



**instytut** biologii doświadczalnej  
im. Marcelego Nenckiego PAN

**Jolanta Nowak**

**Lokalizacja i funkcja miozyny VI w jąderku  
komórek neurosekrecyjnych PC12**

Praca doktorska wykonana  
w Pracowni Molekularnych Podstaw  
Ruchów Komórkowych  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. Marcelego Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**  
**Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz**

**Promotor pomocniczy:**  
**Dr hab. Robert Lenartowski**

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Warszawa, 2022

## ***Serdecznie dziękuję:***

***Prof. dr hab. Marii Jolancie Rędownicz*** za wieloletnią opiekę naukową, wyrozumiałość, cierpliwość, cenne uwagi oraz okazaną pomoc w powstawaniu niniejszej rozprawy doktorskiej.

***Dr hab. Robertowi Lenartowskiemu*** za wsparcie i cenne uwagi w trakcie pisania pracy.

***Dr. Łukaszowi Majewskiemu, dr Magdalenie Sobczak i dr Elżbiecie Dudek*** za przekazaną wiedzę, wprowadzenie mnie w techniki eksperymentalne oraz życzliwą i miłą atmosferę.

Ponadto, pozostałym byłym i obecnym ***Pracownikom Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych - dr Justynie Karolczak, dr Julii Pavlyk, dr Małgorzacie Topolewskiej, dr Olenie Karatsai, dr Lili Lehkiej, Dominice Wojton, dr Virze Chumak, dr. Damianowi Matyśniakowi, Weronice Ficerman, dr Marcie Gawor, dr Palomie Alvarez Suarez*** za stworzenie wyjątkowej atmosfery pracy, wsparcie, nieocenioną pomoc, niezliczone momenty śmiechu oraz inspirujące dyskusje o sprawach dotyczących nie tylko świata nauki.

***Pracownikom Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych, a w szczególności dr. Jarosławowi Korczyńskiemu oraz Natalii Nowak*** w obsłudze mikroskopów i obrazowaniu preparatów.

***Dr hab. Marcie Lenartowskiej i dr. Przemysławowi Zakrzewskiemu*** z Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za pomoc w uzyskaniu wyników z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego.

***Dr hab. Katarzynie Kalicie-Bykowskiej*** z Pracowni Neurobiologii za pomoc w uzyskaniu wyników z wykorzystaniem techniki q-PCR.

Dziękuję ***Rodzinie*** oraz ***mojemu Mężowi*** za nieustanne wsparcie, motywację i cierpliwość oraz wiarę w powstanie tego doktoratu.

# SPIS TREŚCI

<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>9</b>
<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	<b>11</b>
<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>15</b>
1.1. Jądro komórkowe .....	16
1.2. Jąderko - struktura i funkcje .....	18
1.3. Stres jąderkowy .....	22
1.4. Charakterystyka wybranych białek jąderkowych .....	23
1.4.1. UBF .....	23
1.4.2. Fibrylaryna .....	24
1.4.3. Białko B23 .....	25
1.4.4. Nukleolina .....	26
1.5. Nadrodzina miozyn .....	28
1.5.1. Miozyny konwencjonalne .....	30
1.5.2. Miozyny niekonwencjonalne .....	30
1.5.3. Miozyny w jądrze komórkowym .....	32
1.6. Miozyna VI .....	33
1.6.1. Budowa miozyny VI .....	33
1.6.1.1. Właściwości kinetyczne miozyny VI .....	35
1.6.2. Białka oddziałujące z miozyną VI .....	35
1.6.3. Funkcje miozyny VI .....	38
1.6.4. Miozyna VI w jądrze komórkowym .....	38
1.6.5. Inne miozyny występujące w jądrze komórkowym .....	41
1.6.5.1. Miozyna IC .....	41
1.6.5.2. Miozyna II .....	45
1.6.5.3. Miozyna V .....	45
1.6.5.4. Miozyna XVI .....	47
1.6.5.5. Miozyna XVIII .....	48
<b>2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY</b> .....	<b>50</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b> .....	<b>52</b>
3.1. Hodowla komórek PC12 .....	53

3.1.1.	Bankowanie i rozmrażanie linii komórkowych.....	54
3.1.1.1.	Bankowanie .....	54
3.1.1.2.	Rozmrażanie .....	55
3.2.	Stymulacja komórek do wydzielania zawartości granul chromafinowych .....	55
3.3.	Wywoływanie stresu jąderkowego w komórkach PC12 .....	55
3.4.	Metody pracy z kwasami nukleinowymi .....	56
3.4.1.	Izolacja RNA .....	56
3.4.2.	Pomiar stężenia RNA .....	56
3.4.3.	Przepisywanie RNA na cDNA metodą odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) .....	56
3.4.4.	Reakcja PCR z analizą ilości przyrostu produktu w czasie rzeczywistym	57
3.5.	Metody pracy z białkami .....	58
3.5.1.	Otrzymywanie całkowitych lizatów komórek PC12 .....	58
3.5.2.	Otrzymywanie frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej z komórek PC12 ....	58
3.6.	Oznaczenie stężenia białka w lizatach komórek PC12 metodą Bradforda.....	60
3.7.	Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) .....	61
3.8.	Immunodetekcja białek metodą Western blot .....	61
3.9.	Metody barwień immunofluorescencyjnych .....	63
3.9.1.	Przygotowanie szkiełek nakrywkowych wykorzystywanych do barwień.	63
3.9.2.	Barwienie immunofluorescencyjne komórek PC12 .....	63
3.9.3.	Wizualizacja retikulum endoplazmatycznego (ER) .....	65
3.10.	Metody z zastosowaniem DNA .....	66
3.10.1.	Hodowla bakterii .....	66
3.10.2.	Przygotowanie bakterii kompetentnych .....	66
3.10.3.	Transformacja bakterii kompetentnych .....	67
3.10.4.	Przechowywanie bakterii.....	67
3.11.	Otrzymywanie rekombinowanych białek.....	67
3.11.1.	Ekspresja konstruktów kodujących rekombinowane białka w bakteriach <i>E.coli</i> .....	67
3.11.2.	Oczyszczanie rekombinowanej C-końcowej domeny globularnej MVI z bakterii <i>E.coli</i> .....	68
3.12.	Metody badań oddziaływań białek.....	69
3.12.1.	Metoda zbliżeniowej ligacji in situ, PLA.....	69
3.12.2.	Chromatografia powinowactwa typu <i>pull down</i> .....	71
3.12.3.	Koimmunoprecypitacja białek na złożu Protein A/G agarose .....	72
3.13.	Transmisyjna mikroskopia elektronowa .....	73

3.13.1. Analiza ultrastruktury komórek .....	73
3.13.2. Znakowanie techniką Immunogold .....	74
3.14. Analiza statystyczna.....	75
<b>4. WYNIKI.....</b>	<b>76</b>
4.1. Wprowadzenie .....	77
4.2. Oddziaływanie MVI z nukleoliną .....	78
4.3. Oddziaływanie MVI z S6.....	82
4.4. Obecność MVI w jąderku .....	84
4.4.1. MVI jest obecna we frakcji jąderkowej.....	84
4.4.2. MVI zawiera sygnał lokalizacji jąderkowej NoLS.....	85
4.4.3. MVI występuje głównie w obszarach DFC i GC jąderka .....	86
4.4.4. Poziom MVI w jąderku zwiększa się po stymulacji komórek 56 mM KCl.....	87
4.4.5. Oddziaływanie MVI z białkami charakterystycznymi dla obszarów jąderka .....	88
4.4.6. MVI kolokalizuje z białkami jąderkowymi.....	90
4.5. Wpływ stresu jąderkowego wywołanego aktynomycyną D (ActD) na lokalizację MVI w komórkach PC12.....	92
4.5.1. Ultrastruktura jąderka w komórkach traktowanych ActD.....	93
4.5.2. ActD wpływa na lokalizację MVI w komórkach PC12 .....	94
4.6. Wpływ obniżonego poziomu MVI na ultrastrukturę jąderka – badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej .....	96
4.7. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom i lokalizację białek jąderkowych.....	98
4.7.1. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom wybranych białek jąderkowych .....	98
4.7.2. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację UBF .....	99
4.7.3. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację fibrylaryny .....	101
4.7.4. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację B23 .....	103
4.8. Wpływ obniżonego poziomu MVI na morfologię retikulum endoplazmatycznego (ER) .....	105
4.8.1. Wpływ obniżonego poziomu MVI na organizację ER z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i konfokalnej .....	105
4.8.2. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację i poziom białka rybosomalnego S6.....	108

4.9. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom 45S pre-rRNA .....	110
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>113</b>
5.1. Wprowadzenie .....	114
5.2. Analiza oddziaływania MVI z S6 .....	114
5.3. Analiza oddziaływania MVI z nukleoliną.....	117
5.4. Analiza lokalizacji MVI w jąderku i identyfikacja nowych partnerów MVI w jąderku .....	118
5.5. Wpływ stresu jąderkowego na lokalizację MVI .....	120
5.6. Wpływ obniżonego poziomu MVI na ultrastrukturę jąderka i lokalizację białek jąderkowych .....	121
5.7. Wpływ obniżonego poziomu MVI na organizację ER .....	123
5.8. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom 45S pre-rRNA .....	124
5.9. Uwagi końcowe.....	125
<b>6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....</b>	<b>126</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>128</b>
<b>LISTA PUBLIKACJI WŁASNYCH.....</b>	<b>157</b>

## STRESZCZENIE

Miozyna VI (MVI) to unikalne białko motoryczne, które w odróżnieniu od innych miozyn porusza się w kierunku końca „minus” filamentów aktynowych. MVI jest zaangażowana w szereg procesów komórkowych, w tym migrację, adhezję, egzo- i endocytozę, stabilizację struktury aparatu Golgiego, cytokinezę oraz ekspresję genów. Jej udział w tych procesach polega na transporcie ładunku (cargo) i/lub kotwiczeniu cargo z filamentami aktynowymi. U ssaków mutacje w genie kodującym MVI prowadzą do utraty słuchu, zaś zwiększona synteza MVI - do nowotworów jajnika i prostaty. U ludzi mutacja punktowa (His246Arg) jest również związana z objawami kardiomiopatii przerostowej. Ponadto, u myszy *Snell's waltzer*, u których na skutek mutacji w genie *Myo6* doszło do utraty zdolności do syntezy MVI, zaobserwowano, oprócz głuchoty i łagodnych zmian neurologicznych, przerost mięśnia sercowego.

O obecności MVI w jądrze wiadomo od 2006 r., kiedy to pokazano, że w transkrypcyjnie aktywnych komórkach HeLa MVI kolokalizuje z kompleksem RNA polimerazy II (Pol II) oraz z nowopowstałymi transkryptami mRNA. Późniejsze badania prowadzone w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, na komórkach neurosekrecyjnych PC12, wyprowadzonych z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura potwierdziły te obserwacje. Co więcej wykazano, że po stymulacji komórek PC12 KCl poziom MVI w jądrze wzrasta, czemu towarzyszy wzrost jej kolokalizacji z aktywną formą Pol II. Ponadto, analiza spektrometrii mas umożliwiła identyfikację szeregu nowych, potencjalnych jądrowych partnerów MVI, którzy mogą determinować jej rolę w jądrze komórkowym. Wśród nich znalazła się nukleolina, białko jąderkowe biorące udział w biogenezie rybosomów oraz S6, białko strukturalne małej podjednostki (40S) rybosomu. Brak danych literaturowych na temat funkcjonowania MVI w jąderku zachęcił mnie do zbadania potencjalnej roli tego białka motorycznego w tym regionie jądra.

W moich badaniach potwierdziłam oddziaływanie MVI z nukleoliną [białkiem charakterystycznym dla warstwy ziarnistej jąderka (GC, ang. *granular component*), w której ma miejsce składanie podjednostek rybosomów] oraz białkiem rybosomalnym S6 (biorącym udział w eksporcie małej podjednostki rybosomu z jąderka do cytoplazmy). Pokazałam również, że inne białka jąderkowe charakterystyczne dla poszczególnych warstw jąderka także oddziałują z MVI. Wśród nich znalazły się: czynnik transkrypcyjny

UBF (ang. *upstream binding factor*) [charakterystyczny dla centrum fibrylarnego jąderka (FC, ang. *fibrillar center*), gdzie odbywa się transkrypcja rDNA], fibrylaryna [charakterystyczna dla gęstego składnika fibrylarnego jąderka (DFC, ang. *dense fibrillar component*), w którym zachodzi dojrzewanie pre-rRNA] oraz białko B23 [charakterystyczne dla warstwy GC]. Oddziaływanie MVI z białkami jąderkowymi i S6 sugeruje zatem zaangażowanie MVI w różnych etapach biogenezy rybosomów.

Z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej określiłam subjąderkową lokalizację MVI; MVI występuje głównie w obszarze DFC oraz otaczającym go obszarze GC. Analiza przy użyciu mikroskopii elektronowej wykazała ponadto, że w warunkach stresu jąderkowego wywołanego aktynomycyną D (ActD) dochodzi do dezintegracji jąderka. Zaobserwowałam ponadto, że w komórkach z obniżonym poziomem syntezy MVI ultrastruktura jąderka była mniej zwarta w porównaniu do komórek kontrolnych, co może świadczyć o udziale MVI w zachowaniu prawidłowej organizacji jąderka. Co więcej, analiza z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej wykazała, że MVI bierze udział w lokalizacji białka jąderkowego B23 w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu jąderkowego, co może wskazywać na funkcjonalność tych oddziaływań. Dodatkowo, zaobserwowałam, że obniżeniu poziomu MVI towarzyszą zaburzenia w organizacji siateczki śródplazmatycznej (retikulum endoplazmatycznego, ER); ER było bardziej pofragmentowane i rozproszone, w porównaniu do komórek kontrolnych. Ponadto, zaobserwowałam, że w komórkach z obniżonym poziomem MVI, barwienie przeciwko białku rybosomalnemu S6 było znacznie mniej intensywne w porównaniu do komórek kontrolnych, co może sugerować udział MVI w organizacji i funkcjonowaniu rybosomów. Nie wykazałam natomiast wpływu obniżonego poziomu MVI na poziom 45S pre-rRNA.

Podsumowując, uzyskane przez mnie wyniki wskazują, że MVI jest zaangażowana w organizację jąderka i siateczki śródplazmatycznej ale nie odgrywa znaczącej roli w transkrypcji rDNA. Ponieważ utrzymanie prawidłowej organizacji jąderka jest istotne dla biogenezy rybosomów, (której zaburzenia prowadzą do wielu poważnych chorób), prezentowane wyniki otwierają możliwość dalszych badań nad mechanizmami funkcjonowania MVI w jąderku.



## SUMMARY

Myosin VI (MVI) is a unique motor protein that, unlike other myosins, moves toward the "minus" end of actin filaments. MVI is involved in a number of cellular processes, including migration, adhesion, exo- and endocytosis, stabilization of the Golgi apparatus structure, cytokinesis and gene expression. Its involvement in these processes involves cargo transport and/or cargo anchoring with actin filaments. In mammals, mutations in the gene encoding MVI lead to hearing loss, while increased synthesis of MVI leads to ovarian and prostate cancers. In humans, a point mutation (His246Arg) is also associated with symptoms of hypertrophic cardiomyopathy. In addition, in *Snell's waltzer* mice, which lost the ability to synthesize MVI due to mutations in the *MYO6* gene, cardiac hypertrophy was observed next to deafness and mild neurological changes.

The presence of MVI in the nucleus has been known since 2006, when it was shown that in transcriptionally active HeLa cells, MVI colocalizes with the RNA polymerase II complex (Pol II) and with newly formed mRNA transcripts. Subsequent studies conducted in the Laboratory of Molecular Basis of Cell Motility, Nencki Institute of Experimental Biology of the Polish Academy of Sciences, on PC12 neurosecretory cells derived from rat adrenal medulla tumor confirmed these observations. Moreover, it was shown that after stimulation of PC12 cells with KCl the level of MVI in the nucleus increases, and this is accompanied by an increase in its colocalization with the active form of Pol II. In addition, mass spectrometry analysis allowed for identification of a number of new potential nuclear partners of MVI, which may determine its role in the cell nucleus. Among them was nucleolin, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis as well as S6, a structural protein of the small ribosomal subunit (40S). The lack of literature data on the function of MVI in the nucleolus encouraged me to investigate the potential role of this motor protein in this region of the nucleus.

In my study, I confirmed the interaction of MVI with nucleolin [a protein characteristic of the granular component (GC) of the nucleus, where the assembly of ribosome subunits takes place] and the ribosomal protein S6 (involved in the export of the small subunit of the ribosome from the nucleus to the cytoplasm). I also showed that other nucleolar proteins also interact with MVI. These included upstream binding factor (UBF) [characteristic of the fibrillar center (FC) of the nucleolus, where rDNA transcription takes place], fibrillarin [characteristic of the dense fibrillar component

(DFC) of the nucleolus, where pre-rRNA maturation takes place] and B23 protein [characteristic of the GC]. Thus, the interaction of MVI with nucleolar proteins and S6 suggests the involvement of MVI in various steps of ribosome biogenesis. Using electron microscopy, I determined the subnuclear localization of MVI; MVI is mainly found in the DFC and the surrounding GC region. Further analysis using electron microscopy showed that under actinomycin D (ActD)-induced nucleolar stress, the nucleolus disintegrates. In addition, I observed that in MVI-knockdown cells the ultrastructure of the nucleolus was less compact compared to control cells, which might indicate that MVI is involved in the maintaining the normal organization of the nucleolus. Moreover, confocal microscopy analysis showed that MVI is involved in the localization of the nucleolar protein B23 under control and nucleolar stress conditions, which may suggest the functionality of these interactions. In addition, I observed that reduced level of MVI is accompanied by disruption of the organization of the endoplasmic reticulum (ER); the ER was more fragmented and scattered, compared to control cells. Also, I observed that in cells with reduced levels of MVI, staining against the ribosomal protein S6 was significantly less intense compared to control cells, which may suggest the involvement of MVI in the organization and function of ribosomes. In contrast, I did not show an effect of reduced MVI levels on 45S pre-rRNA level.

In summary, my results indicate that MVI is involved in the organization of the nucleolus and ER but does not play a significant role in rDNA transcription. Since the maintenance of proper nucleolar organization is important for ribosome biogenesis (the disruption of which leads to many serious diseases), the results presented here open the possibility for further research into the mechanisms of MVI function in the nucleolus.

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>AKAP9</b>	<i>A-kinase anchor protein 9</i> - białko 9 kotwiczące kinazę białkową A
<b>ATP</b>	<i>adenosine triphosphate</i> - adenozyntrifosforan
<b>B23</b>	białko jąderkowe, zwane również nukleofosminą (NPM1)
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i> - albumina surowicy bydłowej
<b>C-koniec białka</b>	koniec karboksylowy łańcucha polipeptydowego
<b>CBD</b>	<i>cargo binding domain</i> - domena wiążąca cargo miozyny VI
<b>CKII</b>	<i>casein kinase II</i> - kinaza kazeinowa II
<b>Coiled-coil</b>	struktura superhelisy
<b>Da</b>	Dalton - umowna jednostka masy atomowej, stosowana w chemii do oznaczania masy cząteczkowej, wynosząca 1/12 masy atomu węgla 12C
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> - 4',6-diamidyno-2-fenylindol
<b>DFC</b>	<i>dense fibrillar component</i> - gęsty składnik fibrylarny jąderka
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> - pożywka hodowlana
<b>DMSO</b>	<i>dimethyl sulfoxide</i> - dimetylosulfotlenek
<b>DTT</b>	<i>dithiothreitol</i> - ditiotreitrol
<b>EDTA</b>	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> - kwas etylenodiaminotetraoctowy
<b>EGTA</b>	<i>ethylene glycol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> - kwas etylenoglikolo-O-O'-bis(2-aminoetylo)-N,N,N',N'- tetraoctowy
<b>ELC</b>	<i>essential light chains</i> - istotne łańcuchy lekkie miozyn konwencjonalnych
<b>ER</b>	<i>endoplasmic reticulum</i> - retikulum endoplazmatyczne, siateczka śródplazmatyczna
<b>FBS</b>	<i>fetal bovine serum</i> - płodowa surowica bydłowa
<b>FC</b>	<i>fibrillar center</i> - centrum fibrylarnie jąderka
<b>GAPDH</b>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> - dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
<b>GC</b>	<i>granular component</i> - składnik ziarnisty jąderka

<b>GRP78</b>	<i>Glucose-regulated protein 78 kDa</i> - białko GRP78
<b>GSH</b>	<i>glutathione</i> - glutation (forma zredukowana)
<b>GST</b>	<i>glutathione S-transferase</i> - S-transferaza glutationu
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i> - peroksydaza chrzanowa
<b>Hsp</b>	<i>heat shock protein</i> - białko szoku cieplnego
<b>HS</b>	<i>horse serum</i> - surowica końska
<b>IgG</b>	<i>immunoglobulin G</i> - immunoglobuliny klasy G
<b>IP</b>	<i>immunoprecipitation</i> - immunoprecypitacja
<b>IPTG</b>	<i>isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside</i> - izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd
<b>KO</b>	<i>knock-out</i> - nokaut (nokaut miozyny VI)
<b>LB</b>	<i>Luria-Bertani medium</i> - pożywka do hodowli kultur bakteryjnych
<b>MHC</b>	<i>myosin heavy chain</i> - łańcuch ciężki miozyny mięśniowej
<b>MLC</b>	<i>myosin light chain</i> - łańcuch lekki miozyny mięśniowej
<b>MLCK</b>	<i>myosin light chain kinase</i> - kinaza lekkich łańcuchów miozyny
<b>m.cz.</b>	masa cząsteczkowa
<b>MVI</b>	<i>myosin VI</i> - miozyna VI
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>N-koniec białka</b>	koniec aminowy łańcucha polipeptydowego
<b>NES</b>	<i>nuclear export signal</i> - sygnał/sekwencja eksportu do cytoplazmy
<b>NLS</b>	<i>nuclear localization signal</i> - sygnał/sekwencja lokalizacji jądrowej
<b>NoLS</b>	<i>nucleolar localization signal</i> - sygnał/sekwencja lokalizacji jąderkowej
<b>NPC</b>	<i>nuclear pore complex</i> - kompleks poru jądrowego
<b>NOR</b>	<i>nucleolus organizer region</i> - obszary jąderkotwórcze
<b>OD</b>	<i>optical density</i> - gęstość optyczna
<b>pS6</b>	<i>phospho-S6 ribosomal protein</i> - ufosforylowane białko rybosomalne S6
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffer saline</i> - sól fizjologiczna buforowana fosforanami
<b>PBS-T</b>	<i>phosphate buffer saline with Triton X-100</i> - sól fizjologiczna

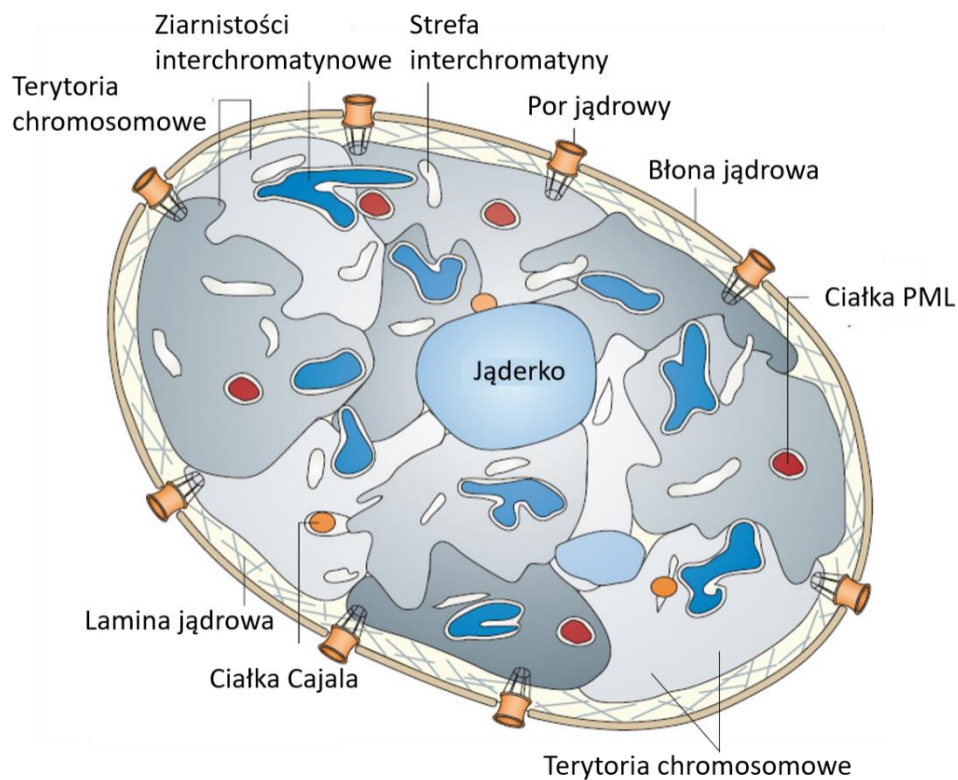
	buforowana fosforanami z dodatkiem detergentu Triton X-100
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> - łańcuchowa reakcja polimerazy
<b>PFA</b>	<i>paraformaldehyde</i> - paraformaldehyd
<b>PMSF</b>	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> - fluorek fenylometylosulfonylu
<b>PLA</b>	<i>proximity ligation assay</i> - metoda ligacji zbliżeniowej
<b>Pol I</b>	<i>RNA polymerase I</i> - polimeraza RNA I
<b>PML</b>	<i>promyelocytic leukemia</i> - ciałka PML
<b>pre-rRNA</b>	<i>preribosomal RNA</i> - prekursorowe rybosomalne RNA
<b>q-PCR</b>	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
<b>RLC</b>	<i>regulatory light chains</i> - lekkie łańcuchy regulatorowe miozyny konwencjonalnych
<b>RNP</b>	<i>ribonucleoproteins</i> - białka wiążące RNA
<b>RPL</b>	<i>ribosomal protein large subunit</i> - białka rybosomalne związane z dużą podjednostką rybosomu
<b>RPS</b>	<i>ribosomal protein small subunit</i> - białka rybosomalne związane z małą podjednostką rybosomu
<b>rRNA</b>	<i>ribosomal RNA</i> - rybosomalne RNA
<b>RT-PCR</b>	<i>reverse transcriptase PCR</i> - PCR z odwrotną transkrypcją
<b>RT</b>	<i>room temperature</i> - temperatura pokojowa
<b>shRNA</b>	<i>short hairpin RNA</i> - RNA o strukturze „szpilki do włosów”
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i> - krótkie interferujące RNA
<b>S6</b>	<i>ribosomal protein S6</i> - białko rybosomalne S6
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i> - dodecylosiarczan sodu
<b>SDS-PAGE</b>	<i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i> - elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących
<b>snoRNP</b>	<i>small nucleolar ribonucleoproteins</i> - małe jąderkowe rybonukleoproteiny
<b>SV</b>	<i>Snell's waltzer mice</i> - myszy <i>Snell's waltzer</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris Buffer Saline</i> - sól fizjologiczna buforowana Tris
<b>TBS-T</b>	<i>Tris Buffer Saline with Triton X-100</i> - sól fizjologiczna buforowana Tris z detergentem Triton X-100
<b>TEMED</b>	N,N,N',N' - tetrametyloetylenodiamina

<b>Tris</b>	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> - Tris(hydroxymetylo)aminometan
<b>UBF</b>	<i>Upstream Binding Factor</i> - czynnik transkrypcyjny
<b>WB</b>	Western Blot

## **1. WSTĘP**

## 1.1. Jądro komórkowe

Jądro komórkowe jest największym przedziałem w komórkach eukariotycznych. Jego średnica waha się od 3,5 do 20  $\mu\text{m}$  i zależy od typu komórki (Kawiak i Zabel 2002). Jądro komórkowe opisane zostało po raz pierwszy w 1802 r. przez Franza Bauera, ale dopiero Robert Brown w 1831 r. nadał mu obecną nazwę *nucleus*. Główną funkcją jądra komórkowego jest przechowywanie materiału genetycznego komórki i kontrola jego aktywności przez regulację ekspresji genów. W organizacji przestrzennej jądra komórkowego można wyróżnić cztery główne struktury: błonę jądrową, nukleoplazmę, chromatynę i jąderko (Rycina 1.1).



**Rycina 1.1. Organizacja przestrzenna jądra komórkowego.** Na podstawie *Molecular Biology of the Cell*, The 4th edition, Alberts i in. 2002, zmodyfikowany.

Błona jądrowa (zwana też otoczką jądrową) oddziela nukleoplazmę od cytoplazmy. W jej obrębie można wyróżnić dwie błony lipidowe, zewnętrzną - od strony cytoplazmy (ONM, ang. *outer nuclear membrane*) i wewnętrzną - od strony nukleoplazmy (INM, ang. *inner nuclear membrane*), pomiędzy którymi znajduje się przestrzeń perinuklearna.

Zewnętrzna błona jądrowa zachowuje ciągłość z systemem błon szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (retikulum endoplazmatycznego) (rER, ang. *rough*



*endoplasmic reticulum*), którą charakteryzuje obecność licznych rybosomów na jej zewnętrznej powierzchni. Jedną z głównych funkcji rER jest biosynteza i fałdowanie białek. Sfałdowane białka są następnie transportowane oraz potranslacyjnie modyfikowane (modyfikacje warunkują funkcjonalną strukturę białka) wewnątrz kanałów rER. Za poprawne fałdowanie białek w warunkach fizjologicznych i w warunkach stresu odpowiadają białka opiekuńcze (czaperony), do których zalicza się białka szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock protein*), które znajdują się w świetle rER (Ni i Lee 2007). Jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek opiekuńczych rER jest białko GRP78 (ang. *glucose regulated protein 78 kDa*) znane również jako BiP (ang. *binding immunoglobulin protein*) lub HSAP5 (ang. *heat shock protein 5*). Białko GRP78 to białko opiekuńcze z rodziny HSP70, które bierze udział w transporcie nowo zsyntetyzowanych białek przez błony rER, ułatwieniu fałdowania białek, degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek, regulacji homeostazy wapniowej i w odpowiedzi na stres ER (Hendershot 2004; Lee 2005; Li i in. 2006).

Wewnętrzna powierzchnia błony jądrowej sąsiaduje z jednej strony z blaszką jądrową, z drugiej jest powiązana z chromatyną. Blaszka jądrowa to sieć włókienek białkowych utworzonych z lamin, które zaliczane są do białek macierzy jądra (ang. *nuclear lamina*). U ssaków można wyróżnić trzy typy lamin: laminę A, B (B1 oraz B2) oraz C. Laminę na peryferiach jądra zapewniają mechaniczną podporę jądra oraz odpowiadają za jego kształt, zaś ich wewnątrzjądrowa pula moduluje dynamikę chromatyny, alternatywne składanie eksonów (splicing) i naprawę DNA (Moir i in. 1994; Mahen i in. 2013; Camps i in. 2015; Bronshtein i in. 2015).

W obrębie otoczki jądrowej wyróżnia się pory jądrowe, tworzone przez wyspecjalizowane strukturalnie kompleksy porów jądrowych (NPC, ang. *nuclear pore complex*), których budulcem są nukleoporyny. Za pośrednictwem porów jądrowych odbywa się nieselektywny transport jonów, cząsteczek oraz białek o masie poniżej 40 kDa z cytoplazmy do jądra komórkowego i w kierunku przeciwnym. Transport cząstek większych takich, jak rybonukleoproteiny, enzymy (polimerazy) lub czynniki transkrypcyjne podlega ścisłej kontroli i ma charakter transportu aktywnego. Białka transportowane przez pory jądrowe są wyposażone w krótkie sekwencje sygnałowe: NLS (ang. *nuclear localization signals*) i NES (ang. *nuclear export signals*), które są rozpoznawane przez specyficzne przenośniki, odpowiednio importyny i eksportyny.

Jądro komórkowe jest wysoce zorganizowane i zawiera wiele nie ograniczonych błoną lipidową struktur jądrowych, do których zalicza się: wspomniane wcześniej jąderko

(którego średnica może osiągać do 8  $\mu\text{m}$ ), ciała jądrowe (osiągające średnicę 0,1-3 $\mu\text{m}$ ) takie, jak ciała Cajala i ciała PML, terytoria chromosomowe [(euchromatyna - chromatyna rozproszona) i heterochromatyna - chromatyna skondensowana)], przestrzeń między skupieniami chromatyny - strefa interchromatyny oraz ziarnistości interchromatynowe (ang. *speckles i paraspeckles*), stanowiące przede wszystkim miejsce występowania czynników splicingowych (Lamond i Earnshaw 1998; Zamora-Cura i in. 2014).

## 1.2. Jąderko – struktura i funkcje

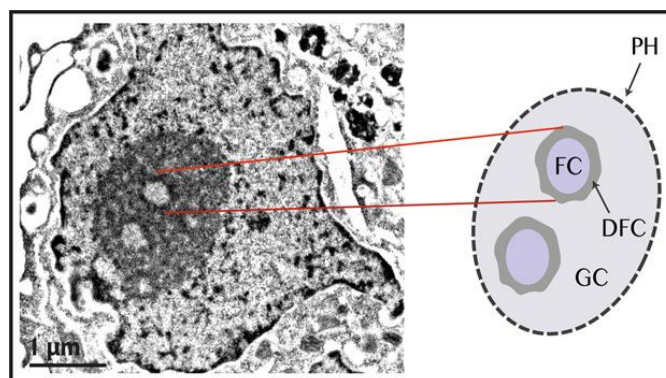
Jąderko jest najbardziej widoczną, pozbawioną błon strukturą w jądrze komórek eukariotycznych (Emmott i Hiscox 2009; Lam i Trinkle-Mulcahy 2015; Peng i Weber 2019). Może ono zajmować do 25% objętości jądra, zwłaszcza w komórkach, w których występuje duże zapotrzebowanie na syntezę białka. Zwykle w jądrze są obecne jedno lub dwa jąderka (Doeberitz i Wentzensen 2008). W jąderku zachodzi synteza rybosomalnego RNA (rRNA) przez polimerazę RNA I (Pol I), składanie rRNA z białkami rybosomalnymi i tworzenie podjednostek rybosomów (Mélèse i Xue 1995; Bywater i in. 2013; Thomson i in. 2013; Diesch i in. 2014; Farley i in. 2015; Konikkat i Woolford 2017; Derenzini i in. 2017; Mangan i in. 2017). Jąderko powstaje wokół obszarów (organizatorów) jąderkotwórczych, NOR (ang. *nucleolar organizer region*), zlokalizowanych w przewężeniach wtórnych niektórych chromosomów (Nemeth i Grummt 2018; van Sluis i McStay 2019). Obszary te są kluczowe dla dynamicznego formowania jąderka podczas cyklu komórkowego (Nemeth i Grummt 2018). Obszary jąderkotwórcze zawierają tandemowo powtórzone geny kodujące 5.8S<sup>1</sup>, 18S oraz 28S rRNA (liczba kopii genów kodujących rRNA u ludzi wynosi 200) (Scheer i Hock 1999; Lam i in. 2005; Mangan i in. 2017; Pelletier i in. 2018). Liczba i umiejscowienie NOR-ów na chromosomach jest charakterystyczna dla danego gatunku. U ludzi znajduje się 10 obszarów jąderkotwórczych NOR obecnych na krótkich ramionach pięciu par akrocentrycznych chromosomów [(chromosomów z centromerem zlokalizowanym blisko końca jednego z nich (chromosomy 13,14,15,21 i 22)].

W aktywnym transkrypcyjnie jąderku można wyróżnić trzy obszary: centrum fibrylarne FC (ang. *fibrillar center*), gęsty składnik fibrylarny DFC (ang. *dense fibrillar component*) oraz składnik ziarnisty GC (ang. *granular component*), otoczony przez

---

<sup>1</sup> S – stała sedymentacji Svedberga

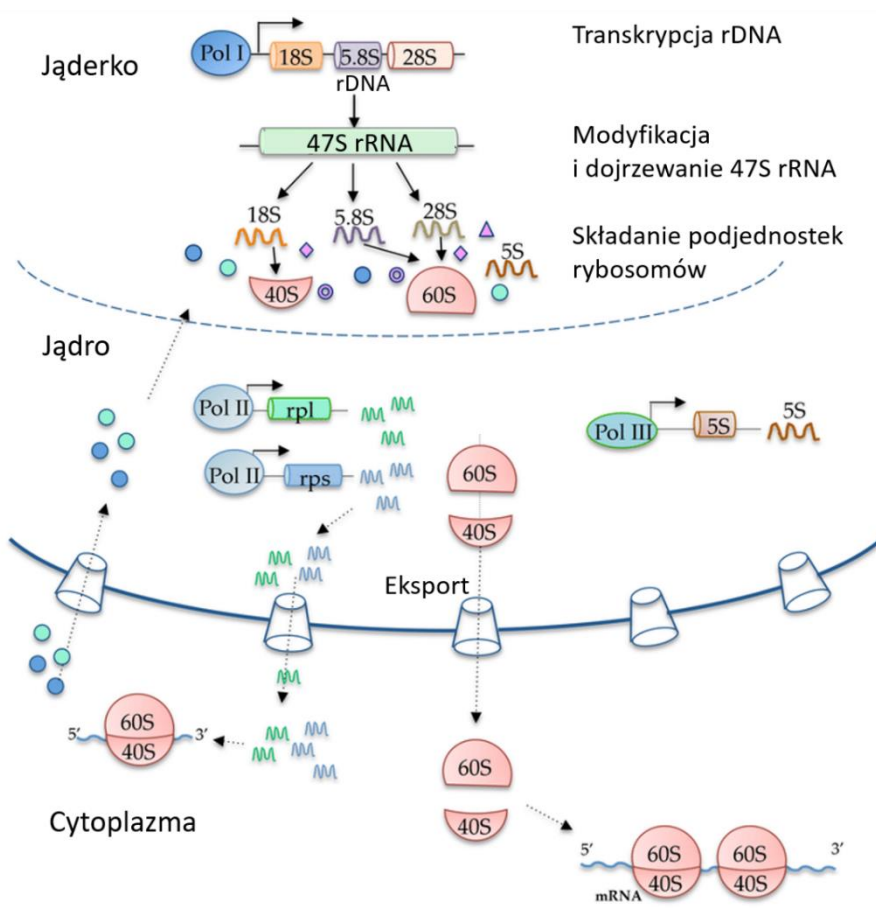
strukturę zlokalizowaną na peryferium jąderka określaną jako PH (ang. *peri-nucleolar heterochromatin*) (Rycina 1.2) (Emmott i Hiscox 2009; Farley i in. 2015; Feric i in. 2016; Mangan i in. 2017; Tsekrekou i in. 2017). Organizacja jąderka odzwierciedla przestrzenne rozdzielanie poszczególnych etapów biogenezy rybosomów (Lo i in. 2006, Hiscox 2007). Proces ten jest zapoczątkowany w obszarze FC jąderka, gdzie ma miejsce transkrypcja genu 45S rRNA na matrycy rDNA, z udziałem Pol I. Na granicy FC i otaczających je DFC ma miejsce dojrzewanie i modyfikacja prekursorów 47S rRNA (transkryptów 47S pre-rRNA), w tym np. metylacja rybozy oraz izomeryzacja urydyny do pseudourydyny, która jest niezbędna dla właściwej strukturalnej organizacji jąderka i aktywności dojrzałego rRNA (Freed i in. 2010; Kressler i in. 2010). W procesie tym biorą udział małe jąderkowe rybonukleoproteiny, snoRNPs (ang. *small nucleolar ribonucleoproteins*) (Shubina i in. 2016). W obszarze GC jąderka zachodzi składanie podjednostek rybosomów tj. składanie 5.8S, 18S i 28S rRNA oraz 5S rRNA z białkami rybosomalnymi (Tschochner i Hurt 2003; Thiry i Lafontaine 2005; Smirnov i in. 2014; Lindström i in. 2018). Struktura na peryferium jąderka, określaną jako PH, jest związana z jąderkiem, ale jest od niego strukturalnie odmienna. Zawiera kompleksy heterogennych, jądrowych rybonukleoprotein, hnRNP (ang. *heterogeneous ribonucleoproteins*), białka wiążące RNA, jak również transkrypty polimerazy RNA III (Pol III) [(transkrypty genów 5S rRNA, tRNA oraz małych jądrowych RNA, snRNA (ang. *small nuclear RNA*)] (Pollock i Huang 2009, 2010). Wyżej opisane obszary jąderka można rozróżnić na podstawie ich morfologii z użyciem mikroskopu elektronowego podczas interfazy; w trakcie podziału komórki jąderko ulega zanikowi (Prieto i McStay 2005).



**Rycina 1.2. Schemat budowy jąderka.** W aktywnym transkrypcyjnie jąderku można wyróżnić trzy obszary: centrum fibrylarne FC (ang. *fibrillar center*), gęsty składnik fibrylarny DFC (ang. *dense fibrillar component*) oraz składnik ziarnisty GC (ang. *granular component*) otoczony przez strukturę zlokalizowaną na peryferium jąderka, określaną jako PH (ang. *peri-nucleolar heterochromatin*). Rycina z lewej przedstawia obraz z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, rycina z prawej to schemat z zaznaczeniem obszarów jąderka. Skala 1µm (na podstawie Villacis i in. 2018, zmodyfikowany).

W jąderku, jak już wcześniej wspomniano, zachodzi transkrypcja genu 45S rRNA przez Pol I, w wyniku której generowany jest prekursor 47S rRNA (pre-rRNA), który po wstępnej obróbce i dojrzewaniu prowadzi do powstania dojrzałych 5.8S, 18S i 28S rRNA (Thomson i in. 2013). 5S rRNA ulega transkrypcji przy udziale Pol III w nukleoplazmie, skąd jest transportowany wraz z białkami rybosomalnymi, RP (ang. *ribosomal proteins*) do jąderka (Rycina 1.3).

Z powstałych rRNA powstają podjednostki rybosomów – mała podjednostka rybosomu 40S zawierająca 18S rRNA i 33 białka, oraz duża podjednostka 60S zawierająca 5.8S, 28S i 5S rRNA oraz 47 białek (Fromont-Racine i in. 2003; Henras i in. 2008; Kressler i in. 2010; Anger i in. 2013; Khatter i in. 2015; Thomson i in. 2013; de la Cruz i in. 2015). Białka wiążące odpowiednie rRNA bezpośrednio zaangażowane w syntezę podjednostek rybosomów zwane są rybonukleoproteinami, RNP (ang. *ribonucleoproteins*). U *Eukaryota* zidentyfikowano jak dotąd 80 białek RNP, wśród których wyróżnia się białka RPS, związane z małą podjednostką rybosomu oraz białka RPL, związane z dużą podjednostką rybosomu. Podjednostki 40S i 60S są następnie eksportowane przez nukleopory do cytoplazmy, gdzie po procesie ostatecznego dojrzewania tworzą dojrzały rybosom 80S (Boisvert i in. 2007; Goodfellow i Zomerdijk 2013; Gamalinda i Woolford 2015; Henras i in. 2015; Blalock i in. 2017).



**Rycina 1.3. Schemat biogenezy podjednostek rybosomów w jąderku.** W wyniku transkrypcji rDNA (kodującego 45S rRNA) przez polimerazę RNA I (Pol I) dochodzi do powstania prekursora 47S rRNA (pre-rRNA), który podlega specyficznym modyfikacjom i prowadzi do powstania dojrzałych rRNA (5.8S, 18S, 28S rRNA). 5S rRNA ulega transkrypcji przy udziale polimerazy RNA III (Pol III) w nukleoplazmie, skąd wraz z białkami rybosomalnymi jest transportowany do jąderka. rRNA wraz z odpowiednimi białkami rybosomalnymi dają początek dużej (60S) i małej (40S) podjednostce rybosomu (na podstawie Russo i Russo 2017, zmodyfikowany).

Dotychczas zidentyfikowano 1318 białek jąderkowych [baza danych *Human Protein Atlas* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org); Uhlen i in. 2010; Thul i in. 2017), Stenström i in. 2020]. Wśród nich wyróżnić można wcześniej wspomniane białka rybosomalne bezpośrednio zaangażowane w syntezę podjednostek rybosomów (RPS i RPL), białka nierybosomalne [(helikazy, czynniki splicingowe, białka czaperonowe i enzymy biorące udział w transkrypcji (Pol I)], enzymy biorące udział w dojrzewaniu pre-rRNA (np. fibrylaryna), małe jąderkowe RNA, snoRNA (ang. *small nucleolar RNA*) oraz białka regulatorowe (np. B23). Pozostałe białka jąderkowe biorą udział w takich procesach, jak: odpowiedź komórki na stres, regulacja cyklu komórkowego, replikacja i naprawa DNA, kontrola starzenia czy odpowiedź na infekcje wirusowe (Boisvert i in. 2007; Tsekrekou i in. 2017; Russo i Russo 2017; Yang i in. 2018; Weeks i in. 2019).

Udział jąderka w tak różnorodnych procesach sprawia, że można je uznać za strukturę multifunkcjonalną (Correll i in. 2019). A zatem, proces biogenezy rybosomów jest nierozzerwalnie związany z innymi fundamentalnymi procesami komórkowymi. Co więcej, dysfunkcje w procesie produkcji rybosomów prowadzą do rozwoju nowotworów i/lub chorób genetycznych, zwanych rybosomopatiami (charakteryzujących się obecnością mutacji lub delecji genów związanych z biogenezą rybosomów) (Derenzini i in. 2009; Villacís i in. 2018; Turi i in. 2019). Ponadto, zaburzenia w funkcjonowaniu jąderka są charakterystycznym markerem wielu chorób neurologicznych związanych z wiekiem, włączając choroby Parkinsona (PD), Huntingtona (HD) oraz Alzheimerera (AD), a także chorób układu krążenia (ischemia, zawał mięśnia sercowego, przerost mięśnia sercowego) (Villacís i in. 2018).

### **1.3. Stres jąderkowy**

Jąderko zmienia swą morfologię, wielkość i aktywność pod wpływem działania różnych czynników stresowych, którymi są m.in. inhibitory Pol I [(np. aktynomycyna D (ActD)] (Yung i in. 1985), czynniki cytotoksyczne (Desnoyers i in. 1996; Chan i Chan 1999), białka wirusowe (Matthews 2001), promieniowanie UV (Thielmann i in. 1999), szok cieplny (Chan i Chan 1999) oraz czynniki indukujące uszkodzenia DNA (Yogev i in. 2008), apoptozę czy starzenie (Kar i in. 2011). Pod wpływem stresu dochodzi do rozpadu struktury jąderka (następuje utrata jego integralności na skutek rozdziału obszarów FC i GC), co określa się terminem stresu jąderkowego (Emmot i Hiscox 2009; Boulon i in. 2010; James i in. 2014). W tych warunkach dochodzi również do zmian w lokalizacji białek jąderkowych. Białka te mogą ulegać translokacji z jąderka do nukleoplazmy lub cytoplazmy. Przykładem białka jąderkowego przemieszczającego się do nukleoplazmy pod wpływem stresu jest marker GC jąderka, białko B23 (Boulon i in. 2010; Burger i in. 2010).

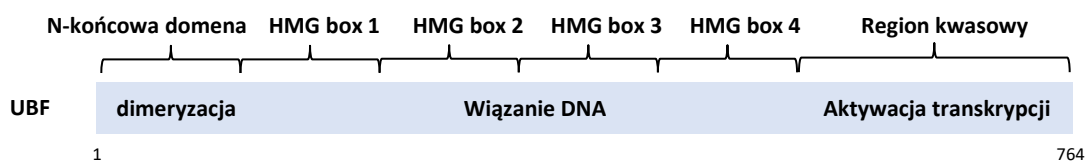
Zmiany morfologiczne, którym podlega jąderko pod wpływem ActD można uwidocznić wykonując barwienia immunofluorescencyjne z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał skierowanych przeciwko znanym markerom jąderka, to jest: UBF, fibrylaryny oraz B23. Translokacja B23 do nukleoplazmy jest wizualizowana na obrazach mikroskopowych jako jednorodne barwienie obszaru nukleoplazmy lub całego jądra (Yung i in. 1985; Chan i in. 1985; Rubbi i Millner 2003; Yang i in. 2016, 2018).

## 1.4. Charakterystyka wybranych białek jąderkowych

### 1.4.1. UBF

Oprócz Pol I, przynajmniej dwa czynniki transkrypcyjne są niezbędne w inicjacji transkrypcji rDNA: białko UBF (ang. *upstream binding factor*) (Learned i in. 1986; Bell i in. 1988) oraz czynnik selekcyjny SL1 (ang. *selectivity factor 1*). Białko UBF (m.cz. ~ 90 kDa), kodowane przez gen *UBTF*, rozpoznaje dwa rejony promotora rDNA: główny rejon promotora CORE oraz rejon dodatkowy UCE (ang. *upstream control element*) (Bell i in. 1988; Jantzen i in. 1990). Rejon CORE zawiera miejsce startu transkrypcji +1. Rejon UCE, o długości 50-80 pz, występuje w odległości ~100 pz powyżej miejsca startu transkrypcji (-100) i jest odpowiedzialny za wzrost wydajności transkrypcji (~10-100x). Dodatkowy czynnik, SL1 wiąże i stabilizuje kompleks UBF-DNA i oddziałuje z wolną częścią głównego rejonu promotorowego CORE. Związanie SL1 umożliwia przyłączenie się Pol I do kompleksu UBF-rDNA i zapoczątkowanie transkrypcji.

Białko UBF posiada na końcu aminowym (N-końcu) region pośredniczący w dimeryzacji, za którym znajdują się cztery domeny HMG, które wykazują homologię do niehistonowych białek z rodziny HMG (ang. *high mobility group*), HMG1 i HMG2 (Jantzen i in. 1990; McStay i in. 1991) (Rycina 1.4).



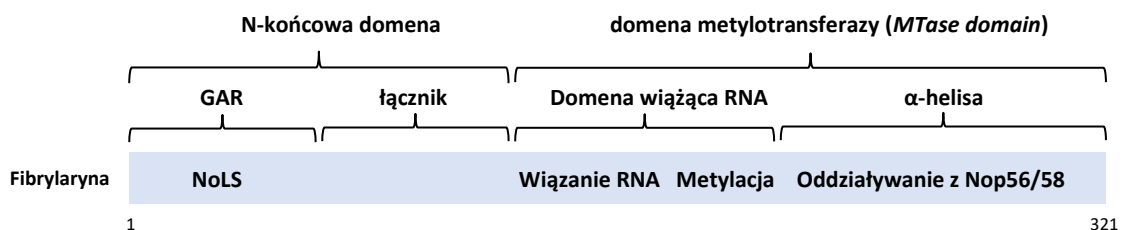
**Rycina 1.4. Schemat struktury białka UBF.** Białko UBF jest zbudowane z 764 reszt aminokwasowych i zawiera cztery domeny HMG wiążące DNA (HMG box), domenę umożliwiającą dimeryzację na N-końcu białka oraz wysoce kwasowy region C-końcowy (na podstawie Wright i in. 2006, zmodyfikowany).

Pierwsza domena HMG białka UBF jest niezbędna dla specyficznego wiązania DNA, pozostałe domeny HMG modulują wydajność wiązania DNA (Jantzen i in. 1992). Na końcu karboksylowym (C-końcu) białka znajduje się domena bogata w kwasowe reszty aminokwasowe, która bierze udział w aktywacji transkrypcji (Jantzen i in. 1992; Voit i in. 1992). Mutacje w sekwencji promotora, które wywierają wpływ na wiązanie UBF do DNA lub oddziaływanie UBF-SL1, skutkują drastycznym spadkiem aktywności transkrypcji.

### 1.4.2. Fibrylaryna

Fibrylaryna (m.cz. ~34 kDa), kodowana przez gen *FBL*, jest kluczowym białkiem jąderka, którego sekwencja i funkcja jest zachowana w ewolucji od *Archaea* po człowieka (Rodriguez-Corona i in. 2015; Shubina i in. 2016). U *Eukaryota*, fibrylaryna lokalizuje się na granicy między obszarami FC i DFC oraz w obszarze DFC jąderka, gdzie zachodzi dojrzewanie pre-rRNA (Ochs i in. 1985; Sobol i in. 2013).

Fibrylaryna jest związana z małymi, jąderkowymi rybonukleoproteinami, snoRNPs i katalizuje 2'-O-metylację rybosomalnego RNA podczas dojrzewania pre-rRNA (Lechertier i in. 2009; Shubina i in. 2016). Dodatkowo, fibrylaryna reguluje transkrypcję rRNA poprzez metylację histonu H2A (Tessarz i in. 2014; Loza-Muller i in. 2015). Sekwencja fibrylaryny, zbudowana z 321 reszt aminokwasowych, jest podzielona na dwie duże domeny: domenę N-kończową oraz domenę o aktywności metylotransferazy (*MTase domain*, Feric i in. 2016) (Rycina 1.5). Domena N-kończowa jest podzielona na dwa regiony (1) domenę GAR bogatą w reszty glicyny i argininy zbudowaną z 77 reszt aminokwasowych oraz (2) łącznik zbudowany z 61 reszt aminokwasowych o nieznanym jak dotąd funkcji. Domena GAR jest odpowiedzialna za kierowanie białka do jądra oraz posiada sygnał lokalizacji jąderkowej, NoLS (ang. *nucleolar localization signal*) (Pih i in. 2000; Levitskii i in. 2004; Kozbial i Mushegian 2005). Domena metylotransferazy odpowiada zaś za aktywność enzymatyczną (Feric i in. 2016), zawiera zachowaną sekwencję wiążącą RNA oraz region  $\alpha$ -helisy, który oddziałuje z białkiem Nop56/58 (Snaar i in. 2000); sekwencja ta jest niezbędna dla lokalizacji jąderkowej fibrylaryny.



**Rycina 1.5. Schemat struktury fibrylaryny.** W sekwencji fibrylaryny wyróżnia się dwie domeny: domenę N-kończową oraz domenę o aktywności metylotransferazy (*MTase domain*). Domena N-kończowa zbudowana jest z (1) domeny GAR, zawierającej sygnał lokalizacji jąderkowej NoLS oraz (2) łącznika o niezidentyfikowanej jak dotąd funkcji. Domena o aktywności metylotransferazy jest zbudowana z (1) domeny wiążącej RNA, odpowiedzialnej za metylację rRNA podczas dojrzewania pre-rRNA oraz (2) regionu  $\alpha$ -helisy, oddziałującym z białkiem Nop56/58 (na podstawie Rodriguez-Corona i in. 2015, zmodyfikowany).

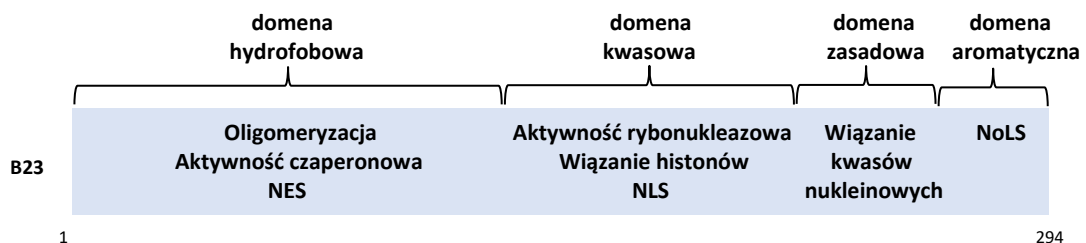
Fibrylaryna jest białkiem wysoce dynamicznym, stale krążącym między jąderkiem a nukleoplazmą (Phair i Misteli 2000; Snaar i in. 2000). Wzrost poziomu



fibrylaryny zaobserwowano w nowotworach piersi (Marcel i in. 2013; Su i in. 2014), prostaty (Koh i in. 2011) i wątroby (Zhang i in. 2021), co wskazuje na potencjalne zastosowanie tego białka jako celu terapeutycznego (Marcel i in. 2013; El Hassouni i in. 2019).

### 1.4.3. Białko B23

Białko B23 (m.c.z. ~37 kDa), kodowane przez gen *NPM1*, znane jest również jako NPM1/nukleofosmina/numatryna lub NO38. Jest powszechnie występującym białkiem jądrowym zaangażowanym na każdym z etapów syntezy podjednostek rybosomów (od etapu transkrypcji rDNA przez dojrzewanie prekursorów rRNA, składanie podjednostek po ich eksport do cytoplazmy) (Herrera i in. 1995; Yu i in. 2006; Maggi i in. 2008). W strukturze białka B23 można wyróżnić trzy domeny funkcjonalne (Rycina 1.6). Hydrofobowa domena na N-końcu pośredniczy w oligomeryzacji białka B23 i oddziaływaniu z innymi białkami np. nukleoliną i fibrylaryną (Namboodiri i in. 2004). Oligomeryzacja białka B23 wiąże się z jego rolą w proliferacji komórek, podczas gdy monomeryczna forma białka jest związana z odpowiedzią na uszkodzenia DNA i indukcję apoptozy (Koike i in. 2019). Centralna domena zawiera reszty kwasu asparaginowego i glutaminowego, uczestniczy w wiązaniu histonów i jest niezbędna dla aktywności rybonukleazowej białka (Okuwaki i in. 2001; Gadad i in. 2011; Hisaoka i in. 2014). Kolejną domenę charakteryzuje obecność zasadowych reszt aminokwasowych, które odpowiadają za wiązanie z kwasami nukleinowymi oraz ATP (Hingorani i in. 2000; Choi i in. 2008). Natomiast domena C-końcowa posiada wysoce zakonserwowany region aromatyczny i sygnał lokalizacji jądrowej NoLS.



**Rycina 1.6. Schemat struktury B23.** B23 posiada N-końcową, hydrofobową domenę odpowiedzialną za oligomeryzację i aktywność czaperonową. W domenie tej zlokalizowany jest sygnał eksportu jądrowego NES, który sprzyja translokacji B23 z jądra do cytoplazmy. Domena centralna o charakterze kwasowym jest niezbędna dla aktywności rybonukleazowej białka i pośredniczy w wiązaniu histonów; zawiera ona sygnał lokalizacji jądrowej NLS. Domena zasadowa jest zaangażowana w wiązanie kwasów nukleinowych. C-końcowa domena aromatyczna zawiera sygnał lokalizacji jądrowej NoLS i jest odpowiedzialna za jądrową lokalizację białka (na podstawie Zarka i in. 2020, zmodyfikowany).

Głównym miejscem występowania B23 jest obszar GC jąderka, gdzie odbywa się składanie podjednostek rybosomów 40S i 60S zawierających swoiste rRNA z odpowiednimi białkami (Spector i in. 1984; Yu i in. 2006). B23 występuje również poza obszarem jąderka, w nukleoplazmie i cytoplazmie. Dzięki obecności sekwencji sygnałowych tj. sygnału eksportu jądrowego NES, sygnału lokalizacji jądrowej NLS oraz sygnału lokalizacji jąderkowej NoLS, B23 może przemieszczać się w obrębie jąderka oraz pomiędzy jąderkiem i nukleoplazmą lub cytoplazmą (Yung i in. 1985; Wang i in. 2005; Yu i in. 2006; Muro i in. 2008). Zdolność do przemieszczania się B23 między tymi przedziałami jest kluczowa dla procesu syntezy podjednostek rybosomów oraz ich transportu z jądra do cytoplazmy, gdzie podlegają procesowi ostatecznego dojrzewania.

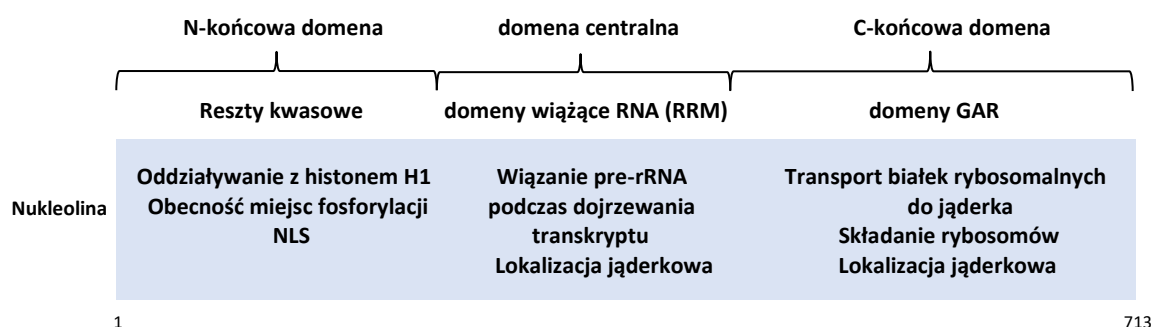
Na wczesnych etapach biogenezy rybosomów B23, wiążąc białka histonowe, reguluje stopień kondensacji chromatyny (Lindstrom 2011). W procesie dojrzewania rybosomów białko B23, oddziałując jako endorybonukleaza, tnie nić pierwotnego transkryptu 47S pre-rRNA (Herrera i in. 1995; Savkur i in. 1998). Ponadto, B23 oddziałuje bezpośrednio z kilkoma białkami rybosomalnymi, w tym RPL5, RPS9 i RPL23 (Lindstrom i Zhang 2008; Wanzel i in. 2008). Co więcej, B23 wiążąc już dojrzałe podjednostki rybosomów uczestniczy w ich eksporcie do cytoplazmy (Maggi i in. 2008). Obniżony poziom białka B23 prowadzi do zaburzenia dojrzewania 28S rRNA (Itahana i in. 2003) i translokacji B23 do cytoplazmy, a tym samym do zahamowania transportu podjednostek rybosomów oraz wolniejszego podziału komórek (Maggi i in. 2008).

#### **1.4.4. Nukleolina**

Nukleolina (m.c.z. ~110 kDa), kodowana przez gen *NCL* jest jednym z najpowszechniej występujących białek w jąderku, stanowi bowiem ~10% wszystkich obecnych tam białek. Nukleolina zlokalizowana jest głównie w obszarach DFC i GC jąderka (Lischwe i in. 1981; Bugler i in. 1982; Ochs i in. 1983; Biggiogera i in. 1990; Shaw i Jordan 1995; Andersen i in. 2005; Bicknell i in. 2005). Nukleolina jest obecna również w niewielkiej ilości w nukleoplazmie, cytoplazmie i błonie komórkowej, dzięki jej zdolności migracji z jąderka (Tuteja i Tuteja 1998; Abdelmohsen i Gorospe 2012; Berger i in. 2015). Jąderkowa frakcja nukleoliny reprezentuje ponad 90% komórkowej puli białka, podczas gdy nukleoplazma zawiera mniej niż 5% białka (Scherl i in. 2002).

Główną funkcją nukleoliny jest udział w biogenezie rybosomów, w tym transkrypcji rDNA, dojrzewaniu rRNA oraz składaniu i dojrzewaniu rybosomów (Cong

i in. 2012; Tonello i in. 2022). Zdolność nukleoliny do wypełniania tych funkcji komórkowych jest powiązana z jej strukturalną organizacją i tworzeniu przez nią wielu różnych interakcji z innymi białkami i RNA (Tuteja i Tuteja 1998; Ginisty i in. 1999, Raska i in. 2006). Ujemnie naładowana domena N-końcowa jest odpowiedzialna za interakcje z histonem H1 i dekondensację chromatyny (Rycina 1.7). Dzięki temu, nukleolina wspomaga wiązanie i działanie kompleksu Pol I, co ułatwia transkrypcję rDNA (Olson i Thompson 1983; Bouche i in. 1984; Egyhazi i in. 1988; Erard i in. 1988; Ghisolfi-Nieto i in. 1996; Roger i in. 2003; Angelov i in. 2006; Cong i in. 2012). W domenie N-końcowej znajdują się miejsca fosforylacji przez kinazę kazeinową typu II (CKII); fosforylacja nukleoliny prowadzi do jej proteolizy (Mongelard i Bouvet 2007) i zwiększonej specyficzności jej oddziaływania z Pol I i z rDNA (Leary i Huang 2001). Domena centralna nukleoliny zawiera cztery motywy rozpoznające RNA, RRM (ang. *RNA recognition motif*), zwane także domenami wiążącymi RNA, RBD (ang. *RNA binding domain*). Odpowiada ona za wiązanie pre-rRNA podczas dojrzewania transkryptu, co pozwala na utrzymanie jego struktury II-rzędowej. Te funkcje nukleoliny pozwalają na zaliczenie jej do białek opiekuńczych procesu biosyntezy rybosomów. Sądzi się, że RBD są kluczowe dla jąderkowej lokalizacji nukleoliny (Créancier i in. 1993). Domena C-końcowa GAR, uczestniczy w transporcie białek rybosomalnych do jąderka, składaniu rybosomów i lokalizacji nukleoliny w jąderku (Pellar i Dimario 2003, Masiuk 2008; Okuwaki i in. 2021).



**Rycina 1.7. Schemat struktury nukleoliny.** Domena N-końcowa nukleoliny zawiera kwasowe reszty aminokwasowe oraz sygnał NLS; centralna domena białka zawiera sekwencje wiążące RNA i warunkuje jąderkową akumulację białka, domena C-końcowa wiąże białka rybosomalne (na podstawie Carvalho i in. 2021, zmodyfikowany).

Nukleolina bierze również udział w transporcie białek rybosomalnych i podjednostek rybosomalnych z jądra do cytoplazmy (Borer i in. 1989; Schmidt-Zachmann i in. 1993; Tuteja i Tuteja 1998; Tajrishi i in. 2011). Nukleolina odpowiada także za utrzymanie sferycznego kształtu i prawidłowej organizacji jąderek (wyciszenie

ekspresji *NCL* prowadzi do zmiany kształtu jąderek ze sferycznego na nieregularny) (Ma i in. 2007).

Wyciszenie ekspresji *NCL* powoduje areszt cyklu komórkowego, czemu towarzyszą defekty kontroli duplikacji centrosomu. W komórkach takich obserwuje się ponadto zaburzenia budowy jądra, w tym powiększenie jądra komórkowego, obecność mikrojąder lub wielu jąder (Ugrinova i in. 2007). Wyciszenie ekspresji *NCL* prowadzi również do rearanżacji poszczególnych obszarów jąderka: obszary FC i DFC ulegają delokalizacji do GC (Ugrinova i in. 2007).

Nukleolina bierze udział w procesie apoptozy, stanowiąc receptor na powierzchni makrofagów i monocytów. W komórkach apoptotycznych wykazano jej związek z PARP-1 (ang. *poly ADP-ribose polymerase 1*), który jest ważnym białkiem w naprawie uszkodzeń DNA (Mi i in. 2003).

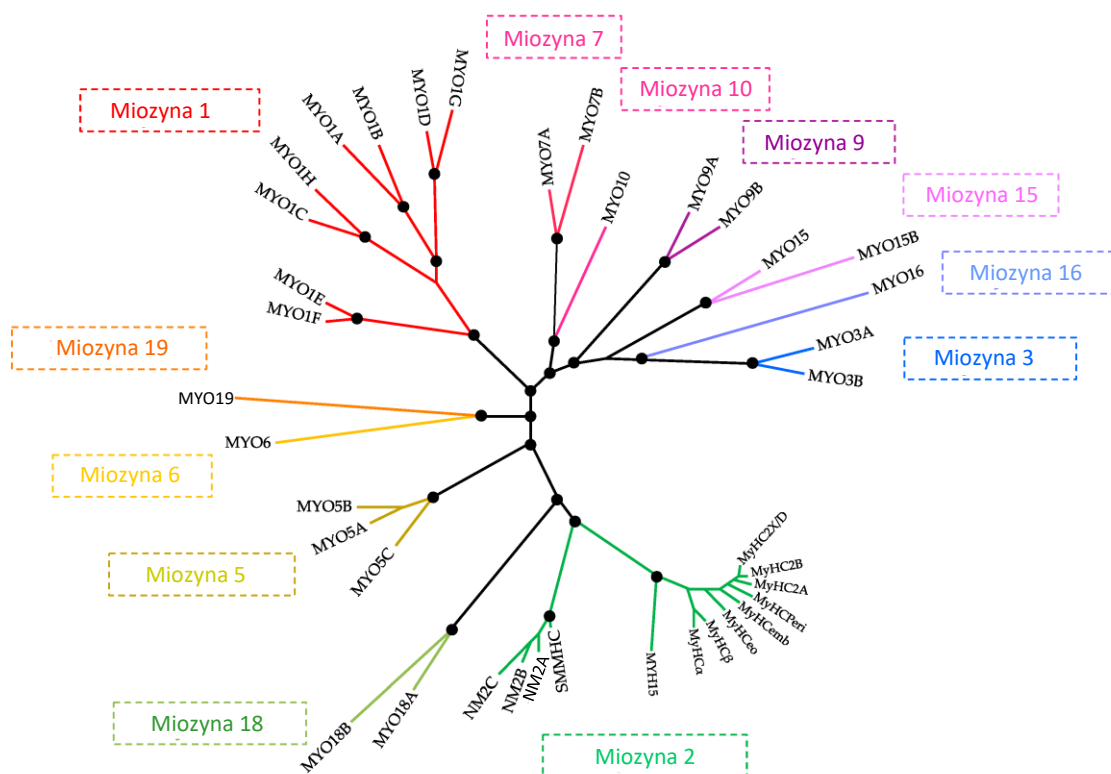
Nukleolina odgrywa również rolę w kancerogenezie indukowanej wirusem HPV; warunkuje ona ekspresję onkogenów wirusa w komórkach raka szyjki macicy i podtrzymuje ich proliferację (Grinstein i in. 2002). Co więcej, wykazano, że nukleolina na powierzchni komórek pełni funkcję receptora dla wirusa HIV (Masiuk 2008). Nukleolina bierze ponadto udział w zakażeniu komórki przez wirusy hepatotropowe, transporcie cząstek wirusa do jąderka i ich replikacji (Hirano i in. 2005).

Zaangażowanie nukleoliny w procesy patologiczne (głównie tumorogenezę i infekcję wirusową) czyni to białko potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowej i przeciwwirusowej (Waggoner i Sarnow 1998; Matthews 200; Mongelard i Bouvet 2007; Krust i in. 2011; Hsu i in. 2015; Morfoisse i in. 2016).

## **1.5. Nadrodzina miozyn**

Miozyny tworzą ogromną nadrodzinę białek motorycznych, które przekształcają energię uzyskaną z hydrolizy ATP w siłę mechaniczną niezbędną do ruchu wzdłuż filamentów aktynowych (Holmes i Geeves 2000; Foth i in. 2006; Sweeney i Houdusse 2010; Scott i in. 2021). Miozyny występują powszechnie w komórkach eukariotycznych zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym (Sellers 2000; Richards i Cavalier-Smith 2005; Odrionitz i Kollmar 2007, Maly i Hofmann 2020). Miozyna została po raz pierwszy odkryta w mięśniach szkieletowych (Engelhardt i Lyubimova 1939). Obecnie wiemy, że miozyny mięśniowe generują skurcz wszystkich typów mięśni.

Dotychczas poznano ponad 35 rodzin (klas) tych molekularnych motorów, których podział oparto na różnicach w sekwencji domeny motorycznej (Foth i in. 2006; Odronitz i Kollmar 2007). Miozyny można podzielić także na dwie główne grupy, miozyny konwencjonalne i miozyny niekonwencjonalne (Sellers 2000; Berg i in. 2001). Miozyny mięśniowe oraz podobne do nich pod względem struktury i funkcji miozyny niemięśniowe zwane są miozynami konwencjonalnymi i tworzą rodzinę II. Miozyny te, kodowane u człowieka przez geny *MYH*, tworzą filamenty (Geeves i in. 1999; Beach i Hammer 2015). Natomiast miozyny należące do pozostałych rodzin i występujące w różnych typach tkanek to miozyny niekonwencjonalne, niezdolne do tworzenia filamentów. Są one kodowane u człowieka przez geny *MYO*. U ludzi odkryto 40 genów kodujących łańcuchy ciężkie miozyn z 12 rodzin (Rycina 1.8) z czego miozyny konwencjonalne są kodowane przez 14 genów (Berg i in. 2001; Foth i in. 2006; Odronitz i in. 2007; Hartman i in. 2011).



**Rycina 1.8. Drzewo filogenetyczne nadrodziny miozyn występujących u ludzi.** U ludzi odkryto 40 genów kodujących łańcuchy ciężkie miozyn z 12 rodzin (na podstawie Brito i Sousa 2020, zmodyfikowany).

Większość miozyn konwencjonalnych występuje w mięśniach poprzecznie prążkowanych i gładkich, ale trzy izoformy, tzw. miozyny niemięśniowe kodowane przez *MYH9*, *MYH10* i *MYH14* są obecne we wszystkich typach komórek.

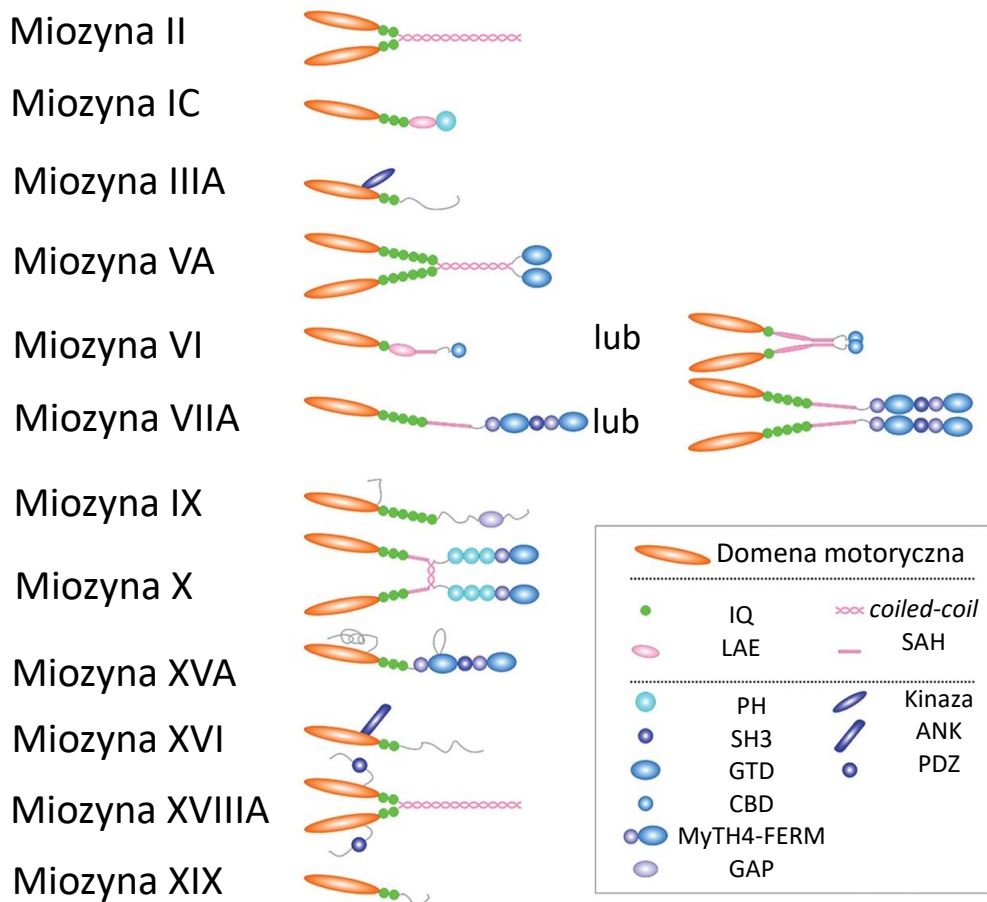
### 1.5.1. Miozyny konwencjonalne

Miozyny konwencjonalne to heksamery o łącznej m.cz. ~500 kDa; zbudowane są z pary łańcuchów ciężkich (ang. *myosin heavy chain*) o m.cz. ~200 kDa każdy oraz dwóch par łańcuchów lekkich (ang. *myosin light chains*) o m.cz. ~16-25 kDa (Billington i in. 2013) (Rycina 1.9). Na N-końcu łańcucha ciężkiego znajduje się globularną główką o m. cz. ~ 95 kDa, zawierającą domenę motoryczną i szyjkę, a na C-końcu pałeczka (ogonek) o strukturze długiej  $\alpha$ -helisy, która wraz z pałeczką drugiego łańcucha ciężkiego tworzy superhelisę (ang. *coiled-coil*). Pałeczki biorą udział w tworzeniu filamentów miozyn, które wraz z filamentami aktynowymi stanowią aparat skurczu mięśnia. Domena motoryczna jest najbardziej zachowanym w ewolucji fragmentem miozyny; tu zachodzi hydroliza ATP i wiązanie z filamentami aktynowymi (Geeves i Holmes 1999; Walklate i in. 2016). Helikalna szyjka zawiera dwa motywy IQ i bierze udział w wiązaniu łańcuchów lekkich. Wyróżnia się dwa typy łańcuchów lekkich: łańcuchy istotne, ELC (ang. *essential light chains*), stabilizujące szyjkę oraz łańcuchy regulatorowe, RLC (ang. *regulatory light chains*), ulegające fosforylacji przez kinazę lekkich łańcuchów miozyny MLCK (ang. *myosin light chain kinase*), aktywowaną przez jony  $Ca^{2+}$  i cząsteczki kalmoduliny. Fosforylacja RLC prowadzi do aktywacji miozyny (Wang i in. 2011).

### 1.5.2. Miozyny niekonwencjonalne

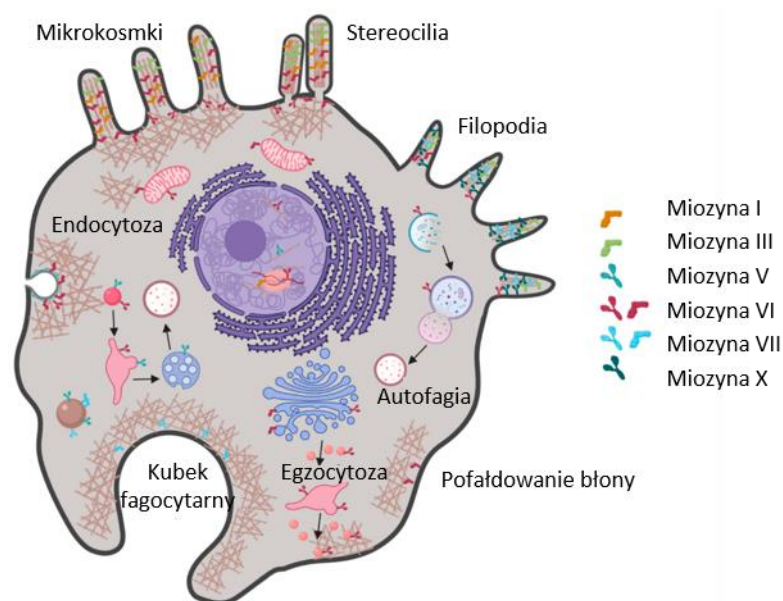
Miozyny niekonwencjonalne charakteryzują się podobną budową domenową i funkcjonują w komórkach w formie monomerów lub dimerów, zbudowanych odpowiednio z jednego lub dwóch łańcuchów ciężkich (Rycina 1.9). Każdy łańcuch ciężki miozyn jest złożony z trzech zasadniczych domen: (1) domeny motorycznej o aktywności ATPazy i zdolności wiązania filamentu aktynowego (Hartman i in. 2011; Guhathakurta i in. 2018); (2) helikalnej szyjki zawierającej od 1 do 7 motywów IQ wiążących łańcuchy lekkie (Caride i in. 2010; Heissler i Sellers 2014) oraz (3) C-końcowej pałeczki (ogonka), najbardziej zróżnicowanej domeny, która wiąże i transportuje cargo wzdłuż filamentów aktynowych oraz warunkuje specyficzne funkcje miozyny (Rycina 1.9) (Brawley i Rock 2009; Fili i in. 2019). W ogonkach niektórych miozyn niekonwencjonalnych występuje motyw superhelisy. Jest on obecny u miozyn funkcjonujących w formie dimerów. Łańcuchami lekkimi miozyn niekonwencjonalnych są najczęściej cząsteczki kalmoduliny, które poprzez przyłączanie lub odłączanie od łańcuchów ciężkich regulują aktywność tych miozyn (Logvinova i Levitsky 2018).

Ponadto, u niektórych miozynie przed domeną motoryczną mogą występować dodatkowe sekwencje, które (obok ogonka) mogą warunkować funkcje tych białek (Berg i in. 2001).



**Rycina 1.9. Schemat budowy miozynie występujących u ludzi.** Wszystkie klasy miozynie posiadają (1) zachowaną w ewolucji domenę motoryczną (pomarańczowy), (2) szyjkę, zawierającą różną liczbę motywów IQ wiążących łańcuchy lekkie (zielony), (3) pałeczkę, która może zawierać sekwencję umożliwiającą tworzenie stabilnej superhelisy (ang. *coiled coil*) oraz unikatowe domeny, które warunkują specyficzne funkcje miozynie. Miozyna II, VA, X oraz XVIII występuje w formie dimeru, natomiast miozyna VI i miozyna VIIA mogą występować w formie monomeru i dimeru (na podstawie Li i in. 2016, zmodyfikowany).

U ludzi można wyróżnić miozynie niekonwencjonalne z następujących rodzin: I, III, V, VI, VII, IX, X, XV, XVI, XVIII i XIX (Berg i in. 2001). Miozynie niekonwencjonalne są zaangażowane w wielu procesach komórkowych, tj. endocytoza, egzocytoza, transport pęcherzyków i organelli komórkowych, adhezja i ruch komórek, przekazywanie sygnałów, naprawa DNA oraz transkrypcja (Rycina 1.10) (Berg i in. 2001; Akhmanowa i Hammer 2010; de Lanerolle i Serebryannyy 2011; Hartman i in. 2011; Hartman i Spudich 2012; Li i in. 2016; Kulashreshtha i in. 2016; Caridi i in. 2018; Titus 2018; Fili i Toseland 2019; Venit i in. 2020; Cook i in. 2020).



**Rycina 1.10. Schemat reprezentujący funkcje wybranych miozyn niekonwencjonalnych.** Każda z miozyn może pełnić więcej niż jedną funkcję w komórce (na podstawie Fili i Toseland 2020, zmodyfikowany).

U ludzi, mutacje w genach wielu miozyn niekonwencjonalnych mogą prowadzić do poważnych zaburzeń, m.in. kardiomiopatii przerostowej (mutacje w genie miozyny VI) (Mohiddin i in. 2014), defektów neurologicznych (mutacje w genie miozyny V), retinopatii (mutacje w genie miozyny III i miozyny VII), utraty słuchu (mutacje w genie miozyny IA, miozyny VI, miozyny VIIA i miozyny XV) (Friedman i in. 1999; Zadro i in. 2009).

### 1.5.3. Miozyny w jądrze komórkowym

Jeszcze dwie dekady temu doniesienia o występowaniu aktyny i miozyny w jądrze komórkowym wzbudzały nieufność i powątpiewanie. Uważano, że są to artefakty wynikające z techniki barwienia, bądź z zanieczyszczenia frakcji jądrowej frakcją cytoplazmatyczną. Jak dotąd potwierdzono występowanie w jądrze komórkowym ośmiu miozyn niekonwencjonalnych. Są to: dwie izoformy miozyny IC: A i B; dwie izoformy miozyny V: A i B; miozyna VI; miozyna XVIB oraz dwie izoformy miozyny XVIII: A i B (de Lanerolle 2012; Cook i in. 2020). W jądrze jest obecna również miozyna konwencjonalna (miozyna II), ale nie wiadomo jak dotąd, która z izoform tu występuje (Li i Sarna 2009). Dane literaturowe wskazują na udział miozyn i aktyny w procesach replikacji i naprawy DNA, transkrypcji i dojrzewania mRNA oraz w transporcie wewnątrzjądrowym (Fomproix i Percipalle 2004; Hofmann i in. 2006; de Lanerolle



2012; Sarshad i Percipalle 2014; Cook i in. 2020). Występujące w jądrze aktyna i miozyny odgrywają również kluczową rolę w organizacji jądra i struktur jądrowych (de Lanerolle 2012; Belin i Mullins 2013; Sarshad i Percipalle 2014; Batters i Veigel 2016; Kristó i in. 2016).

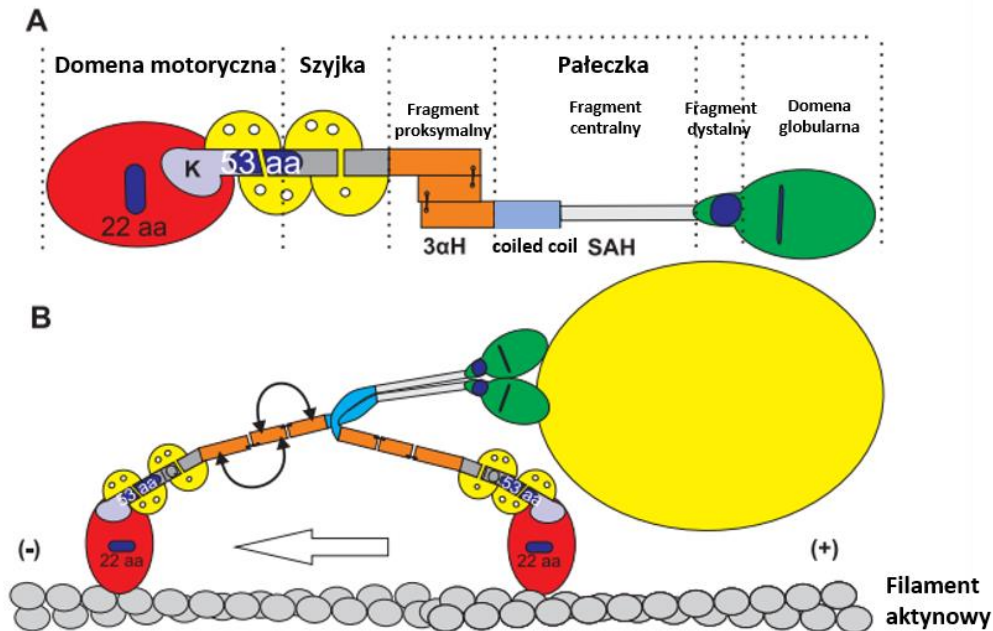
## 1.6. Miozyna VI

Miozyna VI (MVI) to wyjątkowe białko motoryczne cytoszkieletu aktynowego, gdyż w odróżnieniu od pozostałych miozyn przemieszcza się w kierunku końca minus filamentów aktynowych skierowanych do wnętrza komórki (Wells i in. 1999; Sweeney i Houdusse 2010). Wspomniana cecha MVI może decydować o pełnieniu przez nią unikalnych funkcji. MVI po raz pierwszy opisano u *Drosophila* (Kellerman i Miller 1992) a następnie potwierdzono jej obecność u niemal wszystkich *Metazoa* (Sellers 2000).

### 1.6.1. Budowa miozyny VI

MVI zbudowana jest z łańcucha ciężkiego (m.cz. ~140 kDa) i jest kodowana u ludzi przez gen *MYO6*. Wykazuje ona typową dla miozyn budowę domenową (Rycina 1.11). Można w niej wyróżnić znajdującą się na N-końcu domenę motoryczną z miejscami wiązania aktyny i ATP; szyjkę zawierającą pojedynczy motyw IQ, z którym wiąże się cząsteczka kalmoduliny (zależnie od jonów  $Ca^{2+}$ ) oraz znajdujący się na C-końcu ogonek, który wiąże i transportuje cargo. Dodatkowo, w łańcuchu ciężkim tej miozyny można wyróżnić kilka unikalnych sekwencji. W domenie motorycznej zlokalizowana jest wstawka zbudowana z 22 reszt aminokwasowych, która poprzez spowolnienie tempa wiązania ATP wpływa na właściwości kinetyczne tego białka (Menétrey i in. 2005). Jest ona również niezbędna dla mechanicznej koordynacji dwóch domen motorycznych w dimerze MVI. Obecność tej wstawki zapewnia ponadto stabilne oddziaływanie MVI z filamentami aktynowymi. Drugą charakterystyczną sekwencją jest wstawka zbudowana z 53 reszt aminokwasowych znajdująca się między domeną motoryczną a szyjką. Pomimo braku klasycznego motywu IQ wiąże ona drugą cząsteczkę kalmoduliny, niezależnie od jonów  $Ca^{2+}$  (Bahloul i in. 2004). Przyłączenie kalmoduliny do wstawki powoduje zmianę konformacji w szyjce MVI i decyduje o jej ruchu w kierunku końca minus filamentu aktynowego (Menétrey i in. 2005). W ogonku MVI znajdują się cztery fragmenty: proksymalny, centralny, dystalny oraz globularną domenę wiążącą cargo (CBD ang. *cargo binding domain*) (Rycina 1.11). Fragment proksymalny tworzą trzy antyrównoległe  $\alpha$ -helisy, które rozwijają się podczas dimeryzacji

(Mukherejea i in. 2009). We fragmencie centralnym pałeczki występuje motyw superhelisy (Phichith i in. 2009; Menetrey i in. 2012) oraz pojedyncza  $\alpha$ -helisa SAH (ang. *single alpha-helix*). Obie te sekwencje uczestniczą w stabilizacji dimeru MVI (Sweeney i Houdusse 2010).



**Rycina 1.11. Schemat budowy MVI (A) oraz model jej dimeru ze związanym ładunkiem (B)** 22 aa, 53 aa - unikalne wstawki, 3 $\alpha$ H - motyw trzech antyrównoległych  $\alpha$ -helis, SAH - fragment pałeczki, stabilizujący dimer MVI (na podstawie Lenartowska i Walczewski 2011, zmodyfikowany).

W dystalnym fragmencie pałeczki oraz domenie globularnej wiążącej cargo mogą występować dwie dodatkowe wstawki, tzw. krótka (ang. *small insert*) i długa (ang. *large insert*), które w wyniku splicingu decydują o powstawaniu czterech izoform MVI w komórkach ssaczy (Buss i in. 2001; Dance i in. 2004; de Jonge i in. 2019). Długa wstawka składa się z 21-31 reszt aminokwasowych i znajduje się w dystalnym fragmencie pałeczki. Natomiast krótka wstawka, zbudowana z 9 reszt aminokwasowych, zlokalizowana jest w domenie globularnej. Występowanie krótkiej lub długiej wstawki, obu wstawek lub ich brak determinuje subkomórkową lokalizację i funkcję izoform MVI w różnych typach komórek/tkanek (Buss i in. 2001; Au i in. 2007; Wollscheid i in. 2016; O’Loughlin i in. 2018). Izoformę MVI zawierającą długą wstawkę wykryto w apikalnej strefie spolaryzowanych komórek epitelialnych, gdzie jest obecna w pobliżu pęcherzyków opłaszczonych klatryną (Ameen i Apodaca 2007). Izoformę bez długiej wstawki wykryto w pęcherzykach nieopłaszczonych w peryferycznej strefie komórek (Aschenbrenner i in. 2003). Co więcej, zaobserwowano różnice w występowaniu

poszczególnych izoform w zależności od rodzaju tkanki. Izoforma z długą wstawką występuje w komórkach spolaryzowanych nabłonka jelita cienkiego, nerkach i wątrobie (Dance i in. 2004). Izoforma z krótką lub bez żadnej wstawki występuje zaś w komórkach niespolaryzowanych, np. w jądrach i płucach (Buss i Kendrick Jones 2008, Zakrzewski i in. 2017).

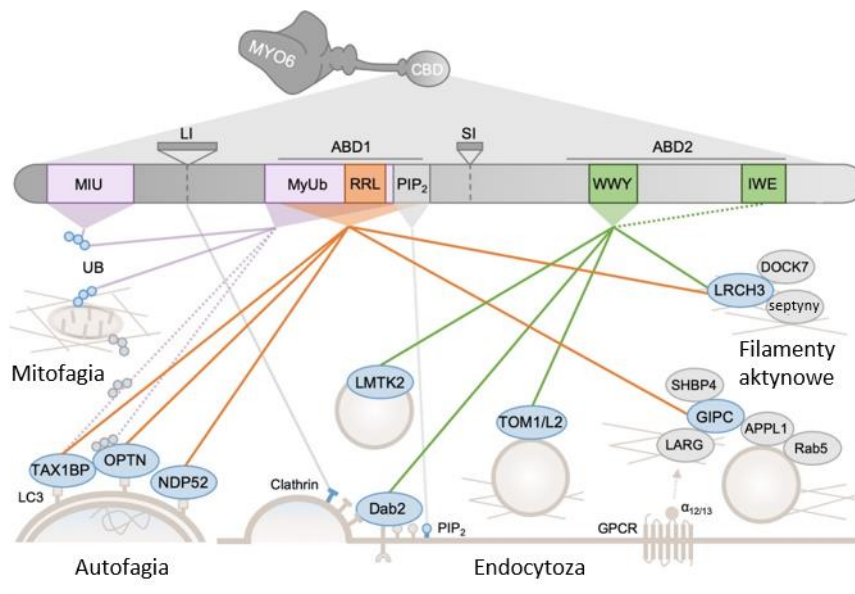
#### **1.6.1.1. Właściwości kinetyczne miozyny VI**

MVI jest motorem procesywnym, który przemieszcza się - jak już wcześniej wspomniano – do końca minus filamentu aktynowego w następstwie zmiany konformacji białka indukowanej przyłączeniem się kalmoduliny do unikalnej 53 aminokwasowej wstawki. Najprawdopodobniej oddziaływanie MVI z określonym ładunkiem indukuje jej dimeryzację (Lister i in. 2004; Phichith i in. 2009) i rozwinięcie fragmentu trzech antyrównoległych  $\alpha$ -helis w proksymalnym fragmencie pałeczki, czego efektem jest wykonanie przez MVI niezwykle długiego kroku roboczego (Lister i in. 2004; Phichith i in. 2009; Mukherjea i in. 2009). Badania kinetyczne wykazały, że długość kroku roboczego dla dimeru wynosi 30-36 nm (Rock i in. 2001; Nishikawa i in. 2002; Yildiz i in. 2004; Okten i in. 2004; Ali i in. 2004) i zależy od wielkości transportowanego cargo (Altman i in. 2004). MVI wykonuje kilka zróżnicowanych pod względem długości kroków przed dysocjacją od filamentu aktynowego, pokonując odległość ok. 200 nm (Rock i in. 2001; de la Cruz i in. 2001; Nishikawa i in. 2002; Rock i in. 2005). Sądzi się, że jako dimer MVI pełni rolę motoru transportującego cargo, a w postaci monomeru kotwiczy cargo z filamentami aktynowymi (Rock i in. 2001; de La Cruz i in. 2001; Nishikawa i in. 2002; Ali i in. 2004; Altman i in. 2004; Yildiz i in. 2004; Okten i in. 2004).

#### **1.6.2. Białka oddziałujące z miozyną VI**

W przyłączaniu cargo (tj. pęcherzyków, kompleksów białkowych i organelli) do CBD MVI biorą udział jej partnerzy białkowi, którzy oddziałują z nią siłami elektrostatycznymi lub hydrofobowymi. W oddziaływania elektrostatyczne zaangażowany jest motyw RRL<sup>1116-1118</sup> (złożony z reszt argininy i leucyny), natomiast w oddziaływania hydrofobowe motyw WWY<sup>1201-1203</sup> (złożony z reszt tryptofanu i tyrozyny) (Yu i in. 2009; Tumbarello i in. 2013; He i in. 2016; Shang i in. 2017) (Rycina 1.12). Ponadto w domenie globularnej pałeczki zidentyfikowano kolejne unikalne motywy zaangażowane w przyłączenie cargo do MVI. Jest to motyw IWE<sup>1261-1263</sup> (złożony z reszt

izoleucyny, tryptofanu oraz kwasu glutaminowego) oraz dwa regiony wiążące ubikwitynę: motyw MIU<sup>997-1024</sup> (ang. *motif interacting with ubiquitin*) (Penengo i in. 2006) i motyw MyUb<sup>1080-1122</sup> (ang. *myosin VI ubiquitin-binding domain*) (He i in. 2016; de Jonge i in. 2019). W CBD występuje ponadto domena wiążąca fosfolipidy PIP<sub>2</sub><sup>1122-1131</sup> (Spudich i in. 2007).



**Rycina 1.12. Schemat przedstawiający motywy w domenie wiążącej cargo (CBD), poprzez które odbywa się wiązanie MVI z jej partnerami białkowymi.** MVI oddziałuje bezpośrednio z partnerami białkowymi (zaznaczonymi na niebiesko) poprzez motywy RRL (linia pomarańczowa) oraz WWY (linia zielona) lub pośrednio (szary kolor białek). W oddziaływaniach MVI z partnerami białkowymi są zaangażowane również: motyw IWE (złożony z reszty izoleucyny, tryptofanu oraz kwasu glutaminowego) oraz dwa regiony wiążące ubikwitynę: motyw MIU (ang. *motif interacting with ubiquitin*) oraz motyw MyUb (ang. *myosin VI ubiquitin-binding domain*) (na podstawie de Jonge i in. 2019, zmodyfikowany).

Związanie określonego partnera białkowego przez MVI kieruje ją do specyficznych przedziałów subkomórkowych, gdzie pełni wyspecjalizowane funkcje. Z domeną wiążącą cargo pałeczki MVI oddziałuje wiele białek, wśród których znalazły się:

- białka adaptorowe biorące udział w endocytozie zależnej od receptorów: **Dab2** (ang. *disabled 2*) (Inoue i in. 2002; Morris i in. 2002; Spudich i in. 2007), **GIPC** (ang. *GAIP-interacting protein COOH terminus*) (Aschenbrenner i in. 2004; Arden i in. 2007) oraz **Sap97** (ang. *synapse-associated protein 97*) (Wu i in. 2002; Osterweil i in. 2005).
- białka autofagosomalne: **Tom1** (ang. *target of myb protein 1*) i **Tom1L2** (ang. *Tom1-like protein 2*) (Finan i in. 2011; Tumbarello i in. 2012; Karolczak i in. 2013).

- enzymy, tj. kinaza tyrozynowa **LMTK2** (ang. *lemur tyrosine kinase 2*) (Chibalina i in. 2007; Inoue i in. 2008), biorąca udział w recyklingu endosomów oraz **fosfolipaza C $\delta$ 3** (Sakurai i in. 2011), włączona w metabolizm fosfoinozytoli.
- białka stabilizujące organizację aparatu Golgiego: **optyneuryna** (Sahlender i in. 2005) i **T6BP/NDP52** [ang. *TRAF6-tumor necrosis factor receptor associated factor-binding protein/nuclear dot protein 52 kDa*] (Morriswood i in. 2007) oraz **otoferlina** stabilizująca organizację siateczki śródplazmatycznej (Roux i in. 2009).
- białka adhezyjne **E-kadheryna** i  **$\beta$ -katenina** (Geisbrecht i Montell 2002), **talina** (Karolczak i in. 2015b).
- białka sygnałowe: **CaBP5** (ang. *calcium-binding protein 5*) (Sokal i Haeseleer, 2011) i **DOCK7** (ang. *dedicator of cytokinesis 7*) (Sokal i Haeseleer 2011; Majewski i in. 2012; Sobczak i in. 2016) biorące udział w neurytogenezie oraz **AKAP9** (ang. *a kinase anchoring protein 9*) będący regulatorem aktywności kinazy PKA (Karolczak i in. 2015a i b).
- białka jądrowe: **hnRNPU** (ang. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein U*), biorące udział w dojrzewaniu i transporcie pre-mRNA, białko rybosomalne **S6** (ang. *ribosomal protein S6*) biorące udział w biogenezie rybosomów (Karolczak i in. 2013; Majewski i in. 2018), **receptor estrogenu  $\alpha$  – ER** (ang. *estrogen receptor  $\alpha$* ) (Fili i in. 2017), **receptor androgenu AR** (ang. *androgen receptor*) (Loikkanen i in. 2009).

Białka Dab2, Tom1, Tom1L2 i LMTK2 wiążą się poprzez motyw WWY w domenie wiążącej cargo MVI (Morris i in. 2002; Spudich i in. 2007; Tumbarello i in. 2012). Z motywem RRL oddziałują natomiast Sap97, T6BP/NDP52, optyneuryna, GIPC oraz DOCK7 (Bunn i in. 1999; Sahlender i in. 2005; Chibalina i in. 2007; Morriswood i in. 2007; Tumbarello i in. 2013; Sobczak i in. 2016). Dla innych białek miejsce wiązania w domenie wiążącej cargo nie zostało jak dotąd określone.

### 1.6.3. Funkcje miozyny VI

MVI jest zaangażowana w wielu procesach takich, jak: adhezja i migracja komórek (Geisbrecht i Montell 2002; Millo i in. 2004; Yoshida i in. 2004; Maddugoda i in. 2007), endocytoza (Buss i in. 2001; Aschenbrenner i in. 2004; O’Loughlin i in. 2018),

stabilizacja struktury aparatu Golgiego i egzocytoza (Sahlender i in. 2005; Warner i in. 2003; Tomatis i in. 2013, 2017), stabilizacja komórek włoskowatych ucha wewnętrznego (Avraham i in. 1995), autofagia (Tumbarello i in. 2012, 2013, 2015; Kruppa i in. 2018), miogeneza (Karolczak i in. 2013, 2015b; Suszek i in. 2018) czy spermatogeneza (Zakrzewski i in. 2017; 2020a i b, Noguchi i in. 2006; 2008). Bierze ona również udział w procesach zachodzących w jądrze, tj. transkrypcji, transporcie wewnątrzjądrowym i naprawie DNA (Vreugde i in. 2006; Jung i in. 2006; Fili i in. 2017, 2020; Majewski i in. 2018; Nowak i in. 2018).

U ludzi i myszy mutacje w genie *MYO6* prowadzą do utraty słuchu (Avraham i in. 1995; Rędownicz 2002; Ahmed i in. 2003; Mohiddin i in. 2004) i kardiomiopatii przerostowej (Mohiddin i in. 2004; Hegan i in. 2015). Co więcej, wzrost ekspresji *MYO6* obserwuje się w nowotworach jajnika i prostaty (Yoshida i in. 2004; Naora i Montell 2005; Dunn i in. 2006; Al Olama i in. 2014), co czyni MVI potencjalnym wczesnym markerem rozwoju nowotworu. Zwiększony poziom syntezy MVI jest obecny również w siatkówce oka (Breckler i in. 2000); uważa się, że mutacje w genie *MYO6* mogą powodować zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (Ahituv i in. 2000). Brak MVI u myszy wywołuje także liczne defekty podczas spermiogenezy, co skutkuje obniżoną płodnością samców (Zakrzewski i in. 2020a i b).

#### **1.6.4. Miozyna VI w jądrze komórkowym**

Jedną z najmniej poznanych kwestii jest rola MVI w jądrze komórkowym. Do tej pory ukazało się kilka prac dokumentujących obecność MVI w jądrze komórkowym i jej udział w transkrypcji (Vreugde i in. 2006; Zorca i in. 2015; Cho i in. 2016; Fili i in. 2017; Zakrzewski i in. 2017; Majewski i in. 2018; Cook i in. 2018, 2020; Hari-Gupta i in. 2022), transporcie wewnątrz jądra (Majewski i in. 2010, 2018) oraz naprawie uszkodzeń DNA (Jung i in. 2006; Cho i Chen 2010).

Vreugde i in. (2006) pokazali, że w aktywnych transkrypcyjnie komórkach raka szyjki macicy HeLa, MVI oddziałuje z kompleksem Pol II i kolokalizuje z nowopowstałymi transkryptami. Pokazano następnie, że MVI ulega rekrutacji do rejonów promotorowych i intragenowych (wewnątrzgenowych) aktywnych genów, kodujących urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA), czynnik inicjacji transkrypcji 6 (p27/eIF6) oraz receptor lipoproteinowy niskiej gęstości LDLR (ang. *low density lipoprotein receptor*). Nie zaobserwowano jednak wiązania MVI z niekodującymi,

nieregulatorowymi rejonami intergenowymi (międzygenowymi). Dodatkowo, zablokowanie MVI z użyciem specyficznych przeciwciał prowadziło do obniżenia ekspresji *LDLR*. Autorzy pracy zasugerowali, że MVI moduluje zależną od Pol II transkrypcję aktywnych genów, co implikuje możliwość udziału tego białka w mechanizmie transkrypcji (Vreudge i in. 2006).

Cho i in. (2016) pokazali, że podczas transkrypcji Pol II jest przestrzennie zorganizowana w jądrze w formie klastrów, co koreluje z aktywnością transkrypcji. Jednak mechanizm dotyczący składania, organizacji i stabilności tych klastrów pozostawał jak dotąd nieznany. Najnowsze badania ujawniły, że MVI również nie jest rozmieszczona przypadkowo w jądrze, a występuje w formie klastrów (Hari-Gupta i in. 2022). W takiej postaci reguluje przestrzenną organizację inicjacji transkrypcji poprzez zakotwiczenie Pol II do miejsc inicjacji transkrypcji (Hari-Gupta i in. 2022). Dowiedziono, że aktywność motoryczna MVI warunkuje formowanie klastrów Pol II, natomiast obniżenie poziomu MVI powoduje ich destabilizację (Hari-Gupta i in. 2022).

Dodatkowo zaobserwowano, że pod wpływem TIP, inhibitora aktywności motorycznej MVI (Heissler i in. 2012), dochodzi nie tylko do zaburzeń w organizacji i dynamice MVI w jądrze, ale również do zakłóceń w lokalizacji Pol II. Po działaniu TIP, Pol II gromadziła się na peryferium jądra, co wskazuje na kluczową rolę MVI w zachowaniu lokalizacji tej polimerazy w jądrze. O zależności między tymi dwoma białkami świadczy również fakt, że obniżenie poziomu Pol II prowadzi do zmian w jądrowej dynamice MVI (Hari-Gupta i in. 2022).

Ponadto, Cook i in. (2018) zaobserwowali, że zahamowanie aktywności motorycznej MVI przez TIP prowadzi do zahamowania transkrypcji o 75%, co dodatkowo wskazuje na udział MVI w transkrypcji.

Fili i in. (2017) pokazali, że interakcja między MVI a Pol II zależy od związania DNA przez ten kompleks. Za regulację tego oddziaływania odpowiada ko-aktywator transkrypcji, białko NDP52 (ang. *nuclear dot protein 52 kDa*), które jest również jednym z potencjalnych partnerów białkowych MVI. NDP52, zidentyfikowano po raz pierwszy w jądrze, ale dotychczas lepiej scharakteryzowano je jako białko oddziałujące z MVI w adhezji i autofagii (Morriswood i in. 2007; Mostowy i Cossart 2011). Białko NDP52 wiążąc się z MVI za pośrednictwem domeny CBD wywołuje zmianę konformacji w łańcuchu MVI z zamkniętej (nieaktywnej) w otwartą (aktywną), co wpływa na zwiększoną zdolność wiązania DNA przez MVI. Ponadto, oddziaływanie NDP52 z MVI pośredniczy w dimeryzacji cząsteczki MVI. Autorzy zidentyfikowali ponadto na C-końcu

MVI motyw bogaty w reszty leucyny, wiążący receptor jądrowy, który pozwala na wiązanie estrogenu. Ponadto, wykazano, że obniżenie poziomu MVI lub NDP52 prowadzi do zmniejszonej ekspresji genów docelowych dla tego receptora (Fili i in. 2017). Autorzy sugerują, że MVI może pełnić rolę motora w procesie transkrypcji przez wiązanie z kompleksem Pol II za pośrednictwem NDP52, jak również wiązanie MVI z Pol II może odbywać się poprzez oddziaływanie z aktyną, która wchodzi w skład kompleksu Pol II.

Z kolei Jung i in. (2006) pokazali, że w odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórkach raka okrężnicy RKO i LS147T czynnik transkrypcyjny p53 wiąże się z promotorem *MYO6*, co prowadzi do aktywacji jego ekspresji. Co więcej, w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, które aktywują zależne od czynnika transkrypcyjnego p53 systemy naprawcze, MVI ulega przemieszczeniu z cytoplazmy do aparatu Golgiego, błony okołojądrowej oraz do jądra. Brak MVI obniża aktywność białka p53, co wpływa na zwiększoną podatność na uszkodzenie DNA. Przypuszcza się więc, że MVI jest mediatorem zależnego od p53 szlaku prożyciowego w odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA (Jung i in. 2006). W kolejnej pracy pokazano jednak, że w komórkach raka piersi MCF7 i raka prostaty LNCaP na skutek uszkodzeń DNA wywołanych działaniem inhibitorów: topoizomerazy I (kamptotecyny) i topoizomerazy II (doksorubicyny), ekspresja *MYO6* drastycznie spada; spadek nie zależy jednak od p53 (Cho i Chen 2010).

Analiza *in silico* sekwencji ciężkiego łańcucha MVI szczura i człowieka wykazała obecność w rejonie pałeczki siedmiu potencjalnych/prawdopodobnych sygnałów lokalizacji jądrowej NLS a także jednego potencjalnego motywu eksportu jądrowego NES. O funkcjonalności tych motywów świadczą badania, w których zastosowano inhibitor importu jądrowego (iwermektynę) oraz inhibitor eksportu jądrowego (leptomycynę D). Zaobserwowano bowiem, że po inkubacji komórek PC12 z ww. inhibitorami dochodzi do zablokowania, odpowiednio importu MVI do jądra i jej eksportu z jądra (Majewski i in. 2018).

Do badań w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych nad udziałem MVI w jądrze komórkowym stosowano komórki hodowli pierwotnej uzyskane z rdzenia nadnerczy wołu i komórki PC12 (ang. *pheochromocytoma*), wyprowadzone z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (Greene i Tischler 1976). Wykazano, że po stymulacji komórek chlorkiem potasu dochodzi do znacznego wzrostu poziomu MVI w jądrze komórkowym, co wiąże się z nasileniem jej kolokalizacji z aktywną formą



Pol II, białkiem SC35 (ang. *serine/arginine-rich splicing factor SC35*), czynnikiem transkrypcyjnym SP1 (ang. *specificity protein 1*), czynnikiem splicingowym hnRNPU oraz acetylowaną formą histonu H3 (H3AcK9) (Majewski i in. 2018). W komórkach niestymulowanych białko to lokalizuje się głównie na obrzeżach heterochromatyny, a po stymulacji występuje też w ziarnistościach interchromatynowych. Późniejsze badania wykazały, że MVI niezależnie od stymulacji lokalizuje się w sąsiedztwie porów jądrowych, zarówno po cytoplazmatycznej jak i nukleoplazmatycznej stronie poru, co wskazuje na jej udział w transporcie do i z jądra (Majewski i in. 2018).

Podsumowując, lokalizacja MVI w obszarach pozbawionych chromatyny oraz przemieszczanie się MVI z cytoplazmy do jądra komórkowego sugeruje udział MVI w transporcie wewnątrzjądrowym. Przy użyciu metody chromatografii powinowactwa typu *pull down* i spektrometrii mas zidentyfikowano szereg nowych potencjalnych jądrowych partnerów MVI, które mogą determinować jej funkcjonowanie w jądrze. Wśród nich znalazły się hnRNPU, białka z rodziny helikaz DEAD-box, białka rybosomalne (S6) i jąderkowe (nukleolina). Oddziaływanie MVI z hnRNPU potwierdzono, m.in. z wykorzystaniem koimmunoprecypitacji i ligacji zbliżeniowej *in situ*, PLA (Majewski i in. 2018).

Wykazano również udział MVI w parowaniu homologicznych alleli chromosomów, co jest kluczowe dla ekspresji genów związanych z aktywacją limfocytów T (Zorca i in. 2015).

### **1.6.5. Inne miozyny występujące w jądrze komórkowym**

Jak już wcześniej wspomniano poza MVI w jądrze występują również przedstawiciele innych rodzin miozyn tj. I, II, V, XVI i XVIII. Należą one, z wyjątkiem rodziny II, do rodziny miozyn niekonwencjonalnych.

#### **1.6.5.1. Miozyna IC**

W jądrze komórkowym występują dwie izoformy miozyny IC: izoforma A i B. U ludzi miozyna IC jest kodowana przez gen *MYOIC*. Miozyna IC jest pierwszą niekonwencjonalną miozyną odkrytą w *Acanthamoeba castellanii* (Pollard i Korn 1973). Została ona oznaczona numerem I, ponieważ w odróżnieniu od konwencjonalnej miozyny II zbudowana jest z jednego łańcucha ciężkiego (ze związanymi do niego łańcuchami lekkimi), nie tworzy filamentów i występuje jako monomer (Collucio i in.

1997; Baryłko i in. 2000). Łańcuch ciężki miozyny z rodziny IC ma m.cz. ~110-150 kDa i zawiera N-końcową domenę motoryczną z miejscami wiązania aktyny i ATP; szyjkę z liczącymi od 1-3 motywami IQ wiążącymi łańcuchy lekkie (najczęściej kalmodulinę) oraz C-końcowy ogonek, zawierający motyw TH2 (ang. *tail homology domain*) bogaty w reszty glicyny, proliny lub glicyny/glutaminy, który tworzy drugie, niezależne od nukleotydu, miejsce wiązania aktyny (Rycina 1.9). W ogonku występuje również domena SH3 (ang. *src homology domain*), która jest obecna w wielu białkach cytoszkieletu i uczestniczy w oddziaływaniach białko-białko (Sellers 2000). W ogonku miozyny IC odnaleźć również można motyw o sekwencji homologicznej do domeny plekstrynowej PH (ang. *pleckstrin homology domain*), oddziałujący z domeną SH3 innych białek (Hwang i in. 2007). Regulacja aktywności miozyny IC odbywa się poprzez fosforylację reszt seryny lub treoniny zlokalizowanych w domenie motorycznej lub przez wiązanie jonów  $Ca^{2+}$  przez łańcuchy lekkie (Baryłko i in. 2000; Rędownicz 2001, 2002; Coluccio i in. 2008).

Izoforma B miozyny IC znana także jako jądrowa miozyna I (NMI) posiada na N-końcu białka dodatkową sekwencję zbudowaną z 16 reszt aminokwasowych, która decyduje o jej jądrowej lokalizacji (Nowak i in. 1997; Pestic-Dragovich i in. 2000; Schwab i in. 2013). Sekwencja ta różni się jednak od klasycznego motywu NLS kierującego do jądra. Klasyczny motyw NLS zidentyfikowano w drugiej z trzech domen IQ obecnych w izoformie B miozyny IC (Dzijak i in. 2012). Jako ostatnia zidentyfikowana została izoforma A miozyny IC, która na N-końcu białka posiada dodatkową sekwencję zbudowaną z 36 reszt aminokwasowych, która też warunkuje jej występowanie w jądrze komórki (Ihnatovych i in. 2012). Zarówno długość, jak i skład aminokwasowy tej wstawki różni się od tej zlokalizowanej w izoformie B miozyny IC.

Izoforma A miozyny IC kolokalizuje z Pol II w nukleoplazmie, a po zahamowaniu transkrypcji ulega redystrybucji do ziarnistości interchromatynowych, gdzie kolokalizuje z rybonukleoproteiną RNP-U1. Warto zauważyć, że w ziarnistościach interchromatynowych są przechowywane i modyfikowane białka zaangażowane w splicing pre-mRNA i eksport jądrowy. Nie występują natomiast tu czynniki transkrypcyjne zaangażowane w inicjacji i elongacji transkrypcji (Lamond i Spector 2003; Saitoh i in. 2004).

Izoforma B miozyny IC uczestniczy w transkrypcji zależnej od Pol II na etapie inicjacji transkrypcji (Pestic-Dragovich i in. 2000; Philimonenko i in. 2004; Almuzzaini i in. 2015), natomiast po zahamowaniu tego procesu nie ulega translokacji do ziarnistości

interchromatynowych (Hofmann i in. 2006). Przemieszczanie izoformy A miozyny IC do tych struktur sugeruje jej udział w późniejszych etapach transkrypcji tj. w dojrzewaniu RNA oraz/lub ich eksportem z jądra. Powyższe obserwacje sugerują zatem pełnienie przez izoformy A i B miozyny IC innych, wyspecjalizowanych funkcji w transkrypcji zależnej od Pol II. Co więcej, nowoodkryta izoforma A w odróżnieniu od izoformy B nie jest obecna w jąderku i nie współwystępuje z Pol I (Ihnatovych i in. 2012).

Izoforma B miozyny IC była pierwszym motorem molekularnym odkrytym w jądrze komórki (Nowak i in. 1997). Zidentyfikowano ją nie tylko w nukleoplazmie, ale również w jąderku, głównie w obszarze DFC, gdzie ma miejsce transkrypcja rDNA. Po aktywacji transkrypcji w ludzkich limfocytach za pomocą fitohemaglutyniny (PHA) zaobserwowano trzykrotny wzrost poziomu izoformy B miozyny IC w jąderku (Kyselá i in. 2005) oraz zmianę jej lokalizacji (oraz aktywności) z obszaru heterochromatyny do euchromatyny (Kyselá i in. 2005).

Główną rolą izoformy B miozyny IC jest uczestnictwo w transkrypcji zależnej od Pol II. Pokazano, że izoforma ta kolokalizuje i ulega koimmunoprecypitacji z Pol II. Po inkubacji komórek z inhibitorami transkrypcji,  $\alpha$ -amanityną lub ActD obserwowano zanik kolokalizacji obu białek, co wskazywało na udział izoformy B miozyny IC w tym procesie (Pestic-Dragovich i in. 2000). Inaktywacja izoformy B miozyny IC przy udziale specyficznego przeciwciała spowodowała zahamowanie transkrypcji zależnej od Pol II, natomiast dodanie oczyszczonego białka powodowało wzrost poziomu transkrypcji (Pestic-Dragovich i in. 2000). Również mikroiniekcja przeciwciała przeciwko izoformie B miozyny IC wprowadzonego do komórek doprowadziła do zmniejszenia ilości nowopowstałych transkryptów (Pestic-Dragovich i in. 2000).

Izoforma B miozyny IC pełni także ważną rolę w transkrypcji zależnej od Pol I (Fomproix i Percipalle 2004; Ihnatovych i in. 2012). Zaobserwowano współwystępowanie tej izoformy z miejscami aktywnej transkrypcji, a jej zablokowanie po mikroiniekcji do jąderka przeciwciała przeciwko izoformie B miozyny IC lub wprowadzeniu siRNA dla tej izoformy skutkuje zahamowaniem transkrypcji rDNA (Philimonenko i in. 2004). Natomiast po nadekspresji izoformy B miozyny IC dochodzi do wzrostu poziomu syntezy pre-RNA.

Pokazano również, że izoforma B miozyny IC oddziałuje z kompleksem Pol I za pośrednictwem czynnika inicjującego transkrypcję TIF1A (Philimonenko i in. 2004). Oddziaływanie izoformy B miozyny IC z TIF1A jest niezbędne do związania Pol I z promotorem rDNA. Dodatkowo, za pomocą koimmunoprecypitacji pokazano, że

kompleks Pol I z TIF1A powstaje tylko, gdy w komórkach zachodzi transkrypcja; zaobserwowano bowiem, że po zahamowaniu transkrypcji przy użyciu ActD (w stężeniu hamującym aktywność Pol I, bez wpływu na aktywność Pol II) dochodzi do spadku ilości powstającego kompleksu (Philimonenko i in. 2004). Oddziaływanie TIF1A z izoformą B miozyny IC obserwowano niezależnie od stanu aktywności transkrypcyjnej, jednak powstanie tego kompleksu jest zależne od fosforylacji TIF1A przez kinazę RSK (ang. *ribosomal S6 kinase*). Zakłada się więc, że oddziaływanie izoformy B miozyny IC z TIF1A jest niezbędne w etapie inicjacji transkrypcji. Przyłączenie Pol II do kompleksu: izoforma B miozyny IC z TIF1A może być ułatwione dzięki oddziaływaniu izoformy B miozyny IC z aktyną, która wiąże się bezpośrednio z Pol I (Grummt 2006). Dalsze wyniki wskazały, że izoforma B miozyny IC odgrywa ważną rolę na etapie późniejszym niż inicjacja transkrypcji (Percipalle i in. 2006). Izofoma B miozyny IC wchodzi również w skład kompleksu modyfikującego chromatynę B-WICH, zawierającego czynnik WSTF (ang. *William syndrom transcription factor*) i ATPazę SNF2h (ang. *switch nuclear ATPase smarca5*) oraz bierze udział w rearanzacji chromatyny. Kompleks modyfikujący chromatynę oddziałuje zarówno z Pol I w jąderku oraz rejonem promotora rDNA (Percipalle i in. 2006; Vintermist i in. 2011; Sarshad i in. 2013).

Izofoma B miozyny IC może brać również udział w transporcie chromosomów wewnątrz jądra (Chuang i in. 2006; Hu i in. 2008). Chuang i in. (2006) zaobserwowali, że heterochromatyna zlokalizowana na peryferiach jądra, ulega przemieszczeniu po aktywacji transkrypcji w kierunku centrum jądra. Translokacja ta jest zależna od oddziaływania filamentów aktynowych z izoformą B miozyny IC (zablokowanie polimeryzacji aktyny powodowało zahamowanie ruchu chromosomów) (Chuang i in. 2006). Z kolei Hu i in. (2008) zaobserwowali, że po stymulacji jądrowego receptora estrogenowego ( $E\alpha$ ) za pomocą  $17\beta$ -estradiolu dochodzi do przemieszczania się genów regulatorowych obecnych na dwóch różnych chromosomach i ich oddziaływania w miejscach występowania ziarnistości interchromatynowych. W procesie tym jest zaangażowana izoforma B miozyny IC, ponieważ jej mutacje (w rejonie wiążącym aktynę oraz w miejscu wiążącym ATP) powodują zanik oddziaływania pomiędzy chromosomami. Izofoma B miozyny IC bierze również udział w naprawie uszkodzeń DNA (Kulashreshtha i in. 2016; Evdokimova i in. 2018).

Cisterna i in. (2006) zaobserwowali także, że izoforma B miozyny IC kolokalizuje z białkiem S6 wchodzącym w skład małej podjednostki rybosomu w obszarze GC jąderka (Cisterna i in. 2006). Podczas transportu małej podjednostki rybosomu z jąderka do

nukleoplazmy zaobserwowano kolokalizację S6 (zasocjowanego z RNA) z izoformą B miozyny IC w porach jądrowych. Dodatkowo, po zablokowaniu izoformy B tej miozyny lub aktyny obserwowano nagromadzenie S6 w jąderku, co wskazuje na udział izoformy B miozyny IC w transporcie wewnątrzjądrowym oraz w eksporcie jądrowym.

#### **1.6.5.2. Miozyna II**

O obecności miozyny konwencjonalnej w jądrze komórkowym wiadomo z badań przeprowadzonych ponad dekadę temu przez Li i Sarnę (2009). Badacze ci pokazali, że miozyna II nie tylko występuje w jądrze, ale również reguluje transkrypcję genu kodującego glikoproteinę ICAM-1 (ang. *intracellular adhesion molecule 1*), należącej do nadrodziny immunoglobulin. Jako model badawczy zastosowano hodowlę ludzkich komórek uzyskanych z mięśni gładkich okrężnicy HCCSMCs (ang. *human colonic circular smooth muscle cells*) oraz szczurze skrawki z tej części jelita grubego. Wykazano, że miozyna II przyłącza się do sekwencji promotora genu ICAM-I. Wzrost transkrypcji genu ICAM-I w zapaleniu okrężnicy odgrywa ważną rolę w dysfunkcji mięśni gładkich (Pazdrak i in. 2004). Li i Sarna (2009) pokazali, że defosforylacja regulatorowych łańcuchów lekkich miozyny mięśni gładkich RLC zwiększa poziom transkrypcji genu ICAM-I, natomiast fosforylacja RLC zmniejsza poziom transkrypcji tego genu. Zauważono także, iż podczas zapalenia okrężnicy dochodzi do inaktywacji znajdującej się w jądrze kinazy lekkich łańcuchów miozyny, co powoduje wzrost nieufosforylowanej formy RLC i skutkuje wzrostem transkrypcji genu ICAM-1.

#### **1.6.5.3. Miozyna V**

Miozyna V funkcjonuje w formie dimeru i jest zbudowana z dwóch łańcuchów ciężkich o m.cz. ~190 i 220 kDa (Cheney i in. 1993; Vale 2003; Sellers i Veigel 2006; Taylor 2007). Łańcuch ciężki miozyn V przedstawia typową dla miozyn budowę domenową (Rycina 1.9). Zbudowany jest z: N-końcowej domeny motorycznej zawierającej miejsce wiązania ATP i aktyny, szyjki wyposażonej w sześć motywów IQ, do której przyłączają się cztery cząsteczki kalmoduliny i dwa łańcuchy lekkie (łańcuchy istotne) typowe dla miozyn konwencjonalnych (Espindola i in. 2000), oraz ogonka obejmującego część helikalną i C-końcową część globularną (Hammer i Sellers 2012; Wilkie i in. 2018). W rejonie helikalnym ogonka znajduje się motyw odpowiedzialny za tworzenie dimerów, natomiast globularna część pałeczki odpowiada za wiązanie cargo

(Langford 2002). Wiązanie miozyny V z cargo odbywa się za pośrednictwem specyficznych dla cargo białek adaptorowych (Wong i Weisman 2021).

Miozyna V pełni rolę typowego motoru transportującego ładunek w kierunku końców plus filamentów aktynowych. U ssaków zidentyfikowano trzy izoformy miozyny V: VA, VB i VC, spośród których dwie pierwsze (kodowane u ludzi przez geny *MYO5A* i *MYO5B*) występują w jądrze komórkowym (Reck-Peterson i in. 2000). Oba motory nie są jednak obecne w jądrach komórek nieaktywnych transkrypcyjnie (Prancheivicius i in. 2008).

Wykazano, że fosforylacja reszty seryny (Ser-1650) w pałeczce miozyny VA przez zależną od jonów  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny kinazę typu II (ang. *CAM-kinase II*) warunkuje występowanie miozyny VA w określonych przedziałach jądra komórkowego. Ufosforylowaną formę miozyny VA znaleziono w ziarnistościach interchromatynowych, gdzie kolokalizuje z białkiem SC35 (Prancheivicius i in. 2008). Nie stwierdzono jej natomiast w rejonie heterochromatyny, ciałkach Cajala, jąderku czy rejonie okołojąderek (ang. *nucleolar caps*). Po zahamowaniu transkrypcji rDNA przez ActD obserwowano translokację ufosforylowanej miozyny VA z ziarnistości interchromatynowych (niezależnie od białka SC35) do jąderek oraz do miejsc, sąsiadujących z ziarnistościami interchromatynowymi (Prancheivicius i in. 2008).

Z kolei miozyna VB jest obecna w jąderku, gdzie kolokalizuje z Pol I i z nowo powstałymi rRNA (Lindsay i McCaffrey 2009). Wykazano również, że za transport miozyny VB do jąderka odpowiada zidentyfikowany w szyjce odcinek 796-911, zawierający reszty argininy. Motyw ten wykazuje znaczną homologię do krótkiej domeny wiążącej RNA niezbędnej dla jądrowej lokalizacji ludzkiego białka Nop25 (Fujiwara i in. 2006). Po zahamowaniu transkrypcji rDNA zaobserwowano translokację miozyny VB z jąderka poza jego obwód/do rejonu około jądrowego (Lindsay i McCaffrey 2009) oraz jej kolokalizację z białkami: UBF i Pol I (Lindsay i McCaffrey 2009), co sugeruje udział miozyny VB w transkrypcji rDNA. Przypuszczenie to potwierdzają badania z inhibitorem Pol II –  $\alpha$  amanityną, pod wpływem której nie zaobserwowano zmiany w jądrowej lokalizacji miozyny VB. Z wykorzystaniem koimmunoprecypitacji pokazano ponadto bezpośrednie oddziaływanie miozyny VB z kompleksem Pol I i aktyny (Lindsay i McCaffrey 2009), co sugeruje zaangażowanie miozyny VB w transkrypcji zależnej od Pol I (Lindsay i McCaffrey 2009).

#### 1.6.5.4. Miozyna XVI

Miozyna XVI jest obecna tylko u ssaków a synteza jej zachodzi głównie podczas rozwoju tkanki nerwowej (Patel i in. 2001). Poznano dwie izoformy miozyny XVI, miozynę XVIA i miozynę XVIB, które są produktami genu *MYO16*. Masa cząsteczkowa łańcuchów ciężkich miozyn wynosi, odpowiednio, ~150 kDa i ~210 kDa, a ich budowa jest typowa dla innych miozyn. Ponieważ w ogonku obu izoform miozyny XVI nie zlokalizowano motywu superhelisy, przypuszcza się, że występuje ona w formie monomeru (Patel i in. 2001; Cameron i in. 2007) (Rycina 1.9). W ogonku miozyny XVIB są obecne ponadto motywy bogate w reszty proliny, które umożliwiają oddziaływanie tej izoformy z profiliną, białkiem biorącym udział w regulacji organizacji cytoszkieletu aktynowego (Yarmola i Bubb 2006). Charakterystyczną cechą obu izoform miozyny XVI jest obecność na N-końcu białka (przed domena motoryczną) domeny ankirynowej (ANK), która umożliwia oddziaływanie z podjednostkami katalitycznymi 1 $\alpha$  i 1 $\gamma$  fosfatazy białkowej 1 (Patel i in. 2001). Fosfataza ta uczestniczy w transkrypcji, dojrzewaniu i transporcie RNA oraz podziale komórkowym (Patel i in. 2001; Cohen 2002; Ceulemans i Bollen 2004).

Miozynę XVIB znaleziono w jądrach komórek podczas interfazy (Cameron i in. 2007). Za jej jądrową lokalizację odpowiada C-końcowy fragment ogonka obejmujący reszty aminokwasowe 1616-1912 (Cameron i in. 2007). Izoforma miozyny XVIA nie posiada fragmentu kierującego do jądra i lokalizuje się tylko w cytoplazmie. Z badań na szczurzych fibroblastach Rat2 wiadomo, że całkowity poziom miozyny XVI zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego. Zaobserwowano ponadto, że w odpowiedzi na działanie czynników uszkadzających DNA (które indukują stres replikacyjny) spada całkowity poziom miozyny XVI (Cameron i in. 2013).

Miozyna XVIB występuje w rejonie euchromatyny, w której zaobserwowano obecność profiliny i spolimeryzowanej aktyny, co może wskazywać na jej uczestnictwo w polimeryzacji aktyny jądrowej (Cameron i in. 2007). Miozyna XVIB współwystępuje również z jądrowym antygenem komórek proliferujących, PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) oraz cyklina A, markerami fazy S cyklu komórkowego, co może sugerować jej udział w replikacji i naprawie DNA. Wykazano także, że nadekspresja miozyny XVIB spowalnia przebieg fazy S cyklu komórkowego, podczas której zachodzi replikacja DNA, poprzedzająca podział komórkowy. Wydaje się więc, że miozyna XVIB może pełnić rolę regulatorową podczas cyklu komórkowego (Cameron i in. 2013). Co

więcej, nie zlokalizowano miozyny XVIB w jąderku, ziarnistościach interchromatynowych, ciałkach Cajala i ciałkach PML (Cameron i in. 2007).

#### **1.6.5.5. Miozyna XVIII**

U ludzi obie izoformy miozyny XVIII: miozyna XVIIIA (m.cz. ~240 kDa) i miozyna XVIIIIB (m.cz. ~285 kDa), kodowane przez dwa geny: *MYO18A* i *MYO18B*, są obecne w jądrze komórkowym (Berg i in. 2001). Łańcuchy ciężkie obu izoform miozyn cechuje podobna budowa; na N-końcu znajduje się (1) domena motoryczna, która wykazuje zdolność wiązania aktyny ale - w odróżnieniu od innych miozyn - nie wykazuje aktywności ATPazy (Isogawa i in. 2005; Guzik-Lendrum i in. 2011, 2013, Taft i in. 2013, Jiu i in. 2019), (2) szyjka, zawierająca dwa motywy IQ, wiążąca łańcuchy lekkie (Preller i Manstein 2013) oraz C-końcowy ogonek zawierający motyw superhelisy, niezbędny dla dimeryzacji (Ajima i in. 2008; Billington i in. 2015; Jiu i in. 2019) (Rycina 1.9).

Izoforma miozyny XVIIIA występuje w komórkach hematopoetycznych zrębu szpiku kostnego (Furusawa i in. 2000), natomiast izoforma miozyny XVIIIIB w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym (Salamon i in. 2003; Mori i in. 2005). W łańcuchu ciężkim miozyny XVIIIA, jeszcze przed domeną motoryczną, zlokalizowano domenę PDZ, która wiąże kanały jonowe i receptory błonowe oraz odpowiada za wiązanie tych receptorów z enzymami efektorowymi. W łańcuchu ciężkim miozyny XVIIIA zlokalizowano również motywy KE (bogate w reszty lizyny i kwasu glutaminowego), odpowiedzialne za jądrową lokalizację białka (Furusawa i in. 2000; Buschman i Field 2017). W łańcuchu ciężkim miozyny XVIIIIB nie zidentyfikowano motywów PDZ i KE, ale zlokalizowano w nim sekwencję NLS, która odpowiada za jej występowanie w jądrze. Sekwencja ta obejmuje reszty aminokwasowe 2377-2387 i znajduje się na C-końcu białka (Salamon i in. 2003).

Jak dotąd ukazało się tylko jedno doniesienie o występowaniu miozyny XVIIIA w jądrze fibroblastów myszy NIH3T3 (Mori i in. 2005). Więcej danych o roli w jądrze komórkowym dotyczy miozyny XVIIIIB. Podczas różnicowania mioblastów w miotuby część cytoplazmatycznej puli miozyny XVIIIIB przemieszcza się do jądra komórkowego (Salamon i in. 2003). W dojrzałych mięśniach szkieletowych miozyna ta również występuje w jądrach komórkowych. Prawdopodobnym jest zatem, że miozyna XVIIIIB, podobnie jak miozyna IC i miozyna VI, może aktywnie uczestniczyć w transkrypcji genów kodujących białka mięśniowe. Zaobserwowano ponadto, że poziom miozyny



XVIIIIB znacząco wzrasta podczas różnicowania mioblastów w miotuby (Ajima i in. 2008; Gurung i in. 2017). Zaobserwowano również, że w komórkach raka płuc dochodzi do zmniejszonej ekspresji genu *MYO18B*, czemu towarzyszy wzrost metylacji DNA i deacetylacji histonów (Nishioka i in. 2002; Tani i in. 2004). Niższy poziom miozyny XVIIIIB występuje też w raku jajnika i odbytu (Yanaihara i in. 2004; Nakano i in. 2005). Uważa się więc, że miozyna XVIIIIB może odgrywać rolę czynnika supresorowego w procesie kancerogenezy (Ajima i in. 2007; Bleeker i in. 2009, Taft i in. 2014, Ouyang i in. 2021). To odmiennie od miozyny XVIIIIA, która jest białkiem sprzyjającym nowotworzeniu, z uwagi na jej udział w migracji komórek nowotworowych np. w raku prostaty (Buschman i Field 2017). Partnerem białkowym miozyny XVIIIIB jest białko HOMER2, biorące udział w szlakach sygnałowych związanych z regulacją wzrostu komórek i ekspresją genów. Ujawniono, że ko-ekspresja konstruktów kodujących HOMER2 i miozynę XVIIIIB zwiększa zdolność miozyny XVIIIIB do hamowania wzrostu komórek linii niedrobnokomórkowego raka płuc H1299, w porównaniu z nadekspresją konstruktów kodującego samą miozynę (Ajima i in. 2007).

## **2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY**

Niekonwencjonalna miozyna VI (MVI) dzięki oddziaływaniu z różnymi ligandami uczestniczy w wielu procesach komórkowych takich, jak endocytoza, sekrecja, podział komórkowy, różnicowanie, migracja komórek czy też transkrypcja zależna od Pol II. Z wcześniejszych badań przeprowadzonych w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych na komórkach neurosekrecyjnych wiadomo, że MVI lokalizuje się w jądrze komórkowym oraz siateczce śródplazmatycznej. Ponadto, analiza spektrometrii mas wykazała, że MVI może oddziaływać z białkiem jąderkowym – nukleoliną oraz białkiem rybosomalnym - S6.

Obserwacje te i **brak danych literaturowych na temat funkcjonowania MVI w jąderku skłoniły mnie do zbadania potencjalnej roli tego białka motorycznego w tym regionie jądra**. Cel ten realizowałam wykorzystując komórki neurosekrecyjne PC12, wyprowadzone ze szczurzych komórek guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy.

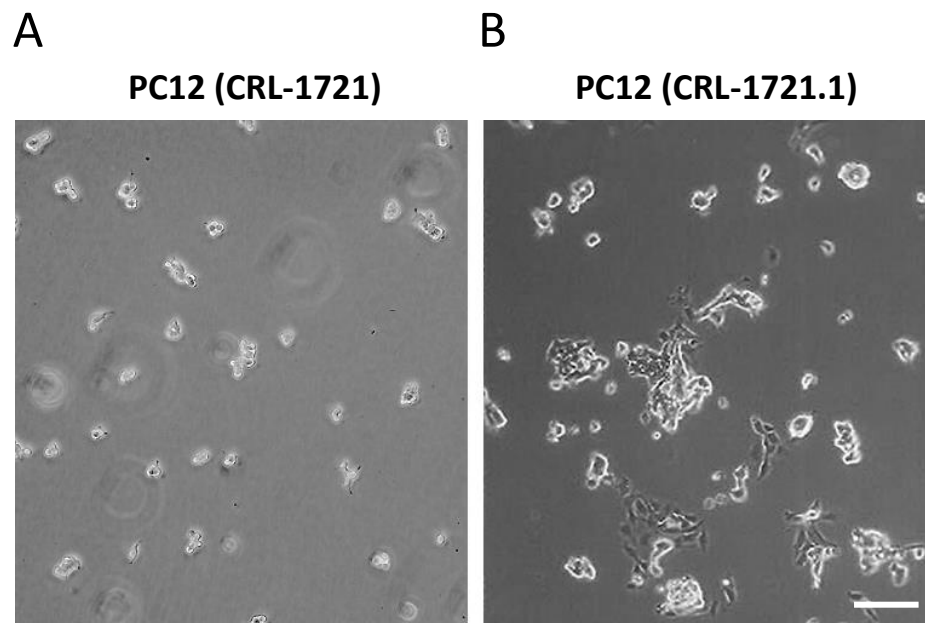
Zamierzony cel postanowiłam zrealizować poprzez :

- Weryfikację oddziaływania MVI z jej nowymi potencjalnymi partnerami: nukleoliną oraz białkiem rybosomalnym S6;
- określenie subjąderkowej lokalizacji MVI;
- analizę oddziaływania MVI z białkami charakterystycznymi dla poszczególnych obszarów jąderka: UBF, fibrylaryną oraz B23;
- zbadanie ultrastruktury jąderka w warunkach stresu jąderkowego wywołanego aktynomycyną D (ActD);
- analizę wpływu obniżonego poziomu MVI na ultrastrukturę jąderka;
- analizę wpływu obniżonego poziomu MVI na lokalizację UBF, fibrylaryny oraz B23 w warunkach stresu jąderkowego wywołanego ActD;
- analizę wpływu obniżonego poziomu MVI na organizację siateczki śródplazmatycznej i poziom 45S pre-rRNA.

### **3. MATERIAŁY I METODY**

### 3.1. Hodowla komórek PC12

Komórki linii PC12 wyprowadzonej z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (ang. *pheochromocytoma of the rat adrenal medulla*), zakupiono w ATCC (*American Type Culture Collection*) i hodowano zgodnie z zaleceniami producenta. Stosowano dwa warianty tych komórek: nieadherentny CRL-1721, który posiada zdolność do fenotypowego różnicowania się w kierunku komórek nerwowych oraz adherentny, CRL-1721.1, który nie jest zdolny do różnicowania. Wariant adherentny CRL-1721.1 posłużył do przygotowania przez dr. Łukasza Majewskiego, byłego doktoranta z Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych linii komórek PC12 ze stabilnie wyciszoną ekspresją *MYO6* (*siRNA-MVI*) oraz komórek kontrolnych *scrambled*. Linie te przygotowano w oparciu o plazmid kodujący siRNA skierowany przeciwko mRNA MVI oraz plazmid kodujący kontrolne siRNA, nierozpoznające żadnej znanej sekwencji mRNA ssaków (szczegóły w Majewski i in. 2011).



**Rycina 3.1. Obraz komórek PC12 (A) CRL-1721 oraz (B) CRL-1721.1 z mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym.** Skala 100  $\mu\text{m}$ . <https://www.atcc.org/products/crl-1721>, <https://www.atcc.org/products/crl-1721.1>.

Komórki PC12 (CRL-1721) hodowano w pożywce RPMI-1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute*) (*Invitrogen*) zawierającej 2 mM L-glutaminę, 4500 mg/L glukozę i 1500 mg/L dwuwęglan sodowy, 5% płodową surowicę bydlęcą (FBS) (Gibco), 10% inaktywowaną termicznie (56°C przez 30 min) surowicę końską (HS) (Gibco) oraz

1% mieszaninę antybiotyków [penicylina (10 000 u/ml) i streptomycyna (10 000 µg/ml) (Invitrogen)] (Rycina 3.1).

Komórki PC12 (CRL-1721.1) hodowano w pożywce F12K (ang. *Kaighn's Modification of Ham's F-12*) (ATCC) zawierającej 2 mM L-glutaminę, 1500 mg/L dwuwęglan sodowy, 2,5% FBS i 15% HS oraz 1% mieszaninę antybiotyków (Rycina 3.1). Komórki *siRNA-MVI* oraz *scrambled* hodowano w pożywce F12K z dodatkiem 2,5% FBS, 15% HS, 1% mieszaniny antybiotyków oraz antybiotyku selekcyjnego higromycyny B (250 ng/ml) (Sigma).

Hodowlę komórek prowadzono w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub> w inkubatorze firmy Heraeus na szalkach i płytkach firmy Sarstedt przeznaczonych do hodowli linii komórek eukariotycznych, które pokrywano (w przypadku komórek nieadherentnych) poli-D-lizyną (PDL) lub poli-L-lizyną (PLL) (Sigma-Aldrich) w stężeniu 50 µg/ml na 1 h przed wysianiem komórek. PDL i PLL to związki syntetyczne, które umożliwiają adhezję komórek do podłoża. Komórki pasażowano dwa razy w tygodniu do uzyskania konfluencji wynoszącej 70 - 80%. W tym celu z szalki odciągano podłoże, dodawano 0,25% roztwór trypsyny z EDTA (Gibco) w celu odklejenia przylegających komórek i inkubowano w 37°C przez 2 min. Następnie zbierano zawiesinę komórek, dodawano równą objętość kompletnej pożywki w celu zahamowania aktywności trypsyny i odwirowano 200 x g przez 3 min w temperaturze pokojowej. Osad zawieszano w świeżej pożywce i wysiewano na płytki 6. lub 12. dołkowe, albo szalki o średnicy 35, 60, 100 lub 150 mm, w zależności od celu doświadczenia, po czym określoną objętość zawiesiny przenoszono do nowego naczynia hodowlanego. Doświadczenia z wykorzystaniem komórek PC12 prowadzono do osiągnięcia 15 pasażu.

### **3.1.1. Bankowanie i rozmrażanie linii komórkowych**

#### **3.1.1.1. Bankowanie**

W celu utworzenia banku kolejnych pasaży komórek, komórki odklejano od dna naczynia hodowlanego stosując 0,25% roztwór trypsyny z EDTA, po czym komórki umieszczano w 37°C na ok. 5 min. Następnie całość (ze świeżą porcją pożywki z surowicą) odwirowywano przy 200 x g przez 3 min w temperaturze pokojowej. Osad komórek delikatnie zawieszano w odpowiedniej pożywce zawierającej 20% HS, 10% FBS, 5% DMSO i przenoszono do probówek kriogenicznych, które przechowywano w ciekłym azocie. Przed przeniesieniem do ciekłego azotu komórki umieszczano w

polistyrenowym pudełku i poddawano zamrażaniu wstępnemu w  $-70^{\circ}\text{C}$  na okres 24 h, celem uzyskania odpowiedniego tempa mrożenia niezbędnego do uzyskania maksymalnego stopnia przeżywalności komórek.

### **3.1.1.2. Rozmrażanie**

Probówki z zamrożonymi komórkami ogrzewano w  $37^{\circ}\text{C}$  przez ok. 2 min. Rozmrożoną zawiesinę komórek przenoszono jak najszybciej do probówki zawierającej 10 ml świeżej, pełnej pożywki hodowlanej i odwirowywano przy 200 x g przez 3 min w temperaturze pokojowej (w celu pozbycia się toksycznego DMSO). Osad komórek delikatnie zawieszano w 1 ml świeżej porcji pożywki i przenoszono na szalki. Następnego dnia zmieniano pożywkę na świeżą.

## **3.2. Stymulacja komórek PC12 do wydzielania zawartości granul chromafinowych**

Komórki PC12 (CRL-1721) stymulowano do wydzielania zawartości granul chromafinowych poprzez wywołanie depolaryzacji ich błony komórkowej (Trifaro i in. 1980; Vitale i in. 1992). W tym celu w pożywce hodowlanej zwiększano do 56 mM KCl zewnątrzkomórkowe stężenie jonów potasu, obniżając stężenie jonów sodu dla zachowania odpowiedniej osmotyczności roztworu. Komórki płukano początkowo roztworem Locke'a z niskim stężeniem jonów potasu (2,6 mM KCl, 154 mM NaCl, 2,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM glukoza), po czym inkubowano przez 1 min roztworem Locke'a z wysokim stężeniem jonów potasu (56 mM KCl, 103,6 mM NaCl, 2,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,25 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM glukoza). Następnie komórki utrwalano do obserwacji z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (Rozdział 3.13).

## **3.3. Wywoływanie stresu jąderkowego w komórkach PC12**

W celu wywołania stresu jąderkowego, komórki PC12 (CRL-1721) oraz *siRNA-MVI* i *scrambled* poddano działaniu inhibitora transkrypcji Pol I, aktynomycynie D (ActD) (Sigma). Komórki inkubowano w pożywce RPMI-1640 zawierającej 5% HS i 10% FBS [PC12 (CRL-1721)] lub F12K zawierającej 2,5% FBS oraz 15% HS (*siRNA-MVI* oraz *scrambled*), z dodatkiem ActD w stężeniu hamującym aktywność Pol I (0,05

µg/ml) przez 3 h w inkubatorze. Komórki kontrolne hodowano jak opisano powyżej, ale bez ActD.

### **3.4. Metody pracy z kwasami nukleinowymi**

#### **3.4.1. Izolacja RNA**

Do oczyszczania całkowitego RNA z komórek PC12 (*siRNA-MVI* oraz *scrambled*) używano zestawu RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) postępując według instrukcji załączonej przez producenta. RNA po oczyszczeniu zawieszano w 50 µl wody dejonizowanej wolnej od RNAz i mierzono jego stężenie. Zanieczyszczenie DNA usuwano przez uprzednie trawienie DNAzą I (Qiagen).

#### **3.4.2. Pomiar stężenia RNA**

Stężenie i czystość wyizolowanego RNA określano metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm przy użyciu spektrofotometru NanoDrop™ One Microvolume UV-VIS Spectrophotometers (ThermoFisher™). Czystość RNA oznaczano na podstawie wartości współczynnika  $A_{260/280}$ . Preparat RNA uznawano za czysty, gdy wartość współczynnika mieściła się w zakresie 2,0-2,2.

#### **3.4.3. Przepisywanie RNA na cDNA metodą odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)**

Reakcję odwrotnej transkrypcji, RT-PCR (ang. *Reverse Transcriptase PCR*) przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu SuperScript III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Do przeprowadzenia reakcji RT-PCR używano całkowitą ilość wcześniej oczyszczonego RNA. Mieszaninę reakcyjną o objętości 13 µl zawierającą RNA, nukleotydy (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), każdy w stężeniu 0,2 mM oraz starter typu *random hexamers* (Invitrogen) w stężeniu 50 µM inkubowano przez 5 min w 65°C po czym inkubowano na lodzie przez 1 min. Następnie dodawano 7 µl mieszaniny zawierającej 200 U odwrotnej transkryptazy, SuperScript™ III RT wraz z odpowiednim buforem (*5xFirst-Strand Buffer*), 0,1 M DTT oraz inhibitor RNazy - RNaseOUT™. Próby inkubowano przez 5 min w 25°C, a następnie przez 45 min w 50°C. Reakcję inaktywowano przez ogrzewanie przez 15 min w temperaturze 70°C. Uzyskane cDNA wykorzystywano jako matryca w reakcji PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (*q-PCR*, ang. *quantitative real-time PCR*) lub przechowywano w -20°C do czasu wykonania reakcji PCR.



### 3.4.4. Reakcja PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym (*q-PCR*) prowadzono w celu pośredniej oceny poziomu aktywności Pol I w komórkach *siRNA-MVI* oraz *scrambled* wyrażonej poziomem jej produktu – 45S pre-rRNA. *q-PCR* prowadzono w 96-dołkowych płytkach (MicroAmp Fast Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems), do których наносzono mieszaninę reakcyjną o objętości 20  $\mu$ l/dołek, zawierającą: SYBR Green PCR Master Mix [zawierający barwnik fluorescencyjny specyficzny do dsDNA SYBR® Green I Dye, polimerazę DNA AmpliTaq Gold®, mieszaninę deoksyrybonukleotydów (dNTPs z dUTP), barwnik pasywny (*passive reference*-nie wchodzi w interakcje z powielanym DNA, intensywność fluorescencji barwnika utrzymuje się na stałym poziomie niezależnie od aktualnego stężenia produktu PCR w mieszaninie reakcyjnej), bufor dostarczony przez producenta polimerazy (Applied Biosystems)], parę starterów komplementarnych do 45S pre-rRNA w stężeniu 0,5  $\mu$ M (Tabela 3.1) oraz 100 ng cDNA jako matrycy. Każdą próbę przygotowano w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki normalizowano względem genu referencyjnego (ang. *housekeeping gene*) - 18S rRNA (Kalita i in. 2008). Analizę przyrostu produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym wykonano w aparacie 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), stosując następujący profil temperaturowo-czasowy reakcji:

95°C - 10 min (denaturacja wstępna)  
95°C - 15 sec (denaturacja)  
60°C - 1 min (przyłączanie starterów i wydłużanie nici DNA) } 45 cykli

**Tabela 3.1. Sekwencje starterów dla 45S pre-rRNA stosowanych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.**

Sekwencje starterów dla 45S pre-rRNA	
<b>Forward</b>	5'-TGGGGCAGCTTTATGACAAC-3'
<b>Reverse</b>	5'-TAGCACCAAACGGGAAAACC-3'

**Tabela 3.2. Sekwencje starterów dla 18S rRNA (genu referencyjnego) stosowanych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.**

Sekwencje starterów dla 18S rRNA	
<b>Forward</b>	5'-GTTGGTTTTTCGGAAGTGGG-3'
<b>Reverse</b>	5'-GTCGGCATCGTTTATGGTCG-3'

Do analizy wyników użyto względnej metodę kwantyfikacji  $\Delta\Delta C_t$ , która opiera się na wyznaczeniu względnej różnicy poziomów ekspresji między próbą badaną (45S pre-rRNA) a referencyjną (18S rRNA). Reakcję PCR w czasie rzeczywistym i analizę wyników przeprowadzono przy pomocy dr hab. Katarzyny Kaloty-Bykowskiej z Pracowni Neurobiologii Instytutu Nenckiego.

### **3.5. Metody pracy z białkami**

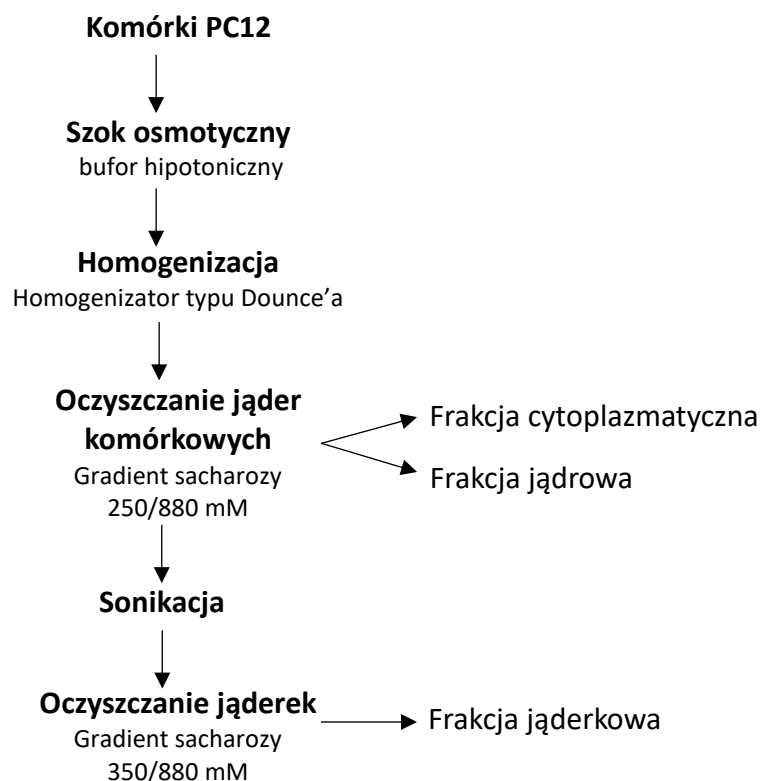
#### **3.5.1. Otrzymywanie całkowitych lizatów komórek PC12**

Komórki linii PC12 (CRL-1721, *siRNA-MVI* oraz *scrambled*) hodowano na szalkach o średnicy 60, 100 mm lub 150 mm. Po uzyskaniu konfluencji wynoszącej 70 - 80 %, komórki dwukrotnie przemywano PBS a następnie zawieszano w buforze lizującym o składzie 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF oraz mieszanina inhibitorów proteaz (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) i fosfataz (PhosSTOP™, Roche). Procedurę przeprowadzano w 4°C. Na szalkę o średnicy 150 mm dodawano 1 ml buforu lizującego, na szalkę o średnicy 100 mm - 800 µl, a na szalkę o średnicy 60 mm - 400 µl. Następnie komórki odrywano od dna naczynia hodowlanego za pomocą skrobaczki, przenoszono do probówek typu Eppendorf i homogenizowano mechanicznie przy użyciu strzykawki z igłą (rozmiar 0,5 x 16 mm, Roth), przeciągając tłok strzykawki 20 razy. Otrzymany homogenat inkubowano przez 30 min w 4°C, po czym odwirowywano przy 10 000 x g przez 10 min w 4°C. Następnie oznaczano stężenie białka w otrzymanym supernatancie (określanym jako lizat białkowy) (Rozdział 3.6). Lizat zawieszano w buforze Laemmliego 5x stężonym (0,25 M Tris-HCl pH 6,8; 40% glicerol, 4% SDS, 4% β-merkaptanoetanol, 0,0125% błękit bromofenolowy) (Laemmli 1970) w stosunku objętościowym 4:1 i inkubowano przez 5 min w 100°C. Tak przygotowane próbki rozdzielano na żelach poliakryloamidowych metodą SDS-PAGE (do studzienek żelu nakładano 10 µg białka) (Rozdział 3.7) lub przechowywano do późniejszych analiz w -80°C.

#### **3.5.2. Otrzymywanie frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej z komórek PC12**

W celu uzyskania frakcji cytoplazmatycznej, jądrowej i jąderkowej komórki PC12 (CRL-1721) frakcjonowano zgodnie z protokołem Hacot (Hacot i in. 2010), stosując kilka modyfikacji (Rycina 3.2). Komórki hodowano na szalkach o średnicy 150

mm, płukano PBS i odklejono od dna szalki przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny z EDTA (Gibco), a następnie dodawano pożywkę z dodatkiem surowicy w celu inaktywacji trypsyny. Komórki zbierano i odwirowywano przy 200 x g przez 3 min w temperaturze pokojowej, po czym ponownie je płukano PBS. Osad komórek zawieszano w hipotonicznym buforze o składzie 10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, inkubowano na lodzie przez 15 min w celu wywołania szoku osmotycznego powodującego rozerwanie błony komórkowej. Zawiesinę komórek homogenizowano z wykorzystaniem schłodzonego na lodzie homogenizatora szklanego do tkanek typu Dounce'a. Następnie zawiesinę odwirowano przy 1200 x g przez 5 min w 4°C. Otrzymany supernatant stanowił frakcję białek cytoplazmatycznych, natomiast osad zawierał pozostałości komórek i jądra komórkowe, które oczyszczano przez wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy. Osad jąder komórkowych, zawieszano w buforze S1 (0,25 M sacharoza i 10 mM MgCl<sub>2</sub>), przenoszono do probówek wirówkowych zawierających bufor S2 (0,88 M sacharoza i 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) umieszczając osad jąder na powierzchni buforu S2 i odwirowano przy 1200 x g przez 5 min w 4°C. Supernatant odrzucano, a znajdujący się na dnie próbówki osad (stanowiący oczyszczoną frakcję jąder komórkowych) zawieszano w buforze S3 (0,35 M sacharoza i 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>). Frakcję jąderkową uzyskiwano poprzez sonikację oczyszczonej frakcji jąder komórkowych, którą prowadzono na lodzie z wykorzystaniem sonikatora S-250D (Branson Ultrasonic S.A.) z mikrokońcówką 1/8'' (3,2 mm) przy 30% mocy urządzenia w trzech cyklach/sekwencjach (10 s sonikacji i 10 s przerwy). Otrzymaną zawiesinę po sonikacji nakładano na powierzchnię buforu S2 (0,88 M sacharoza i 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) i odwirowano przy 2000 x g przez 20 min w 4°C. Supernatant zawierał frakcję nukleoplazmatyczną a osad frakcję jąderkową, którą zawieszono w buforze S2 (0,35 M sacharoza i 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) i przechowywano w - 80°C do czasu dalszej analizy.



**Rycina 3.2. Schemat otrzymywania frakcji cytoplazmatycznej, jądrowej i jąderkowej z komórek PC12.** Opis w tekście.

Z otrzymanych frakcji przygotowano próbki białkowe, które rozdzielano na żelach poliakrylamidowych metodą SDS-PAGE (Rozdział 3.7) i analizowano metodą Western Blot (Rozdział 3.8). Czystość poszczególnych frakcji (cytoplazmatycznej, jądrowej i jąderkowej) sprawdzano z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko GAPDH oraz fibrylarynie.

### **3.6. Oznaczanie stężenia białka w lizatach komórkowych metodą Bradforda**

Stężenie białka w lizatach i frakcjach komórkowych oznaczano metodą Bradforda (Bradford 1976) z wykorzystaniem odczynnika Protein Assay (BioRad) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Stężenie białka w badanych próbach wyznaczano względem krzywej wzorcowej opisującej zależność absorbancji od stężenia białka w roztworze. W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej stosowano roztwory BSA (ang. *bovine serum albumin*) o znanych stężeniach i mierzono absorbancję prób przy długości fali 595 nm w spektrofotometrze Beckman Du 640. Przy tej samej długości fali mierzono absorbancję prób właściwych, a stężenie białka odczytywano z krzywej wzorcowej.

### **3.7. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)**

Elektroforezę SDS-PAGE prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Laemmliego (Laemmli 1970) w 5% żelu zagęszczającym i 10% żelu rozdzielającym. Przed nanoszeniem próbek na żel, inkubowano je w 100°C przez 5 min. Elektroforezę prowadzono w aparacie Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad) w buforze zawierającym 25 mM Tris, 192 mM glicynę i 0,1% SDS. W trakcie migracji próbek w żelu zagęszczającym stosowano napięcie 80 V, a z chwilą osiągnięcia granicy żeli napięcie zwiększano do 120 V. Jako wzorzec mas cząsteczkowych białek stosowano PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™) lub Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo Scientific™). Następnie żełe wykorzystywano do immunodetekcji z użyciem metody Western Blot (Rozdział 3.8).

### **3.8. Immunodetekcja białek - metoda Western Blot**

Immunodetekcję białek po rozdziale elektroforetycznym prowadzono techniką Western Blot. Po zakończeniu elektroforezy żełe równoważono w buforze do transferu zawierającym 10% metanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicynę i 0,01% SDS. Błoneę nitrocelulozową (Immobilon-NC, Millipore) aktywowano w wodzie dejonizowanej, po czym równoważono w buforze do transferu. Transfer białek z żelu na błoneę nitrocelulozową o porach 0,45 µm (Bio-Rad) przeprowadzano w aparacie TE22 Mighty Small Transfer Tank (Hoeffer) przez 24 h w 4°C przy stałym natężeniu prądu 80 mA (Towbin i in. 1979) lub w aparacie Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) przy natężeniu prądu 80 mA przez 16 h lub przy natężeniu 350 mA przez 90 min. W przypadku analizy białek o masie <100 kDa transfer prowadzono w urządzeniu Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) przez 10 min przy natężeniu 1,5 A w temperaturze pokojowej. Błoneę nitrocelulozową barwiono roztworem Ponceau S (Sigma), dokumentowano, a następnie odbarwiano roztworem zawierającym TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,2% Triton X-100) przez 15 min zmieniając roztwór kilukrotnie. Błoneę po elektrotransferze blokowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku lub 5% albuminie (BSA, BioShop) w TBS-T przez 1 h w temperaturze pokojowej na kołyszce laboratoryjnej. Następnie błoneę inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi rozcieńczonymi w roztworze blokującym przez 1 h w temperaturze

pokojujowej (lub 16 h w 4°C), płukano 5x w TBS-T po 5 min, a następnie inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (HRP, Pierce) rozcieńczonymi w roztworze blokującym przez 1 h i płukano 5x w TBS-T po 5 min. Stosowane przeciwciała i ich rozcieńczenia wymieniono w Tabelach 3.3 i 3.4. Do wizualizacji białek stosowano detekcję chemiluminescencyjną - błonę inkubowano z roztworem substratów dla HRP - SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) lub Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, EMD (Millipore). Produkt reakcji chemiluminescencyjnej rejestrowano na kliszach fotograficznych (Fuji film, Carestream), a uzyskane obrazy analizowano z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ 1.52a (National Institutes of Health and University of Wisconsin).

**Tabela 3.3. Lista przeciwciał I-rzędowych oraz ich rozcieńczeń stosowanych w analizie metodą Western Blot (WB).**

antygen	pochozenie	rozcieńczenie	producent	nr katalogowy
β-aktyna	mysz	WB 1:2000	Sigma-Aldrich	A3854
B23	mysz	WB 1:250	Abcam	ab10530
Fibrylaryna	mysz	WB 1:1000	Thermo Fisher Scientific	MA3-16771
GAPDH	mysz	WB 1:5000	Millipore	MAB374
GRP78	królik	WB 1:1000	Abcam	ab21685
Lamina B	koza	WB 1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-6217
Miozyna VI	królik	WB 1:500	Proteus	25-6791
Nukleolina	mysz	WB 1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-8031
pS6	królik	WB 1:2000	Cell Signalling	4858
RPA194 (Pol I)	mysz	WB 1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-48385
S6	królik	WB 1:1000	Cell Signalling	2217
UBF	mysz	WB 1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-13125

**Tabela 3.4. Lista przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z HRP stosowanych w analizie metodą Western Blot (WB).**

przeciwciało	antygen	rozcieńczenie	producent	nr katalogowy
Przeciwciało z peroksydazą chrzanową z kozy	IgG myszy	WB 1:10 000	Millipore	AP308P
Przeciwciało z peroksydazą chrzanową z kozy	IgG królika	WB 1:10 000	Millipore	AP307P
Przeciwciało z peroksydazą chrzanową z osła	IgG kozy	WB 1:15 000	Santa Cruz Biotechnology	sc-2020

### 3.9. Metody barwień immunofluorescencyjnych

#### 3.9.1. Przygotowanie szkiełek nakrywkowych wykorzystywanych do barwień

Szkiełka nakrywkowe inkubowano przez 24 h w 99,8% etanolu, po czym przed umieszczeniem w szalkach do hodowli sterylizowano je w płomieniu palnika gazowego. Sterylne szkiełka nakrywkowe umieszczano w szalkach hodowlanych i powlekano roztworem PDL lub PLL w stężeniu 50 µg/ml przez 1 h, a następnie dwukrotnie płukano sterylnym PBS i pozostawiono do wyschnięcia przez co najmniej 1 h. Na tak przygotowane szkiełka wysiewano komórki.

#### 3.9.2. Barwienie immunofluorescencyjne komórek PC12

Lokalizację wybranych białek (MVI oraz białek jąderkowych) w komórkach PC12 (CRL-1721), *siRNA-MVI* oraz *scrambled* w warunkach kontrolnych i w stresie jąderkowym (Rozdział 3.3) określano dzięki zastosowaniu specyficznych przeciwciał (Tabela 3.5 i Tabela 3.6) i analizowano wykonując barwienia immunofluorescencyjne. Każdorazowo wykonano negatywną reakcję kontrolną z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałami I-rzędowymi. Procedurę, tam gdzie nie zaznaczono inaczej przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Komórki hodowano na szkiełkach nakrywkowych, następnie przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS (ogrzanym do 37°C) po czym utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA) w PBS przez 15 min. Utrwalone komórki płukano trzykrotnie roztworem PBS przez 5 min, inkubowano w roztworze NH<sub>4</sub>Cl przez 30 min w celu wygaszenia wolnych grup aldehydowych i ponownie trzykrotnie płukano PBS przez 5 min. Następnie komórki na szkiełkach inkubowano w 0,1% roztworze Triton X-100 w PBS przez 5 min w 4°C w celu permeabilizacji (uprzepuszczalniania) błon i ponownie trzykrotnie płukano PBS przez 5 min. W następnym etapie, komórki blokowano w 2% HS w PBS z dodatkiem 0,02% Triton X-100 (PBS-T) przez 1 h. Następnie komórki inkubowano z I-rzędowymi

przeciwciałami rozcieńczonymi w roztworze do blokowania przez 1 h w temperaturze pokojowej lub przez 16 h w 4°C. Komórki ponownie trzykrotnie płukano buforem PBS-T przez 5 min i inkubowano bez dostępu światła z przeciwciałami II-rzędowymi skoniugowanymi z fluorochromami przez 1 h. Wykaz przeciwciał stosowanych w barwieniach immunofluorescencyjnych przedstawiono w Tabeli 3.5 i 3.6. Do wybarwienia jąder komórkowych stosowano barwnik DAPI, zawarty w roztworze do zamykania preparatów. Po trzykrotnym odpłukaniu przeciwciał II-rzędowych PBS-T przez 5 min, szkiełka z komórkami przenoszono na szkiełka podstawowe i zatapiano w roztworze Vectashield z DAPI (Vector Labs), zapobiegającym wygaszaniu fluorochromów. Szkiełka pozostawiono do wyschnięcia i przechowywano bez dostępu światła w 4°C. Wyniki analizowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 SMD z obiektywem HC PL APO CS2 63x 1.4 Oil oraz oprogramowaniem Leica LAS AF Software lub Zeiss LSM 780 z obiektywem OilPlan Apochromat 63x/1.4 Oil DIC i oprogramowaniem ZEN Microscope Software (Pracownia Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN). W rozdziale Wyniki przedstawiono zdjęcia reprezentujące środkową warstwę komórek o grubości 0,3 µm lub zastosowano złożenie wszystkich obrazów wzdłuż osi Z, o czym informowano w opisie rycin.



**Tabela. 3.5. Lista przeciwciał I-rzędowych stosowanych do barwień immunofluorescencyjnych (IF).**

antygen	pochodzenie	rozcieńczenie	producent	nr katalogowy
B23	mysz	IF 1:50	Abcam	ab10530
Fibrylaryna	mysz	IF 1:500	Thermo Fisher Scientific	MA3-16771
GRP78	królik	IF 1:1000	Abcam	ab21685
Lamina B	koza	IF 1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-6217
Miozyna VI	królik	IF 1:50	Proteus	25-6791
Nukleolina	mysz	IF 1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-8031
pS6	królik	IF 1:200	Cell Signalling	4858
RPA194 (Pol I)	mysz	IF 1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-48385
S6	królik	IF 1:100	Cell Signalling	2217
UBF	mysz	IF 1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-13125

**Tabela 3.6. Lista przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z fluorochromami stosowanych do barwień immunofluorescencyjnych (IF).**

przeciwciało	antygen	rozcieńczenie	producent	nr katalogowy
Przeciwciało skoniugowane z AlexaFluor 488 z kozy	IgG królika	IF 1:500	Invitrogen	A11008
Przeciwciało skoniugowane z AlexaFluor 488 z kozy	IgG myszy	IF 1:500	Invitrogen	ab150113
Przeciwciało skoniugowane z AlexaFluor 546 z kozy	IgG królika	IF 1:500	Invitrogen	A11010
Przeciwciało skoniugowane z AlexaFluor 546 z kozy	IgG myszy	IF 1:500	Invitrogen	A11003
Przeciwciało skoniugowane z AlexaFluor 555 z kozy	IgG myszy	IF 1:500	Invitrogen	A21422
Przeciwciało skoniugowane z AlexaFluor 555 z kozy	IgG kozy	IF 1:500	Invitrogen	A21432

### 3.9.3. Wizualizacja retikulum endoplazmatycznego (ER)

Retikulum endoplazmatyczne, ER, wizualizowano poprzez przyżyciowe barwienie komórek PC12 (*siRNA-MVI*, *scrambled*) selektywnym barwnikiem ER Tracker™ Blue/White DPX (ThermoFisher Scientific). Barwienie wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Komórki *siRNA-MVI* oraz *scrambled* wysiewano na szkiełka

nakrywkowe i hodowano przez 24 h, po czym dwukrotnie płukano PBS. Następnie komórki inkubowano z barwnikiem ER tracker rozcieńczonym do stężenia 1  $\mu\text{M}$  w podłożu do hodowli komórek (F12K, 2,5% FBS, 15% HS) przez 30 min w 37°C. Wybarwione komórki utrwalano w 4% roztworze PFA w PBS przez 10 min, płukano PBS i zatapiano w roztworze Vectashield bez DAPI (Vector Labs), zapobiegającym wygaszaniu fluorochromów, a następnie przechowywano w 4°C bez dostępu światła. Preparaty analizowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780 z obiektywem OilPlan Aplanachromat 63x/1.4 Oil DIC i oprogramowania ZEN Microscope Software.

### **3.10. Metody z zastosowaniem DNA**

#### **3.10.1. Hodowla bakterii**

Do doświadczeń użyto dwóch różnych szczepów bakteryjnych *Escherichia coli* (*E. coli*): TOP10F (Invitrogen) do namnażania i izolacji plazmidów ekspresyjnych oraz BL21(DE3)pLys (Novagen) do produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek. Do hodowli bakterii stosowano podłoże płynne *Luria-Bertani* Broth (LB) o składzie 2% pepton/trypton, 0,5% NaCl, 0,5% ekstrakt drożdżowy, pH 7,4 (Roth) oraz podłoże stałe zawierające LB w 1,5% agarze (Roth). Podłoże LB przed użyciem sterylizowano przez autoklawowanie w 121°C, a następnie schładzano do temperatury poniżej 50°C, po czym dodawano odpowiedni antybiotyk selekcyjny. Jako czynnik selekcyjny, w zależności od genu oporności na plazmidzie, stosowano antybiotyki: ampicylinę (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma) lub kanamycynę (50  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma).

#### **3.10.2. Przygotowanie bakterii kompetentnych**

W celu uzyskania bakterii kompetentnych poszczególnego szczepu, 5 ml płynnej pożywki LB bez antybiotyku zaszczipiano pojedynczą kolonią bakterii *E.coli* i hodowano przez 16 h w 37°C z wytrząsaniem przy 220 obr./min (z wykorzystaniem wytrząsarki do hodowli bakteryjnych Innova42 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific). Następnie 1 ml hodowli przenoszono do 100 ml podłoża LB bez antybiotyku. Hodowlę kontynuowano z wytrząsaniem, aż do osiągnięcia zawiesiny bakterii o gęstości optycznej  $\text{OD}_{600} = 0,4-0,5$ . Hodowlę schładzano w 4°C przez 15 min, po czym odwirowywano przy 1600 x g przez 15 min w 4°C. Osad bakterii delikatnie zawieszano w 10 ml zimnego (0°C), sterylnego roztworu  $\text{CaCl}_2$  (60 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15% glicerol, 10 mM

PIPES, pH 7,0) i inkubowano przez 30 min w 4°C. Zawiesinę bakterii ponownie odwirowywano przy 1100 x g w 4°C przez 10 min, a uzyskany osad zawieszano w 10 ml sterylnego, zimnego roztworu CaCl<sub>2</sub> i inkubowano przez 10 min w 4°C. Zawiesinę bakterii raz jeszcze odwirowywano przy 1100 x g, osad zawieszano w 2 ml zimnego roztworu CaCl<sub>2</sub>. Tak przygotowaną zawiesinę bakterii kompetentnych rozdzielano po 100 µl do sterylnych probówek, a następnie przechowywano w -70°C.

### **3.10.3. Transformacja bakterii kompetentnych**

W celu produkcji rekombinowanych białek stosowano bakterie kompetentne *E.coli* BL21 (DE3) pLys, do których wprowadzano plazmidowe DNA (transformacja). W celu transformacji bakterii wykorzystywano metodę szoku cieplnego. Do 100 µl zawiesiny bakterii kompetentnych pozostających w lodzie dodawano 50-100 ng DNA plazmidowego, mieszano i inkubowano na lodzie przez 25 min. Następnie zawiesinę bakterii z DNA umieszczano w łaźni wodnej o 42°C (szok cieplny) na 2 min, po czym probówkę przenoszono ponownie do lodu na 2 min. Do mieszaniny transformacyjnej dodawano 1 ml sterylnego płynnego podłoża LB bez antybiotyku ogrzanego do 37°C i inkubowano z wytrząsaniem (160 obr./min) przez 1 h w 37°C. Następnie bakterie odwirowywano (1600 x g) przez 2 min w temperaturze pokojowej. Uzyskany osad zawieszano w 25 µl supernatantu i wysiewano przy pomocy głaszczki na podłoże stałe (LB z agarem) z odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym (zawiesinę bakterii rozprowadzano po powierzchni szalki). Stransformowane bakterie hodowano przez 16 h w 37°C, po czym oceniano kolonie bakteryjne wyrosłe na szalce.

### **3.10.4. Przechowywanie bakterii**

W celu przechowywania bakterii po transformacji do późniejszych badań sporządzano "stoki" glicerynowe. Do bakterii w fazie logarytmicznego wzrostu dodawano płynne podłoże LB z odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym oraz 10% glicerol (sterylny). "Stoki" przechowywano w -70°C.

## **3.11. Otrzymywanie rekombinowanych białek**

### **3.11.1. Ekspresja konstruktów kodujących rekombinowane białka w bakteriach**

#### *E.coli*

W celu uzyskania rekombinowanych białek: C-końcowej domeny globularnej MVI w fuzji z GST oraz GST, wykorzystywano odpowiednio plazmidy: pGEX-GST-

GD\_MVI oraz pGEX-4T1. Plazmidy te kodują odpowiednio, sekwencję C-końcowej domeny globularnej MVI szczura z metką GST oraz samo GST (Tabela 3.7). Plazmidy te posiadają promotor *lac* indukowany IPTG oraz gen oporności na ampicylinę. Bakterie kompetentne *E. coli* szczepu BL21(DE3) pLys transformowano plazmidami pGEX-GST-GD\_MVI i pGEX-4T1 (Rozdział 3.10.3) i wysiewano na szalki z ampicyliną. Po 16 h, do 100 ml płynnego podłoża LB z dodatkiem ampicyliny [antybiotyku selekcyjnego - ampicyliny (50 µg/ml)] przenoszono z szalki jedną kolonię bakteryjną i prowadzono hodowlę przez 16 h w 37°C z wytrząsaniem 220 obr./min (wytrząsarka do hodowli bakteryjnych Innova 42 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific). Po tym czasie hodowlę rozcieńczano świeżą pożywką LB z antybiotykiem w stosunku 1:20 i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem aż do uzyskania gęstości optycznej OD<sub>600</sub>= 0,5. Nadprodukcję białka indukowano przez dodanie IPTG (Roth) do końcowego stężenia 0,5 mM. Hodowlę w tych warunkach prowadzono w temperaturze 25°C z wytrząsaniem przez kolejne 3 h. Następnie bakterie odwirowano przy 4300 x g przez 25 min w 4°C, a uzyskany osad bakteryjny zamrażano w -20°C.

**Tabela. 3.7. Plazmidy stosowane do nadprodukcji GST oraz domeny globularnej MVI w fuzji z GST.**

<b>nazwa</b>	<b>opis</b>
<b>pGEX-4T1</b>	plazmid ekspresyjny umożliwiający nadprodukcję w bakteriach białka lub ich fragmentów w fuzji z GST pod kontrolą indukowalnego promotora <i>lac</i> przez IPTG; zawiera gen oporności na ampicylinę (GE Healthcare, nr katalogowy 28-9545-49)
<b>pGEX-GST-GD_MVI</b>	plazmid pGEX-4T1 z wklonowanym fragmentem sekwencji kodującej C-końcową globularną domenę MVI szczura (3302-3985 pz) (przygotowany w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych przez dr. Ł. Majewskiego)

### **3.11.2. Oczyszczanie rekombinowanej C-końcowej domeny globularnej MVI z bakterii *E.coli***

Osady bakterii przechowywane w -20°C rozmrażano na lodzie, zawieszano w buforze lizującym (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich) i poddawano lizie przy użyciu prasy Frencha (Thermo Spectronic), pod ciśnieniem hydrostatycznym 13 barów. Lizat bakterii odwirowano przy 40000 x g przez 30 min w 4°C, a uzyskany supernatant inkubowano ze złożem Glutathione Sepharose™4B (Amersham Biosciences) przez 3 h na kołysce laboratoryjnej w 4°C. Złoże przed użyciem

przeplukano trzykrotnie buforem do lizy z dodatkiem 1% Triton X-100 i odwirowano przy 5000 obr./min przez 2 min w 4°C. W kolejnym etapie złoże odwirowano przez 10 min przy 4500 x g w 4°C celem usunięcia niezwiązanych z nim białek. Następnie złoże płukano sześciokrotnie buforem do lizy z dodatkiem 1% Triton-X-100, a uzyskane rekombinowane białko związane ze złożem stosowano w doświadczeniach przeprowadzonych z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa typu *pull down* (Rozdział 3.12.2).

## 3.12. Metody badania oddziaływań białek

### 3.12.1. Metoda zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA

Barwienia preparatów mikroskopowych metodą ligacji zbliżeniowej *in situ*, PLA (ang. *Proximity ligation assay*) prowadzono z użyciem zestawu Duolink In situ PLA Technology (Olink Bioscience, Sigma-Aldrich) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. W skład zestawu wchodziły bufony, odczynniki oraz przeciwciała II-rzędowe. Komórki PC12 (CRL-1721) hodowano na szkiełkach hodowlanych Lab-Tek II (Nunc), uprzednio pokrywanych roztworem PDL. 24 h po wysianiu komórki przepłukiwano PBS (4°C), a następnie utrwalano przez 15 min w 4% roztworze PFA w PBS w temperaturze pokojowej. Utrwalone komórki płukano trzykrotnie po 5 min roztworem PBS, inkubowano przez 30 min w roztworze NH<sub>4</sub>Cl w celu wygaszenia wolnych grup aldehydowych i ponownie płukano trzykrotnie po 5 min PBS. Następnie komórki permeabilizowano przez dodanie 0,1% Triton X-100 w PBS przez 5 min w 4°C i ponownie trzykrotnie płukano po 5 min PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20. W następnym etapie komórki inkubowano przez 1 h w roztworze blokującym (*Blocking solution*). Od etapu blokowania wszystkie mieszaniny reakcyjne nanoszono na szkiełka w objętości 40 µl, a inkubacje prowadzono w wilgotnej komorze bez dostępu światła w 37°C. Następnie preparaty komórek inkubowano przez 24 h z mieszaniną I-rzędowych przeciwciał króliczego i mysiego skierowanych przeciwko odpowiednim białkom (Tabela 3.8) rozcieńczonych w roztworze do blokowania (*Antibody diluent*). Komórki płukano dwukrotnie po 5 min buforem A (*Wash buffer*) zawierającym 0,01 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20 i inkubowano przez 1 h z mieszaniną II-rzędowych przeciwciał rozcieńczonych 1:5 w roztworze *Antibody diluent*. Przeciwciała II-rzędowe znakowane są odpowiednimi oligonukleotydami (PLA probe *anti-rabbit* PLUS i PLA probe *anti-mouse* MINUS) (Tabela 3.9).

**Tabela 3.8. Lista przeciwciał I-rzędowych oraz ich rozcieńczeń stosowanych w metodzie PLA.**

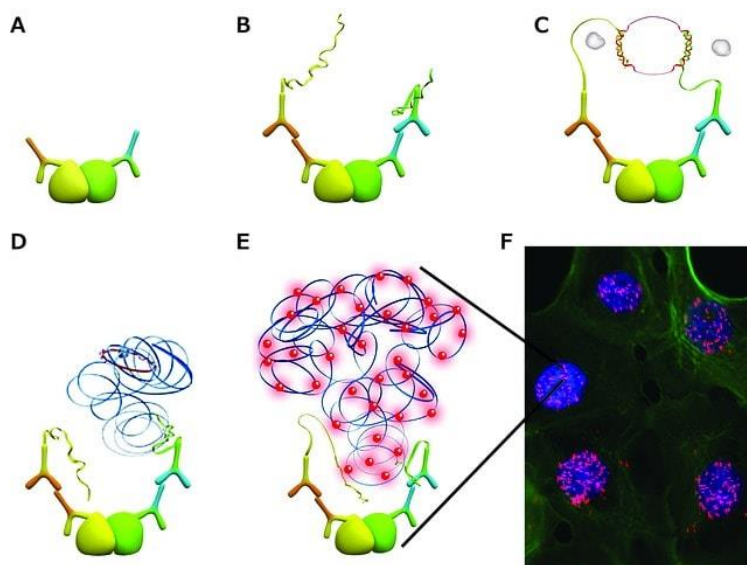
antygen	pochozenie	rozcieńczenie	producent	nr katalogowy
β-aktyna	mysz	PLA (1:1000)	Sigma-Aldrich	A3854
B23	mysz	PLA (1:400)	Abcam	ab10530
Fibrylaryna	mysz	PLA (1:100)	Thermo Fisher Scientific	MA3-16771
GRP78	królik	PLA (1:100)	Abcam	ab21685
Miozyna VI	królik	PLA (1:50)	Proteus	25-6791
Nukleolina	mysz	PLA (1:50)	Santa Cruz Biotechnology	sc-8031
pS6	królik	PLA (1:100)	Cell Signalling	4858
RPA194 (Pol I)	mysz	PLA (1:50)	Santa Cruz Biotechnology	sc-48385
S6	królik	PLA ( 1:100)	Cell Signalling	2217
UBF	mysz	PLA (1:50)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13125

**Tabela 3.9. Lista przeciwciał II-rzędowych stosowanych w metodzie PLA.**

przeciwciało	antygen	rozcieńczenie	producent	nr katalogowy
IgG myszy	PLA anti-mouse MINUS	1:300	Sigma-Aldrich	DUO 92004
IgG królika	PLA anti-rabbit PLUS	1:300	Sigma-Aldrich	DUO 92002

Po inkubacji z przeciwciałami II-rzędowymi i ponownym dwukrotnym przepłukaniu buforem A (*Wash buffer A*) na preparaty nanoszono mieszaninę ligacyjną (1 μl ligazy + 39 μl *ligation stock*) (roztwór ligazy *Ligase solution* rozcieńczony 40x w H<sub>2</sub>O), inkubowano przez 30 min, po czym dwukrotnie przepłukano buforem A (*Wash buffer A*). W kolejnym etapie, w celu uwidocznienia sygnału PLA, komórki inkubowano przez 100 min w roztworze *Amplification solution*, zawierającym polimerazę DNA, mieszaninę wolnych nukleotydów oraz fluorescencyjnie wyznakowane oligonukleotydy po czym dwukrotnie przepłukiwano buforem B (*Wash Buffer B*) przez 10 min (0,2 M Tris, 0,1 M NaCl) i jednokrotnym samym buforem rozcieńczonym 100 razy przez 1 min. Po zakończeniu procedury, preparaty pozostawiano do wyschnięcia, po czym zamykano je w roztworze zapobiegającym wygaszaniu fluorochromów (*Duolink In situ Mounting Medium*) z DAPI i przechowywano w -20°C bez dostępu światła. Kontrolą negatywną testu PLA były komórki traktowane jak wyżej, do których nie dodano przeciwciał pierwszorzędowych. W kontroli pozytywnej użyto dwóch przeciwciał

skierowanych przeciwko białkom, o których wiadomo, że oddziałują ze sobą (w tym przypadku MVI i  $\beta$ -aktyna). Produkt reakcji PLA (czerwone punkty) świadczący o bliskim sąsiedztwie badanych białek w komórkach (<40 nm) analizowano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 780 z obiektywem OilPlan Aplanachromat 63x/1.4 Oil DIC i oprogramowaniem Zen Microscope Software. Schemat reakcji PLA przedstawiono na Rycinie 3.3.



**Rycina 3.3. Schemat reakcji Duolink PLA** (A) Inkubacja ze specyficznymi przeciwciałami I-rzędowymi wyprodukowanymi w dwóch różnych gatunkach. (B) Dodanie II-rzędowych przeciwciał, tzw. sond PLA, sprzężonych z odpowiednimi oligonukleotydami (PLA probe PLUS i PLA probe MINUS). (C) Hybrydyzacja dwóch oligonukleotydów (connector oligos) z PLA probe PLUS i PLA probe MINUS i ligacja. (D) Amplifikacja DNA. (E) Hybrydyzacja fluorescencyjnie znakowanych komplementarnych oligonukleotydów z namnożonym DNA. (F) Wizualizacja sygnałów PLA.

<https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/duo92202>.

### 3.12.2. Chromatografia powinowactwa typu *pull down*

W celu identyfikacji białek potencjalnie oddziałujących z MVI w komórkach PC12 (CRL-1721) zastosowano technikę chromatografii powinowactwa typu *pull down*, z wykorzystaniem rekombinowanej C-końcowej domeny globularnej MVI w fuzji z GST (GST-MVI-GD) (Rozdział 3.11.1). W doświadczeniu użyto złoża Glutathione Sepharose™4B, z którym silnie wiąże się GST (Rozdział 3.11.2).

W celu przygotowania lizatów przeznaczonych do chromatografii powinowactwa typu *pull down* komórki PC12 hodowano na szalkach o średnicy 150 mm. Po 24 h komórki płukano PBS, zawieszano w schłodzonym (na lodzie) buforze lizującym o składzie 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM DTT, 2 mM EGTA, 50mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, mieszanina inhibitorów proteaz (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) i fosfataz (PhosSTOP™, Roche) i zbierano za pomocą skrobaczki. Zawiesinę komórek przenoszono do probówek, homogenizowano za pomocą strzykawki z igłą o rozmiarze 0,5 x 16 mm (Roth), a

następnie inkubowano przez 30 min w 4°C. Otrzymany homogenat odwirowano przy 10 000 x g przez 20 min w 4°C (Rozdział 3.5.1). Z supernatantu zebrano frakcję wyjściową (1/100 obj.), a pozostałą jego część inkubowano przez 2 h ze złożem: Glutathione Sepharose™4B oraz Glutathione Sepharose™4B ze związanym GST w stosunku objętościowym 2:1 w celu usunięcia białek wiążących się niespecyficznie ze złożem i/lub samym GST. Następnie próbkę odwirowano przy 5000 x g przez 10 min w 4°C. Otrzymany supernatant podzielono na dwie równe części i наносzono na złożo Glutathione Sepharose™4B ze związanym wcześniej białkiem GST-MVI-GD lub samym GST (jako próbę kontrolną). Mieszaniny inkubowano przez 4 h na rotorze kołowym, po czym złoża odwirowano 5000 x g przez 10 min. Frakcję niezwiązaną odrzucano, złoża płukano pięciokrotnie sześciokrotną objętością buforu lizującego zawierającego 0,5% Triton X-100, po czym zawieszano w 50 µl buforu Laemmliego (Rozdział 3.5.1) i inkubowano przez 5 min w 100°C. Tak przygotowane próbki rozdzielano w 10% żelu poliakrylamidowym metodą SDS-PAGE (Rozdział 3.7). Obecność badanych białek we frakcji wyjściowej i związanej ze złożem analizowano metodą Western Blot (Rozdział 3.8).

### 3.12.3. Koimmunoprecypitacja białek na złożu Protein A/G agarose

W celu przygotowania lizatów białkowych do koimmunoprecypitacji, komórki PC12 (CRL-1721) hodowano przez 24 h na szalkach o średnicy 150 mm, po czym płukano je PBS, zawieszano w zimnym (trzymanym na lodzie) buforze do immunoprecypitacji, IP o składzie 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0,1% Triton X-100, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MgATP, 50mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> z dodatkiem inhibitorów proteaz (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) i fosfataz (PhosSTOP™, Roche) i zbierano za pomocą skrobaczki. Zawiesinę komórek przenoszono do probówek, homogenizowano za pomocą strzykawki z igłą o rozmiarze 0,5 x 16 mm (Roth), a następnie inkubowano przez 30 min. Otrzymany homogenat odwirowano przy 10 000 x g przez 20 min w 4°C, a uzyskany supernatant (lizat białkowy) inkubowano ze złożem agarozowym ze związanym białkiem A/G (Protein A/G agarose, Santa Cruz Biotechnology) uprzednio zrównoważonym buforem do IP. Lizat wraz ze złożem inkubowano przez 2 h w 4°C na rotorze kołowym, a następnie odwirowano przez 3 min przy 1000 x g w 4°C (*pre-clearing*). Do tak wstępnie oczyszczonego supernatantu dodawano 10 µg przeciwciała skierowanego przeciw MVI i inkubowano przez 4 h w 4°C



na rotorze kołowym. Jednocześnie przygotowano próbę kontrolną zawierającą frakcję immunoglobulin IgG z surowicy pochodzenia króliczego (NS, ang. *non immune serum*, próba nie zawierała przeciwciała). Następnie do mieszanin dodano po 100  $\mu$ l złoża Protein A/G agarose i pozostawiono na rotorze kołowym przez 12 h w 4°C. Po tym czasie mieszaniny odwirowano przez 1 min przy 2000 x g w 4°C, a z supernatantów pobierano frakcję białek niezwiązanych. Następnie złoża płukano pięciokrotnie stosując za każdym razem 1 ml buforu IP po czym zawieszano w 50  $\mu$ l buforu Laemmliego (elucja białka) i inkubowano przez 5 min w 100°C. Obecność kompleksów białkowych we frakcjach związanych ze złożem analizowano w żelu poliakryloamidowym SDS-PAGE (Rozdział 3.7) oraz metodą Western Blot (Rozdział 3.8).

### **3.13. Transmisyjna mikroskopia elektronowa**

#### **3.13.1. Analiza ultrastruktury komórek PC12**

Komórki PC12 hodowano na szkiełkach Thermanox™ coverslips pokrytych PLL (Electron Microscopy Sciences) w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 10% HS, 5% FBS i 1% mieszaniny antybiotyków (CRL-1721) lub podłożu F12K z dodatkiem 2,5% FBS, 15% HS i 1% mieszaniny antybiotyków (*siRNA-MVI* oraz *scrambled*) (Rozdział 3.1). Komórki trzykrotnie płukano po 30 s w PBS i utrwalano w 2% roztworze glutaraldehydu (GA) w PBS przez 2 h w temperaturze pokojowej. Utrwalone komórki płukano trzykrotnie po 10 min w PBS, po czym powtórnie utrwalano w 1% czterotlenku osmu (OsO<sub>4</sub>) przez 30 min w temperaturze pokojowej (OsO<sub>4</sub> nie tylko utrwała, ale też nadaje kontrast błonom lipidowym). Preparaty następnie płukano dwukrotnie po 10 min w PBS i dwukrotnie po 5 min w wodzie dejonizowanej, po czym odwadniano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu w tzw. szeregu odwadniającym, począwszy od alkoholu 50%, poprzez 70%, 80%, 90%, 96% (5 min w każdym) i bezwodny (absolutny 99,8%) - dwukrotnie po 15 min i zatapiano w żywicy Spurr (Sigma-Aldrich) wg standardowego protokołu. Zatopione w żywicy preparaty skrawano na ultracienkie skrawki o grubości 60 -70 nm przy użyciu noża diamentowego (Micro Star Technologies) i ultramikrotomu Leica UTC, po czym zbierano je na pokryte formwarem miedziane siatki mikroskopowe (Electron Microscopy Sciences). Preparaty kontrastowano 2,5% roztworem octanu uranylu i 0,4% cytrynianu ołowiu, a następnie obrazowano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego Joel EM 100. Procedurę tę prowadzono we współpracy z dr

hab. Martą Lenartowską z Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

### **3.13.2. Znakowanie techniką immunogold**

Komórki PC12 do badań immunocytochemicznych hodowano na szkiełkach Thermanox™ coverslips pokrytych PLL (Electron Microscopy Sciences) w podłożu RPMI-1640 z dodatkiem 10% HS, 5% FBS i 1% mieszaniny antybiotyków (CRL-1721) lub podłożu F12K z dodatkiem 2,5% FBS, 10% HS i 1% mieszaniny antybiotyków (Rozdział 3.1). Komórki płukano trzykrotnie po 30 s w PBS i utrwalano w 4% roztworze formaldehydu (FA) i 0,25% GA w PBS przez 24 h w 4°C (stężenie GA pozwala na obserwację ultrastruktury przy zachowaniu antygenowości epitopów). Utrwalone komórki płukano trzykrotnie po 10 min w PBS i dwukrotnie po 5 min w wodzie dejonizowanej. Następnie preparaty odwadniano w szeregu wzrastających stężeń etanolu (Rozdział 3.13.1), po czym preparaty zatapiano w żywicy LR Gold/LR White resin (Electron Microscopy Sciences) wg standardowego protokołu. Zatopione w żywicy preparaty skrawano na ultracienkie skrawki przy użyciu noża diamentowego (Micro Star Technologies) i ultramikrotomu Leica UTC, po czym zbierano je na niklowe siatki mikroskopowe (Electron Microscopy Sciences). Do znakowania techniką immunogold wykorzystywano zebrane na pokrytych formwarem siatkach niklowych ultracienkie skrawki, które inkubowano w roztworze 50 mM glicyny w PBS przez 10 min (blokowanie wolnych grup aldehydowych), po czym inkubowano w roztworze blokującym, zawierającym 3% roztwór albuminy surowicy bydlęcej BSA w PBS przez 5 min w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym (anty-MVI) rozcieńczonym 1:50 w 0,3% BSA w PBS przez 2 h w temperaturze pokojowej, płukano trzykrotnie po 5 min PBS, po czym inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym ze złotem koloidalnym o średnicy cząstek złota 15 nm (anty-rabbit IgG 15 nm secondary antibody, BB International) rozcieńczonym w 0,1% BSA w PBS przez 2 h w temperaturze pokojowej. W kontroli negatywnej pominięto przeciwciała I-rzędowe. Preparaty kontrastowano 2,5% octanem uranylu i obrazowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego Joel EM 100. Procedurę tę prowadzono we współpracy z dr hab. Martą Lenartowską z Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

### **3.14. Analiza statystyczna**

Wyniki przedstawiano w postaci średniej arytmetycznej ze wszystkich wartości otrzymanych dla danego wariantu doświadczenia, z odchyleniem standardowym. Istotność statystyczną uzyskanych wyników określano z wykorzystaniem testu t-Studenta (przedziały istotności oznaczono: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ). Do analizy wyników wykorzystano programy: Microsoft Excel, Power Point, ImageJ oraz Zeiss Zen.

## **4. WYNIKI**

## 4.1. Wprowadzenie

W niniejszej pracy, wykorzystując komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy szczura PC12, badano lokalizację i biologiczną rolę MVI w jądrze komórkowym, a dokładniej w jej największej strukturze, jakim jest jąderko. Do poszukiwań roli MVI w tej nieobłonionej strukturze jądra skłoniły mnie wyniki wcześniejszych badań prowadzonych w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, które wskazywały na możliwy udział tego unikalnego motoru molekularnego w jądrku.

Ponieważ MVI wypełnia swoją rolę poprzez oddziaływanie ze specyficznymi dla niej partnerami, dr Łukasz Majewski, były doktorant w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych, podjął próbę identyfikacji nowych, potencjalnych ligandów MVI z wykorzystaniem metody spektrometrii mas. Wynikiem tej analizy były sekwencje peptydów reprezentujących sekwencje białek charakterystycznych dla jądra komórkowego, jąderka oraz rybosomów/ER. Listę nowych, potencjalnych, jądrowych partnerów MVI zamieszczono w Tabeli 4.1 (Majewski i in. 2018). Wśród zidentyfikowanych białek znalazła się nukleolina - białko charakterystyczne dla jąderka oraz białka rybosomalne małej 40S (S6, S4, S3) i dużej 60S (L7) podjednostki rybosomu. Z uwagi na brak danych potwierdzających obecność MVI w jądrku oraz wysoką wartość *Mascot score* (wartość parametru programu Mascot przy  $p < 0,05$  dla nukleoliny - 308 oraz dla S6 - 318) rozpoczęłam badania od scharakteryzowania oddziaływania MVI z nukleoliną oraz MVI z białkiem S6.

**Tabela 4.1. Lista białek potencjalnie oddziałujących z MVI w komórkach PC12 zidentyfikowanych metodą spektrometrii mas.**

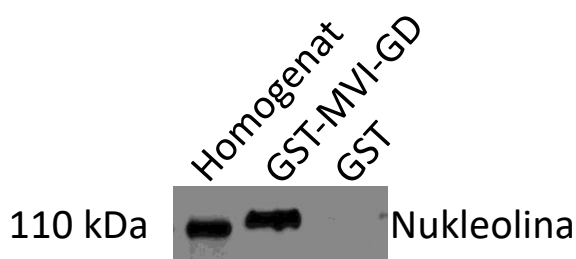
Identyfikator białka w bazie danych	Nowe białka potencjalnie oddziałujące z MVI zidentyfikowane metodą spektrometrii mas	Gen
<b>Funkcje jądrowe</b>		
gi 41056215	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells	<i>XRCC5</i>
gi 149060668	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 3 (predicted), isoform CRA_a	<i>LRCH3</i>
gi 18181882	G22p1 – ATP-dependent DNA helicase activity	<i>G22P1</i>
gi 197927118	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1	<i>LRCH1</i>
gi 149065924	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a	<i>DDX17</i>
gi 149016333	nucleolin, isoform CRA_d	<i>NCL</i>
gi 157819755	hypothetical protein LOC364073	<i>DDX3Y</i>
gi 157823027	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	<i>DDX3X</i>
gi 624918	SP120 /heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	<i>HNRNPU</i>
gi 109504268	similar to Werner syndrome ATP dependent helicase homolog	<i>PREDICTED WRN</i>
gi 149023880	family rCG31475, isoform CRA_c	<i>PABP</i>
gi 56090441	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	<i>DDX5</i>
gi 13384620	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	<i>HNRNPK</i>
gi 204595	histone (H1d)	<i>HIST1H1D</i>
gi 114145419	replication protein A1	<i>RPA1</i>
gi 158186696	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M isoform b	<i>HNRNPM</i>
<b>Funkcje w rybosomach/ER</b>		
gi 4506725	ribosomal protein S4, X-linked X isoform	<i>RPS4X</i>
gi 6677809	ribosomal protein S6	<i>RPS6</i>
gi 19705459	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	<i>PABPC1</i>
gi 129731	RecName: Full = Protein disulfide-isomerase; Short = PDI	<i>P4HB</i>
gi 11693176	acidic ribosomal phosphoprotein P0	<i>RPLP0</i>
gi 4506661	ribosomal protein L7a	<i>RPL7A</i>
gi 8394221	ribosomal protein S3a	<i>RPS3A</i>
gi 206736	ribosomal protein L7	<i>RPL7</i>
gi 2920825	ribosomal protein S2	<i>RPS2</i>
gi 114145636	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA	<i>SYNCRIP</i>
gi 6755372	ribosomal protein S3 95 4	<i>RPS3</i>

gi- identyfikator białka w bazie GenBank. Na szaro, wykryte białka, które analizowałam w niniejszej rozprawie.

## 4.2. Oddziaływanie MVI z nukleoliną

W celu potwierdzenia, czy nukleolina rzeczywiście tworzy kompleks białkowy z MVI, zastosowałam metodę chromatografii powinowactwa typu *pull down* na złożu

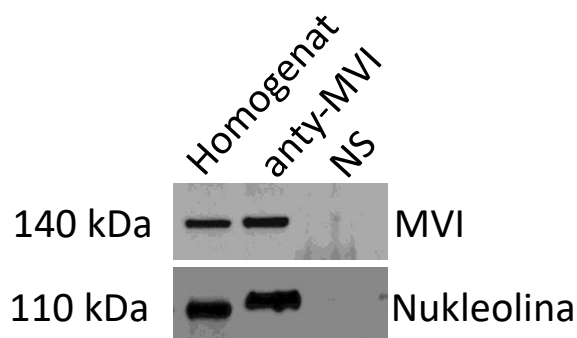
Glutathione-Sepharose™4B z wykorzystaniem rekombinowanej domeny globularnej pałeczki MVI w fuzji z GST (GST-MVI-GD). Na złożę zawierające związane z glutationem białko fuzyjne GST-MVI-GD (lub GST jako kontrola) naniósłm lizat białkowy z komórek PC12. Frakcje eluowane ze złoża zawierające białka związane z GST-MVI-GD lub związane z GST analizowałam metodą Western Blot z zastosowaniem przeciwciała przeciwko nukleolinie. Jak widać na Rycinie 4.1, prążek odpowiadający nukleolinie zidentyfikowałam jedynie we frakcji eluowanej ze złoża, do którego związane GST-MVI-GD. Nie wykryłam go natomiast we frakcji eluowanej ze złoża, do którego dołączono samo GST (kontrola).



**Rycina 4.1. Chromatografia powinowactwa typu pull down na złożu Glutathione Sepharose ze związanym GST-MVI.** Homogenat, lizat komórek PC12 przed nałożeniem na złożę Glutathione Sepharose; GST-MVI-GD, frakcja eluowana ze złoża Glutathione Sepharose, ze związanym białkiem fuzyjnym GST-MVI-GD, na które naniesiono lizat białkowy komórek PC12; GST, frakcja eluowana ze złoża Glutathione Sepharose ze związanym GST, na które naniesiono lizat białkowy komórek PC12 (kontrola). Western Blot po inkubacji błony nitrocelulozowej z przeciwciałem anti-nukleolina.

Potwierdziłam zatem możliwość oddziaływania MVI z nukleoliną, białkiem zlokalizowanym głównie w jąderku, której główną funkcją jest udział w metabolizmie rRNA od etapu transkrypcji rDNA po formowanie podjednostek rybosomów.

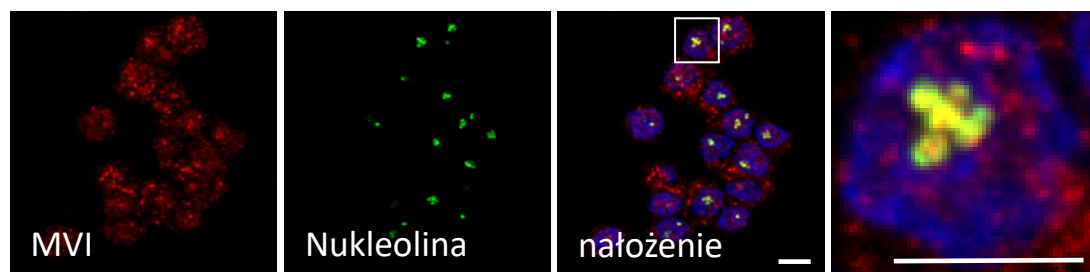
Aby dodatkowo potwierdzić możliwość oddziaływania MVI z nukleoliną, zastosowałam metodę koimmunoprecypitacji (Co-IP) z użyciem złoża Protein A/G-Sepharose. Do złoża przyłączyłam przeciwciało przeciwko MVI (próba badana), a następnie inkubowałam je z homogenatem komórek PC12, intensywnie płukałam i poddałam analizie Western Blot, w której wykorzystałam przeciwciało specyficznie rozpoznające nukleolinę. Próbę kontrolną stanowiło złożę Protein A/G-Sepharose, które inkubowałam z nieimmunizowaną surowicą szczura NS (ang. *non-immune serum*) (Rycina 4.2).



**Rycina 4.2. Koimmunoprecypitacja (Co-IP) nukleoliny z MVI w lizatach komórek PC12 na złożu Protein A/G-Sepharose.** Do złoża Protein A/G-Sepharose dodano przeciwciało przeciwko MVI (anty-MVI, próba badana) lub nieimmunizowaną surowicą szczura NS (próba kontrolna), a następnie inkubowano z homogenatem komórek PC12 i analizowano metodą Western Blot. Nukleolina utworzyła kompleks z MVI, „wychwyconą” za pomocą przeciwciała anti-MVI.

Jak widać na Rycinie 4.2, w eluacie uzyskanym ze złoża ze związanym przeciwciałem przeciwko MVI zidentyfikowałam prążek odpowiadający nukleolinie. Prążka takiego nie wykryłam w próbie uzyskanej ze złoża bez przeciwciała przeciwko MVI (NS). Powyższe obserwacje mogą wskazywać na interakcje MVI z nukleoliną.

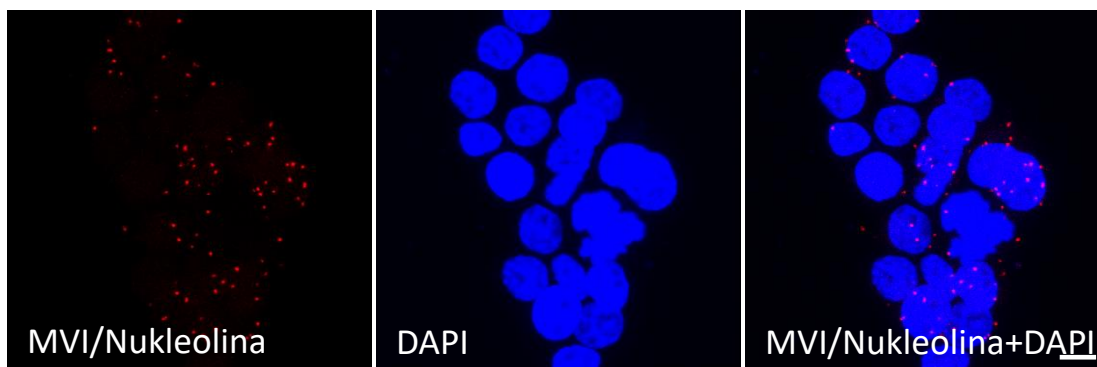
Aby zobrazować oddziaływanie MVI z nukleoliną w komórce, wykonałam barwienie immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciała przeciwko MVI oraz przeciwciała przeciwko nukleolinie (Rycina 4.3).



**Rycina 4.3. Współwystępowanie MVI oraz nukleoliny, znacznika jąderka w komórkach PC12.** Barwienie immunofluorescencyjne komórek z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał: anti-MVI (czerwony) oraz anti-nukleolina (zielony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Przedstawiony obraz pochodzi ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Panel prawy -  $\sim 6\times$  powiększenie obrazu zaznaczonego na panelu „nałożenie”. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

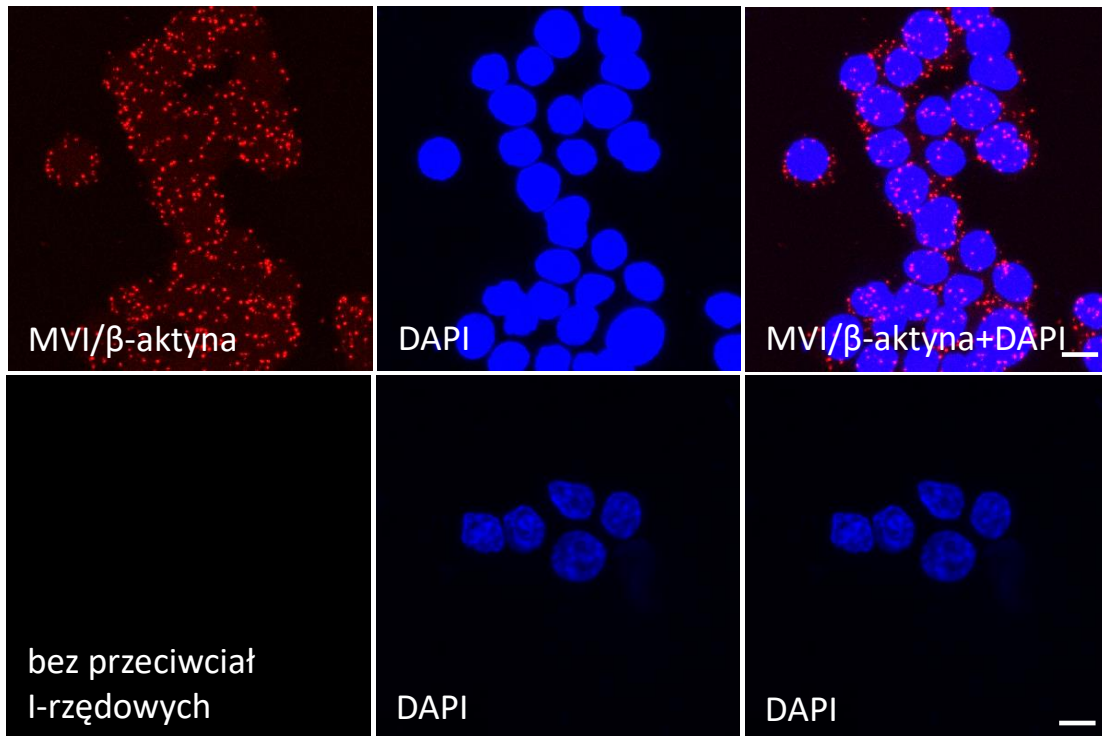
Analiza uzyskanych obrazów immunofluorescencyjnych wskazuje na współwystępowanie obu białek. W celu zobrazowania i zlokalizowania kompleksów MVI/nukleolina wykorzystałam wysoce czułą i specyficzną metodę zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA. Technologia ta pozwala na uwidocznienie w tkance/komórce białek znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie (w odległości  $<40\text{ nm}$ ). Wyniki analizy PLA przedstawiłam na Rycinie 4.4. Fluorescencyjne czerwone punkty (sygnały) odpowiadają miejscu oddziaływań obu białek; widoczne są one głównie na terenie jądra komórkowego oraz w mniejszej ilości w cytoplazmie.





**Rycina 4.4. Metoda zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA.** Analiza sygnału PLA wskazuje na specyficzne tworzenie kompleksów MVI/Nukleolina w komórkach PC12 (fluorescencyjne punkty odpowiadają miejscu oddziaływań obu białek). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Obraz pochodzi ze skanowania ok. 40 warstw preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$  każda. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Doświadczenia te przeprowadziłam z zastosowaniem odpowiednich kontroli (w ten sposób oceniłam specyficzność metody PLA). W kontroli pozytywnej użyłam dwóch przeciwciał przeciwko białkom o scharakteryzowanym już wcześniej oddziaływaniu, czyli przeciwko MVI i  $\beta$ -aktynie (Rycina 4.5). Jak przedstawia Rycina 4.5 (górny panel), sygnały fluorescencyjne reprezentujące oddziaływanie obu białek widoczne są głównie w cytoplazmie. W kontroli negatywnej (kontrola techniczna negatywna) nie użyłam przeciwciał pierwszorzędowych; nie zaobserwowałam w tym przypadku sygnału PLA (Rycina 4.5, dolny panel).

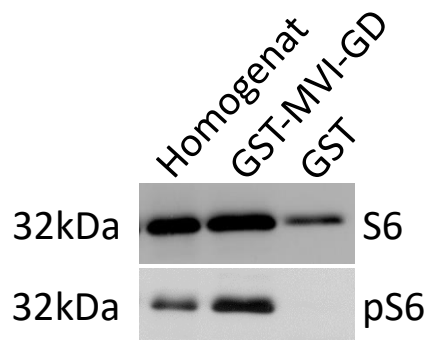


**Rycina 4.5. Metoda zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA – kontrole.** Górny panel (kontrola pozytywna), sygnały PLA (czerwone punkty) odpowiadające kompleksom MVI/β-aktyna. Dolny panel (kontrola negatywna), brak sygnałów PLA w przypadku braku przeciwciał I-rzędowych. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Obrazy pochodzą ze skanowania ok. 40 warstw preparatu o grubości 0,3 μm każda. Skala 10 μm.

Z wykorzystaniem metody PLA potwierdziłam zatem oddziaływanie MVI z nukleoliną, białkiem charakterystycznym dla jąderka.

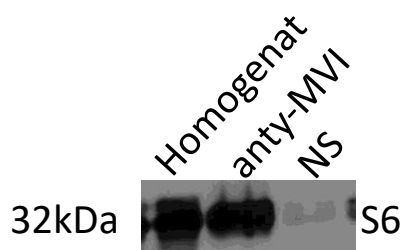
### 4.3. Oddziaływanie MVI z S6

Z wykorzystaniem metody *pull down* zidentyfikowałam również białko S6, będące składnikiem małej podjednostki rybosomu 40S jako nowe białko wiążące MVI. Wyniki tego doświadczenia przedstawia Rycina 4.6. Co ciekawe, oddziaływanie MVI z S6 jest bardziej specyficzne dla jego aktywnej ufosforylowanej formy, pS6.



**Rycina 4.6. Chromatografia powinowactwa typu pull down na złoże Glutathione Sepharose ze związanym GST-MVI-GD.** Homogenat, lizat komórek PC12 przed nałożeniem na złoże Glutathione Sepharose; GST-MVI-GD, frakcja eluowana ze złoża Glutathione Sepharose, ze związanym białkiem fuzyjnym GST-MVI-GD, na które naniesiono lizat białkowy komórek PC12; GST, frakcja eluowana ze złoża Glutathione Sepharose ze związanym GST, na które naniesiono lizat białkowy komórek PC12 (kontrola). Western Blot po inkubacji błony nitrocelulozowej z przeciwciałem anti-S6 oraz anti-pS6.

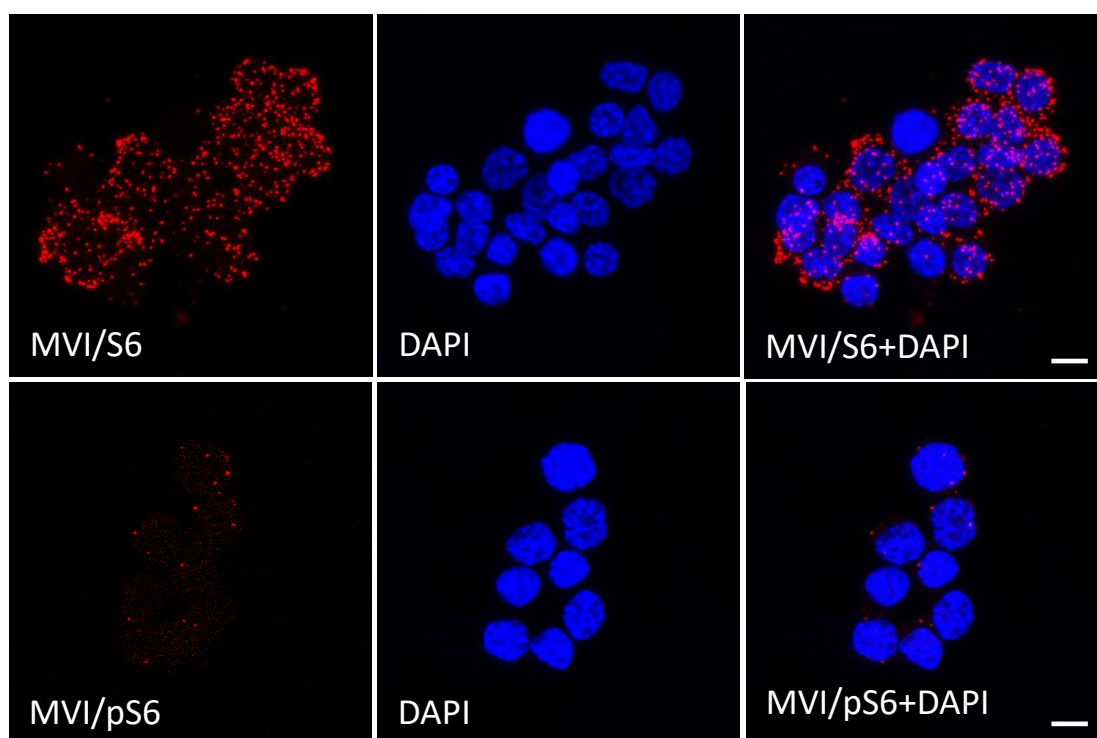
W celu dodatkowego potwierdzenia możliwości oddziaływania MVI z S6 zastosowałam metodę koimmunoprecypitacji z użyciem złoża Protein A/G-Sepharose. Do złoża przyłączyłam przeciwciało przeciwko MVI (próba badana), a następnie inkubowałam je z homogenatem komórek PC12, intensywnie płukałam i poddałam analizie Western Blot, w której wykorzystałam przeciwciało przeciwko S6. Próbę kontrolną stanowiło złoże Protein A/G-Sepharose, które inkubowałam z nieimmunizowaną surowicą szczura NS (Rycina 4.7).



**Rycina 4.7. Koimmunoprecypitacja S6 z MVI w lizatach komórek PC12 na złoże Protein A/G-Sepharose.** Do złoża Protein A/G-Sepharose dodano przeciwciało anti-MVI (próba badana) lub nieimmunizowaną surowicą szczura NS (próba kontrolna) a następnie inkubowano z homogenatem komórek PC12 i analizowano metodą Western Blot. S6 utworzyła kompleks z MVI, „wychwyconą” za pomocą przeciwciała anti-MVI.

Jak widać na Rycinie 4.7, we frakcji uzyskanej ze złoża ze związanym/sprzęgniętym przeciwciałem przeciwko MVI zidentyfikowałam prążek odpowiadający białku S6. Prążka takiego nie wykryłam w próbie uzyskanej ze złoża bez przeciwciała przeciwko MVI (NS). Powyższe obserwacje mogą wskazywać na interakcje MVI z S6. Warto jednak podkreślić, iż zastosowane metody nie pozwalają na zdefiniowanie charakteru tych oddziaływań (czy jest to oddziaływanie bezpośrednie czy pośrednie). Oddziaływanie MVI z białkiem S6 i jego ufosforylowaną formą, pS6

zaobserwowałam również metodą zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA (opis w rozdziale 3.12.1; Rycina 4.8). Mniej liczne oddziaływania były widoczne w przypadku pS6 i MVI.



**Rycina 4.8. Metoda zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA.** Analiza sygnału PLA wskazuje na specyficzne tworzenie kompleksów MVI/S6 oraz MVI/pS6 w komórkach PC12 (fluorescencyjne punkty odpowiadają miejscu oddziaływań obu białek). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Obrazy pochodzą ze skanowania ok. 40 warstw preparatu o grubości 0,3 µm każda. Skala 10 µm.

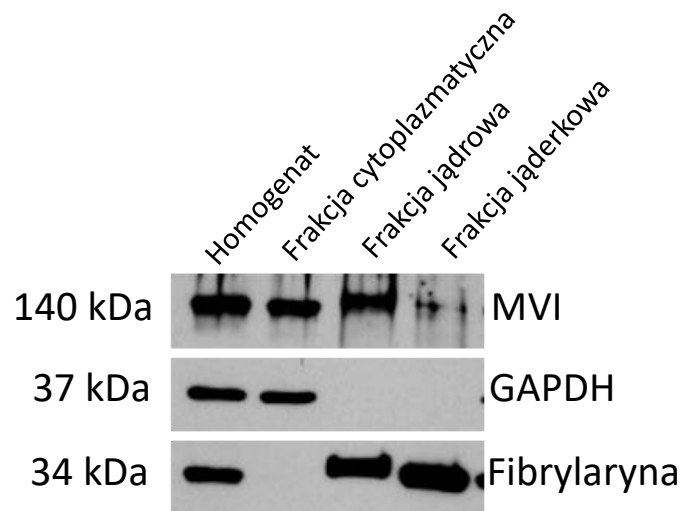
Podsumowując tę część wyników, wykazałam, że MVI oddziałuje z białkami jądrowymi i rybosomalnym w jądrze komórkowym, które zostały wykryte metodą spektrometrii mas jako potencjalni partnerzy MVI .

#### 4.4. Obecność MVI w jąderku

##### 4.4.1. MVI jest obecna we frakcji jądrowej

W celu potwierdzenia występowania MVI w jąderku, komórki PC12 frakcjonowałam z zastosowaniem metody wirowania w gradiencie sacharozy zgodnie z protokołem opisanym w Hacot i in. (2010). Przeprowadzona analiza uzyskanych frakcji potwierdziła obecność MVI we frakcji cytoplazmatycznej i jądrowej, a także wykazała jej obecność we frakcji jądrowej komórek PC12 (Rycina 4.9). Czystość poszczególnych frakcji sprawdziłam wykorzystując odpowiednie znaczniki białkowe,

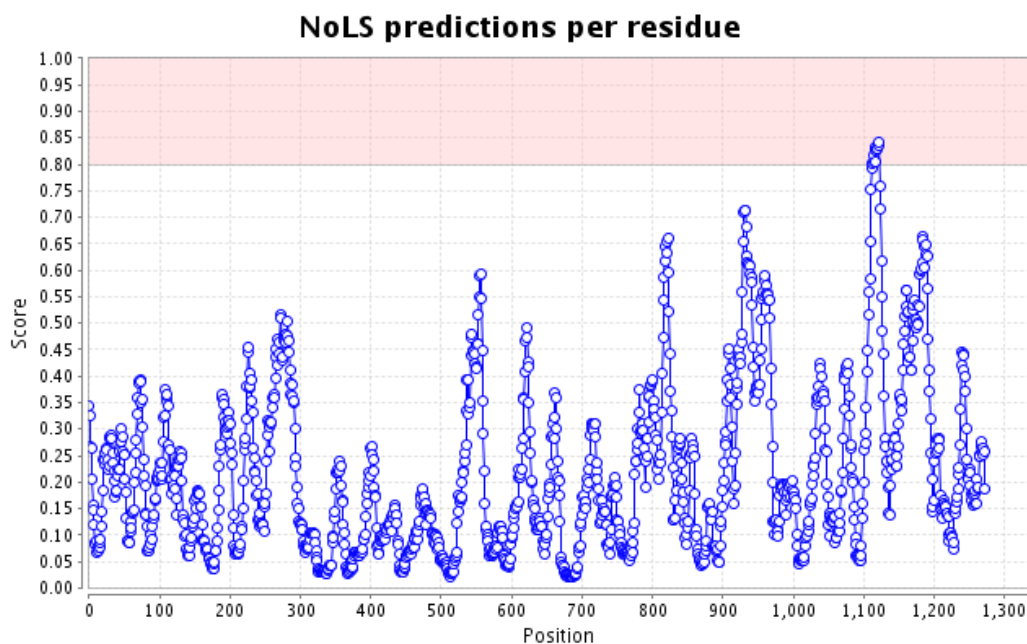
czyli GAPDH dla frakcji cytoplazmatycznej i fibrylarynę dla frakcji jądrowej i jąderkowej.



**Rycina 4.9. Frakcjonowanie komórek PC12.** MVI zidentyfikowano we frakcji jąderkowej komórek PC12 z wykorzystaniem specyficznego przeciwciała anty-MVI. Czystość poszczególnych frakcji uzyskanych po wirowaniach w gradiencie sacharozy analizowano z wykorzystaniem przeciwciał anty-GAPDH oraz anty-fibrylaryna.

#### 4.4.2. MVI zawiera sygnał lokalizacji jąderkowej NoLS

Następnie z wykorzystaniem narzędzia bioinformatycznego NoD (ang. *nucleolar localization sequence detector*) (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/nod>) (Scott i in. 2011), wykryłam potencjalną sekwencję NoLS (ang. *nucleolar localization sequence*), która może warunkować lokalizację MVI w jąderku (Rycina 4.10). Program NoD - w oparciu o analizę bazy danych 46 ludzkich sekwencji jąderkowych NoLS - przewiduje obecność NoLS w białkach eukariotycznych i wirusowych (Scott i in. 2011).

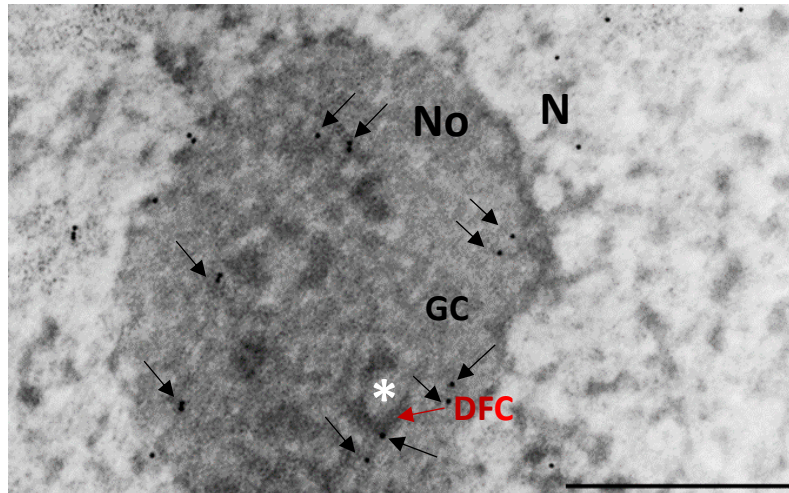


**Rycina 4.10. Identyfikacja potencjalnej sekwencji NoLS, odpowiedzialnej za lokalizację MVI w jąderku za pomocą programu NoD.** Zaciemniony obszar reprezentuje zakres wyników, w obrębie których 20 aminokwasowy segment białka jest potencjalnym miejscem lokalizacji jąderkowej (NoLS); punkt odcięcia 0,8. <http://www.compbio.dundee.ac.uk/nod> (Scott i in. 2011).

Program wytypował jako NoLS sekwencję  ${}_{1114}\text{FHRRLKVYHAWKSKNKKRNTETEQRAPKS}_{1142}$ , zlokalizowaną w domenie wiążącej cargo (CBD, ang. *cargo binding domain*) i obejmującą motyw MVI bogaty w reszty argininy i leucyny (RRL), odpowiedzialny za wiązanie MVI z wieloma partnerami białkowymi.

#### 4.4.3. MVI występuje głównie w obszarach DFC i GC jąderka

W celu ustalenia, w jakich obszarach jąderka zlokalizowana jest MVI przeprowadziłam badania na poziomie mikroskopii elektronowej z wykorzystaniem techniki immunogold; MVI uwidoczniono w postaci czarnych, wyraźnych punktów, odpowiadającym cząstkom złota koloidalnego o średnicy 15 nm. Procedurę tę i obrazowanie komórek prowadziłam we współpracy z dr hab. Martą Lenartowską z Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.



**Rycina 4.11. Lokalizacja MVI w jąderku.** Jądro komórkowe (N), jąderko (No), centrum fibrylarne FC (ang. *fibrillar center*) - zaznaczone gwiazdką, gęsty składnik fibrylarny DFC (ang. *dense fibrillar component*) - zaznaczony czerwoną strzałką, składnik ziarnisty GC (ang. *granular component*). Miejsca występowania MVI w jąderku zaznaczono czarnymi strzałkami. Skala 1  $\mu$ m.

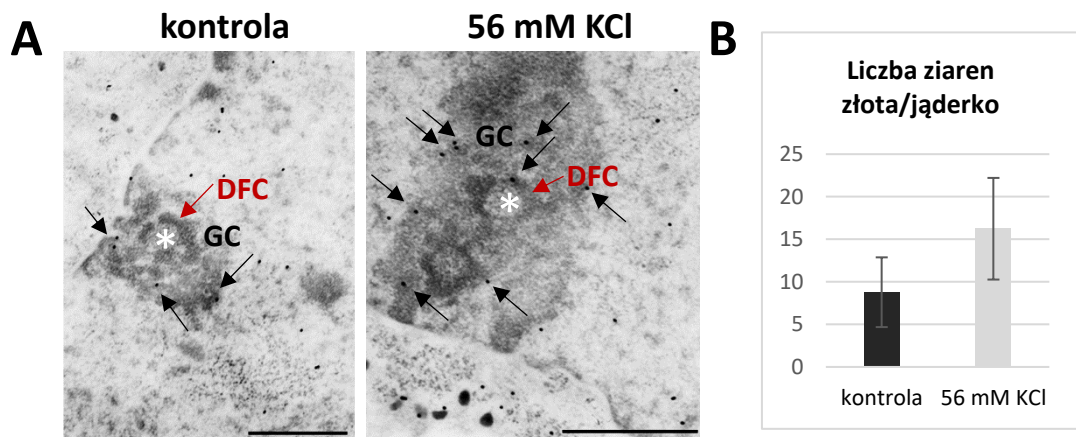
MVI zlokalizowałam głównie w gęstym składniku fibrylarnym DFC (ang. *dense fibrillar component*) i składniku ziarnistym GC (ang. *granular component*) jąderka oraz na granicy tych obu obszarów (Rycina 4.11).

#### 4.4.4. Poziom MVI w jąderku zwiększa się po stymulacji komórek 56 mM KCl

Badania prowadzone przez dr. Łukasza Majewskiego wykazały, że po stymulacji komórek PC12 przy użyciu 56 mM KCl dochodzi do wzrostu poziomu MVI w jądrze komórkowym (w porównaniu do komórek kontrolnych, niestymulowanych) (Majewski i in. 2018). Obserwacja ta skłoniła mnie do zbadania wpływu stymulacji komórek PC12 na poziom MVI w jąderku. W tym celu komórki inkubowałam w roztworze z wysokim (56 mM) lub niskim (2,6 mM) (kontrola) stężeniem jonów potasu, po czym znakowałam tak traktowane komórki techniką mikroskopii elektronowej immunogold.

Na uzyskanych elektronogramach zaobserwowałam wyższy wzrost znakowania cząstkami złota jąderek komórek stymulowanych 56 mM KCl, w porównaniu do komórek kontrolnych, niestymulowanych (Rycina 4.12 A i B).





**Rycina 4.12 (A) Lokalizacja MVI w jąderkach komórek kontrolnych i po stymulacji 56 mM KCl.** Znakowanie komórek techniką immunogold z wykorzystaniem przeciwciała I-rzędowego przeciwko MVI oraz II-rzędowego sprzężonego ze złotem koloidalnym. Centrum fibrylarne (FC), zaznaczone białą gwiazdką; gęsty składnik fibrylarny (DFC), zaznaczony czerwonymi strzałkami; składnik ziarnisty jąderka (GC). Miejsca występowania MVI w jąderku zaznaczono czarnymi strzałkami. Skala 1  $\mu\text{m}$ . **(B) Analiza liczby ziaren złota koloidalnego w jąderkach komórek kontrolnych i stymulowanych.** N=100. Brak istotności statystycznej.

#### 4.4.5. Oddziaływanie MVI z białkami charakterystycznymi dla obszarów jąderka

Ponieważ na zdjęciach wykonanych z użyciem mikroskopu elektronowego zaobserwowałam obecność MVI w różnych obszarach jąderka (Rycina 4.11), postanowiłam sprawdzić, czy MVI oddziałuje z białkami charakterystycznymi dla tych obszarów. Do tego celu wykorzystałam metodę *pull down* oraz analizę Western Blot, w której zastosowałam przeciwciała przeciwko UBF (znacznikowi FC jąderka), fibrylarynie (znacznikowi DFC jąderka) oraz B23 (znacznikowi GC jąderka).

Jak widać na Rycinie 4.13, prążki odpowiadające UBF, fibrylarynie i B23 wykryłam we frakcjach eluowanych ze złoża, do którego przyłączyłam GST-MVI-GD. Nie zidentyfikowałam ich we frakcjach eluowanych ze złoża ze związanym GST (kontrola).



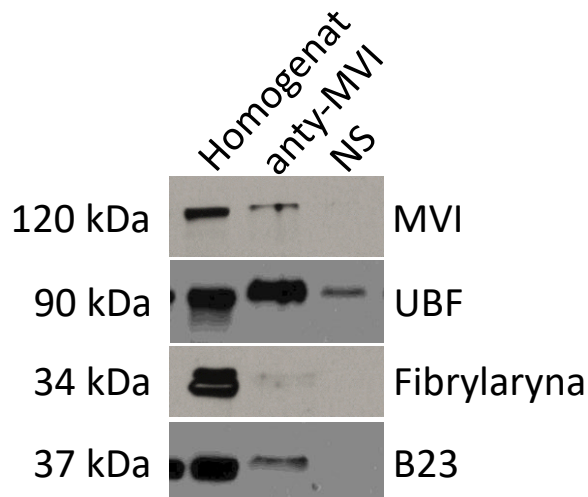


**Rycina 4.13. Chromatografia powinowactwa typu *pull down* na złożu Glutathione Sepharose ze związanym GST-MVI-GD.** Homogenat, lizat komórek PC12 przed nałożeniem na złoże Glutathione Sepharose; GST-MVI-GD, frakcja eluowana ze złoża Glutathione Sepharose, ze związanym białkiem fuzyjnym GST-MVI-GD, na które naniesiono lizat białkowy komórek PC12; GST, frakcja eluowana ze złoża Glutathione Sepharose ze związanym GST, na które naniesiono lizat białkowy komórek PC12 (kontrola). Western Blot po inkubacji błony nitrocelulozowej z przeciwciałami: anty-UBF, anty-fibrylaryna oraz anty-B23.

Zatem zastosowanie metody *pull down* połączonej z analizą Western Blot z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko UBF, fibrylarynie oraz B23 pozwoliło na zidentyfikowanie nowych potencjalnych oddziaływań MVI.

Aby dodatkowo potwierdzić nowoodkryte oddziaływania MVI z UBF, fibrylaryną oraz B23 zastosowałam metodę koimmunoprecypitacji. W pierwszym etapie do złoża Protein A/G Sepharose dodałam przeciwciało rozpoznające MVI (próbę badana), a następnie inkubowałam je z homogenatem komórek PC12. Po odwirowaniu próby, sprawdzałam czy poszukiwane białka jąderkowe utworzyły kompleksy z MVI związaną (uchwyconą) za pomocą przeciwciała. W tym celu wykorzystywałam analizę Western Blot, w której zastosowałam przeciwciała specyficznie rozpoznające UBF, fibrylarynę i B23. Próbę kontrolną stanowiło złoże Protein A/G-Sepharose, które inkubowałam (w pierwszym etapie) z nieimmunizowaną surowicą szczura (NS).

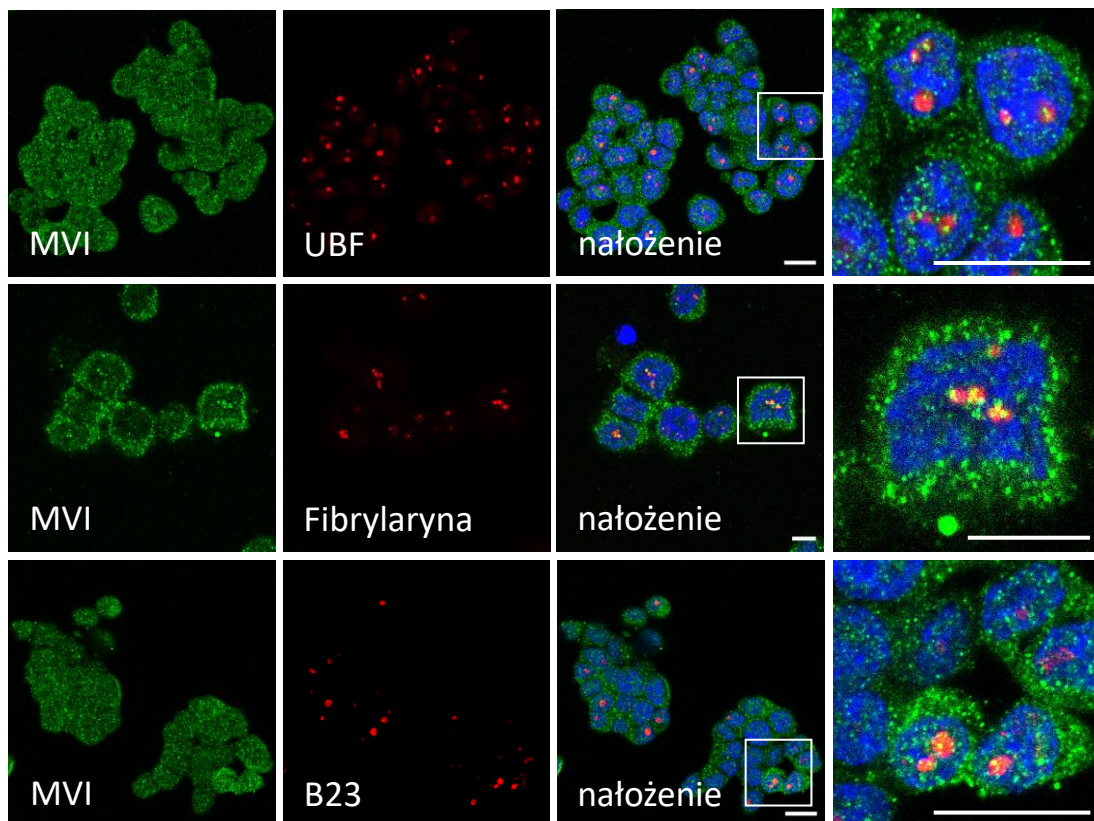
Jak widać na Rycinie 4.14, w próbach uzyskanych ze złoży ze sprzęgniętym przeciwciałem przeciwko MVI zidentyfikowałam prążki odpowiadające masom białek jąderkowych tj. UBF, fibrylaryny i B23. Prążków tych nie wykryłam w próbach uzyskanych ze złoży bez przeciwciała przeciwko MVI. Powyższe obserwacje mogą zatem wskazywać na interakcję między MVI a białkami jąderkowymi.



**Rycina 4.14. Koimmunoprecypitacja UBF z MVI, fibrylaryny z MVI oraz B23 z MVI w lizatach komórek PC12 na złożu Protein A/G-Sepharose.** Do złoża Protein A/G-Sepharose dodano przeciwciało przeciwko anty-MVI (próba badana) lub nieimmunizowaną surowicę szczura NS (próba kontrolna) a następnie inkubowano z homogenatem komórek PC12 i analizowano metodą Western Blot z wykorzystaniem przeciwciał: anty-UBF, anty-fibrylaryna oraz anty-B23.

#### 4.4.6. MVI kolokalizuje z białkami jąderkowymi

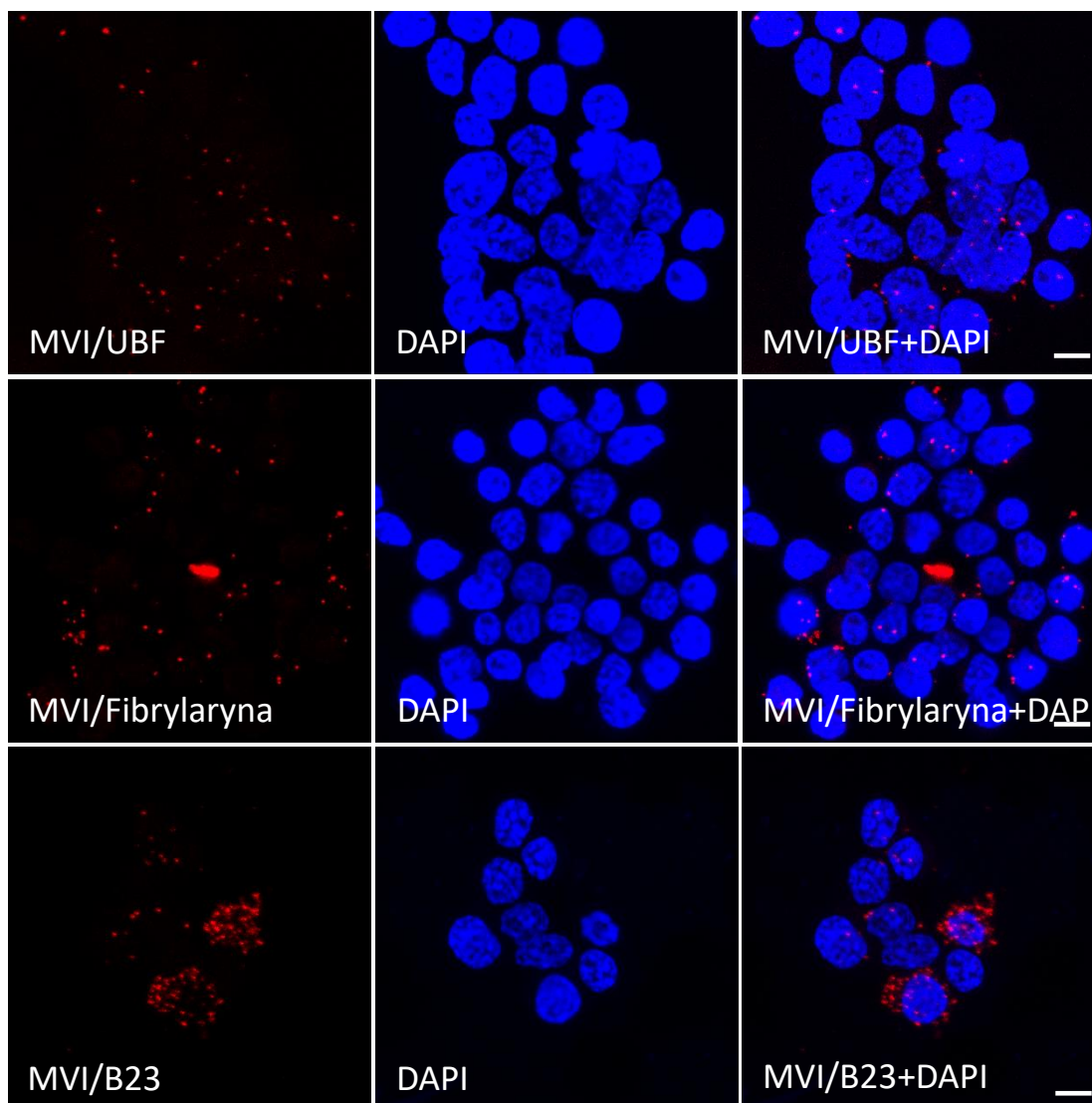
Aby zobrazować oddziaływania między MVI a białkami jąderkowymi, wykryte metodą *pull down* i koimmunoprecypitacji, wykonałam barwienia immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciał: anty-UBF do wyznakowania FC jąderka, anty-fibrylaryna do wyznakowania DFC jąderka oraz anty-B23 do wyznakowania obszaru GC jąderka (Rycina 4.15).



**Rycina 4.15. Współwystępowanie MVI i UBF, MVI i fibrylaryny oraz MVI i B23 w komórkach PC12.** Barwienie immunofluorescencyjne komórek z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał: anti-MVI (zielony) oraz anti-UBF, anti-fibrylaryna i anti-B23 (czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Prawe panele -  $\sim 5\text{x}$  powiększenia obrazów zaznaczonych na panelach „nałożenie”. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Analizując powyższe obrazy immunofluorescencyjne, zaobserwowałam współwystępowanie MVI ze znacznikami poszczególnych obszarów jąderka.

Aby dodatkowo potwierdzić oddziaływanie MVI ze znacznikami poszczególnych obszarów jąderka ponownie wykorzystałam metodę zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA. Z wykorzystaniem tej metody potwierdziłam oddziaływanie MVI z UBF, fibrylaryną oraz B23 (Rycina 4.16).



**Rycina 4.16. Metoda zbliżeniowej ligacji *in situ*, PLA.** Analiza sygnału PLA wskazuje na specyficzne tworzenie kompleksów MVI/UBF, MVI/Fibrylaryna oraz MVI/B23 w komórkach PC12 (fluorescencyjne punkty odpowiadają miejscu oddziaływań obu białek). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Obrazy pochodzą ze skanowania ok. 40 warstw preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$  każda. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Zatem wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody PLA wskazują na oddziaływanie MVI z innymi białkami jądrowymi, nie tylko nukleoliną i S6.

#### **4.5. Wpływ stresu jądrowego wywołanego aktynomycyną D (ActD) na lokalizację MVI w komórkach PC12**

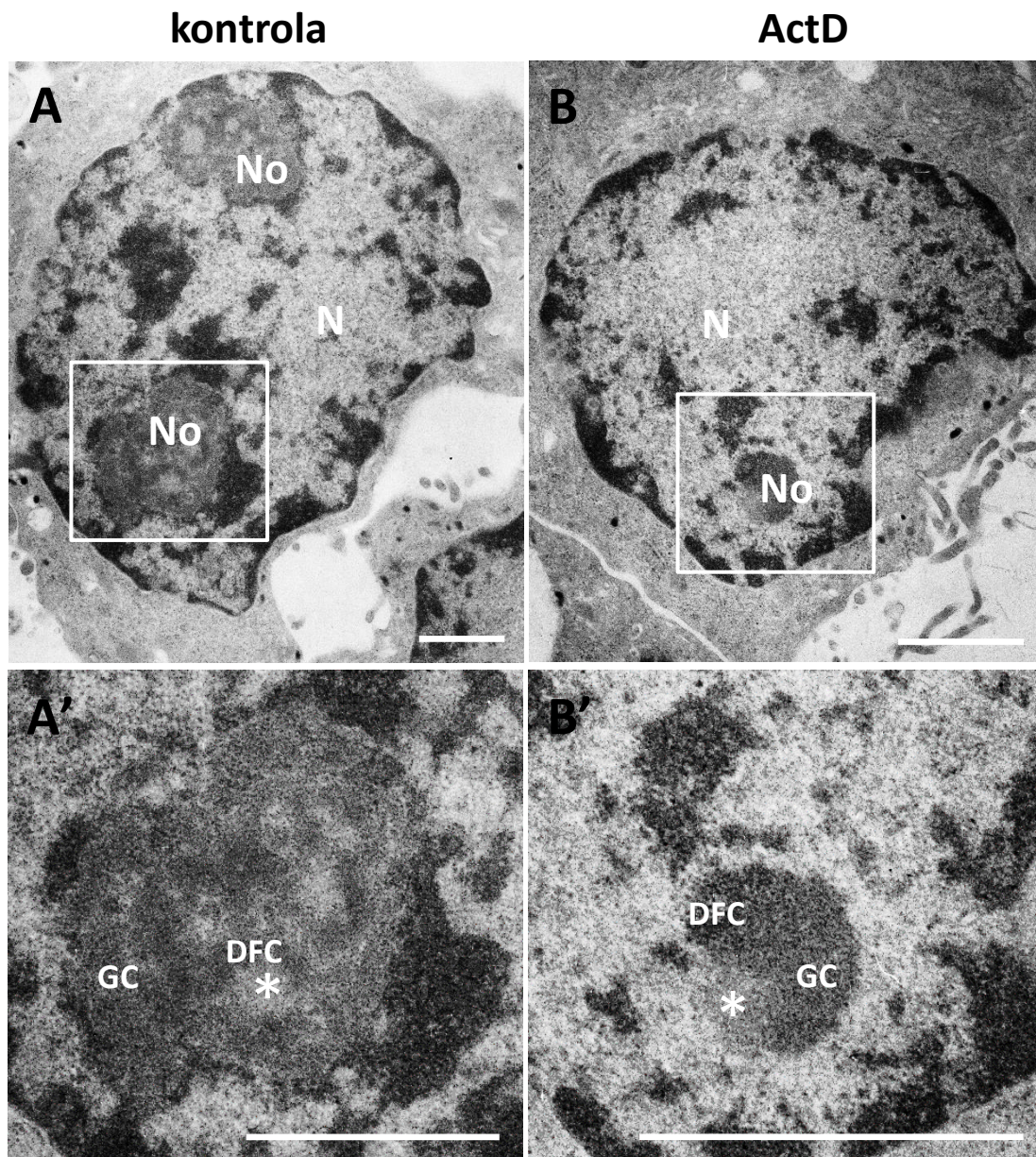
Z danych literaturowych wiadomo, że na skutek działania aktynomycyny D (ActD) w stężeniu 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , hamującym aktywność Pol I, ale nie Pol II, dochodzi do stresu jądrowego, co manifestuje się zmianami w morfologii jąderka. UBF i fibrylaryna ulegają wówczas translokacji na obrzeża jąderka a B23 i nukleolina – translokacji do

nukleoplazmy (Boulon i in. 2010; Burger i in. 2010; Yang i in. 2018). Ponieważ wykryłam, że MVI oddziałuje z tymi białkami jąderkowymi postanowiłam zbadać, czy i w jaki sposób stres jąderkowy wpływa na lokalizację i poziom MVI w komórkach PC12.

#### **4.5.1. Ultrastruktura jąderka w komórkach traktowanych ActD**

Aby zbadać wpływ ActD na organizację jąderka w badanych komórkach przeprowadziłam badania ultrastrukturalne techniką mikroskopii elektronowej z wykorzystaniem tego inhibitora. Analiza uzyskanych obrazów wykazała drastyczne zmiany w organizacji struktury jąderka komórek traktowanych ActD (w stężeniu 0,05  $\mu\text{g/ml}$ ); nie można było w nim wyróżnić typowych obszarów charakterystycznych dla prawidłowej struktury jąderka; skutek działania ActD dochodziło do jego dezintegracji (Rycina 4.17). Widoczne były natomiast bezpostaciowe, resztkowe jąderka, w których obszar FC występował na jego peryferium (Rycina 4.17).

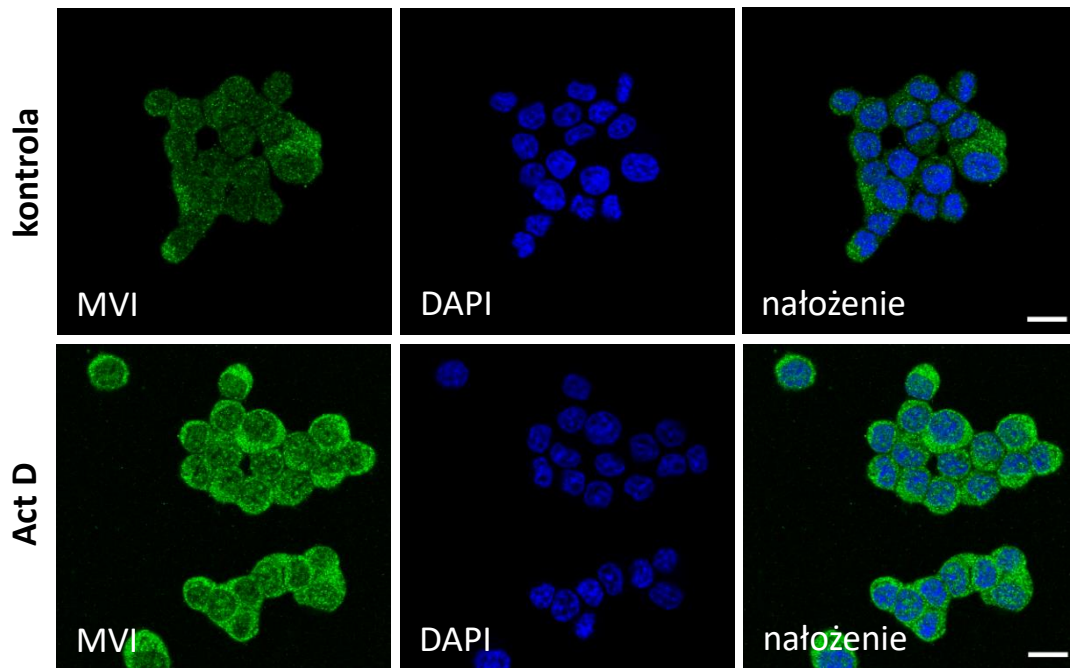




**Rycina 4.17. Ultrastruktura jąderka w komórkach PC12 nietraktowanych (kontrola) lub traktowanych ActD. (A, A')** W komórkach kontrolnych uwidoczniło typową organizację jąderka: obszar FC jest otoczony przez DFC i GC. **(B, B')** W komórkach traktowanych ActD dochodzi do dezintegracji jąderka. Gwiazdką zaznaczono obszar FC. A', B' - ~ 3x powiększenia obrazów zaznaczonych na górnych panelach. N - jądro, No - jąderko. Skala 1  $\mu\text{m}$ .

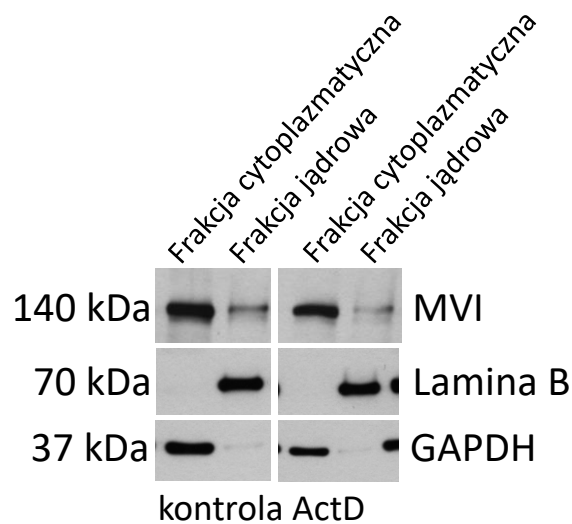
#### 4.5.2. ActD wpływa na lokalizację MVI w komórkach PC12

Z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej zaobserwowałam, że w komórkach traktowanych ActD sygnał pochodzący od przeciwciała przeciwko MVI był intensywniejszy niż w komórkach kontrolnych (Rycina 4.18). Może to wskazywać na wzrost poziomu MVI w tych komórkach.



**Rycina 4.18. Występowanie MVI w komórkach PC12 nietraktowanych (kontrola) lub traktowanych ActD (stres jąderkowy).** Barwienie immunofluorescencyjne komórek z wykorzystaniem przeciwciał anti-MVI (zielony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Przedstawiony obraz pochodzi ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Skala 10  $\mu\text{m}$ .

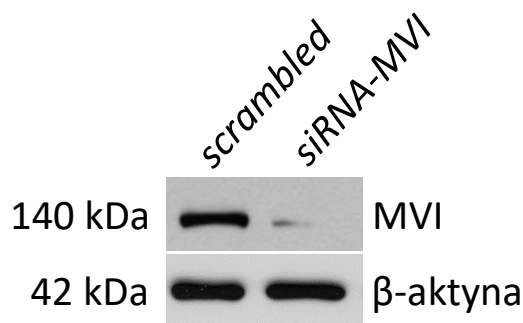
Niestety, analiza Western Blot nie potwierdziła tych obserwacji (Rycina 4.19).



**Rycina 4.19. Poziom MVI we frakcjach cytoplazmatycznej i jądrowej uzyskanych z komórek PC12 nietraktowanych (kontrola) i traktowanych ActD (stres jąderkowy).** Western Blot po inkubacji z przeciwciałami: anti-MVI, anti-lamina B i anti-GAPDH.

#### 4.6. Wpływ obniżonego poziomu MVI na ultrastrukturę jąderka – badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej

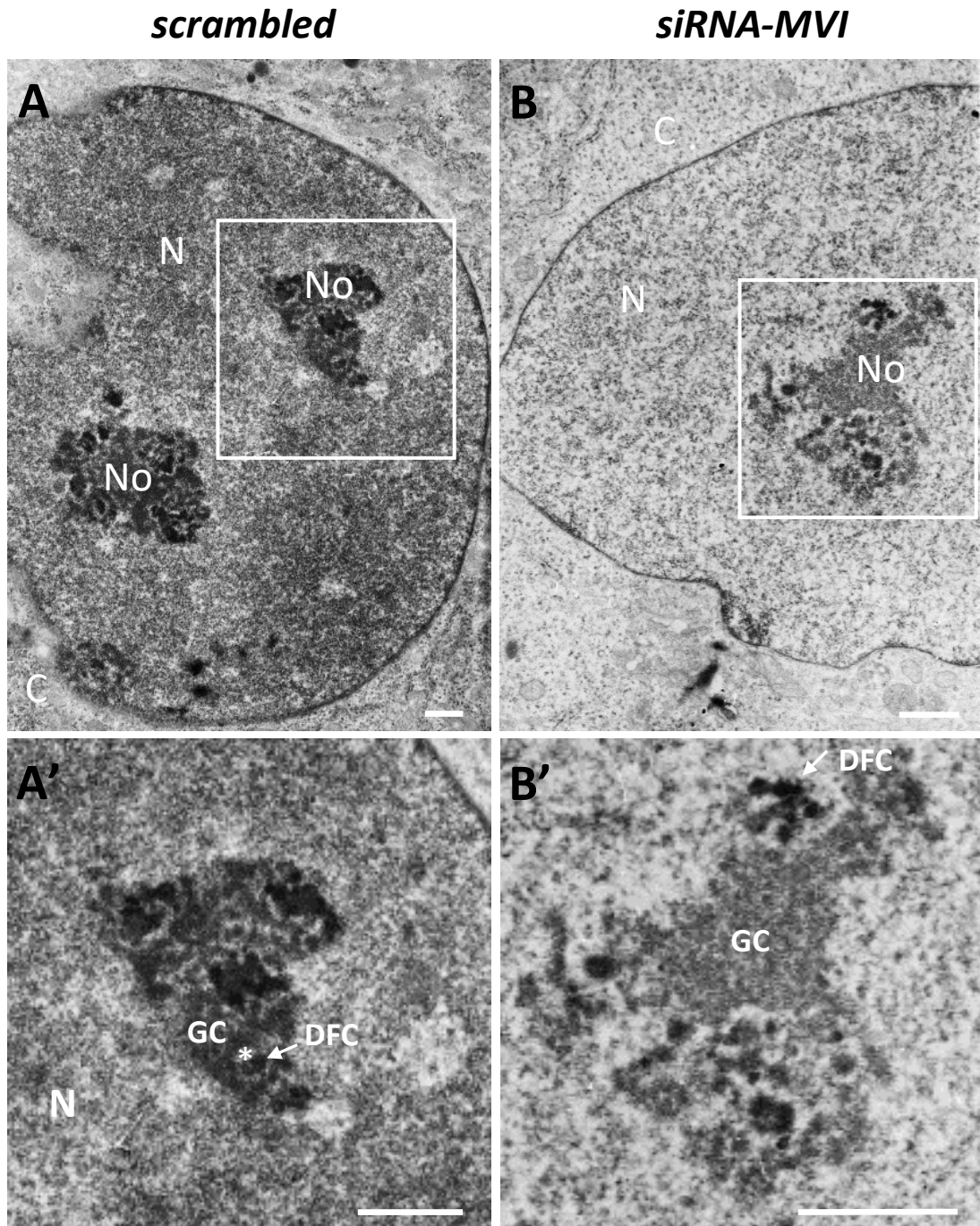
Następnie postanowiłam sprawdzić, czy MVI bierze udział w organizacji jąderka. W tym celu przeprowadziłam badania ultrastrukturalne komórek z obniżonym poziomem MVI (*siRNA-MVI*) oraz komórek kontrolnych *scrambled* (Rycina 4.20). Te linie komórkowe zostały przygotowane w oparciu o plazmid kodujący *siRNA* skierowany przeciwko mRNA *MYO6* oraz plazmid kodujący kontrolne *siRNA*, nierozpoznające żadnej znanej sekwencji mRNA ssaków (Majewski i in. 2011).



**Rycina 4.20. Poziom syntezy MVI w komórkach *siRNA-MVI* i komórkach *scrambled*.** Western Blot po inkubacji z przeciwciałem anti-MVI. Jako białko referencyjne użyto β-aktynę.

Analiza obrazów uzyskanych z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazała, że w komórkach *siRNA-MVI* dochodzi do drastycznych zmian w ultrastrukturze jąderka (Rycina 4.21). Zaobserwowałam, że jąderko w tych komórkach jest bardziej rozproszone/mniej zwarte w porównaniu do komórek *scrambled*. Obserwowana jest również dezorganizacja poszczególnych obszarów jąderka. Uzyskany wynik może świadczyć o udziale MVI w utrzymaniu prawidłowej organizacji jąderka, a tym samym o wpływie MVI na zachodzące w nim procesy.



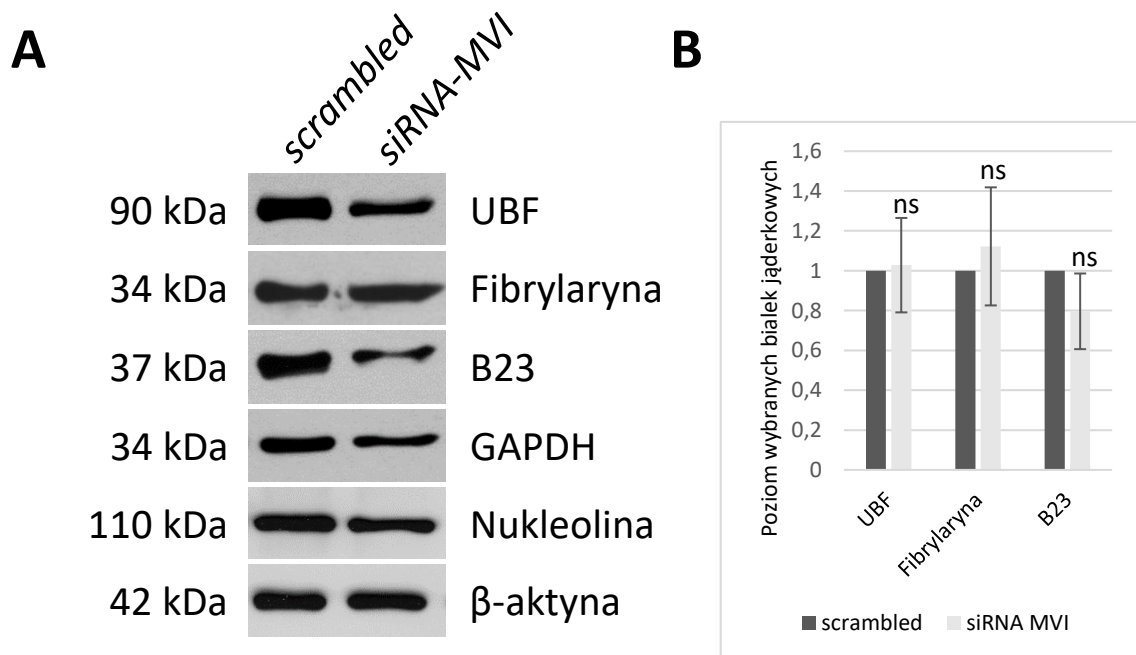


**Rycina 4.21. Ultrastruktura jąderek w komórkach *siRNA-MVI* oraz komórkach *scrambled*.** (A, A') W komórkach *scrambled* uwidoczniono wszystkie obszary jąderka tj. FC (zaznaczony gwiazdką), DFC (zaznaczony strzałką) oraz GC. (B, B') W komórkach *siRNA-MVI* uwidoczniono dramatyczne zmiany w strukturze jąderka (dezintegracja). A', B'- ~ 2,5x powiększenia obrazów zaznaczonych na górnych panelach. N- jądro, No-jąderko, C-cytoplazma. Skala 1  $\mu\text{m}$ .

## 4.7. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom i lokalizację białek jąderkowych

### 4.7.1. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom wybranych białek jąderkowych

Ponieważ w komórkach *siRNA-MVI* dochodzi do drastycznych zmian w organizacji jąderka (dezintegracji), postanowiłam sprawdzić poziom wybranych białek jąderkowych (UBF, fibrylaryny, B23 oraz nukleoliny) w tych komórkach w porównaniu do komórek *scrambled*, w których struktura jąderka nie była zaburzona. Nie zaobserwowałam jednak istotnych zmian w poziomie białek jąderkowych pomiędzy komórkami *siRNA-MVI* a *scrambled* (Rycina 4.22).



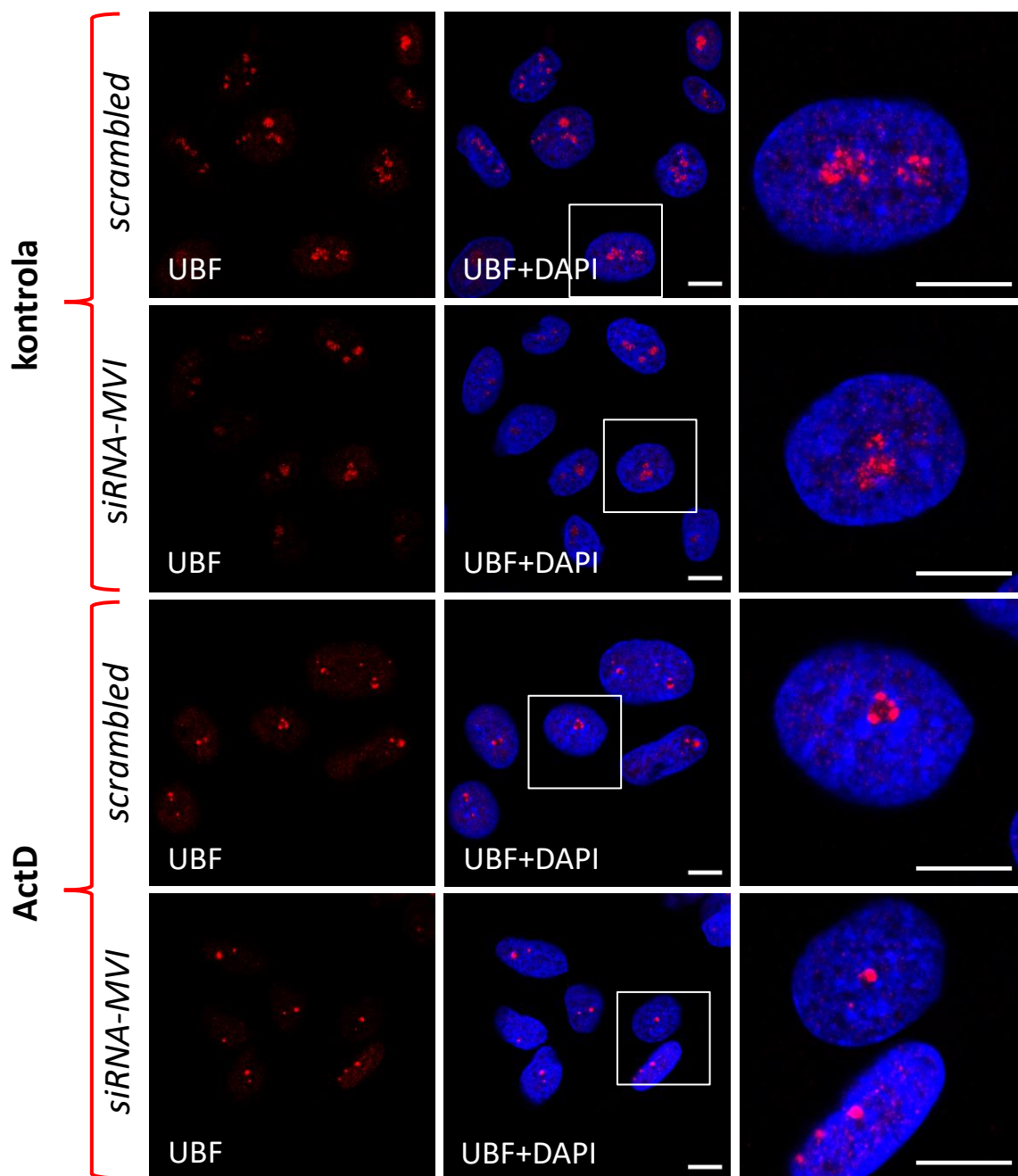
**Rycina 4.22. Poziom wybranych białek jąderkowych w komórkach *siRNA-MVI* i komórkach *scrambled*.** (A) Western Blot po inkubacji z przeciwciałami: anti-UBF, anti-fibrylaryna, anti-B23, anti-nukleolina. Jako białka referencyjne użyto GAPDH oraz  $\beta$ -aktynę. (B) Analiza densytometryczna poziomu UBF, fibrylaryny oraz B23 względem GAPDH. N=3; ns- brak istotności statystycznej.

Ponieważ zaobserwowałam, że w komórkach *siRNA-MVI* oraz pod wpływem działania ActD (niezależnie od siebie) dochodzi do dezorganizacji jąderka, postanowiłam sprawdzić, czy i w jaki sposób zmienia się lokalizacja białek charakterystycznych dla poszczególnych obszarów jąderka. W tym celu wykonałam barwienia immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* z wykorzystaniem przeciwciał

skierowanych przeciwko UBF, fibrylarynie oraz B23 w obecności i nieobecności ActD (Rycina 4.23, 4.24, 4.25).

#### **4.7.2. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację UBF**

Badania rozpoczęłam od sprawdzenia, czy obniżony poziom MVI wpływa na lokalizację UBF. Analiza obrazów uzyskanych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego wykazała, że w komórkach *scrambled* i *siRNA-MVI* nietraktowanych ActD (kontrola), UBF występowało w jąderku w postaci luźno upakowanych i drobnych skupisk (Rycina 4.23). Nie zaobserwowałam zatem różnic w lokalizacji UBF pomiędzy tymi komórkami, natomiast widoczny był nieznaczny spadek intensywności barwienia UBF w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled* (Rycina 4.23). Na podstawie tych wyników, można przypuszczać, że obniżony poziom MVI nie wpływa na lokalizację UBF w warunkach kontrolnych.



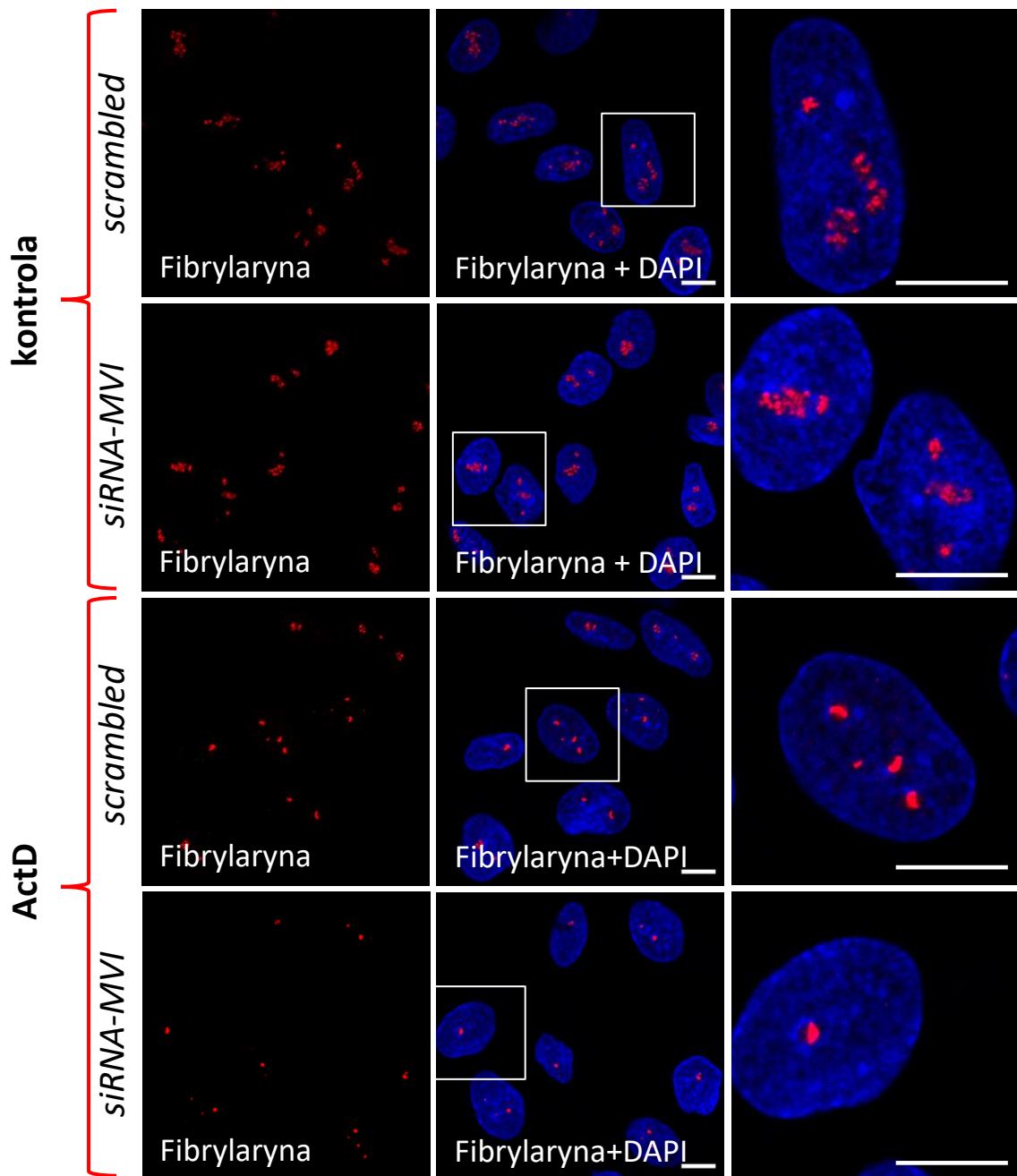
**Rycina 4.23. Barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* i komórek *scrambled* w obecności lub nieobecności ActD.** Do barwień wykorzystano przeciwciało anti-UBF (czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI. Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Panele prawe -  $\sim 3\times$  powiększenia obrazów zaznaczonych na środkowych panelach. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Z kolei w komórkach *scrambled* traktowanych ActD zaobserwowałam zmianę rozmieszczenia UBF z obszaru FC jąderka poza jego obręb; utworzone zostały struktury zwane „*nucleolar caps*”, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi (Shav-Tal i in. 2005). W przypadku komórek *siRNA-MVI* traktowanych ActD również zaobserwowałam gromadzenie UBF, ale nie jako „*nucleolar caps*” na obrzeżach jąderka, tylko w postaci

zwartej zaokrąglonej struktury. Na podstawie tych wyników, można przypuszczać, że obniżony poziom MVI nie wpływa znacząco na lokalizację UBF w komórkach PC12.

#### **4.7.3. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację fibrylaryny**

Następnie zbadalam, czy obniżony poziom MVI wpływa na lokalizację fibrylaryny. Analiza obrazów uzyskanych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego wykazała, że w komórkach *scrambled* i nietraktowanych ActD, fibrylaryna występowała w jąderku w postaci licznych, ale drobnych, rozproszonych punkcików/skupisk. Nie zaobserwowałam również istotnych różnic w lokalizacji fibrylaryny w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled* (Rycina 4.24). Uzyskane wyniki wskazują zatem, że MVI nie wpływa na lokalizację fibrylaryny w warunkach kontrolnych.



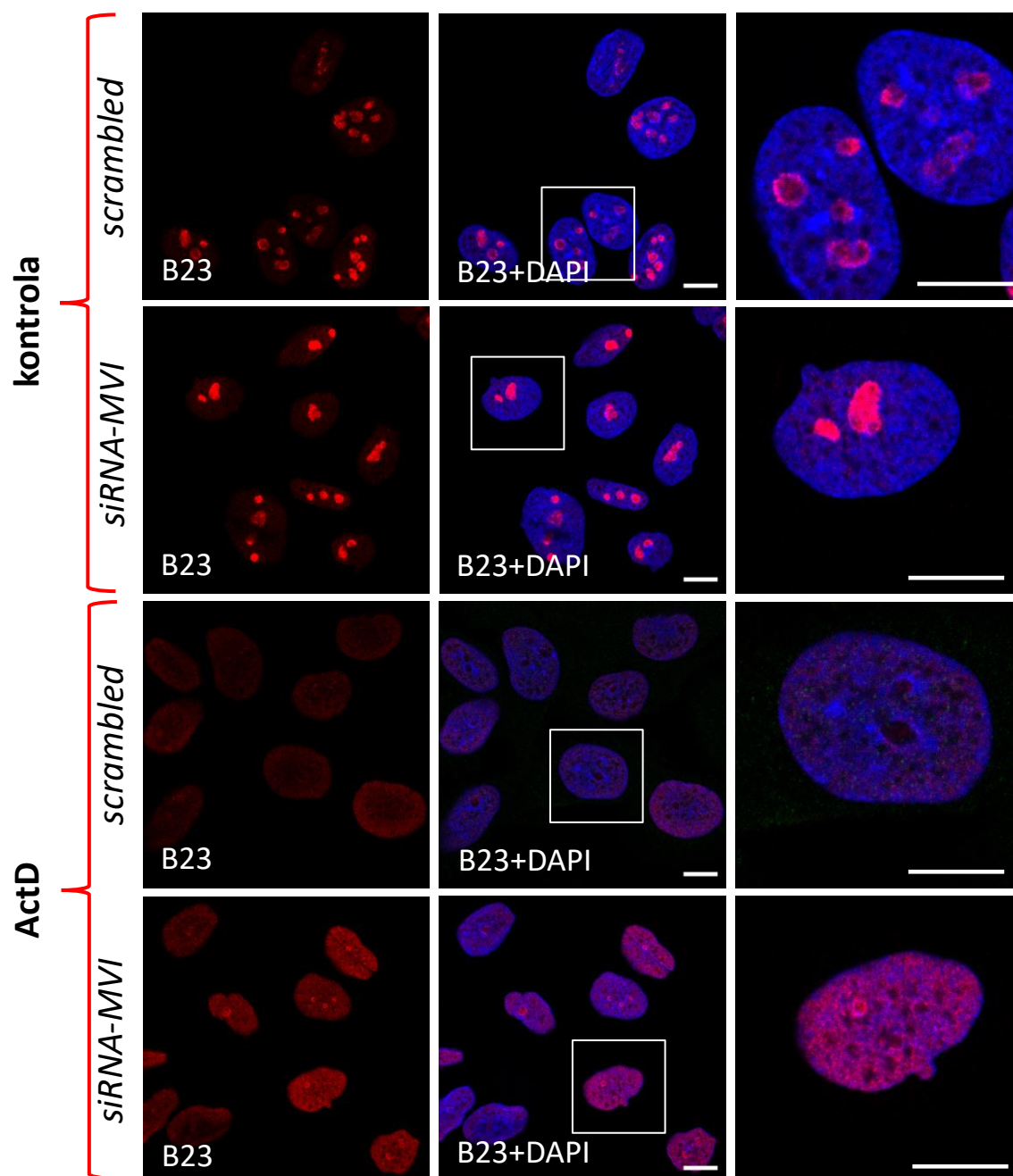
**Rycina 4.24. Barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* i komórek *scrambled* w obecności lub nieobecności ActD.** Do barwień wykorzystano przeciwciało anti-fibrylaryna (czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI. Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Panele prawe -  $\sim 3\text{x}$  powiększenia obrazów zaznaczonych na środkowych panelach. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Z kolei w komórkach *scrambled* oraz *siRNA-MVI* traktowanych ActD zaobserwowałam występowanie fibrylaryny w postaci pojedynczych, zwartych skupisk na obrzeżach jąderka. Nie zaobserwowałam zatem różnic w lokalizacji fibrylaryny pomiędzy komórkami *scrambled* oraz *siRNA-MVI* pod wpływem działania ActD. Natomiast sama ActD powodowała zmianę w sposobie rozmieszczenia fibrylaryny w porównaniu do komórek kontrolnych, nietraktowanych ActD (Rycina 4.24).

#### **4.7.4. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację B23**

Następnie zbadalam, czy obniżony poziom MVI wpływa na lokalizację B23. Analiza obrazów uzyskanych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej wykazała, że w komórkach *scrambled*, nietraktowanych ActD, B23 lokalizuje się w obszarze GC jąderka w postaci charakterystycznych pierścieni. W komórkach *siRNA-MVI* B23 było widoczne w postaci dużych skupisk, wypełniających całe jąderko (Rycina 4.25). Na podstawie tych wyników, można przypuszczać, że MVI bierze udział w lokalizacji B23 w warunkach kontrolnych.





**Rycina 4.25. Barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* i komórek *scrambled* w obecności lub nieobecności ActD.** Do barwień wykorzystano przeciwciało anti-B23 (czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI. Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Panele prawe -  $\sim 3\text{x}$  powiększenia obrazów zaznaczonych na środkowych panelach. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

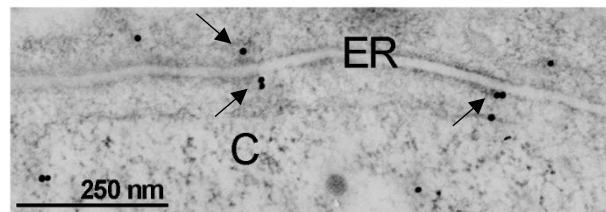
Z kolei w komórkach *scrambled* traktowanych ActD zaobserwowałam translokację B23 z obszaru GC jąderka do nukleoplazmy, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi (Boulon i in. 2010; Burger i in. 2010). Natomiast w komórkach *siRNA-MVI* traktowanych ActD zaobserwowałam obecność B23 zarówno w obszarze GC jąderka, jak i w nukleoplazmie (Rycina 4.25). Na podstawie tych wyników, można



przypuszczać, że MVI bierze udział w lokalizacji B23 również w warunkach stresu jąderkowego.

#### **4.8. Wpływ obniżonego poziomu MVI na morfologię retikulum endoplazmatycznego (ER)**

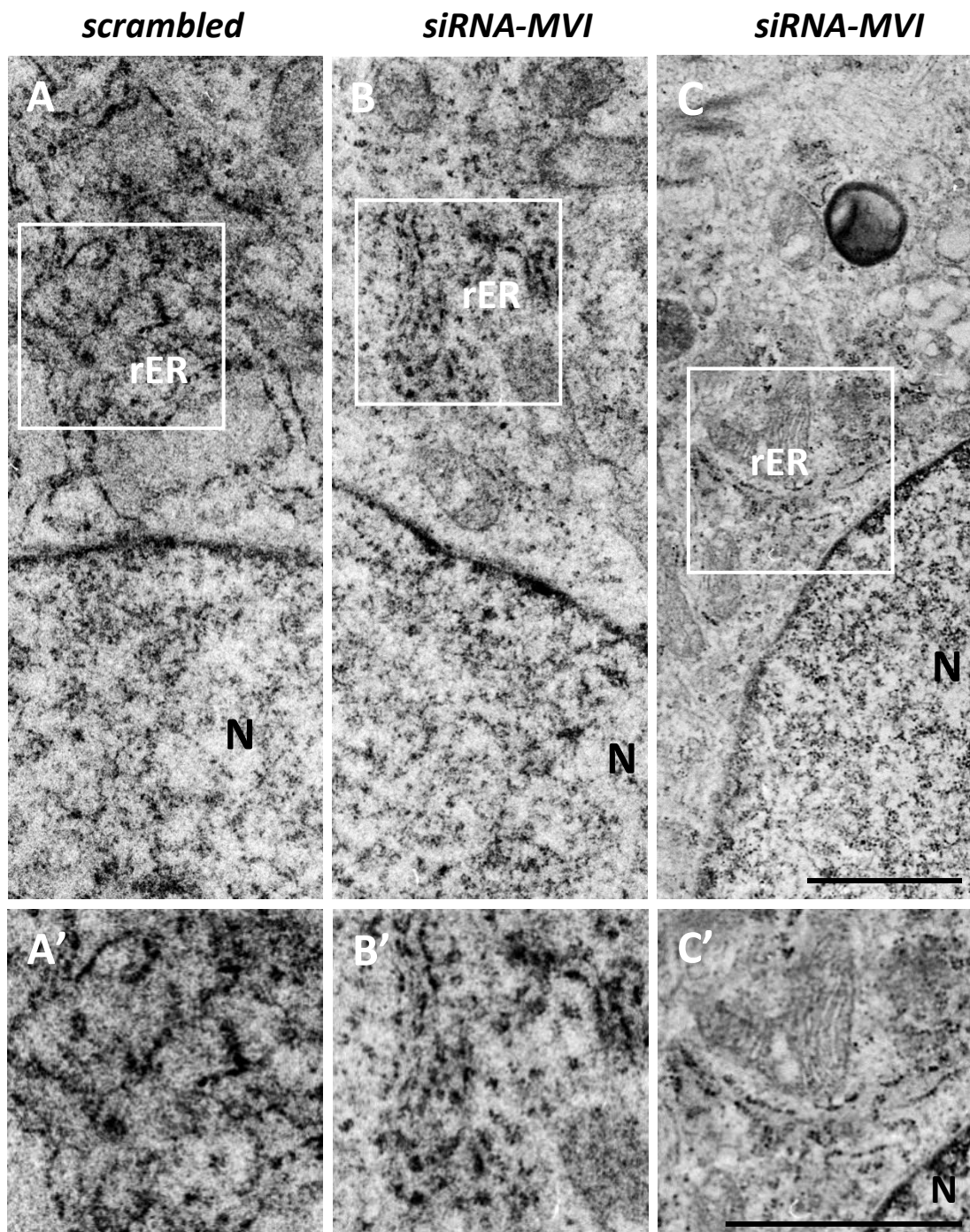
Z uzyskanych w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych wyników (Majewski i in. 2018) wiadomo, że w komórkach PC12 MVI lokalizuje się w pobliżu ER (Rycina 4.26). Dlatego postanowiłam sprawdzić, czy i jak obniżony poziom MVI wpływa na organizację ER oraz lokalizację i poziom białka rybosomalnego S6, wykrytego jako potencjalny partner MVI.



**Rycina 4.26. Lokalizacja MVI w pobliżu retikulum endoplazmatycznego (ER).** Znakowanie komórek techniką immunogold z wykorzystaniem przeciwciała I-rzędowego przeciwko MVI oraz II-rzędowego sprzężonego ze złotem koloidalnym (średnica cząstek złota 15 nm). C- cytoplazma. Skala 250 nm (Majewski i in. 2018).

##### **4.8.1. Wpływ obniżonego poziomu MVI na organizację ER z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i konfokalnej**

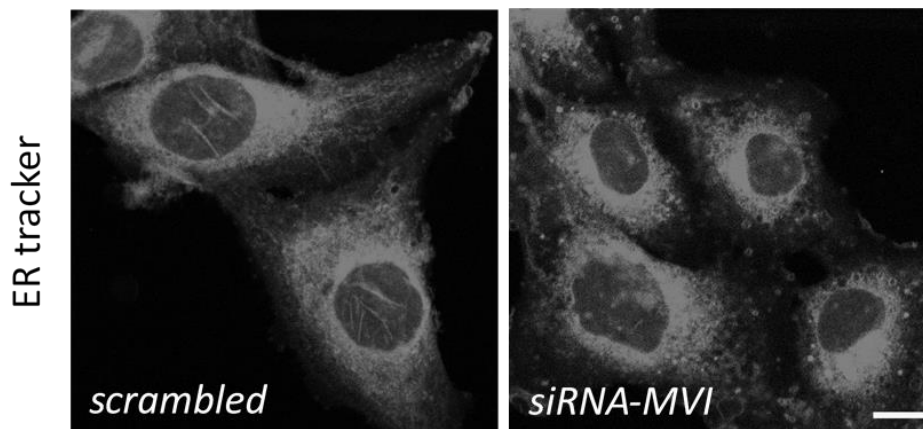
Następnie postanowiłam zbadać ultrastrukturę ER w komórkach *siRNA-MVI* przy użyciu mikroskopii elektronowej. Zaobserwowałam, że w komórkach tych dochodzi do zaburzenia w organizacji błon ER [(na błonach szorstkiego ER (rER) były widoczne tylko nieliczne, oddalone od siebie rybosomy)] (Rycina 4.27).



**Rycina 4.27.** Ultrastruktura ER w komórkach *siRNA-MVI* (B, B' i C, C') oraz komórkach *scrambled* (A, A'). N-jądro komórkowe, rER- szorstkie retikulum endoplazmatyczne. A', B', C' - ~ 1,5x powiększenia obrazów zaznaczonych na górnych panelach. Skala 2  $\mu\text{m}$ .

W kolejnym etapie badań wykonałam barwienie przyżyciowe komórek *siRNA-MVI* z wykorzystaniem barwnika ER tracker<sup>TM</sup>Blue-WhiteDPX wiążącego się specyficznie z błonami ER (barwnik ten jest wysoce selektywny dla ER, stosowany w niskich stężeniach nie jest toksyczny dla komórek; częściowo pozostaje w komórce po

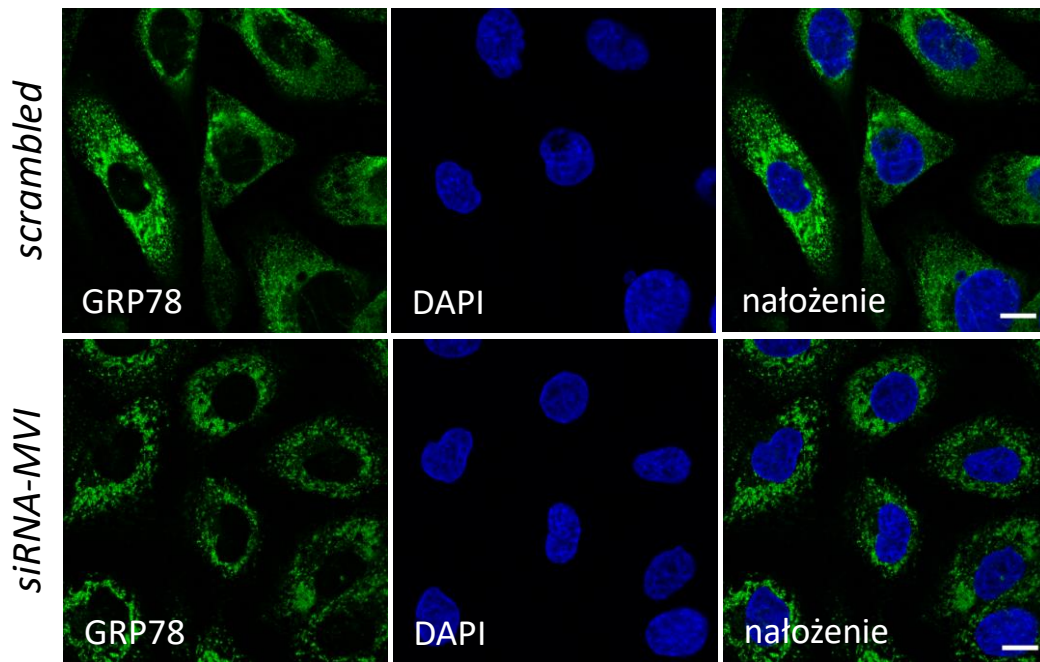
traktowaniu formaldehydem). Komórki po inkubacji z barwnikiem ER tracker<sup>TM</sup>Blue-WhiteDPX analizowałam z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (Rycina 4.28).



Rycina 4.28. Barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* i komórek *scrambled* z wykorzystaniem znacznika ER (ER tracker<sup>TM</sup> Blue-WhiteDPX). Przedstawiony obraz pochodzi ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Skala 10  $\mu\text{m}$ .

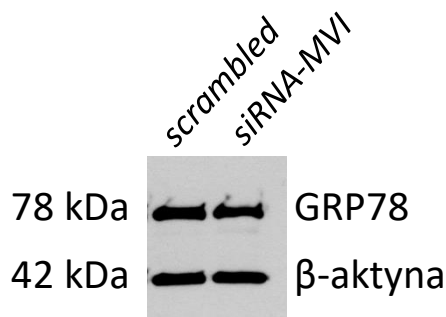
Jak widać na Rycinie 4.28, w komórkach *siRNA-MVI* dochodzi do wyraźnych zmian w morfologii ER. ER jest pofragmentowane i rozproszone. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem sugestię, że MVI bierze udział w organizacji ER.

Ponieważ prawidłowe funkcje rER są utrzymywane m.in. dzięki aktywności białek opiekuńczych (czaperonów), które odpowiadają za prawidłową konformację powstających białek (chronią przed nieprawidłową agregacją białek) postanowiłam sprawdzić, czy MVI wpływa na lokalizację białka opiekuńczego GRP78 (ang. 78-kDa *glucose-regulated protein*), znajdującego się w świetle ER. Barwienie przeciwko białku GRP78 wykazało znaczne zmiany w organizacji struktur ER w komórkach *siRNA-MVI*. Struktury ER są bardziej pofragmentowane i mniej uporządkowane, w porównaniu do komórek kontrolnych (Rycina 4.29).



**Rycina 4.29. Barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* oraz komórek *scrambled*.** Do barwień wykorzystano przeciwciało anti-GRP78 (zielony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI. Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Nie zaobserwowano natomiast zmian w poziomie GRP78 w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled* (Rycina 4.30).



**Rycina 4.30. Poziom syntezy GRP78 w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled*.** Western Blot po inkubacji z przeciwciałem anti-GRP78. Jako białko referencyjne użyto  $\beta$ -aktynę.

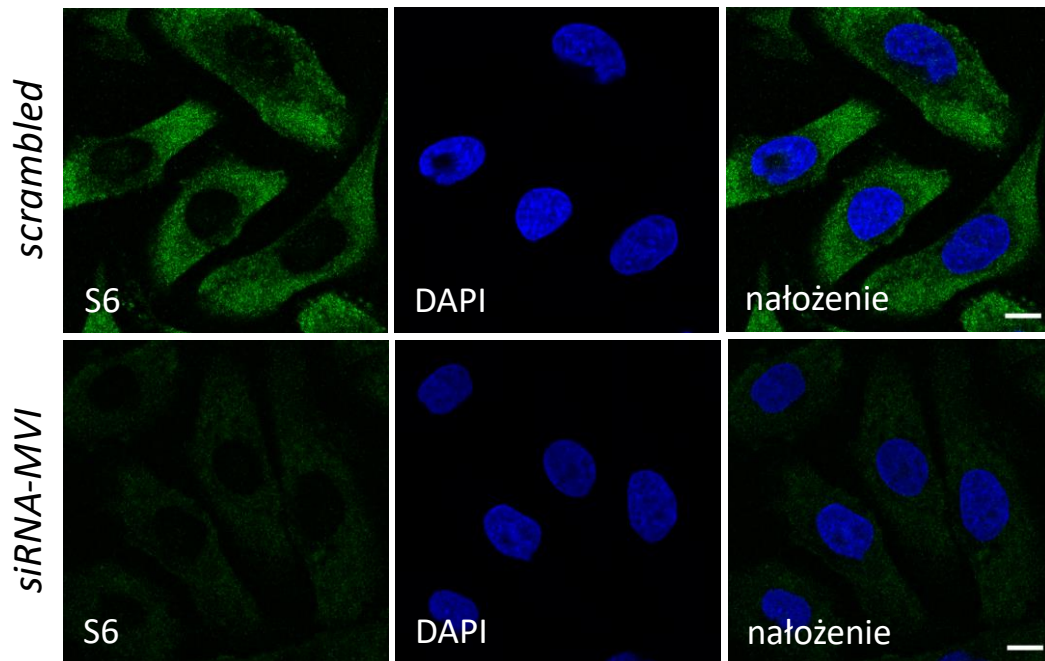
Podsumowując, MVI wpływa na morfologię ER, ale nie na poziom białka opiekuńczego ER, jakim jest białko GRP78.

#### 4.8.2. Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację i poziom białka rybosomalnego S6

Ponieważ białko rybosomalne S6, wykryto jako potencjalny jądrowy partner MVI, postanowiłam zbadać, czy obniżenie poziomu MVI wpływa na lokalizację i poziom

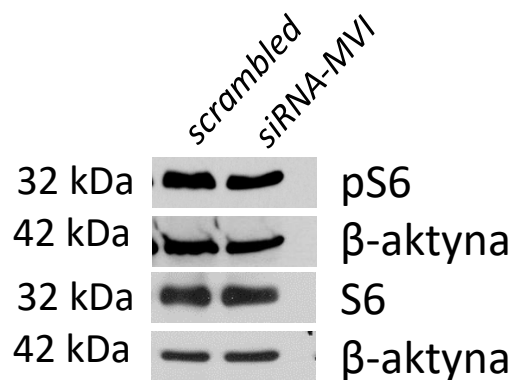
białka S6. W tym celu przeprowadziłam barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko S6.

Analizując obrazy z mikroskopu konfokalnego zaobserwowałam, że w komórkach *siRNA-MVI* barwienie przeciwko S6 było znacznie mniej intensywne w porównaniu do komórek *scrambled*, co może sugerować zaburzenia w organizacji i funkcjonowaniu rybosomów (Rycina 4.31).



**Rycina 4.31. Barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* oraz komórek *scrambled*.** Do barwień wykorzystano przeciwciało anti-S6 (zielony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI. Przedstawione obrazy pochodzą ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Nie zaobserwowałam natomiast zmian w poziomie S6 oraz jego formy aktywnej (pS6) w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled* (Rycina 4.32).



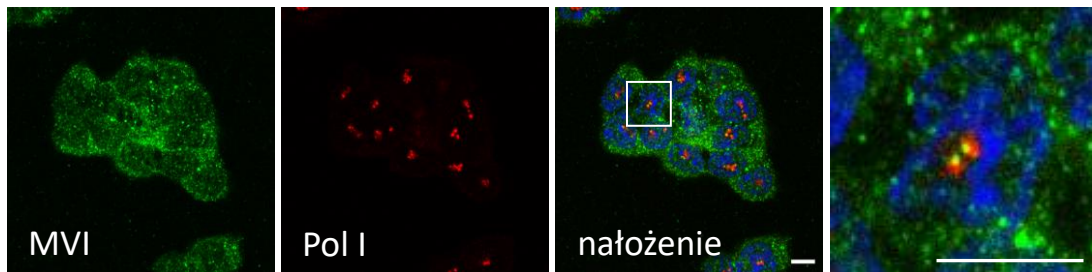
**Rycina 4.32. Poziom syntezy S6 i pS6 w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled*.** Western Blot po inkubacji z przeciwciałami: anti-pS6 i anti-S6. Jako białka referencyjne użyto  $\beta$ -aktynę.



#### 4.9. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom 45S pre-rRNA

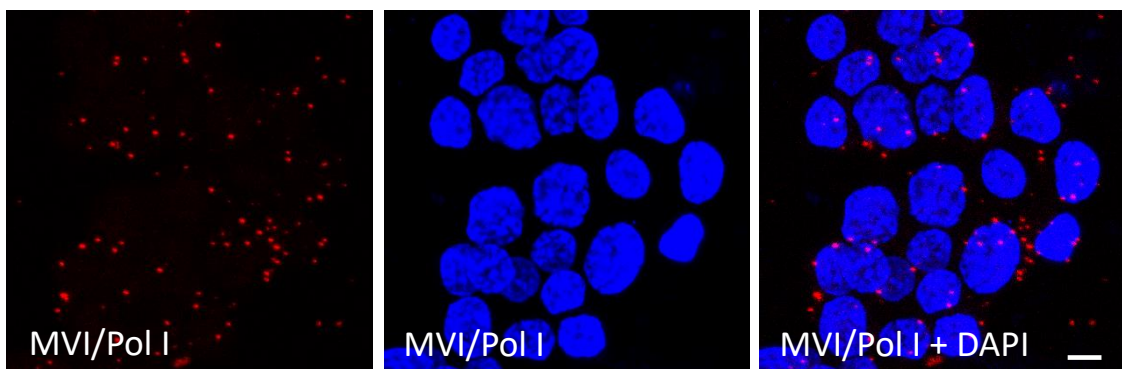
Przedstawione dotychczas wyniki wskazują na udział MVI w organizacji jąderka i ER. Postanowiłam zatem zbadać czy obniżony poziom MVI wpływa na poziom 45S pre-rRNA, który jest pierwszym i niestabilnym produktem transkrypcji rDNA. Ponieważ 45S pre-rRNA ulega szybkim przemianom do dojrzałych 5S, 18S i 28S rRNA, poziom 45S pre-rRNA jest miarą aktywności Pol I (Mayer i Grummt 2005).

Aby zobrazować potencjalne oddziaływanie MVI z Pol I w komórce, wykonałam barwienie immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciała przeciwko MVI oraz przeciwciała przeciwko Pol I (Rycina 4.33).



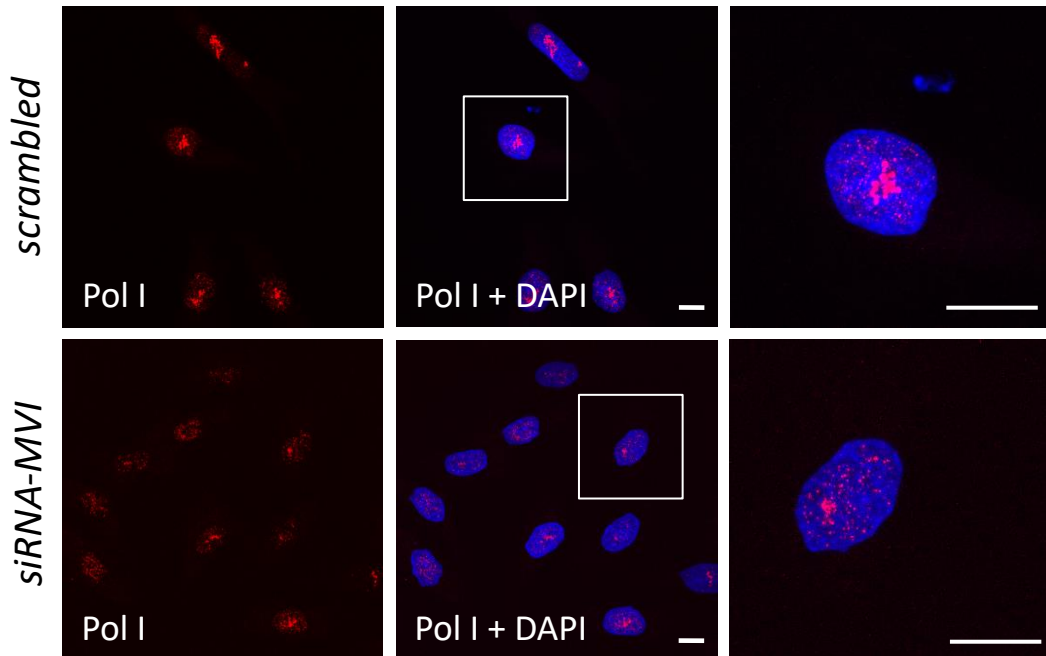
**Rycina 4.33. Współwystępowanie MVI oraz Pol I, znacznika obszaru FC jąderka w komórkach PC12.** Barwienie immunofluorescencyjne komórek z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał: anti-MVI (zielony) oraz anti-Pol I (czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Przedstawiony obraz pochodzi ze skanowania pojedynczej warstwy preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$ . Panel prawy -  $\sim 6\times$  powiększenie obrazu zaznaczonego na panelu „nałożenie”. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Analiza uzyskanych obrazów immunofluorescencyjnych wskazuje na współwystępowanie obu białek. W celu zobrazowania i zlokalizowania kompleksów MVI/Pol I wykorzystałam metodę zblizeniowej ligacji *in situ*, PLA (Rycina 4.34).



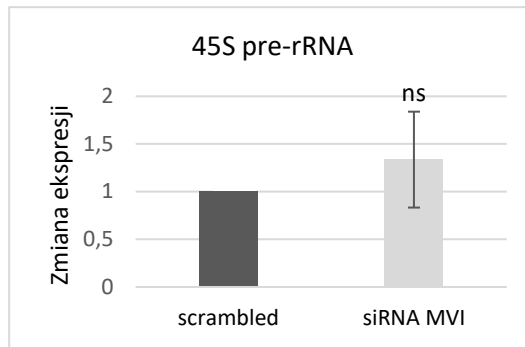
**Rycina 4.34. Metoda zblizeniowej ligacji *in situ*, PLA.** Analiza sygnału PLA wskazuje na tworzenie kompleksów MVI/Pol I w komórkach PC12 (fluorescencyjne punkty odpowiadają miejscu oddziaływań obu białek). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieski). Obraz pochodzi ze skanowania ok. 40 warstw preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$  każda. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Z wykorzystaniem tej metody potwierdziłam oddziaływanie MVI z Pol I (Rycina 4.34). W kolejnym etapie przeprowadziłam barwienia immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* oraz komórek *scrambled* z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko Pol I (Rycina 4.35).



**Rycina 4.35. Barwienie immunofluorescencyjne komórek *siRNA-MVI* i komórek *scrambled*.** Do barwień wykorzystano przeciwciało anti-Pol I (czerwony). Jądra komórkowe wybarwiono DAPI. Obrazy pochodzą ze skanowania ok. 40 warstw preparatu o grubości 0,3  $\mu\text{m}$  każda. Panele prawe -  $\sim 3\text{x}$  powiększenia obrazów zaznaczonych na środkowych panelach. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Analizując obrazy z mikroskopu konfokalnego zaobserwowałam, że w komórkach *siRNA-MVI* barwienie przeciwko Pol I było znacznie mniej intensywne w porównaniu do komórek *scrambled* (Rycina 4.35). Następnie sprawdziłam, czy zmienia się poziom 45S pre-rRNA w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled* stosując metodę *q-PCR* (Rycina 4.36).



**Rycina 4.36. Poziom ekspresji 45S pre-rRNA w komórkach *siRNA-MVI* określony metodą *q*-PCR.** Analiza ekspresji 45S pre-rRNA w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled* dokonana za pomocą metody  $\Delta\Delta C_t$ . Wyniki normalizowano względem 18S rRNA. N=3; ns-brak istotności statystycznej.

Analiza *q*-PCR nie wykazała istotnych zmian w poziomie ekspresji 45S pre-rRNA w komórkach *siRNA-MVI* w porównaniu do komórek *scrambled*. Może to świadczyć o tym, iż MVI nie odgrywa znaczącej roli w transkrypcji rDNA.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że MVI jest zaangażowana w organizację jąderka i ER ale nie wpływa na poziom 45S pre-rRNA.



## **5. DYSKUSJA**

## 5.1. Wprowadzenie

Miozyna VI jest jedną z najbardziej fascynujących miozyn niekonwencjonalnych, ponieważ w odróżnieniu od pozostałych miozyn porusza się w kierunku końca minus filamentu aktynowego. O obecności MVI w jądrze wiadomo od ponad dekady, kiedy to pokazano, że w transkrypcyjnie aktywnych komórkach HeLa, MVI oddziałuje z kompleksem Pol II i współwystępuje z nowopowstałymi transkryptami (Vreudge i in. 2006). Późniejsze badania prowadzone w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych na komórkach neurosekrecyjnych PC12, wyprowadzonych z guza rdzenia nadnerczy szczura potwierdziły te obserwacje (Majewski i in. 2018). Co więcej, wykazano, że po stymulacji komórek PC12, dochodzi do wzrostu ilości MVI w jądrze komórkowym i nasilenie jej kolokalizacji z aktywną formą Pol II (Majewski i in. 2018). Analiza spektrometrii mas wykazała ponadto wiele nowych, potencjalnych jądrowych ligandów MVI, które mogą wpływać na pełnienie przez nią nowych funkcji w jądrze komórkowym. Wśród nich znalazła się nukleolina, białko charakterystyczne dla jąderka, biorące udział w biogenezie rybosomów oraz białka rybosomalne małej 40S (S6, S4, S3) i dużej 60S (L7) podjednostki rybosomu, które poza rolą w biogenezie rybosomów pełnią funkcje w syntezie białek. Wyniki analizy spektrometrii mas, jak też wcześniejsze dane mówiące o współwystępowaniu MVI z kalretikulina – markerem ER (Majewski i in. 2010), zainspirowały mnie do zbadania potencjalnej roli MVI w jąderku i jej wpływu na syntezę białka.

## 5.2. Analiza oddziaływania MVI z S6

Białko rybosomalne S6 to jedno z białek zidentyfikowanych metodą spektrometrii mas jako białko potencjalnie oddziałujące z MVI w komórkach PC12 (Majewski i in. 2018). Wcześniejsze prace naszego zespołu wykazały, że białko S6 może być również nowym potencjalnym, partnerem MVI w mięśniach szkieletowych (Karolczak i in. 2013). Białko S6 wchodzi w skład małej podjednostki rybosomu 40S, wiąże RNA i bierze udział w translacji (Meyuhas 2008). Występuje ono też w obszarze DFC jąderka, gdzie bierze udział w dojrzewaniu pre-rRNA (Ferreira-Cerca i in. 2005; Krüger i in. 2007; Yi i in. 2022). Białko S6 jest również czaperonem RNA, dzięki czemu zapewnia stabilizację oraz prawidłowe fałdowanie rRNA podczas montażu podjednostek rybosomów w obszarze GC jąderka. Białko S6 to pierwsze zidentyfikowane białko rybosomalne ulegające

fosforylacji (Gressner i Wool 1974) i jedno z dwóch ulegające tej modyfikacji potranslacyjnej (Khalailah i in. 2013). Badania nad rolą fosforylacji S6 prowadzone przez Zhang i in. (2016) wykazały, że modyfikacja ta jest niezbędna dla dojrzewania prekursora 18S rRNA, ale nie jest wymagana dla importu S6 do jądra i jej lokalizacji w jąderku. Białko S6 uczestniczy także w jądrowym eksporcie podjednostki 40S do cytoplazmy (Ferreira-Cerca i in. 2005). W komórkach HeLa, obniżenie poziomu S6 powoduje akumulację pre-rRNA w jąderku i spadek poziomu dojrzałego 18S rRNA bez wpływu na formowanie dojrzałych 28S i 5.8S rRNA (Robledo i in. 2008).

Wyniki badań przeprowadzonych w toku realizacji niniejszej rozprawy wykazały, że białko S6 oddziałuje z MVI w komórkach PC12 (Tabela 5.1) i występuje razem z nim w jądrze komórkowym, obszarze okołojądrowym oraz cytoplazmie. Obserwacje te wskazują na możliwość zaangażowania MVI w (1) imporcie S6 z cytoplazmy (gdzie białko to jest syntetyzowane) do jąderka (gdzie, łącznie z innymi białkami oraz rRNA wchodzi w skład małej podjednostki rybosomu 40S) (Fromont-Racine i in. 2003; Li i Wang 2020) oraz (2) eksporcie małej podjednostki 40S (której składową jest S6) z jąderka do nukleoplazmy i przez pory jądrowe do cytoplazmy, gdzie wraz z podjednostką 60S tworzy dojrzały rybosom i bierze udział w syntezie białek.

**Tabela 5.1. Podsumowanie oddziaływań MVI z badanymi białkami.**

	Białka jąderkowe				Białka rybosomalne/ER	
	UBF	Fibrylaryna	B23	Nukleolina	S6	GRP78
<b>Marker struktury jąderka</b>	<b>FC</b>	<b>DFC</b>	<b>GC</b>	<b>GC</b>	n/d	n/d
<b>Oddziaływanie z MVI</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Wpływ obniżonego poziomu MVI na lokalizację białek</b>	-	-	+	n/b	n/d	n/d
<b>Wpływ obniżonego poziomu MVI na organizację ER/rybosomów</b>	n/d	n/d	n/d	n/d	+	+

n/b nie badano; n/d nie dotyczy; FC - centrum fibrylarne; DFC- składnik fibrylarny, GC- składnik ziarnisty jąderka.

Również badania prowadzone przez Cisterna (2006) wykazały, że inna miozyna jądrowa, izoforma B miozyny IC ulega precypitacji z białkiem S6 oraz wspólnie z nim (co pokazała technika immunogold) występuje na peryferium jądra i w porach jądrowych co wskazuje na jej funkcję transportową (Cisterna i in. 2006). Badacze Ci, wysnuli również hipotezę, że aktywny, zależny od izoformy B miozyny IC, ruch małej podjednostki rybosomu 40S z jąderka do cytoplazmy, może być odpowiedzialny za eksport ~ 10% tych podjednostek (Cisterna i in. 2006). Obecnie sugeruje się też, że za uwalnianie podjednostek rybosomów z jąderka do cytoplazmy odpowiada mechanizm dyfuzji. Występowanie tego podwójnego mechanizmu uwalniania podjednostek rybosomów gwarantuje, że ruch części podjednostek rybosomów może być modulowany (zwiększony lub zmniejszony) w zależności od potrzeb komórki (Udem i Warner 1973; Gleizes i in. 2001) w precyzyjnym momencie cyklu komórkowego.

Interesującym byłoby zatem zbadanie, czy MVI występuje wraz z S6 w jąderku oraz w pobliżu porów jądrowych, co wskazywałoby na zaangażowanie MVI w import S6 do jądra i w eksport podjednostki 40S do cytoplazmy. Takich danych dostarczą nam analizy techniką immunogold z zastosowaniem przeciwciał skierowanych na MVI i S6. Kolejnym ciekawym zagadnieniem byłoby zablokowanie MVI i sprawdzenie czy indukuje ono akumulację S6 w jąderku.

O tym, że MVI w jądrze może przemieszczać się między jądrem a cytoplazmą a tym samym pełnić funkcję transportową, wiadomo z wcześniejszych badań przeprowadzonych w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych (Majewski i in. 2018). W łańcuchu ciężkim MVI zidentyfikowano siedem potencjalnych sekwencji lokalizacji jądrowej NLS oraz jedną potencjalną sekwencję warunkującą jej import do jądra, NES (Majewski i in. 2018), które wydają się być funkcjonalne. Wykazano bowiem, że inkubacja komórek neurosekrecyjnych PC12 z inhibitorem importu (iwermektyną) i eksportu jądrowego (leptomycyną B) hamuje, odpowiednio, translokację MVI do jądra i jej eksport z jądra (Majewski i in. 2018). Co więcej, z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i techniki immunogold, pokazano obecność MVI w pobliżu poru jądrowego, zarówno po stronie nukleoplazmy jak i cytoplazmy, co również wskazuje na możliwość przemieszczania się tego motoru pomiędzy jądrem i cytoplazmą (w zależności od potrzeb komórki z wykorzystaniem mechanizmów importu i eksportu jądrowego) (Majewski i in. 2018).

### 5.3. Analiza oddziaływania MVI z nukleoliną

Potwierdziłam też możliwość oddziaływania MVI z nukleoliną, białkiem charakterystycznym dla jąderka (Tabela 5.1). Ponieważ nukleolina bierze udział na każdym z etapów biogenezy rybosomów (transkrypcja rDNA, dojrzewanie i modyfikacje rRNA, składanie podjednostek rybosomów oraz ich transport do cytoplazmy (Tuteja i Tuteja 1998; Ginisty i in. 1999; Lo i in. 2006; Mongelard i Bouvet 2007; Tonello i in. 2022)), można sądzić o udziale MVI w tych procesach (jako, że wyspecjalizowane funkcje MVI są determinowane związaniem określonego partnera białkowego). Ponieważ C-końcowy region nukleoliny (GAR), który zawiera domeny bogate w reszty argininy/glicyny odpowiada za jej interakcje z innymi białkami (w tym z białkami rybosomalnymi, m.in. S6) (Ghisolfi i in. 1992; Bouvet i in. 1998; Abdelmohsen i in. 2011), można przypuszczać, że jest on również odpowiedzialny za jej oddziaływanie z MVI. Powinowactwo nukleoliny do białek rybosomalnych sugeruje udział nukleoliny w składaniu podjednostek rybosomów w jądrze (Bouvet i in. 1998) i prawdopodobny jej udział w transporcie tych podjednostek do cytoplazmy (Xue i Melese 1994). Ponieważ MVI również oddziałuje z białkami rybosomalnymi (m.in. ze wspomnianym wyżej S6), można wnioskować, że w kompleksie z nukleoliną jest ona zaangażowana w te same, co nukleolina procesy.

O tym, że MVI i nukleolina mogą wchodzić w skład tych samych kompleksów białkowych (i uczestniczyć w organizacji chromatyny) świadczy również fakt, że oba białka oddziałują z histonami i regulują transkrypcję. Ujemnie naładowana domena N-końcowa nukleoliny odpowiada za interakcje z histonem H1 i dekondensację chromatyny, dzięki czemu ułatwia transkrypcję rDNA (Tuteja i Tuteja 1998). Również wcześniejsze badania prowadzone w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych potwierdziły oddziaływanie MVI z aktywną (acetylowaną) formą histonu H3 (histonem H3AcK9) (Majewski i in. 2018).

Aby scharakteryzować nowe oddziaływania MVI z nukleoliną oraz MVI z S6 niezbędne są jednak dalsze badania z wykorzystaniem rekombinowanych białek. Nie wykazano jak dotąd, czy oddziaływanie MVI-nukleolina oraz MVI-S6 ma charakter pośredni czy bezpośredni oraz jakie motywy w obu parach białek/MVI-nukleolinie oraz MVI-S6/odpowiadają za ich wzajemne interakcje.

#### 5.4. Analiza lokalizacji MVI w jąderku i identyfikacja nowych partnerów MVI w jąderku

Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej i techniki immunogold pokazały, że MVI lokalizuje się głównie w obszarze DFC jąderka oraz obszarze GC (Rycina 4.11). Lokalizacja MVI w obszarze DFC i GC jąderka jest zgodna z badaniami prowadzonymi przez Cisterna (2006), które wykazały, że w komórkach HeLa białko rybosomalne S6, z którym najprawdopodobniej oddziałuje MVI, również lokalizuje się w obszarze DFC i GC jąderka. Poza tym, wykazana przeze mnie możliwość oddziaływania MVI z nukleoliną, obecnej we wszystkich obszarach jąderka, zdaje się potwierdzać tę hipotezę.

Wykazałam również, że MVI oddziałuje z UBF (znacznikiem FC), fibrylaryną (znacznikiem DFC) oraz B23 (znacznikiem GC) (Tabela 5.1). W obszarze FC jąderka odbywa się transkrypcja rDNA, w obszarze DFC dojrzewanie i modyfikacja pre-rRNA a w obszarze GC jąderka składanie podjednostek rybosomów. Zatem oddziaływanie MVI z białkami charakterystycznymi dla wszystkich trzech obszarów jąderka może sugerować jej zaangażowanie na wszystkich etapach biogenezy rybosomów.

Jak dotąd w literaturze brak było danych na temat obecności MVI w jąderku. Znane są natomiast dwie inne miozyny obecne w tej strukturze jądra. Są to izoforma B miozyny IC oraz miozyna VB (Nowak i in. 1997; Lindsay i McCaffrey 2009). Izoforma B miozyny IC współwystępuje z miejscami aktywnej transkrypcji związanej z Pol I, a obniżenie syntezy tej miozyny prowadzi do zahamowania transkrypcji rDNA (Nowak i in. 1997; Philimonenko i in. 2004). Izoforma B miozyny IC oddziałuje z kompleksem Pol I za pośrednictwem czynnika inicjującego transkrypcję TIF1A. Uważa się, że izoforma ta oddziałując z TIF1A uczestniczy w inicjacji transkrypcji (Philimonenko i in. 2004). Z kolei miozyna VB kolokalizuje z Pol I i z nowo syntetyzowanymi rRNA (Lindsay i McCaffrey 2009). Wykazano ponadto bezpośrednio jej oddziaływanie z kompleksem Pol I i aktywności, co również potwierdza jej udział w transkrypcji rDNA (Lindsay i McCaffrey 2009).

Białka, które zlokalizowane są w jąderku zawierają na ogół sygnał/sekwencję NoLS (ang. *nucleolar localization sequence*). Cechą charakterystyczną tych sekwencji jest zawartość aminokwasów zasadowych (Scott i in. 2010). W sekwencji MVI zidentyfikowałam jedną potencjalną sekwencję NoLS, która może warunkować jej jąderkową lokalizację. Region ten nie wykazuje jednak homologii do innych domen, w

tym kluczowych dla jąderekowej lokalizacji innych białek. Co ciekawe jednak, sygnał NoLS pokrywa się z jedną z siedmiu sekwencji NLS (ang. *nuclear localization sequence*) zlokalizowanych w sekwencji aminokwasowej MVI, które umożliwiają jej transport do jądra (Majewski i in. 2018). Można zatem przypuszczać, że istnieje ścisły związek między lokalizacją MVI w jąderku, a jej importem z cytoplazmy do jądra. Niezbędne są jednak dalsze badania, które potwierdzą funkcjonalność sygnału NoLS obecnego w sekwencji aminokwasowej MVI.

W przypadku miozyny VB, zidentyfikowano jeden sygnał NoLS, który pokrywa się z motywem IQ wiążącym kalmodulinę; wykazuje on także homologię do domeny wiążącej RNA niezbędnej dla jąderekowej lokalizacji białka Nop25 (Fujiwara i in. 2006).

Uważa się również, że za kierowanie białek do jąderka oraz ich lokalizację jąderekową mogą odpowiadać pośrednie lub bezpośrednie oddziaływania tych białek z innymi białkami jąderekowymi i/lub RNA (Li i in. 1996; Emmott i Hiscox 2009). Ponieważ analizy bioinformatyczne nie wykazały w sekwencji MVI obecności domeny wiążącej RNA, można sądzić, że za lokalizację jąderekową MVI mogą odpowiadać również inne ligandy białkowe. Ponieważ nukleolina i B23 to białka przemieszczające się między jąderkiem a nukleoplazmą (ang. *shuttle protein*) można przypuszczać, że pośredniczą one w lokalizacji jąderekowej MVI.

Nie określono jak dotąd charakteru oddziaływań pomiędzy białkami jąderekowymi, będącymi potencjalnymi partnerami MVI a samą MVI oraz motywów/reszt aminokwasowych, które odpowiadałyby za ich wzajemne interakcje. Wiadomo natomiast, że MVI oddziałuje z innymi ligandami białkowymi za pośrednictwem domeny wiążącej cargo (CBD, ang. *cargo binding domain*), zlokalizowanej w pałeczce MVI (Fili i in. 2017). Znane są również domeny, które odpowiadają za oddziaływanie tych białek jąderekowych, z ich innymi ligandami.

UBF, czynnik transkrypcyjny niezbędny w inicjacji transkrypcji rDNA, oddziałuje z rDNA za pośrednictwem domen HMG (Copenhaver i in. 1994). MVI może być zatem rekrutowana do DNA (i RNA) poprzez to białko a oddziaływanie MVI-UBF mogłoby sugerować udział MVI w transkrypcji rDNA. Kolejny potencjalny partner MVI, fibrylaryna oddziałuje z innymi białkami m. in. z białkiem Nop56/58, 15.5K i snoRNA (ang. *small nucleolar ribonucleoprotein*) poprzez rejon  $\alpha$ -helisy, zlokalizowany w domenie metylotransferazy (*Mtase domain*) (Wang i in. 2000). Można sądzić, że ten region jest również odpowiedzialny za oddziaływanie fibrylaryny z MVI, a interakcja obu białek może sugerować udział MVI w dojrzewaniu rRNA. Inny potencjalny partner MVI,

białko B23 oddziałuje z białkami jądrowymi (np. nukleoliną i fibrylaryną) oraz białkami rybosomalnymi (L5, S9 i L23) (Lindstrom i Zhang 2008; Wanzen i in. 2008) za pośrednictwem domeny zlokalizowanej na N-końcu białka (Namboodiri i in. 2004). Można zatem przypuszczać, że ten region białka B23 może być również odpowiedzialny za oddziaływanie z MVI, a ich interakcja może sugerować zaangażowanie MVI w składanie rybosomów.

Dane literaturowe pokazują, że B23 dzięki sekwencji NES, uczestniczy w transporcie podjednostek 40S i 60S z jądra do nukleoplazmy (Maggi i in. 2008). Ponieważ MVI również posiada sekwencję NES, można przypuszczać, że i ona bierze udział w tym procesie. Co więcej, białko B23 oddziałuje z podjednostkami rybosomalnymi 60S, z którymi oddziałują m.in. hnRNPU oraz nukleolina (Okuwaki i in. 2021), a więc białka będące potencjalnymi partnerami MVI (Majewski i in. 2018). Ta obserwacja sugeruje możliwość występowania MVI w wieloskładnikowym kompleksie z B23 oraz nukleoliną.

Zatem obecność MVI w jąderku, oddziaływanie z białkami jądrowymi charakterystycznymi dla różnych jego obszarów pozwalają sądzić o zaangażowaniu MVI na różnych etapach biogenezy rybosomów.

## **5.5. Wpływ stresu jądrowego na lokalizację MVI**

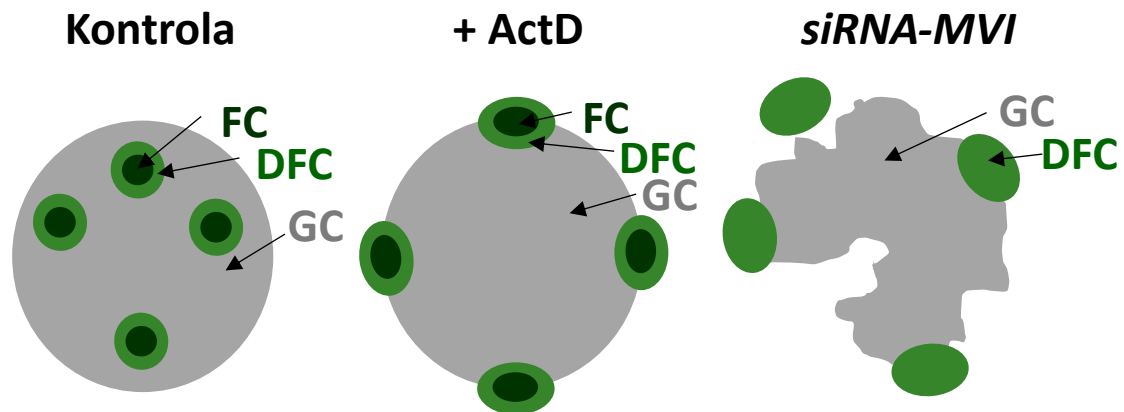
Aby sprawdzić, czy MVI bierze udział w transkrypcji rDNA, komórki PC12 traktowałam inhibitorem syntezy rRNA, ActD w stężeniu 50 ng/ml hamującym aktywność Pol I, bez wpływu na aktywność Pol II (Perry i Kelley 1970; Torrano i in. 2006). ActD indukuje rozpad jąderka, w wyniku którego geny rRNA oraz UBF, kluczowy czynnik transkrypcyjny genów rRNA przemieszczają się z obszaru FC jąderka na peryferium jąderka tworząc typowe struktury, określane jako „*nucleolar caps*” (Journey i Goldstein 1961; Jordan 1996). Wiadomo również, że pod wpływem stresu indukowanego ActD dochodzi do translokacji białek obszaru GC jąderka (nukleoliny i B23) do nukleoplazmy. Niestety, w naszych badaniach, w warunkach działania ActD nie zaobserwowałam gromadzenia MVI w strukturach „*nucleolar caps*”, co może wskazywać na brak wpływu MVI na transkrypcję rDNA. Uzyskane wyniki wskazują również na to, że lokalizacja MVI w jąderku nie zależy od aktywnej transkrypcji rDNA.

W przypadku miozyny VB, o której wiemy, że uczestniczy w transkrypcji rDNA zaobserwowano, że po traktowaniu komórek ActD (w stężeniu hamującym aktywność



Pol I) dochodzi do przemieszczenia się tej miozyny z jąderka na jego obrzeża oraz jej kolokalizację w tych obszarach z białkiem UBF i Pol I (Lindsay i McCaffrey 2009).

Badając wpływ ActD na strukturę jąderek z wykorzystaniem badań ultrastrukturanych techniką mikroskopii elektronowej wykazałam drastyczne zmiany w organizacji jąderka komórek traktowanych ActD; nie uwidoczniło w nim typowych obszarów charakterystycznych dla prawidłowej struktury jąderka (Rycina 4.17 i 5.1).



**Rycina 5.1. Proponowany schemat przedstawiający organizację jąderka w komórkach PC12 w warunkach stresu jąderkowego (pod wpływem działania ActD) i po obniżeniu poziomu MVI. FC - centrum fibrylarne; DFC- składnik fibrylarny, GC- składnik ziarnisty jąderka.**

Widoczne były natomiast bezpostaciowe, resztkowe jąderka, w których obszar FC występował na ich peryferiach. Uzyskane przeze mnie obrazy jąderek są zatem typowym obrazem komórek traktowanych ActD (Hernandez-Verdun i in. 2010). Powyższa obserwacja stanowi zatem dowód na to, że stężenie ActD użyte w doświadczeniu, mającym na celu zbadanie wpływu stresu jąderkowego na lokalizację MVI i jej udział w transkrypcji rDNA było optymalne aby nastąpił rozpad jąderka komórek PC12.

## **5.6. Wpływ obniżonego poziomu MVI na ultrastrukturę jąderka i na lokalizację białek jąderkowych**

Analizując obrazy uzyskane z mikroskopu elektronowego wykazałam, że obniżenie poziomu MVI prowadzi do drastycznych zmian w ultrastrukturze jąderka (Rycina 4.21 i 5.1). W komórkach *siRNA-MVI* nie można było wyróżnić trzech typowych obszarów jąderka w porównaniu do komórek kontrolnych *scrambled*. Zaobserwowałam natomiast, że struktura tych jąderek jest bardziej rozproszona; co więcej, doszło w nich do delokalizacji obszarów jąderka. Uzyskany wynik może świadczyć o udziale MVI w

utrzymaniu właściwego kształtu i prawidłowej struktury/organizacji jąderka (prawidłowej lokalizacji białek jąderkowych) a tym samym o wpływie MVI na biogenezę rybosomów. Warto wspomnieć, że zaburzenia związane z biogenezą rybosomów, prowadzą do rybosomopatii (chorób związanych z powstawaniem i funkcjonowaniem rybosomów) (Kampen i in. 2020). Pomimo obecności innych miozyn w jąderku, nie zobrazowano ich udziału w utrzymaniu prawidłowej organizacji jąderka.

Kolejnym etapem badań była analiza wpływu obniżonego poziomu MVI na lokalizację białek jąderkowych charakterystycznych dla poszczególnych obszarów jąderka, w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu jąderkowego indukowanego ActD. W komórkach *scrambled* po traktowaniu ActD, UBF oraz fibrylaryna ulegają przemieszczeniu na obrzeża jąderka/poza obszar jąderka, tworząc typowe struktury „*nucleolar caps*”, zaś B23 przemieszcza się z obszaru GC jąderka do nukleoplazmy. Obserwowane zmiany w lokalizacji białek jąderkowych pod wpływem ActD są zgodne z doniesieniami literaturowymi (Shav-Tal i in. 2005; Boulon i in. 2010; Burger i in. 2010; Sweet i in. 1989; Yung i in. 1986; Yung i in. 1990). Warto również wspomnieć, że takie zmiany w lokalizacji białek jąderkowych pod wpływem ActD są odpowiedzią komórki na stres i wiążą się z rozpadem jąderka (Yang i in. 2018).

W komórkach z obniżonym poziomem MVI nie zaobserwowałam zmian w lokalizacji UBF w porównaniu do komórek *scrambled*. W obu typach komórek UBF występował w jąderku w postaci drobnych, luźno upakowanych skupisk. Uzyskane wyniki sugerują, że MVI nie wpływa na zachowanie jąderkowej lokalizacji UBF w warunkach kontrolnych. W przypadku fibrylaryny, również nie zaobserwowałam zmian w jego lokalizacji pomiędzy komórkami *scrambled* a komórek z obniżonym poziomem MVI. W obu typach komórek fibrylaryna była widoczna w postaci skupisk, licznych i drobnych (*scrambled*) lub dużych i zwartych (komórki z obniżonym poziomem MVI). Uzyskane wyniki wskazują, że MVI nie wpływa na zachowanie jąderkowej lokalizacji fibrylaryny w warunkach kontrolnych. Natomiast, w przypadku B23, w komórkach z obniżonym poziomem MVI zaobserwowałam zmianę jego lokalizacji z obszaru GC jąderka na całe jąderko w porównaniu do komórek *scrambled* (Tabela 5.1).

Wyniki te sugerują, że MVI bierze udział w utrzymaniu prawidłowej jąderkowej lokalizacji B23, a zatem może mieć wpływ na utrzymanie prawidłowej struktury jąderka. O roli B23 w zachowaniu integralności struktury jąderka świadczą badania prowadzone przez Amin i in. (2008), w których zaobserwowano, że obniżenie poziomu B23 w komórkach HeLa prowadzi do zmian w strukturze jąderek (dochodzi do fragmentacji

jąderek). Podobne wyniki uzyskano w badaniach Olausson i in (2014), w których obniżenie poziomu B23 w komórkach *osteosarcoma* i glejaka prowadzi do zniekształcenia jąderek.

Z kolei w komórkach z obniżonym poziomem MVI w warunkach stresu jąderkowego nie zaobserwowałam zmian w lokalizacji UBF w porównaniu do komórek *scrambled*; UBF lokalizowało się na obrzeżach jąderka. Powyższe obserwacje wskazują na brak wpływu MVI na jąderkową lokalizację UBF w warunkach stresu jąderkowego. Nie zaobserwowałam również różnic w lokalizacji fibrylaryny pomiędzy komórkami *scrambled* oraz komórek z obniżonym poziomem MVI w warunkach stresu jąderkowego. W obu typach komórek fibrylaryna występowała w postaci jednolitych skupisk. Obserwacje te wskazują na brak wpływu MVI na jąderkową lokalizację fibrylaryny w warunkach stresu.

Natomiast w komórkach z obniżonym poziomem MVI w warunkach stresu jąderkowego zaobserwowałam wzrost intensywności barwienia B23 w nukleoplazmie i obecność tego białka w obszarze GC jąderka w porównaniu do komórek *scrambled* (Tabela 5.1). Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że MVI wpływa na utrzymanie jąderkowej lokalizacji B23 w warunkach stresu.

Jak dotąd w literaturze ukazało się jedno doniesienie o wpływie białka Cacy BP/SIP (ang. *Calcyclin Binding protein and Siah-1 Interacting protein*) na prawidłową lokalizację białka B23 w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rosińska i Filipek 2018). Wykryto również, że w warunkach stresu białko Cacy BP/SIP odgrywa rolę w zachowaniu prawidłowej organizacji jąderka (Rosińska i Filipek 2018).

## **5.7. Wpływ obniżonego poziomu MVI na organizację ER**

Z uzyskanych w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych wyników (Majewski i in. 2018) wiadomo, że w komórkach PC12, MVI lokalizuje się w pobliżu ER. Dlatego postanowiłam sprawdzić, czy i jak obniżony poziom MVI wpływa na organizację ER. Obrazowanie przy użyciu mikroskopu elektronowego ujawniło, że w komórkach z obniżonym poziomem MVI dochodzi do zaburzenia w organizacji błon ER [(błony szorstkiego ER (rER) charakteryzowało występowanie tylko nielicznych rybosomów)] (Rycina 4.27). Zaburzenia w organizacji ER mogą wiązać się z zaburzeniem zachodzących w nich procesów tj. syntezy, składania, modyfikacji potranslacyjnych i transportu białek oraz zmian w poziomie białek istotnych dla

funkcjonowania ER. Dodatkowo analiza barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko białku opiekuńczemu ER, GRP78 wykazała, że struktura ER w komórkach z obniżonym poziomem MVI jest bardziej pofragmentowana i rozproszona w porównaniu do komórek *scrambled* (Rycina 4.29, Tabela 5.1). Podobne zmiany w organizacji ER w komórkach z obniżonym poziomem MVI uzyskano wykorzystując barwnik ER tracker<sup>TM</sup>Blue-White DPX, wiążący się specyficznym do błon ER. Co więcej, analiza obrazów uzyskana z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego wykazała, że w komórkach z obniżonym poziomem MVI barwienie na białko rybosomalne S6 jest zdecydowanie mniej intensywne niż w komórkach *scrambled* (Tabela 5.1). Wynik ten może oznaczać udział MVI w syntezie białka.

Na podstawie uzyskanych wyników można zatem wnioskować o udziale MVI w zachowaniu prawidłowej organizacji ER w komórkach PC12 oraz o wpływie MVI na funkcje ER, w tym m.in. na syntezę białek. Do ustalenia precyzyjnej roli MVI w organizacji ER przyczynią się z pewnością badania nad oddziaływaniem MVI z nowymi partnerami białkowymi, zaangażowanymi w funkcję ER/rybosomów, które zanalizowano metodą spektrometrii mas (Majewski i in. 2010).

O udziale MVI w organizacji ER świadczą również badania przeprowadzone w Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych przez dr Justynę Karolczak (Karolczak i in. 2013, 2015) i dr Małgorzatę Topolewską (Topolewska i in., dane nieopublikowane). Dr Justyna Karolczak wykazała, że w mysich mioblastach C2C12 z obniżonym poziomem MVI dochodzi do zmian w organizacji ER; ER w tych komórkach wydawało się być bardziej upakowane (zbite) w porównaniu do komórek *scrambled*. Co więcej, dr Justyna Karolczak wykazała, że jednym z partnerów MVI zarówno w mięśniach szkieletowych, jak i w mioblastach jest również rybosomalne białko S6 (Karolczak i in. 2013). Z kolei dr Małgorzata Topolewska wykazała, że do zaburzeń w organizacji ER dochodzi w mioblastach pochodzących od myszy niesyntetyzujących MVI (KO); ER w tych komórkach było słabiej zorganizowane w porównaniu do komórek kontrolnych (Topolewska i in., dane nieopublikowane).

## **5.8. Wpływ obniżonego poziomu MVI na poziom 45S pre-rRNA**

Kluczowym procesem dla zachowania struktury i funkcji jąderka oraz rybosomów jest aktywna transkrypcja rDNA (która zachodzi w obszarze FC jąderka przy udziale Pol I). Przedstawione przeze mnie wyniki wskazują na udział MVI w organizacji jąderka i

rybosomów. Postanowiłam zatem zbadać czy obniżony poziom MVI wpływa na poziom 45S pre-rRNA, który jest pierwszym i niestabilnym produktem transkrypcji rDNA. Ponieważ 45S pre-rRNA ulega szybkim przemianom do dojrzałych 5S, 18S i 28S rRNA, poziom 45S pre-rRNA jest miarą aktywności Pol I (Mayer i Grummt 2005). Nie zaobserwowałam jednak zmian w poziomie 45S pre-rRNA w komórkach z obniżonym poziomem MVI w porównaniu z komórkami *scrambled* (Rycina 4.36), co oznacza brak znaczącego wpływu MVI na transkrypcję rDNA.

## **5.9. Uwagi końcowe**

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że MVI znajduje się w jąderku komórek PC12 i wiąże się z białkami jądrowymi charakterystycznymi dla trzech jego obszarów: UBF, fibrylaryną oraz B23 i nukleoliną. Oddziaływanie MVI z B23 wpływa na zachowanie jądrowej lokalizacji B23 w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu jądrowego, indukowanego ActD, co może wskazywać na udział MVI w zachowaniu prawidłowej organizacji jąderka. Poza tym, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że MVI bierze udział w zachowaniu prawidłowej organizacji ER. Utrzymanie prawidłowej organizacji jąderka jest istotne, gdyż wykazano, że zaburzenia powiązane z biogenezą rybosomów prowadzą do wielu poważnych chorób, związanych z tworzeniem i funkcjonowaniem rybosomów.

## **6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI**

Przedstawione w rozprawie wyniki dotyczyły poznania roli MVI w jąderku komórek PC12. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że:

- MVI oddziałuje z białkiem jąderkowym – nukleoliną i białkiem strukturalnym małej podjednostki rybosomu - S6.
- MVI lokalizuje się głównie w obszarze DFC jąderka, związanym z dojrzewaniem pre-rRNA oraz otaczającym go obszarze GC, w którym ma miejsce składanie podjednostek rybosomów.
- MVI oddziałuje z białkami charakterystycznymi dla poszczególnych obszarów jąderka: UBF (znacznikiem FC), fibrylaryną (znacznikiem DFC) oraz B23 (znacznikiem GC).
- W warunkach stresu jąderkowego wywołanego ActD dochodzi do dezintegracji jąderka.
- Obniżenie poziomu syntezy MVI prowadzi do drastycznych zmian w ultrastrukturze jąderka/dezintegracji jąderka.
- Obniżenie poziomu syntezy MVI prowadzi do zmiany lokalizacji B23 w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu jąderkowego wywołanego ActD.
- Obniżenie poziomu syntezy MVI prowadzi do zaburzeń w organizacji siateczki śródplazmatycznej, ale nie wpływa na poziom 45S pre-rRNA.

Uzyskane wyniki wskazują, że MVI pełni istotną rolę w zachowaniu prawidłowej organizacji jąderka oraz prawidłowej organizacji siateczki śródplazmatycznej.

## **7. LITERATURA**



1. Abdelmohsen K, Gorospe M. RNA-binding protein nucleolin in disease (2012) *RNA Biol* 9(6):799–808.
2. Abdelmohsen K, Tominaga K, Lee EK, Srikantan S, Kang M-J, Kim MM, Selimyan R, Martindale JL, Yang X, Carrier F, Zhan M, Becker KG, Gorospe M. Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs (2011) *Nucleic Acids Res* 39:8513–8530.
3. Ahituv N, Avraham KB. Auditory and vestibular mouse mutants: models for human deafness (2000) *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 11(3):181-91.
4. Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaukat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T, Khan SN, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Wilcox ER. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37 (2003) *Am J Hum Genet* 2003 72(5):1315-22.
5. Ajima R, Akazawa H, Kodama M, Takeshita F, Otsuka A, Kohno T, Komuro I, Ochiya T, Yokota J. Deficiency of Myo18B in mice results in embryonic lethality with cardiac myofibrillar aberrations (2008) *Genes Cells* 13:987-999.
6. Ajima R, Kajiya K, Inoue T, Tani M, Shiraishi-Yamaguchi Y, Maeda M, Segawa T, Furuichi T, Sutoh K, Yokota J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth (2007) *Biochem Biophys. Res. Comm.* 356:851-856.
7. Akhmanova A, Hammer 3rd JA. Linking Molecular motors to membrane cargo (2010) *Curr Opin Cell Biol* 22(4):479-87.
8. Al Olama, AA i in. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer (2014) *Nat. Genet.* 46:1103–1109.
9. Ali MY, Homma K, Iwane AH, Adachi K, Itoh H, Kinoshita K Jr, Yanagida T, Ikebe M. Unconstrained steps of myosin VI appear longest among known molecular motors (2004) *Biophys. J.* 86:3804-3810.
10. Almuzzaini B, Sarshad AA, Östlund Farrants AK, Percipalle P. Nuclear myosin I contributes to a chromatin landscape compatible with RNA polymerase II transcription activation (2015) *BMC Biol* 5,13:35.
11. Altman D, Sweeney HL, Spudich JA. The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring (2004) *Cell* 116:737-749.
12. Ameen N, Apodaca G. Defective CFTR apical endocytosis and enterocyte brush border in Myosin VI-deficient mice (2007) *Traffic* 8:998-1006.
13. Amin MA, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K. Depletion of nucleophosmin leads to distortion of Nucleolar and nuclear structures in HeLa cells (2008) *Biochem J* 1;415(3):345-51.
14. Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M. Nucleolar proteome dynamics (2005) *Nature* 433(7021):77-83.

15. Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongelard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S, Bouvet P. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes (2006) *EMBO J.* 25:1669-1679.
16. Anger AM, Armache JP, Berninghausen O, Habeck M, Subklewe M, Wilson DN, Beckmann R. Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome (2013) *Nature* 497:80–85.
17. Arden SD, Puri C, Au JS, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI is required for targeted membrane transport during cytokinesis (2007) *Mol. Biol. Cell* 18:4750-4761.
18. Aschenbrenner L, Lee TT, Hasson T. Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries (2003) *Mol. Biol. Cell* 14:2728-2743.
19. Aschenbrenner L, Naccache SN, Hasson T. Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers (2004) *Mol. Biol. Cell* 15:2253-2263.
20. Au JSY, Puri C, Ihrke G, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI is required for sorting of AP-1B-dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells (2007) *J. Cell Biol.* 177:103-114.
21. Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA. The mouse *Snell's waltzer* deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells (1995) *Nature Genetics* 11:369-375.
22. Bahloul A, Chevreux G, Wells AL, Martin D, Nolt J, Yang Z, Chen LQ, Potier N, Van Dorsselaer A, Rosenfeld S, Houdusse A, Sweeney HL. The unique insert in myosin VI is a structural calcium calmodulin binding site (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 101:4787-4792.
23. Barylko B, Binns DD, Albanesi JP. Regulation of the enzymatic and motor activities of myosin I (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1496:23-35.
24. Batters C, Veigel C. Mechanics and activation of unconventional myosins (2016) *Traffic* 17:860-71.
25. Beach JR, Hammer 3rd JA. Myosin II isoform co-assembly and differential regulation in mammalian systems (2015) *Exp Cell Res* 334(1):2-9.
26. Belin BJ, Mullins RD. What we talk about when we talk about nuclear actin (2013) *Nucleus* 4:291-297.
27. Bell SP, Learned RM, Jantzen HM, Tjian R. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis (1988) *Science* 241: 1192–1197.
28. Berg JS, Powell BC, Cheney RE. A millennial myosin census (2001) *Mol. Biol. Cell* 12:780-794.
29. Berger CM, Gaume X, Bouvet P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer (2015) *Biochimie* 113:78-85.

30. Bicknell K, Brooks G, Kaiser P, Chen H, Dove BK, Hiscox JA. Nucleolin is regulated both at the level of transcription and translation (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 332(3):817-22.
31. Biggiogera M, Fakan S, Leser G, Martin TE, Gordon J. Immunoelectron microscopical visualization of ribonucleoproteins in the chromatoid body of mouse spermatids (1990) *Mol Reprod Dev* 16:150-158.
32. Billington N, Beach JR, Heissler SM, Remmert K, Guzik-Lendrum S, Nagy A, Takagi Y, Shao L, Li D, Yang Yi, Zhang Y, Barzik M, Betzig E, Hammer III JA, Sellers JR. Myosin 18A coassembles with nonmuscle myosin 2 form mixed bipolar filaments (2015) *Curr Biol* 25(7):942-948.
33. Billington N, Wang A, Mao J, Adelstein RS, Sellers JR. Characterization of three full-length human nonmuscle myosin II paralogs (2013) *J Biol Chem* 288(46):33398-410.
34. Blalock WL, Piazzini M, Gallo A, Bavelloni A, Faenza I. RNA processing and ribosome biogenesis in bone marrow failure disorders. (2017) *RNA Dis.* 4:e1531.
35. Bleeker FE, Lamba S, Rodolfo M, Scarpa A, Leenstra S, Vandertop WP, Bardelli A. Mutational profiling of cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma and pancreatic carcinoma reveals a snapshot of their genomic landscapes (2009) *Hum. Mutat.* 30:E451-E459.
36. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):574-85.
37. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm (1989) *Cell.* 56:379-390.
38. Bouche G, Caizergues-Ferrer M, Bugler B, Amalric F. Interrelations between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre rRNA synthesis in CHO cells (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3025-3035.
39. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress (2010) *Mol Cell* 40(2):216-27.
40. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976) *Anal Biochem* 7;72:248-254.
41. Brawley CM, Rock RS. Unconventional myosin traffic in cells reveals a selective actin cytoskeleton (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 16;106(24):9685-9690.
42. Breckler J, Au K, Cheng J, Hasson T, Burnside B. Novel myosin VI isoform is abundantly expressed in retina (2000) *Exp Eye Res* 70(1):121-34.
43. Brito C, Sousa S. Non-muscle myosin 2A (NM2A): Structure, regulation and function (2020) *Cells* 1;9(7):1590.

44. Bronshtein I, Kepten E, Kanter I, Berezin S, Lindner M, Redwood AB, Mai S, Gonzalo S, Foisner R, Shav-Tal Y, Garini Y. Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior (2015) *Nat Commun* 24;6:8044.
45. Bugler B, Caizergues-Ferrer M, Bouche G, Bourbon H, Amalric F. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein (1982) *Eur J Biochem* 128(2-3):475-80.
46. Bunn RC, Jensen MA, Reed BC. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton (1999) *Mol Biol Cell*. 10:819–32.
47. Burger K, Mühl B, Harasim T, Rohrmoser M, Malamoussi A, Orban M, Kellner M, Gruber-Eber A, Kremmer E, Hölzel M, Eick D. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J. Biol. Chem* (2010) 285:12416–12425.
48. Buschman MD, Field SJ. MYO18A: An unusual myosin (2017) *Adv. Biol. Regul.* 67:84-92.
49. Buss F, Arden SD, Lindsay M, Luzio JP, Kendrick-Jones J. Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis (2001) *EMBO J.* 20: 3676-3684.
50. Buss F, Kendrick-Jones J. How are the cellular functions of myosin VI regulated within the cell? (2008) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 369:165-175.
51. Bywater MJ, Pearson RB, McArthur GA, Hannan RD. Dysregulation of the basal RNA polymerase transcription apparatus in cancer (2013) *Nat Rev Cancer* 13(5):299-314.
52. Cameron RS, Liu C, Mixon AS, Pihkala JPS, Rahn RJ, Cameron PL. Myosin16b: The COOH-tail region directs localization to the nucleus and overexpression delays S-phase progression (2007) *Cell Motil. Cytoskeleton* 64:19-48.
53. Cameron RS, Liu C, Pihkala JPS. Myosin 16 levels fluctuate during the cell cycle and are downregulated in response to DNA replication stress (2013) *Cytoskeleton* 70:328-338.
54. Camps J, Erdos MR, Ried T. The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function (2015) *Nucleus* 6(1):8–14.
55. Caride AJ, Bennett RD, Strehler EE. Kinetic analysis reveals differences in the binding mechanism of calmodulin and calmodulin-like protein to the IQ motifs of myosin-10 (2010) *Biochemistry* 21:49(37):8105-8116.
56. Caridi PCh, D'Agostino C, Ryu T, Zapotoczny G, Delabaere L, Li X, Khodaverdian VY, Amaral N, Lin E, Rau AR, Chiolo I. Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks (2018) *Nature* 559(7712):54-60.
57. Carvalho LS, Gonçalves N, Fonseca NA, Moreira JN. Cancer Stem Cells and Nucleolin as Drivers of Carcinogenesis (2021) *Pharmaceuticals* 14(1):60.
58. Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button (2004) *Physiol. Rev.* 84:1-39.

59. Chan PK, Aldrich M, Busch H. Alterations in immunolocalization of the phosphoprotein B23 in HeLa cells during serum starvation (1985) *Exp Cell Res.* 161(1):101-10.
60. Chan PK, Chan FY. A study of correlation between NPM-translocation and apoptosis in cells induced by daunomycin (1999) *Biochem Pharmacol.* 57(11):1265-73.
61. Cheney CM, Kravit NG, Verbsky JW. A New myosin I gene in *Drosophila* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 195:1280-1288.
62. Chibalina MV, Puri C, Kendrick-Jones J, Buss F. Potential roles of myosin VI in cell motility (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 37:966- 970.
63. Cho SJ, Chen X. Myosin VI is differentially regulated by DNA damage in p53- and cell type-dependent manners (2010) *J Biol Chem* 27;285(35):27159-27166.
64. Cho W-K, Jayanth N, English BP, Inoue T, Andrews JO, Cissé II. RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells (2016) *eLife* 5: e13617.
65. Choi JW, Bae Lee S, Ahn JY, Lee KH. Disruption of ATP binding destabilizes NPM/B23 and inhibits anti-apoptotic function (2008) *BMP Rep.* 41(12):840-5.
66. Chuang CH, Carpenter AE, Fuchsova B, Johnson T, de Lanerolle P, Belmont AS. Long-range directional movement of an interphase chromosome site (2006) *Curr. Biol.* 16:825-831.
67. Cisterna B, Necchi D, Prosperi E, Biggiogera M Small ribosomal subunits associate with nuclear myosin and actin in transit to the nuclear pores (2006) *FJ Express Summaries* 20(11)1901-1903.
68. Cohen PT. Protein phosphatase 1-targeted in many directions (2002) *J. Cell Sci.*115:241-256.
69. Colluccio LM. Myosin I (1997) *Am J Physiol* 273(2 Pt 1):C347-59.
70. Coluccio LM. Myosin I. In *Myosins: a superfamily of Molecular motors* (2008) *Proteins Cell Regul.* 7:95-124.
71. Cong R, Das S, Ugrinova I, Kumar S, Mongelard F, Wong J, Bouvet P. Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription (2012) *Nucleic Acids Res.* 40:9441-9454.
72. Cook A, Hari-Gupta Y, Toseland ChP. Application of the SSB biosensor to study *in vitro* transcription (2018) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 486 (3):820-825.
73. Cook AW, Gough RE, Toseland ChP. Nuclear myosins - roles for molecular transporters and anchors (2020) *J Cell Sci* 4;133(11):jcs242420.
74. Copenhagen GP, Putnam CD, Denton ML, Pikaard CS. The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids (1994) *Nucleic Acids Res* 11;22(13):2651-2657.
75. Correll CC, Bartek J, Dundr M. The Nucleolus: A Multiphase Condensate Balancing Ribosome Synthesis and Translational Capacity in Health, Aging and Ribosomopathies (2019) *Cells* 8(8):869.

76. Créancier L, Prats H, Zanibellato C, Amalric F, Bugler B. Determination of the functional domains involved in nucleolar targeting of nucleolin (1993) *Mol Biol Cell* 4(12):1239-50.
77. Dance AL, Miller M, Seragaki S, Aryal P, White B, Aschenbrenner L, Hasson T. Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments (2004) *Traffic* 5:798-813.
78. de Jonge JJ, Batters Ch, O'Loughlin T, Arden SD, Buss F. The MYO6 interactome: selective motor-cargo complexes for diverse cellular processes (2019) *FEBS Lett* 593(13):1494-1507.
79. de La Cruz EM, Ostap EM, Sweeney HL. Kinetic mechanism and regulation of myosin VI (2001) *J. Biol. Chem.* 276:32373-32381.
80. de la Cruz J, Karbstein K, Woolford Jr JL. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo (2015) *Annu Rev Biochem* 84:93-129.
81. de Lanerolle P. Nuclear actin and myosins at a glance (2012). *J. Cell Sci.* 125: 4945-4949.
82. de Lanerolle P, Serebryanny L. Nuclear actin and myosins: life without filaments (2011) *Nat Cell Biol* 13:1282–1288.
83. Derenzini M, Montanaro L, Trerè D. Ribosome biogenesis and cancer (2017) *Acta Histochem* 119(3):190-197.
84. Derenzini M, Montanaro L, Trerè D. What the nucleolus says to a tumour pathologist. (2009) *Histopathology* 54(6):753-62.
85. Desnoyers S, Kaufmann SH, Poirier GG. Alteration of the nucleolar localization of poly(ADP-ribose) polymerase upon treatment with transcription inhibitors (1996) *Exp Cell Res* 227(1):146-53.
86. Diesch J, Hannan RD, Sanij E. Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease (2014) *Cell Biosci* 19:4:43.
87. Doeberitz MK, Wentzensen N. Chapter 1- The Cell:Basic structure and function (2008) *Comprehensive Cytopathology (Third Edition)* 3-22.
88. Dunn TA, Chen S, Faith DA, Hicks JL, Platz EA, Chen Y, Ewing CM, Sauvageot J, Isaacs WB, De Marzo AM, Luo J. A novel role of myosin VI in human prostate cancer (2006) *Am. J. Pathol.* 169(5):1843-1854.
89. Dzijak R, Yildirim S, Kahle M, Nowák P, Hnilicová J, Venit T, Hozák P. Specific nuclear localizing sequence directs two myosin isoforms to the cell nucleus in calmodulin-sensitive manner (2012) *PLoS One* 7(1):e30529.
90. Egyhazi E, Pigon A, Chang JH, Ghaffari SH, Dreesen TD, Wellman SE, Case ST, Olson MO. Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in *Chironomus* salivary gland cells (1998) *Exp. Cell Res.* 178:264-272.
91. El Hassouni B, Sarkisjan Dz, Vos JCh, Giovanetti E, Peters GJ Targeting the Ribosome Biogenesis Key Molecule Fibrillarin to Avoid Chemoresistance (2019) *Curr Med Chem* 26(33):6020-6032.

92. Emmott E, Hiscox JA. Nucleolar targeting: the hub of the matter (2009) *Embo Rep* 10(3):231-8.
93. Engelhardt VA, Lyubimova MN. Myosin and adenosine triphosphatase (1939) *Nature* 144:668-669.
94. Erard MS, Belenguer P, Caizergues-Ferrer M, Pantaloni A, Amalric F. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1 (1988) *Eur. J. Biochem.* 175:525-530.
95. Espindola FS, Suter DM, Partata LB, Cao T, Wolenski J, Cheney RE, King SM, Mooseker MS. The light chain composition of chicken brain myosin Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN (2000) *Cell Motil Cytosk.* 47:269-281.
96. Evdokimova VN, Gandhi M, Nikitski AV, Bakkenist ChJ, Nikiforov YE. Nuclear myosin/actin-motored contact between homologous chromosomes is initiated by ATM kinase and homology-directed repair proteins at double-strand DNA breaks to suppress chromosome rearrangements (2018) *Oncotarget* 9(17):13612-13622.
97. Farley KI, Surovtseva Y, Merkel J, Baserga SJ. Determinants of mammalian nucleolar architecture (2015) *Chromosoma* 124(3):323-31.
98. Feric M, Vaidya N, Harmon TS, Mitrea DM, Zhu L, Richardson TM, Kriwacki RW, Pappu RV, Brangwynne CP. Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments (2016) *Cell* 165(7):1686-1697.
99. Ferreira-Cerca S, Poll G, Gleizes PE, Tschochner H, Milkereit P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function (2005) *Mol Cell* 28;20(2):263-75.
100. Fili N, Hari-Gupta Y, Aston B, Dos Santos A, Gough RE, Alamad B, Wang L, Martin-Fernandez ML, Toseland ChP. Competition between two high- and low-affinity protein-binding sites in myosin VI controls its cellular function (2020) *J Biol Chem* 10;295(2):337-347.
101. Fili N, Hari-Gupta Y, Dos Santos Á, Cook A, Poland S, Ameer-Beg S. M, Parsons M, Toseland CP. NDP52 activates nuclear myosin VI to enhance RNA polymerase II transcription (2017) *Nat. Comm.* 8:1871.
102. Fili N, Toseland ChP. Unconventional Myosins: How Regulation Meets Function (2019) *Int J Mol Sci* 20;21(1):67.
103. Finan D, Hartman MA, Spudich JA. Proteomics approach to study the functions of *Drosophila* myosin VI through identification of multiple cargo-binding proteins (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:5566-5571.
104. Fomproix N, Percipalle P. An actin-myosin complex on actively transcribing genes (2004) *Exp. Cell Res.* 294:140-148.

105. Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(10):3681-3686.
106. Freed EF, Bleichert F, Dutca LM, Baserga SJ. When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis (2010) *Mol Biosyst* 6(3):481-93.
107. Friedman TB, Sellers JR, Avraham KB. Unconventional myosins and the genetics of hearing loss (1999) *Am J Med Genet* 89(3):147-57.
108. Fromont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. Ribosome assembly in eukaryotes. (2003) *Gene* 313:17-42.
109. Fujiwara T, Suzuki S, Kanno M, Sugiyama H, Takahashi H, Tanaka J. Mapping a nucleolar targeting sequence of an RNA binding nucleolar protein, Nop25 (2006) *Exp. Cell Res.* 312:1703-1712.
110. Furusawa T, Ikawa S, Yanai N, Obinata M. Isolation of a novel PDZ-containing myosin from hematopoietic supportive bone marrow stromal cell lines (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 270:67-75.
111. Gadad SS, Senapati P, Syed SH, Rajan RE, Shandilya J, Swaminathan V, Chatterjee S, Colombo E, Dimitrov S, Pelicci PG, Ranga U, Kundu TK. The multifunctional protein nucleophosmin (NPM1) is a human linker histone H1 chaperone (2011) *Biochemistry* 50(14):2780-9.
112. Gamalinda M, Woolford JL, Jr. Paradigms of ribosome synthesis: Lessons learned from ribosomal proteins (2015) *Translation.* 3:e975018.
113. Geeves MA, Holmes KC. Structural mechanism of muscle contraction (1999) *Annu Rev Biochem* 68:687-728.
114. Geisbrecht ER, Montell DJ. Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration (2002) *Nat. Cell Biol.* 4:616-620.
115. Ghisolfi LG, Amalric JF, Erard M. The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA helix-destabilizing properties (1992) *The Journal of biological chemistry* 267:2955- 2959.
116. Ghisolfi-Nieto L, Puvion-Dutilleul F, Amalric F, Bouvet P. Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA (1996) *J. Mol. Biol.* 260:34-53.
117. Ginisty H, Sicard H, Roger B. Bouvet P. Structure and functions of nucleolin (1999) *J. Cell Sci.* 112 (Pt 6):761-772.
118. Gleizes PE, Noaillac-Depeyre J, Léger-Silvestre I, Teulières F, Dauxois JY, Pommet D, Azum-Gealde MC, Gas N. Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex (2001) *J Cell Biol* 10;155(6):923-36.



119. Goodfellow S, Zomerdijk JCBM. Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes (2013) *Subcell Biochem* 61:211-36.
120. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor (1976) *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(7):2424-2428.
121. Gressner AM, Wool IG. The stimulation of the phosphorylation of ribosomal protein S6 by cycloheximide and puromycin (1974) *Biochem Biophys Res Commun* 23;60(4):1482-90.
122. Grinstein E, Wernet P, Snijders PJF, Rösl F, Weinert I, Jia W, Kraft R, Schewe Ch, Schwabe M, Hauptmann S, Dietel M, Meijer ChJLM, Royer HD. Nucleolin as activator of human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer (2002) *J Exp Med* 21;196(8):1067-78.
123. Grummt I. Actin and myosin as transcription factors (2006) *Curr Opin Genet Dev* 16(2):191-6.
124. Guhathakurta P, Prochniewicz E, Thomas DD. Actin-myosin Interaction: Structure, function and drug discovery (2018) *Int J Mol Sci* 19(9):2628.
125. Gurung R, Ono Y, Baxendale S, Lee SL, Moore S, Calvert M, Ingham PW. A zebrafish model for a human myopathy associated with mutation of the unconventional myosin MYO18B (2017) *Genetics* 205:725-735.
126. Guzik-Lendrum S, Heissler SM, Billington N, Takagi Y, Yang Y, Knight PJ, Homsher E, Sellers JR. Mammalian myosin-18A, a highly divergent myosin (2013) *J Biol Chem* 288(13):9532-9548.
127. Guzik-Lendrum S, Nagy A, Takagi Y, Houdusse A, Sellers JR. *Drosophila melanogaster* Myosin-18 Represents a Highly Divergent Motor with Actin Tethering Properties (2011) *J Biol Chem* 286(24):21755–21766.
128. Hacot S, Coute Y, Belin S, Albaret MA, Mertani HC, Sanchez JCh, Rosa-Calatrava M, Diaz JJ. Isolation of nucleoli (2010) *Curr Protoc Cell Biol* 3:3.36.
129. Hammer JA, Sellers JR. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13:13-26.
130. Hari-Gupta Y, Fili N, dos Santos A, Cook AW, Gough RE, Reed HCW, Wang L, Aaron J, Venit T, Wait E, Grosse-Berkenbusch A, Gebhardt JChM, Percipalle P, Chew T-L, Martin-Fernandez M, Toseland ChP. Myosin VI regulates the spatial organisation of mammalian transcription initiation (2022) *Nature Communications* 13(1):1346.
131. Hartman MA, Finan D, Sivaramakrishnan S, Spudich JA. Principles of unconventional myosin function and targeting (2011) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 133-155.
132. Hartman MA, Spudich JA. The myosin superfamily at a glance (2012) *J Cell Sci* 1;125(Pt 7):1627-1632.

133. He F, Wollscheid HP, Nowicka U, Biancospino M, Valentini E, Ehlinger A, Acconcia F, Magistrati E, Polo S, Walters KJ. Myosin VI contains a compact structural motif that binds to ubiquitin chains (2016) *Cell Rep.* 14:2683-2694.
134. Hegan PS, Lanahan AA, Simons M, Mooseker MS. Myosin VI and cardiomyopathy: Left ventricular hypertrophy, fibrosis, and both cardiac and pulmonary vascular endothelial cell defects in the Snell's waltzer mouse (2015) *Cytoskeleton* 72:373-387.
135. Heissler SM, Sellers JR. Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks (2014) *Bioarchitecture* 4(6):169-88.
136. Heissler SM, Selvadurai J, Bond LM, Fedorov R, Kendrick-Jones J, Buss F, Manstein DJ. Kinetic properties and small-molecule inhibition of human myosin-6 (2012) *FEBS Lett* 21;586(19):3208-3214.
137. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function (2004) *Mt Sinai J Med* 71(5):289-297.
138. Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue MF, Chakraborty A, Gleizes PE. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes (2015) *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 6:225–242.
139. Henras AK, Soudet J, G erus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Mouglin A, Henry Y (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:2334–2359.
140. Hernandez-Verdun, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism (2010) *Wires RNA* 1:415-431.
141. Herrera JE, Savkur R, Olson MO. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23 (1995) *Nucleic Acids Res* 23(19):3974-3979.
142. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23 (2000) *J Biol Chem* 275(32):24451-7.
143. Hirano K, Miki Y, Hirai Y, Sato R, Itoh T, Hayashi A, Yamanaka M, Eda S, Beppu M. A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells (2005) *J Biol Chem* 280(47):39284-93.
144. Hisaoka M, Nagata K, Okuwaki M. Intrinsically disordered regions of nucleophosmin/B23 regulate its RNA binding activity through their inter- and intra-molecular association (2014) *Nucleic Acids Res* 42(2):1180-95.
145. Hiscox JA. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus (2007) *Nat Rev Microbiol.* 5(2):119-27.
146. Hofmann WA, Johnson T, Klapczynski M, Fan JL, de Lanerolle P. From transcription to transport: emerging roles for nuclear myosin I (2006) *Biochem. Cell Biol.* 84, 418-426.
147. Holmes KC, Geeves MA. The structural basis of muscle contraction (2000) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 29;355(1396):419-31.

148. Hsu TI, Lin SC, Lu PS, Chang WC, Hung CY, Yeh YM, Su WC, Liao PC, Hung JJ. MMP7-mediated cleavage of nucleolin at Asp255 induces MMP9 expression to promote tumor malignancy (2015) *Oncogene* 34:826-837.
149. Hu HH, Wang J, Zhu R, Guo J, Wu Y. Effect of myosin heavy chain composition of muscles on meat quality in Laiwu pigs and Duroc (2008) *Sci China C Life Sci* 51(2):127-32.
150. Hwang KJ, Mahmoodian F, Ferretti JA, Korn ED, Gruschus JM. Intramolecular interaction in the tail of *Acanthamoeba* myosin IC between the SH3 domain and a putative pleckstrin homology domain (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:784-789.
151. Ihnatovych I, Migocka-Patrzalek M, Dukh M, Hofmann WA. Identification and characterization of a novel myosin Ic isoform that localizes to the nucleus (2012) *Cytoskeleton* 69:555-565.
152. Inoue A, Sato O, Homma K, Ikebe M. DOC-2/DAB2 is the binding partner of myosin VI (2002) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 292:300-307.
153. Inoue T, Kon T, Ohkura R, Yamakawa H, Ohara O, Yokota J, Sutoh K. BREK/ LMTK2 is a myosin VI-binding protein involved in endosomal membrane trafficking (2008) *Gen. Cells* 13:483-495.
154. Isogawa Y, Kon T, Inoue T, Onkura R, Yamakawa H, Ohara O, Sutoh K. The N-terminal domain of MYO18A has an ATP-insensitive actin-binding site (2005) *Biochemistry* 26;44(16):6190-6.
155. Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, Zhang Y. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation (2003) *Mol Cell.* 12(5):1151–1164.
156. James A, Wang Y, Raje H, Rosby R, DiMario P. Nucleolar stress with and without p53. (2014) *Nucleus* 5(5):402-26.
157. Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins (1990) *Nature* 344: 830–836.
158. Jantzen HM, Chow AM, King DS, Tjian R. Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. (1992) *Genes Dev* 6: 1950–1963.
159. Jiu Y, Kumari R, Fenix AM, Schaible N, Liu X, Varjosalo M, Kirshnan R, Burnette DT, Lappalainen P. Myosin-18B Promotes the Assembly of Myosin II Stacks for maturation of Contractile Actomyosin Bundles (2019) *Curr Biol* 29(1):81-92.e5.
160. Jordan P, Mannervik M, Tora L, Carmo-Fonseca M. In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive (1996) *J. Cell Biol.* 133:225–234.
161. Journey LJ, Goldstein MN. Electron microscope studies on HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D (1961) *Cancer Res* 21, 929–932

162. Jung EJ, Liu G, Zhou W, Chen X. Myosin VI is a mediator of the p53-dependent cell survival pathway (2006) *Mol. Cell. Biol.* 26:2175-2186.
163. Kalita K, Makonchuk D, Gomes C, Zheng J-J, Hetman M. Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis (2008) *J Neurochem* 1;105(6):2286-99.
164. Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, Keersmaecker KD. Hallmarks of ribosomopathies (2020) *Nucleic Acids Research* 48 (3)1013-1028.
165. Kar B, Liu B, Zhou Z, Lam YW. Quantitative nucleolar proteomics reveals nuclear re-organization during stress- induced senescence in mouse fibroblast (2011) *BMC Cell Biol* 11;12:33.
166. Karolczak J, Pavlyk I, Majewski L, Sobczak M, Niewiadomski P, Rzhetsky Y, Sikorska A, Nowak N, Pomorski P, Proszyński T, Ehler E, Redowicz MJ. Involvement of unconventional myosin VI in myoblast function and myotube formation (2015a) *Histochem. Cell Biol.* 144:21-38.
167. Karolczak J, Sobczak M, Majewski L, Yeghiazaryan M, Jakubiec-Puka A, Ehler E, Sławińska U, Wilczyński GM, Rędownicz MJ. Myosin VI in skeletal muscle: its localization in the sarcoplasmic reticulum, neuromuscular junction and muscle nuclei (2013) *Histochem. Cell Biol.* 139:873-885.
168. Karolczak J, Sobczak M, Skowronek K, Rędownicz MJ. A kinase anchoring protein 9 is a novel myosin VI binding partner that links myosin VI with the PKA pathway in myogenic cells (2015b) *Biomed. Res. Int.* 816019.
169. Kawiak J, Zabel M. *Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny* (2002)
170. Kellerman KA, Miller KG. An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster* (1992) *J Cell Biol* 119(4):823-34.
171. Khalailah A, Dreazen A, Khatib A, Apel R, Swisa A, Kidess-Basir N, Maitra A, Meyuhas O, Dor Y, Zamir G. Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer (2013) *Cancer Res.* 73, 1811–1820.
172. Khatter H, Myasnikov AG, Natchiar SK, Klaholz BP. Structure of the human 80S ribosome (2015) *Nature* 520(7549):640-5.
173. Koh ChM, Gurel B, Sutcliffe S, Aryee MJ, Schultz D, Iwata T, Uemura M, Zeller KI, Anele U, Zheng Q, Hicks JL, Nelson WG, Dang ChV, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. Alterations in nucleolar structure and gene expression programs in prostatic neoplasia are driven by the MYC oncogene (2011) *Am J Pathol* 178(4):1824-34.
174. Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR, Ohta T. Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates (2019) *Cancer Res* 70(17):6746–6756.

175. Konikkat S, Woolford JL, Jr. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast (2017) *Biochem J.* 15;474(2):195-214.
176. Kozbial PZ, Mushegian AR. Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins (2005) *BMC Struct Biol* 5:19.
177. Kressler D, Hurt E, Bassler J. Driving ribosome assembly (2010) *Biochim Biophys Acta.* 1803(6):673-83.
178. Kristó I, Bajusz I, Bajusz C, Borkúti P, Vilmos P. Actin, actin-binding proteins, and actin-related proteins in the nucleus (2016) *Histochem Cell Biol* 145:373-388.
179. Krüger T, Zentgraf H, Scheer U (2007) Intranucleolar sites of ribosome biogenesis defined by the localization of early binding ribosomal proteins. *J Cell Biol.* 177(4):573-578.
180. Kruppa AJ, Kishi-Itakura Ch, Masters TA, Rorbach JE, Grice GL, Kendrick-Jones J, Nathan JA, Minczuk M, Buss F. Myosin VI-Dependent Actin Cages Encapsulate Parkin-Positive Damaged Mitochondria (2018) *Dev Cell* 44(4):484-499.e6.
181. Krust B, El Khoury D, Nondier I, Soundaramourty C, Hovanessian AG. Targeting surface nucleolin with multivalent HB-19 and related Nucant pseudopeptides results in distinct inhibitory mechanisms depending on the malignant tumor cell type (2011) *BMC Cancer.* 11:333.
182. Kulashreshtha M, Mehta IS, Kumar P, Rao BJ. Chromosome territory relocation during DNA repair requires nuclear myosin 1 recruitment to chromatin mediated by  $\gamma$ -H2AX signaling (2016) *Nucleic Acids Res* 30;44(17):8272-8291.
183. Kyselá K, Philimonenko AA, Philimonenko VV, Janáček J, Kahle M, Hozák P. Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell (2005) *Histochem. Cell Biol.* 124:347-358.
184. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970) *Nature* 15;227(5259):680-685.
185. Lam YW, Trinkle-Mulcahy L. New insights into nucleolar structure and function (2015) *F1000Prime Rep.* 7:48.
186. Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and Function in the Nucleus (1998) *Science* 24;280(5363):547-53.
187. Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: A model for nuclear organelles (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:605-612.
188. Langford GM. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport (2002) *Traffic* 3:859-865.
189. Learned RM, Learned TK, Haltiner MM, Tjian RT. Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element (1986) *Cell* 45: 847–857.

190. Leary DJ, Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus (2001) *FEBS Lett* 7;509(2):145-150.
191. Lechertier T, Grob A, Hernandez-Verdun D, Roussel P. Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs (2009) *Exp Cell Res* 315(6):928-42.
192. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress (2005) *Methods* 35(4):373-381.
193. Lenartowska M, Walczewski J. Miozyna VI: unikalne białko motoryczne cytoszkieletu aktynowego (2011) *Postępy Biochemii* 57(1):63-73.
194. Levitskiy SA, Mukharyamova KS, Veiko VP, Zatsepina OV. Identification of signal sequences determining the specific nucleolar localization of fibrillarin in HeLa cells (2004) *Molecular Biology* 38(3):405–413.
195. Li D, Wang J. Ribosome heterogeneity in stem cells and development. (2020) *J. Cell Biol.* 219:e202001108.
196. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53 (2006) *J Biol Chem* 17;281(11):7260-7270.
197. Li J, Lu Q, Zhang M. Structural Basis of Cargo Recognition by Unconventional Myosins in Cellular Trafficking (2016) *Traffic* 17(8):822-38.
198. Li M, Andersson-Lendahl M, Sejersen T, Arner A. Knockdown of fast skeletal myosin-binding protein C in zebrafish results in a severe skeletal myopathy (2016) *J Gen Physiol* 147(4):309-22.
199. Li Q, Sarna SK. Nuclear myosin II regulates the assembly of preinitiation complex for ICAM-1 gene transcription (2009) *Gastroenterology* 137:1051-1060.
200. Li Y-P, Busch RK, Valdez BC, Busch H (1996) C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur. J. Biochem* 237,153-158.
201. Lindsay AJ, McCaffrey MW. Myosin Vb localises to nucleoli and associates with the RNA polymerase I transcription complex (2009) *Cell Motil. Cytoskeleton* 66:1057-1072.
202. Lindström MS, Jurada D, Bursac S, Orsolich I, Bartek J, Volarevic S. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis (2018) *Oncogene* 37(18):2351-2366.
203. Lindström MS, Zhang Y. Ribosomal protein S9 is a novel B23/NPM-binding protein required for normal cell proliferation (2008) *J Biol Chem* 283(23):15568-76.
204. Lindström MS. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling (2011) *Biochem Res Int* 2011:195209.
205. Lischwe MA, Richards RL, Busch RK, Busch H. Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions (1981) *Exp Cell Res* 136(1):101-109.

206. Lister I, Schmitz S, Walker M, Trinick J, Buss F, Veigel C, Kendrick-Jones J. A monomeric myosin VI with a large working stroke (2004) *EMBO J* 23(8):1729-1738.
207. Lo SJ, Lee ChCh, Lai HJ (2006) The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings *Cell Res* 16(6):530-8.
208. Logvinova DS, Levitsky DI. Essential Light Chains of Myosin and Their Role in Functioning of the Myosin Motor (2018) *Biochemistry (Mosc)* 83(8):944-960.
209. Loikkanen I, Toljamo K, Hirvikoski P, Väisänen T, Paavonen TK, Vaarala MH. Myosin VI is a modulator of androgen-dependent gene expression (2009) *Oncol Rep* 22(5):991-995.
210. Loza-Muller L, Rodriguez-Corona U, Sobol M, Rodriguez-Zapata, Hozak P, Castano E. Fibrillarin methylates H2A in RNA polymerase I trans-active promoters in *Brassica oleracea* (2015) *Front Plant Sci* 6:6:976.
211. Ma N, Matsunaga S, Takata H, Ono-Maniwa R, Uchiyama S, Fukui K. Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression (2007) *J Cell Sci* 120(Pt 12):2091-105.
212. Maddugoda MP, Crampton MS, Shewan AM, Yap AS. Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell–cell contacts in mammalian epithelial cells (2007) *J Cell Biol* 178 (3): 529–540.
213. Maggi LB Jr, Kuchenruether M, Dadey DYA, Schwoppe RM, Grisendi S, Reid Townsend R, Pandolfi PP, Weber JD. Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome (2008) *Mol Cell Biol* 28(23):7050-65.
214. Mahen R, Hattori H, Lee M, Sharma P, Jeyasekharan AD, Venkitaraman AR. A-type lamins maintain the positional stability of DNA damage repair foci in mammalian nuclei (2013) *PLoS One* 8(5):e61893.
215. Majewski L, Nowak J, Sobczak M, Karatsai O, Havrylov S, Lenartowski R, Suszek M, Lenartowska M, Redowicz MJ. Myosin VI in the nucleus of neurosecretory PC12 cells: Stimulation-dependent nuclear translocation and interaction with nuclear proteins (2018) *Nucleus* 9:125-141.
216. Majewski L, Sobczak M, Havrylov S, Jozwiak J, Redowicz MJ. Dock7:a GEF for Rho-family GTPases and a novel myosin VI-binding partner in neuronal PC12 cells (2012) *Biochem. Cell Biol.* 90:565-574.
217. Majewski L, Sobczak M, Redowicz MJ. Myosin VI is associated with secretory granules and is present in the nucleus in adrenal medulla chromaffin cells (2010) *Acta Biochim. Pol.* 57:109-114.
218. Mały IV, Hofmann WA. Myosins in the nucleus (2020) *Adv Exp Med Biol* 1239:199-231.

219. Mangan H, Ó Gailín M, McStay B. Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of nucleoli (2017) *FEBS J.* 284(23):3977-3985.
220. Marcel V, Ghayad SE, Belin S, Therizols G, Morel AP, Solano- González E, Vensrell JA, Hacot S, Mertani HC, Albaret MA, Bourdon JCh, Jordan L, Thompson A, Tafer Y, Cong R, Bouvet P, Saurin JCh, Catez F, Prats AC, Puisieux A, Diaz JJ. p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer (2013) *Cancer Cell* 24(3):318-30.
221. Masiuk M. Nukleolina: charakterystyka białka i jego rola w biologii nowotworów i infekcji wirusowych (2008) *Postepy Biologii Komorki* 35(2):207-228.
222. Matthews DA. Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm (2001) *J Virol* 75(2):1031-8.
223. Mayer Ch, Grummt I. Cellular stress and nucleolar function (2005) *Cell Cycle* 4(8):1036-8.
224. McStay B, Frazier MW, Reeder RH. xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription (1991) *Genes Dev* 5: 1957–1968.
225. Mélése T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome (1995) *Curr Opin Cell Biol* 7(3):319-24.
226. Menétrey J, Bahloul A, Wells AL, Yengo CM, Morris CA, Sweeney HL, Houdusse A. The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal (2005) *Nature* 435:779-785.
227. Menétrey J, Isabet T, Ropars V, Mukherjea M, Pylypenko O, Liu X, Perez J, Vachette P, Sweeney HL, Houdusse AM. Processive steps in the reverse direction require uncoupling of the lead head lever arm of myosin VI (2012) *Mol. Cell* 48: 75-86.
228. Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: four decades of research (2015) *Int Rev Cell Mol Biol.* 320:41–73.
229. Mi Y, Thomas SD, Xu X, Casson LK, Miller DM, Bates PJ. Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 8572-8579.
230. Millo H, Leaper K, Lazou V, Bownes M. Myosin VI plays a role in cell-cell adhesion during epithelial morphogenesis (2004) *Mech Dev* 121(11):1335-1551.
231. Mohiddin SA, Ahmed Z M, Griffith AJ, Tripodi D, Friedman TB, Fananapazir L, Morell RJ. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6) (2004) *J. Med. Genet.* 41:309-314.
232. Moir RD, Montag-Lowy M, Goldman RD. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication (1994) *J Cell Biol* 125 (6)1201–1212.



233. Mongelard F, Bouvet P. Nucleolin: a multiFACeTed protein (2007) *Trends Cell Biol* 17(2):80-6.
234. Morfoisse F, Tatin F, Hantelys F, Adoue A, Helfer AC, Cassant-Sourdy S, Pujol F, Gomez-Brouchet A, Ligat L, Lopez F, Pyronnet S, Courty J, Guillermet-Guibert J, Marzi S, Schneider RJ, Prats AC, Garmy-Susini BH. Nucleolin promotes heat shock-associated translation of VEGF-D to promote tumor lymphangiogenesis (2016) *Cancer Res.* 76:4394-4405.
235. Mori K, Matsuda K, Furusawa T, Kawata M, Inoue T, Obinata M. Subcellular localization and dynamics of MysPDZ (Myo18A) in live mammalian cells (2005) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 326:491-498.
236. Morris SM, Arden SD, Roberts RC, Kendrick-Jones J, Cooper JA, Luzio JP, Buss F. Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton (2002) *Traffic* 3: 331-341.
237. Morriswood B, Ryzhakov G, Puri C, Arden SD, Roberts R, Dendrou C, Kendrick-Jones J, Buss F. T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signalling and cell adhesion (2007) *J. Cell Sci.* 120: 2574-2585.
238. Mostowy S, Cossart P. Autophagy and the cytoskeleton (2011) *Autophagy* 7:7,780-782.
239. Mukherjea M, Linas P, Kim HJ, Travaglia M, Safer D, Menétrey J, Franzini-Armstrong C, Selvin PR, Houdusse A, Sweeney HL. Myosin VI dimerization triggers an unfolding of a 3-helix bundle in order to extend its reach (2009) *Mol. Cell* 35:305-315.
240. Muro E, Hoang TQ, Jobart-Malfait A, Hernandez-Verdun D. In nucleoli, the steady state of nucleolar proteins is leptomycin B-sensitive (2008) *Biol Cell* 100(5):303-13.
241. Nakano T, Tani M, Nishioka M, Kohno T, Otsuka A, Ohwada S, Yokota J. Genetic and epigenetic alterations of the candidate tumor-suppressor gene MYO18B, on chromosome arm 22q, in colorectal cancer (2005) *Genes Chromosomes Cancer* 43:162-171.
242. Namboodiri HVM, Akey IV, Schmidt-Zachmann MS, Head JF, Akey WCh. The structure and function of *Xenopus* NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus (2004) *Structure* 12(12):2149-2160.
243. Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms (2005) *Nat Rev Cancer* 5(5):355-66.
244. Nemeth A, Grummt I. Dynamic regulation of nucleolar architecture (2018) *Curr Opin Cell Biol* 52:105-111.
245. Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signaling and therapeutic targeting (2011) *Biochem J* 1;434(2):181-8.
246. Nishikawa S, Homma K, Komori Y, Iwaki M, Wazawa T, Hikikoshi Iwane A, Saito J, Ikebe R, Katayama E, Yanagida T, Ikebe M. Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps (2002) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290:311-317.

247. Nishioka M, Kohno T, Tani M, Yanaihara N, Tomizawa Y, Otsuka A, Sasaki S, Kobayashi K, Niki T, Maeshima A, Sekido Y, Minna JD, Sone S, Yokota J. MYO18B, a candidate tumor suppressor gene at chromosome 22q12.1, deleted, mutated, and methylated in human lung cancer (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12269-12274.
248. Noguchi T, Lenartowska M, Miller KG. Myosin VI stabilizes an actin network during *Drosophila* spermatid individualization (2006) *Mol Biol Cell* 17:2559–2571.
249. Noguchi T, Lenartowska M, Rogat AD, Frank DJ, Miller KG. Proper cellular reorganization during *Drosophila* spermatid individualization depends on actin structures composed of two domains, bundles and meshwork, that are differentially regulated and have different functions (2008) *Mol Biol Cell* 19:2363–2372.
250. Nowak G, Pestic-Dragovich L, Hozak P, Philimonenko A, Simerly C, Schatten G, de Lanerolle P. Evidence for the presence of myosin I in the nucleus (1997) *J. Biol. Chem.* 272:17176-17181.
251. Nowak J, Redowicz MJ. Aktyna i miozyny w jądrze komórkowym (2018) *Kosmos* 67, 1(318):75-93.
252. O’Loughlin T, Masters TA, Buss F. The MYO6 interactome reveals adaptor complexes coordinating early endosome and cytoskeletal dynamics (2018) *EMBO Rep* 19:e44884.
253. Ochs R, Lischwe M, O’Leary P, Busch H. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis (1983) *Exp Cell Res.*146(1):139-49.
254. Ochs RL, Lischwe MA, Spohn WH, Busch H. Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera (1985) *Biol Cell* 54:123–134.
255. Odronitz F, Kollmar M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species (2007) *Genome Biology* 8:R196.
256. Okten Z, Churchman LS, Rock RS, Spudich JA. Myosin VI walks hand-over-hand along actin (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:884-887.
257. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone (2001) *FEBS Lett.* 506(3):272-6.
258. Okuwaki M, Saito S, Hirawake-Mogi H, Nagata K. The interaction between nucleophosmin/NPM1 and the large ribosomal subunit precursors contribute to maintaining the Nucleolar structure (2021) *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868(1):118879.
259. Olausson KH, Nister M, Lindström MS. Loss of nucleolar histone chaperone NPM1 triggers rearrangement of heterochromatin and synergizes with a deficiency in DNA methyltransferase DNMT3A to drive ribosomal DNA transcription (2014) *Biol Chem* 12;289(50):34601-19.
260. Olson MO, Thompson BA. Distribution of proteins among chromatin components of nucleolin (1983) *Biochemistry* 22:3187-3193.

261. Osterweil E, Wells DG, Mooseker MS. A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis (2005) *J. Cell Biol.* 168:329-338.
262. Ouyang Z, Zhao S, Yao S, Wang J, Cui Y, Wei Ke, Jiu Y. Multifaceted Function of Myosin-18, an unconventional class of the myosin superfamily (2021) *Front Cell Dev Biol* 9;9:632445.
263. Patel KG, Liu C, Cameron PL, Cameron RS. Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1alpha and 1gamma1 (2001) *J. Neurosci.* 21:7954-7968.
264. Pazdrak K, Shi XZ, Sarna SK. TNF alpha suppresses human colonic circular smooth muscle cell contractility by SP1-and NF-kappa B-mediated induction of ICAM-1 (2004) *Gastroenterology* 127:1096-1109.
265. Pellar GJ, DiMario PJ. Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain (2003) *Chromosoma* 111(7):461-469.
266. Pelletier J, Thomas G, Volarevic S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues (2018) *Nat Rev Cancer* 18, 51–63.
267. Penengo L, Mapelli M, Murachelli AG, Confalonieri S, Magri L, Musacchio A, Di Fiore PP, Polo S, Schneider TR. Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin (2006) *Cell* 124:1183-1195.
268. Peng A, Weber SC. Evidence for and against Liquid-Liquid Phase Separation in the Nucleus (2019) *Noncoding RNA* 1;5(4):50.
269. Peng L, Liang J, Wang H, Song X, Rashid A, Gomez HF, Corley LJ, Abbruzzese JL, Fleming JB, Evans DB, Wang H. High levels of nucleolar expression of nucleolin are associated with better prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma (2010) *Clin. Cancer Res.* 16:3734-3742.
270. Percipalle EP, Fomproix N, Cavellán E, Voit R, Reimer G, Krüger T, Thyberg J, Scheer U, Grummt I, Farrants AK. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription (2006) *EMBO Rep.* 7:525-530.
271. Perry RP, Kelley DE. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species (1970) *J Cell Physiol* 76(2):127-39.
272. Pestic-Dragovich L, Stojkovic L, Philimonenko AA, Nowak G, Ke Y, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt SF, Hozak P, de Lanerolle EP. A myosin I isoform in the nucleus (2000) *Science* 290:337-341.
273. Phair RD, Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus (2000) *Nature* 404(6778):604-609.
274. Phichith D, Travaglia M, Yang Z, Liu X, Zong AB, Safer D, Sweeney HL. Cargo binding induces dimerization of myosin VI (2009) *Natl. Acad. Sci. USA* 106 (41) 17320-17324.

275. Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingova H, Kyselá K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, de Lanerolle P, Hozák P, Grummt I. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription (2004) *Nat. Cell Biol.* 6:1165-1172.
276. Pih KT, Yi MJ, Liang YS, Shin BJ, Cho MJ, Hwang I, Son O. Molecular cloning and targeting of a fibrillarin homolog from *Arabidopsis* (2000) *Plant Physiol* 123(1):51-8.
277. Pollard TD, Korn ED. Acanthamoeba myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin (1993) *J. Biol. Chem.* 248: 4682-4690.
278. Pollock C, Huang S. The peri-nucleolar compartment (2009) *J Cell Biochem.* 2009 107(2):189-93.
279. Pollock C, Huang S. The peri-nucleolar compartment (2010) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2):a000679.
280. Pranchevicius MC, Baqui MM, Ishikawa-An-Kerhold HC, Lourenco EV, Leao RM, Banzi SR, Dos Santos CT, Barreira MC, Espreafico EM, Larson RE. Myosin Va phosphorylated on Ser1650 is found in nuclear speckles and redistributes to nucleoli upon inhibition of transcription (2008) *Cell Motil. Cytoskeleton* 65:441-456.
281. Preller M, Manstein D. Myosin structure, allostery, and mechano-chemistry (2013) *Structure* 21(11):1911-22.
282. Prieto JL, McStay B. Nucleolar biogenesis: the first small steps (2005) *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 6):1441-1443.
283. Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:325-334.
284. Reck-Peterson SL, Provance DW, Mooseker MS, Mercer JA. Class V myosins (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1496:36-51.
285. Redowicz MJ. Myosins and pathology: genetics and biology (2002) *Acta Biochim. Polon.* 49:789-804.
286. Redowicz MJ. Regulation of nonmuscle myosins by heavy chain phosphorylation (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22:163-173.
287. Richards, TA, Cavalier-Smith, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes (2005) *Nature* 436:1113– 1118.
288. Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production (2008) *RNA* 14:1918–1929.
289. Rock RS, Ramamurthy B, Dunn AR, Beccafico S, Rami BR, Morris C, Spink BJ, Franzini-Armstrong C, Spudich JA, Sweeney HL. A flexible domain is essential for the large step size and processivity of myosin VI (2005) *Mol. Cell* 17:603-609.
290. Rock RS, Rice SE, Wells AL, Purcell TJ, Spudich JA, Sweeney HL. Myosin VI is a processive motor with a large step size (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13655-13659.

291. Rodriguez-Corona U, Sobol M, Rodriguez-Zapata LC, Hozak P, Castano E. Fibrillarin from Archaea to human (2015) *Biol Cell* 107:159-174.
292. Roger B, Moisand A, Amalric F, Bouvet P. Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly (2003) *Chromosoma* 111(6):399-407.
293. Rosinska S, Filipek A. Interaction of CacyBP/SIP with NPM1 and its influence on NPM1 localization and function in oxidative stress (2018) *J Cell Physiol* 233(11):8826-8838.
294. Roux I, Hosie S, Johnson SL, Bahloul A, Cayet N, Nouaille S, Kros CJ, Petit Ch, Safieddine S. Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses (2009) *Hum Mol Genet* 18(23):4615-28.
295. Rubbi CP, Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 22 (2003) pp. 6068-6077.
296. Russo A, Russo G. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress (2017) *Int J Mol Sci.* 12;18(1):140.
297. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis (2005) *J Cell Biol.* 169:285–95.
298. Saitoh N, Spahr CS, Patterson SD, Bubulya P, Neuwald AF, Spector DL Proteomic analysis of interchromatin granule clusters (2004) *Mol Biol. Cell* 15:3876-3890.
299. Sakurai K, Hirata M, Yamaguchi H, Nakamura Y, Fukami K. Phospholipase C $\delta$ 3 is a novel binding partner of myosin VI and functions as anchoring of myosin VI on plasma membrane (2011) *Adv. Enzyme Regul.* 51:171-181.
300. Salamon M, Millino C, Raffaello OA, Mongillo M, Sandri C, Bean C, Negrisol E, Pallavicini A, Valle G, Zaccolo M, Schiaffino S, Lanfranchi G. Human MYO18B, a novel unconventional myosin heavy chain expressed in striated muscles moves into the myonuclei upon differentiation (2003) *J. Mol. Biol.* 326:137-149.
301. Sarshad AA, Percipalle P. New insight into role of myosin motors for activation of RNA polymerases (2014) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 311:183-230.
302. Sarshad AA, Sadeghifar F, Louvet E, Mori R, Böhm S, Al-Muzzaini B, Vintermist A, Fomproix N, Östlund AK, Percipalle P Nuclear myosin 1c facilitates the chromatin modifications required to activate rRNA gene transcription and cell cycle progression (2013) *PLoS Genet* 9(3):e1003397.
303. Savkur RS, Olson MO. Nucleic Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease (1998) *Acids Res* 26(19):4508-15.
304. Scheer U, Hock R. Structure and function of the nucleolus (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11(3):385-390.

305. Scherl A, Couté Y, Déon C, Callé A, Kindbeiter K, Sanchez JCh, Greco A, Hochstrasser D, Diaz JJ. Functional proteomic analysis of the human nucleolus (2002) *Mol. Biol. Cell* 13:4100–4109.
306. Schmidt-Zachmann MS, Dargemont C, Kuhn LC, Nigg EA. Nuclear export of proteins: the role of nuclear retention (1993) *Cell* 74:493-504.
307. Schmidt-Zachmann MS, Nigg EA. Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin (1993) *J Cell Sci* 105(Pt 3):799-806.
308. Schwab RS, Ihnatovych I, Yunus SZSA, Domaradzki T, Hofmann WA. Identification of signals that facilitate isoform specific nucleolar localization of myosin IC (2013) *Exp Cell Res* 1;319(8):1111-23.
309. Scott B, Marang C, Woodward M, Debold EP. Myosin's powerstroke occurs prior to the release of phosphate from the active site (2021) *Cytoskeleton (Hoboken)* 78(5):185-198.
310. Scott MS, Boisvert F-M, McDowall MD, Lamond AI, Barton GJ. Characterization and prediction of protein Nucleolar localization sequences (2010) *Nucleic Acids Res* 38(21):7388-99.
311. Sellers JR, Veigel C. Walking with Myosin V (2006) *Curr Opin Cell Biol* 18(1):68-73.
312. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily (2000) *Biochim Biophys Acta* 17;1496:3-22.
313. Shang G, Brautigam ChA, Chen R, Lu D, Torres-Vázquez, Zhang X. Structure analyses reveal a regulated oligomerization mechanism of the PlexinD1/GIPC/myosin VI complex (2017) *Elife* 24;6:e27322.
314. Shav-Tal Y, Blechman J, Darzacq X, Montagna C, Dye BT, Patton JG, Singer RH, Zipori D. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition (2005) *Mol Biol Cell* 16(5):2395-413.
315. Shaw PJ, Jordan EG. The nucleolus (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:93 -121.
316. Shubina MY, Musinova YR, Sheval EV. Nucleolar Methyltransferase Fibrillarin: Evolution of Structure and Functions (2016) *Biochemistry (Mosc)*. 81(9):941.
317. Smirnov E, Borkovec J, Kováčik L, Svidenská S, Schröfel A Skalníková M, Švindrych Z, Křížek P Oven M, Hagen GM, Juda P, Michalová K, Cardoso MC, Cmarko D, Raška I. Separation of replication and transcription domains in nucleoli (2014) *J Struct Biol* 188(3):259-66.
318. Snaar S, Wiesmeijer K, Jochemsen AG, Tanke HJ, Dirks RW. Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells (2000) *J Cell Biol* 151(3):653-662.
319. Sobczak M, Chumak V, Pomorski P, Wojtera E, Majewski L, Nowak J, Yamauchi J, Redowicz MJ. Interaction of myosin VI and its binding partner DOCK7 plays an important role in NGF-stimulated protrusion formation in PC12 cells (2016) *Biochim. Biophys. Acta* 1863:1589-1600.

320. Sobol M, Yildirim S, Philimonenko VV, Marasek P, Castano E, Hozak P. UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity (2013) *Nucleus* 4:478–486.
321. Sokal I, Haeseleer F. Insight into the role of Ca<sup>2+</sup>-binding protein 5 in vesicle exocytosis (2011) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52:9131-9141.
322. Spector DL, Ochs RL, Busch H. Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 (1984) *Chromosoma* 90(2):139-48.
323. Spudich G, Chibalina MV, Au JS, Arden SD, Buss F, Kendrick-Jones J. Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (2007) *Nat. Cell Biol.* 9:176-183.
324. Stenström L, Mahdessian D, Gnann Ch, Cesnik AJ, Ouyang W, Leonetti MD, Uhlén M, Cuylen-Haering S, Thul PJ, Lundberg E. Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder (2020) *Mol Syst Biol* 16(8):e9469.
325. Su H, Xu T, Ganapathy S, Shadfan M, Long M, Huang THM, Thompson I, Yuan ZM. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer (2014) *Oncogene* 33(11):1348-58.
326. Suszek M, Nowak J, Redowicz MJ. Miozyny niekonwencjonalne i ich rola w mięśniach poprzecznie prążkowanych i komórkach miogennych (2018) *Kosmos* 67(1):57-74.
327. Sweeney HL, Houdusse A. Myosin VI rewrites the rules for myosin motors (2010) *Cell* 141:573-582.
328. Sweet P, Chan PK and Slater LM. Cyclosporin A and verapamil enhancement of daunorubicin-produced nucleolar protein B23 translocation in daunorubicin-resistant and -sensitive human and murine tumor cells (1989) *Cancer Res.* 49:677–680.
329. Taft MH, Radke MB, Stanczak M, Thiel C, Manstein DJ. Human myosin-18B-a versatile actin binding protein (2014) *Biophys. J.* 106, 179a-180a.
330. Taft MH, Behrmann E, Munske-Weidemann L-Ch, Thiel C, Raunser S, Manstein DJ. Functional characterization of human myosin-18A and its interaction with F-actin and GOLPH3 (2013) *J Biol Chem* 288(42):30029-30041.
331. Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. Nucleolin The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus (2011) *Commun Integr Biol* 4(3):267-75.
332. Tani M, Ito J, Nishioka M, Kohno T, Tachibana K, Shiraishi M, Takenoshita S, Yokota J. Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells (2004) *Genes Chromosomes Cancer* 40(2):146-51.
333. Taylor KA. Regulation and recycling of myosin V (2007) *Curr Opin Cell Biol* 19(1):67-74.

334. Tessarz P, Santos-Rosa H, Robson SC, Sylvestersen KB, Nelson CJ, Nielsen ML, Kouzarides T. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification (2014) *Nature* 505:564–568.
335. Thielmann HW, Popanda O, Staab HJ. Subnuclear distribution of DNA topoisomerase I and Bax protein in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts after irradiation with UV light and gamma rays or treatment with topotecan (1999) *J Cancer Res Clin Oncol* 125(3-4):193-208.
336. Thiry M, Lafontaine DL. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments (2005) *Trends Cell Biol.* 15(4):194-9.
337. Thomson E, Ferreira-Cerca S I Hurt E. Eukaryotic Ribosome Biogenesis at a Glance (2013) *J. Cell Sci.* 126: 4815–4821.
338. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM, Bäckström A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann Ch, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey CM, Nilsson P, Oksvold P, Rockberg J, Schutten R, Schwenk JM, Sivertsson A, Sjöstedt E, Skogs M, Stadler Ch, Sullivan DP, Tegel H, Winsnes C, Zhang Ch, Zwahlen M, Mardinoglu A, Pontén F, von Feilitzen K, Lilley KS, Uhlén M, Lundberg E. A subcellular map of the human proteome (2017) *Science* 356:eaal 3321.
339. Titus MA. Myosin-Driven Intracellular transport (2018) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(3):a021972
340. Tomatis VM, Josh P, Papadopulos A, Gormal RS, Lanoue V, Martin S, Meunier FA. ENA/VASP proteins regulate exocytosis by mediating myosin VI-dependent recruitment of secretory granules to the cortical actin network (2017) *Mol Cell Neurosci* 84:100-111.
341. Tomatis VM, Papadopulos A, Malintan NT, Martin S, Wallis T, Gormal RS, Kendrick-Jones J, Buss F, Meunier FA. Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin (2013) *J Cell Biol* 200(3):301-20.
342. Tonello F, Massimino ML, Peggion C. Nucleolin: a cell portal for viruses, bacteria, and toxins (2022) *Cellular and Molecular Life Sciences* 79(5):271.
343. Torrano V, Navascués J, Docquier F, Zhang R, Burke Les I, Chernukhin I, Farrar D, León J, Berciano MT, Renkawitz R, Klenova E, Lafarga M, Delgado MD. Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism (2006) *J Cell Sci* 1;119(Pt 9):1746-59.
344. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications (1979) *Proc Natl Acad U S A* 76(9):4350-4354.
345. Tschochner H, Hurt E. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm (2003) *Trends Cell Biol.* 13(5):255-63.



346. Tsekrekou M, Stratigi K, Chatzinikolaou G. The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair (2017) *Int J Mol Sci* 18(7):1411.
347. Tumbarello DA, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosin VI and its cargo adaptors - linking endocytosis and autophagy (2013) *J. Cell Sci.* 126, 2561-2570.
348. Tumbarello DA, Manna PT, Allen M, Bycroft M, Arden SD, Kendrick-Jones J, Buss F. The autophagy receptor TAX1BP1 and the molecular motor Myosin VI are required for clearance of *Salmonella Typhimurium* by autophagy (2015) *PLoS Pathog* 11(10):e1005174.
349. Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F, Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome (2012) *Nat. Cell Biol.* 14:1024-1035.
350. Turi Z, Lacey M, Mistrik M, Moudry P. Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging (2019) *Aging* 11:2512-2540.
351. Tuteja R, Tuteja N. Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein (1998) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33(6):407-36.
352. Udem SA, Warner JR. The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast (1973) *J Biol Chem* 25;248(4):1412-6.
353. Ugrinova I, Monier K, Ivaldi C, Thiry M, Storck S, Mongelard F, Bouvet P. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication (2007) *BMC Mol. Biol.* 8:66.
354. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Björling L, Ponten F. Towards a knowledge-based human protein atlas (2010) *Nature Biotechnology* 28:1248-1250.
355. Vale RD. Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism (2003) *J. Cell Biol.* 163: 445-450.
356. van Sluis M, McStay B. Nucleolar DNA Double-Strand Break Responses Underpinning rDNA Genomic Stability (2019) *Trends Genet* 35(10):743-753.
357. Venit T, Mahmood SR, Endara-Coll M, Percipalle P. Nuclear actin and myosin in chromatin regulation and maintenance of genome integrity (2020) *Int Rev Cell Mol Biol* 355:67-108.
358. Villacís LN, Wong MS, Ferguson LL, Hein N, George AJ, Hannan KM. New Roles for the Nucleolus in Health and Disease (2018) *Bioessays* 40(5):e1700233.
359. Vintermist A, Bohm AS, Sadeghifar F, Louvet E, Mansen A, Percipalle AK, Östlund Farrants AK. The chromatin remodelling complex B-WICH changes the chromatin structure and recruits histone acetyl-transferases to active rRNA genes. *PLoS One* 6 (2011) e19184.
360. Voit R, Schnapp A, Kuhn A, Rosenbauer H, Hirschmann P, Stunnenberg HG, Grummt I. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-

- terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation (1992) EMBO J 11: 2211–2218.
361. Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, Bussi M, Biffo S. Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription (2006) Mol. Cell 23:749-755.
362. Waggoner S, Sarnow P. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocation of nucleolin in poliovirus-infected cells (1998) J Virol 72(8):6699-709.
363. Walklate J, Ujfalusi Z, Geeves MA. Myosin isoforms and the mechanochemical cross-bridge cycle (2016) J Exp Biol 219(Pt 2):168-174.
364. Wang H, Boisvert D, Kim KK, Kim R, Kim S-H. Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution (2000) EMBO J. 19(3):317-323.
365. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication (2005) Nat Cell Biol 7:823–830.
366. Wang Y, Steimle PA, Ren Y, Ross ChA, Robinson DN, Egelhoff TT, Sesaki H, Iijima M. Dictyostelium huntingtin controls chemotaxis and cytokinesis through the regulation of myosin II phosphorylation (2011) Mol Biol Cell 1;22(13):2270-81.
367. Wanzel M, Russ AC, Kleine-Kohlbrecher D, Colombo E, Pelicci PG, Eilers M. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth (2008) Nat Cell Biol. 10(9):1051–1061.
368. Warner CL, Stewart A, Luzio JP, Steel KP, Libby RT, Kendrick-Jones J, Buss F. Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice (2003) Embo J. 22:569–79.
369. Weeks SE, Metge BJ, Samant RS. The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression (2019) Cell Mol life Sci 76, 4511-4524.
370. Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards (1999) Nature 401 (6752):505-8.
371. Wilkie AR, Sharma M, Pesola JM, Ericsson M, Fernandez R, M Coen D. A role for myosin Va in human Cytomegalovirus Nuclear Egress (2018) J Virol 26;92(6):e01849-17.
372. Wollscheid HP, Biancospino M, He F, Magistrati E, Molteni E, Lupia M, Soffientini P, Rottner K, Cavallaro U, Pozzoli U, Mapelli M, Walters KJ, Polo S. Diverse functions of myosin VI elucidated by an isoform-specific  $\alpha$ -helix domain (2016) Nat. Struct. Mol. Biol. 23:300-308.

373. Wong S, Weisman LS (2021) Roles and regulation of myosin V interaction with cargo. *Adv Biol Regul* 79:100787.
374. Wright JE, Mais Ch, Prieto JL, McStay B. A role for upstream binding factor in organizing ribosomal gene chromatin (2006) *Biochem Soc Symp* (73):77-84.
375. Wu X, Wang F, Rao K, Sellers JR, Hammer JA. 3rd. Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va (2002) *Mol. Biol. Cell* 13:1735-1749.
376. Wu XS, Rao K, Zhang H, Wang F, Sellers JR, Matesic LE, Copeland NG, Jenkins NA, Hammer J. A. 3rd. Identification of an organelle receptor for myosin Va (2002) *Nat. Cell Biol.* 4:271-278.
377. Xue Z, Mélése T. Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis? (1994) *Trends Cell Biol* 4(12):414-7.
378. Yanaihara N, Nishioka M, Kohno T, Otsuka A, Okamoto A, Ochiai K, Tanaka T, Yokota J. Reduced expression of MYO18B, a candidate tumor-suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer (2004) *Int. J. Cancer.* 112: 150-154.
379. Yang K, Wang M, Zhao Y, Sun X, Yang Y, Li X, Zhou A, Chu H, Zhou H, Xu J, Wu M, Yang J, Yi J. A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin (2016) *Nat Commun* 25(7):13599.
380. Yang K, Yang J, Yi J. Nucleolar Stress: hallmarks, sensing mechanism and diseases (2018) *Cell stress* 2(6):123-140.
381. Yarmola EG, Bubb MR. Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions (2006) *Trends Biochem. Sci.* 31:197-205.
382. Yi YW, You KS, Park J-S, Lee S-G, Seong Y-S. Ribosomal Protein S6: A potential therapeutic target against cancer? (2022) *Int J Mol Sci.* 23(1):48.
383. Yildiz A, Park H, Safer D, Yang Z, Chen LQ, Selvin PR, Sweeney HL. Myosin VI steps via a hand-over-hand mechanism with its lever arm undergoing fluctuations when attached to actin (2004) *J. Biol. Chem.* 279:37223-37226.
384. Yogev O, Saadon K, Anzi S, Inoue K, Shaulian E. DNA damage-dependent translocation of B23 and p19 ARF is regulated by the Jun N-terminal kinase pathway (2008) *Cancer Res* 68(5):1398-406.
385. Yoshida H, Cheng W, Hung J, Montell D, Geisbrecht E, Rosen D, Liu J, Naora H. Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8144-8149.
386. Yu C, Feng W, Wei Z, Miyanoiri Y, Wen W, Zhao Y, Zhang M. Myosin VI undergoes cargo-mediated dimerization (2009) *Cell* 138(3):537-48.
387. Yu Y, Maggi LB Jr, Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, Weber JD. Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export (2006) *Molecular and Cellular Biology* 26(10):3798-3809.

388. Yung BY, Bor AM, Chan PK. Short exposure to actinomycin D induces "reversible" translocation of protein B23 as well as "reversible" inhibition of cell growth and RNA synthesis in HeLa cells (1990) *Cancer Res* 15;50(18):5987-91.
389. Yung BY, Busch H, Chan PK. Translocation of nucleolus phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis (1985) *Biochim Biophys Acta* 826(4):167-73.
390. Zadro C, Alemanno MS, Bellacchio E, Ficarella R, Donaudy F, Melchionda S, Zelante L, Rabionet R, Hilgert N, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Carella M. Are MYO1C and MYO1F associated with hearing loss? (2009) *Biochim Biophys Acta* 1792(1):27-32.
391. Zakrzewski P, Lenartowski R, Redowicz MJ, Miller KG, Lenartowska M. Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids (2017) *Histochem. Cell Biol.* 48:445-462.
392. Zakrzewski P, Suwinska A, Lenartowski R, Redowicz MJ, Buss F, Lenartowska M. Myosin VI maintains the actin-dependent organization of the tubulobulbar complexes required for endocytosis during mouse spermiogenesis (2020a) *Biol Reprod* 102(4):863-875.
393. Zakrzewski P, Redowicz MJ, Buss F, Lenartowska M. Loss of myosin VI expression affects acrosome/acroplaxome complex morphology during mouse spermiogenesis (2020b) *Biol Reprod.* 21;103(3):521-533.
394. Zamora-Cura AL, Jimenez-Garcia LF. Visualization of Interchromatin Granules in the Cell Nucleus by Atomic Force Microscopy (2014) *Journal of Advanced Microscopy Research* 9(4):296-300.
395. Zarka J, Short NJ, Kanagal-Shamanna R, Issa GC. Nucleophosmin 1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia (2020) *Genes (Basel)* 11(6):649.
396. Zhang J, Yang G, Li Q, Xie F. Increased fibrillarin expression is associated with tumor progression and an unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma (2021) *Oncol Lett* 21(2):92.
397. Zhang L, Wu Ch, Cai G, Chen S, Ye K. Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast (2016) *Genes Dev* 15;30(6):718-32.
398. Zorca CE, Kim LK, Kim YJ, Krause MR, Zenklusden D, Spilianakis CG, Flavell RA. Myosin VI regulates gene pairing and transcriptional pause release in T cells (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:E1587-1593.

## LISTA PUBLIKACJI WŁASNYCH:

### Publikacje związane z tematyką rozprawy:

1. Majewski L\*, **Nowak J\***, Sobczak M, Karatsai O, Havrylov S, Lenartowski R, Suszek M, Lenartowska M, Rędownicz MJ. Myosin VI in the nucleus of neurosecretory PC12 cells: Stimulation-dependent nuclear translocation and interaction with nuclear proteins (2018) *Nucleus* 9(1):125-141.

(\* równy wkład w publikację)

2. **Nowak J**, Rędownicz MJ. Aktyna i miozyny w jądrze komórkowym (2018) *Kosmos* 67 (1/318)/75-93.

### Publikacje pozostałe:

1. Suszek M, **Nowak J**, Rędownicz MJ. Miozyny niekonwencjonalne i ich rola w mięśniach poprzecznie prążkowanych i komórkach biogenych (2018) *Kosmos* 67 (1/318):57-74.
2. Sobczak M, Chumak V, Pomorski P, Wojtera E, Majewski Ł, **Nowak J**, Yamauchi J, Rędownicz MJ. Interaction of myosin VI and its binding partner DOCK7 plays an important role in NGF-stimulated protrusion formation in PC12 cells (2016) *Biochim Biophys Acta*. 1863(7 Pt A):1589-600.
3. Jurewicz E, Ostrowska Z, **Józwiak J**, Rędownicz MJ, Leśniak W, Moraczewska J, Filipek A. CacyBP/SIP as a novel modulator of the thin filament (2013) *BBA - Molecular Cell Research*, 1833(3):761-6.
4. Żbikowska-Gotz M, **Józwiak J**, Rędownicz MJ, Kuźmiński A, Napiórkowska K, Przybyszewski M, Socha E, Bartuzi Z, Karczewska E. An assessment of cross reactivity in patients allergic to birch pollen by immunoblotting (2013) *Food and Agricultural Immunology* 24:445-456.
5. Majewski Ł, Sobczak M, Havrylov S, **Józwiak J**, Rędownicz MJ. DOCK7: A GEF for Rho-family GTPases is a novel myosin VI binding partner in neuronal PC12 cells (2012) *Biochemistry and Cell Biology* 90(4):565-74.
6. Osiecka KM, Nieznańska H, Skowronek KJ, **Józwiak J**, Nieznański K. Tau inhibits tubulin oligomerization induced by prion protein (2011) *BBA-Molecular Cell Research*, 1813:1845-53.
7. **Józwiak J**, Rhrzpetskiy Y, Sobczak M, Kocik E, Skórzewski R, Kłopocka W, Rędownicz MJ. C-terminal fragment of amebin promotes actin filament bundling, inhibits actomyosin ATPase activity and is essential for amoeba migration (2011) *Arch Biochem Biophys* 506(1):99-108.
8. Schneider G, Nieznański K, **Józwiak J**, Słomnicki ŁP, Rędownicz MJ, Filipek A. Tubulin binding protein, CacyBP/SIP, induces actin polymerization and may link actin and tubulin cytoskeletons (2010) *Biochim Biophys Acta* 1803(11):1308-17.