikrotubul stacjonarnych jest to przeszkoda, która mogła sztucznie obniżyć długość przebiegu i czas trwania ruchu mikrotubula-mikrotubula, a zatem

utrudniać obserwacje. Wykorzystując fakt, że kinezyrna-1 porusza się w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej i tam się gromadzi, sprawdzono, czy zakładane położenie końca plus mikrotubuli stacjonarnej polarnie znakowanej jest słuszne. Ryc. 5.30 i 5.31 potwierdzają to, że kinezyrna-1 poruszała się w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej polarnie znakowanej (świecącego bardziej intensywnie) i tam się gromadziła.



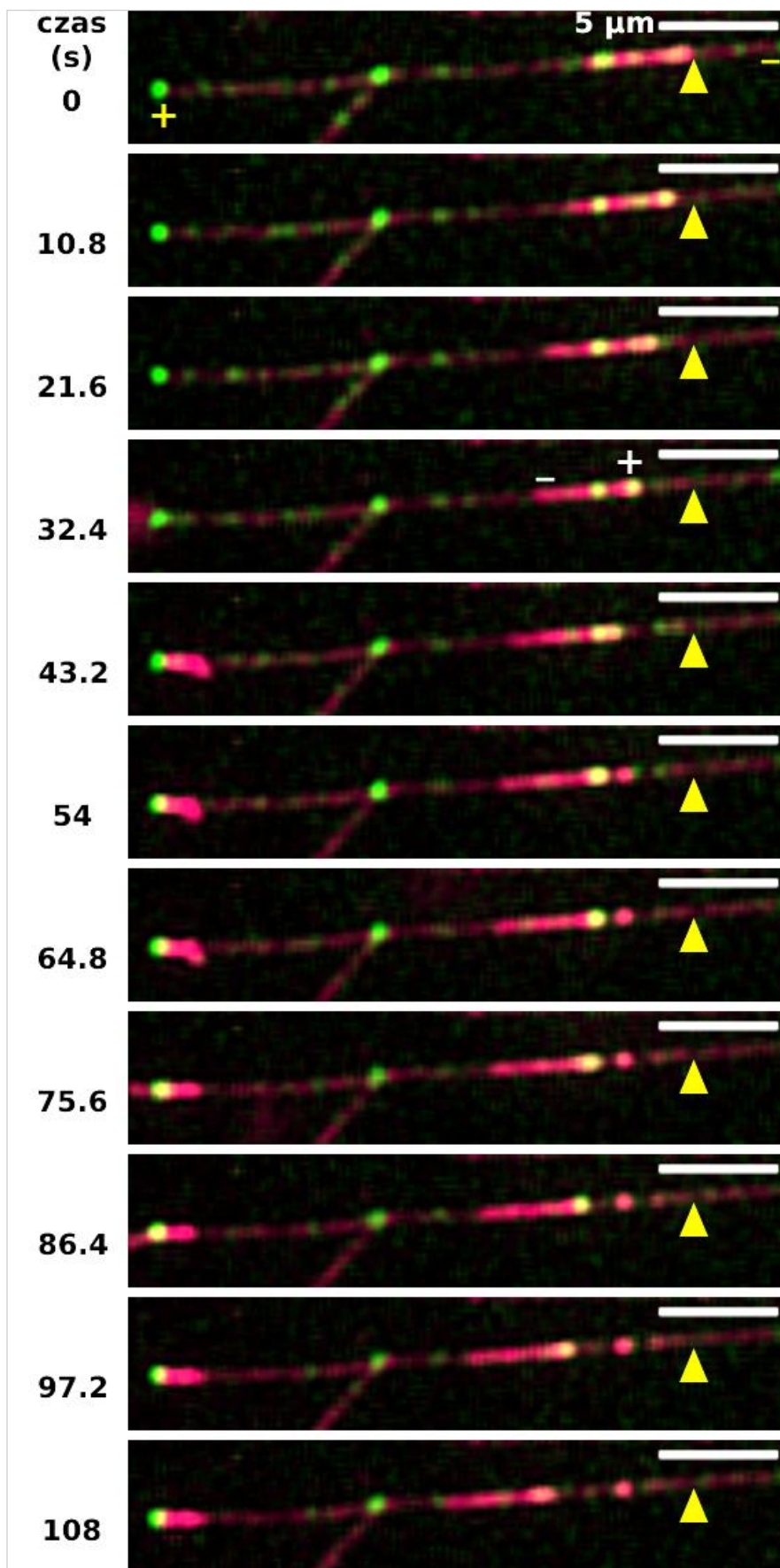
Ryc. 5.30 Wybrana klatka z filmu przedstawiającego kroczenie kinezy-1 (12 nM) wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej polarnie znakowanej. Żółtymi symbolami „+” i „-” oznaczono końce mikrotubuli polarnie znakowanej



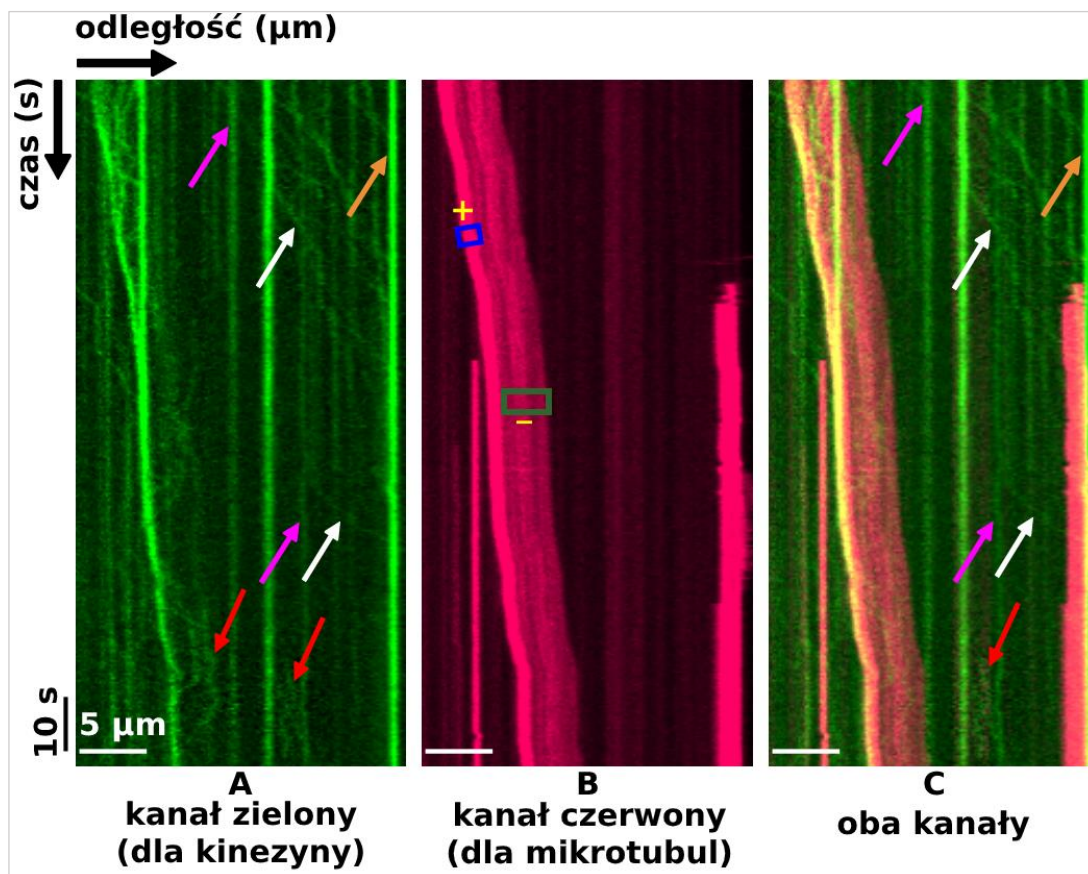
Ryc. 5.31 Kimograf przedstawiający zjawiska zachodzące na mikrotubuli z Ryc. 5.30. A – kanał kinezy-1, B – kanał mikrotubul, C – oba kanały. Zielonym prostokątem oznaczono koniec minus mikrotubuli stacjonarnej, a niebieskim intensywniej świeący koniec plus. Czerwonymi gwiazdkami zaznaczono cząsteczki kinezy-1 poruszające się wzdłuż mikrotubuli, a pomarańczowymi strzałkami cząsteczki kinezy-1 zgromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej

Do kolejnych doświadczeń mikrotubule stacjonarne przygotowano według standardowego protokołu (podrozdział 4.4.5), a mikrotubule ładunkowe były polarnie znakowane (podrozdział 4.4.6) z intensywniej świecącym końcem plus. Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przeprowadzono według procedury opisanej w podrozdziale 4.8.8, tylko w przypadku mikrotubul ładunkowych nie rozdrabniano ich za pomocą igły do HPLC, bo były one wystraszająco krótkie wskutek procedury polarnego znakowania.

Te eksperymenty z użyciem mikrotubul polarnie znakowanych wykazały, że istnieją trzy możliwości transportu mikrotubul ładunkowych przez kinezynę-1 wzdłuż drugiej mikrotubuli: transport mikrotubuli zorientowanej antyrównolegle w kierunku końca plus, transport mikrotubuli równoległej w stronę końca minus oraz równoległej w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej. Pierwszy sposób ruchu mikrotubula-mikrotubula obrazuje Ryc. 5.32, uzupełniający go kimograf (Ryc. 5.33), a także Film 06.

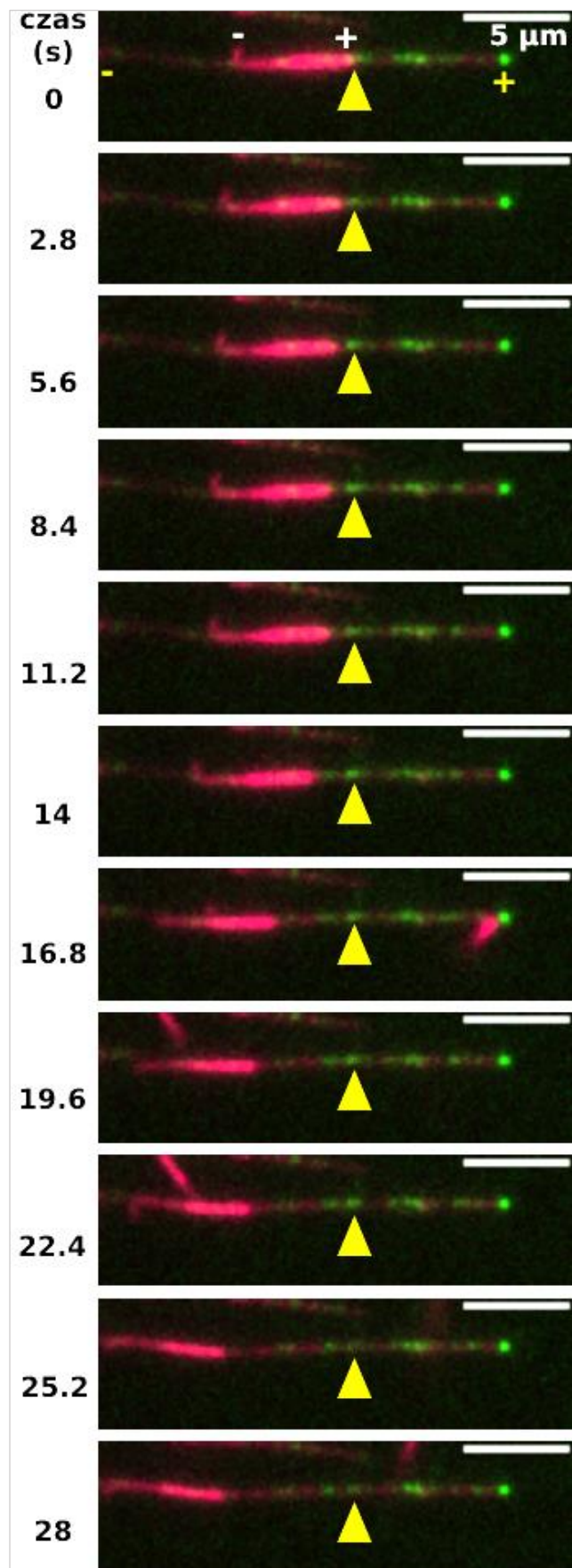


Ryc. 5.32 Transport mikrotubuli ładunkowej antyrównoległej (polarnie znakowanej) przez kinezyne-1 (21 nM). Żółtymi trójkątami zaznaczono miejsce startu mikrotubuli ładunkowej polarnie znakowanej, a białymi symbolami „+” i „-” jej końce (czas 32.4 s). Żółtymi symbolami „+” i „-” oznaczono końce mikrotubuli stacjonarnej

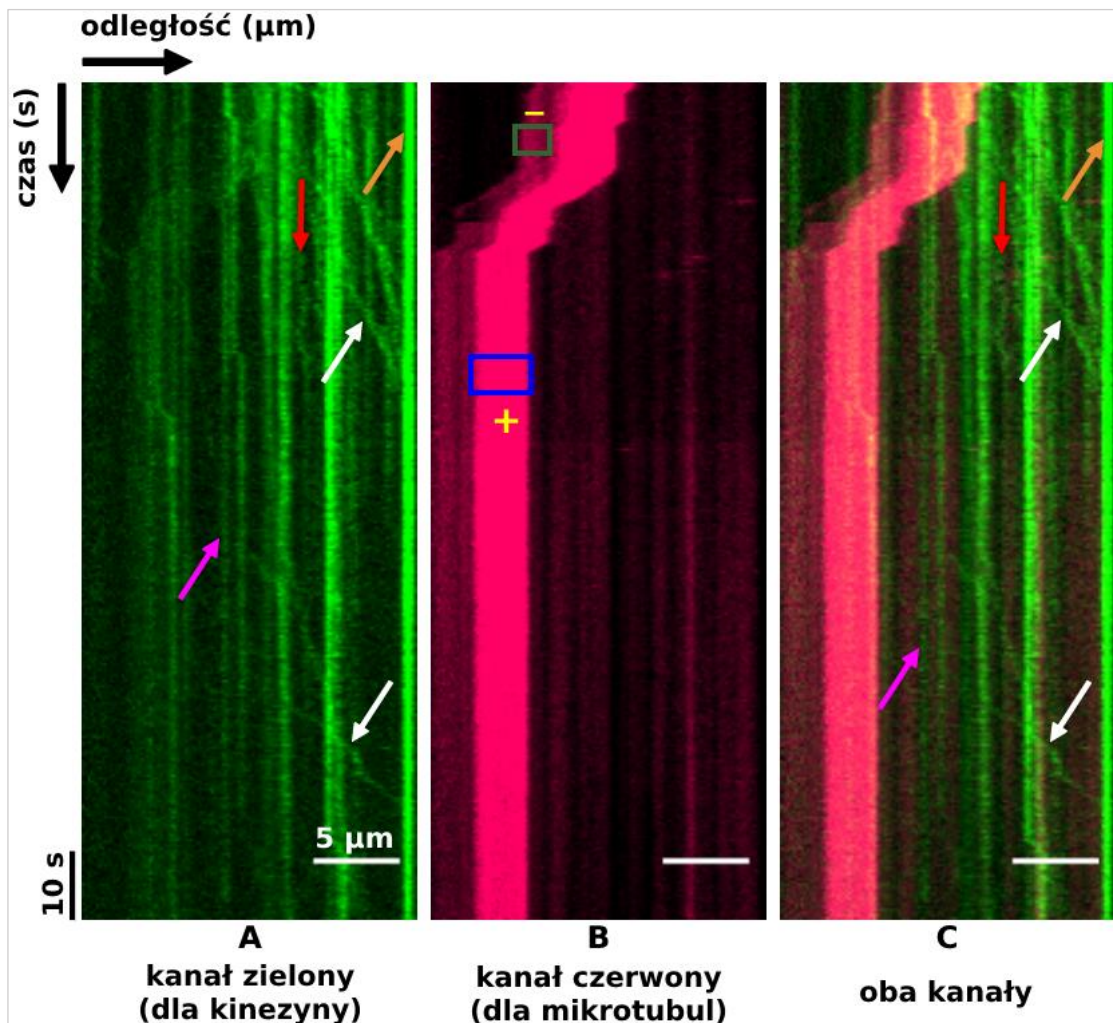


Ryc. 5.33 Kimograf pokazujący transport mikrotubuli ładunkowej antyrównoległej (polarnie znakowanej) do końca plus przez kinezynę-1 (21 nM) z tego samego obszaru co montaż na Ryc. 5.32. Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyiny unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyiny nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, białe – procesywny ruch cząsteczek kinezyiny-1 wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, czerwone – dyfuzja cząsteczek kinezyiny-1. Prostokątami zielonym i niebieskim oznaczono odpowiednio koniec minus i plus mikrotubuli ładunkowej polarnie znakowanej. Żółtymi symbolami „+” i „-” oznaczono końce mikrotubuli stacjonarnej

Druga możliwość w przesuwaniu dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 to transport równoległych mikrotubul ładunkowych w kierunku końca minus mikrotubuli stacjonarnej. Przykład pokazano na Ryc. 5.34 i 5.35 – obie ryciny utworzono na podstawie Filmu 07. Szczególnie na kimografie (Ryc. 5.35) widać, że cząsteczki kinezyiny-1 poruszały się procesywnie w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej, a mikrotubula ładunkowa była transportowana w stronę końca minus. W tym przypadku nie było widać kolokalizacji procesywnego ruchu cząsteczek kinezyiny-1 wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej z transportem mikrotubuli ładunkowej (Ryc. 5.35). Obserwowano natomiast poruszanie się cząsteczek kinezyiny-1 w stronę końca plus mikrotubuli stacjonarnej oraz transport mikrotubuli ładunkowej w przeciwną stronę (Ryc. 5.35). W tym przypadku za transport odpowiadały tylko motory oddziałujące poprzez domeny motoryczne z mikrotubulą ładunkową, które ogonami były jednocześnie związane do mikrotubuli stacjonarnej.

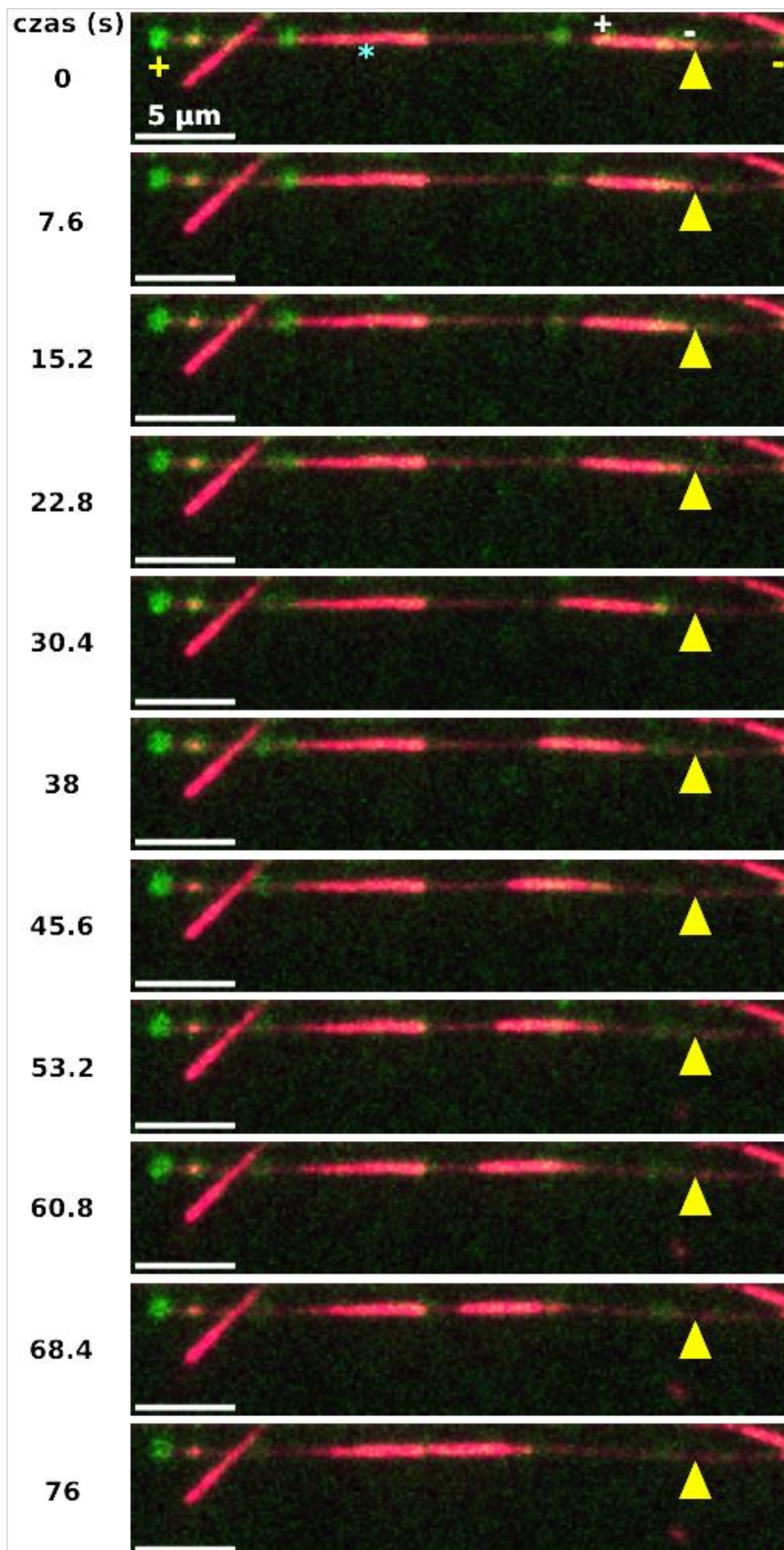


Ryc. 5.34 Transport mikrotubuli ładunkowej (polarnie znakowanej) równoległej w kierunku końca minus mikrotubuli stacjonarnej przez kinezyne-1 (6 nM). Żółtymi trójkątami zaznaczono miejsce startu mikrotubuli ładunkowej, a białymi symbolami „+” i „-” jej końce. Żółtymi symbolami „+” i „-” oznaczono końce mikrotubuli stacjonarnej

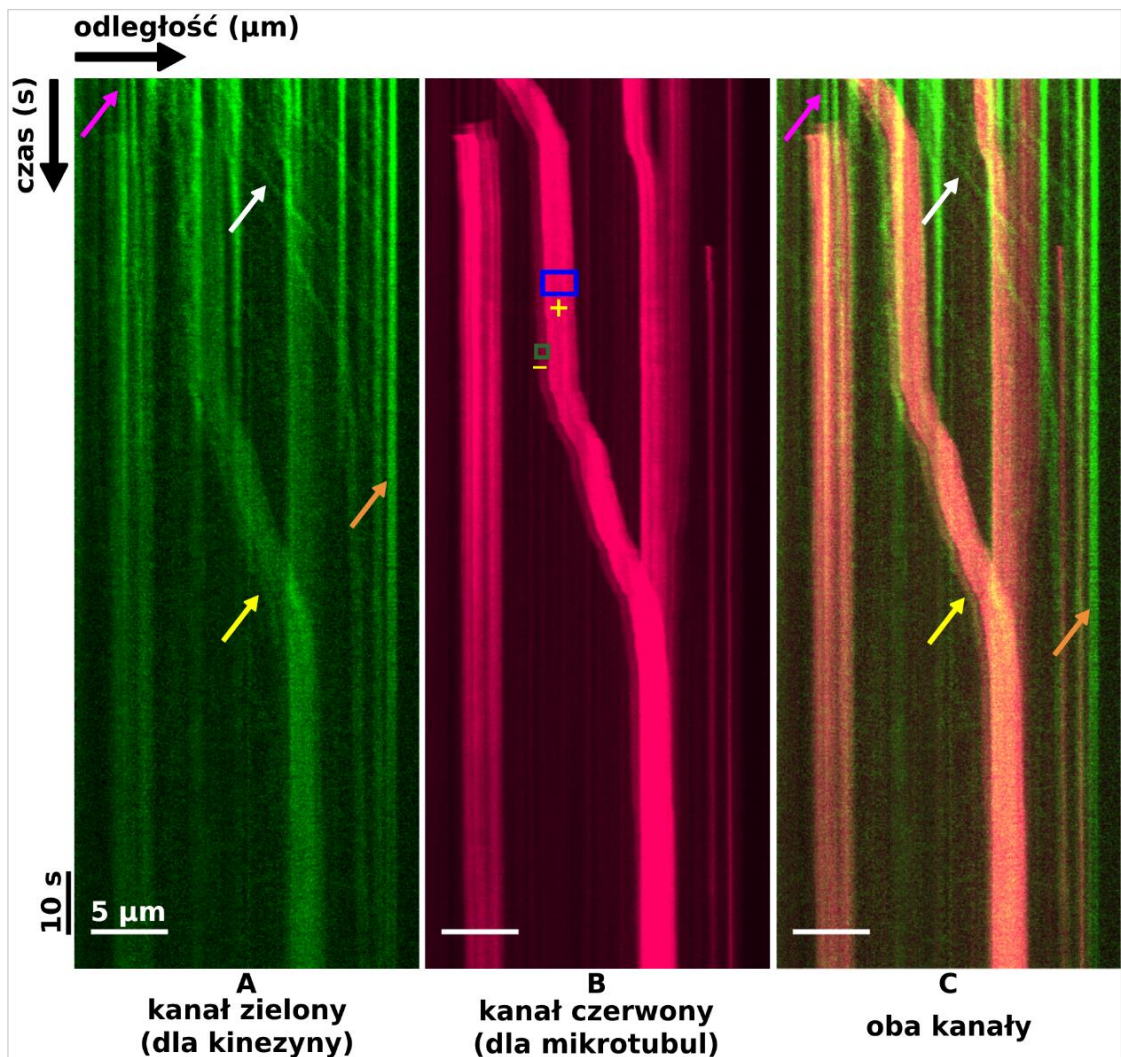


Ryc. 5.35 Kimograf pokazujący transport mikrotubuli ładunkowej (polarnie znakowanej) równoległej w kierunku końca minus przez kinezyne-1 (6 nM) z tego samego obszaru co montaż na Ryc. 5.34. Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyzny unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyzny nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, białe – procesywny ruch kinezyn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, czerwone – dyfuzja cząsteczek kinezyzny-1. Prostokątami zielonym i niebieskim oznaczono odpowiednio koniec minus i plus mikrotubuli ładunkowej polarnie znakowanej

Trzecia możliwość w ruchu mikrotubula-mikrotubula napędzanego przez kinezyne-1 to transport mikrotubul ładunkowych równoległych w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej. Pokazano to na Ryc. 5.36, 5.37 oraz Filmie 08. Na Ryc. 5.37 widać kolokalizację transportu mikrotubuli ładunkowej z procesywnym ruchem kinezyzny-1, co oznaczono żółtą strzałką.

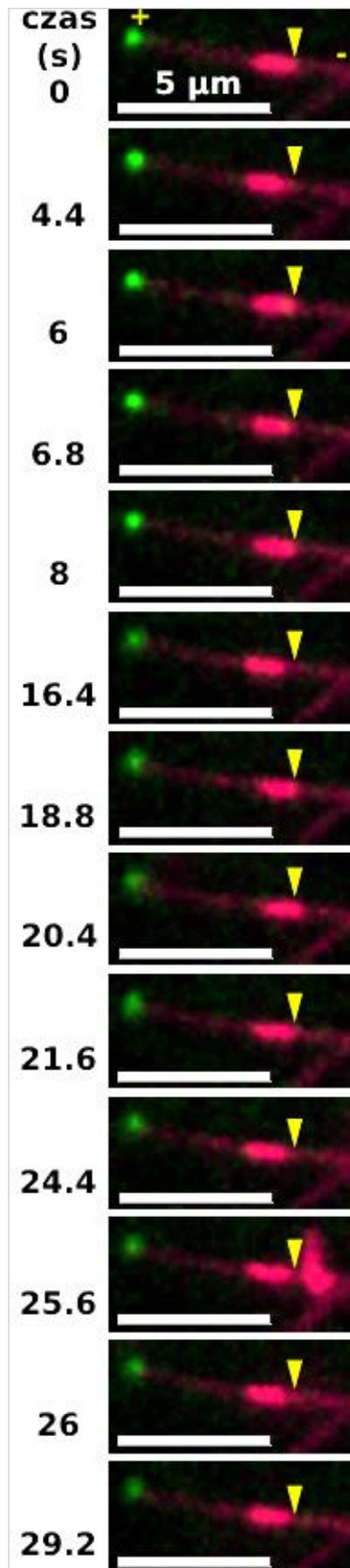


Ryc. 5.36 Transport mikrotubuli ładunkowej (polarnie znakowanej) równoległej w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej przez kinezyne-1 (60 nM). Żółtymi trójkątami zaznaczono miejsce startu mikrotubuli ładunkowej polarnie znakowanej, a białymi symbolami „+” i „-” jej końce. Żółtymi symbolami „+” i „-” oznaczono końce mikrotubuli stacjonarnej. Jasnoniebieską gwiazdką zaznaczono mikrotubulę, która nie była transportowana

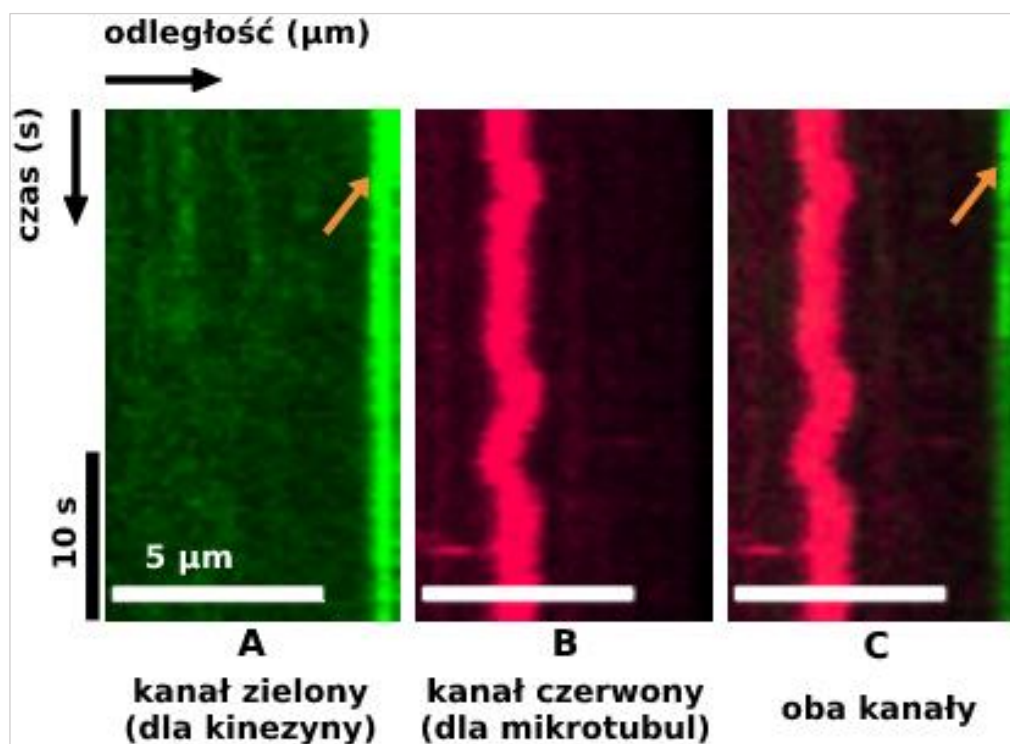


Ryc. 5.37 Kimograf pokazujący transport mikrotubuli ładunkowej (polarnie znakowanej) równoległej w stronę końca plus mikrotubuli stacjonarnej przez kinezyne-1 (60 nM) z tego samego obszaru co montaż na Ryc. 5.36. Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyne unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyne nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, białe – procesywny ruch kinezyn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, żółte – kolokalizacja procesywnego ruchu cząsteczek kinezyne-1 z transportem mikrotubuli ładunkowej. Prostokątami zielonym i niebieskim oznaczono odpowiednio koniec minus i plus mikrotubuli ładunkowej polarnej znakowanej

We wstępie krótko opisano zjawisko ruchu oscylacyjnego (tzw. „przeciągania liny”, 1.4), w którym ładunek ulega naprzemiennym zmianom kierunku transportu na niewielkie odległości. Analogiczne zjawisko obserwowano również w doświadczeniach z niniejszej pracy podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula napędzanego przez kinezyne-1, a przykłady pokazano na Ryc. 5.38 i uzupełniającym go kimografie (Ryc. 5.39), a także w Filmie 09.



Ryc. 5.38 Montaż wybranych klatek z filmu przedstawiającego zjawisko ruchu oscylacyjnego (stężenie kinezy-1 wynosiło 4.5 nM). Żółtymi trójkątami zaznaczono położenie mikrotubuli ładunkowej w czasie równym 0 s

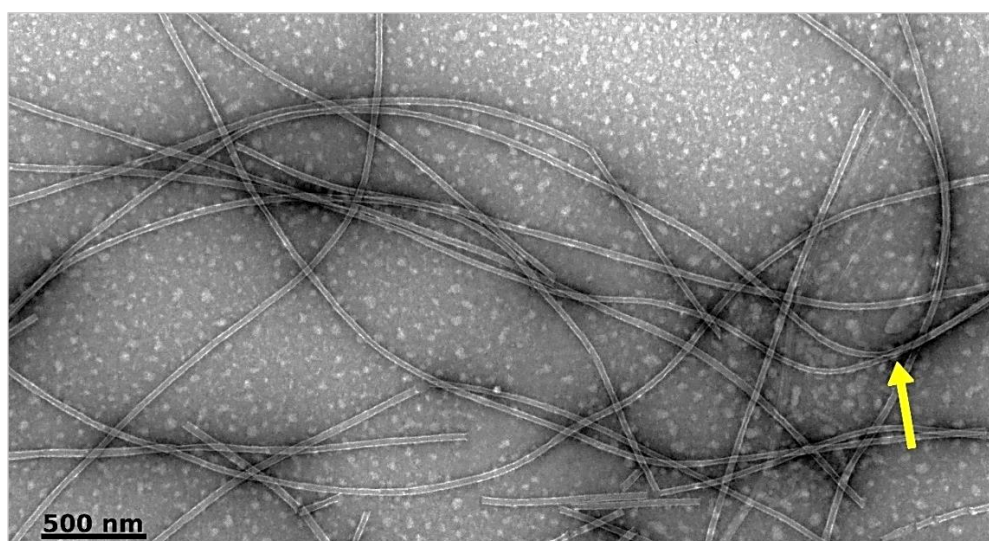


Ryc. 5.39 Kimograf do Ryc. 5.38, obrazujący zmiany położenia mikrotubuli ładunkowej podczas ruchu oscylacyjnego (stężenie kinezyzny-1 wynosiło 4.5 nM). Pomarańczowymi strzałkami oznaczono cząsteczki kinezyzny-1 nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej

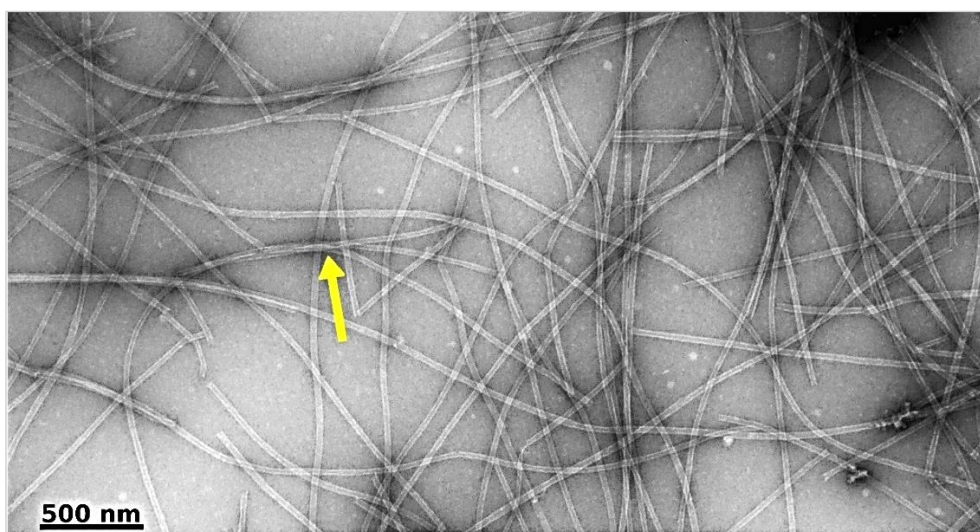
5.9 Wiązowanie mikrotubul

Ponieważ mikrotubule mają średnicę ok. 20 – 25 nm, a rozdzielczość mikroskopii TIRF wynosi 64 nm/piksel (najwyższa), to nie można ocenić, czy konkretna obserwowana mikrotubula to oddzielna struktura, czy np. dwie położone bardzo blisko siebie. Jednakże, karboksylowy koniec tubuliny wystający nad powierzchnię mikrotubul ma duży ładunek ujemny, a zatem głównie oddziałuje z cząsteczkami lub obszarami cząsteczek naładowanymi dodatnio, np. motorami molekularnymi (Lefèvre i wsp., 2011; Roll-Mecak, 2015). Poza tym, w literaturze przeważają dane na temat sieciowania mikrotubul przez białka związane z mikrotubulami, co zostało zademonstrowane w komórkach i *in vitro*, np. tau, MAP2, PRC1 (Kapitein i Hoogenraad, 2015). Stąd, wydaje się, że prawdopodobieństwo spontanicznego tworzenia wiązek mikrotubul w warunkach *in vitro* jest niskie. Nie jest również jasne, czy ruch kinezyzny-1 wzdłuż wiązki ma zasadniczo różne parametry ruchu w porównaniu z ruchem wzdłuż pojedynczej mikrotubuli. Niemniej jednak, używając transmisyjnej mikroskopii elektronowej sprawdzono, czy mikrotubule standardowo używane do eksperymentów mają tendencję do tworzenia wiązek. Mikrotubule przygotowano według opisu w podrozdziale 4.4.5, a poszczególne etapy dotyczące mikroskopii elektronowej zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 4.5. Reprezentatywne zdjęcia zamieszczono na Ryc.

5.40 i 5.41. Zarówno mikrotubule stacjonarne (Ryc. 5.40), jak i ładunkowe (Ryc. 5.41) w większości obserwowano jako odrębne struktury, ale zdarzały się sporadycznie przypadki nakładania się na siebie dwóch lub trzech mikrotubul w pewnym wspólnym obszarze, co mogło być też dziełem przypadkowego umiejscowienia w wyniku naniesienia ich na siatki mikroskopowe. Ponadto, do analizy mikrotubul wybrano w tym przypadku stężenie 0.08 mg/ml, natomiast podczas eksperymentów z mikroskopii TIRF używano o wiele niższych stężeń – 0.003 mg/ml dla mikrotubul stacjonarnych i 0.001 mg/ml dla ładunkowych (podrozdział 4.8.8), czyli odpowiednio 27 i 80 razy mniejszych niż do mikroskopu elektronowego. To skłania do przypuszczenia, że przy niższym stężeniu mikrotubul tendencja do ich sieciowania jest niewielka.

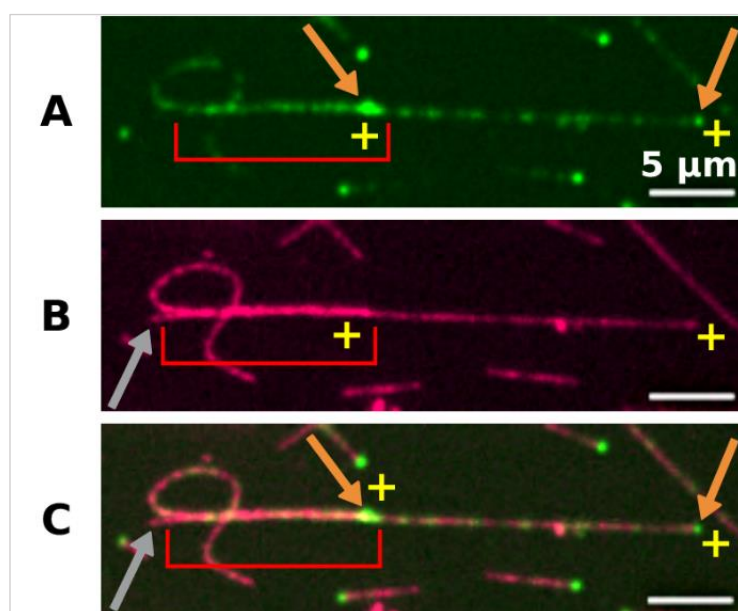


Ryc. 5.40 Zdjęcie mikrotubul stacjonarnych (0.08 mg/ml) z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Żółtą strzałką zaznaczono przykład nakładania się dwóch mikrotubul na siebie (lub wiązkanie)



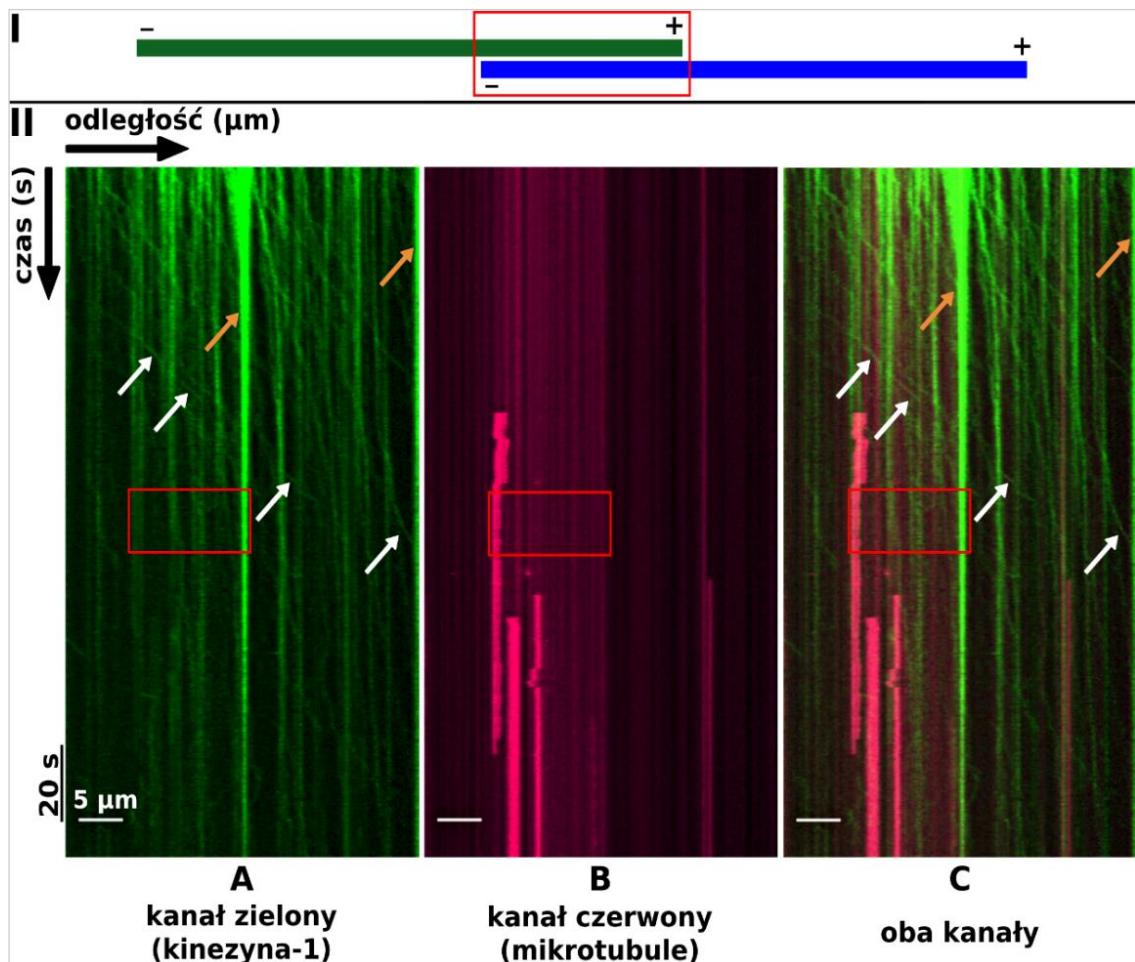
Ryc. 5.41 Zdjęcie mikrotubul ładunkowych (0.08 mg/ml) z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Żółtą strzałką zaznaczono przykład nakładania się dwóch mikrotubul na siebie (lub wiązkanie)

Jednakże, w mikroskopie TIRF również czasem obserwowano nakładanie się na siebie mikrotubul, chociaż w przeciwieństwie do mikroskopii elektronowej niemożliwe było ustalenie ile dokładnie mikrotubul wchodzi w skład danej wiązki (ze względu na ograniczenia wynikające z rozdzielczości). Nakładające się na siebie mikrotubule wyróżniały się jako zgrubienia w pewnym obszarze i wyraźna różnica w intensywności fluorescencji (Ryc. 5.42 i 5.44, czerwone klamry), albo też jako oddzielający się koniec jednej z mikrotubul, co przypominało rozdwojone włókno lub nić (Ryc. 5.42, szara strzałka).

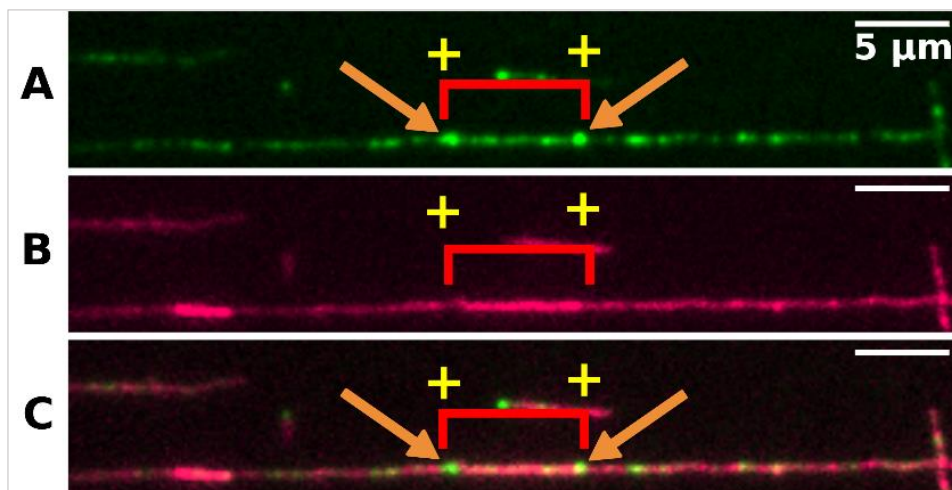


Ryc. 5.42 Wybrane klatki z filmu pokazującego wiązkę dwóch równoległych mikrotubul. Do eksperymentu użyto 4.5 nM kinezy-1. A – kanał zielony (kinezy-1), B – kanał czerwony (mikrotubule), C – oba kanały. Czerwoną klamrą zaznaczono obszar nakładania się na siebie mikrotubul. Pomarańczowymi strzałkami oznaczono cząsteczki kinezy-1 nagromadzone na końcach plus jednej i drugiej mikrotubuli stacjonarnej, a szarą strzałką zaznaczono miejsce rozdzielania się mikrotubul

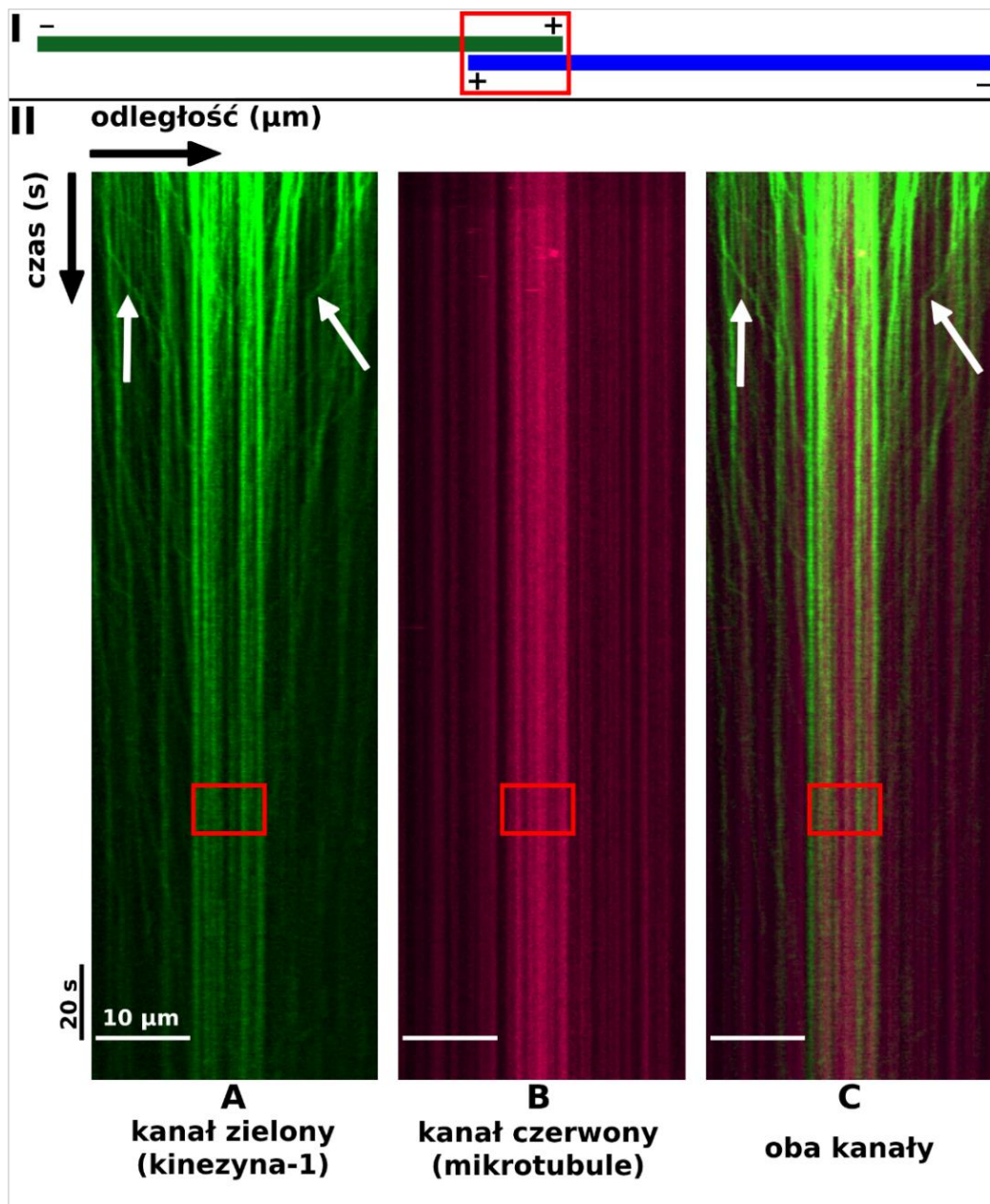
Dodatkowo, dzięki analizie kierunku ruchu cząsteczek kinezy-1 (kimografy) możliwe było ustalenie wzajemnej orientacji mikrotubul w wiązce. Obserwowano zarówno wiązki równoległe (Ryc. 5.43, panel II), po których cząsteczki kinezy-1 wędrowały w jednym kierunku, jak i antyrównoległe (Ryc. 5.45, panel II), gdzie cząsteczki poruszały się w przeciwnych kierunkach.



Ryc. 5.43 Schemat wiązki (I, zielony i niebieski prostokąt to dwie różne mikrotubule) i kimograf (II) pokazujący kierunek poruszania się cząsteczek kinezy-1 (4.5 nM) po wiązce równoległych mikrotubul z Ryc. 5.42. Czerwonymi prostokątami zaznaczono obszar nakładania się na siebie mikrotubul. Pomarańczowymi strzałkami oznaczono cząsteczki kinezy-1 nagromadzone na końcach plus jednej i drugiej mikrotubuli stacjonarnej, a białymi – procesywny ruch cząsteczek kinezy-1



Ryc. 5.44 Wybrane klatki z filmu pokazującego wiązkę dwóch antyrównoległych mikrotubul stacjonarnych. Do eksperymentu użyto 4.5 nM kinezy-1. A – kanał zielony (kinezy-1), B – kanał czerwony (mikrotubule), C – oba kanały. Czerwonym nawiasem kwadratowym zaznaczono obszar nakładania się na siebie mikrotubul. Pomarańczowymi strzałkami oznaczono cząsteczki kinezy-1 nagromadzone na końcach plus jednej i drugiej mikrotubuli stacjonarnej



Ryc. 5.45 Schemat wiązki (I) i kimograf (II) wiązki antyrównoległej z Ryc. 5.44 pokazujący kierunki poruszania się cząsteczek kinezyzny-1 (4.5 nM). Czerwonymi prostokątami zaznaczono obszar nakładania się na siebie mikrotubul. Białymi strzałkami oznaczono procesywny ruch cząsteczek kinezyzny-1

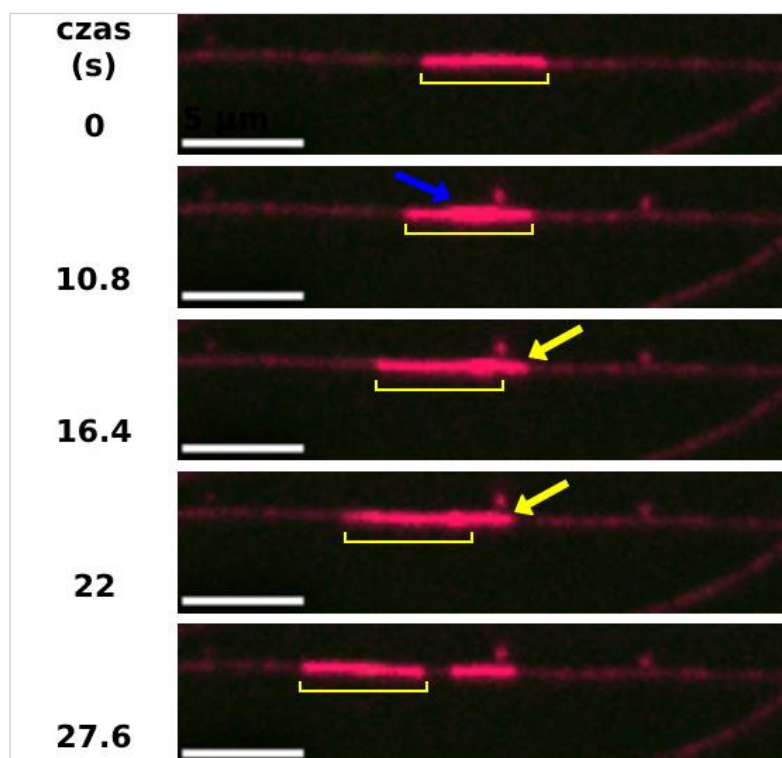
W przypadku antyrównoległych wiązek mikrotubul istnieją dwie możliwości ich ustawienia rozpoznawane poprzez obserwację kierunku ruchu cząsteczek kinezyzny-1, co pokazano na schematach – Ryc. 5.45 (panel I) oraz Ryc. 5.46.



Ryc. 5.46 Schemat drugiej konfiguracji wiązki antyrównoległych mikrotubul

Podczas wykonywania eksperymentów przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 obserwowano również nakładanie się na siebie dwóch lub więcej mikrotubul ładunkowych. Przykład przedstawia Ryc. 5.47. Ze względu na fakt,

że te mikrotubule ładunkowe nie były przytwierdzone do szkiełka, często obserwowano rozdzielanie się wiązki na pojedyncze mikrotubule. Poniższy Ryc. 5.47 również pokazuje to zjawisko (żółte strzałki).



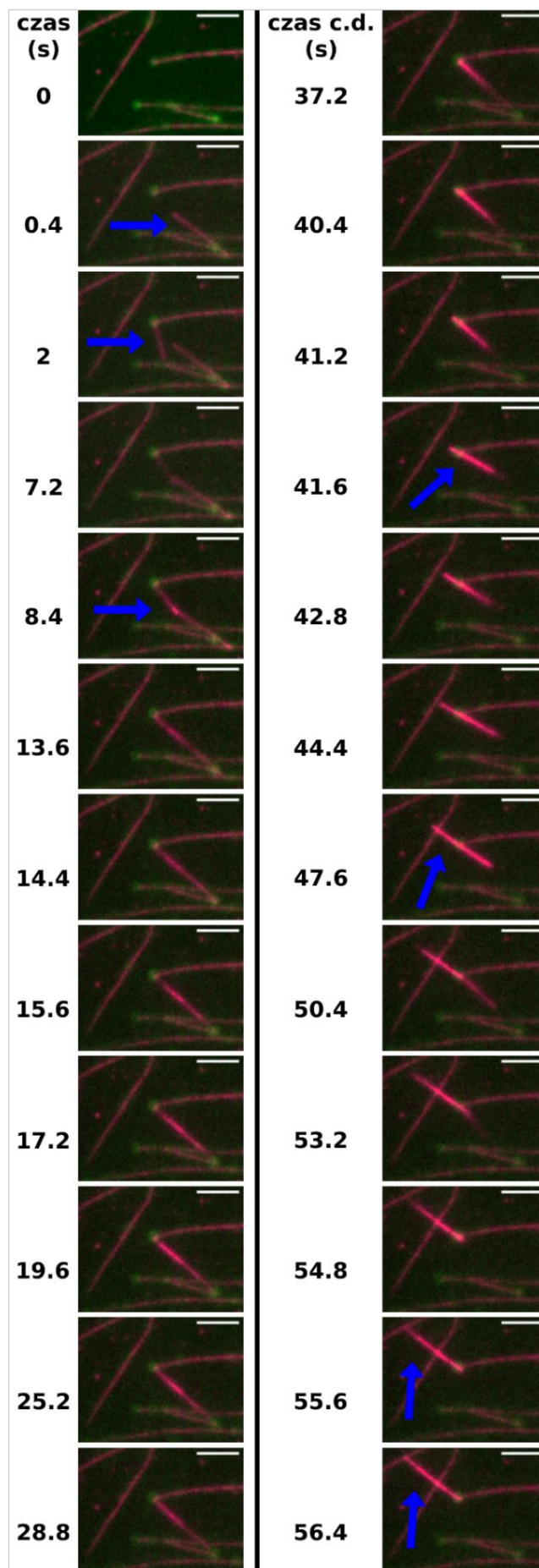
Ryc. 5.47 Wybrane klatki z filmu pokazującego nakładanie się na siebie dwóch mikrotubul ładunkowych (wiązkanie) podczas testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 (9 nM). Niebieską strzałką zaznaczono wiązki (zgrubienie), a żółtymi – rozdzielanie się wiązki mikrotubul ładunkowych

W przypadku mikrotubul stacjonarnych mogły one nakładać się przypadkowo, zależnie od miejsca przytwierdzenia poszczególnych mikrotubul i ich interakcji z przeciwciałami po naniesieniu na szkiełko. Mogły też być bardzo blisko siebie, a sygnały fluorescencyjne przez nie emitowane nakładały się. Z kolei mikrotubule ładunkowe również mogły być bardzo blisko siebie, np. nad sąsiadującymi protofilamentami mikrotubuli stacjonarnej. Istnieje też prawdopodobieństwo, że mikrotubule ładunkowe były sieciowane przez cząsteczki kinezyne-1, tym bardziej, że podczas transportu takich wiązek w ramach ruchu mikrotubula-mikrotubula często obserwowano rozdzielanie się wiązki na pojedyncze mikrotubule. Ze względu na brak możliwości jednoznacznego określenia ilości mikrotubul w wiązce czy wzajemnej orientacji mikrotubul, w obliczeniach parametrów ruchu mikrotubula-mikrotubula nie uwzględniano transportu wiązki mikrotubul ładunkowych wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, podobnie postępowano gdy jedna mikrotubula ładunkowa była transportowana wzdłuż wiązki mikrotubul stacjonarnych.

5.10 Kinezyzna-1 organizuje mikrotubule *in vitro*. Obracanie mikrotubul i zmiana kierunku transportu tej samej mikrotubuli

Kinezyzna-1 oprócz przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie może je również organizować *in vitro*. Jednym z przykładów jest przesuwanie dwóch mikrotubul ładunkowych względem siebie (Ryc. 5.48 oraz Film 10). Obserwowano to dość często w ramach badań dotyczących niniejszej pracy. Przykładowo, jedna z mikrotubul ładunkowych niespecyficznie przyłączyła się do powierzchni szkiełka, następnie do niej przyłączyły się cząsteczki kinezyzny-1 obecne w roztworze (konsekwencja dysocjacji z powierzchni mikrotubul stacjonarnych), które związały inną mikrotubulę ładunkową z roztworu i transportowały ją wzdłuż tej związanej niespecyficznie z powierzchnią szkiełka.

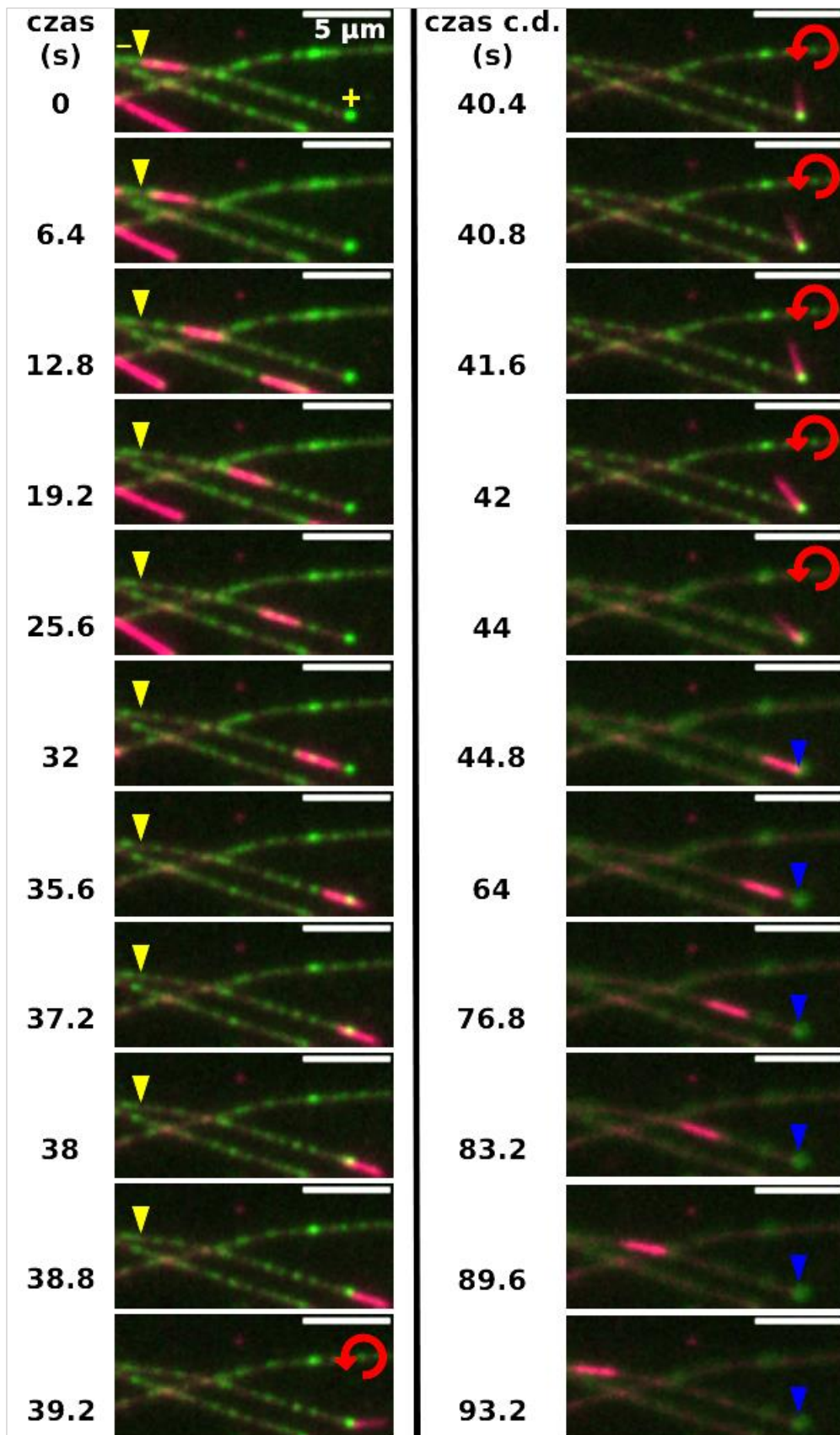
W przypadku pokazanym na Ryc. 5.48 sytuacja jest nieco odmienna od przykładu opisanego w poprzednim akapicie. Mikrotubula ładunkowa przyłączyła się do kinezyn nagromadzonych na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej (Ryc. 5.48, niebieska strzałka, czas 0.4 s). Analogiczna sytuacja miała miejsce na sąsiedniej mikrotubuli (Ryc. 5.48, niebieska strzałka, czas 2 s). Część cząsteczek kinezyzny-1 obecnych na końcach mikrotubul stacjonarnych prawdopodobnie zaczęła się przemieszczać wzdłuż jednej lub obu mikrotubul ładunkowych, podczas gdy inne nadal podtrzymywały mikrotubule ładunkowe. Konsekwencją tej skomplikowanej konfiguracji było po pierwsze utworzenie połączenia między różnymi mikrotubulami stacjonarnymi za pomocą mikrotubul ładunkowych, po drugie przesuwanie dwóch mikrotubul ładunkowych względem siebie, a po trzecie – jednoczesne przemieszczanie tych dwóch mikrotubul ładunkowych dalej przez kinezyzny nadal nagromadzone na końcach plus mikrotubul stacjonarnych aż do mikrotubuli stacjonarnej widocznej w lewych górnych rogach klatek (Ryc. 5.48, niebieskie strzałki, czas 55.6 oraz 56.4 s). W ostatnim wymienionym przypadku transport nie odbywał się wzdłuż mikrotubul stacjonarnych, a pod kątem.



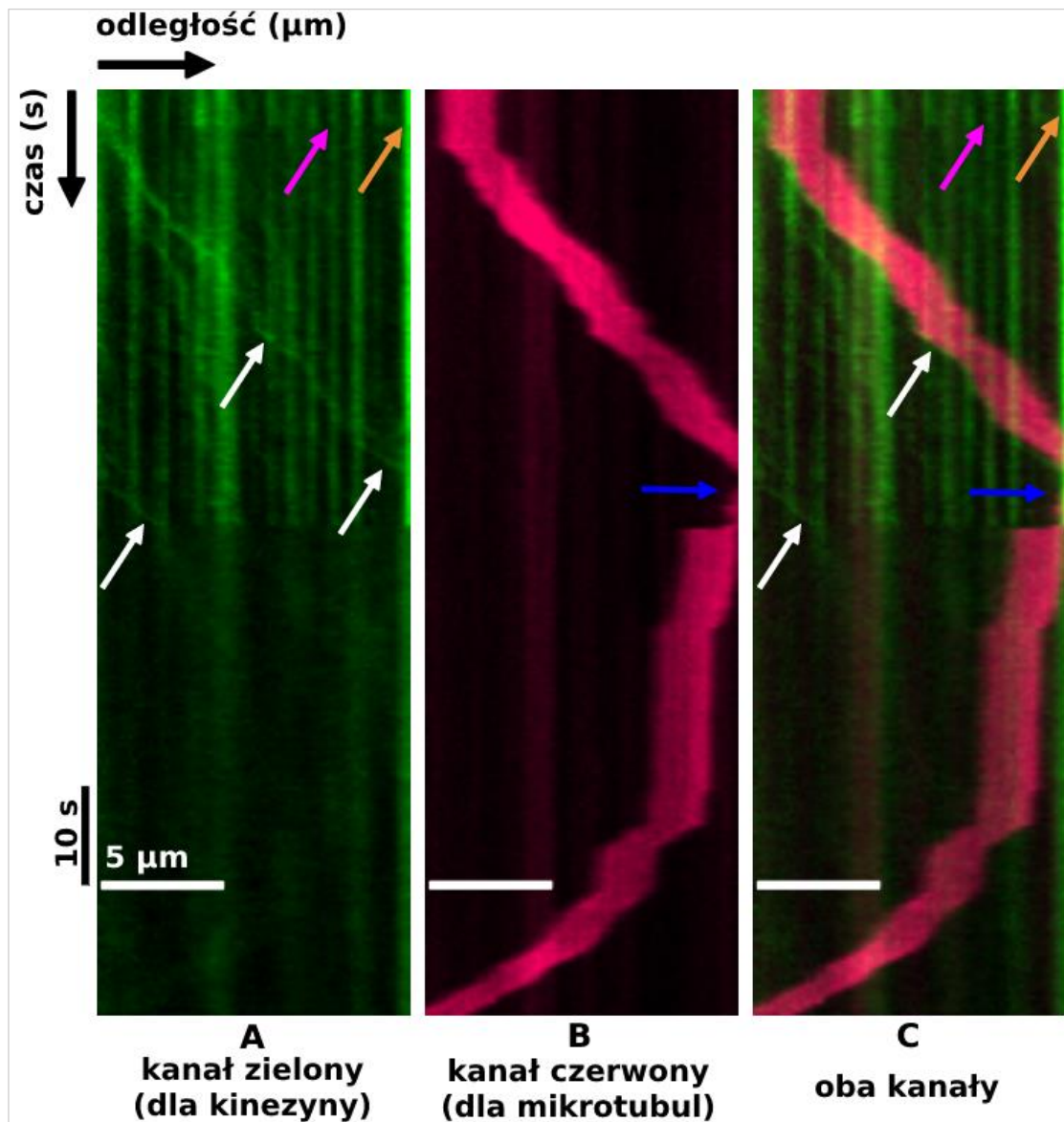
Ryc. 5.48 Przesuwanie dwóch mikrotubul ładunkowych (niebieskie strzałki) względem siebie przez kinezyne-1 (6 nM)

Innym obserwowanym zjawiskiem było obracanie mikrotubul ładunkowych związane ze zmianą kierunku ich transportu (chodzi o tę samą mikrotubulę), co obserwowano niezbyt często, ale nie można powiedzieć, że było to coś wyjątkowego. Najczęściej zauważano, że mikrotubula ładunkowa przemieszczana w stronę końca plus mikrotubuli stacjonarnej przez cząsteczki kinezy-1 docierała do końca plus tej mikrotubuli, następnie była obracana – a więc miała miejsce zmiana jej orientacji, po czym następował transport w kierunku minus mikrotubuli stacjonarnej, czyli w przeciwnym do pierwotnego. Prawdopodobnie, przed obróceniem mikrotubula ta była zorientowana antyrównolegle, a po obróceniu – równolegle. Przykład takiego zjawiska zawiera Ryc. 5.49, której uzupełnieniem są kimograf z Ryc. 5.50 oraz Film 11. W górnej części kimografu (Ryc. 5.50, nad niebieską strzałką) widać kolokalizację ruchu procesywnego kinezy-1 z przemieszczaniem mikrotubuli ładunkowej, ale kinezy-1 związane ogonami do mikrotubuli stacjonarnej (oznaczone strzałkami różowymi) prawdopodobnie także uczestniczyły w transporcie tej mikrotubuli ładunkowej (przynajmniej pewna część tych motorów). Po obróceniu, podczas przemieszczania w kierunku końca minus, ruch mógł być już generowany tylko przez cząsteczki kinezy-1 związane ogonami do mikrotubuli stacjonarnej.

Zjawisko obracania mikrotubul ładunkowych również wskazuje na to, że kinezy-1 może organizować mikrotubule *in vitro*. Ale obracanie mikrotubul obserwowano również w komórkach potraktowanych kolcemidem (substancja depolimeryzująca mikrotubule), co spowodowało powstanie krótkich mikrotubul (Jolly i wsp., 2010).

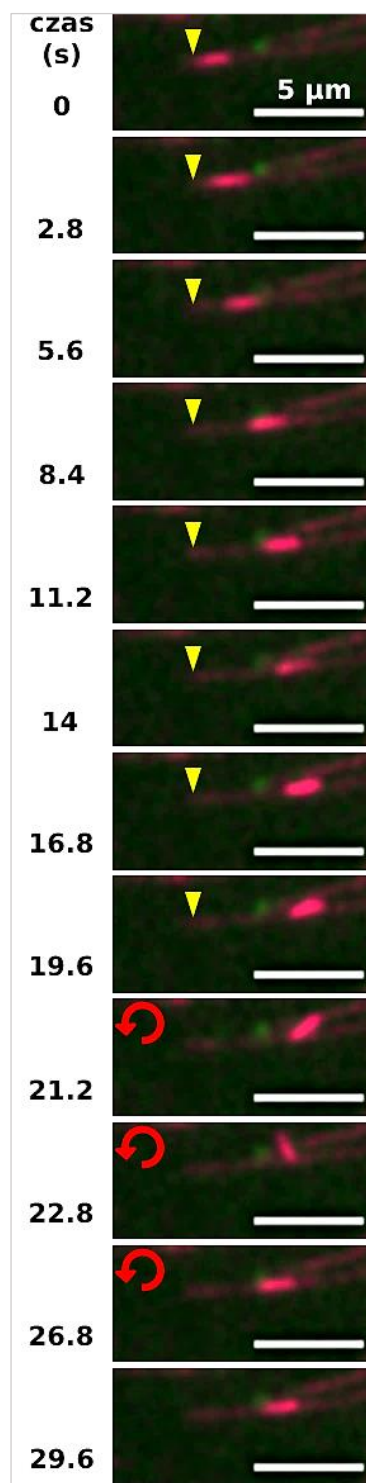


Ryc. 5.49 Montaż wybranych klatek z filmu przedstawiającego zjawisko obracania mikrotubuli ładunkowej przez kinezynę-1 (4.5 nM), które wystąpiło podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula. Żółtymi trójkątami zaznaczono miejsce startu przemieszczania mikrotubuli ładunkowej w stronę końca plus, a niebieskim – po jej obróceniu, w stronę końca minus. Końce mikrotubuli stacjonarnej zaznaczono symbolami „+” i „-” na pierwszej klatce (czas 0). Czerwoną strzałką oznaczono klatki, na których widać obracanie mikrotubuli ładunkowej



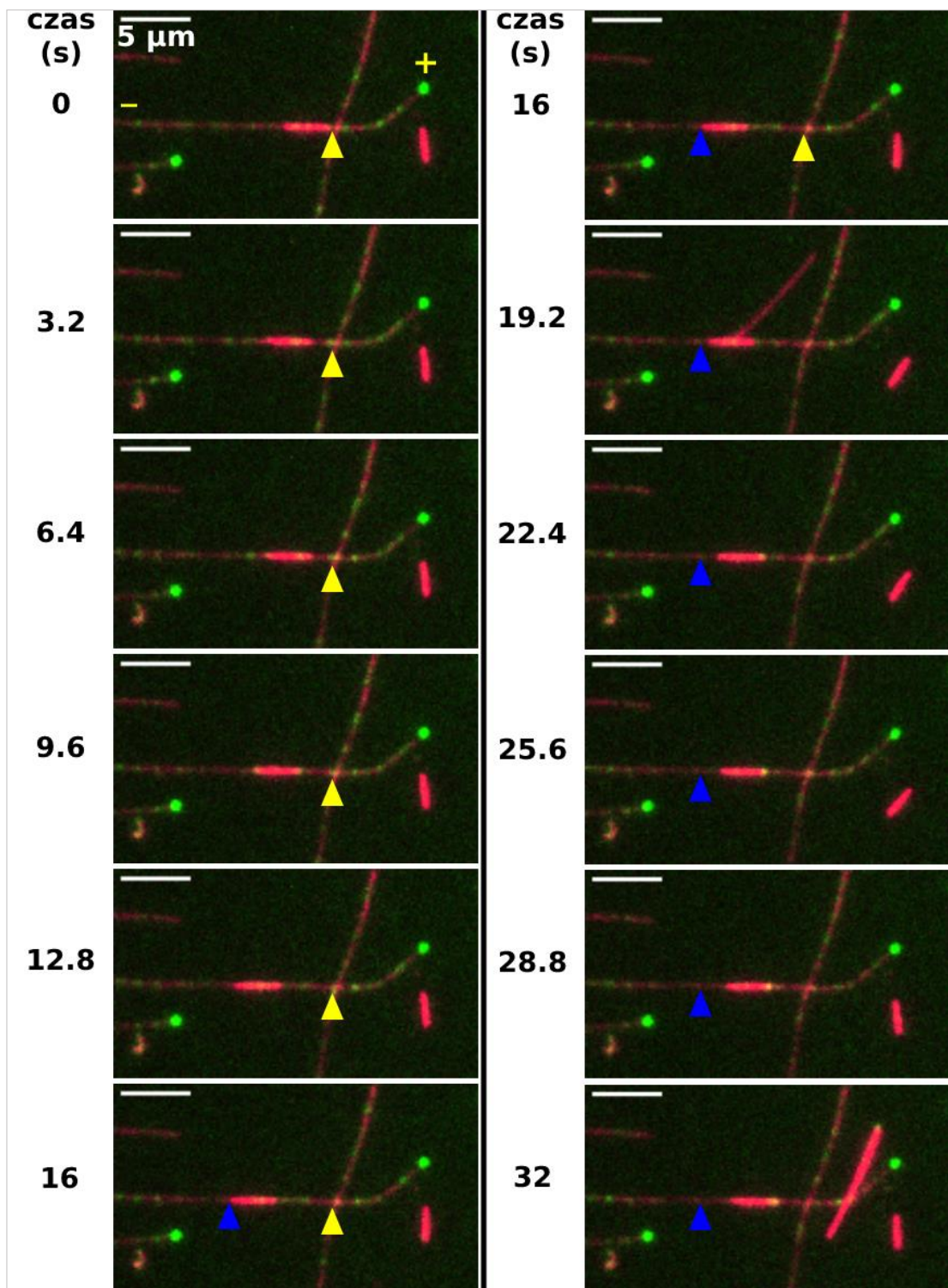
Ryc. 5.50 Kimograf pokazujący obracanie mikrotubuli ładunkowej przez kinezynę-1 (4.5 nM) i jej transport w przeciwną stronę z tego samego filmu co montaż na Ryc. 5.49. Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyzny unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyzny nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, białe – procesywny ruch kinezyzn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, niebieskie – moment obracania mikrotubuli ładunkowej

Czasem zdarzało się, że mikrotubula ładunkowa była obracana nie na końcu mikrotubuli stacjonarnej, a np. w połowie jej długości. Przykład pokazano na Ryc. 5.51.

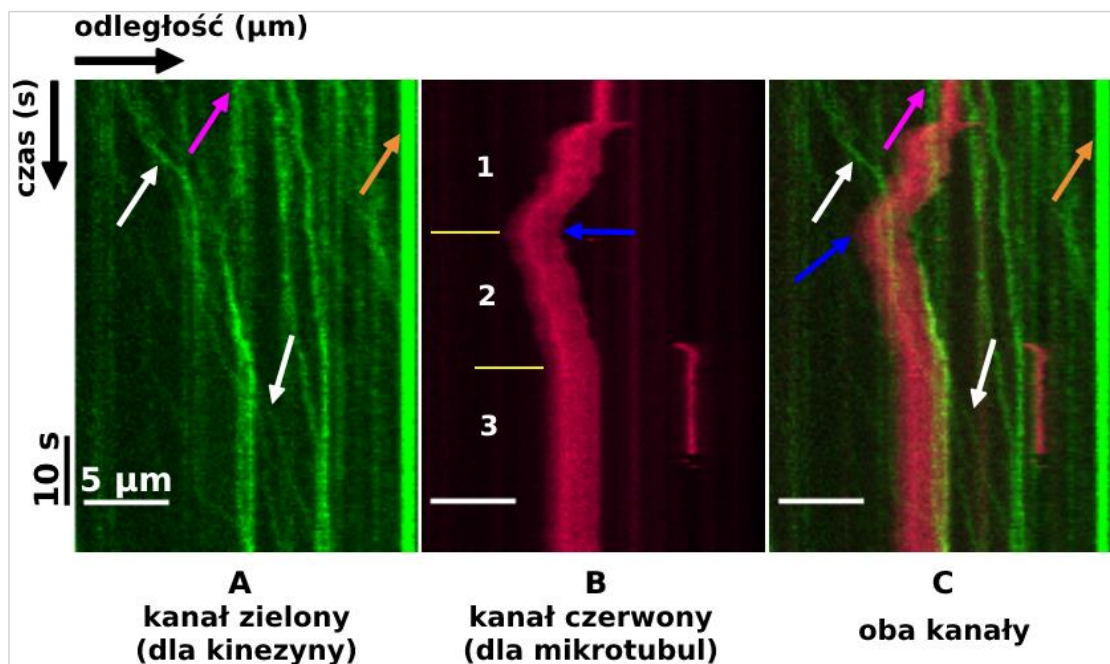


Ryc. 5.51 Montaż z filmu przedstawiającego obracanie mikrotubuli ładunkowej przez kinezynę-1 (4.5 nM) w połowie długości mikrotubuli stacjonarnej. Żółtymi trójkątami zaznaczono miejsce startu przemieszczania mikrotubuli ładunkowej, a czerwoną strzałką oznaczono klatki, na których widać obracanie mikrotubuli ładunkowej

Istnieje również kolejna możliwość, a mianowicie zmiana kierunku transportu mikrotubuli ładunkowej bez jej obracania przez cząsteczki kinezy-1. Opisywane w tym podrozdziale zjawisko jest możliwe tylko dla mikrotubul równoległych, a zaprezentowano je na Ryc. 5.52, uzupełniającym go kimografie (Ryc. 5.53) oraz Filmie 12.



Ryc. 5.52 Zmiana kierunku przemieszczania mikrotubuli ładunkowej bez zmiany jej orientacji podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula przy udziale cząsteczek kinezy-1 (3 nM). Żółtymi trójkątami zaznaczono położenie mikrotubuli ładunkowej w czasie równym 0 s, a niebieskim moment zmiany kierunku tej mikrotubuli i jej umiejscowienie w tym czasie



Ryc. 5.53 Kimograf do montażu z Ryc. 5.52 pokazujący zmianę kierunku przemieszczania mikrotubuli ładunkowej podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula napędzanego przez kinezynę-1 (3 nM). Strzałki oznaczają kolejno: różowe – kinezyne unieruchomione na mikrotubuli stacjonarnej, pomarańczowe – kinezyne nagromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej, białe – procesywny ruch kinezyn wzdłuż mikrotubuli stacjonarnej, niebieskie – moment zmiany kierunku mikrotubuli ładunkowej. Cyframi 1, 2 i 3 oznaczono poszczególne etapy ruchu mikrotubuli ładunkowej

Na kimografie (Ryc. 5.53) oddzielono poszczególne etapy przemieszczania mikrotubuli ładunkowej. Etap 1 to transport w kierunku końca minus mikrotubuli stacjonarnej zakończony zmianą kierunku ruchu (niebieska strzałka), następnie etap 2 – przemieszczanie tej samej mikrotubuli ładunkowej bez jej obracania w stronę końca minus, a 3 etap stanowił zatrzymanie transportu, innymi słowy – ta mikrotubula ładunkowa została usieciowana przez cząsteczki kinezyne-1.

5.11 Modyfikacje potranslacyjne tubuliny

Celem eksperymentów było ustalenie czy wybrane modyfikacje potranslacyjne tubuliny mają wpływ na przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie. Do badań wytypowano glutamylację, tyrozynację i detyrozynację, ponieważ wpływ tych modyfikacji na ruchliwość pojedynczych cząsteczek kinezy-1 oraz regulację transportu w komórkach został wykazany przez różne zespoły badawcze (opis w podrozdziale 1.5). Do testów ruchu mikrotubula-mikrotubula stosowano 30 nM kinezy-1, ponieważ analizy modyfikacji potranslacyjnych tubuliny wykonano przed sprawdzeniem zależności parametrów przesuwania dwóch mikrotubul od stężenia kinezy-1. Niemniej jednak uzyskane wyniki można porównać między sobą, tzn. glutamylację z kontrolą glutamylacji, a tyrozynację z detyrozynacją w celu sprawdzenia czy dana modyfikacja potranslacyjna ma wpływ na ruch mikrotubula- mikrotubula.

5.11.1 Tyrozynacja i detyrozynacja tubuliny

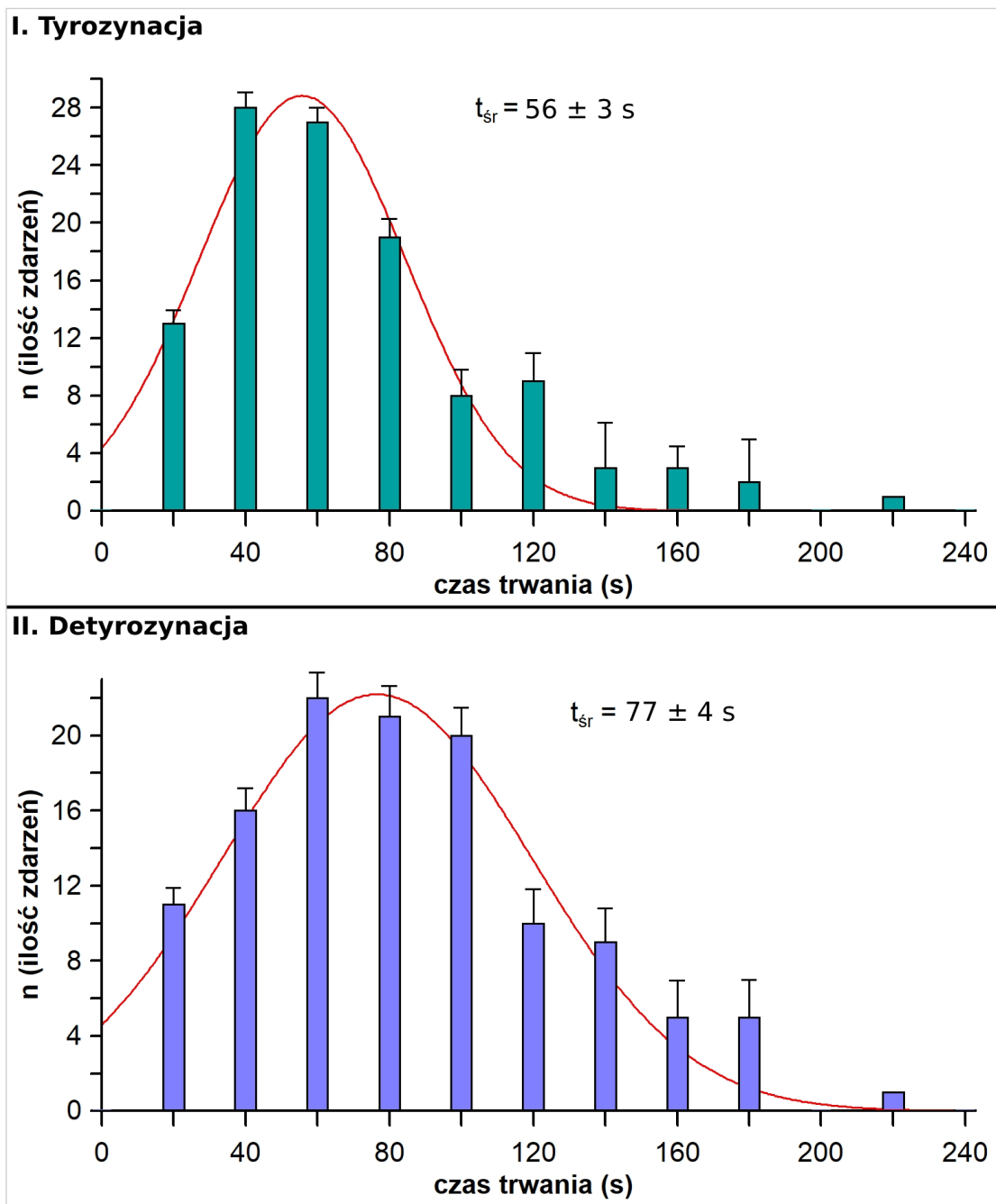
Tyrozynację przeprowadzono według procedury opisanej w podrozdziale 4.6.1, a detyrozynację według punktu 4.6.2. Występowanie obu modyfikacji sprawdzono przez Western Blot (podrozdział 4.3.2, rodzaj użytych przeciwciał i wyniki analizy w 4.6.1 dla tyrozynacji i 4.6.2 dla detyrozynacji). Porcje tubuliny tyrozynowanej i detyrozynowanej wykorzystano do przygotowania mikrotubul według protokołu opisanego w trzecim akapicie podrozdziału 4.4.5. Następnie przeprowadzono eksperymenty przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 (według procedury z podrozdziału 4.8.8) z użyciem mikroskopii TIRF, używając naprzemiennie mikrotubul tyrozynowanych i detyrozynowanych. Po zebraniu wystarczającego zasobu danych, przeprowadzono obliczenia wybranych parametrów ruchu za pomocą programu FIESTA. Uzyskane dane analizowano dalej pod kątem statystyki w programie Excel i DataWnd.

Tab. 5.2 zawiera podsumowanie wyników oraz informację na temat istotności statystycznej różnic między parametrami dla tyrozynowanych i detyrozynowanych mikrotubul w teście przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1. Chociaż zaobserwowano różnice w przypadku wartości kilku parametrów ruchu, to jedyna różnica istotna statystycznie dotyczyła czasu trwania ruchu – wyniki wskazują, że dla tyrozynowanych mikrotubul ta wartość była niższa niż dla detyrozynowanych (Tab. 5.2, Ryc. 5.54).

Tab. 5.2 Tyrozynacja i detyrozynacja tubuliny – porównanie wybranych parametrów ruchu mikrotubula-mikrotubula¹

	Tyrozynacja (n=113)	Detyrozynacja (n=120)	Istotność statystyczna różnicy
Szybkość ± SE (nm/s)	70 ± 3 (SD = 32.4)	51 ± 3 (SD = 20)	Nieistotne p = 0.097
Szybkość z uwzględnioną przerwą w ruchu ± SE (nm/s)	143 ± 6 (SD = 63)	110 ± 5 (SD = 59)	Nieistotne p = 0.097
Długość przebiegu ± SE (µm)	2.9 ± 0.06 (SD = 2.7)	2.6 ± 0.04 (SD = 2.6)	Nieistotne p = 0.9
Liczba zdarzeń na minutę (mediana)	2	1.7	Nieistotne p = 0.357
Czas trwania ruchu ± SE (s)	56 ± 3 (SD = 29)	77 ± 4 (SD = 43)	Istotne** p = 0.0036
Przerwa jako procent czasu trwania ruchu ± SE (%)	54 ± 4 (SD = 21)	57 ± 2 (SD = 18)	Nieistotne p = 0.437

¹długość przebiegu obliczona na podstawie dystrybuanty (Równanie 6); wartości pozostałych parametrów zostały odczytane z krzywej dopasowania do rozkładu normalnego (Równanie 5)



Ryc. 5.54 Rozkłady normalne czasów trwania ruchu mikrotubula-mikrotubula dla mikrotubul tyrozynowanych (I) i detyrozynowanych (II). Na każdym wykresie jest dopasowanie krzywej rozkładu normalnego (czerwone linie). t_{sr} to średni czas trwania ruchu obliczony z Równania 5. Słupki błędów to błędy standardowe (SE) obliczone dla każdego zakresu szybkości osobno (opuszczono zakresy z pojedynczymi wartościami). SD oraz n są podane w Tab. 5.2

Obliczono również korelacje (liniowe Pearsona oraz nieliniowe Spearmana) między długością mikrotubul ładunkowych a wybranymi parametrami ruchu. W przypadku tyrozynacji nie zaobserwowano żadnej zależności, a dla detyrozynacji słabą dodatnią korelację nieliniową ($r = 0.35$) między długością mikrotubuli ładunkowej a szybkością przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1.

5.11.2 Glutamylicacja tubuliny

Glutamylicację mikrotubul stacjonarnych i ładunkowych wykonano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.6.3 i sprawdzono przez analizę Western Blot (podrozdział 4.3.2, rodzaj użytych przeciwciał i wynik analizy w 4.6.3). Modyfikowane mikrotubule analizowano w teście przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1 (według opisu w podrozdziale 4.8.8) używając naprzemiennie mikrotubul glutamylowanych i kontrolnych do glutamylicacji (bez dodatku enzymu). Następnie przeprowadzono obliczenia wybranych parametrów ruchu mikrotubula-mikrotubula za pomocą programu FIESTA. Średnie wartości poszczególnych parametrów wyznaczono za pomocą programów Excel i DataWnd.

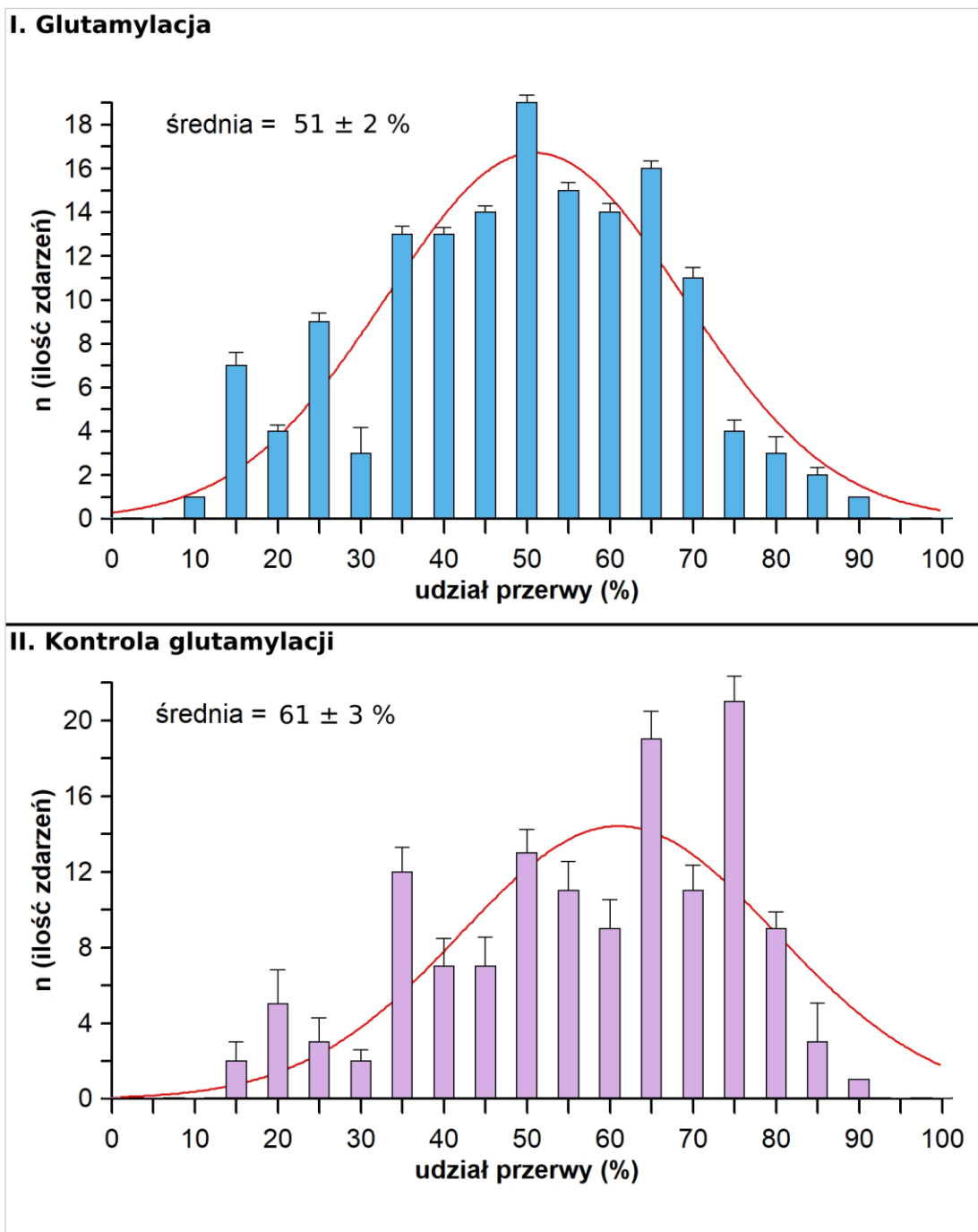
W Tab. 5.3 pokazano wpływ glutamylicacji na parametry ruchu mikrotubula-mikrotubula. Jedyną różnicą istotną statystycznie to procentowy udział przerw podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezyne-1, przy czym wykazano niższe wartości procentowe przerw w ruchu w przypadku glutamylowanych mikrotubul (Ryc. 5.55).

Tab. 5.3 Wpływ glutamylicacji tubuliny na wybrane parametry ruchu mikrotubula-mikrotubula¹

	Glutamylicacja	Kontrola glutamylicacji	Istotność statystyczna różnicy
Szybkość ± SE (nm/s)	65 ± 4 (SD = 34)	69 ± 5 (SD = 39)	Nieistotne p = 0.557
Szybkość z uwzględnioną przerwą w ruchu ± SE (nm/s)	131 ± 4 (SD = 61)	173 ± 10 (SD = 90)	Nieistotne p = 0.0899
Długość przebiegu ± SE (µm)	3.1 ± 0.04 (SD = 2.2)	3.3 ± 0.04 (SD = 2.9)	Nieistotne p = 0.917
Liczba zdarzeń na minutę (mediana)	3.8	3.5	Nieistotne p = 0.145
Czas trwania ruchu ± SE (s)	51 ± 6 (SD = 44)	49 ± 5 (SD = 35)	Nieistotne p = 0.716

Przerwa jako procent czasu trwania ruchu \pm SE (%)	51 ± 2 (SD = 18)	61 ± 3 (SD = 19)	Istotne*** $p = 0.0002$
---	----------------------	----------------------	----------------------------

¹długość przebiegu obliczona na podstawie dystrybuanty (Równanie 6); wartości pozostałych parametrów zostały odczytane z krzywej dopasowania do rozkładu normalnego (Równanie 5)



Ryc. 5.55 Rozkłady normalne procentowego udziału przerwy w ruchu mikrotubula-mikrotubula dla mikrotubul glutamylowanych (I) i kontrolnych (II). Średnie obliczone z Równania 5. Czerwone linie to krzywe dopasowania do rozkładów normalnych. Słupki błędów to błędy standardowe (SE) obliczone dla każdego zakresu szybkości osobno (opuszczono zakresy z pojedynczymi wartościami). SD oraz n są podane w Tab. 5.3

Sprawdzono również korelacje między długością mikrotubul ładunkowych a wybranymi parametrami ruchu. W przypadku kontroli glutamylacji wykazano słabą dodatnią korelację liniową dla długości przebiegu ruchu mikrotubula-mikrotubula ($r = 0.34$), słabą dodatnią korelację nieliniową dla szybkości przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie ($r = 0.33$) oraz słabą ujemną korelację nieliniową dla procentowego udziału przerw w ruchu ($r = -0.36$). Jeśli chodzi o glutamylowane mikrotubule to obliczenia pokazały słabą dodatnią korelację liniową dla długości przebiegu ($r = 0.32$) oraz słabą dodatnią korelację nieliniową dla szybkości ruchu mikrotubula-mikrotubula ($r = 0.32$).

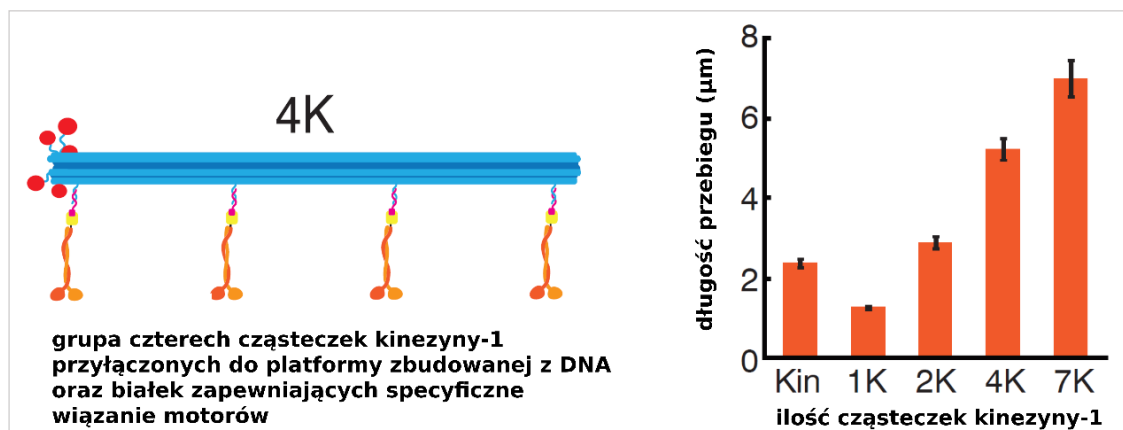
6. Dyskusja

Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez motory molekularne jest istotne w wielu procesach wewnątrzkomórkowych, takich jak ruch rzęsek, podział komórki, powstawanie wypustek komórkowych (np. aksonów), czy organizacja i polarne sortowanie mikrotubul, co przedstawiono we Wstępie tej rozprawy (1.3). W niniejszej pracy obrano za cel m.in. zbadanie mechanizmu ruchu mikrotubula-mikrotubula generowanego przez kinezynę-1 *in vitro*, ponieważ, jak dotychczas, zjawisko to było obserwowane tylko w komórkach i niewiele było wiadomo na temat tego ruchu.

6.1 Molekularne aspekty przesuwania i reorientacji mikrotubul przez pojedyncze cząsteczki lub grupy kinezyn *in vitro*

W Wynikach pokazano, że ruch mikrotubula-mikrotubula z udziałem kinezyny-1 ma znacząco odmienne parametry w porównaniu do tych uzyskiwanych w teście gliding oraz mierzonych podczas poruszania się pojedynczych cząsteczek kinezyny-1 wzdłuż mikrotubuli. Nie jest to zaskakujące, ponieważ są tu opisywane i porównywane dwa różne zjawiska: ruch mikrotubuli poruszanej przez kinezynę lub grupę kinezyn i ruch samego motoru (kinezyny-1). Gliding i ruch pojedynczych cząsteczek zachodziły szybciej niż przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie i wynosiły odpowiednio 1170 nm/s (Ryc. 5.1), 594 nm/s (Ryc. 5.2) oraz 136 nm/s (punkt 5.3.3, Ryc. 5.13). Wcześniej, Jolly i wsp (2010) zmierzili szybkość ruchu mikrotubula-mikrotubula napędzanego przez kinezynę-1 w komórkach i otrzymali wartość 70 nm/s. W przypadku innych kinezyn, szybkości przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie *in vitro* w porównaniu do szybkości osiągniętych przez pojedyncze cząsteczki wynoszą odpowiednio: dla Ncd 57 nm/s (Lüdecke i wsp., 2018) oraz 130 nm/s (Chandra i wsp., 1993), a dla Kif4a (kinezyny-4) 75 nm/s (Wijeratne i Subramanian, 2018) oraz 600 nm/s (Wijeratne i wsp., 2020). Podobnie jak niniejszej pracy, wartości szybkości ruchu mikrotubula-mikrotubula generowanego przez te kinezyny były niższe niż dla pojedynczych cząsteczek poruszających się wzdłuż mikrotubuli. Innym parametrem charakteryzującym ruch jest długość przebiegu, która dla pojedynczych cząsteczek kinezyny-1 wynosiła 0.5 μm , a w przypadku grupy motorów mikrotubula ładunkowa była transportowana na odległość 12 μm w obecności 6 nM kinezyny-1 (Ryc. 5.11). Kinezyna Kif4a wykazuje analogiczną do kinezyny-1 różnicę w długości przebiegu: 1 μm dla pojedynczych

cząsteczek (Wijeratne i wsp., 2020) i kilka μm w ruchu mikrotubula-mikrotubula (Wijeratne i Subramanian, 2018).

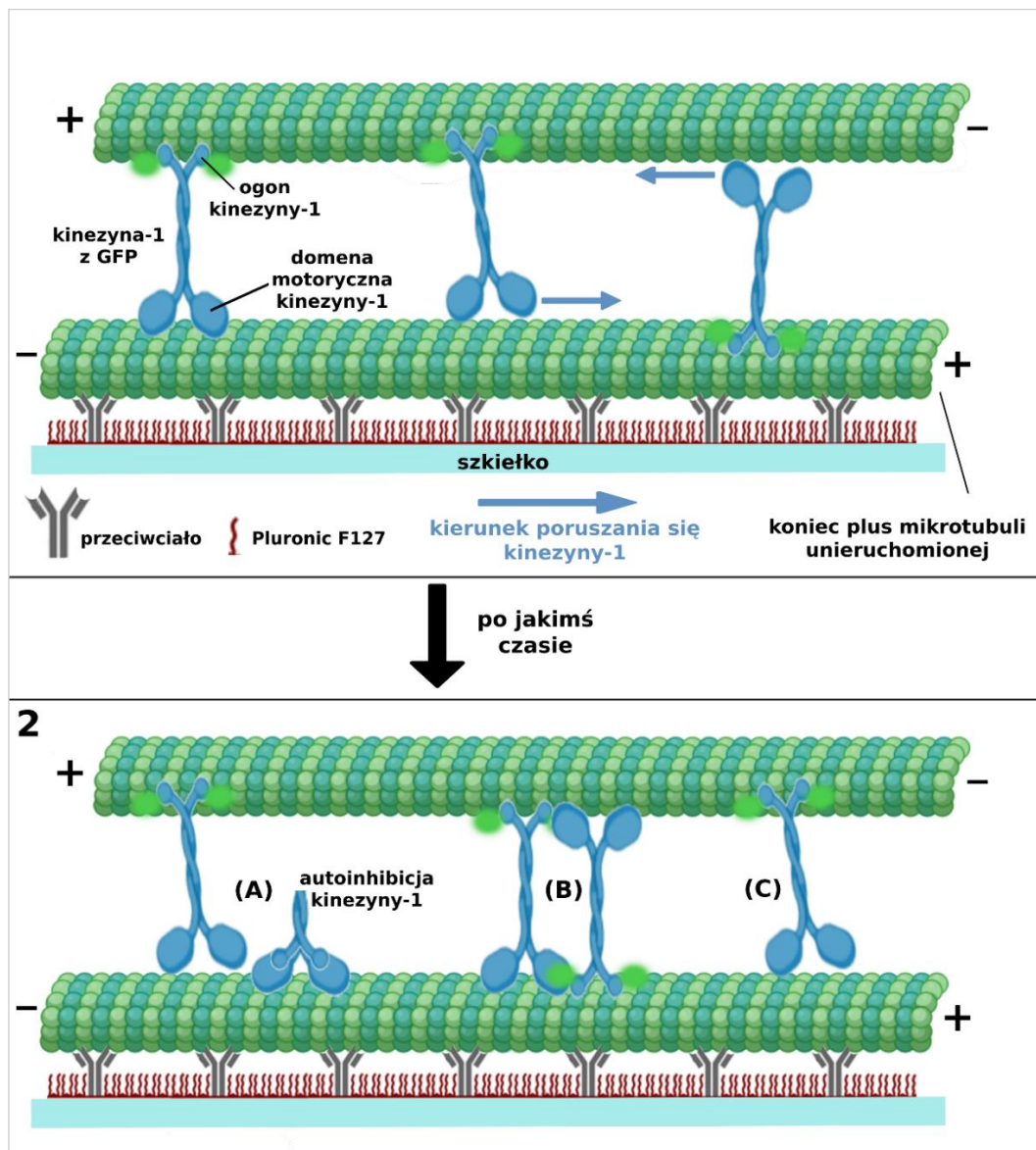


Ryc. 6.1 Zależność długości przebiegu od ilości cząsteczek kinezy-1 przyłączonych do platformy DNA (Derr i wsp., 2012; zmienione)

Transport ładunków przez grupy motorów był analizowany przez wiele grup badawczych. Generalnie, grupa motorów tego samego rodzaju wspólnie transportuje ładunek na znacznie większe odległości niż pojedyncza cząsteczka (Klump i Lipowsky, 2005; Rogers i wsp., 2009; Conway i wsp., 2012; Derr i wsp., 2012; Furuta i wsp. 2013; Norris i wsp., 2014). Aby uniknąć konieczności szacowania liczby motorów przyłączonych do mikrotubuli, Derr i wsp. (2012) badali parametry ruchliwości dla pojedynczych cząsteczek kinezy-1 oraz grup tych motorów przyłączonych trwale do wspólnej platformy (Ryc. 6.1). Przy 7 cząsteczkach kinezy-1, długość przebiegu wynosiła ok. $7 \mu\text{m}$, co ok. siedmiokrotnie przekracza przebieg osiągnięty przez jedną cząsteczkę kinezy-1 (Derr i wsp., 2012).

W niniejszej pracy często obserwowano grupy motorów, które można pomylić z agregatami (Ryc. 5.29). Jednakże, możliwość odłączenia się cząsteczki od takiej grupy widoczna na Ryc. 5.29, świadczy o tym, że obserwowane grupy nie były agregatami. Nie jest tylko jasne z iloma protofilamentami mikrotubuli oddziałuje taka grupa podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula. Na Ryc. 6.2 przedstawiono schemat ruchu dwóch antyrównoległych mikrotubul względem siebie generowanego przez 3 cząsteczki kinezy-1. Dwie cząsteczki kinezy-1 związane są z unieruchomioną mikrotubulą przez główki, a jedna przez ogon. Kiedy te motory znajdują się w odpowiedniej odległości od siebie, transport mikrotubuli ładunkowej odbywa się bez przeszkód (Ryc. 6.2, panel 1). Natomiast po pewnym czasie, na torze transportu danej mikrotubuli mogą znaleźć się inne motory, zarówno aktywne, jak i nieaktywne – w formie „złożonej”, tj. w stanie

autoinhibicji, opisanej w punkcie 1.2.5, a także uszkodzone motory. Kiedy aktywna cząsteczka kinezy-1 napotka na swoim torze ruchu inną cząsteczkę kinezy-1, która jest w stanie autoinhibicji, dochodzi do zatrzymania aktywnego motoru bądź jego dysocjacji z mikrotubuli (Ryc. 6.2, panel 2, A). Ale jeśli motor zatrzyma się i po chwili dołączą kolejne cząsteczki, wtedy utworzy się grupa. W przypadku motorów związanych w odwrotny sposób, tj. jedna część cząsteczek oddziałuje ogonami z mikrotubulą ładunkową, a druga – główkami, które znajdują się zbyt blisko siebie w wyniku procesywnego ruchu wzdłuż mikrotubul, może dojść do sytuacji, w której jeden motor stanie się dla drugiego fizyczną przeszkodą na torze ruchu (Ryc. 6.2, panel 2, B). W rezultacie, może nastąpić zatrzymanie ruchu tych cząsteczek na mikrotubuli i ich stłoczenie albo dysocjacja jednej cząsteczki kinezy lub obu od mikrotubuli, co obok niezależnej od przeszkód dysocjacji motorów z powierzchni mikrotubul, prawdopodobnie prowadzi do obserwowanych przerw w transporcie mikrotubul oraz do obniżenia średniej szybkości i dużych fluktuacji w szybkości transportu (podrozdziały 5.3.4, 5.3.3 oraz 5.5).



Ryc. 6.2 Możliwości rozmieszczenia cząsteczek kinezy-1 podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula (panel 1) oraz prawdopodobne oddziaływania między cząsteczkami kinezy-1 (panel 2)

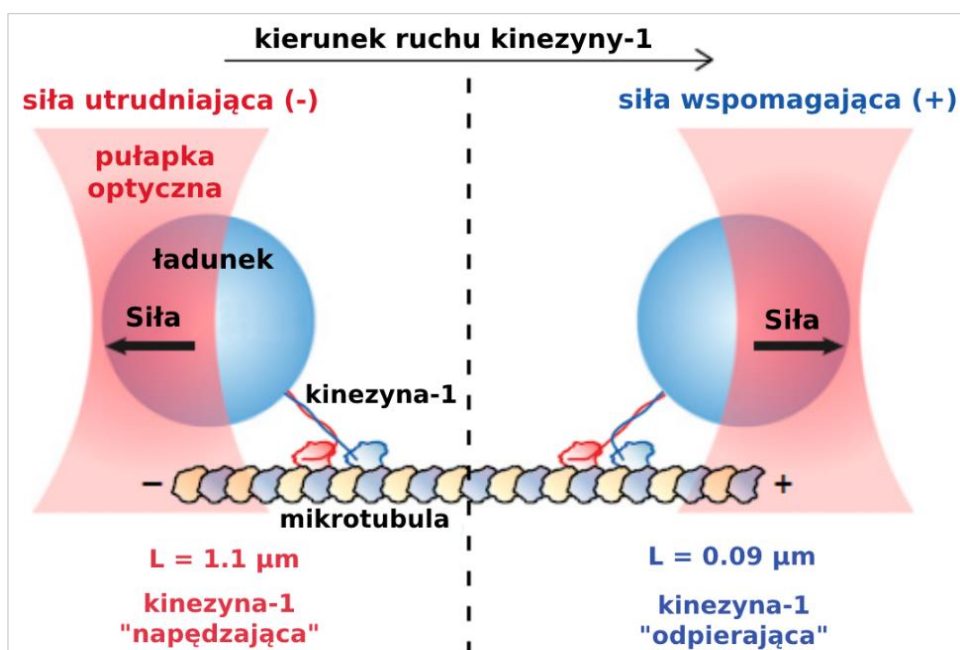
Inną przyczyną wystąpienia przerw w ruchu mikrotubula-mikrotubula może być obecność dyfundującej cząsteczki kinezy-1, która może być kolejną przeszkodą, napotkaną na mikrotubuli przez inne motory transportujące mikrotubulę ładunkową. Dyfuzję cząsteczek kinezy-1 obserwowano podczas testu ruchliwości pojedynczych cząsteczek (Ryc. 5.3, czerwone strzałki oraz żółta), jak również w ruchu mikrotubula-mikrotubula (Ryc. 5.5, 5.27, 5.33 i 5.35; oznaczone czerwonymi strzałkami).

Wpływ nieaktywnych motorów na transport był obserwowany także dla innych, niż kinezy-1, motorów: Kang'iri i wsp. (2022) zaobserwowali, że wydajność transportu filamentów aktynowych przez ciężką meromiozynę w teście typu gliding zależy od udziału frakcji aktywnych motorów w stosunku do wadliwych. Ponad 90% cząsteczek

meromiozyny, związanych z powierzchnią musi pozostać aktywnych, aby zapewnić efektywny transport. Meromiozyna jest bardziej wrażliwa na obecność uszkodzonych motorów niż kinezyna-1, w przypadku której wystarczy 70% aktywnych cząsteczek (Kang'iri i wsp., 2022; Scharrel i wsp., 2014).

Założmy, że jak w przypadku B (Ryc. 6.2, panel 2) jeden motor pozostanie nieruchomy na mikrotubuli (brak dysocjacji) i blokuje transport. Można się spodziewać, że jeśli w pewnej odległości od zatrzymanej kinezyny-1 znajdą się np. dwa lub więcej aktywnych motorów to transport mikrotubuli ładunkowej zostanie wznowiony. Jeśli natomiast będzie tylko jeden aktywny motor, tak jak w przypadku C (Ryc. 6.2, panel 2), wznowienie transportu będzie zależało od indywidualnych właściwości danego motoru, a konkretnie od siły, jaką jest w stanie wygenerować; dla kinezyny-1 ta siła wynosi od 5 do 7 pN (Schnitzer i wsp., 2000; Block, 2007). Taka siła jest wystarczająca do oderwania innego – zatrzymanego motoru od mikrotubuli, a tym samym umożliwia kontynuację ruchu mikrotubula-mikrotubula. Ewentualny czas, potrzebny na przyłączenie większej ilości cząsteczek kinezyny-1, które pozwolą na wznowienie transportu, może też być jednym z czynników powodujących obserwowane fluktuacje szybkości i przerwy w ruchu.

Warto też wymienić badania, w których do pojedynczej cząsteczki kinezyny-1 transportującej ładunek przyłożono siłę i przeciągano ładunek albo w tę samą stronę co kierunek ruchu, albo w przeciwną. W rezultacie, zaobserwowano asymetryczne rozkłady szybkości (dwa piki zamiast jednego) w funkcji przyłożonej siły (Coppin i wsp., 1997) lub długości przebiegu (również w funkcji siły, Milic i wsp., 2014) dla tej samej cząsteczki poddanej sekwencyjnie dwóm przeciwstawnym obciążeniom. Stany, jakim ulegała kinezyna-1 poddana tym siłom określono jako „napędzający” i „odpierający” (terminy pierwszy raz występujące u Tjioe i wsp., 2019, ang. *driving* i *resisting*; Ryc. 6.3 i 6.4). W położeniu „napędzającym” kinezyna-1 porusza się w kierunku końca plus mikrotubuli i jednocześnie jej segment superhelikalny jest nachylony pod pewnym kątem w stosunku do osi mikrotubuli i przeciwnie do kierunku ruchu. W stanie „odpierającym” kinezyna-1 jest ustawiona również pod kątem, ale w tym samym kierunku, co ruch pojedynczych cząsteczek.

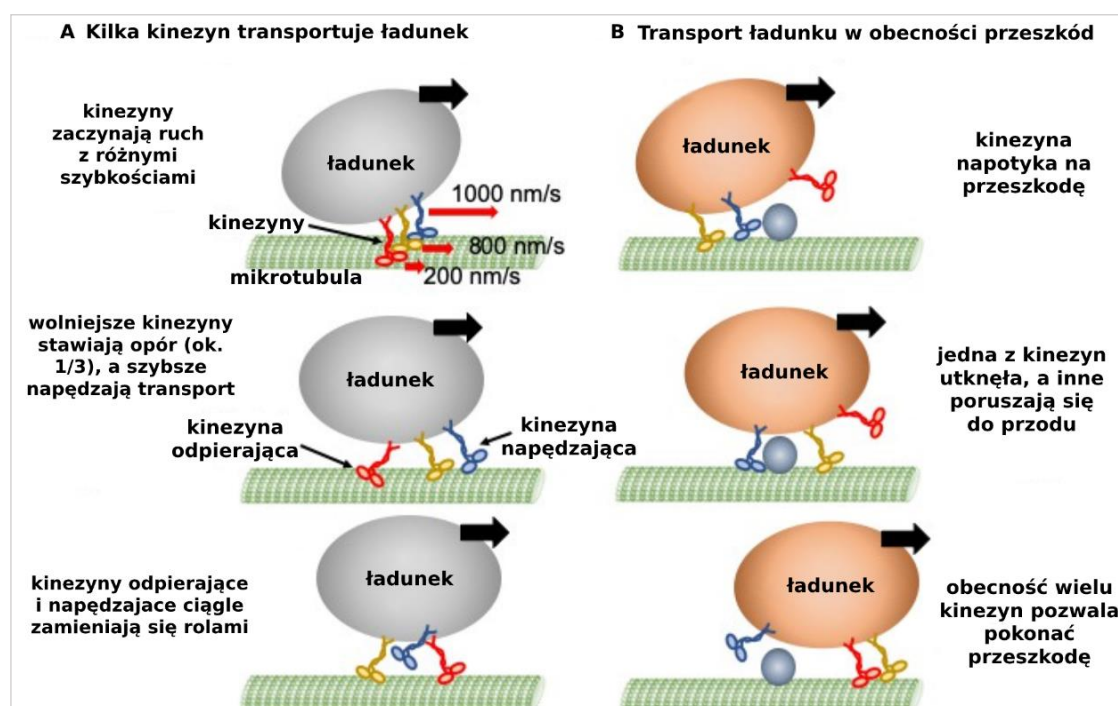


Ryc. 6.3 Fizyczne ułożenie oraz długość przebiegu (L) kinezy-1 w zależności od kierunku działania przyłożonej siły (Milic i wsp., 2014; zmienione)

Jeśli zewnętrzna siła była skierowana w tym samym kierunku, co transport, to obserwowano wzrost szybkości, jeśli w przeciwnym – jej spadek, a brak przyłożonej siły stabilizował szybkość (Coppin i wsp., 1997). Z kolei Milic i wsp. (2014) zaobserwowali, że długość przebiegu gwałtownie rośnie dla kinezy „napędzającej” podczas zmniejszania siły od -4 do 0 pN (znak minus „-” oznacza kierunek przyłożenia siły). W przypadku siły przeciągającej kinezynę zgodnie z kierunkiem transportu (stan „odpierający”) obserwowane długości przebiegu były o rząd wielkości mniejsze niż w przypadku siły skierowanej przeciwnie do kierunku ruchu, co przypuszczalnie było spowodowane zmianą dynamiki odłączania domeny motorycznej od mikrotubuli podczas procesywnego ruchu cząsteczki (Milic i wsp., 2014).

Przy użyciu testu gliding z pomiarem generowanej siły (ang. *force-gliding assay*) Tjioe i wsp. (2019) potwierdzili eksperymentalnie występowanie kinezy-1 w położeniu „napędzającym” (2/3 motorów pracujących wspólnie) i w „odpierającym” (1/3). Ponadto, kinezy mogą przechodzić z jednego stanu do drugiego albo odłączać się od mikrotubuli („równowaga”), (Tjioe i wsp., 2019). Podczas transportu tej samej mikrotubuli przez kilka cząsteczek kinezy-1, zaobserwowano różnice w długości przebiegu: 2.31 μm dla stanu „napędzającego” i 1.42 μm dla „odpierającego”, co doprowadziło do wniosku, że między kinezynami znajdującymi się w tych dwóch różnych stanach istnieje oddziaływanie (rodzaj naprężenia, powstałego w wyniku wiązania tego samego ładunku przez kilka motorów).

Obecność kilku cząsteczek kinezy-1 przyłączonych do ładunku pozwala na pokonanie przeszkody bez spowolnienia transportu (Ryc. 6.4). Pojedyncza cząsteczka trafiająca na przeszkodę albo zatrzymuje się i czeka, albo od razu się odłącza (Schneider i wsp., 2015). Natomiast funkcjonując w zespole, jeśli jedna cząsteczka zostanie zatrzymana przez przeszkodę, pozostałe wywierają na nią siłę, pozwalającą szybciej dysocjować stojącej cząsteczce od mikrotubuli i przyłączyć w innym miejscu (albo odłączyć się od kompleksu mikrotubuli i ładunku), a transport pozostaje niezakłócony (Tjioe i wsp. 2019). Jest to ważny aspekt, bo na mikrotubulach w komórce są obecne cząsteczki różnych motorów czy niemotorycznych białek wiążących mikrotubule (Lakadamyali, 2014).



Ryc. 6.4 Transport ładunku przez kilka kinezyn (Tjioe i wsp., 2019; zmienione)

Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezy-1 odbywa się w warunkach, w których kilka motorów przyłącza się do transportowanej mikrotubuli. W tych warunkach, część motorów może być w stanie „napędzającym”, a część – w „odpierającym”. Ponadto, w przypadku ruchu mikrotubula-mikrotubula nie tylko domena motoryczna może odłączyć się od jednej z mikrotubul, ale też ogon kinezy-1, który raczej słabo wiąże się z mikrotubulą ($K_D \sim 0.5 \mu M$; Seeger i Rice, 2010). Można przypuszczać, że wiele cząsteczek motoru i różne oddziaływania ogona i domeny motorycznej z mikrotubulą umożliwiają pokonanie przeszkód podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula – czy tych powstałych wskutek konkurencji między cząsteczkami lub oddziaływania motorów między sobą, czy fizycznych, np. nieaktywnych

motorów lub zanieczyszczeń, które nie są motorami. Obecność co najmniej kilku (wielu) motorów przyłączonych do transportowanego ładunku zapobiega również natychmiastowej terminacji transportu po napotkaniu przeszkody, ponieważ nie wszystkie motory odłączą się w wyniku kontaktu z przeszkodą.

6.2 Zależność parametrów ruchu mikrotubula-mikrotubula od stężenia kinezy-1

Długość przebiegu (Ryc. 5.11) i szybkość (Ryc. 5.13) przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 zależą od stężenia motoru. Do stężenia 6 nM kinezy-1, obserwuje się wzrost wartości obu parametrów, a potem, w miarę dalszego podnoszenia stężenia motoru, szybkość i długość przebiegu maleje. Najmniejsze stężenie kinezy-1 jakie badano to 1.5 nM. Przy tym stężeniu szybkość była dwukrotnie niższa od wartości uzyskanych dla 6 nM, a długość przebiegu była czterokrotnie mniejsza. Przy stężeniu 1.5 nM kinezy-1 zaobserwowano też najniższą liczbę zdarzeń na minutę (Ryc. 5.16). Było to jednocześnie minimalne stężenie, przy którym wystąpił ruch mikrotubula-mikrotubula. Badania w niniejszej pracy po raz pierwszy pokazują zależność parametrów ruchu mikrotubula-mikrotubula od stężenia kinezy-1 podczas tego ruchu. W literaturze są dostępne jedynie badania dotyczące wpływu niskich gęstości kinezy-1, tj. liczby motorów na jednostkę długości (μm) mikrotubuli, na szybkość w teście gliding. Wyniki tych badań są jednak raczej rozbieżne. Kaneko i wsp. (2020) pokazali, że szybkość uzyskiwana przez kinezynę-1 (aminokwasy 1-465) w teście gliding była niezależna od gęstości motorów na szkiełku. Bieling i wsp. (2008b) zaobserwowali, że przy niskich gęstościach skróconej formy kinezy-1, obejmującej aminokwasy 1-401, szybkość transportu mikrotubul w teście gliding była nieznacznie niższa, niż w przypadku gęstości motorów standardowo używanych w tym teście. Z kolei, Gagliano i wsp. (2010) zaobserwowali obniżenie szybkości w teście gliding przy niskiej gęstości cząsteczek kinezy-1 pełnej długości.

Rozważmy wpływ stężenia kinezy-1 na szybkość przesuwanej mikrotubuli. W przypadku, gdy transportowany ładunek jest mały lub bliski zera, szybkość jego przesuwania będzie bliska szybkości maksymalnej i nie będzie zależeć od stężenia motorów (Fallesen i wsp. 2011). W przypadku obecności większego ładunku, symulacje komputerowe Korna i wsp. (2009) i doświadczenia Gagliano i wsp. (2010) doprowadziły

do wniosku, że szybkość transportu przy dużym oporze ładunku rośnie wraz ze wzrostem ilości motorów biorących udział.

W tym miejscu nasuwa się pytanie ile cząsteczek kinezy-1 uczestniczyło w transporcie jednej mikrotubuli wzdłuż drugiej. Brakuje bezpośrednich pomiarów tego parametru i nie ma pewności czy w obecnych warunkach takie pomiary byłyby wykonalne. Kushwaha i wsp. (2020) mierzyli stopień dekoracji mikrotubul przez kinezynę-2 metodą fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej. Oprócz wartości dla kinezy-2 w cytowanym artykule umieścili oni porównawcze wartości dla kinezy-1 z *D. melanogaster*. Mierzono parametry ruchu dla pojedynczych cząsteczek kinezyn poruszających się wzdłuż mikrotubul (Kushwaha i wsp., 2020; Miedema i wsp., 2017) i uzyskano prawie liniową zależność pomiędzy całkowitym stężeniem kinezy-1 a gęstością motorów. Wartości uzyskane dla zakresu stężeń kinezy-1 używanych w tej rozprawie wynosiły od 0.1 do 2 motorów na μm mikrotubuli. Stosunkowo niewielkie liczby cząsteczek kinezy-1 podtrzymującej ruch mikrotubul znajdują potwierdzenie w pracy Gagliano i wsp. (2010), którzy otrzymali wartość gęstości motorów w analizie typu gliding wynoszącą 0.17 cząsteczek/ μm dla niskich stężeń kinezy-1 (250 motorów na μm^2) i 0.35/ μm dla wysokich (1000 motorów na μm^2). Po przeliczeniu na 25- μm mikrotubulę transportowaną w teście gliding, spodziewane ilości cząsteczek wynoszą ~ 4 i 9 kinezyn przy odpowiednio, niskim i wysokim stężeniu kinezy-1. Wszystkie te wartości są szacunkowe i nie dotyczą dokładnie tego samego typu analizy, która była wykonywana tutaj, ale pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie zachodzi z udziałem małej (<10) grupy motorów.

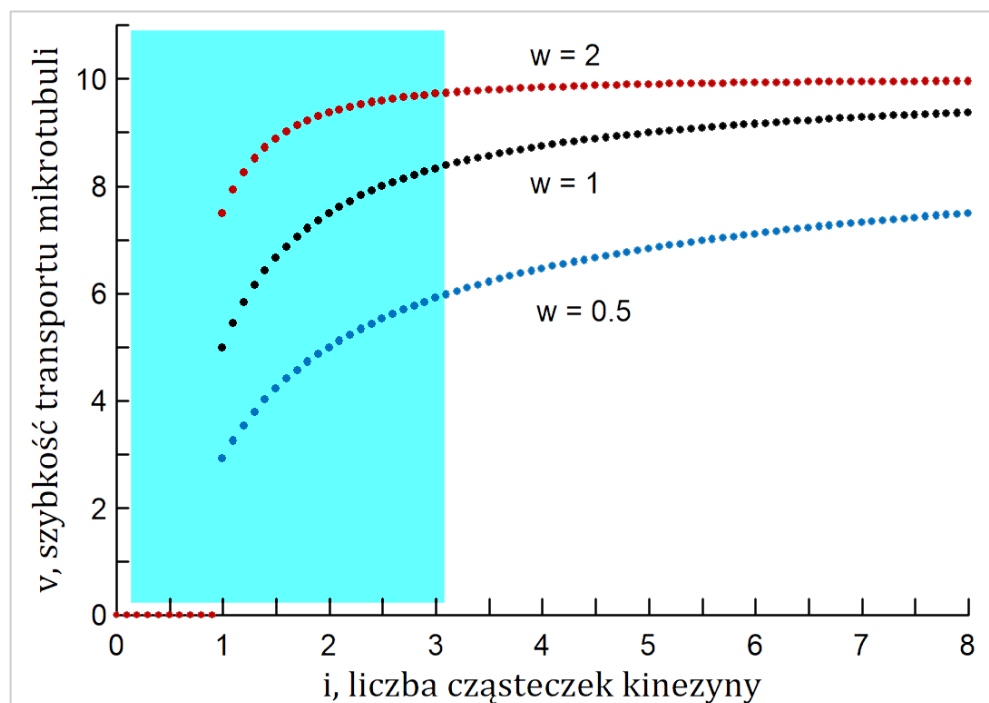
Zależność szybkości transportu ładunku (mikrotubuli) $v(F, i)$ od siły generowanej przez grupę kinezyn można opisać równaniem (Kunwar i Mogilner, 2010):

$$v(F, i) = v_u \left[1 - \left(\frac{F}{i F_s} \right)^w \right]$$

Równanie 7 Zależność między szybkością transportu a siłą generowaną przez grupę kinezyn, gdzie v_u – szybkość bez obciążenia (ładunku); F – aktualna siła; F_s siła, potrzebna na zatrzymanie transportu mikrotubuli generowanego przez 1 cząsteczkę motoru (ang. *stall force*); $i \cdot F_s$ – siła, która zatrzymuje transport generowany przez i cząsteczek; w – opisuje typ zależności siła–szybkość.

Dla $w = 1$, Równanie 7 opisuje liniową zależność siła–szybkość i wykładniczo zmieniającą się długość przebiegu (Keren i wsp., 2008). Jak widać z wykresu (Ryc. 6.5) szybkość transportu wzrasta z ilością cząsteczek kinezy-1, również dla nieliniowych

zależności siła–szybkość ($w \neq 1$). Taki wzrost zachodzi w największym stopniu przy niskich stężeniach kinezyiny, kiedy efekty przeszkód w poruszaniu się mikrotubuli transportowej są niewielkie (niebieski obszar na Ryc. 6.5). Przy wyższych stężeniach kinezyiny szybkość wysyca się.



Ryc. 6.5 Szybkość transportu mikrotubuli w funkcji liczby cząsteczek kinezyiny-1 z uwzględnieniem liniowych ($w=1$) oraz nieliniowych ($w \neq 1$) zależności siła-szybkość. Wartości szybkości obliczono z Równania 7. Niebieskim obszarem oznaczono fragment, w którym widać największą zmianę szybkości w zależności od stężenia kinezyiny-1

Jednak w miarę zwiększania stężenia motorów inne zjawisko staje się coraz bardziej widoczne. Jest nim wpływ przeszkód na mikrotubuli, czego widocznym efektem jest malejąca szybkość i długość przebiegu dla stężeń kinezyiny >7.5 nM. Prowadzi to do powstania maksimum na krzywej szybkości oraz długości przebiegu w funkcji stężenia kinezyiny-1 (Ryc. 5.13 i 5.11).

Typy przeszkód na jakie może natrafić poruszająca się kinezyina-1 są różnorakie i częściowo były wymienione powyżej. Najważniejszą przeszkodą są cząsteczki samej kinezyiny w stanie autoinhibicji (1.2.5); inną – kinezyiny związane ogonem do mikrotubuli, albo cząsteczki kinezyn, które zajmując miejsce na mikrotubuli uniemożliwiają wykonanie następnego kroku, jak również nieaktywne (uszkodzone) cząsteczki kinezyiny związane niefunkcjonalnymi główkami, czy zanieczyszczenia inne niż motory. Obecność takich przeszkód może stanowić jedną z przyczyn występowania przerw w ruchu mikrotubula-mikrotubula (Ryc. 5.15) oraz wyraźnych fluktuacji szybkości,

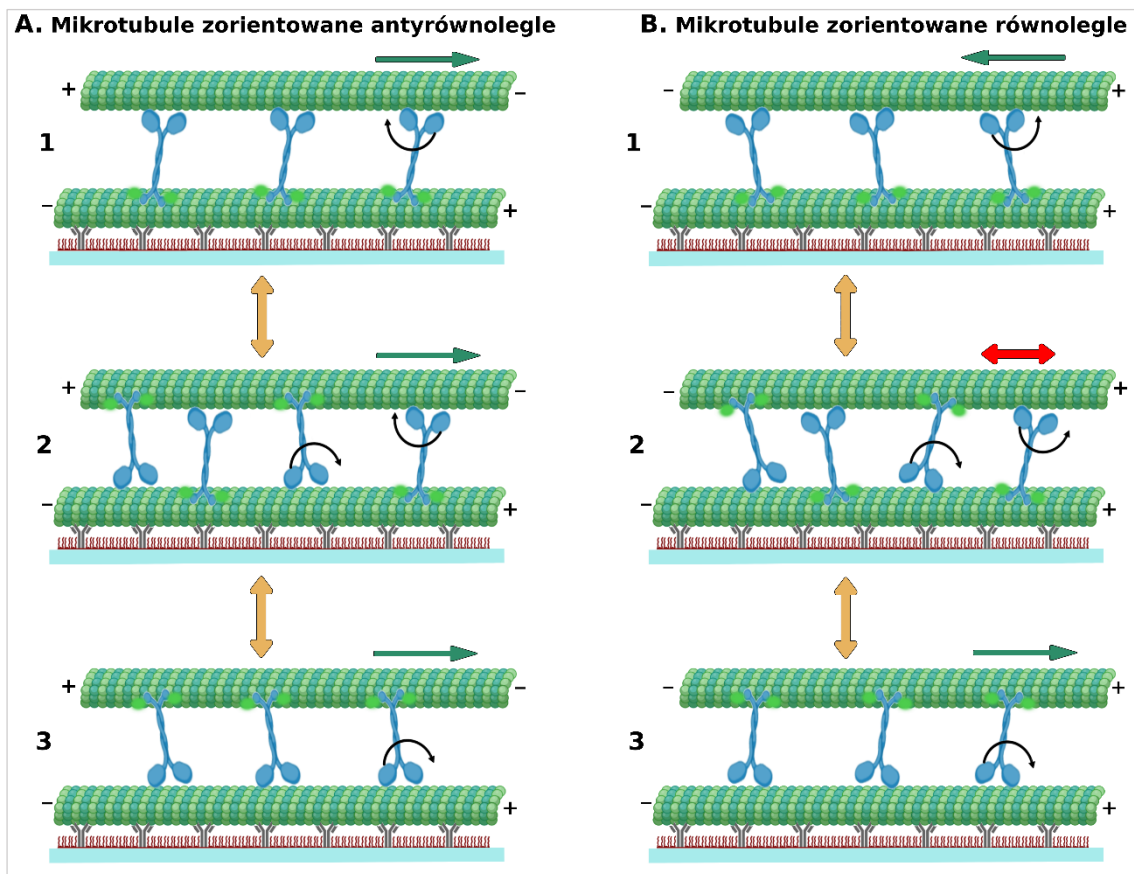
które nie były tak częste w teście gliding (podrozdział 5.5). Poza tym, przerwy obserwowane w ruchu mikrotubula-mikrotubula w tej pracy, mogą być też spowodowane tym, że cząsteczki kinezy-1 poruszają się z różnymi szybkościami, co widać na kimografie obrazującym ruch pojedynczych cząsteczek kinezy-1 (Ryc. 5.3). Obniżenie szybkości ruchu mikrotubula-mikrotubula przy wyższych stężeniach kinezy-1 jest zgodne z wynikami Telleya i wsp. (2009), którzy badali wpływ przeszkód na mikrotubuli na ruchliwość pojedynczych cząsteczek kinezy-1 (wariant motoru obejmujący aminokwasy 1-401) i ich długość przebiegu. Stwierdzono stopniowe obniżenie zarówno szybkości ruchu, jak i długości przebiegu i – co warte uwagi – zachodzące w podobnym zakresie stężeń, jak w obecnej pracy. Wyniki Telleya i wsp. (2009) wykorzystano później do stworzenia bardziej ogólnego opisu roli przeszkód w ruchu kinezy-1 (Rank i Frey, 2018). Warto też zauważyć, że doświadczalnie zmierzona szybkość poruszania się ładunków, do których dołączone były cząsteczki kinezy-1, pokazana jako funkcja stężenia motoru wykazywała maksimum przy wartości ok. 7 nM kinezy-1 (Conway i wsp., 2012), podobnie jak u Ross (2012), a także w obecnej pracy.

Można się zastanawiać, w jakim stopniu wyniki doświadczeń *in vitro* opisują zachowanie motorów molekularnych, a w szczególności kinezy-1, także w komórkach. Przykładowo, w artykule Cai i wsp. (2007b) opisano pomiary ruchliwości i długości przebiegu kinezy-1 pełnej długości (1-891) *in vitro* i w komórkach. Wyniki tych pomiarów były bardzo zbliżone, ale nie wyklucza to konieczności przeprowadzania badań zarówno *in vitro* jak i w komórkach.

6.3 Kinezy-1 podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula transportuje zarówno antyrównoległe, jak i równoległe mikrotubule

Mikrotubule podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula mogą być ułożone równoległe (końce plus obu mikrotubul są po tej samej stronie) lub antyrównoległe (końce plus obu mikrotubul są po przeciwnych stronach). Lu i Gelfand (2017) uważali, że kinezy-1 prawdopodobnie wiąże się z dwiema mikrotubulami w przypadkowej orientacji – statystycznie 50% oddziałuje z mikrotubulą przez domenę motoryczną, a 50% z tą samą mikrotubulą przez ogon. Autorzy ci (Lu i Gelfand, 2017) proponowali, że kinezy-1, podobnie jak kinezy-14, przesuwają względem siebie tylko antyrównoległe mikrotubule, a równoległe sieciuje. Konsekwencją przesuwania względem siebie antyrównoległych mikrotubul jest transport mikrotubuli ładunkowej tylko w jednym

kierunku – do końca plus mikrotubuli stacjonarnej, co obrazuje Ryc. 6.6 (panel A). Jednakże, już w pierwszych doświadczeniach nad ruchem mikrotubula-mikrotubula opisanych w niniejszej pracy zaobserwowano dwukierunkowy transport mikrotubul ładunkowych (podrozdział 5.7). Transport mikrotubul ładunkowych w stronę końca minus stanowił ok. 30% zdarzeń ruchu mikrotubula-mikrotubula. (Wykorzystano dane uzyskane dla wszystkich analizowanych stężeń kinezy-1 omówionych w podrozdziale 5.3). Logicznym wyjaśnieniem transportu mikrotubul ładunkowych w stronę końca minus mikrotubuli stacjonarnej było przesuwanie równoległych mikrotubul względem siebie przez cząsteczki kinezy-1 związane ogonami do mikrotubuli stacjonarnej (pokazane na schemacie – Ryc. 6.6, B1). Przesuwanie równoległych mikrotubul przez kinezynę-1 było sugerowane w teoretycznej publikacji (Allard i wsp., 2019), w której matematycznie analizowano możliwość występowania tego zjawiska. W niniejszej pracy eksperymenty z użyciem mikrotubul ładunkowych polarnie znakowanych (dzięki którym można było odróżnić końce mikrotubul ładunkowych), wykazały, że kinezy-1 przesuwa nie tylko mikrotubule antyrównoległe, ale też równoległe (podrozdział 5.8). Ponadto, wykazano, że mikrotubule równoległe mogą być transportowane nie tylko do końca minus (Ryc. 5.34 i 5.35), ale też do końca plus (Ryc. 5.36 i 5.37) mikrotubuli stacjonarnej. Zatem, istnieją trzy możliwości występowania ruchu mikrotubula-mikrotubula: przesuwanie względem siebie antyrównoległych mikrotubul, transport równoległych mikrotubul w stronę końca minus i transport równoległych mikrotubul w stronę końca plus mikrotubuli stacjonarnej. Uwzględnienie różnych sposobów wiązania się kinezy-1 między dwiema mikrotubulami powiększa liczbę możliwości do sześciu, co pokazano na poniższym schemacie (Ryc. 6.6). Należy pamiętać, że możliwości A1, A3, B1 i B3 są sytuacjami krańcowymi i prawdopodobnie rzadko istnieją w rzeczywistym układzie dwóch mikrotubul z kinezyną-1 zarówno *in vivo* lub *in vitro*. Można tylko mówić o dominującym sposobie wiązania się cząsteczek kinezy-1 w pokazanych na schemacie opcjach (Ryc. 6.6).



Ryc. 6.6 Schemat przedstawiający możliwości ułożenia mikrotubul i wiązania się cząsteczek kinezy-1 podczas ruchu mikrotubula-mikrotubula. Zielone strzałki oznaczają kierunek transportu mikrotubuli ładunkowej, czarne półokrągłe – kierunek poruszania się cząsteczek kinezy-1, szeroka czerwona – oznacza ruch oscylacyjny mikrotubuli ładunkowej, a szerokie pomarańczowe – możliwość zmiany dominującego sposobu wiązania się kinezy-1 w wyniku dysocjacji i/lub asocjacji cząsteczek motoru

Pierwszy sposób to transport mikrotubuli ładunkowej zorientowanej antyrównolegle względem mikrotubuli stacjonarnej, co przedstawiają ilustracje z Wyników (Ryc. 5.32 i 5.33) oraz Ryc. 6.6, panel A. W tym przypadku, cykl mechanochemiczny motorów przyłączonych główkami do mikrotubuli unieruchomionej (A3), jak i transportowanej (A1) prowadzi do przesuwania mikrotubuli ładunkowej w kierunku końca plus mikrotubuli unieruchomionej.

W przypadku przesuwania względem siebie mikrotubul zorientowanych antyrównolegle, ewentualna losowa dysocjacja/asocjacja motorów i wynikające z tego przekształcenie z wariantu A1 lub A3 do A2 nie spowoduje zmiany kierunku ruchu transportowanej mikrotubuli, ani nie doprowadzi do oscylacyjnego transportu mikrotubuli ładunkowej (tzw. „przeciągania liny”, ang. *tug-of-war*), które miałyby miejsce w przypadku przesuwania względem siebie mikrotubul równoległych (Ryc. 6.6, B2). Zatem, niezależnie od sposobu wiązania się między mikrotubulami antyrównoległymi, cząsteczki kinezy-1 transportują mikrotubulę ładunkową zawsze

w tym samym kierunku (Ryc. 6.6, A). Ważne jest również to, że ewentualne zakłócenia transportu mikrotubuli (np. przerwy) mogą się pojawić dopiero, gdy dwie cząsteczki kinezy-1 związane odmiennie, tzn. jedna przez główkę, a druga przez ogon, znajdą się zbyt blisko siebie (Ryc. 6.2, panel 2). Jednakże, ponieważ niewiele cząsteczek kinezy-1 uczestniczy w ruchu mikrotubula-mikrotubula, takie zjawisko jest prawdopodobnie rzadkie.

W przypadku mikrotubul równoległych, kierunek transportu zależy od tego czy więcej cząsteczek kinezy-1 jest związanych poprzez ogony czy główki do mikrotubuli ładunkowej. Podczas transportu mikrotubuli równoległej w kierunku końca minus mikrotubuli stacjonarnej więcej cząsteczek kinezy-1 oddziałuje główkami z mikrotubulą ładunkową, więc wypadkowa siła kieruje ładunek w stronę końca minus mikrotubuli stacjonarnej (Ryc. 6.6, B1). Doświadczalnie pokazano to na Ryc. 5.28 oraz 5.29, a także Ryc. 5.34 i 5.35. Warto zauważyć, że B1 jest jedyną możliwością, w której ruch mikrotubuli ładunkowej odbywa się w kierunku minus. Jeśli większość motorów zwiąże się ogonami do mikrotubuli ładunkowej zorientowanej równolegle względem mikrotubuli stacjonarnej, to mikrotubula ładunkowa będzie transportowana w stronę końca plus mikrotubuli stacjonarnej. Udowodniono to za pomocą mikrotubul polarnie znakowanych (Ryc. 5.36 i 5.37), jak również pokazano na schemacie (Ryc. 6.6, B3). Jednakże, motory dysocjują z każdej z mikrotubul i przyłączają się do tej samej lub innej mikrotubuli. Może to doprowadzić do dynamicznych zmian dominującego sposobu wiązania się cząsteczek kinezy-1, np. z B3 do B2 i potem do B1, albo z A3, przez A2 do A1.

Panele A2 i B2 obrazują zjawisko, w którym około 50% cząsteczek kinezy-1 jest związana ogonami do mikrotubuli ładunkowej i drugie 50% główkami – chodzi tylko o cząsteczki kinezy-1 jednocześnie oddziałujące z mikrotubulą stacjonarną. O ile dla mikrotubul antyrównoległych nie ma to wpływu na przebieg ruchu, to w przypadku mikrotubul równoległych sytuacja się komplikuje. Motory związane na dwa różne sposoby będą ze sobą współzawodniczyć – generować siły w przeciwnych stronach (Ryc. 6.6, B2). Dość często obserwowano bardzo gwałtowne, wielokrotne, naprzemienne zmiany kierunku transportu mikrotubuli ładunkowej na minimalne odległości, czyli ruch oscylacyjny lub tzw. „przeciąganie liny” (podrozdział 1.3). Przykład takiego zjawiska przedstawia montaż (Ryc. 5.38) i uzupełniający go kimograf (Ryc. 5.39). Do tej pory

nie opisano przykładu „przeciągania liny” między samymi cząsteczkami kinezy-1, bez udziału motorów innego rodzaju. W przypadku ruchu mikrotubula-mikrotubula, zjawisko „przeciągania liny” prawdopodobnie dotyczy tylko mikrotubul równoległych, przeciąganych w jedną stronę przez motory związane główkami do mikrotubuli ładunkowej (siła generowana w stronę końca minus mikrotubuli stacjonarnej), a w drugą stronę przez kinezy-1 związane ogonami (w kierunku końca plus). To co obserwowano, czyli brak „długodystansowego” ruchu w jedną stronę było wynikiem tego, że siły generowane w przeciwne strony równoważyły się, a więc ustalenie jednego kierunku ruchu było niemożliwe.

W większości publikacji przedstawia się możliwość B2 jako jedyną, która powstaje przypadku równoległej orientacji mikrotubul (np. Lu i Gelfand, 2017). Tak w istocie się dzieje jeśli motor generujący ruch mikrotubula-mikrotubula jest nieprocesywny, np. Ncd. W przypadku cząsteczek Ncd, równowaga wiązania się do mikrotubul ustala się bardzo szybko, teoretycznie po jednym cyklu mechanochemicznym. Prowadzi to do zablokowania ruchu (Ryc. 6.6, B2). Jednakże, gdy motor jest procesywny (jak np. kinezy-1) i przechodzi przez wiele cykli mechanochemicznych bez dysocjacji, prowadzi to do wykonywania ruchów przedstawionych w panelu B1 lub B3, a więc przemieszczania się równoległych mikrotubul względem siebie. Co więcej, brak synchronizacji motorów i procesywność mogą spowodować odwrócenie kierunku ruchu mikrotubuli ładunkowej, co również obserwowano (Ryc. 5.52 i 5.53). Zatem generowanie dwukierunkowego ruchu mikrotubul ładunkowych jest bezpośrednim skutkiem procesywności kinezy-1 i nie jest zaskoczeniem, że nie występowało w przypadku nieprocesywnych motorów, takich jak kinezy-14. Takie wyjaśnienie pojawia się po raz pierwszy w niniejszej pracy.

Mikrotubule ładunkowe czasem zmieniały kierunek ruchu – zwykle po ich obróceniu przez cząsteczki kinezy-1 (Ryc. 5.49 i 5.50) i sporadycznie bez obracania (Ryc. 5.52 i 5.53). Najczęściej takie obracanie mikrotubul miało miejsce po dotarciu mikrotubuli ładunkowej do końca plus mikrotubuli stacjonarnej, kiedy była już tylko związana za jeden koniec przez motory zgromadzone na końcu plus mikrotubuli stacjonarnej. Prawdopodobnie przypadkowe ruchy mikrotubuli ładunkowej związanej jednym końcem przez motory mogło na tyle przybliżyć ją do cząsteczek kinezy-1, że mogła ona „powrócić” na tor ruchu, ale już w zmienionej orientacji w stosunku do pierwotnej.

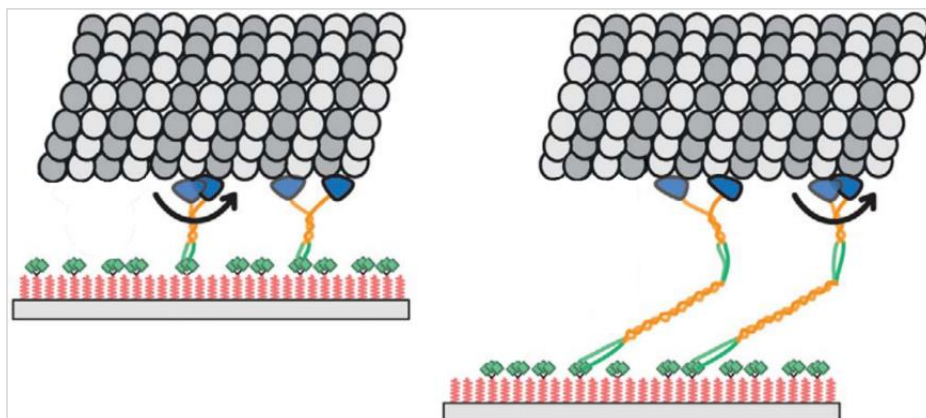
Inny przykład organizacji mikrotubul *in vitro* pokazano na Ryc. 5.48. W tym przypadku następowało przesuwanie dwóch mikrotubul ładunkowych względem siebie – obie były mobilne, co bardziej przypominało realną sytuację w komórkach, gdzie mikrotubule nie są trwale unieruchomione, a jedynie sieciowane (np. przez białko tau, Drechsel i wsp., 1992) w sposób regulowany.

6.4 Znaczenie elastycznego zawiasu-2 kinezy-1 w przesuwaniu dwóch mikrotubul względem siebie

Cząsteczka kinezy-1 pełnej długości zawiera dwa zawiasy molekularne: zawias-1, obejmujący aminokwasy 372-446 i zawias-2 zawierający reszty 505-610. Brak zawiasów obniżał szybkość w teście gliding, gdzie pracują grupy motorów oddziałujące z jednym obiektem (Friedman i Vale, 1999; Crevenna i wsp., 2008; Bieling i wsp., 2008b). Bieling i wsp. (2008b) doszli do wniosku, że w zbiorowym transporcie jednej mikrotubuli przez wiele motorów, jaki występuje w teście gliding, istotną sprawą jest *elastyczność* połączenia między główką i ogonem każdego z grupy motorów uczestniczących w transporcie, przyłączonych przez ogony do szkiełka, a przez domeny motoryczne do tej samej mikrotubuli. Ta elastyczność rekompensuje efekty braku synchronizacji pomiędzy motorami, z których każdy znajduje się w innym etapie cyklu mechanochemicznego (podrozdział 1.2.4).

Konieczność obecności zawiasu molekularnego w cząsteczce kinezy można zobrazować za pomocą testu gliding, w którym dwie przyłączone do szkiełka kinezy transportują mikrotubulę (Ryc. 6.7). Z uwagi na to, że cykle mechanochemiczne motorów molekularnych nie są zsynchronizowane, prawie zawsze różne główki są w różnym etapie cyklu. Przykładowo, jedna z kinezyn jest w trakcie przestawiania swojej główki do nowej podjednostki mikrotubuli, czyli w tym momencie przesuwać mikrotubulę – generuje ruch. Natomiast druga z kinezyn jest na etapie cyklu, w którym obie domeny motoryczne przyłączone są do mikrotubuli. W momencie, gdy następuje ruch mikrotubuli transportowej, generowany przez pierwszą z omawianych tu cząsteczek, druga kinezyzna może: 1. oddysocjować od mikrotubuli lub 2. odkształcić swoją strukturę tak, aby pozostać przyłączoną do mikrotubuli dwiema główkami. Pierwsza ewentualność wymagałaby, aby na każdym etapie cyklu, w którym zmieniają się relacje przestrzenne główki, prawie wszystkie cząsteczki kinezy dysocjowały, co rzeczywiście się dzieje w przypadku nieprocesywnego motoru. Etapów cyklu jest dużo

i w każdym momencie tylko niewiele motorów procesywnych miałyby przypadkowo zsynchronizowane etapy cyklu mechanochemicznego. W drugim mechanizmie, odkształcenie struktury najłatwiej jest zrealizować, wprowadzając elastyczny (nieuporządkowany) segment pozwalający na pewną swobodę ruchu części N- i C-końcowej motoru względem siebie. Stąd konieczność zawiasu molekularnego. Analogicznie, te dwie kinezyzny zamiast do szkiełka mogą być przyłączone do mikrotubuli stacjonarnej.



Ryc. 6.7 Schemat testu gliding. Po lewej - skrócone cząsteczki kinezyzny-1 (zawierające aminokwasy 1-401), po prawej – bardziej elastyczne warianty kinezyzny-1 (1-612), zawierające zawiasy (Bieling i wsp., 2008b)

Wnioski Bielinga i wsp. (2008b) oraz Friedman i Vale'a (1999) pomagają wyjaśnić różnice parametrów ruchu mikrotubula-mikrotubula między kinezyną-1 bez zawiasu-2 a kinezyną-1 pełnej długości, zaobserwowane w niniejszej pracy. W Wynikach pokazano, że delecja elastycznego zawiasu-2 kinezyzny-1 powodowała obniżenie częstości występowania zdarzeń ruchu mikrotubula-mikrotubula w porównaniu do kinezyzny-1 pełnej długości, a także niższe wartości długości przebiegu (podrozdziały 5.6 i 5.3). Te wyniki ewidentnie wskazują na istotność zawiasu-2 w strukturze kinezyzny-1, który, jak wykazano w obecnej pracy, jest niezbędny także podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1.

6.5 Znaczenie zjawisk opisanych w obecnej pracy

W tym miejscu chciałabym przejść do znaczenia biologicznego zjawisk pokazanych w tej pracy. Kinezyzna-1 poprzez przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie odpowiada za inicjację procesu powstawania wypustek nerwowych u *Drosophila* i jest do tego niezbędna (Lu i Gelfand, 2013). W kolejnej pracy wykazano, że mutacje w ogonie kinezyzny – w miejscu wiążącym mikrotubule niezależnym od ATP, które uniemożliwiały ruch mikrotubula-mikrotubula, spowodowały, m.in. powstawanie krótszych aksonów

(Winding i wsp., 2016). Zespół Gelfanda sugerował, że kinezyrna-1 przesuwana tylko antyrównoległe mikrotubule, ale ze względu na niemal jednolitą polarność mikrotubul w dojrzałym aksonie ten ruch miałby być ograniczony jedynie do początkowych etapów powstawania aksonu (del Castillo i wsp., 2015; Lu i Gelfand, 2017; Oelz i wsp., 2018; del Castillo i wsp., 2020). Ponadto, Lu i wsp. (2015) pokazali, że dojrzałe neurony *Drosophila* ulegają regeneracji w warunkach *in vitro* po przecięciu aksonu (aksotomii). W wyniku uszkodzenia aksonu następuje uwolnienie jonów wapnia do cytoplazmy. Powoduje to depolimeryzację mikrotubul i powstawanie nowych o mieszanej polarności, które są przesuwane względem siebie przez kinezyrnę-1 w celu wydłużenia skróconego aksonu i jego regeneracji (Lu i wsp., 2015; podrozdział 1.3.1). Jednakże, grupa kierowana przez Baasa twierdzi, że przesuwanie wyłącznie antyrównoległych mikrotubul przez kinezyrnę-1 wprowadzałoby zaburzenia w organizacji cytoszkieletu mikrotubularnego i utrudniałoby utrzymanie jednolitej polarności (Guha i wsp., 2021). Zespół Baasa sugeruje, że nadmierna aktywność kinezyrny-1 nasilona brakiem dyneiny (wyciszonej) jest odpowiedzialna za zaburzenia organizacji mikrotubul w aksonie (Guha i wsp., 2021), powołując się na analogię do komórek mięśniowych (Mogessie i wsp., 2015). Jednakże, Mogessie i wsp. (2015) pokazali, że kinezyrna-1 również jest potrzebna w procesie porządkowania mikrotubul w rozwijających się komórkach mięśniowych. Guha i wsp. (2021) twierdzą, że destrukcyjne efekty ruchu mikrotubula-mikrotubula napędzanego przez kinezyrnę-1 (na organizację mikrotubul w aksonie) mogłyby być zniwelowane, gdyby kinezyrna-1 przesuwała równoległe mikrotubule. Niniejsza praca jako pierwsza opisuje zarówno ruch mikrotubula-mikrotubula napędzany przez kinezyrnę-1 *in vitro*, jak i pokazuje, że kinezyrna-1 może przesuwać równoległe mikrotubule *in vitro*.

Guha i wsp. (2021) proponują, że białko MAP7 mogłoby odpowiadać za promocję przesuwania równoległych mikrotubul względem siebie przez kinezyrnę-1. MAP7 nie zmienia siły wywieranej przez pojedynczą cząsteczkę kinezyrny-1, ale zwiększa szybkość wiązania motoru do mikrotubuli (Chaudhary i wsp., 2019). Pan i wsp. (2019) pokazali, że wyciszenie MAP7D2 skutkuje zmniejszeniem kierowania ładunków do aksonów oraz defektami w tworzeniu i wzroście aksonów we wczesnych stadiach rozwoju neuronów. Ferro i wsp. (2022) z kolei zademonstrowali, że miejsce wiązania domeny wiążącej mikrotubule białka MAP7 częściowo pokrywało się z miejscem

wiązania główki kinezy-1 i hamowało ruchliwość motoru. Jak dotychczas, nie badano roli MAP7 podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 ani *in vitro* ani w komórkach.

6.6 Regulacja ruchu mikrotubula-mikrotubula napędzanego przez kinezynę-1. Znaczenie modyfikacji potranslacyjnych mikrotubul

Do tej pory niewiele wiadomo na temat regulacji przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1. Lu i wsp. (2013) pokazali, że w dojrzałych neuronach *Drosophila* przesuwanie mikrotubul względem siebie jest znacząco mniej częste – zaobserwowano 50-krotny spadek mobilności mikrotubul w stosunku do ich mobilności w rozwijających się neuronach. Dzieje się tak pomimo stałej obecności kinezyn, dyneiny oraz mikrotubul i w rozwijających się i w dojrzałych neuronach. del Castillo i wsp. (2015) pokazali, że u *Drosophila* negatywnym regulatorem kinezy-1 w ruchu mikrotubula-mikrotubula jest białko Pavarotti/MKLP1 (kinezyna-6), które hamuje przesuwanie mikrotubul względem siebie, a przez to kontroluje wzrost aksonu i jest niezbędne do prawidłowego przebiegu tego procesu. Norkett i wsp. (2020) wykazali, że fosforylacja Ser745 w Pavarotti/MKLP1 promowała jego wiązanie z białkiem 14-3-3. Powstały w ten sposób kompleks sieciował mikrotubule i hamował ruch mikrotubula-mikrotubula napędzany przez kinezynę-1 w komórkach S2 *Drosophila*. Nieufosforylowana forma Pavarotti/MKLP1 w ogóle nie wiązała się do mikrotubul. Jednakże, fosforylacja Pavarotti/MKLP1 to prawdopodobnie tylko jeden z mechanizmów regulujących ruch mikrotubula-mikrotubula napędzany przez kinezynę-1.

Innym mechanizmem, regulującym aktywność białek wiążących mikrotubule (MAP, podrozdział 1.1.8) oraz motorów generujących siłę podczas powstawania aksonu mogłyby być modyfikacje potranslacyjne tubuliny. W niniejszej pracy zadano pytanie, czy modyfikacje potranslacyjne tubuliny, takie jak detyrozynacja, tyrozynacja i glutamylacja mają wpływ na przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 *in vitro*. Do tej pory analizowano jedynie wpływ modyfikacji potranslacyjnych tubuliny na ruchliwość pojedynczych cząsteczek kinezy-1 (podrozdział 1.5). Natomiast wpływ modyfikacji potranslacyjnych tubuliny na ruch mikrotubula-mikrotubula generowany przez kinezynę-1 nie był znany i niniejsza praca po raz pierwszy przedstawia jego znaczenie w tym procesie.

Kinezyzna-1 w komórkach ma większe powinowactwo do mikrotubul detyrozynowanych, co umożliwia kierowanie tego motoru do odpowiednich kompartmentów komórki, np. w neuronie (Konishi i Setou, 2009). W warunkach *in vitro* zaobserwowano, że kinezyzna-1 częściej przyłączała się do mikrotubul detyrozynowanych niż do tyrozynowanych, ale nie wykazano różnic w szybkości czy w długości przebiegu pojedynczych cząsteczek (Kaul i wsp., 2014). Jednakże, Sirajuddin i wsp. (2014) pokazali, że detyrozynacja tubuliny zmniejszyła długość przebiegu kinezyzny-1 o 25%. W obecnej pracy, jedyna różnica istotna statystycznie dotyczyła czasu trwania ruchu mikrotubula-mikrotubula, który był większy o ok. 25% dla mikrotubul detyrozynowanych (podrozdział 5.11.1). Może to wskazywać na zachowaną preferencję kinezyzny-1 do mikrotubul detyrozynowanych również podczas przesuwania dwóch mikrotubul, kiedy to w oddziaływaniu uczestniczy i domena motoryczna i ogon kinezyzny. Czy ma to przełożenie na interakcje w komórkach, np. podczas inicjacji elongacji aksonu? Obecnie można jedynie spekulować, ponieważ nikt tego nie badał. W rozwijającym się aksonie dominują mikrotubule tyrozynowane, które wraz ze wzrostem neurytu stopniowo ulegają detyrozynacji. Teoretycznie, na początkowym etapie rozwoju aksonu mogłoby to stanowić mechanizm ograniczający przesuwanie dwóch mikrotubul przez kinezynę-1. Jednakże później, kiedy przeważają mikrotubule detyrozynowane mogłoby to być pewnym problemem, bo kinezyzna-1 ma większe powinowactwo do mikrotubul detyrozynowanych, a ruch mikrotubula-mikrotubula z udziałem tego motoru w dojrzałym neuronie jest wyciszany. Potrzeba zatem nowych badań, które wyjaśnią dokładny mechanizm regulacji ruchu mikrotubula-mikrotubula generowanego przez kinezynę-1 – zarówno przez modyfikacje potranslacyjne mikrotubul, jak i przez białka MAP.

Wpływ glutamylacji na ruchliwość pojedynczych cząsteczek kinezyzny-1 był badany przez Sirajuddina i wsp. (2014). Wykazali oni, że dołączenie 10 reszt kwasu glutaminowego do tubuliny powoduje wzrost szybkości i procesywności 1.5 razy. Natomiast w przypadku kinezyzny-2 już 3 reszty glutaminianowe zmieniały parametry ruchu analogicznie jak w przypadku kinezyzny-1. W przypadku przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 *in vitro* glutamylacja miała ograniczony wpływ – w niniejszej pracy wykazano zmniejszenie procentowego udziału przerw w ruchu o 17% w stosunku do kontroli. Chociaż różnica jest mała, nie jest to oczekiwany

wynik, ponieważ glutamylacja zmienia ładunek mikrotubul na bardziej ujemny, a domeny oddziałujące z mikrotubulami w kinezyne-1 są naładowane dodatnio, co powinno teoretycznie zwiększać długość przerw z uwagi na silniejsze interakcje. Lessard i wsp. (2019) pokazali, że w przypadku Kif1A (kinezyne-3) glutamylacja powoduje wydłużenie przerw w ruchu pojedynczych cząsteczek. Wobec tego, badania nad wpływem glutamylacji na ruch mikrotubula-mikrotubula wymagają bardziej ukierunkowanego podejścia, np. poprzez zastosowanie i porównanie konkretnych izoform tubuliny w eksperymentach. Przykładowo tubulina- β 3 posiada w ogonie dodatnio naładowaną resztę lizyny, mającą również wpływ na oddziaływanie kinezyne-1, której procesywność zmalała trzykrotnie jeśli poruszała się po mikrotubulach zbudowanych z tego izotypu. Natomiast glutamylacja zniwelowała hamujący efekt reszty lizyny (Sirajuddin i wsp., 2014).

7. Wnioski

Kinezyzna-1 podczas przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie transportuje zarówno mikrotubule zorientowane antyrównolegle, jak i równolegle. Możliwość przesuwania względem siebie mikrotubul równoległych jest bezpośrednim skutkiem procesywności kinezyzny-1. Dwa poprzednie zdania są najważniejszymi wnioskami wynikającymi z tej pracy. Szybkość, długość przebiegu i częstość występowania zdarzeń przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 są zależne od stężenia kinezyzny-1 i osiągają maksimum przy 6 nM motoru. Podczas generacji ruchu mikrotubula-mikrotubula istotnym elementem jest elastyczny zawias-2 w kinezyynie-1, który pozwala na kompensację braku synchronizacji między cząsteczkami motoru transportującymi tę samą mikrotubulę. Modyfikacje potranslacyjne tubuliny – detyrozynacja, tyrozynacja i glutamylacja nie wpływają na szybkość i długość przebiegu w ruchu mikrotubula-mikrotubula generowanym przez kinezynę-1. Jednakże, detyrozynacja powoduje wydłużenie czasu trwania ruchu mikrotubula-mikrotubula, a glutamylacja obniża procentowy udział przerw w ruchu. W tej pracy opisano więc podstawy mechanizmu generacji ważnego biologicznie ruchu mikrotubula-mikrotubula przez kinezynę-1.

8. Spis filmów

W przypadku filmów w kolorze w kanale czerwonym widać mikrotubule, a w zielonym cząsteczki kinezy-1. W wybranych filmach białymi symbolami „+” oznaczono końce plus mikrotubul stacjonarnych, a żółtymi „+” i „-” odpowiednio końce plus i minus mikrotubul ładunkowych polarnie znakowanych.

Nazwa filmu	Opis	Ilość klatek / odstęp między klatkami / przyspieszenie filmu	Stężenie kinezy-1
Film 01 – Test gliding	Transport mikrotubul przez cząsteczki kinezy-1 unieruchomione przez ogony na powierzchni szkiełka	498 / 200 ms / 100 razy	25 nM
Film 02 – Ruch pojedynczych cząsteczek kinezy-1 wzdłuż mikrotubuli	Pojedyncze cząsteczki kinezy-1 (wyraźne świecące punkty) poruszające się wzdłuż mikrotubuli (szare wydłużone struktury)	597 klatek / 200 ms / 30 razy	0.1 nM
Film 03 – Ruch mikrotubula-mikrotubula – porównanie trzech stężeń kinezy-1	Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie przez kinezynę-1 w trzech wariantach stężenia motoru. Warto zwrócić uwagę na różnicę w liczbie mikrotubul ładunkowych, które są transportowane i długość przebiegu. Mniej intensywna czerwień to mikrotubule stacjonarne (unieruchomione), a bardziej intensywna – ładunkowe. Na końcach plus mikrotubul stacjonarnych widać nagromadzenia cząsteczek kinezy-1 (zielone)	Wszystkie filmy: 445 klatek/ 400 ms / 40 razy	1.5 nM, 6 nM i 45 nM
Film 04 – Porównanie kinezy-1 pełnej długości do kinezy-1 bez zawiasu-2 w ruchu mikrotubula-mikrotubula	Porównanie generacji ruchu mikrotubula-mikrotubula przez kinezynę-1 pełnej długości oraz jej mutantu bez zawiasu-2.	Oba filmy: 208 / 400 ms / 40 razy	12 nM

Film 05 – Przesuwanie dwóch mikrotubul względem siebie – kierunek transportu mikrotubul	Dwie mikrotubule, które są transportowane w przeciwnych kierunkach, tzn. jedna do końca plus, a druga do końca minus mikrotubuli stacjonarnej przez cząsteczki kinezy-1	312 / 400 ms / 40 razy	6 nM kinezy-1
Film 06 – Ruch mikrotubula- mikrotubula (mikrotubule zorientowane antyrównolegle)	Transport mikrotubuli polarnie znakowanej zorientowanej antyrównolegle (bardziej intensywna czerwień to koniec plus tej mikrotubuli) przez cząsteczki kinezy-1	316 / 400 ms / 40 razy	20 nM kinezy-1
Film 07 – Przesuwanie względem siebie mikrotubul równoległych – transport do końca minus	Transport mikrotubuli polarnie znakowanej zorientowanej równolegle w kierunku końca minus mikrotubuli stacjonarnej przez cząsteczki kinezy-1	150 / 400 ms / 40 razy	6 nM
Film 08 – Przesuwanie względem siebie mikrotubul równoległych – transport do końca plus	Mikrotubula polarnie znakowana zorientowana równolegle jest transportowana w kierunku końca plus mikrotubuli stacjonarnej przez cząsteczki kinezy-1	361 / 400 ms / 40 razy	60 nM
Film 09 – Ruch oscylacyjny mikrotubuli ładunkowej (w ramach testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie)	Zjawisko tzw. „przeciągania liny”, kierunek transportu mikrotubuli ładunkowej nie został ustalony, 50% kinezyn związała się ogonami i 50% główkami do mikrotubuli stacjonarnej. Mikrotubula ładunkowa najprawdopodobniej była zorientowana równolegle	507 / 400 ms / 80 razy	6 nM
Film 10 – Organizacja mikrotubul <i>in vitro</i> przez kinezynę-1	Przesuwanie względem siebie dwóch mikrotubul ładunkowych (żadna z nich nie była unieruchomiona) przez cząsteczki kinezy-1, a więc ich reorganizację <i>in vitro</i>	145 / 400 ms / 20 razy	6 nM

<p>11 – Ruch mikrotubula- mikrotubula i następnie obracanie mikrotubuli ładunkowej</p>	<p>Najpierw widać transport mikrotubuli ładunkowej do końca plus mikrotubuli stacjonarnej. Następnie mikrotubula ładunkowa jest obracana i transportowana w stronę końca minus tej samej mikrotubuli stacjonarnej. Prawdopodobnie, ta mikrotubula ładunkowa najpierw była zorientowana antyrównoległe, a potem równoległe</p>	<p>234 / 400 ms / 40 razy</p>	<p>4.5 nM</p>
<p>12 – Dwukierunkowy transport jednej mikrotubuli ładunkowej (w ramach testu przesuwania dwóch mikrotubul względem siebie)</p>	<p>Transport jednej mikrotubuli ładunkowej w dwie strony: najpierw do końca minus i potem do końca plus mikrotubuli stacjonarnej, bez obracania tej mikrotubuli ładunkowej (prawdopodobnie zorientowana równoległe)</p>	<p>85 / 400 ms / 40 razy</p>	<p>3 nM</p>

9. Streszczenie

Kinezyzna-1 jest białkiem motorycznym (motorem molekularnym), który przekształca energię pochodzącą z hydrolizy ATP w ruch mechaniczny. Motor ten "kroczy" po mikrotubuli (MT) w stronę jej końca plus. Kinezyzna-1 jest heterotetramerem złożonym z dwóch łańcuchów ciężkich i dwóch lekkich. Łańcuch ciężki składa się z domeny motorycznej (koniec aminowy), zawierającej centrum katalityczne, łącznika szyjki, domeny superhelikalnej oraz, na końcu karboksylowym, ogona, który odpowiada za wiązanie ładunków. Główną rolą kinezyzny-1 w komórkach jest transport różnych ładunków (np. mitochondriów, pęcherzyków) od ciała komórki do jej dystalnych części oraz reorganizacja struktury cytoszkieletu mikrotubularnego.

Każdy z dwóch łańcuchów ciężkich kinezyzny-1 zawiera dwa miejsca wiązania MT – jedno w domenie motorycznej, którego powinowactwo do MT zależy od obecności ATP, oraz drugie w ogonie, niezależne od obecności ATP. Dzięki temu kinezyzna-1 może jednocześnie oddziaływać z dwiema MT, czyli sieciovąć je albo przesuwając względem siebie (*sliding*), co zaobserwowano po raz pierwszy w rozwijających się neuronach *Drosophila*, a także w fibroblastach i oocytach. W neuronie ten proces jest niezbędny podczas powstawania aksonu – nacisk mechaniczny na błonę komórkową zapoczątkowuje i ukierunkowuje tworzenie wypustki. Jednakże, nadal niewiele wiadomo jaki jest mechanizm przesuwania dwóch MT przez kinezyznę-1, wzajemna orientacja MT podczas ruchu, sposób wiązania się cząsteczek kinezyzny między MT, a także jaka jest regulacja wymienionych procesów.

W celu zbadania mechanizmu przesuwania jednej MT względem drugiej przez kinezyznę-1 najpierw opracowano nowy test ruchliwości *in vitro*. Badana była rekombinowana dimeryczna kinezyzna-1 pełnej długości bez łańcuchów lekkich. Do tego białka, jak również do MT zostały dołączone znaczniki fluorescencyjne umożliwiające ich indywidualną obserwację. Całość była wizualizowana przy pomocy mikroskopu całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF). Umożliwiło to jednoczesną obserwację kinezyzny jak również MT transportowanej i stacjonarnej, które zawierały różne proporcje znacznika fluorescencyjnego w celu ich rozróżnienia.

Analiza filmów otrzymanych z użyciem tego zestawu badawczego wykazała, że średnia szybkość przesuwania MT względem siebie (~120 nm/s) jest dużo niższa

niż procesywne kroczenie pojedynczych cząsteczek (~600 nm/s) lub zbiorowe przesuwanie MT po powierzchni pokrytej kinezynami (*gliding*) (~1200 nm/s). W przeciwieństwie do dwóch pozostałych analiz, ruch MT-MT nie był płynny, pojawiały się okresy dużego spowolnienia, jak również częstokroć występowały znaczące przerwy w ruchu. W doświadczeniach z polarnie znakowanymi MT wykazano, że wystąpiły trzy konfiguracje MT ładunkowych i stacjonarnych: przesuwanie antyrównoległych MT do końca plus, równoległych do końca minus oraz równoległych do końca plus MT. Nieoczekiwanie wykazano, że przesuwane są nie tylko antyrównoległe MT, jak to obserwowano dla innych białek motorycznych, ale również równoległe MT, co zgodnie z proponowanym w pracy mechanizmem jest skutkiem procesywnej generacji ruchu przez kinezynę-1.

Kinezyna-1 może ulegać autoinhibicji – zmianie konformacji, uniemożliwiającej ruch, co teoretycznie mogło utrudniać powtarzalną obserwację procesu przesuwania dwóch MT. Aby wyeliminować elastyczny fragment kinezyny niezbędny do autoinhibicji (zawias-2, $\Delta 505-610$), przy użyciu narzędzi biologii molekularnej utworzono konstrukt z delecją obejmujący zawias-2. Okazało się, że taka kinezyna bardzo rzadko przesuwała MT względem siebie (6 razy rzadziej), a w przypadkach, kiedy taki ruch wystąpił, jego długość przebiegu była 5 razy niższa niż w przypadku kinezyny-1 pełnej długości typu dzikiego. Zatem obecność elastycznego fragmentu jest konieczna, aby kompensować brak synchronizacji cząsteczek kinezyny-1 transportujących tę samą MT.

Zbadano też wpływ modyfikacji potranslacyjnych tubuliny na przesuwanie MT względem siebie przez kinezynę-1. Wykazano, że w przypadku mikrotubul detyrozynowanych czas ruchu mikrotubula-mikrotubula jest dłuższy niż dla tyrozynowanych, a w przypadku glutamylacji zaobserwowano niższy procentowy udział przerw niż dla kontroli. Z kolei analiza szybkości oraz odległości transportu nie wykazała znaczących różnic dla badanych modyfikacji potranslacyjnych tubuliny.

10. Summary

Kinesin-1 is a motor protein that converts energy from ATP hydrolysis into mechanical movement. This motor protein "walks" on the microtubule (MT) towards its plus end. Kinesin-1 is a heterotetramer composed of two heavy chains and two light chains. The heavy chain consists of a motor domain (amino terminus) containing a catalytic center, a neck linker, a coiled-coil domain and, at the carboxy terminus, a tail which is responsible for cargo binding. The main role of kinesin-1 in cells is to transport various cargoes (e.g. mitochondria, vesicles) from the cell body to its distal parts and to reorganize the microtubular cytoskeleton.

The two kinesin-1 heavy chains contain two MT binding sites - one in the motor domain, which affinity for MT depends on the presence of ATP, and the other in the tail, independent of the presence of ATP. As a result, kinesin-1 can simultaneously interact with two MTs, that is, cross-link them or move them against each other (which was observed for the first time in developing *Drosophila* neurons, as well as in fibroblasts and oocytes). In the neuron, this process is necessary during axon formation - mechanical pressure on the cell membrane initiates and directs the formation of a neurite. However, still little is known about the mechanism of MT sliding by kinesin-1, the mutual orientation of the MTs during movement, the way kinesin molecules bind between the MTs, and the regulation of these processes.

In order to investigate the mechanism of MT-pair sliding driven by kinesin-1, a new *in vitro* motility assay was developed for the first time. Full length recombinant dimeric kinesin-1 without light chains was tested. Both kinesin-1 and MTs were marked with fluorescent dyes which enabled their individual observation and visualization using a total internal reflection microscopy (TIRFM). This technique allowed the simultaneous observation of the kinesin-1 as well as the cargo MT and stationary MT, which contained different proportions of the fluorescent dye in order to distinguish them from each other.

Analysis of the movies obtained from TIRFM showed that the average velocity of MT-MT sliding by kinesin-1 (~120 nm/s) is much lower than for kinesin-1 single molecules (~600 nm/s) or in gliding assay (~1200 nm/s). Contrary to the other two analyzes, MT-MT sliding was not smooth, there were visible breaks in movement, and there were often significant interruptions during MT transport. Experiments with

polarity marked MTs showed that there were three ways of MT-MT sliding and stationary MT orientation: sliding of the anti-parallel MTs to the plus end, parallel MT sliding towards the minus end, and parallel sliding to the plus end of the stationary MT. An unexpected result of these measurements was the discovery that not only anti-parallel MTs are transported, as observed for other motor proteins, but also parallel MTs, which, according to the mechanism suggested in this thesis, is the result of the processive generation of movement by kinesin-1.

Kinesin-1 can undergo autoinhibition – a change in conformation that prevents movement, which theoretically could make it difficult to repeatedly observe the process of MT sliding. To eliminate the flexible kinesin fragment necessary for autoinhibition (molecular hinge-2, $\Delta 505-610$), a construct lacking hinge-2 was created using molecular biology tools. It turned out that hingeless kinesin-1 performed MT-pair sliding 6 times less frequently, with run length 5 times lower comparing to wild-type kinesin-1. Thus, the presence of an elastic fragment is necessary to compensate the lack of synchronization among the kinesin-1 molecules transporting the same MT.

The effect of post-translational modifications of tubulin on MT-MT sliding by kinesin-1 was also investigated. It has been shown that for detyrosinated microtubules, the time of the movement is longer than for the tyrosinated ones. Concerning glutamylation of microtubules, a lower percentage of breaks during movement was observed as compared to control. On the other hand, the analysis of the velocity and run length of transport showed no significant differences for the post-translational modifications of tubulin investigated here.

11. Spis publikacji doktoranta i źródła finansowania

Kliszcz B i Kasprzak AA (2018). Rola białek motorycznych w transporcie aksonalnym. *Kosmos* 67(1), pp. 109-119.

Kliszcz B, Osinka A, Waclawek E, Kasprzak AA, Włoga D (2018). Modyfikacje potranslacyjne tubuliny. *Kosmos*, 67(1), pp. 95–107.

Szkop M, Kliszcz B, Kasprzak AA (2018). A simple and reproducible protocol of glass surface silanization for TIRF microscopy imaging. *Anal Biochem*, 549, pp. 119-123. – *ta publikacja zawiera opis metodycznych aspektów wymienionych w niniejszej pracy*

Badania będące przedmiotem niniejszej pracy były finansowane przez:

Narodowe Centrum Nauki – grant Opus 7 nr 2014/13/B/NZ1/03995

Cytowane prace

1. A M, Latario CJ, Pickrell LE, Higgs HN (2020). *Lysine acetylation of cytoskeletal proteins: Emergence of an actin code*. J Cell Biol, 219(2), p. e202006151.
2. Ahmad FJ, Baas PW (1995). *Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon*. J Cell Sci, 108(Pt 8), pp. 2761-2769.
3. Aizawa H, Sekine Y, Takemura R, Zhang Z, Nangaku M, Hirokawa N (1992). *Kinesin family in murine central nervous system*. J Cell Biol, 119(5), pp. 1287-1296.
4. Aillaud C, Bosc C, Peris L, Bosson A, Heemeryck P, Van Dijk J, Le Friec J, Boulan B, Vossier F, Sanman LE, Syed S, Amara N, Couté Y, Lafanechère L, Denarier E, Delphin C, Pelletier L, Humbert S, Bogyo M, Andrieux A, Rogowski K, Moutin MJ (2017). *Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation*. Science, 358(6369), pp. 1448–1453.
5. Akella J S, Włoga D, Kim J, Starostina NG, Lyons-Abbott S, Morrissette NS, Dougan ST, Kipreos ET, Gaertig J (2010). *MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase*. Nature, 467(7312), pp. 218-222.
6. Allard J, Doumic M, Mogilner A, Oelz D (2019). *Bidirectional sliding of two parallel microtubules generated by multiple identical motors*. J Math Biol, 79(2), pp. 571-594.
7. Allen RD, Metzals J, Tasaki I, Brady ST, Gilbert SP (1982). *Fast axonal transport in squid giant axon*. Science, 218(4577), pp. 1127-1129.
8. Andrews SB, Gallant PE, Leapman RD, Schnapp BJ, Reese TS (1993). *Single kinesin molecules crossbridge microtubules in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 90(14), pp. 6503-6507.
9. Arce C A, Rodriguez JA, Barra HS, Caputto R (1975). *Incorporation of L-Tyrosine, L-Phenylalanine and L-3 ,4-Dihydroxyphenylalanine as Single Units into Rat Brain Tubulin*. Eur J Biochem, 59(1), pp. 145-149.
10. Asbury CL (2017). *Anaphase A: Disassembling Microtubules Move Chromosomes toward Spindle Poles*. Biology, 6(1):15.
11. Audebert S, Desbruyeres E, Gruszczynski C, Koulakoff A, Gros F, Denoulet P, Edde B (1993). *Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons*. Mol Biol Cell, 4(6), pp. 615-626.
12. Audebert S, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Gros F, Denoulet P, Eddé B (1994). *Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons*. J Cell Sci, 107, pp. 2313-2322.
13. Axelrod D (1981). *Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence*. J Cell Biol., 89(1), pp. 141–145.
14. Baas PW (2013). *Microtubule stability in the axon: new answers to an old mystery*. Neuron, 78(1), pp. 3-5.
15. Baas PW, Rao AN, Matamoros AJ, Leo L (2016). *Stability properties of neuronal microtubules*. Cytoskeleton (Hoboken), 73(9), pp. 442-460.

16. Barisic M, Maiato H (2016). *The Tubulin Code: A Navigation System for Chromosomes during Mitosis*. Trends Cell Biol, 26(10), pp. 766-775.
17. Barisic M, e Sousa RS, Tripathy SK, Magiera MM, Zaytsev AV, Pereira AL, Janke C, Grishchuk EL, Maiato, H. (2015). *Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis*. Science, 348(6236), pp. 799–803.
18. Barlan K, Lu W, Gelfand VI (2013). *The microtubule-binding protein ensconsin is an essential cofactor of kinesin-1*. Curr Biol, 23(4), pp. 317-322.
19. Barlan K, Gelfand VI (2017). *Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 9(5), p. a025817.
20. Barlow S, Gonzalez-Garay ML, West RR, Olmsted JB, Cabral F (1994). *Stable expression of heterologous microtubule-associated proteins (MAPs) in Chinese hamster ovary cells: Evidence for differing roles of MAPs in microtubule organization*. J Cell Biol, 126(4), pp. 1017-1029.
21. Beltramo DM, Arce CA, Barra HS (1987). *Tubulin, but Not Microtubules, Is the Substrate for Tubulin:Tyrosine Ligase in Mature Avian Erythrocytes*. J Biol Chem, 262(32), pp. 15673-15677.
22. Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, Wu S, Mazutis L, Deschmann E, Sola-Visner M, Italiano JE, Hartwig JH (2015). *Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein*. Blood, 125(5), pp. 860-868.
23. Beninati S, Piacentini M, Cocuzzi ET, Autuori F, Folk JE (1988). *Covalent incorporation of polyamines as γ -glutamyl derivatives into CHO cell protein*. Biochim Biophys Acta, 952(3), pp. 325-333.
24. Bhabha G, Johnson GT, Schroeder CM, Vale RD (2016). *How Dynein Moves Along Microtubules*. Trends Biochem Sci, 41(1), pp. 94-105.
25. Bieling P, Kandels-Lewis S, Telley IA, van Dijk J, Janke C, Surrey T (2008a). *CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites*. J Cell Biol, 183(7), pp. 1223-1233.
26. Bieling P, Telley IA, Piehler J, Surrey T (2008b). *Processive kinesins require loose mechanical coupling for efficient collective motility*. EMBO Rep, 9(11), pp. 1121-1127
27. Blasius TL, Cai D, Jih GT, Toret CP, Verhey KJ (2007). *Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1*. J Cell Biol, 176(1), pp. 11-17.
28. Block SM (2007). *Kinesin motor mechanics: binding, stepping, tracking, gating, and limping*. Biophys J, 92(9), pp. 2986-2995.
29. Block SM, Goldstein LS, Schnapp BJ (1990). *Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers*. Nature, 348(6299), pp. 348-352.
30. Bodakuntla S, Schnitzler A, Villablanca C, Gonzalez-Billault C, Bieche I, Janke C, Magiera MM (2020). *Tubulin polyglutamylation is a general traffic-control mechanism in hippocampal neurons*. J Cell Sci, 133(3), p. jcs241802.
31. Bodakuntla S, Yuan X, Genova M, Gadadhar S, Leboucher S, Birling MC, Klein D, Martini R, Janke C, Magiera MM (2021). *Distinct roles of α - and β -tubulin*

- polyglutamylation in controlling axonal transport and in neurodegeneration*. EMBO J, 40(17), p. e108498.
32. Bodrug T, Wilson-Kubalek EM, Nithianantham S, Thompson AF, Alfieri A, Gaska I, Major J, Debs G, Inagaki S, Gutierrez P, Gheber L, McKenney RJ, Sindelar CV, Milligan R, Stumpff J, Rosenfeld SS, Forth ST, Al-Bassam J (2020). *The kinesin-5 tail domain directly modulates the mechanochemical cycle of the motor domain for anti-parallel microtubule sliding*. Elife, 9, p. e51131.
 33. Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC (2001). *Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation*. J Biol Chem, 276(16), pp. 12839-12848.
 34. Borisy GG, Marcum JM, Olmsted JB, Murphy DB, Johnson JH (1975). *Purification of tubulin and associated high molecular weight proteins from porcine brain and characterization of microtubule assembly in vitro*. Ann NY Acad Sci, 253, pp. 107-132.
 35. Bosch Grau M, Gonzalez Curto G, Rocha C, Magiera MM, Marques Sousa P, Giordano T, Spassky N, Janke C (2013). *Tubulin glycyloses and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia*. J Cell Biol, 202(3), pp. 441-451.
 36. Bosch Grau M, Masson C, Gadadhar S, Rocha C, Tort O, Marques Sousa P, Vacher S, Bieche I, Janke C (2017). *Alterations in the balance of tubulin glycylation and glutamylation in photoreceptors leads to retinal degeneration*. J Cell Sci, 130(5), pp. 938-949.
 37. Boucher D, Larcher J-C, Gros F, Denoulet P (1994). *Polyglutamylation of Tubulin as a Progressive Regulator of in Vitro Interactions between the Microtubule-Associated Protein Tau and Tubulin*. Biochemistry, 33(41), pp. 12471-12477.
 38. Böhm KJ, Stracke R, Baum M, Zieren M, Unger E (2000). *Effect of temperature on kinesin-driven microtubule gliding and kinesin ATPase activity*. FEBS Lett, 466(1), pp. 59-62.
 39. Bradford MM (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 72pp. 248-254.
 40. Brady ST (1985). *A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor*. Nature, 317(6032).pp. 73-75.
 41. Brady ST, Tytell M, Lasek RJ (1984). *Axonal tubulin and axonal microtubules: biochemical evidence for cold stability*. J Cell Biol, 99(5), pp. 1716-1724.
 42. Braun M, Lansky Z, Szuba A, Schwarz FW, Mitra A, Gao M, Lüdecke A, Ten Wolde PR, Diez S (2017). *Changes in microtubule overlap length regulate kinesin-14-driven microtubule sliding*. Nat Chem Biol, 13(12), pp. 1245-1252
 43. Bré MH, Redeker V, Quibell M, Darmanaden-Delorme J, Bressac C, Cosson J, Huitorel P, Schmitter JM, Rossler J, Johnson T, Adoutte A, Levilliers N (1996). *Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility*. J Cell Sci, 109(4), pp. 727-738.

44. Breuss MW, Leca I, Gstrein T, Hansen AH, Keays DA (2017). *Tubulins and brain development – The origins of functional specification*. Mol Cell Neurosci, 84, pp. 58-67.
45. Brouhard GJ, Rice LM (2018). *Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 19(7), pp. 451-463.
46. Budaitis BG, Jariwala S, Reinemann DN, Schimert KI, Scarabelli G, Grant BJ, Sept D, Lang MJ, Verhey KJ (2019). *Neck linker docking is critical for Kinesin-1 force generation in cells but at a cost to motor speed and processivity*. Elife, 8, p. e44146.
47. Burns RG (1991). *α -, β - and γ -Tubulins: Sequence Comparisons and Structural Constraints*. Cell Motil Cytoskeleton, 20(3), pp. 181-189.
48. Cai D, Hoppe AD, Swanson JA, Verhey KJ (2007a). *Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells*. J Cell Biol, 176(1), pp. 51-63.
49. Cai D, McEwen DP, Martens JR, Meyhofer E, Verhey KJ (2009). *Single Molecule Imaging Reveals Differences in Microtubule Track Selection Between Kinesin Motors*. PLoS Biol, 7(10), p. e1000216.
50. Cai D, Verhey KJ, Meyhöfer E (2007b). *Tracking single Kinesin molecules in the cytoplasm of mammalian cells*. Biophys J, 92(12), pp. 4137-4144.
51. Camlin NJ, McLaughlin EA, Holt JE (2017). *Motoring through: the role of kinesin superfamily proteins in female meiosis*. Hum Reprod Update, 23(4), pp. 409-420.
52. Cardoso CM, Groth-Pedersen L, Høyer-Hansen M, Kirkegaard T, Corcelle E, Andersen JS, Jäättelä M, Nylandsted J (2009). *Depletion of kinesin 5B affects lysosomal distribution and stability and induces peri-nuclear accumulation of autophagosomes in cancer cells*. PLoS One, 4(2), p. e4424.
53. Chandra R, Salmon ED, Erickson HP, Lockhart A, Endow SA (1993). *Structural and functional domains of the Drosophila ncd microtubule motor protein*. J Biol Chem, 268(12), pp. 9005-9013.
54. Chaudhary AR, Lu H, Kremontsova EB, Bookwalter CS, Trybus KM, Hendricks AG (2019). *MAP7 regulates organelle transport by recruiting kinesin-1 to microtubules*. J Biol Chem, 294(26), pp. 10160-10171.
55. Chiba K, Ori-McKenney KM, Niwa S, McKenney RJ (2021). *Reconstitution of Kinesin-1 Activation*. bioRxiv, p. 434960.
56. Chu CW, Hou F, Zhang J, Phu L, Loktev AV, Kirkpatrick DS, Jackson PK, Zhao Y, Zou H (2011). *A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation*. Mol Biol Cell, 22(4), pp. 448-456.
57. Conibear PB, Kuhlman PA, Bagshaw CR (1998). *Measurement of ATPase activities of myosin at the level of tracks and single molecules*. In H. Sugi, G. H. Pollack, Mechanisms of Work Production and Work Absorption in Muscle. Advances in Experimental Medicine and Biology (Vol. 453, pp. 15-26). Boston.
58. Conway L, Wood D, Tüzel E, Ross JL (2012). *Motor transport of self-assembled cargos in crowded environments*. Proc Natl Acad Sci USA, 109(51), pp. 20814-20819.

59. Coombes CE, Yamamoto A, Kenzie MR, Odde DJ, Gardner MK (2013). *Evolving tip structures can explain age-dependent microtubule catastrophe*. *Curr Biol*, 23(14), pp. 1342–1348.
60. Coppin CM, Pierce DW, Hsu L, Vale RD (1997). *The load dependence of kinesin's mechanical cycle*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(16), pp. 8539-8844.
61. Coy DL, Wagenbach M, Howard J (1999). *Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes*. *Nature*, 274(6), pp. 3667-3671.
62. Crevenna AH, Madathil S, Cohen DN, Wagenbach M, Fahmy K, Howard J (2008). *Secondary structure and compliance of a predicted flexible domain in kinesin-1 necessary for cooperation of motors*. *Biophys J*, 95(11), pp. 5216-5227.
63. Cross RA (2004). *The kinetic mechanism of kinesin*. *Trends Biochem Sci*, 29(6), pp. 301-309.
64. Cross RA, McAinsh A (2014). *Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(4), pp. 257-271.
65. De Rossi MC, Wetzler DE, Benseñor L, De Rossi ME, Sued M, Rodríguez D, Gelfand V, Bruno L, Levi V (2017). *Mechanical coupling of microtubule-dependent motor teams during peroxisome transport in Drosophila S2 cells*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861(12), pp. 3178-3189.
66. De S, Tsimounis A, Chen X, Rotenberg SA (2014). *Phosphorylation of α -Tubulin by Protein Kinase C Stimulates Microtubule Dynamics in Human Breast Cells*. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 71(4), pp. 257-272.
67. del Castillo U, Lu W, Winding M, Lakonishok M, Gelfand VI (2015). *Pavarotti/MKLP1 Regulates Microtubule Sliding and Neurite Outgrowth in Drosophila Neurons*. *Curr Biol*, 25(2), pp. 200-205.
68. del Castillo U, Müller HJ, Gelfand VI (2020). *Kinetochore protein Spindly controls microtubule polarity in Drosophila axons*. *Proc Natl Acad Sci*, 117(22), pp. 12155-12163.
69. Del Duca S, Serafini-Fracassini D, Bonner P, Cresti M, Cai G (2009). *Effects of post-translational modifications catalysed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments*. *Biochem J*, 418(3), pp. 651-664.
70. Derr ND, Goodman BS, Jungmann R, Leschziner AE, Shih WM, Reck-Peterson SL (2012). *Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold*. *Science*, 338(6107), pp. 662-665.
71. Desai A, Mitchison TJ (1997). *Microtubule polymerization dynamics*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, pp. 83-117.
72. Dietrich KA, Sindelar CV, Brewer PD, Downing KH, Cremo CR, Rice SE (2008). *The kinesin-1 motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(26), pp. 8938-8943.
73. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelières FP, King SJ, Humbert S, Saudou F (2007). *Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation*. *J Neurosci*, 27(13), pp. 3571-3583.

74. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992). *Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau*. Mol Biol Cell, 3(10), pp. 1141-1154.
75. Drechsler H, McAinsh AD (2016). *Kinesin-12 motors cooperate to suppress microtubule catastrophes and drive the formation of parallel microtubule bundles*. Proc Natl Acad Sci USA, 113(12), pp. E1635-1644.
76. Drechsler H, McHugh T, Singleton MR, Carter NJ, McAinsh AD (2014). *The Kinesin-12 Kif15 is a processive track-switching tetramer*. Elife, 3, p. e01724.
77. Endow SA, Chandra R, Komma DJ, Yamamoto AH, Salmon ED (1994). *Mutants of the Drosophila ncd microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis*. J Cell Sci, 107(Pt 4), pp. 859-867.
78. Endow SA, Kull FJ, Liu H (2010). *Kinesins at a glance*. J Cell Sci, 123(20), pp. 3420-3424.
79. Endres NF, Yoshioka C, Milligan RA, Vale RD (2006). *A lever-arm rotation drives motility of the minus-end-directed kinesin Ncd*. Nature, 439(7078), pp. 875-878.
80. Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, Salin PA, Job D, Wehland J (2005). *A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization*. Proc Natl Acad Sci, 102(22), pp. 7853-7858.
81. Fabczak H, Rędownicz MJ, Włoga D (2018). *Cytoszkielek i ruch komórki*. Kosmos, 67(1), pp. 13-14.
82. Fallesen TL, Macosko JC, Holzwarth G (2011). *Force-velocity relationship for multiple kinesin motors pulling a magnetic bead*. Eur Biophys J, 40(9), pp. 1071-1079.
83. Feng JF, Readon M, Yadav SP, Im MJ (1999). *Calreticulin Down-Regulates both GTP Binding and Transglutaminase Activities of Transglutaminase II*. Biochemistry, 38(33), pp. 10743-10749.
84. Ferenz NP, Paul R, Fagerstrom C, Mogilner A, Wadsworth P (2009). *Dynein antagonizes eg5 by crosslinking and sliding antiparallel microtubules*. Curr Biol, 19(21), pp. 1833-1838.
85. Ferro LS, Fang Q, Eshun-Wilson L, Fernandes J, Jack A, Farrell DP, Golcuk M, Huijben T, Costa K, Gur M, DiMaio F, Nogales E, Yildiz A (2022). *Structural and functional insight into regulation of kinesin-1 by microtubule-associated protein MAP7*. Science, 375(6578), pp. 326-331.
86. Fink G, Hajdo L, Skowronek KJ, Reuther C, Kasprzak AA, Diez S (2009). *The mitotic kinesin-14 Ncd drives directional microtubule-microtubule sliding*. Nat Cell Biol, 11(6), pp. 717-723.
87. Findeisen P, Muhlhausen S, Dempewolf S, Hertzog J, Zietlow A, Carlomagno T, Kollmar M (2014). *Six Subgroups and Extensive Recent Duplications Characterize the Evolution of the Eukaryotic Tubulin Protein Family*. Genome Biol Evol, 6(9), pp. 2274-2288.
88. Finkenstaedt-Quinn SA, Qiu TA, Shin K, Haynes CL (2016). *Super-resolution imaging for monitoring cytoskeleton dynamics*. Analyst, 141(20), pp. 5674-5688.
89. Fish KN (2009). *Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy*. Curr Protoc Cytom, 12(12.18).

90. Foster KA, Gilbert SP (2000). *Kinetic studies of dimeric Ncd: evidence that Ncd is not processive*. *Biochemistry*, 39(7), pp. 1784-1791.
91. Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantéz V, Job D (2006). *Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1*. *Mol Biol Cell*, 17(3), pp. 1041-1050.
92. Friedman DS, Vale RD (1999). *Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargo-binding tail domain*. *Nat Cell Biol*, 1(5), pp. 293-297.
93. Friel CT, Howard J (2011). *The kinesin-13 MCAK has an unconventional ATPase cycle adapted for microtubule depolymerization*. *EMBO J*, 30(19), pp. 3928-39.
94. Friel CT, Welburn JP (2018). *Parts list for a microtubule depolymerising kinesin*. *Biochem Soc Trans*, 46(6), pp. 1665-1672.
95. Fu C, Ward JJ, Loiodice I, Velve-Casquillas G, Nedelec FJ, Tran PT (2009). *Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation*. *Dev Cell*, 17(2), pp. 257-267.
96. Funatsu T, Harada Y, Higuchi H, Tokunaga M, Saito K, Ishii Y, Vale RD, Yanagida T (1997). *Imaging and nano-manipulation of single biomolecules*. *Biophys Chem*, 68(1-3), pp. 63-72.
97. Furuta K, Furuta A, Toyoshima YY, Amino M, Oiwa K, Kojima H (2013). *Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(2), pp. 501-506.
98. Gadadhar S, Dadi H, Bodakuntla S, Schnitzler A, Bièche I, Rusconi F, Janke C (2017). *Tubulin glycylation controls primary cilia length*. *J Cell Biol*, 216(9), pp. 2701-2713.
99. Gadadhar S, Viar GA, Hansen JN, Gong A, Kostarev A, Ialy-Radio C, Leboucher S, Whitfield M, Ziyat A, Touré A, Alvarez L, Pigino G, Janke C (2021). *Tubulin glycylation controls axonemal dynein activity, flagellar beat, and male fertility*. *Science*, 371(6525), p. eabd4914.
100. Gagliano J, Walb M, Blaker B, Macosko JC, Holzwarth G (2010). *Kinesin velocity increases with the number of motors pulling against viscoelastic drag*. *Eur Biophys J*, 39(5), pp. 801-13.
101. Geimer S, Teltenkötter A, Plessmann U, Weber K, Lehtreck K-F (1997). *Purification and characterization of basal apparatuses from a flagellate green alga*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 37(1), pp. 72-85.
102. Gell C, Bormuth V, Brouhard GJ, Cohen DN, Diez S, Friel CT, Helenius J, Nitzsche B, Petzold H, Ribbe J, Schäffer E, Stear JH, Trushko A, Varga V, Widlund PO, Zanic M, Howard J (2010). *Microtubule Dynamics Reconstituted In Vitro and Imaged by Single-Molecule Fluorescence Microscopy*. *Meth Cell Biol*, 95, pp. 221-245.
103. Geuens G, Gundersen GG, Nuydens R, Cornelissen F, Bulinski JC, DeBrabander M (1986). *Ultrastructural Colocalization of Tyrosinated and Detyrosinated α -Tubulin in Interphase and Mitotic Cells*. *J Cell Biol*, 103(5), pp. 1883-1893.
104. Gindhart JG Jr, Desai CJ, Beushausen S, Zinn K, Goldstein LS (1998). *Kinesin light chains are essential for axonal transport in Drosophila*. *J Cell Biol*, 141(2), pp. 443-454.

105. Godena VK, Brookes-Hocking N, Moller A, Shaw G, Oswald M, Sancho R., Miller CC, Whitworth AJ, De Vos KJ (2014). *Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations*. Nat Commun, 5, p. 5245.
106. Goodson HV, Jonasson EM (2018). *Microtubules and Microtubule-Associated Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 10(6), p. a022608.
107. Gordon DM, Roof DM (1999). *The kinesin-related protein Kip1p of Saccharomyces cerevisiae is bipolar*. J Biol Chem, 274(40), pp. 28779-28786.
108. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM (2002). *Transglutaminases: Nature's biological glues*. Biochem J, 368(2), pp. 377-396.
109. Groß H, Heil HS, Ehrig J, Schwarz FW, Hecht B, Diez S (2018). *Parallel mapping of optical near-field interactions by molecular motor-driven quantum dots*. Nat Nanotechnol, 13, pp. 691–695.
110. Gross SP, Guo Y, Martinez JE, Welte MA (2003). *A determinant for directionality of organelle transport in Drosophila embryos*. Curr Biol, 13(19), pp. 1660-1668.
111. Grummt M, Woehlke G, Henningsen U, Fuchs S, Schleicher M, Schliwa M (1998). *Importance of a flexible hinge near the motor domain in kinesin-driven motility*. EMBO J, 17(19), pp. 5536-5542.
112. Guedes-Dias P, Holzbaur ELF (2019). *Axonal transport: Driving synaptic function*. Science, 366(6462), p. eaaw9997.
113. Guha S, Patil A, Muralidharan H, Baas PW (2021). *Mini-review: Microtubule sliding in neurons*. Neurosci Lett, 753, p. 135867.
114. Gundersen GG, Bulinski JC (1986). *Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin*. Eur J Cell Biol, 42(2), pp. 288-294.
115. Guo W, Naujock M, Fumagalli L, Vandoorne T, Baatsen P, Boon R, Ordoñas L, Patel A, Welters M, Vanwelden T, Geens N, Tricot T, Benoy V, Steyaert J, Lefebvre-Omar C, Boesmans W, Jarpe M, Sternecker J, Wegner F, Petri S, Bohl D, Vanden Berghe P, Robberecht W, Van Damme P, Verfaillie C, Van Den Bosch L (2017). *HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients*. Nat Commun, 8(1), p. 861.
116. Guo SK, Wang WC, Wang PY, Xie P (2019). *Force Dependence of Velocity and Run Length of Kinesin-1, Kinesin-2 and Kinesin-5 Family Molecular Motors*. Molecules, 24(2), p. 287.
117. Hackney DD (1988). *Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release*. Proc Natl Acad Sci USA, 85(17), pp. 6314-6318.
118. Hackney DD (1995). *Highly processive microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains*. Nature, 377(6548), pp. 448-450.
119. Hackney DD, Baek N, Snyder AC (2009). *Half-site inhibition of dimeric kinesin head domains by monomeric tail domains*. Biochemistry, 48(15), pp. 3448-3456.
120. Hammond JW, Huang C-F, Kaech S, Jacobson C, Banker G, Verhey KJ (2010). *Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons*. Mol Biol Cell, 21(4), pp. 572-583.

121. Hancock WO (2016). *The Kinesin-1 Chemomechanical Cycle: Stepping Toward a Consensus*. *Biophys J*, 110(6), pp. 1216-1225.
122. Hancock WO, Howard J (1999). *Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(23), pp. 13147-13152.
123. Hasegawa G, Suwa M, Ichikawa Y, Ohtsuka T, Kumagai S, Kikuchi M, Sato Y, Saito Y (2003). *A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase*. *Biochem J*, 373(3), pp. 793-803.
124. Hendricks AG, Perlson E, Ross JL, Schroeder HW 3rd, Tokito M, Holzbaur EL (2010). *Motor coordination via a tug-of-war mechanism drives bidirectional vesicle transport*. *Curr Biol*, 20(8), pp. 697-702.
125. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009). *Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(10), pp. 682-696.
126. Hirokawa N, Pfister KK, Yorifuji H, Wagner MC, Brady ST, Bloom GS (1989). *Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration*. *Cell*, 56(5), pp. 867-878.
127. Hisanaga S, Murofushi H, Okuhara K, Sato R, Masuda Y, Sakai H, Hirokawa N (1989). *The molecular structure of adrenal medulla kinesin*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 12(4), pp. 264-272.
128. Hooikaas PJ, Martin M, Mühlethaler T, Kuijntjes GJ, Peeters CAE, Katrukha EA, Ferrari L, Stucchi R, Verhagen DGF, van Riel WE, Grigoriev I, Altelaar AFM, Hoogenraad CC, Rüdiger SGD, Steinmetz MO, Kapitein LC, Akhmanova A (2019). *MAP7 family proteins regulate kinesin-1 recruitment and activation*. *J Cell Biol*, 218(4), pp. 1298-1318.
129. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao T-P (2002). *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. *Nature*, 417(6887), pp. 455-458.
130. Hyman A, Drechsel D, Kellog D, Salser S, Sawin K, Steffen P, Wordeman L, Mitchison T (1991). *Preparation of modified tubulins*. *Methods Enzymol*, 196, pp. 478-485.
131. Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, Takagi H, Mukai M, Shimma S, Taira S, Hatanaka K, Morone N, Yao I, Campbell PK, Yuasa S, Janke C, Macgregor GR, Setou M (2007). *Loss of alpha-tubulin polyglutamylolation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(9), pp. 3213-3218.
132. Jacobson C, Schnapp B, Banker GA (2006). *A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon*. *Neuron*, 49(6), pp. 797-804.
133. Jamison DK, Driver JW, Rogers AR, Constantinou PE, Diehl MR (2010). *Two kinesins transport cargo primarily via the action of one motor: implications for intracellular transport*. *Biophys J*, 99(9), pp. 2967-2977.
134. Janke C (2014). *The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions*. *J Cell Biol*, 206(4), pp. 461-472.

135. Janke C, Magiera MM (2020). *The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 21(6), pp. 307-326.
136. Jaud J, Bathe F, Schliwa M, Rief M, Woehlke G (2006). *Flexibility of the neck domain enhances Kinesin-1 motility under load*. Biophys J, 91(4), pp. 1407-1412.
137. Jeppesen GM, Hoerber JK (2012). *The mechanical properties of kinesin-1: a holistic approach*. Biochem Soc Trans, 40(2), pp. 438-443.
138. Johnson GV, Cox TM, Lockhart JP, Zinnerman MD, Miller ML, Powers RE (1997). *Transglutaminase activity is increased in Alzheimer's disease brain*. Brain Res, 751(2), pp. 323-329.
139. Jolly AL, Kim H, Srinivasan D, Lakonishok M, Larson AG, Gelfand VI (2010). *Kinesin-1 heavy chain mediates microtubule sliding to drive changes in cell shape*. Proc Natl Acad Sci USA, 107(27), pp. 12151-12156.
140. Kaan HY, Hackney DD, Kozielski F (2011). *The structure of the kinesin-1 motor-tail complex reveals the mechanism of autoinhibition*. Science, 333(6044), pp. 883-885.
141. Kahn OI, Sharma V, González-Billault C, Baas PW (2015). *Effects of kinesin-5 inhibition on dendritic architecture and microtubule organization*. Mol Biol Cell, 26(1), pp. 66-77.
142. Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004). *Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule*. Neuron, 43(4), pp. 513-525.
143. Kang'iri SM, Salem A, Nicolau DV, Nitta T (2022). *Effects of defective motors on the active transport in biosensors powered by biomolecular motors*. Biosens Bioelectron, 203, p. 114011
144. Kaneko T, Furuta K, Oiwa K, Shintaku H, Kotera H, Yokokawa R (2020). *Different motilities of microtubules driven by kinesin-1 and kinesin-14 motors patterned on nanopillars*. Sci Adv, 6(4), p. eaax7413.
145. Kapitein LC, Hoogenraad CC (2015). *Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton*. Neuron, 87(3), pp. 492-506.
146. Kapitein LC, Kwok BH, Weinger JS, Schmidt CF, Kapoor TM, Peterman EJ (2008). *Microtubule cross-linking triggers the directional motility of kinesin-5*. J Cell Biol, 182(3), pp. 421-428.
147. Kapitein LC, Peterman EJ, Kwok BH, Kim JH, Kapoor TM, Schmidt CF (2005). *The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks*. Nature, 435(7038), pp. 114-118.
148. Kardon JR, Vale RD (2009). *Regulators of the cytoplasmic dynein motor*. Nat Rev Mol Cell Biol, 10(12), pp. 854-865.
149. Kaul N., Soppina V, Verhey KJ (2014). *Effects of α -tubulin K40 acetylation and deetyrosination on kinesin-1 motility in a purified system*. Biophys J, 106(12), pp. 2636-2643.
150. Kawaguchi K (2008). *Energetics of kinesin-1 stepping mechanism*. FEBS Lett, 582(27), pp. 3719-3722.
151. Kelliher MT, Yue Y, Ng A, Kamiyama D, Huang B, Verhey KJ, Wildonger J (2018). *Autoinhibition of kinesin-1 is essential to the dendrite-specific localization of Golgi outposts*. J Cell Biol, 217(7), pp. 2531-2547.

152. Keren K, Pincus Z, Allen GM, Barnhart EL, Marriott G, Mogilner A, Theriot JA (2008). *Mechanism of shape determination in motile cells*. Nature, 453(7194), pp. 475-480.
153. Kim JY, Woo S-Y, Hong YB, Choi H, Kim J, Choi H, Mook-Jung I, Ha N, Kyung J, Koo SK, Jung SC, Choi B-O (2016). *HDAC6 inhibitors rescued the defective axonal mitochondrial movement in motor neurons derived from the induced pluripotent stem cells of peripheral neuropathy patients with HSPB1 mutation*. Stem Cells Int, 2016, p. 9475981.
154. Kliszcz B, Kasprzak AA (2018). *Rola białek motorycznych w transporcie aksonalnym*. Kosmos 67(1), pp. 109-119.
155. Kliszcz B, Osinka A, Wacławek E, Kasprzak AA, Włoga D (2018). *Modyfikacje potranslacyjne tubuliny*. Kosmos, 67(1), pp. 95–107.
156. Klumpp S, Lipowsky R (2005). *Cooperative cargo transport by several molecular motors*. Proc Natl Acad Sci USA, 102(48), pp. 17284-17289.
157. Konishi Y, Setou M (2009). *Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons*. Nat Neurosci, 12(5), pp. 559-567.
158. Konjikusic MJ, Gray RS, Wallingford JB (2021). *The developmental biology of kinesins*. Dev Biol, 469, pp. 26-36.
159. Korn CB, Klumpp S, Lipowsky R, Schwarz US (2009). *Stochastic simulations of cargo transport by processive molecular motors*. J Chem Phys, 131(24), p. 245107.
160. Korten T, Chaudhuri S, Tavkin E, Braun M, Diez S (2016). *Kinesin-1 Expressed in Insect Cells Improves Microtubule in Vitro Gliding Performance, Long-Term Stability and Guiding Efficiency in Nanostructures*. IEEE Trans Nanobioscience, 15(1), pp. 62-69.
161. Korten T, Diez S (2008). *Setting up roadblocks for kinesin-1: mechanism for the selective speed control of cargo carrying microtubules*. Lab Chip, 8(9), pp. 1441-1447.
162. Kubo T, Yanagisawa H-A, Yagi T, Hirono M, Kamiya R (2010). *Tubulin Polyglutamylation Regulates Axonemal Motility by Modulating Activities of Inner-Arm Dyneins*. Curr Biol, 20(5), pp. 441-445.
163. Kumar N, Flavin M (1980). *Preferential action of a brain detyrosinating carboxypeptidase on polymerized tubulin*. J Biol Chem, 256(14), pp. 7678-7686.
164. Kunwar A, Mogilner A (2010). *Robust transport by multiple motors with nonlinear force-velocity relations and stochastic load sharing*. Phys Biol, 7(1), p. 16012.
165. Kuo YW, Trottier O, Mahamdeh M, Howard J (2019). *Spastin is a dual-function enzyme that severs microtubules and promotes their regrowth to increase the number and mass of microtubules*. Proc Natl Acad Sci USA, 116(12), pp. 5533–5541.
166. Kural C, Kim H, Syed S, Goshima G, Gelfand VI, Selvin PR (2005). *Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement?* Science, 308(5727), pp. 1469-1472.
167. Kushwaha VS, Acar S, Miedema DM, Denisov DV, Schall P, Peterman EJG (2020). *The crowding dynamics of the motor protein kinesin-II*. PLoS One, 15(2), p. e0228930.

168. La Regina G, Coluccia A, Naccarato V, Silvestri R (2019). *Towards modern anticancer agents that interact with tubulin*. Eur J Pharm Sci, 131, pp. 58-68.
169. Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C (2010). *Tubulin polyglutamylolation stimulates spastin-mediated microtubule severing*. J Cell Biol, 189(6), pp. 945-954.
170. Laemmli UK (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227(5259), pp. 680-685.
171. Lakadamyali M (2014). *Navigating the cell: how motors overcome roadblocks and traffic jams to efficiently transport cargo*. Phys Chem Chem Phys, 16(13), pp. 5907-5916.
172. Landskron L, Bak J, Adamopoulos A, Kaplani K, Moraiti M, van den Hengel LG, Song JY, Bleijerveld OB, Nieuwenhuis J, Heidebrecht T, Henneman L, Moutin MJ, Barisic M, Taraviras S, Perrakis A, Brummelkamp TR (2022). *Posttranslational modification of microtubules by the MATCAP detyrosinase*. Science, p. eabn6020.
173. Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE, Wordeman L (2004). *A standardized kinesin nomenclature*. J Cell Biol, 167(1): 19-22.
174. LeDizet M, Piperno G (1986). *Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in Chlamydomonas reinhardtii: spatial arrangement and properties*. J Cell Biol, 103(1), pp. 13-22.
175. Leduc C, Padberg-Gehle K, Varga V, Helbing D, Diez S, Howard J (2012). *Molecular crowding creates traffic jams of kinesin motors on microtubules*. Proc Natl Acad Sci USA, 109(16), pp. 6100-6105.
176. Lee S, Sunil N, Tejada JM, Shea TB (2011). *Differential roles of kinesin and dynein in translocation of neurofilaments into axonal neurites*. J Cell Sci, 124(Pt 7), pp. 1022-1031.
177. Lefèvre J, Chernov KG, Joshi V, Delga S, Toma F, Pastré D, Curmi PA, Savarin P (2011). *The C terminus of tubulin, a versatile partner for cationic molecules: binding of Tau, polyamines, and calcium*. J Biol Chem, 286(4), pp. 3065-3078.
178. Lesort M, Tucholski J, Miller ML, Johnson, GV (2000). *Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases*. Prog Neurobiol, 61(5), pp. 439-463.
179. Lessard DV, Zinder OJ, Hotta T, Verhey KJ, Ohi R, Berger CL (2019). *Polyglutamylolation of tubulin's C-terminal tail controls pausing and motility of kinesin-3 family member KIF1A*. J Biol Chem, 294(16), pp. 6353-6363.
180. Leung CL, Sun D, Zheng M, Knowles DR, Liem RK (1999). *Microtubule Actin Cross-Linking Factor (Macf): A Hybrid of Dystonin and Dystrophin That Can Interact with the Actin and Microtubule Cytoskeletons*. J Cell Biol, 147(6), pp. 1275-1286.
181. Levi V, Serpinskaya AS, Gratton E, Gelfand V (2006). *Organelle transport along microtubules in Xenopus melanophores: evidence for cooperation between multiple motors*. Biophys J, 90(1), pp. 318-327.

182. L'Hernault SW, Rosenbaum JL (1985). *Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine*. *Biochemistry*, 24(2), pp. 473-478.
183. Lim A, Rechtsteiner A, Saxton WM (2017). *Two kinesins drive anterograde neuropeptide transport*. *Mol Biol Cell*, 28(24), pp. 3542-3553.
184. Lim SS, Sammak PJ, Borisy GG (1989). *Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells*. *J Cell Biol*, 109(1), pp. 253-263.
185. Little M, Seehaus T (1988). *Comparative analysis of tubulin sequences*. *Comp Biochem Physiol B*, 90(4), pp. 655-670.
186. Lu H, Ali MY, Bookwalter CS, Warshaw DM, Trybus KM (2009). *Diffusive movement of processive kinesin-1 on microtubules*. *Traffic*, 10(10), pp. 1429-1438.
187. Lu W, Fox P, Lakonishok M, Davidson MW, Gelfand VI (2013). *Initial Neurite Outgrowth in Drosophila Neurons Is Driven by Kinesin-Powered Microtubule Sliding*. *Curr Biol*, 23(11), pp. 1018-1023.
188. Lu W, Gelfand VI (2017). *Moonlighting Motors: Kinesin, Dynein, and Cell Polarity*. *Trends Cell Biol*, 27(7), pp. 505-514.
189. Lu W, Lakonishok M, Gelfand VI (2015). *Kinesin-1-powered microtubule sliding initiates axonal regeneration in Drosophila cultured neurons*. *Mol Biol Cell*, 26(7), pp. 1296-1307.
190. Lu W, Winding M, Lakonishok M, Wildonger J, Gelfand VI (2016). *Microtubule-microtubule sliding by kinesin-1 is essential for normal cytoplasmic streaming in Drosophila oocytes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(34), pp. E4995-5004.
191. Lüdecke A, Seidel AM, Braun M, Lansky Z, Diez S (2018). *Diffusive tail anchorage determines velocity and force produced by kinesin-14 between crosslinked microtubules*. *Nat Commun*, 9(1), pp. 2214.
192. Ludueña RF, Banerjee A (2008). *The Isoforms of Tubulin*. In T. Fojo (Ed.), *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology* (pp. 123-175). Bethesda: Humana Press. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-59745-336-3_6
193. Maccioni RB, Seeds NW (1986). *Transglutaminase and neuronal differentiation*. *Mol Cell Biochem*, 69(2), pp. 161-168.
194. McDonald HB, Stewart RJ, Goldstein LS (1990). *The kinesin-like ncd protein of Drosophila is a minus end-directed microtubule motor*. *Cell*, 63(6), pp. 1159-1165.
195. Magiera MM, Bodakuntla S, Ziak J, Lacomme S, Sousa PM, Leboucher S, Hausrat TJ, Bosc C, Andrieux A, Kneussel M, Landry M, Calas A, Balastik M, Janke C (2018). *Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport*. *EMBO J*, 37(23), p. e100440.
196. Mandelkow EM, Herrmann M, Ruhl U (1985). *Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies*. *J Mol Biol*, 185(2), pp. 311-327.
197. Mandelkow E, Johnson KA (1998). *The structural and mechanochemical cycle of kinesin*. *Trends Biochem Sci*, 23(11), pp. 429-433.
198. Mann BJ, Balchand SK, Wadsworth P (2017). *Regulation of Kif15 localization and motility by the C-terminus of TPX2 and microtubule dynamics*. *Mol Biol Cell*, 28(1), pp. 65-75.

199. Marx A, Thormählen M, Müller J, Sack S, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998). *Conformations of kinesin: solution vs. crystal structures and interactions with microtubules*. Eur Biophys J, 27(5), pp. 455-465.
200. McKean PG, Vaughan S, Gull K (2001). *The extended tubulin superfamily*. J Cell Sci, 114(15), pp. 2723–2733.
201. McKenney RJ, Huynh W, Vale RD, Sirajuddin M (2016). *Tyrosination of α -tubulin controls the initiation of processive dynein–dynactin motility*. EMBO J, 35(11), pp. 1175-1185.
202. McNally FJ, Roll-Mecak A (2018). *Microtubule-severing enzymes: From cellular functions to molecular mechanism*. J Cell Biol, 217(12), pp. 4057-4069.
203. Mickolajczyk KJ, Cook ASI, Jevtha JP, Fricks J, Hancock WO (2019). *Insights into Kinesin-1 Stepping from Simulations and Tracking of Gold Nanoparticle-Labeled Motors*. Biophys J, 117(2), pp. 331-345.
204. Miedema DM, Kushwaha VS, Denisov DV, Acar S, Nienhuis B, Peterman EIJ, Schall P (2017). *Correlation imaging reveals specific crowding dynamics of kinesin motor proteins*. Physical Review X(7), p. 041037.
205. Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N (2001). *All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human*. Proc Natl Acad Sci USA, 98(13), pp. 7004-7011.
206. Milic B, Andreasson JO, Hancock WO, Block SM (2014). *Kinesin processivity is gated by phosphate release*. Proc Natl Acad Sci USA, 111(39), pp. 14136-14140.
207. Mishra S, Saleh A, Espino PS, Davie JR, Murphy LJ (2006). *Phosphorylation of Histones by Tissue Transglutaminase*. J Biol Chem, 281(9), pp. 5532-5538.
208. Mitchison T, Kirschner M (1984). *Dynamic instability of microtubule growth*. Nature, 312(5991), pp. 237–242.
209. Mogessie B, Roth D, Rahil Z, Straube A (2015). *A novel isoform of MAP4 organises the paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation*. eLife, 4, p. e05697.
210. Monzon GA, Scharrel L, DSouza A, Henrichs V, Santen L, Diez S (2020). *Stable tug-of-war between kinesin-1 and cytoplasmic dynein upon different ATP and roadblock concentrations*. J Cell Sci, 133(22), p. jcs249938.
211. Moore A, Wordeman L (2004). *The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis*. Trends Cell Biol, 14(10), pp. 537-546.
212. Morley SJ, Qi Y, Iovino L, Andolfi L, Guo D, Kalebic N, Castaldi L, Tischer C, Portulano C, Bolasco G, Shirlekar K, Fusco CM, Asaro A, Fermani F, Sundukova M, Matti U, Reymond L, De Ninno A, Businaro L, Johnsson K, Lazzarino M, Ries J, Schwab Y, Hu J, Heppenstall PA (2016). *Acetylated tubulin is essential for touch sensation in mice*. eLife, 5, p. e20813.
213. Mostowy S, Cossart P (2012). *Septins: the fourth component of the cytoskeleton*. Nat Rev Mol Cell Biol, 13(3), pp. 183-194.
214. Mountain V, Simerly C, Howard L, Ando A, Schatten G, Compton DA (1999). *The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle*. J Cell Biol, 147(2), pp. 351-366.

215. Moutaux E, Christaller W, Scaramuzzino C, Genoux A, Charlot B, Cazorla M, Saudou F (2018). *Neuronal network maturation differently affects secretory vesicles and mitochondria transport in axons*. *Sci Rep*, 8(1), p. 13429.
216. Moutin MJ, Bosc C, Peris L, Andrieux A (2020). *Tubulin post-translational modifications control neuronal development and functions*. *Dev Neurobiol*. doi:10.1002/dneu.22774
217. Mukai M, Ikegami K, Sugiura Y, Takeshita K, Nakagawa A, Setou M (2009). *Recombinant mammalian tubulin polyglutamylase TLL7 performs both initiation and elongation of polyglutamylation on beta-tubulin through a random sequential pathway*. *Biochemistry*, 48(5), pp. 1084–1093.
218. Murphy DB, Hiebsch RR, Wallis KT (1983). *Identity and Origin of the ATPase activity associated with neuronal microtubules*. I. The ATPase activity is associated with membrane vesicles. *J Cell Biol*, 96(5), pp. 1298-305.
219. Nakata T, Hirokawa N (2003). *Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head*. *J Cell Biol*, 162(6), pp. 1045-1055.
220. Navone F, Niclas J, Hom-Booher N, Sparks L, Bernstein HD, McCaffrey G, Vale RD (1992). *Cloning and expression of a human kinesin heavy chain gene: interaction of the COOH-terminal domain with cytoplasmic microtubules in transfected CV-1 cells*. *J Cell Biol*, 117(6), pp. 1263-1275.
221. Niescier RF, Kwak SK, Joo SH, Chang KT, Min KT (2016). *Dynamics of Mitochondrial Transport in Axons*. *Front Cell Neurosci*, 10, p. 123.
222. Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB, Mazouzi A, Stickel E, Celie P, Altelaar M, Knipscheer P, Perrakis A, Blomen VA, Brummelkamp TR (2017). *Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity*. *Science*, 358(6369), pp. 1453-1456.
223. Nieuwenhuis J, Brummelkamp TR (2019). *The Tubulin Detyrosination Cycle: Function and Enzymes*. *Trends Cell Biol*, 29(1), pp. 80-92.
224. Nieznanska H, Bandyszewska M, Surewicz K, Zajkowski T, Surewicz WK, Nieznanski K (2018). *Identification of prion protein-derived peptides of potential use in Alzheimer's disease therapy*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864(6), pp. 2143-2153.
225. Nitzsche B, Dudek E, Hajdo L, Kasprzak AA, Vilfan A, Diez S (2016). *Working stroke of the kinesin-14, ncd, comprises two substeps of different direction*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(43), p. E6582-E6589.
226. Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998). *Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography*. *Nature*, 391(6663), pp. 199-203.
227. Norkett R, Del Castillo U, Lu W, Gelfand VI (2020). *Ser/Thr kinase Trc controls neurite outgrowth in Drosophila by modulating microtubule-microtubule sliding*. *Elife*, 9, p. e52009.
228. Norris SR, Soppina V, Dizaji AS, Schimert KI, Sept D, Cai D, Sivaramakrishnan S, Verhey KJ (2014). *A method for multiprotein assembly in cells reveals independent action of kinesins in complex*. *J Cell Biol*, 207(3), pp. 393-406.

229. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003). *The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase*. Mol Cell, 11(2), pp. 437-444.
230. O'Connell JE, Grinberg VY, de Kruif CG (2003). *Association behavior of beta-casein*. J Colloid Interface Sci, 258(1), pp. 33-39.
231. Oelz DB, Del Castillo U, Gelfand VI, Mogilner A (2018). *Microtubule Dynamics, Kinesin-1 Sliding, and Dynein Action Drive Growth of Cell Processes*. Biophys J, 115(8):1614-1624.
232. Okabe S, Hirokawa N (1992). *Differential behavior of photoactivated microtubules in growing axons of mouse and frog neurons*. J Cell Biol, 117(1), pp. 105-120.
233. Oladipo A, Cowan A, Rodionov V (2007). *Microtubule motor Ncd induces sliding of microtubules in vivo*. Mol Biol Cell, 18(9), pp. 3601-3606.
234. Pampaloni F, Florin E-L (2008). *Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials*. Trends Biotechnol, 26(6), pp. 302-310.
235. Pan X, Cao Y, Stucchi R, Hooikaas PJ, Portegies S, Will L, Martin M, Akhmanova A, Harterink M, Hoogenraad CC (2019). *MAP7D2 Localizes to the Proximal Axon and Locally Promotes Kinesin-1-Mediated Cargo Transport into the Axon*. Cell Rep, 26(8), pp. 1988-1999.
236. Paturle-Lafanechere L, Edde B, Denoulet P, Van Dorsselaer A, Mazarguil H, Le Caer JP, Wehland J, Job D (1991). *Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated*. Biochem, 30, pp. 10523-10528.
237. Peris L, Parato J, Qu X, Soleilhac JM, Lanté F, Kumar A, Pero ME, Martínez-Hernández J, Corrao C, Falivelli G, Payet F, Gory-Fauré S, Bosc C, Blanca Ramírez M, Sproul A, Brocard J, Di Cara B, Delagrangé P, Buisson A, Goldberg Y, Moutin MJ, Bartolini F, Andrieux A (2022). *Tubulin tyrosination regulates synaptic function and is disrupted in Alzheimer's disease*. Brain, p. awab436.
238. Peris L, Wagenbach M, Lafanechère L, Brocard J, Moore AT, Kozielski F, Job D, Wordeman L, Andrieux A (2009). *Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination*. J Cell Biol, 185(7), pp. 1159–1166.
239. Pernigo S, Chegkazi MS, Yip YY, Treacy C, Glorani G, Hansen K, Politis A, Bui S, Dodding MP, Steiner RA (2018). *Structural basis for isoform-specific kinesin-1 recognition of Y-acidic cargo adaptors*. Elife, 7, p. e38362.
240. Peterman EJ, Scholey JM (2009). *Mitotic microtubule crosslinkers: insights from mechanistic studies*. Curr Biol, 19(23), pp. R1089-1094.
241. Pilling AD, Horiuchi D, Lively CM, Saxton WM (2006). *Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons*. Mol Biol Cell, 17(4), pp. 2057-2068.
242. Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, Castelnaud-Ptakhine L, Roubertie A, Attie-Bitach T, Desguerre I, Genevieve D, Barnerias C, Keren B, Lebrun N, Boddaert N, Encha-Razavi F, Chelly J (2010). *Mutations in the neuronal β -tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical*

- development and neuronal migration defects.* Hum Mol Genet, 19(22), pp. 4462–4473.
243. Portran D, Schaedel L, Xu Z, Théry M, Nachury MV (2017). *Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical aging.* Nat Cell Biol, 19(4), pp. 391–398.
244. Prassanawar SS, Panda D (2019). *Tubulin heterogeneity regulates functions and dynamics of microtubules and plays a role in the development of drug resistance in cancer.* Biochem J, 476(9), pp. 1359-1376.
245. Prosser SL, Pelletier L (2017). *Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act.* Nat Rev Mol Cell Biol, 18(3), pp. 187-201.
246. Qiang L, Yu W, Andreadis A, Luo M, Baas PW (2006). *Tau Protects Microtubules in the Axon from Severing by Katanin.* J Neurosci, 26(12), pp. 3120-3129.
247. Qin J, Zhang H, Geng Y, Ji Q (2020). *How Kinesin-1 Utilize the Energy of Nucleotide: The Conformational Changes and Mechanochemical Coupling in the Unidirectional Motion of Kinesin-1.* Int J Mol Sci, 21(18), p. 6977.
248. Rao AN, Baas PW (2018). *Polarity Sorting of Microtubules in the Axon.* Trends Neurosci, 41(2), pp. 77-88.
249. Rao AN, Patil A, Black MM, Craig EM, Myers KA, Yeung HT, Baas PW (2017). *Cytoplasmic Dynein Transports Axonal Microtubules in a Polarity-Sorting Manner.* Cell Rep, 19(11), pp. 2210-2219.
250. Rank M, Frey E (2018). *Crowding and Pausing Strongly Affect Dynamics of Kinesin-1 Motors along Microtubules.* Biophys J, 115(6), pp. 1068-1081.
251. Rappoport JZ, Simon SM (2003). *Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration.* J Cell Sci, 116(5), pp. 847-855.
252. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993). *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor.* Science, 261(5117), pp. 50-58.
253. Reddy BJN, Tripathy S, Vershinin M, Tanenbaum ME, Xu J, Mattson-Hoss M, Arabi K, Chapman D, Doolin T, Hyeon C, Gross SP (2017). *Heterogeneity in kinesin function.* Traffic, 18(10), pp. 658-671.
254. Redeker V (2010). *Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins.* Methods Cell Biol, 95, pp. 77-103.
255. Reed NA, Cai D, Blasius LT, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ (2006). *Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport.* Curr Biol, 16(21), pp. 2166-2272.
256. Regnard C, Audebert S, Desbruyères É, Denoulet P, Eddé B (1998). *Tubulin Polyglutamylase: Partial Purification and Enzymatic Properties.* Biochemistry, 37(23), pp. 8395-8404.
257. Reinemann DN, Sturgill EG, Das DK, Degen MS, Vörös Z, Hwang W, Ohi R, Lang MJ (2017). *Collective Force Regulation in Anti-parallel Microtubule Gliding by Dimeric Kif15 Kinesin Motors.* Curr Biol, 27(18), pp. 2810-2820.
258. Reinsch SS, Mitchison TJ, Kirschner M (1991). *Microtubule polymer assembly and transport during axonal elongation.* J Cell Biol, 115(2), pp. 365-379.

259. Reis GF, Yang G, Szpankowski L, Weaver C, Shah SB, Robinson JT, Hays TS, Danuser G, Goldstein LS (2012). *Molecular motor function in axonal transport in vivo probed by genetic and computational analysis in Drosophila*. *Mol Biol Cell*, 23(9), pp. 1700-1714.
260. Rezaul K, Gupta D, Semenova I, Ikeda K, Kraikivski P, Yu J, Cowan A, Zaliapin I, Rodionov V (2016). *Engineered Tug-of-War Between Kinesin and Dynein Controls Direction of Microtubule Based Transport In Vivo*. *Traffic*, 17(5), pp. 475-486.
261. Rice S, Lin AW, Safer D, Hart CL, Naber N, Carragher BO, Cain SM, Pechatnikova E, Wilson-Kubalek EM, Whittaker M, Pate E, Cooke R, Taylor EW, Milligan RA, Vale RD (1999). *A structural change in the kinesin motor protein that drives motility*. *Nature*, 402(6763), pp. 778-784.
262. Rocha C, Papon L, Cacheux W, Marques Sousa P, Lascano V, Tort O, Giordano T, Vacher S, Lemmers B, Mariani P, Meseure D, Medema JP, Bièche I, Hahne M, Janke C (2014). *Tubulin glycyllases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon*. *EMBO J*, 33(19), pp. 2247-2260.
263. Rogers AR, Driver JW, Constantinou PE, Kenneth Jamison D, Diehl MR (2009). *Negative interference dominates collective transport of kinesin motors in the absence of load*. *Phys Chem Chem Phys*, 11(24) pp. 4882-4889.
264. Rogowski K, Juge F, van Dijk J, Włoga D, Strub J-M, Levilliers N, Thomas D, Bré MH, Van Dorsselaer A, Gaertig J, Janke C (2009). *Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation*. *Cell*, 137(6), pp. 1076-1087.
265. Roll-Mecak A (2015). *Intrinsically disordered tubulin tails: complex tuners of microtubule functions?* *Semin Cell Dev Biol*, 37, pp. 11-19.
266. Roll-Mecak A (2019). *How cells exploit tubulin diversity to build functional cellular microtubule mosaics*. *Curr Opin Cell Biol*, 56, pp. 102-108.
267. Roll-Mecak A (2020). *The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding*. *Dev Cell*, 54(1), pp. 7-20.
268. Romberg L, Pierce DW, Vale RD (1998). *Role of the Kinesin Neck Region in Processive Microtubule-based Motility*. *J Cell Biol*, 140(6), pp. 1407-1416.
269. Roostalu J, Hentrich C, Bieling P, Telley IA, Schiebel E, Surrey T (2011). *Directional Switching of the Kinesin Cin8 Through Motor Coupling*. *Science*, 332(6025), pp. 94-99.
270. Rosenfeld SS, Renner B, Correia JJ, Mayo MS, Cheung HC (1996). *Equilibrium studies of kinesin-nucleotide intermediates*. *J Biol Chem*, 271(16), pp. 9473-9482.
271. Rosenfeld SS, Fordyce PM, Jefferson GM, King PH, Block SM (2003). *Stepping and stretching. How kinesin uses internal strain to walk processively*. *J Biol Chem*, 278(20), pp. 18550-18556.
272. Ross JL (2012). *The impacts of molecular motor traffic jams*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(16), pp. 5911-5912.
273. Ruhnnow F, Zwicker D, Diez S (2011). *Tracking single particles and elongated filaments with nanometer precision*. *Biophys J*, 100(11), pp. 2820-2828.
274. Saez TMM, Fernandez Bessone I, Rodriguez MS, Alloatti M, Otero MG, Cromberg LE, Pozo Devoto VM, Oubiña G, Sosa L, Buffone MG, Gelman DM, Falzone TL (2020).

- Kinesin-1-mediated axonal transport of CB1 receptors is required for cannabinoid-dependent axonal growth and guidance.* Development, 147(8), p. dev184069.
275. Sanchez AD, Feldman JL (2017). *Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites.* Curr Opin Cell Biol, 44, pp. 93-101.
276. Sánchez-Huertas C, Freixo F, Lüders J (2016). *Principles of Microtubule Organization: Insight from the Study of Neurons.* In J. Lüders (Ed.), The Microtubule Cytoskeleton (pp. 79-115). Vienna.
277. Sasaki K, Kaya M, Higuchi H (2018). *A Unified Walking Model for Dimeric Motor Proteins.* Biophys J, 115(10), pp. 1981-1992.
278. Satir P (1968). *Studies on cilia.* 3. Further studies on the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility. J Cell Biol, 39(1), pp. 77-94.
279. Saunders HAJ, Johnson-Schlitz DM, Jenkins BV, Volkert PJ, Yang SZ, Wildonger J (2022). *Acetylated α -tubulin K394 regulates microtubule stability to shape the growth of axon terminals.* Curr Biol, 32(3), pp. 614-630, e5.
280. Saxton WM, Hicks J, Goldstein LS, Raff EC (1991). *Kinesin heavy chain is essential for viability and neuromuscular functions in Drosophila, but mutants show no defects in mitosis.* Cell, 64(6), pp. 1093-1102.
281. Schaar BT, Chan GK, Maddox P, Salmon ED, Yen TJ (1997). *CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment.* J Cell Biol, 139(6), pp. 1373-1382.
282. Scharrel L, Ma R, Schneider R, Jülicher F, Diez S (2014). *Multimotor transport in a system of active and inactive kinesin-1 motors.* Biophys J, 107(2), pp. 365-372.
283. Schneider R, Korten T, Walter WJ, Diez S (2015). *Kinesin-1 motors can circumvent permanent roadblocks by side-shifting to neighboring protofilaments.* Biophys J, 108(9), pp. 2249-2257.
284. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.* Nat Methods, 9(7), pp. 671-675.
285. Schnitzer MJ, Block SM (1997). *Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step.* Nature, 388(6640), pp. 386-390.
286. Schnitzer MJ, Visscher K, Block SM (2000). *Force production by single kinesin motors.* Nat Cell Biol, 2(10), pp. 718-723.
287. Scholey JM, Heuser J, Yang JT, Goldstein LS (1989). *Identification of globular mechanochemical heads of kinesin.* Nature, 338(6213), pp. 355-357.
288. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano Jr JE, Hartwig JH, Shivdasani RA (2001). *A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets.* Curr Biol, 11(8), pp. 579-586.
289. Seeger MA, Rice SE (2010). *Microtubule-associated protein-like binding of the kinesin-1 tail to microtubules.* J Biol Chem, 285(11), pp. 8155-8162.
290. Serra-Marques A, Martin M, Katrukha EA, Grigoriev I, Peeters CA, Liu Q, Hooikaas PJ, Yao Y, Solianova V, Smal I, Pedersen LB, Meijering E, Kapitein LC, Akhmanova A (2020). *Concerted action of kinesins KIF5B and KIF13B promotes efficient secretory vesicle transport to microtubule plus ends.* Elife, 9, p. e61302.

291. Shang Z, Zhou K, Xu C, Csencsits R, Cochran JC, Sindelar CV (2014). *High-resolution structures of kinesin on microtubules provide a basis for nucleotide-gated force-generation*. *Elife*, 3, p. e04686.
292. Shashi V, Magiera MM, Klein D, Zaki M, Schoch K, Rudnik-Schöneborn S, Norman A, Lopes Abath Neto O, Dusl M, Yuan X, Bartesaghi L, De Marco P, Alfares AA, Marom R, Arold ST, Guzmán-Vega FJ, Pena LD, Smith EC, Steinlin M, Babiker MO, Mohassel P, Foley AR, Donkervoort S, Kaur R, Ghosh PS, Stanley V, Musaev D, Nava C, Mignot C, Keren B, Scala M, Tassano E, Picco P, Doneda P, Fiorillo C, Issa MY, Alassiri A, Alahmad A, Gerard A, Liu P, Yang Y, Ertl-Wagner B, Kranz PG, Wentzensen IM, Stucka R, Stong N, Allen AS, Goldstein DB; Undiagnosed Diseases Network, Schoser B, Rösler KM, Alfadhel M, Capra V, Chrast R, Strom TM, Kamsteeg EJ, Bönnemann CG, Gleeson JG, Martini R, Janke C, Senderek J (2018). *Loss of tubulin deglutamylase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration*. *EMBO J*, 37(23), p. e100540.
293. Sherwood NT, Sun Q, Xue M, Zhang B, Zinn K (2004). *Drosophila Spastin Regulates Synaptic Microtubule Networks and Is Required for Normal Motor Function*. *PLoS Biol*, 2(12), p. e429.
294. Shida T, Cueva JG, Xu Z, Goodman MB, Nachury MV (2010). *The major α -tubulin K40 acetyltransferase α TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(50), pp. 21517-21522.
295. Shimamoto Y, Forth S, Kapoor TM (2015). *Measuring Pushing and Braking Forces Generated by Ensembles of Kinesin-5 Crosslinking Two Microtubules*. *Dev Cell*, 34(6), pp. 669-681.
296. Siahaan V, Krattenmacher J, Hyman AA, Diez S, Hernández-Vega A, Lansky Z, Braun M (2019). *Kinetically distinct phases of tau on microtubules regulate kinesin motors and severing enzymes*. *Nat Cell Biol*, 21(9), pp. 1086-1092.
297. Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD (2014). *Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications*. *Nat Cell Biol*, 16(4), pp. 335-344.
298. Skowronek KJ, Kocik E, Kasprzak AA (2007). *Subunits interactions in kinesin motors*. *Eur J Cell Biol*, 86(9), pp. 559-568.
299. Smith BN, Ticozzi N, Fallini C, Soragia Gkazi A, Topp S, Kenna KP, Scotter EL, Kost J, Keagle P, Miller JW, Calini D, Vance C, Danielson EW, Troakes C, Tiloca C, Al-Sarraj S, Lewis EA, King A, Colombrita C, Pensato V, Castellotti B, de Bellerocche J, Baas F, ten Asbroek AL, Sapp PC, McKenna-Yasek D, McLaughlin RL, Polak M, Asress S, Esteban-Pérez J, Muñoz-Blanco JL, Simpson M; SLAGEN Consortium, van Rheenen W, Diekstra FP, Lauria G, Duga S, Corti S, Cereda C, Corrado L, Sorarù G, Morrison KE, Williams KL, Nicholson GA, Blair IP, Dion PA, Leblond CS, Rouleau GA, Hardiman O, Veldink JH, van den Berg LH, Al-Chalabi A, Pall H, Shaw PJ, Turner MR, Talbot K, Taroni F, García-Redondo A, Wu Z, Glass JD, Gellera C, Ratti A, Brown RH Jr, Silani V, Shaw CE, Landers JE (2014). *Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS*. *Neuron*, 84(2), pp. 324-331.
300. Song Y, Kirkpatrick LL, Schilling AB, Helseth DL, Chabot N, Keillor JW, Johnson GV, Brady ST (2013). *Transglutaminase and Polyamination of Tubulin: Posttranslational Modification for Stabilizing Axonal Microtubules*. *Neuron*, 78(1), pp. 109-123.

301. Stone MC, Rao K, Gheres KW, Kim S, Tao J, La Rochelle C, Folker CT, Sherwood NT, Rolls MM (2012). *Normal Spastin Gene Dosage Is Specifically Required for Axon Regeneration*. *Cell Rep*, 2(5), pp. 1340-1350.
302. Straube A, Hause G, Fink G, Steinberg G. (2006) *Conventional kinesin mediates microtubule-microtubule interactions in vivo*. *Mol Biol Cell*, 17(2), pp. 907-916.
303. Sturgill EG, Das DK, Takizawa Y, Shin Y, Collier SE, Ohi MD, Hwang W, Lang MJ, Ohi R (2014). *Kinesin-12 Kif15 targets kinetochore fibers through an intrinsic two-step mechanism*. *Curr Biol*, 24(19), pp. 2307-2313.
304. Sturgill EG, Ohi R (2013). *Kinesin-12 differentially affects spindle assembly depending on its microtubule substrate*. *Curr Biol*, 23(14), pp. 1280-1290.
305. Su X, Arellano-Santoyo H, Portran D, Gaillard J, Vantard M, Thery M, Pellman D (2013). *Microtubule-sliding activity of a kinesin-8 promotes spindle assembly and spindle-length control*. *Nat Cell Biol*, 15(8), pp. 948-957.
306. Svoboda K, Block SM (1994). *Force and velocity measured for single kinesin molecules*. *Cell*, 77(5), pp. 773-784.
307. Szczesna E, Kasprzak AA (2012). *The C-terminus of kinesin-14 Ncd is a crucial component of the force generating mechanism*. *FEBS Lett*, 586(6), pp. 854-858.
308. Szkop M, Kliszcz B, Kasprzak AA (2018). *A simple and reproducible protocol of glass surface silanization for TIRF microscopy imaging*. *Anal Biochem*, 549, pp. 119-123.
309. Tanaka EM, Kirschner MW (1991). *Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation*. *J Cell Biol*, 115(2), pp. 345-363.
310. Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, Hirokawa N (1998). *Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria*. *Cell*, 93(7), pp. 1147-1158.
311. Tanenbaum ME, Vale RD, McKenney RJ (2013). *Cytoplasmic dynein crosslinks and slides anti-parallel microtubules using its two motor domains*. *Elife*, 2, p. e00943.
312. Tanner NA, Loparo JJ, van Oijen AM (2009). *Visualizing Single-molecule DNA Replication with Fluorescence Microscopy*. *J Vis Exp*, 32, p. 1529.
313. Tas RP, Chazeau A, Cloin BM, Lambers ML, Hoogenraad CC, Kapitein LC (2017). *Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport*. *Neuron*, 96(6), pp. 1264-1271.
314. Telley IA, Bieling P, Surrey T (2009). *Obstacles on the microtubule reduce the processivity of Kinesin-1 in a minimal in vitro system and in cell extract*. *Biophys J*, 96(8), pp. 3341-3353.
315. Thorn KS, Ubersax JA, Vale RD (2000). *Engineering the processive run length of the kinesin motor*. *J Cell Biol*, 151(5), pp. 1093-1100.
316. Tjioe M, Shukla S, Vaidya R, Troitskaia A, Bookwalter CS, Trybus KM, Chemla YR, Selvin PR (2019). *Multiple kinesins induce tension for smooth cargo transport*. *Elife*, 8, p. e50974.
317. Toleikis A, Carter NJ, Cross RA (2020). *Backstepping Mechanism of Kinesin-1*. *Biophys J*, 119(10), pp. 1984-1994.

318. Tomishige M, Stuurman N, Vale RD (2006). *Single-molecule observations of neck linker conformational changes in the kinesin motor protein*. Nat Struct Mol Biol, 13(10), pp. 887-894.
319. Tovey CA, Conduit PT (2018). *Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes and beyond*. Essays Biochem, 62(6), pp. 765–780.
320. Toprak E, Yildiz A, Hoffman MT, Rosenfeld SS, Selvin PR (2009). *Why kinesin is so processive*. Proc Natl Acad Sci USA, 106(31), pp. 12717-12722.
321. Urrutia R, McNiven MA, Albanesi JP, Murphy DB, Kachar B (1991). *Purified kinesin promotes vesicle motility and induces active sliding between microtubules in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA, 88(15) pp. 6701-6705.
322. Vagnoni A, Hoffmann PC, Bullock SL (2016). *Reducing Lissencephaly-1 levels augments mitochondrial transport and has a protective effect in adult Drosophila neurons*. J Cell Sci, 129(1), pp. 178-190.
323. Vale RD, Funatsu T, Pierce DW, Romberg L, Harada Y, Yanagida T (1996). *Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules*. Nature, 380(6573), pp. 451-453.
324. Vale RD, Milligan RA (2000). *The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins*. Science, 288(5463), pp. 88-95.
325. Vale RD, Reese TS, Sheetz MP (1985). *Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility*. Cell, 42(1), pp. 39-50.
326. Valenstein ML, Roll-Mecak A (2016). *Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation*. Cell, 164(5), pp. 911-921.
327. Valentine MT, Fordyce PM, Krzyziak TC, Gilbert SP, Block SM (2006). *Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro*. Nat Cell Biol, 8(5), pp. 470-476.
328. van den Wildenberg SM, Tao L, Kapitein LC, Schmidt CF, Scholey JM, Peterman EJ (2008). *The homotetrameric kinesin-5 KLP61F preferentially crosslinks microtubules into antiparallel orientations*. Curr Biol, 18(23), pp. 1860-1864.
329. van Dijk J, Rogowski K, Miro J, Lacroix B, Edde B, Janke C (2007). *A Targeted Multienzyme Mechanism for Selective Microtubule Polyglutamylation*. Mol Cell, 26(3), pp. 437-448.
330. Vemu A, Atherton J, Spector JO, Moores CA, Roll-Mecak A (2017). *Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics*. Mol Biol Cell, 28(25), pp. 3564-3572.
331. Vemu A, Garnham CP, Lee D-Y, Roll-Mecak A (2014). *Generation of Differentially Modified Microtubules Using In Vitro Enzymatic Approaches*. Methods Enzymol, 540, pp. 149-166.
332. Verhey KJ, Gaertig J (2007). *The Tubulin Code*. Cell Cycle, 6(17), pp. 2152-2160.
333. Verhey KJ, Hammond JW. (2009). *Traffic control: regulation of kinesin motors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 10(11), pp. 765-777.
334. Verhey KJ, Lizotte DL, Abramson T, Barenboim L, Schnapp BJ, Rapoport TA (1998). *Light chain-dependent regulation of Kinesin's interaction with microtubules*. J Cell Biol, 143(4), pp. 1053-1066.

335. Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP (2007). *Multiple-motor based transport and its regulation by Tau*. Proc Natl Acad Sci USA, 104(1), pp. 87-92.
336. Visscher K, Schnitzer MJ, Block SM (1999). *Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp*. Nature, 400(6740), pp. 184-189.
337. Walter WJ, Beránek V, Fischermeier E, Diez . (2012). *Tubulin Acetylation Alone Does Not Affect Kinesin-1 Velocity and Run Length In Vitro*. PLoS One, 7(8), p. e42218.
338. Wang L, Brown A (2002). Rapid Movement of Microtubules in Axons. Curr Biol, 12(17), pp. 1496-1501.
339. Wang Z, Sheetz MP (2000). *The C-Terminus of Tubulin Increases Cytoplasmic Dynein and Kinesin Processivity*. Biophys J, 78(4), pp. 1955-1964.
340. Webb BC, Wilson L (1980). *Cold-Stable Microtubules from Brain*. Biochemistry, 9(4), pp. 493-504.
341. Weinger JS, Qiu M, Yang G, Kapoor TM (2011). *A nonmotor microtubule binding site in kinesin-5 is required for filament crosslinking and sliding*. Curr Biol, 21(2), pp. 154-160.
342. Welte MA (2004). *Bidirectional transport along microtubules*. Curr Biol, 14(13), p. R525-537.
343. Wijeratne SS, Fiorenza SA, Subramanian R, Meredith D, Betterton MD (2020). *Motor guidance by long-range communication through the microtubule highway*. bioRxiv, p. 424221.
344. Wijeratne SS, Subramanian R (2018). *Geometry of antiparallel microtubule bundles regulates relative sliding and stalling by PRC1 and Kif4A*. Elife, 7, p. e32595.
345. Winding M, Kelliher MT, Lu W, Wildonger J, Gelfand VI (2016). *Role of kinesin-1-based microtubule sliding in Drosophila nervous system development*. Proc Natl Acad Sci USA, 113(34), p. E4985-94.
346. Wong YL, Rice SE (2010). *Kinesin's light chains inhibit the head- and microtubule-binding activity of its tail*. Proc Natl Acad Sci USA, 107(26), pp. 11781-11786.
347. Włoga D, Webster DM, Rogowski K, Bré M-H, Levilliers N, Jerka-Dziadosz M, Janke C, Dougan ST, Gaertig J (2009). *TLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia*. Dev Cell, 16(6), pp. 867-876.
348. Włoga D, Joachimiak E, Louka P, Gaertig J (2017). *Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 9(6), p. a028159.
349. Wu J, Akhmanova A (2017). *Microtubule-Organizing Centers*. Annu Rev Cell Dev Biol, 33, pp. 51-75.
350. Xia CH, Roberts EA, Her LS, Liu X, Williams DS, Cleveland DW, Goldstein LS (2003). *Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A*. J Cell Biol, 161(1), pp. 55-66.
351. Xu Z, Schaedel L, Portran D, Aguilar A, Gaillard J, Marinkovich MP, Théry M, Nachury MV (2017). *Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation*. Science, 356(6335), pp. 328-332.
352. Yang JT, Laymon RA, Goldstein LS (1989). *A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses*. Cell, 56(5), pp. 879-889.

353. Yang JT, Saxton WM, Stewart RJ, Raff EC, Goldstein LS (1990). *Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro*. *Science*, 249(4964), pp. 42-47.
354. Yasuda K, Clatterbuck-Soper S. F, Jackrel ME, Shorter J, Mili S (2017). *FUS inclusions disrupt RNA localization by sequestering kinesin-1 and inhibiting microtubule deetyrosination*. *J Cell Biol*, 216(4), pp. 1015-1034.
355. Yildiz A, Tomishige M, Vale RD, Selvin PR (2004). *Kinesin walks hand-over-hand*. *Science*, 303(5658), pp. 676-678.
356. Yu W, Qiang L, Solowska JM, Karabay A, Korulu S, Baas PW (2008). *The Microtubule-severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches*. *Mol Biol Cell*, 19(4), pp. 1485–1498.
357. Zhang D, Rogers GC, Buster DW, Sharp DJ (2007). *Three microtubule severing enzymes contribute to the “Pacman-flux” machinery that moves chromosomes*. *J Cell Biol*, 177(2), pp. 231–242.
358. Zhang J, Wang S, Huang W, Bennett DA, Dickson DW, Wang D, Wang R (2016). *Tissue Transglutaminase and Its Product Isopeptide Are Increased in Alzheimer's Disease and APP^{sw}/PS1^{dE9} Double Transgenic Mice Brains*. *Mol Neurobiol*, 53(8), pp. 5066–5078.