

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra Biochemie

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Adéla Brucknerová

Vliv sterické exkluze na biochemickou aktivitu molekulárních motorů

Steric Exclusion Effects and Biochemical Activity of Molecular Motors

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Zdeněk Lánský, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

Podpis

Abstrakt

Cytoskelet a s ním spojené proteiny, tzv. molekulární motory, jsou součástí buněčného aparátu všech eukaryotických buněk. Molekulární motory, mezi něž patří kinesin-1, mají schopnost se na cytoskelet dočasně vázat a přenášet po něm v rámci buňky váčky s nákladem (např. organelou). Při tomto pohybu štěpí molekuly kinesinu-1 pro každý krok v rámci chemomechanického cyklu molekulu ATP. Ukazuje se, že průběh chemomechanického cyklu molekulárních motorů může být ovlivněn přítomností inertních makromolekul, ale jak tyto molekuly ovlivňují kinesin, není zcela známo.

Pomocí fluorescenční mikroskopie s totálním vnitřním odrazem byly *in vitro* zobrazovány jednotlivé molekuly kinesinu-1, byl snímán jejich pohyb po rekonstituovaných mikrotubulech a měřena jejich průměrná rychlost. Experimenty probíhaly při různých koncentracích inertních makromolekul, polyethylenglykolu, o molárních hmotnostech 6 kg/mol, 1000 kg/mol a jejich kombinací. Z rychlosti pohybu kinesinů byla zjištěna jejich biochemická aktivita (hydrolýza molekul ATP) při různých koncentracích polyethylenglykolu.

Ve shodě s předchozími výzkumy se ukázalo, že makromolekuly velikostně podobné rozměrům motorové domény kinesinů významně snižují biochemickou aktivitu motorů při zvyšující se koncentraci makromolekul, a to zřejmě sterickými efekty. Naproti tomu makromolekuly výrazně přesahující rozměry motorové domény na kinesiny nemají zásadní vliv ani při koncentracích způsobujících velmi vysokou viskozitu roztoku. Při kombinaci obou použitých typů polyethylenglykolu se značně posílil sterický efekt bránění pohybu motorové domény oproti podmínkám, kdy byl v roztoku přítomen pouze jeden z obou typů. Tato práce ukazuje, jak mohou inertní makromolekuly ovlivňovat enzymovou aktivitu molekulárních motorů.

Klíčová slova: molekulární motory, kinesin-1, shlukování makromolekul, sterická exkluze, cytoskelet, polyethylenglykol

Abstract

The cytoskeleton and its associated proteins, the so-called molecular motors, belong to the cellular apparatus of every eukaryotic cell. Molecular motors, including kinesin-1, have the ability to temporarily bind to the cytoskeleton and transport cargo vesicles (e.g. organelles) along it. During such movement, kinesin-1 molecules hydrolyse one ATP molecule for each step of their chemomechanical cycle. It turns out, that the chemomechanical cycle may be affected by the presence of inert macromolecules. The influence of these macromolecules on the chemomechanical cycle of kinesin-1 is, however, not entirely known.

Using total internal reflection fluorescence microscopy, single molecules of kinesin-1 were tracked *in vitro*. Their movement along reconstituted microtubules was recorded and the average velocity was measured. The performed experiments were carried out with variety of concentrations of soluted macromolecules – polyethylene glycol. For experiments, polyethylene glycols of molecular weight 6 kg/mol, 1000 kg/mol and combination of both were used. From average velocities, biochemical activity of kinesin-1 molecules at various concentrations of polyethylene glycol was obtained.

In accordance with prior studies, macromolecules similar in size to the motor domain of kinesin significantly diminish biochemical activity of motors upon increase of macromolecule concentration, probably due to steric exclusion effects. On the other hand, macromolecules that go beyond the motor domain in their size do not vastly affect kinesins, even at concentrations causing high viscosities. Combining both used polyethylene glycols strongly enhanced the steric effect of hindering kinesin motor domain in its movement compared to experiments with only one type of polyethylene glycol. This work shows how inert macromolecules can affect enzymatic activity of molecular motors.

Key words: molecular motors, kinesin-1, macromolecular crowding, steric exclusion, cytoskeleton, polyethylene glycol

[IN CZECH]

Poděkování

Na prvním místě chci vyjádřit díky svému školiteli RNDr. Zdeňkovi Lánskému, Ph.D. a spolu s ním Mgr. Lence Gryčové, Ph.D. z Laboratoře strukturních proteinů v BIOCEVu. Děkuji za nesmírnou ochotu a vždy přívětivý přístup při vedení mé bakalářské práce.

Děkuji také Mgr. Jánů Sabóvi za jeho vstřícnost a trpělivost při vysvětlování, jak pracovat s technikou, a průběžnou pomoc a radu v laboratoři.

Děkuji své rodině za podporu během studia.

Zvláštní dík bych ráda věnovala dvěma akademikům, jejichž široký rozhled, laskavé rady a ochota kdykoliv pomoci mi pomáhaly zorientovat se v životě nejen na univerzitě během mého studia, Mgr. Alexandru Slávikovi, Ph.D. a Ing. Jakubovi Krásenskému.

Za časnou i pozdní motivaci ke studiu dlužím dík RNDr. Vladimíru Vítovi a Vojtěchu Sekerovi.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	7
Úvod	9
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
1.1 CYTOSKELET	10
1.1.1 Aktinová filamenta (mikrofilamenta)	10
1.1.2 Intermediární filamenta (střední filamenta)	10
1.1.3 Mikrotubuly	10
1.1.3.1 Stavba mikrotubulů	11
1.1.3.2 Formování mikrotubulů	12
1.1.3.3 Struktura tubulinů	14
1.1.3.4 Taxol a jeho účinek na mikrotubuly	17
1.2 MOLEKULÁRNÍ MOTORY A CYTOSKELETÁRNÍ TRANSPORT	18
1.2.1 Kinesin	18
1.2.1.1 Struktura a pohyb kinesinu	19
1.2.1.2 Motorová doména kinesinu	21
1.2.1.3 Kinetika pohybu kinesinu-1	23
1.2.2 Význam studia molekulárních motorů	23
1.3 SHLUKOVÁNÍ INERTNÍCH MAKROMOLEKUL	23
2 CÍLE PRÁCE	28
3 MATERIÁL A METODY	29
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	29
3.1.1 Seznam chemikálií	29
3.1.2 Roztoky	30
3.1.3 Biologický materiál	31
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	31
3.2.1 Seznam přístrojů	31
3.2.2 Další použitý materiál	32
3.2.3 Použitý software	32
3.3 POUŽITÉ METODY	32
3.3.1 Příprava kanálku pro mikroskopii	32
3.3.2 Příprava měřicího pufru	33
3.3.3 Příprava mikrotubulů	34
3.3.4 Ředění kinesinu-1	35
3.3.5 Mikroskopie	35
3.3.6 Analýza obrazu	36
4 VÝSLEDKY	39
4.1 ZÍSKANÁ DATA	39
4.2 RYCHLOST KINESINU-1 V PROSTŘEDÍ PEGU, $M_w = 6$ KG/MOL	41
4.3 RYCHLOST KINESINU-1 V PROSTŘEDÍ PEGU, $M_w = 1000$ KG/MOL	43
4.4 RYCHLOST KINESINU-1 VE SMĚSI PEGŮ, $M_w = 6$ A 1000 KG/MOL	44
5 DISKUZE	46
6 ZÁVĚR	49
Seznam použité literatury	52

Seznam zkratek a symbolů

Å – jednotka délky (Ångström)

a – parametr jednotkového řádu

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosintrifosfát

b – parametr jednotkového řádu

Da – jednotka hmotnosti (Dalton)

DMSO – dimethyl sulfoxid

DTT – dithiotreitol

E_a – aktivační energie ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)

EGTA – ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (z angl. ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)

FPS – počet snímků pořízených za sekundu (z angl. Frames per Second)

GDP – guanosindifosfát

GFP – zelený fluorescenční protein (z angl. Green Fluorescent Protein)

GTP – guanosintrifosfát

HEPES – 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

IRM – interferenční reflexní mikroskopie

k – Boltzmannova konstanta ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$)

$k_{\#}$ – rychlostní konstanta chemické reakce

K_M – Michaelisova konstanta ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

M – jednotka molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

MAPs – proteiny asociované s mikrotubuly (z angl. Microtubule Associated Proteins)

M_w – molární hmotnost (kg/mol, příp. Da)

PBS – fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)

PEG – polyethylenglykol

PEG 1000 – polyethylenglykol o molární hmotnosti 1000 kg/mol

PEG 6 – polyethylenglykol o molární hmotnosti 6 kg/mol

pH – vodíkový exponent

PIPES – 1,4-piperazindiethansulfonová kyselina (z angl. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

R – univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)

R_{ef} – efektivní poloměr částice (m)

R_h – hydrodynamická poloměr makromolekuly (m)
 ROI – oblast zájmu (z angl. Region of Interest)
 r_p – hydrodynamický poloměr sledované částice (m)
 s – dráha (m)
 t – čas (s)
 T – termodynamická teplota (K)
 TIRF – fluorescence s totálním vnitřním odrazem (z angl. Total Internal Reflection Fluorescence)
 TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan
 v – rychlost ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
 v_0 – počáteční rychlost chemické reakce (s^{-1})
 v_{MAX} – maximální rychlost chemické reakce (s^{-1})
 w/w – hmotnostní zlomek
 w/v – hmotnostně-objemový zlomek
 η_0 – dynamická viskozita rozpouštědla ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$)
 η_{ef} – efektivní viskozita ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$)
 ζ – korelační délka (m)

Úvod

Studium cytoskeletu probíhá již několik dekád. Cytoskelet eukaryotických buněk má mimo jiné funkci transportního systému v rámci buňky. Spolu s tím probíhá i studium proteinů, které se na cytoskelet dočasně vážou a pohybují podél jeho složek, tzv. molekulárních motorů. Nejsnadnějším způsobem studia složek cytoskeletu a s nimi spojených molekulárních motorů je jejich pozorování mikroskopickými technikami; s tím je ovšem spojena i řada podmínek, které jsou oproti podmínkám vnitřního prostředí buňky značně zjednodušené.

Známým molekulárním motorem je kinesin-1. Kinesiny jsou schopné přepravovat podél trati vymezené proteinovými vlákny, mikrotubuly, váček s nákladem určeným k doručení do jiných částí buňky. Toho je obzvláště zapotřebí např. v buňkách nervové soustavy, kde nervové výběžky, axony, mohou dosahovat délky i několika metrů. V současnosti probíhá výzkum onemocnění nervové soustavy ve spojitostech s poruchami intercelulárního transportu.

Pohyb kinesinu-1 je uskutečňován díky hydrolýze ATP. Tato biochemická aktivita kinesinu je regulována chemickou vazbou regulačních molekul na mikrotubuly. Obsah buňky je z velké části vyplněn dalšími, vůči kinesinu často inertními molekulami, zdánlivě nehrajícími v regulaci molekulárních motorů žádnou významnější roli. V rámci této práce bude zjišťován vliv interních molekul na pohyb, a tedy i hydrolytickou aktivitu motorů.

Jako modelová molekula byl pro tuto práci vybrán polyethylenglykol (PEG) o dvou molárních hmotnostech a vzájemná kombinace obou těchto typů. Cílem práce je ověřit a prozkoumat vliv PEGu na pohyb a s tím spojenou biochemickou aktivitu kinesinů v podmínkách *in vitro*.

1 Literární přehled

1.1 Cytoskelet

Cytoskelet je souborné označení pro různé typy vláknitých proteinových útvarů obsažených ve všech eukaryotních buňkách. V prokaryotech lze pozorovat analogické struktury jiného biochemického složení [1, 2].

K eukaryotnímu cytoskeletu patří aktinová filamenta (mikrofilamenta), intermediární filamenta (střední filamenta) a mikrotubuly. Tato vlákna dohromady tvoří soustavu podobnou kolejím nebo opěrným soustavám v architektuře, dávají buňce tvar a pevnost, jsou transportním systémem a dopravní komunikací mezi vzdálenými částmi buňky [1].

1.1.1 Aktinová filamenta (mikrofilamenta)

Mikrofilamenta, též aktinová filamenta, mají z cytoskeletárních vláken na průřezu nejmenší průměr – 6 nm [2]. Jedná se o polymery globulárního proteinu aktinu [3]. Při mitóze živočišných buněk mikrofilamenta formují kontraktilní prstenec. Ve svalových buňkách jsou stabilní mikrofilamenta spolu s motorovým proteinem myosinem jedněmi ze základních proteinů svalových vláken (až 25 % svalových bílkovin [4, 5]).

1.1.2 Intermediární filamenta (střední filamenta)

Intermediární filamenta byla pojmenována podle velikosti jejich průřezu (10 nm), která spadala mezi velikosti průřezů aktinových a mikrotubulárních filament [6]. Podílí se mimo jiné na tvorbě struktur v podobě pokožky a jejích derivátů (chlupy, vlasy, nehty, rohy, peří ad.). S intermediárními filamenty se nepojí aktivita žádných molekulárních motorů.

1.1.3 Mikrotubuly

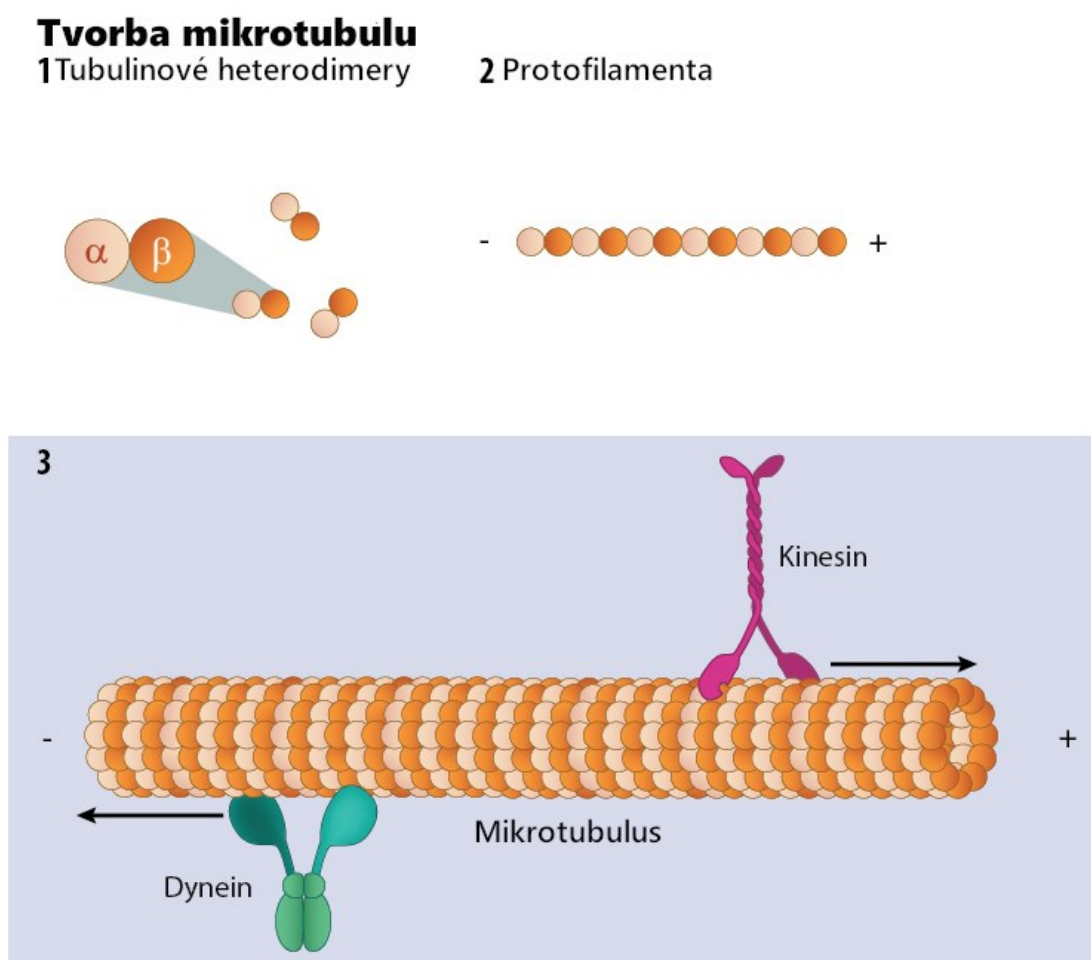
Pojem mikrotubulus byl zaveden r. 1963 Davidem Slautterbackem v návaznosti na pozorování drobných tubulárních útvarů v knidoblastech nezmarů (*Hydra oligactis*, *H. littoralis*) [7]. Jedná se o proteinová vlákna tvaru dutého válce o průměru 25 nm tvořené heterodimery α - a β -tubulinu [5]. Od ostatních složek cytoskeletu je lze odlišit chemicky nebo mikroskopicky.

Mikrotubuly se vyskytují ve všech eukaryotických buňkách. Jsou nezbytné pro dělení buňky, transport látek a tvorbu pohybových organel buněk.

1.1.3.1 Stavba mikrotubulů

Mikrotubuly jsou duté vláknité proteiny tvořené heterodimerními jednotkami α - a β -tubulinu. Molekuly tubulinů jsou volně rozpuštěné v cytoplazmě eukaryotických buněk. Tubuliny se spojují za sebou ve směru hlava-ocas nekovalentními interakcemi a tvoří tak stavební vlákna mikrotubulu, protofilamenta [8]. Interagují mezi sebou také laterálně. Tím je zajištěna soudržnost protofilament v mikrotubulu.

Struktura mikrotubulu je ilustrována na obrázku 1.1.



Obr. 1.1 Struktura mikrotubulu [9], upraveno. 1) Z monomerů α - a β -tubulinu se tvoří heterodimery. 2) Heterodimerní stavební jednotky se spojují do vlákna – protofilamenta – s (+)- a (-)-koncem. 3) Protofilamenta se laterálně spojují do podoby dutého válce. Po povrchu válce se mohou pohybovat molekulární motory (dále v textu).

Délka heterodimeru α/β -tubulinu je přibližně 8 nm [7]. Samotný α -tubulin nedisponuje hydrolasovou aktivitou a nedokáže tak štěpit navázané GTP, jeho GTP je proto nevyměnitelné. Otevření GTP-vazebného místa na α -tubulinu pro vazbu GTP je

děj zprostředkovaný β -tubulinem. Hydrolyza a výměna GTP probíhá na β -tubulinu, nejčastěji v rámci polymerace [10].

Na tvorbě mikrotubulů se podílí i třetí typ tubulinu, γ -tubulin, který se váže na (-)-konec tubulinového vlákna a napomáhá nukleaci a organizaci mikrotubulů [10]. Nachází se specificky v centrosomu. Podle jednoho z modelů zde tvoří nukleační očka o průměru 25 nm, která předznamenávají základnu třinácti protofilament vznikajícího mikrotubulu. Blokují dynamiku tubulu z jeho (-)-konce, který je očkem držen a stabilizován.

Heterodimerní charakter stavebních jednotek mikrotubulů vede k celkové polaritě výsledných vláken. Konec vlákna zakončený α -tubulinem se označuje jako (-)-konec, opačná strana vlákna, která je ohraničena β -tubulinem s navázaným GTP, jako (+)-konec vlákna [11]. Vršek (+)-konce se nazývá GTP-čepička. Je pro mikrotubulus významným stabilizačním prvkem. Zde je díky GTPasové aktivitě β -tubulinu možné štěpení a celková výměna molekul GTP. Výměna molekul GTP tedy probíhá právě z konce mikrotubulu, nikoli z jeho středu. Růst vlákna *in vivo* probíhá na jeho (+)-konci, kde se po hydrolyze GTP a připojení dalšího stavebního dimeru stává zbytek nukleotidu – GDP – nevyměnitelným. Možnost výměny GTP právě na (+)-konci tubulu je kromě strukturních důvodů podpořena také kontaktem vazebného místa pro GTP na poslední stavební podjednotce mikrotubulu se solventem. V solventu jsou nukleotidy rozpuštěny a volně dostupné. Při experimentech *in vitro* přirůstají mikrotubuly z obou konců, na (-)-konci ale pomaleji než na (+)-konci [12].

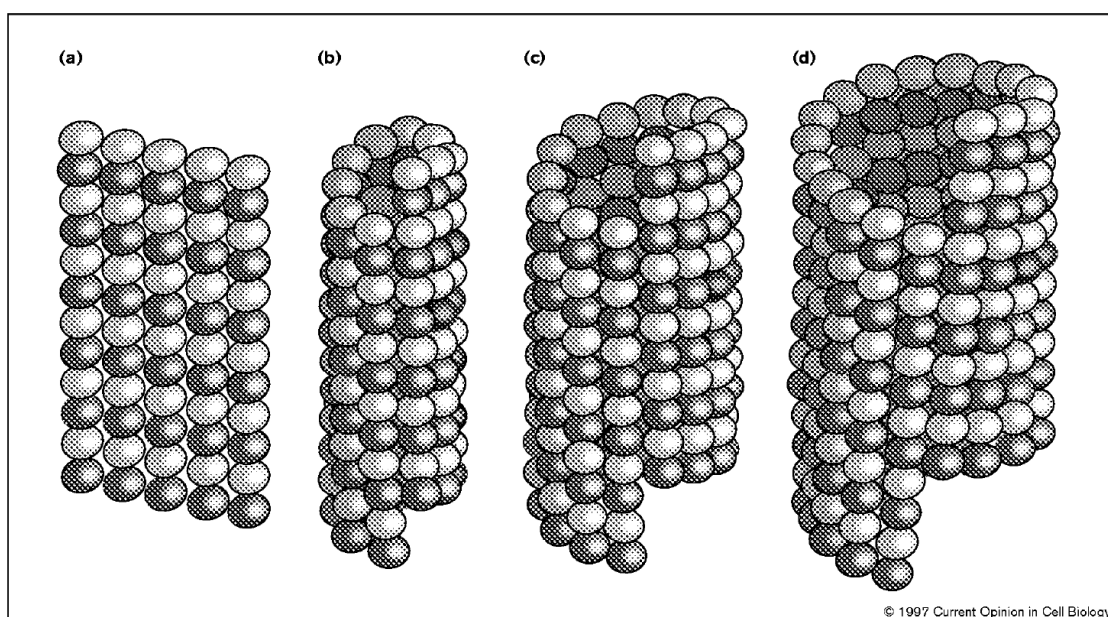
1.1.3.2 Formování mikrotubulů

V živočišných buňkách vyrůstají mikrotubuly zpravidla z centra organizujícího mikrotubuly, kde je zakotven (-)-konec tubulu. Toto centrum se často nachází v centrosomu, organele lokalizované v sousedství jádra (případ buněk v interfázi buněčného cyklu). Při mitóze je centrosom zduplikovaný, mikrotubuly pak vyrůstají z obou organizačních center a formují dělicí vřeténko.

V centrosomu přítomný γ -tubulin vytváří nukleační očka pro růst mikrotubulů. Z heterodimerů α/β -tubulinu se následně podle protofilamentového modelu sestavuje vlákno – protofilamentum. Růst začíná α -tubulinem. Dominující struktura mikrotubulu v eukaryotech pak vzniká podélným přiložením třinácti protofilament k sobě. Pomocí elektronové krystalografie bylo ukázáno, že tubuliny a následně filamenta se při tvorbě

mikrotubulu spojují do β -listu, jak je znázorněno na obrázku 1.2. Spojením listu vzniká dutý válec.

V případě, že je tvořen třinácti protofilamenty, jsou filamenta po celé své délce rovná a nedochází k jejich helikální deformaci podél tubulu [7]. V případě jiného počtu stavebních filament je nevyhnutelné, aby se od pomyslné horní podstavy válce podél pláště protofilamenta mírně helikálně stáčela. V místě spoje krajů původního β -listu vzniká na válci podélný šev, který se vyznačuje laterálním přechodem mezi α - a β -tubulinem. Mimo šev jsou po obvodu válce protofilamenta v laterálním kontaktu přes tubuliny stejného typu, tedy α - α nebo β - β . Šev se na mikrotubulu nevyskytuje, pokud je válec tvořen šestnácti protofilamenty.



Obr 1.2 Stavba tubulinového válce [7]. a) β -list tvořený jednotkami α - a β -tubulinu. b) Mikrotubulus tvořený deseti protofilamenty. c) Mikrotubulus tvořený čtrnácti protofilamenty. Je patrný podélný šev, který narušuje celkovou symetrii tubulu. d) Mikrotubulus tvořený šestnácti protofilamenty. Nemá šev, je proto helikálně symetrický.

V některých rostlinách, živočiších a protistech byly objeveny mikrotubuly složené z jiného počtu protofilament než ze třinácti, jak je tomu většinou u člověka, obvykle v rozmezí deseti až dvaceti protofilament. Např. v háďátku (*Caenorhabditis elegans*) byly nalezeny mikrotubuly tvořené jedenácti protofilamenty [13]. Při experimentech s aktivací lidských krevních destiček se ve vzorcích objevovaly mikrotubuly složené ze čtrnácti nebo patnácti protofilament [14]. Ze zmíněného plyne, že případný rozdíl ve struktuře mikrotubulů nemusí být v rozporu se životaschopností organismu. Přípustných

možností vzájemného uspořádání filament je tedy více, a to přibližně od 20° do 40°; výsledná geometrie se pak odvíjí od počtu protofilament [15].

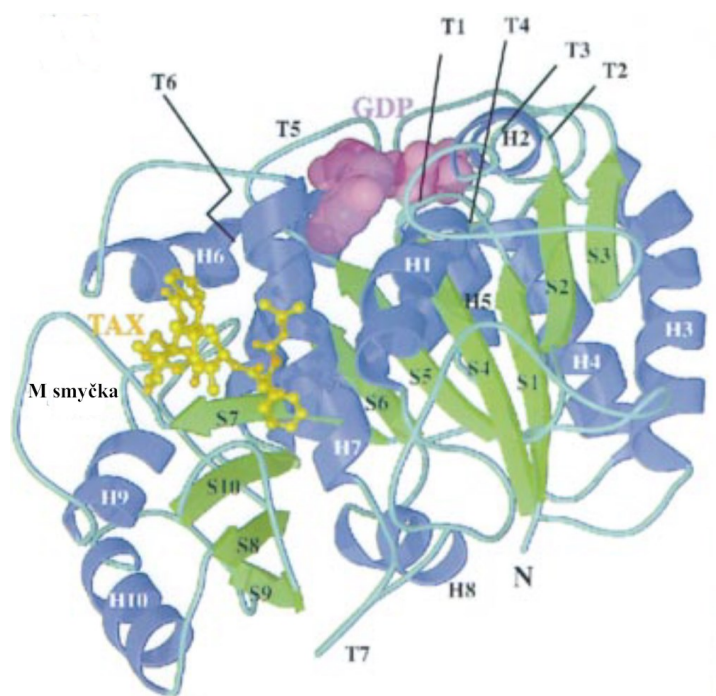
1.1.3.3 *Struktura tubulinů*

Monomer tubulinu připomíná svým tvarem elipsoid a jeho přibližné rozměry jsou $46 \times 40 \times 65 \text{ Å}$ [15]. Proteiny α - a β -tubulinu jsou navzájem vysoce homologní (asi ze 40 %). [16]. Jejich velikost je přibližně 50 kDa a oba jsou tvořené přibližně 450 aminokyselinami [7, 16].

Na tubulinu lze rozlišit tři domény: i) N-terminální doménu, která váže nukleotid, ii) prostřední doménu, iii) helikální doménu C-terminální oblasti. C-terminální doména nese záporný náboj [17, 18]. Prostorově vybočuje jak od těla tubulinu, tak z mikrotubulu, a je častým cílem posttranslačních modifikací proteinu [19]. Slouží také k regulaci vazby proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAPs, z angl. Microtubule Associated Proteins), reguluje mechanické děje a dynamiku mikrotubulů [20]. Tubuliny jsou rozmanité ve svých isotypech a rozlišují se právě na základě rozdílnosti chemických struktur na C-terminálních aminokyselinách.

Oba typy molekul tubulinu vážou jednu molekulu GTP. Vazebné místo GTP na α -tubulinu se nazývá N-místo, na β -tubulinu E-místo. Kromě α -, β - a γ - tubulinu jsou známy ještě další podrodiny tubulinů označované jako δ -, ϵ - a ζ -tubulin. Vyskytují se u eukaryot, v mnoha druzích však nalezeny nebyly [21]. Jejich funkce je často neznámá, byla ale pozorována souvislost s centriolami, mikrotubulárními triplety a s funkcí cílů [22, 23]. Někdy se hovoří i o tubulinech typu η , θ , ι , a κ [24]. Dohromady tvoří všechny tyto typy tubulinovou nadrodinu.

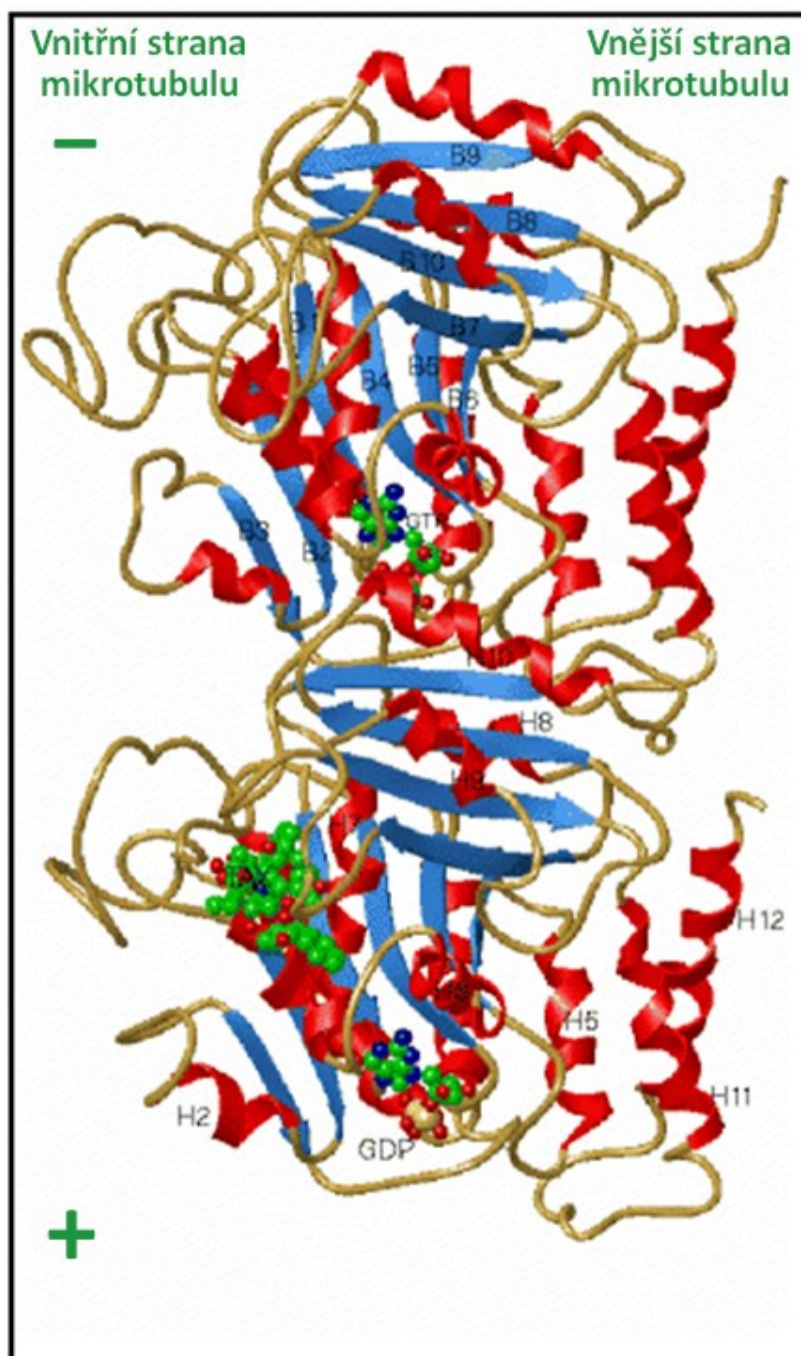
Struktura β -tubulinu je na obrázku 1.3 (str.15).



Obr. 1.3 Struktura β -tubulinu získaná elektronovou krystalografií s Taxolem® [15], upraveno. Helixy jsou značeny jako H a arabská číslce, β -listy jako S a arabská číslce, písmena T a M označují smyčky. Ve své obsahuje β -tubulin M-smyčku, která je nepostradatelná pro udržování laterálních kontaktů mezi protofilamenty [15]. Smyčky T1 až T7 se účastní vazby nukleotidu (GTP). Z nich smyčka T7 přesahuje k sousednímu tubulinovému dimeru a váže se na jeho nukleotid.

Mezi protofilamenty jsou na vnějším i vnitřním povrchu mikrotubulu žlábků, ve kterých se nacházejí otvory o průměru 10 Å [15]. Na vnějším povrchu mikrotubulů vyčnívají z β -tubulinu helixy C-terminální domény H11 a H12 (*Obr. 1.4*, str.16) spolu se smyčkou mezi helixem H10 a β -listem S9. Z těchto struktur vzniká na povrchu protofilament mělký hřebenovitý vzor. Vnitřní povrch mikrotubulů je mnohem více zbrzděn díky přítomnosti dlouhých smyček vyčnívajících do dutiny mikrotubulu. Jedná se o smyčky mezi helixy a listy H1-S2, H2-S3 a S9-S10. Rozhraní dvou heterodimerů tubulinu lze charakterizovat velkou plochou kontaktu obou stavebních jednotek, vysokou komplementaritou strukturních elementů na styčných plochách a výskytem jak polárních, tak hydrofobních komponent.

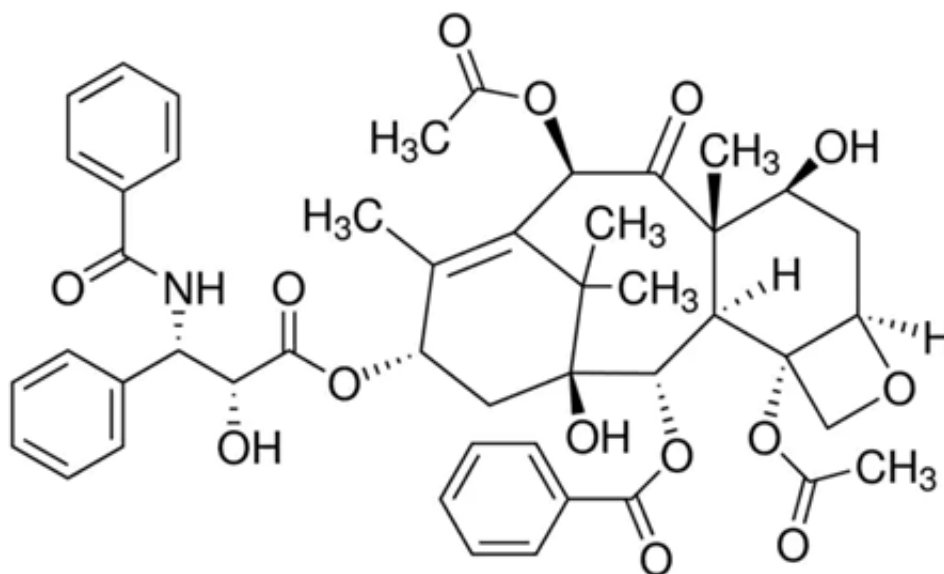
Laterální kontakty tubulinů se oproti jiným kontaktům v mikrotubulu vyznačují elektrostatickými interakcemi [15]. Dalšími interakcemi je přesah M-smyčky (jedná se o S7-H9 smyčku označovanou jako mikrotubulární smyčka) jednoho protofilamenta ke smyčkám C-terminální domény sousedního protofilamenta.



Obr 1.4 Struktura α/β -tubulinového dimeru [25], upraveno. Rozlišení 3,7 Å, struktura řešena elektronovou krystalografií, vizualizace uskutečněna pomocí Advanced Visual Systems. Shora je α -tubulin, dole β -tubulin. Písmenem B a arabskou číslicí jsou označeny β -listy, písmenem H α -helixy. Na pravé straně β -tubulinu jsou zobrazeny helixy H11 a H12 zodpovědné za zbrázdění vnějšího povrchu mikrotubulů. Vlevo na β -tubulinu je patrná vazba další molekuly, jedu ze skupiny taxanů. Váže se v oblasti smyčky B8-H9.

1.1.3.4 Taxol a jeho účinek na mikrotubuly

Taxol® je obchodní název pro chemickou látku paklitaxel (*Obr. 1.5*). Patří do skupiny látek schopných vázat se na mikrotubuly, taxany. Jedná se o diterpeny přírodního původu.



Obr. 1.5 Chemická struktura Taxolu® [28]. Mezi mitotickými jedy patří mezi nejpoužívanější při výzkumu využívajícím stabilizované mikrotubuly.

Je známo více typů paklitaxelu, přičemž paklitaxel 9 se váže přednostně na mikrotubulární vlákno narozdíl od paklitaxelu 1, který dává přednost volnému tubulinovému dimeru [26]. Právě paklitaxel 9 je užíván při léčbě rakoviny a je prodáván jako Taxol i k výzkumným účelům [27]. K efektu působení Taxolu při koncentraci vyšší než $10 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ patří i zvýšená tvorba mikrotubulů, které jsou po svém vzniku Taxolem stabilizované [28]. V případě toxického působení Taxolu na organismy se tedy nejedná o inhibici růstu mikrotubulů, ale o blokaci jejich dynamické nestability a zastavení buněčného cyklu.

Taxol stabilizuje mikrotubuly zesílením laterálních interakcí β -tubulinů na (+)-konci mikrotubulu. V rámci dynamiky (+)-konce může dojít k hydrolýze GTP na GDP, což vede ke konformačním změnám helixu H3 (viz *Obr. 1.3*, str.15) způsobených změnami na M-smyčce [15]. Navázáním Taxolu zřejmě dochází k takovým allosterickým změnám, které dokáží zastavit hydrolýzu GTP. Obecně je na mikrotubulu stabilnější (-)-konec, a to díky přítomnosti aminokyselinových zbytků v oblasti smyček S9 a S10 vyskytujících se v blízkosti M-smyčky. Právě na analogickou oblast k této oblasti se na (+)-konci mikrotubulu Taxol váže – na N-doménu β -tubulinu. Vazba je pravděpodobně kombinací hydrofobních interakcí a kovalentních vazeb [29, 30, 31].

1.2 Molekulární motory a cytoskeletární transport

Proteiny s enzymovou aktivitou, které využívají energii získanou ze štěpení chemické vazby (hydrolýza ATP) pro konformační změny vedoucí k orientovanému pohybu, se označují jako molekulární (molekulové) motory [32]. Oporou jejich pohybu jsou vlákna cytoskeletu. Mívají často schopnost vázat na sebe náklad a přenášet ho po buňce. Příkladem je přenos mitochondrií pomocí kinesinů v axonech. Bez pomoci molekulárních motorů by zvláště rozměrnější buňky brzy selhaly v životaschopnosti, neboť doprava organel a látek potřebných na daném místě prostou difúzí by trvala příliš dlouho. Transport pomocí proteinů navíc skýtá buňkám možnosti jeho citlivé regulace. Motory jsou volně dostupné v cytosolu a mohou se vázat na cytoskeletární vlákna podle aktuálních potřeb buňky, nebo být na vláknech trvale fixované, jak je tomu například v případě myosinu a aktinu ve svalových buňkách.

Mezi molekulární motory patří kinesiny, dyneiny, dynaminy a myosiny [5]. Kinesiny se podílejí na axonomálním transportu. Pohybují se orientovaně po mikrotubulech. Většina kinesinů se pohybuje orientovaně k (+)-konci mikrotubulů. Dyneiny jsou taktéž motory pohybující se po mikrotubulech, ale v opačném směru, tedy směrem k (–)-konci mikrotubulů. Dynein může být cytosolový nebo axonomální, v druhém případě tvoří mechanický základ pro pohyb řasinek a bičíků. Dynamin je na rozdíl od výše zmíněných motorů s ATPasovou aktivitou GTPasa. Podílí se na endocytóze.

1.2.1 Kinesin

Protein kinesin s ATPasovou aktivitou byl popsán v roce 1985 [33]. Byl objeven jako transportní protein v axonech olivně *Loligo pealeii*. Analýzou lidského genomu bylo nalezeno 45 lidských kinesinů tvořících kinesinovou nadrodinu [34].

Kinesiny jsou ATPasy schopné přenášet náklad po mikrotubulu. Typickými prvky každého kinesinu jsou doména pro vazbu a hydrolýzu ATP a doména pro vazbu přenášeného nákladu. Nejčastěji se pohybují od (–)- k (+)-konci tubulů. Jsou známy i kinesiny, které se pohybují k (–)-konci mikrotubulu, příkladem je rodina kinesinů-14 [35]. Kinesiny mohou zastávat i další funkce, jsou známy kinesiny s regulačním vlivem na stabilitu mikrotubulů. Stabilizací dělicího vřeténka fungují kinesiny-8 a kinesiny-5 jako polymerasy [36, 27]. Tím se kinesiny spoluúčastní regulace mitosy. Naproti tomu kinesiny-13 mají depolymerizační funkci [37].

Kinesiny lze klasifikovat podle chemického umístění jejich motorové domény na:

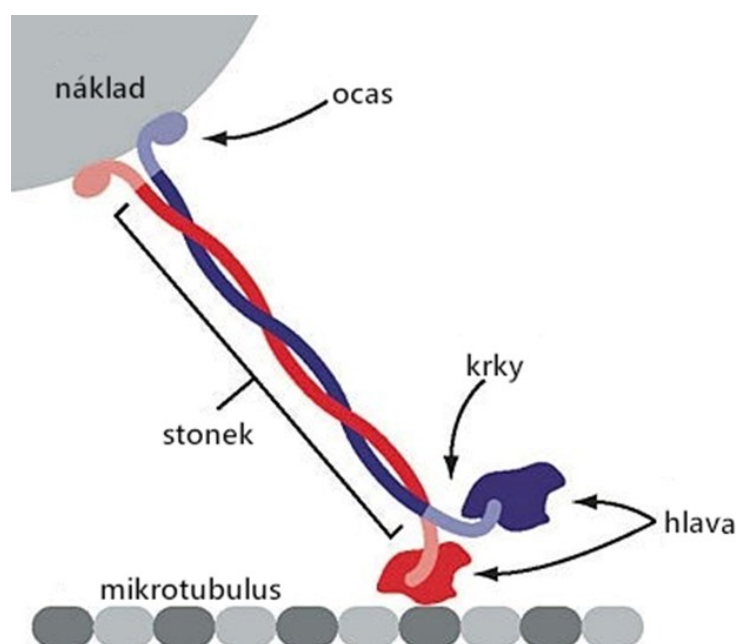
- i) N-typy, motorová doména obsahuje NH_2 - skupinu; patří sem kinesin-1,
- ii) M-typy, motorová doména je přibližně uprostřed celé struktury,
- iii) C-typy, motorová doména obsahuje COOH - skupinu [38, 34].

1.2.1.1 Struktura a pohyb kinesinu

Kinesin-1 je tetramerní protein o celkové velikosti asi 100 nm, 320 kDa [34, 38, 39, 40].

Jeho dva těžké řetězce zajišťují pohyb a dva lehké vážou náklad. Celý kinesin je tvořen třemi doménami: N-terminální doména (hlava), α -helikální stonek a C-terminální ocas.

Na obrázku 1.6 je schematicky znázorněn kinesin typu N.



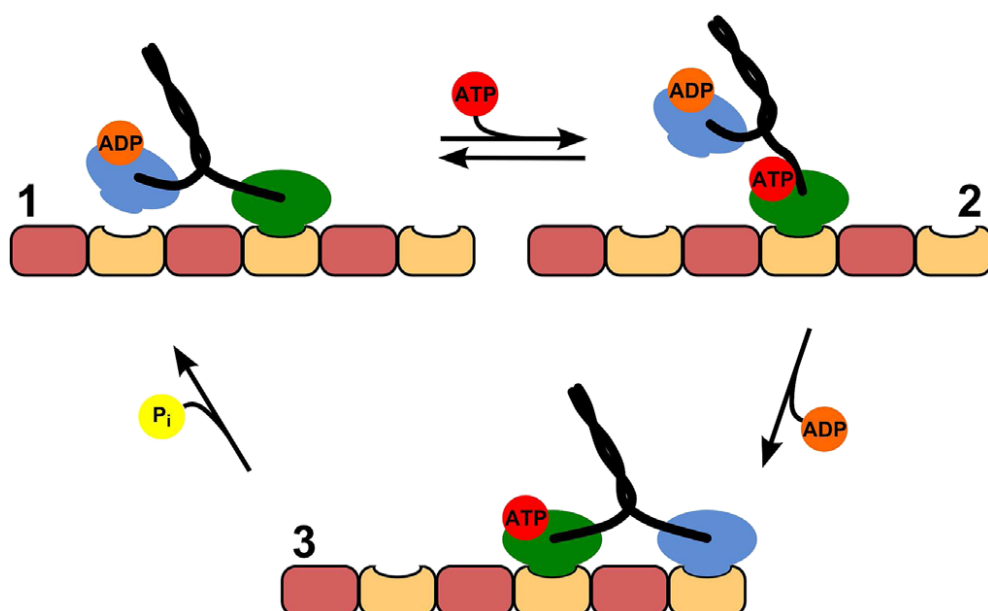
Obr. 1.6 Schéma kinesinu s nákladem [41], upraveno. Globule motorové domény (hlavy) se vážou na vnější povrch mikrotubulu a přes spojky („krky“) na ně navazuje stonek s ocasem (C-terminální doména), ke kterému se může připojit náklad.

Hlava kinesinu má vidličkovitý tvar díky dvěma globulárním doménám o velikosti asi 45 kDa, které zajišťují hydrolýzu ATP a jsou v okolí N-konce v kontaktu s povrchem mikrotubulu [42]. Dohromady se nazývají motorová doména. Globule jsou spojeny řetězcí α -helixů, tzv. krkem, tvořeným asi padesáti aminokyselinami, přes své C-terminální aminokyseliny [38, 40]. Na krk navazuje α -helikální stopka vedoucí k tzv. ocasu, kde se nachází C-terminální oblast celého proteinu. Globule motorové domény kinesinu připomínají nohy, krk tělo, na které se přes vaznou doménu připojuje náklad nesený kinesinem [37].

Krk kinesinu je tvořen patnácti aminokyselinami, které po hydrolýze navázaného ATP podstupují konformační změny [27, 43]. Vzniklé pnutí se šíří i na struktury motorové domény a umožňuje jim zahájit proces kráčení po mikrotubulu [44]. Obě části motorové domény se pohybují jedna po druhé, někdy se „chůze“ kinesinu označuje také jako ručkování. Přesunem jedné z globulí před druhou (jeden krok) znamená jeden chemomechanický cyklus.

Rychlost pohybu kinesinů bez nákladu se pohybuje kolem 800 nm/s [45]. Obecně je pohyb kinesinů po mikrotubulech regulován. Ze známých možností regulace jsou to např. posttranslační modifikace tubulinu, MAPs a rovnovážné procesy v buňce.

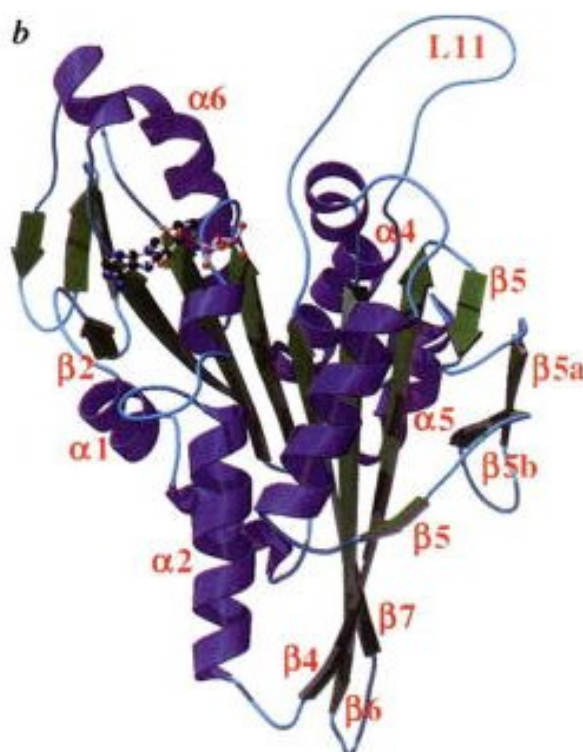
Chemomechanický cyklus kinesinu (*Obr. 1.7*) se skládá z jednotlivých kroků motorové domény [46]. Každým krokem kinesin urazí vzdálenost 8 nm [47].



Obr. 1.7 Chemomechanický cyklus kinesinu [44]. Kinesin se procesivně pohybuje po mikrotubulu od (–)-konce k (+)-konci. 1) Kinesin je ve stavu čekání na ATP. 2) Po navázání ATP dochází ke konformační změně motorové domény a možnosti otočení jedné globulární domény kolem krku. 3) Část motorové domény vázající ADP nachází pomocí difúzního pohybu nové vazebné místo na mikrotubulu. Je uvolněno ADP a dochází k hydrolýze ATP. Efekt případného sterického bránění pohybu je očekáván mezi stavy 2 a 3.

1.2.1.2 Motorová doména kinesinu

Pomocí rentgenové krystalografie se podařilo trojrozměrně zobrazit strukturu kinesinu v atomovém rozlišení [48]. Jedná se o α/β proteinovou strukturu o rozměrech $70 \times 45 \times 45$ Å. Na obrázku 1.8 je rekonstrukce motorové domény lidského kinesinu. Strukturně doména vykazuje značnou podobnost s motorovou doménou myosinu, chemickým složením se však obě struktury liší.

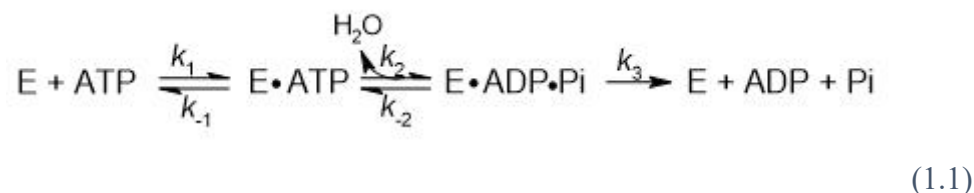


Obr. 1.8 Zobrazení struktury motorové domény kinesinu pomocí programu MOLSCRIPT [48, 49]. Fialově jsou zobrazeny α -helixy, zeleně β -listy. Struktury koulí na tyčinkách vlevo nahoře představují ADP. Střed domény je tvořen osmi vlákny β -listu (β s číslicí), z větší části se jedná o paralelní uspořádání. Vlákna jsou obklopena α -helixy (α s číslicí). Některé struktury vykazují neobvyklou délku v rámci molekuly, konkrétně vlákna $\beta 4$ a $\beta 6$, která jsou součástí základního β -listu molekuly, kopírují celou délku molekuly. Na povrchu domény se nachází velké množství smyček. Celkový tvar motorové domény připomíná hrot šípů.

Motorová doména kinesinů se skládá asi ze 340 aminokyselin, což je asi poloviční velikost v porovnání s myozinovou motorovou doménou (kolem 850 aminokyselin) [48]. Dyneinová doména dosahuje s přibližně 1000 aminokyselinami ještě větších rozměrů.

Energie k pohybu molekulárního motoru po cytoskeletu se získává ze štěpení chemických vazeb makroergních sloučenin. V případě kinesinu se jedná o hydrolýzu

ATP na ADP a fosfát. Rovnovážné děje mezi kinesinem (E) a jeho substrátem (ATP) popisuje rovnice (1.1) [50]. Každý mezikrok děje je charakterizován příslušnou rychlostní konstantou ($k_{\#}$).



Nejprve vzniká vazba mezi kinesinem a molekulou substrátu, tedy ATP (označeno tečkou) (k_1). V přítomnosti vody může dojít k hydrolýze ATP na ADP a fosfát (k_2). Produkty reakce následně z kinesinu uvolní (k_3).

Z krystalové struktury motorové domény (*Obr. 1.8*, str. 21) je vidět, že ADP je navázáno na povrchu motorové domény, tedy v oblasti, která je v kontaktu s prostředím, ve kterém se motor pohybuje a které obsahuje volně dostupné ATP. Disociace ADP z kinesinu je krokem limitujícím rychlost chemomechanického cyklu [51].

Ke kinesinu se ATP váže nekovalentně interakcemi aminokyselin kinesinu s adeninem [48]. Svrchu motorové domény na adenin působí methylenovou skupinou arginin 16, hydrofobními silami prolin 17 a shora na něj působí histidin 93. Voda se na adenin koordinačně váže přes prolin 7 a threonin 94.

Přesná lokace aminokyselinových zbytků, které interagují s povrchem mikrotubulu, nebyla pomocí biochemických studií zjištěna [48]. Na základě strukturní podobnosti kinesinu s myosinem se odhaduje, že se na mikrotubuly bude vázat část vláken $\beta 4$ a $\beta 5$ (viz *Obr. 1.8*, str. 21) spolu se smyčkami L8 a L12. Jedná se o aminokyseliny 138–173 a 272–280 motorové domény, které často mají hydrofobní vlastnosti.

Podobně ani struktury, které jsou zodpovědné za pohyb kinesinu, nejsou přesně známy. Na základě podobnosti s myosinem se odhaduje, že C-terminální oblast kinesinové motorové domény může být místem distribuce a zesílení konformačních změn vycházejících z hydrolýzy ATP [52]. Tyto změny se ve svém počátku odehrávají v rozmezí nanometrů a méně, je proto zapotřebí převést je do větších rozměrů. V blízkosti místa, které váže ATP, je umístěna spleť strukturních jednotek a propojení až k místu, které je považováno za místo vazby na mikrotubuly. Hovoří se o konformačních změnách postihujících tyto struktury, zejména helixy $\alpha 4$, $\alpha 5$, které jsou v kontaktu s $\alpha 6$, který zahrnuje C-terminální oblast celé domény [48].

1.2.1.3 Kinetika pohybu kinesinu-1

Pro kinetiku hydrolasové aktivity kinesinu lze využít model Michaelis-Mentenové [44]:

$$v_0 = \frac{v_{\text{MAX}} \cdot [\text{ATP}]}{K_{\text{M}} + [\text{ATP}]} \quad (1.2)$$

kde v_0 je počáteční reakční rychlost (s^{-1}), v_{MAX} je maximální reakční rychlost (s^{-1}), $[\text{ATP}]$ je koncentrace ATP ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), K_{M} je Michaelisova konstanta ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Experimentálně byly zjištěny hodnoty parametrů [44]:

$$v_{\text{MAX}} = 103,4 \pm 0,2 \text{ s}^{-1},$$
$$K_{\text{M}} = 311 \pm 2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}.$$

1.2.2 Význam studia molekulárních motorů

Cytoskeletární transport je předmětem výzkumu při studiu především neurodegenerativních chorob. Několik chorob je pro příklad uvedeno.

Ve spojitosti s Alzheimerovou chorobou je studován protein tau a jeho agregace na mikrotubulech, dále pak kinesin-1 [53, 54, 55]. Protein tau a mikrotubuly jsou zkoumány také v souvislosti s Pickovou chorobou [56].

Postrádají-li řasinky a bičíky dynein, projevuje se toto jako onemocnění zvané Kartagenerův syndrom. Vede k mužské sterilitě, *situs inversus* a častým respiračním infekcím [5].

Zkoumá se *retinitis pigmentosa* a poruchy transportu zapříčiněné absencí kinesinu-2 v defektních tkáních [55].

Amyotrofická laterální skleróza s sebou nese poruchy kinesinů a dyneinů [57].

1.3 Shlukování inertních makromolekul

Vnitřní prostředí buňky je vyplněno vnitrobuněčnými strukturami. Kromě organel se v cytoplazmě vyskytují ribozomy, množství proteinů, různé inertní i reaktivní molekuly a ionty rozličných rozměrů. Pohyb molekulárních motorů buněčným prostředím tedy není jednoduchým pohybem v kapalině, jak by se ze zjednodušujících schémat mohlo zdát. Vnitrobuněčné prostředí se také značně liší od podmínek při experimentech *in vitro*, při kterých jsou zkoumány jak cytoskelet, tak i molekulární motory a vlastnosti jejich pohybu.

Shlukování inertních makromolekul může mít význam pro nekovalentní interakce v buňce u tak zásadních procesů, jako je syntéza proteinů či nukleových kyselin, přenášení signálních částic nebo metabolismus [58, 59, 60, 61, 62]. Svoji přítomností mohou inertní makromolekuly měnit rychlostní konstanty biochemických dějů [63].

V dřívějším výzkumu vlivu shlukování makromolekul na kinesiny byl podpořen model difúzního pohybu motorové domény kinesinů po mikrotubulu [44]. Tento model má za cíl vysvětlit mechaniku kráčení kinesinu pomocí difúzního pohybu motorové domény. Ta podle něj nachází další vazebné místo na mikrotubulu difúzním pohybem [64, 65]. Navázání domény právě na další vazebné místo na mikrotubulu je vzhledem k prostorovému uspořádání mikrotubulu a kinesinu daleko pravděpodobnější než navázání domény jinam [44].

Modelovou molekulou často využívanou ke studiu vlivu inertních makromolekul či viskozity na okolní molekuly je polyethylenglykol [66].

Přídavek makromolekul do roztoku se projeví růstem viskozity roztoku. V případě, že sledujeme efekt viskozity na částici mikroskopických rozměrů (v tomto případě na kinesin, resp. jeho motorovou doménu), se může efekt přidání různých makromolekul výrazně lišit podle velikosti přidané částice. Rozlišuje se pak **makroskopická viskozita** (tj. viskozita roztoku jako celku) a **efektivní viskozita**, která charakterizuje efekt přítomnosti částic na sledované délkové škále (v tomto případě se jedná o průměry molekul PEGu). Efektivní viskozita (η_{ef} , $\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$) je definována podle rovnice (1.3) [67]:

$$\eta_{\text{ef}} = \eta_0 \exp \left[b \left(\frac{R_{\text{ef}}}{\xi} \right)^a \right], \quad (1.3)$$

kde:

η_0 je dynamická viskozita rozpouštědla ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$),

ξ je korelační délka (vzdálenost mezi dvěma body flexibility polymeru) (m),

a , b jsou parametry jednotkového řádu,

R_{ef} je efektivní poloměr (m).

Efektivní poloměr se získá z hydrodynamických poloměrů sledované částice (zde kinesinu-1), r_p (m), a makromolekul přidávaných do roztoku, R_h (m):

$$R_{\text{ef}}^{-2} = R_h^{-2} + r_p^{-2}$$

Mezi viskozitou a aktivační energií potřebnou k difúzi globulí motorové domény existuje Arrheniovský vztah [68]:

$$\eta_{\text{ef}} = \eta_0 \exp(\Delta E_a R^{-1} T^{-1}) \quad (1.4)$$

kde:

ΔE_a je rozdíl aktivačních energií rozpouštědla a roztoku s makromolekulami ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$),

R je univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T je termodynamická teplota (K).

Aktivační energii pro zahájení difúzního pohybu motorové domény kinesin získává z hydrolýzy ATP. Část energie je disipována, část je spotřebována pro odtažení globule motorové domény od mikrotubulu a asi 20 % energie je využito k napnutí krku motorové domény vedoucí ke konformačním změnám celé motorové domény [69]. Podle teoretických odhadů se jedná o energii rovnou $4kT$, přičemž k je Boltzmannova konstanta ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) a T je termodynamická teplota (K) [69]. Díky difúznímu charakteru pohybu motorové domény (dle difúzního modelu) se na pohybu domény podílí i tepelné jevy přispívající k pohybu aktivovanému hydrolýzou ATP [44]. Zvýšení efektivní viskozity se projeví na potřebě dodání vyšší energie kvůli tření, sterickému bránění motoru, případně významnější disipaci při zvedání globulárních domén motorové domény.

Z již provedených experimentů bylo zjištěno, že se kinesiny zastaví při efektivní viskozitě $5 \text{ mN} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ [44]. Pokud byly do roztoku přidávány makromolekuly s řádově větším průměrem, než jaký je průměr motorové domény kinesinů, nebyl zaznamenán efekt na rychlost pohybu kinesinů ani při makroskopické viskozitě $100 \text{ mN} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$.

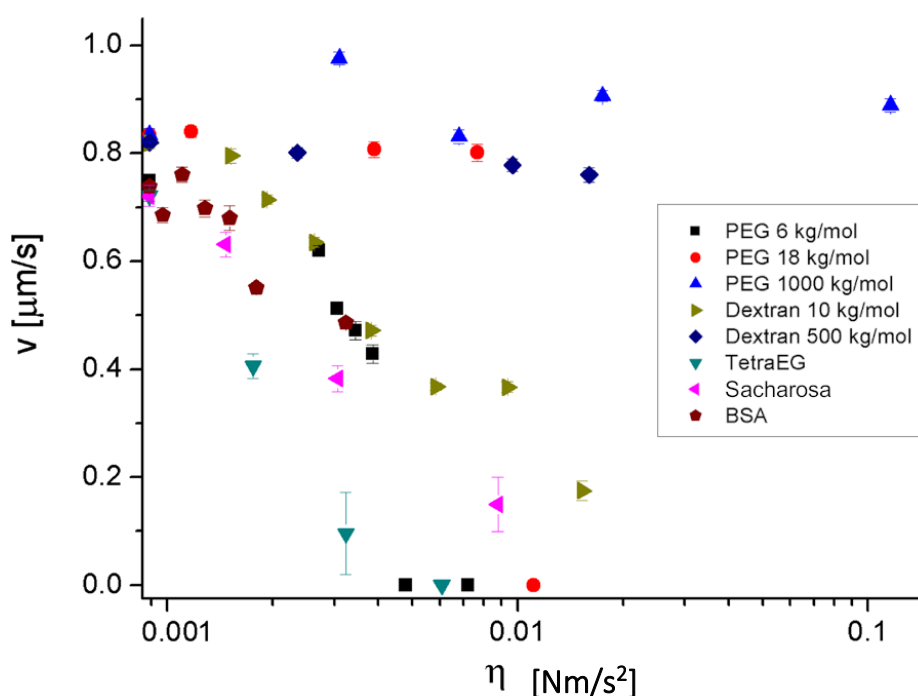
Teoretickými výpočty bylo ukázáno, že změna efektivní viskozity v rámci jednotek má pouze zanedbatelný vliv na náklad přenášený kinesinem a na tření mezi nákladem a prostředím (změna v řádu pN) [44]. Celková změna pohybu kinesinů ale zanedbatelná není, příčinu vlivu makromolekul na kinesiny proto hledáme v mechanismu kráčení.

Přítomnost makromolekul mění vlastnosti roztoku hned v několika ohledech: prostor pro volnou difúzi kinesinů je značně omezen, viskozita se zvyšuje, mění se

osmotický tlak, v důsledku shromažďování menších molekul ve zbylém prostoru může dokonce docházet k nečekaným chemickým interakcím mezi částicemi [70].

Při experimentech s přidáním makromolekul do roztoku některé molekuly kinesinu vykazují difúzní pohyb. Při difúzním pohybu se již nejedná o pohyb výlučně k (+)-konci tubulu, můžeme sledovat i pohyb kinesinu k (-)-konci. Pohyb se podobá Brownovu pohybu. Tento jev byl pozorován právě po přidání 5% (w/w) 40kDa PEGu, v rámci experimentů, při kterých kinesiny přenášely velký náklad [71, 72]. Takový pohyb naznačuje, že sledovaný kinesin se na mikrotubuly vázal nespecificky [71]. Po přidání 5% 40kDa PEGu se zdvojnásobil čas setrvání kinesinu na mikrotubulu, ale rychlost pohybu se nezměnila [71].

Dříve provedené experimenty prokázaly vliv některých inertních molekul v roztoku na rychlost pohybu kinesinů [44]. Předchozí výzkum ukázal, že při zvyšování koncentrace PEGu 6 se rychlost kinesinů snižovala, zatímco větší PEG neměl na rychlost kinesinů významný efekt. Výsledky jsou zobrazeny v grafu (Obr. 1.9). V návaznosti na tyto experimenty byly v rámci této práce provedeny experimenty zaměřující se pouze na molekuly polyethylenglykolu o molární hmotnosti 6 kg/mol (dále: PEG 6) a 1000 kg/mol (dále: PEG 1000) a jejich kombinace.

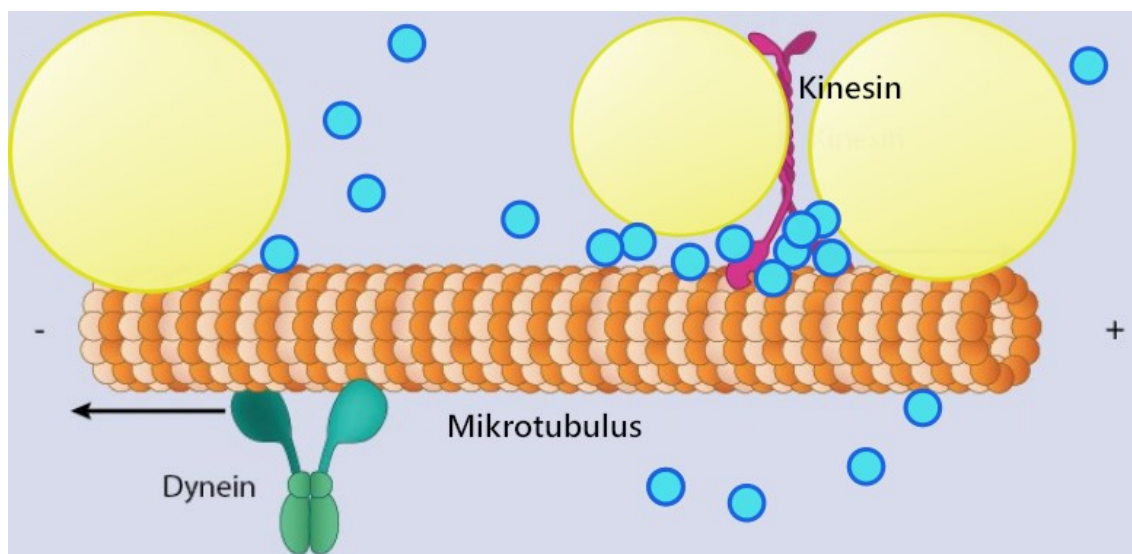


Obr. 1.9 Rychlost kinesinů v závislosti na viskozitě roztoku [44], upraveno.

Přídavek PEGu ($M_w = 6$ kg/mol) způsobuje zpomalení kinesinů téměř k nulové rychlosti.

PEG ($M_w = 1000$ kg/mol) ani při vysoké viskozitě takový efekt zdaleka nepůsobí.

V okolí motorové domény kinesinu může přítomnost makromolekul vést k efektu sterické exkluze (*Obr. 1.10*).



Obr. 1.10 Efekt sterické exkluze na motorovou doménu kinesinu [9], upraveno. Kinesin se k mikrotubulu váže pomocí globulární motorové domény. Makromolekuly (modře), které se svými rozměry podobají rozměrům motorové domény, mohou stericky bránit pohybu globulí a zpomalit tak pohybu kinesinu. Makromolekuly řádově větších rozměrů (žlutě) se motorové doméně vyhýbají a nezasahují do mechanismu kráčení kinesinu.

2 Cíle práce

V rámci této práce bude experimentálně ověřováno, zda může směs různě velkých inertních makromolekul téhož chemického složení mít zásadně odlišný vliv na rychlost, a tím i hydrolasovou aktivitu kinesinů, než roztoky velikostně homogenních makromolekul téhož druhu. Testovaná hypotéza kombinovaného vlivu heterogenních molekul se opírá o představu, že makromolekuly velikostně srovnatelné s motorovou doménou kinesinu-1 budou kinesin zpomalovat a větší makromolekuly budou zvyšovat efektivní koncentraci menších makromolekul. Přídavek větších makromolekul do roztoku menších makromolekul by tedy způsobil zvýšení efektivní viskozity roztoku a zpomalení kinesinů výrazněji než při přídavku pouze menších makromolekul srovnatelné koncentrace. Cíle práce byly konkrétně:

- Reprodukovat experimenty s molekulami PEGu ($M_w = 6$ kg/mol nebo 1000 kg/mol) přidanými do roztoku ke kinesinu-1 s cílem popsat změnu v biochemické aktivitě kinesinů podle dříve provedených experimentů [44].
- Experimentálně popsat efekt velikostně heterogenních inertních makromolekul na biochemickou aktivitu kinesinů.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Seznam chemikálií

1,4-piperazindiethansulfonová kyselina (PIPES) (99%)	Sigma-Aldrich, USA
ATP (98%) (trihydrát disodné soli)	Jena Bioscience, Německo
D-(+)-glukosa (99,5%)	Sigma-Aldrich, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný (98%)	Sigma-Aldrich, Indie
Dimethyl sulfoxid (DMSO) (99,9%)	Sigma-Aldrich, Německo
Dithiotreitol (DTT) (99%)	Sigma, Kanada
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA) (97%)	Sigma-Aldrich, USA
Glukosaoxidasa (100 000 jednotek/g)	Sigma, UK
GTP (90%) (trihydrát disodné soli)	Jena Bioscience, Německo
4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) (99,5%)	Sigma, USA
Hydrogenfosforečnan sodný (99%)	Sigma, Německo
Hydroxid draselný (90%)	Sigma-Aldrich, Francie
Chlorid draselný (99%)	Sigma-Aldrich, Š·nělsko
Chlorid draselný (99%)	Sigma-Aldrich, Španělsko
Chlorid hořečnatý, hexahydrát (99%)	Sigma-Aldrich, Německo
Chlorid sodný, anhydrid (99%)	Sigma-Aldrich, USA
Kasein z kraviho mléka, technický stupeň	Sigma-Aldrich, Švýcarsko
Katalasa (pH = 6,8) (10 000 jednotek/mg)	Sigma-Aldrich, UK
Kyselina chlorovodíková (37%)	AnalaR®NORMAPUR®, Francie
Myší monoklonální protilátky proti β -tubulinu I, klon SAP.4G5, 1 mg/ml v PBS	Sigma, Izrael
Paklitaxel (Taxol®) (97%) 1mM v DMSO	Sigma, Izrael
Pluronic® F-127	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylenglykol sorbitan monolaurát (Tween® 20)	Sigma, USA
Polyethylenglykol, $M_w = 1000$ kg/mol	Sigma-Aldrich, USA
Polyethylenglykol, $M_w = 6$ kg/mol	Sigma, Německo
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (99,8%)	Sigma-Aldrich, USA
Voda Mili-Q	

3.1.2 Roztoky

BRB80 (sterilně filtrovaný)

PIPES $80 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

MgCl₂ $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

EGTA $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

KOH pro úpravu pH na 6,8

PBS

NaCl $137 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

KCl $2,7 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Na₂HPO₄ $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

KH₂PO₄ $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

HCl pro úpravu pH na 7,4

BRB80T

990 μl BRB80

10 μl $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Taxol

Roztok protilátek

245 μl PBS

5 μl protilátek proti β -tubulinu

Měřicí pufr

<i>Objem</i>	<i>Látka</i>	<i>Koncentrace zásobního roztoku</i>
880 μl	BRB80, příp. PEG	100 %
10 μl	Taxol®	$1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$
10 μl	DTT	$1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
10 μl	D-glukosa	$2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
10 μl	Tween® 20	10 % (v/v) v BRB80
50 μl	Kasein	10 mg/ml
10 μl	ATP	$100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$
10 μl	Katalasa	2 mg/ml
10 μl	Glukosoxidasa	22,4 mg/ml

ATP

100mmol·dm⁻³ v roztoku 10mmol·dm⁻³ PIPES a 0,1mol·dm⁻³ MgCl₂

GTP

25mmol·dm⁻³ v 10mmol·dm⁻³ PIPES

Směs pro polymeraci tubulinu

<i>Objem</i>	<i>Látka</i>	<i>Koncentrace zásobního roztoku</i>
1,2 µl	DMSO	99,9 %
1 µl	MgCl ₂	100 mmol·dm ⁻³
1 µl	GTP	25 mmol·dm ⁻³
1,8 µl	BRB80	100 %

3.1.3 Biologický materiál

Kinesin-1 se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP, z angl. Green Fluorescent Protein) vázaným na C-terminálním konci, 1,88 g/l, *Rattus norvegicus*, purifikováno dle protokolu [73], Česká republika.

Tubulin, 4 mg/ml izolovaný z prasečích mozků dle protokolu [74], jatka v Českém Brodě, Česká republika.

3.2 Použité přístroje

3.2.1 Seznam přístrojů

Centrifuga Microfuge® 18 Centrifuge, Beckman Coulter™, USA

Digitální kamera sCMOS Hamamatsu ORCA 4.0 V2, Hamamatsu Photonics K. K, Japonsko

Imerzní objektiv Nikon CFI HP Apo TIRF 100x Oil, NA 1.49, WD 0.12 mm, Japonsko

Inkubátor Dry Bath Incubator, Major Science, USA

Laboratorní váha Kern® PCB 1000-2, Německo

Lampa pro epifluorescenční mikroskopii Intensilight C-HGFIE, Nikon, Japonsko

Laser o vlnové délce záření 488 nm, LU-NV-J, Nikon, Japonsko

Magnetické míchadlo s ohřevem RCT basic – RCTB, IKA®, Německo

Mraznička (– 80 °C) PHCbi, PHC, Japonsko

Sada automatických pipet Pipetman Sipock, Gilson, Francie

Stolní centrifuga HERMLE Z 100 M, Labnet International, Jižní Korea

Stolní počítač HP Z 840, USA

Superrezoluční fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti-E, Nikon, Francie

Vakuový exsikátor, Nalgene®, USA

Vortex BenchMixer V2, Benchmark™, USA

Vyměnitelné špičky k pipetám, Axygen®, Mexico

3.2.2 Další použitý materiál

Centrifugační zkumavky (15 ml), VWR, Čína

Filtr na injekční stříkačku (sterilní, 0,45 µm), VWR, USA

Imerzní olej typ F2 o velmi nízké fluorescenci, index: $n_D(23\text{ °C}) = 1,518$, Nikon, USA

Injekční stříkačka (10 ml), Luer-Lock, Chorana, Slovensko

Mikroskopovací krycí sklíčka No. 1,5H, Marienfield, Německo

Mikrozukavky (0,6 ml; 1,5 ml; 2 ml), Maxymum Recovery®, Mexico

Parafilm, Bemis®, USA

Pinzety Dumoxel, DumontSwiss®, Švýcarsko

Utěrky, KIMTECH Science, Kimberly-Clarks® Professional, UK

Žiletka Personna®, USA

3.2.3 Použitý software

NIS-Elements Advanced Research 5.21.03, Nikon Instruments Inc. NY

ImageJ 1.53c, National Institutes of Health, USA

Microsoft Excel 2016

3.3 Použité metody

3.3.1 Příprava kanálku pro mikroskopii

Dvě krycí sklíčka (18×18 mm a 22×22 mm) byla silanizována, posledním krokem bylo přidání 4,4'-difenylaminosulfou v methanolu [75]. (Chemická úprava povrchu byla provedena laboratorním technikem.)

Na podložním skle byly nařezány proužky parafilmu o tloušťce asi 2–3 mm a položeny v pravidelných rozstupech na větší z krycích sklíček rovnoběžně s hranami až přes kraje sklíčka. (Manipulace se sklíčky probíhala pomocí pinzet na technické utěrce KIMTECH nezanechávající vlákna.) Mezi proužky parafilmu takto vzniklo 4–5 kanálků o podobné tloušťce. Na větší sklíčko s parafilmem bylo přiloženo menší sklíčko tak, aby větší sklíčko ze všech čtyř hran přesahovalo okraje menšího sklíčka. Obě sklíčka byla

zahřáta na ohřívači na 62 °C. Tím se parafilm natavil a obě sklíčka byla pevně připevněna k sobě. Přesahy parafilmu byly odstraněny žiletkou.

Všechny kanálky mezi proužky parafilmu byly postupně promyty sérií připravených roztoků. První roztok byl pipetován na okraj kanálku a roztažen po kanálku pomocí vakua a špičky k pipetování. Ostatní roztoky byly pipetovány na kraj kanálku a na druhém kraji kanálku byl roztok tažen dovnitř filtračním papírem. Roztoky byly pipetovány v tomto pořadí:

- 1) 20 µl roztoku 20 µg/ml anti-β-tubulinových protilátek v PBS, následovalo 10 min inkubace v humidátoru (uzavíratelná plastová krabička s papírem navlhčeným vodou MiliQ). Protilátky navázané na sklíčko budou vázat mikrotubuly. PBS napomáhá přichytávání protilátek na hydrofobní povrch skla.
- 2) 40 µl sterilně filtrovaného 1% (w/v) Pluronicu F127 v PBS, poté inkubace 1 hod v humidátoru. Pluronic je detergent blokující vznik nespecifických interakcí mezi protilátkami a chemikáliemi.

Až před začátkem mikroskopování byla sekvence dokončena:

- 3) 40 µl BRB80T. Přítomné PIPES, EGTA v BRB80 mají spolu s Taxolem stabilizační vliv na mikrotubuly.
- 4) 10 µl roztoku BRB80T s mikrotubuly (roztok s připravenými mikrotubuly 5× naředěný v BRB80T), inkubace asi 30–60 s.
- 5) 20 µl měřicího pufru s ředěným roztokem kinesinu-1, katalasou a glukosaoxidasou (popsáno níže).

Pro případná kontrolní měření (negativní kontrola vlivu PEGu) sloužil na sklíčku jeden kanálek, ve kterém měřicí pufr neobsahoval PEG.

3.3.2 Příprava měřicího pufru

Složky pro přípravu roztoku kromě katalasy a glukosaoxidasy (1mM Taxol, 1M DTT, 2M D-glukosa, 10% Tween 20, 10 mg/ml kasein, 100mM ATP, BRB80, příp. PEG) byly (v případě potřeby) rozmrazeny, na stolní centrifuze HERMLE odstředěny (2–5 s) a na ledu pipetovány do jedné mikrozkušavky. Směs byla promíchána pomocí vortexu. Roztok byl na ledu odplyňován ve vývěvě po dobu min. 30 min.

Těsně před začátkem mikroskopování byly rozmrazeny katalasa a glukosaoxidasa. Finální měřicí pufr byl připraven pouze ze 3 µl katalasy, 3 µl glukosaoxidasy a 294 µl zbylých komponent měřicího pufru. Takto připravených 300 µl měřicího pufru je připraveno pro ředění kinesinů a pipetování do první série

kanálků na sklíčkách (3–4 kanálky). Do další série bude po ukončení práce s první sérií aplikován měřicí pufr s čerstvě přidanou katalasou a glukosaoxidasou, aby byly aktivity těchto enzymů co nejvyšší.

Při přípravě měřicího pufru s PEGem bylo sníženo množství BRB80 a vynechané množství bylo nahrazeno množstvím zásobního roztoku PEGu podle žádané výsledné koncentrace PEGu v 1 ml měřicího pufru. Zásobní roztoky PEGů (50% w/w pro PEG 6; 2% a 2,5% w/w pro PEG 1000) byly připravovány za stálého míchání na magnetické míchačce při ohřevu na 37 °C. Výsledné koncentrace PEGu 6 byly 5 %; 7,5 %; 10 %; 14 % (w/v). Koncentrace PEGu 1000 byly 0,25 %; 0,5 %; 1 % a 2 % (w/v).

Funkce složek měřicího pufru jsou: stabilizace mikrotubulů (BRB80 a Taxol), redukce aktivních kyslíkových částic, které zeslabují fluorescenci a mají destrukční vliv na biologický materiál (DTT, katalasa, glukosaoxidasa), spotřebovávání kyslíku – prevence vzniku aktivních kyslíkových částic (glukosaoxidasa a jí oxidovaná glukosa), blokování nespecifických interakcí látek s povrchem skla (Tween 20, kasein), zdroj energie pro pohyb kinesinů (ATP).

3.3.3 Příprava mikrotubulů

Na ledu byly pipetovány do jedné mikrozkušavky reagentie roztoku pro polymeraci mikrotubulů (DMSO, 100mM MgCl₂, 25mM GTP, BRB80). Funkce složek polymeračního roztoku jsou stabilizace jsou: vyvázání vápníku, který má na mikrotubuly rozkladný vliv (EGTA přítomná v BRB80), kofaktor ATP (MgCl₂), rozpouštědlo Taxolu (DMSO), polymerace tubulinů (GTP).

Směs byla promíchána na vortexu, odstředěna na stolní centrifuze a pět minut inkubována na ledu. Ze směsi bylo odebráno 1,25 µl a přidáno do mikrozkušavky s 5 µl roztoku tubulinu. Poté byla směs s tubuliny po dobu 30 minut inkubována při 37 °C v inkubátoru. Po uplynutí doby k inkubaci bylo do mikrozkušavky pipetováno 100 µl BRB80T, přičemž byla mikrozkušavka stále v inkubátoru. Taxol v BRB80 stabilizuje získané mikrotubuly. Natažením do špičky pipety byl roztok promíchán a poté centrifugován 30 min na centrifuze Microfuge® 18 Centrifuge při zrychlení 18 000× g. Bylo odebráno 100 µl supernatantu a peleta byla resuspendována ve 100 µl BRB80T. Peleta byla rozmělněna špičkou pipety a opakovaným nasáváním do špičky.

3.3.4 Ředění kinesinu-1

Těsně před zahájením mikroskopování byl rozmrazen kinesin-1-GFP v mikrozkuhavce a byl na ledu ředěn v měřicím pufru, případně v měřicím pufru s PEGem. K ředění byla připravena desítková ředicí řada: 36 μ l měřicího pufru a 4 μ l roztoku kinesinu. Z mikrozkuhavky pro ředění 1 000 000 $\times$ bylo odebráno 20 μ l a přidáno k 20 μ l měřicího pufru. Tím způsobem bylo dosaženo ředění 2 000 000 $\times$. Dosáhnout důkladného promíchání roztoků s vyššími koncentracemi PEGu bylo náročné, při různých koncentracích PEGu byla tedy používána různá ředění podle aktuální potřeby (100 000 $\times$, 1 000 000 $\times$ nebo 2 000 000 $\times$). Míchání roztoků bylo realizováno nasáváním do špičky pipety, při vyšších koncentracích PEGu také mícháním na vortexu. Byl-li měřicí pufr kvůli PEGu příliš viskózní a nebylo možné jej do kanálku pipetovat pouze s pomocí filtračního papíru, bylo k roztažení roztoku po kanálku využito vakuum. Při mikroskopování byly kanálky na sklíčku z kraje kvůli odparu průběžně zvlhčovány kapkou BRB80T. Každá podmínka (koncentrace/druh PEGu) byla měřena minimálně ve třech různých kanálcích pro vyloučení chyb vlivem nehomogenit povrchu skla.

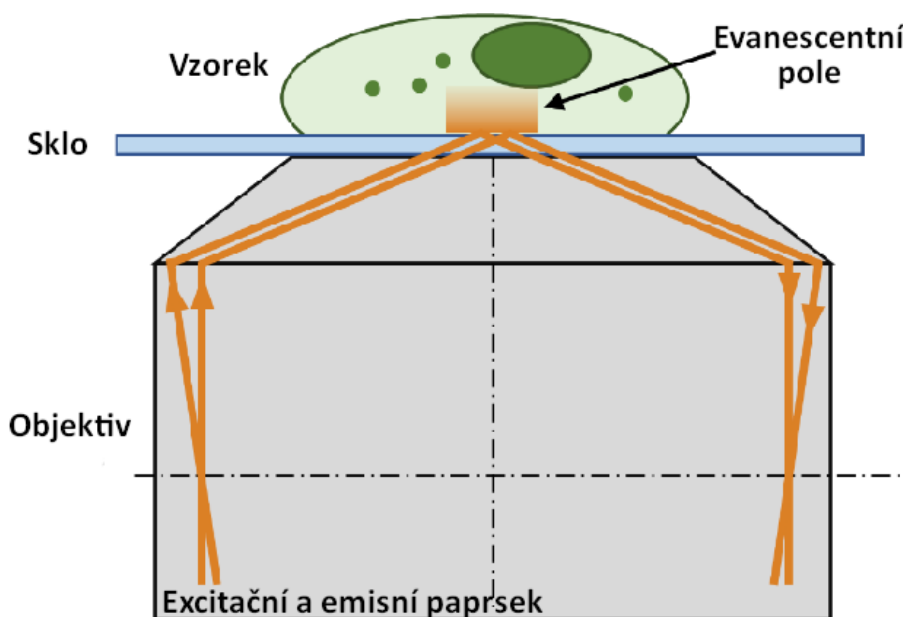
3.3.5 Mikroskopie

Pro mikroskopování byl využíván superrezoluční fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse Ti-E s aktivovanou funkcí Perfect Focus System (systém perfektního zaostření), která stabilizuje mikroskopovací sestavu při drobných vibracích. Mikroskopování bylo z počítače řízeno pomocí programu NIS-Elements Advanced Research. Snímaný obraz byl pomocí kamery sCMOS Hamamatsu ORCA 4.0 V2 přenášen na obrazovku počítače. Zvětšení bylo 100 $\times$ a jednalo se o zvětšení objektivu. Byl užíván imerzní objektiv Nikon CFI HP Apo TIRF (numerická apertura 1,49; pracovní vzdálenost 0,12 mm).

Nejprve byly na sklíčku nalezeny mikrotubuly pomocí interferenční reflexní mikroskopie (IRM) a byla zaznamenána jejich pozice. Světelným zdrojem byla lampa pro epifluorescenční mikroskopii Intensilight C-HGFIE (Nikon). Při metodě IRM dochází k odrazu rovinně polarizovaného světla od skla se vzorkem. Projde-li světlo vzorkem, dochází k posunu fáze světla a k destruktivní interferenci s paprskem odraženým od povrchu světla. Vzorky, které nejsou přichycené u povrchu skla, rovněž mění fázi světla, ale dochází ke konstruktivní interferenci. V prvním případě získáváme signál v podobě tmavého pixelu, ve druhém případě je pixel světlý [76].

Molekuly kinesinu-1-GFP byly zobrazovány pomocí metody fluorescence s totálním vnitřním odrazem (TIRF, z angl. Total Internal Reflection Fluorescence).

Světelným zdrojem je při této metodě laserový paprsek, který je ke vzorku veden pod ostrým úhlem nastaveným tak, aby se co možná největší část laserového paprsku od vzorku odrazila (Obr. 3.1). (Odtud název metody). Díky tomu jsou excitovány jen částice v blízkosti povrchu vzorku a nedochází ke vzniku fluorescenčního šumu z celého objemu vzorku. Tím je zajištěn vyšší poměr signál/ruch oproti jednodušším metodám, kdy světelný zdroj míří na vzorek kolmo [77]. Díky tomu se TIRF stal často využívanou metodou pro zobrazování jednotlivých molekul kinesinu a jiných molekulárních motorů.



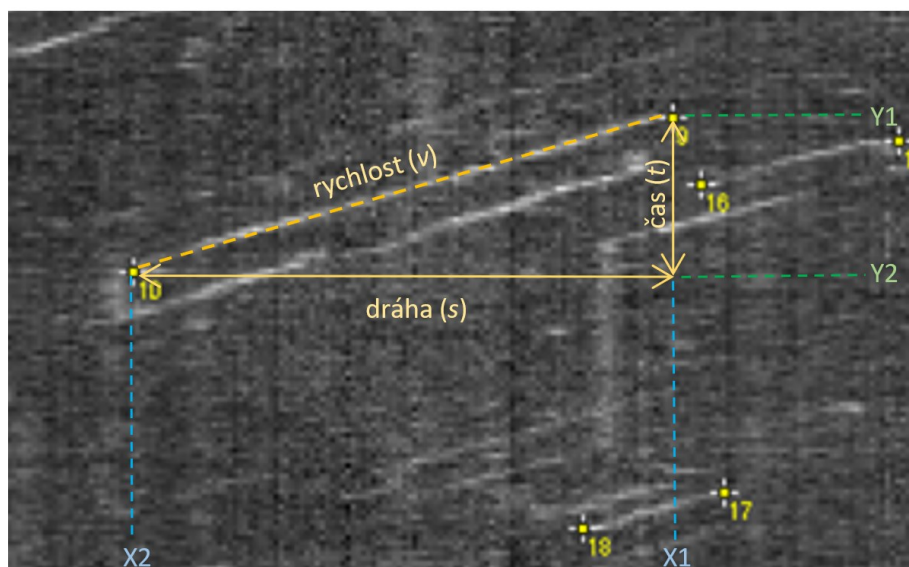
Obr. 3.1 Schéma fluorescenční mikroskopie s totálním vnitřním odrazem [78], upraveno. Excitační paprsek (laser) vybudí ve vzorku fluorescenci. Úhel paprsku vzhledem ke vzorku je nastavený tak, aby paprsek vzorkem neprocházela. Do vzorku prochází pouze evanescentní vlna, která budí fluorescenci v rámci evanescentního pole (asi 100 nm pod povrch vzorku).

Následně bylo snímáno video o délce 1 minuty za využití laseru o vlnové délce 488 nm a intenzitě 12–20 %. Jedná se o zelený laser, který excituje molekuly GFP vázané na kinesin a vyvolává fluorescenci. Doba expozice laseru byla 200 ms, akvizice byla přibližně 4 snímky za sekundu nebo 7 snímků za sekundu podle aktuálního nastavení rychlosti snímání.

3.3.6 Analýza obrazu

Videa byla analyzována pomocí softwaru FIJI ImageJ. Pomocí funkce kreslení lomených čar byly ze snímků získaných pomocí IRM vybrány pixely, kterými procházely mikrotubuly. Vybírány byly mikrotubuly, které se nekřížily, byl patrný jejich začátek i konec a byly ke sklu pevně přichyceny, tzn. žádná jejich část se nepohybovala.

Pro každou oblast zájmu byl vytvořen kymograf (funkce Multi Kymograph) (Obr. 3.2). Jedná se o dvoudimenzionální záznam pohybu sledovaných objektů v definovaném časovém úseku, v tomto případě pohybu kinesinu po mikrotubulech po dobu snímání videa.



Doba snímání všech videí byla 1 minuta, proto i vzdálenost od horního ke spodnímu okraji kymografu reprezentuje snímky pořízené za 1 minutu. Počet pixelů na svislé ose kymografu se může měnit podle nastavené akvizice snímání videa. Drobné odchylky se mohou vyskytovat i kvůli zaneprázdněnosti používaného hardwaru a softwaru. Přesný počet snímků pořízených za minutu v případě daného videa se zjistí vynásobením počtem snímků zaznamenaných za sekundu (FPS, z angl. Frames per Second) šedesáti. Hodnota FPS je v programu NIS-Elements Advanced Research uvedena na každém nasnímaném videu. Z kymografu je třeba zjistit, po jak dlouhou dobu se kinesin pohyboval po mikrotubulu. To lze vypočítat jako počet pixelů na svislé ose mezi oběma konci bílé čáry vynásobený převrácenou hodnotou FPS.

Vodorovná osa kymografu zastupuje prostor. Dráhu, kterou kinesin urazil, lze zjistit jako součin počtu pixelů ve vodorovném směru mezi oběma konci čáry na kymografu a velikosti pixelu pro reálný prostor: vodorovný či svislý průmět (nikoliv úhlopříčka) jednoho pixelu zaznamenaného na videu nebo zobrazeného na kymografu reprezentuje v tomto případě 65 nm ve skutečném prostoru.

Z další analýzy dat byly vyřazeny kymografy, na nichž nebyly patrné bílé čáry, které by se nekřížily a byl patrný jejich začátek i konec. Každá vhodná čára na kymografu byla označena na svém začátku a konci bodem (Multi-Point Tool) (*Obr. 3.2*, str. 37).

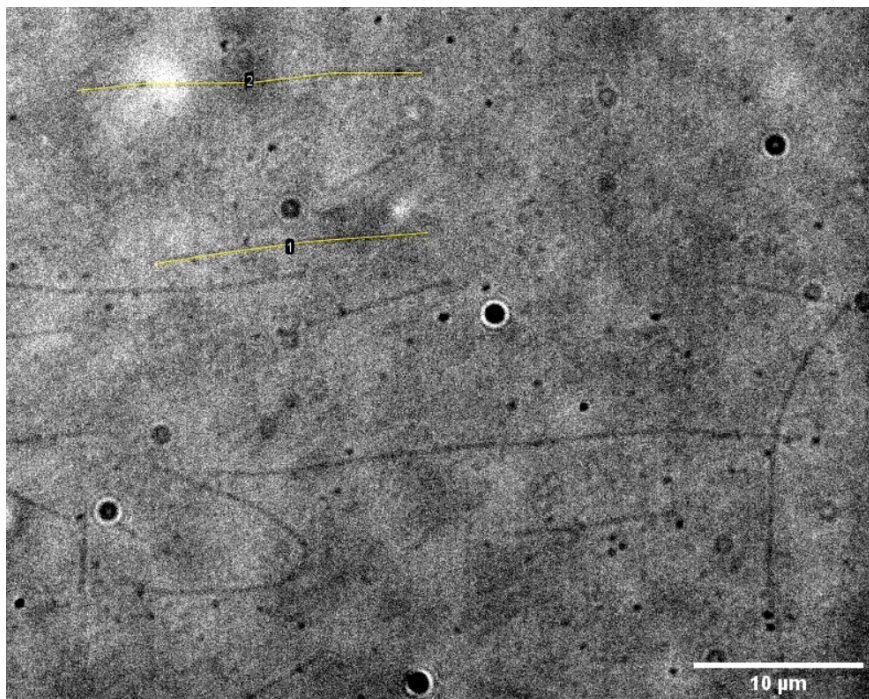
Body z celého kymografu byly přidány do nové složky ROI a uloženy. Pomocí funkce Measure byly v podobě tabulky získány XY souřadnice každého bodu. Číselná hodnota souřadnic má význam pořadí označeného pixelu v rámci pixelů vodorovné (X) nebo svislé (Y) osy. Tabulka byla uložena ve formátu .csv a dále upravována v programu Microsoft Excel. Byly vypočítány vzdálenosti mezi oběma konci bílé čáry, zvlášť pro X souřadnice a zvlášť pro Y souřadnice. Jednotkou vzdálenosti byl počet pixelů mezi označenými pixely. Byl vypočítán čas pohybu a dráha, jak je popsáno výše, a ze vztahu pro průměrnou rychlost $v = s/t$ byla získána průměrná rychlost pohybu kinesinu. Ze všech měření dané koncentrace PEGu byl vypočítán průměr průměrných rychlostí kinesinů a směrodatné odchylky.

Biochemická aktivita byla přímo vypočtena z rychlostí. Rychlost byla převedena na jednotky nm/s a podělena osmi nm. (Jedná se o dráhu osmi nm, kterou kinesin urazí v rámci jednoho kroku – viz 1.2.1.1. Struktura a pohyb kinesinu). Získáme tak ATPasovou aktivitu kinesinu-1, která udává, kolik molekul ATP enzymaticky štěpí jedna molekula kinesinu za jednu sekundu.

4 Výsledky

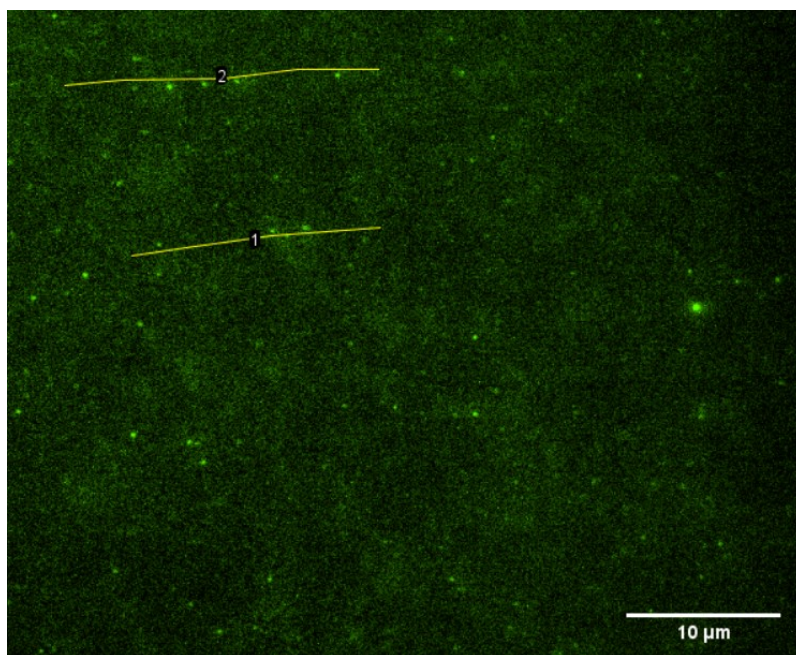
4.1 Získaná data

Při každém měření byly na mikroskopovacím sklíčku nalezeny mikrotubuly rekonstituované *in vitro* a byla pořízena jejich fotografie (Obr. 4.1).



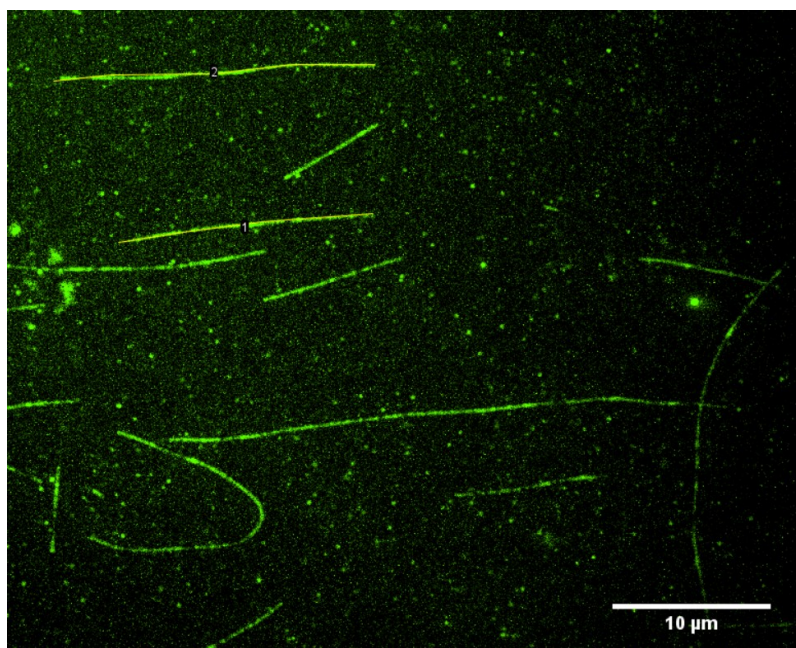
Obr. 4.1 Fotografie mikrotubulů vytvořená za využití metody IRM. Tmavé čáry jsou mikrotubuly přichycené na povrch sklíčka přes anti- β -tubulinové protilátky. Dva mikrotubuly jsou pomocí programu ImageJ označeny žlutě a čísly 1 a 2.

Dále byly metodou TIRF zobrazeny jednotlivé molekuly kinesinu a bylo pořízeno video o délce trvání jedné minuty, které zachycovalo pohyb kinesinů po mikrotubulech (Obr. 4.2, str. 40).



Obr. 4.2 Snímek z videa, metoda TIRF. K vyvolání fluorescence byl použit zelený laser o vlnové délce 488 nm. Čísly 1 a 2 a žlutými čarami jsou označeny polohy mikrotubulů z *Obr. 4.1*. Pod mikrotubulem 2 (nahore) je několik zelených teček. Jedná se o jednotlivé molekuly kinesinu-1 pohybující se podél mikrotubulu. Mikrotubuly jsou rozmístěny po zobrazené oblasti. Nevykazují ale fluorescenci, proto při snímání videa nejsou viditelné.

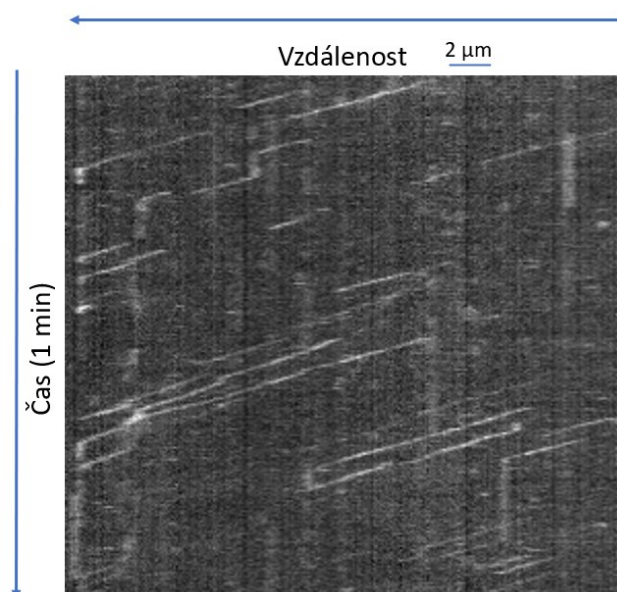
Vázání kinesinů na mikrotubuly bylo možné ověřit v programu ImageJ maximální projekcí fluorescence v rámci snímané oblasti (*Obr. 4.3*).



Obr. 4.3 Maximální projekce fluorescence. Vytvořeno pomocí programu ImageJ. (Popis pokračuje na str. 41.)

(Pokračování popisu Obr. 4.3 ze str. 40) Ze všech snímků videa (totožné s videem z Obr. 4.2) byla nasčítána intenzita všech pixelů. Místa s nejjasnější barvou jsou oblasti mikrotubulů (Obr. 4.1, str. 39), protože se po nich pohybuje velké množství molekul kinesinu-1 s fluorescenčním značením.

Pohyb jednotlivých molekul kinesinu-1 se podařilo graficky znázornit pomocí kymografů vytvořených v programu ImageJ (Obr. 4.4). Analýzou obrazu byla získána data o rychlosti a biochemické aktivitě kinesinu-1 v různých podmínkách.



Obr. 4.4 Kymograf molekul kinesinu-1 pohybujících se po mikrotubulu při TIRF mikroskopii.

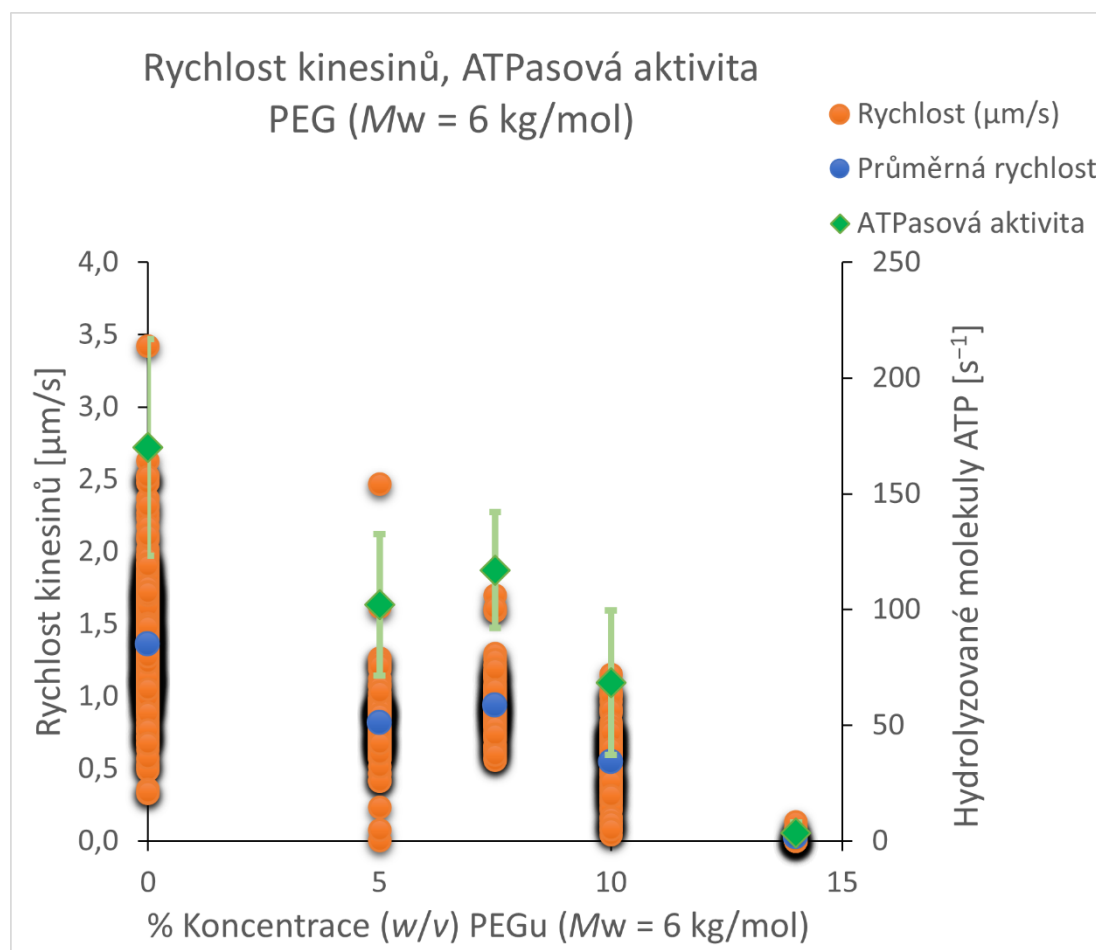
Vytvořeno pomocí programu ImageJ. Každá bílá linie reprezentuje pohyb jedné fluorescenčně značené molekuly kinesinu (případně jiných fluorescenčně aktivních částic). Kinesiny se v čase (svislá osa, směrem dolů) pohybují po mikrotubulu (vodorovná osa, zprava doleva). Čím je čára strmější, tím pomaleji se kinesin pohybuje – k dosažení určité vzdálenosti potřebuje větší množství času.

4.2 Rychlost kinesinu-1 v prostředí PEGu, $M_w = 6$ kg/mol

Pomocí fluorescenční mikroskopie byl sledován pohyb jednotlivých molekul kinesinu-1 podél mikrotubulů *in vitro*. Při každém měření byla do měřicího pufru přidána jiná koncentrace (w/v) PEGu 6, a to 0 %; 5 %; 7,5 %; 10 % a 14 %. Byla vypočtena průměrná rychlost pohybu kinesinu-1 při daných koncentracích PEGu, směrodatné odchylky a ze získaných dat byla pro každou koncentraci PEGu vypočtena ATPasová aktivita kinesinů jako počet molekul ATP hydrolyzovaných za sekundu. Pro každých 8 nm dráhy kinesinů uvažujeme 1 hydrolyzované ATP. Je-li rychlost pohybu vyjádřena v nm/s,

získáme vydělením průměrné rychlosti osmi v převrácené hodnotě čas, za který kinesin urazil dráhu 8 nm – a hydrolyzoval molekulu ATP. Získáme tak ATPasovou aktivitu kinesinu-1 při dané podmínce. Jako substrát uvažujeme právě ATP a předpokládáme jeho dostatek v okolí kinesinu, tedy nasycení kinesinu substrátem.

Výsledky měření byly zaznamenány do grafu (Obr. 4.5). Podařilo se zreprodukovat, že PEG 6 snižuje enzymovou aktivitu kinesinu-1.

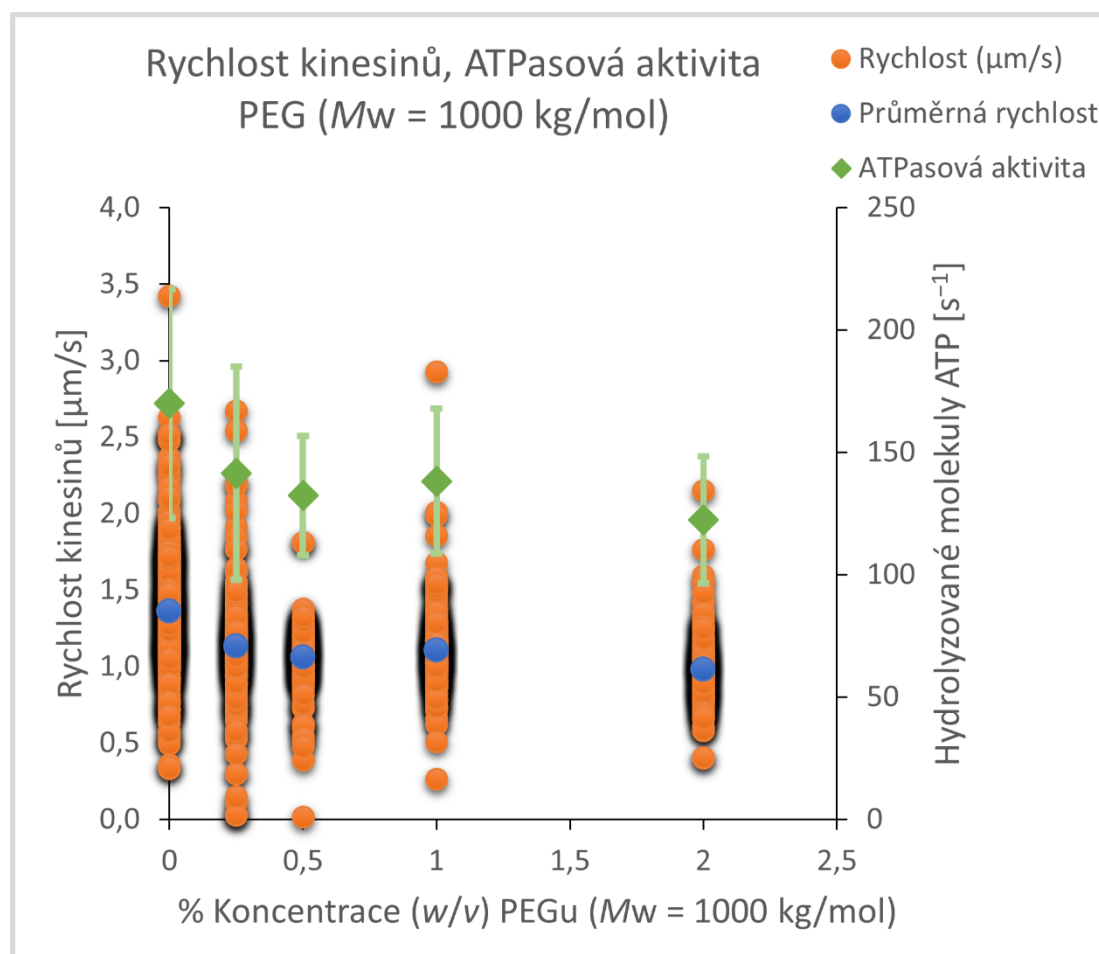


Obr. 4.5 Rychlosti a ATPasové aktivity kinesinů při různých koncentracích PEGu 6 v roztoku.

Oranžové body zastupují naměřené rychlosti jednotlivých kinesinů. Pro každou koncentraci (w/v) PEGu (5 %, 7,5 %, 10 % a 14 %) byla z naměřených rychlostí vypočtena průměrná rychlost (modře). Černá pole kolem setu oranžových bodů ilustrují mohutnost souboru dat – kolem oblasti průměrné rychlosti je naměřených dat velké množství, odlehlejší hodnoty jsou zastoupeny méně a nemají kolem sebe proto černé pole. Průměrné ATPasové aktivity kinesinů a jejich směrodatné odchylky jsou znázorněny zeleně. Osa ATPasové aktivity kinesinů je zavedena na pravé straně grafu. ATPasové aktivity korespondují s průměrnými rychlostmi. Obojí klesá při zvyšování koncentrace PEGu 6 k nule.

4.3 Rychlost kinesinu-1 v prostředí PEGu, $M_w = 1000$ kg/mol

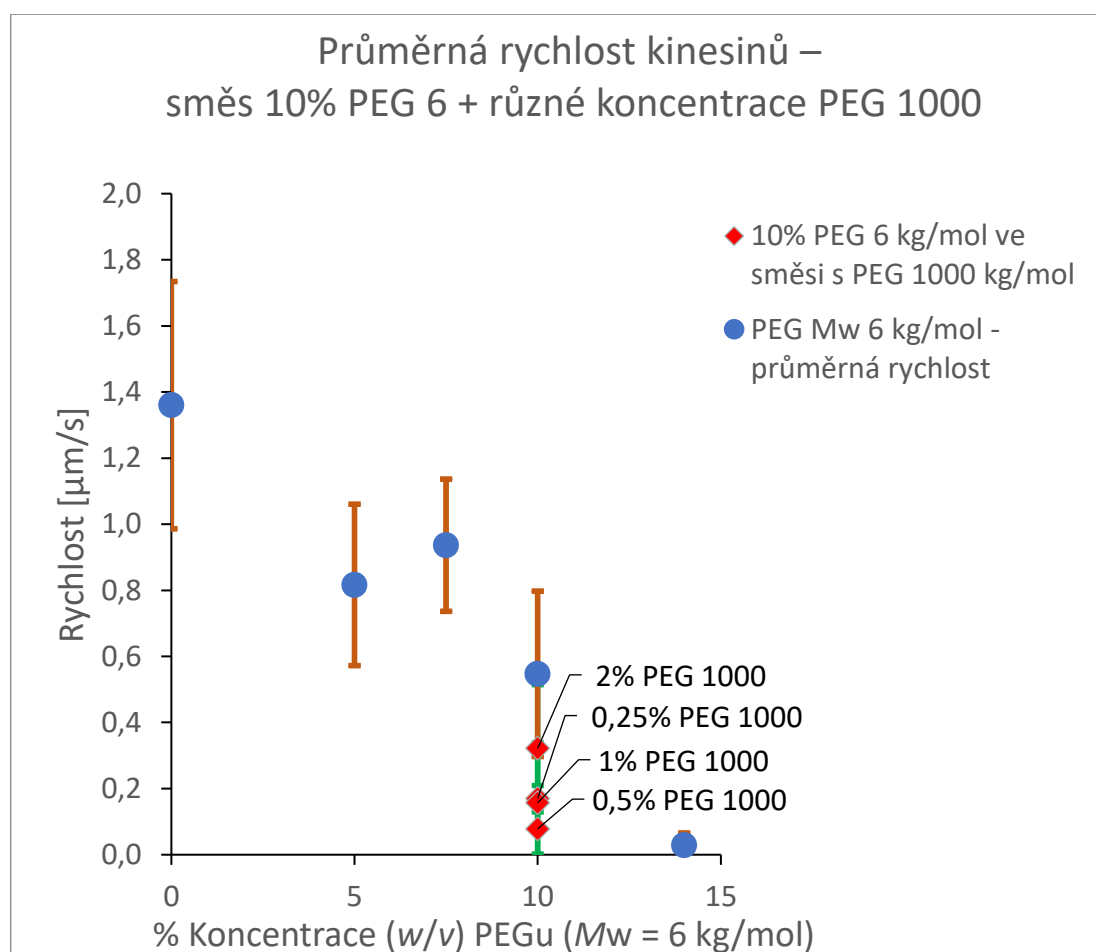
Do měřicího pufru byly přidávány různé koncentrace PEGu 1000. Viskozity jednotlivých roztoků s o různých koncentracích PEGu 1000 pokrývají a přesahují škálu viskozity z experimentu s PEGem 6 [44]. Opět byla sledována rychlost kinesinů a vypočtena jejich hydrolasová aktivita (pro způsob výpočtu viz experiment s PEGem 6). Výsledky jsou zaneseny do grafu (Obr. 4.5). Ze získaných výsledků vyplývá (ve shodě s předchozím výzkumem), že PEG 1000 má na rychlost – a biochemickou aktivitu kinesinů – zanedbatelný vliv [44].



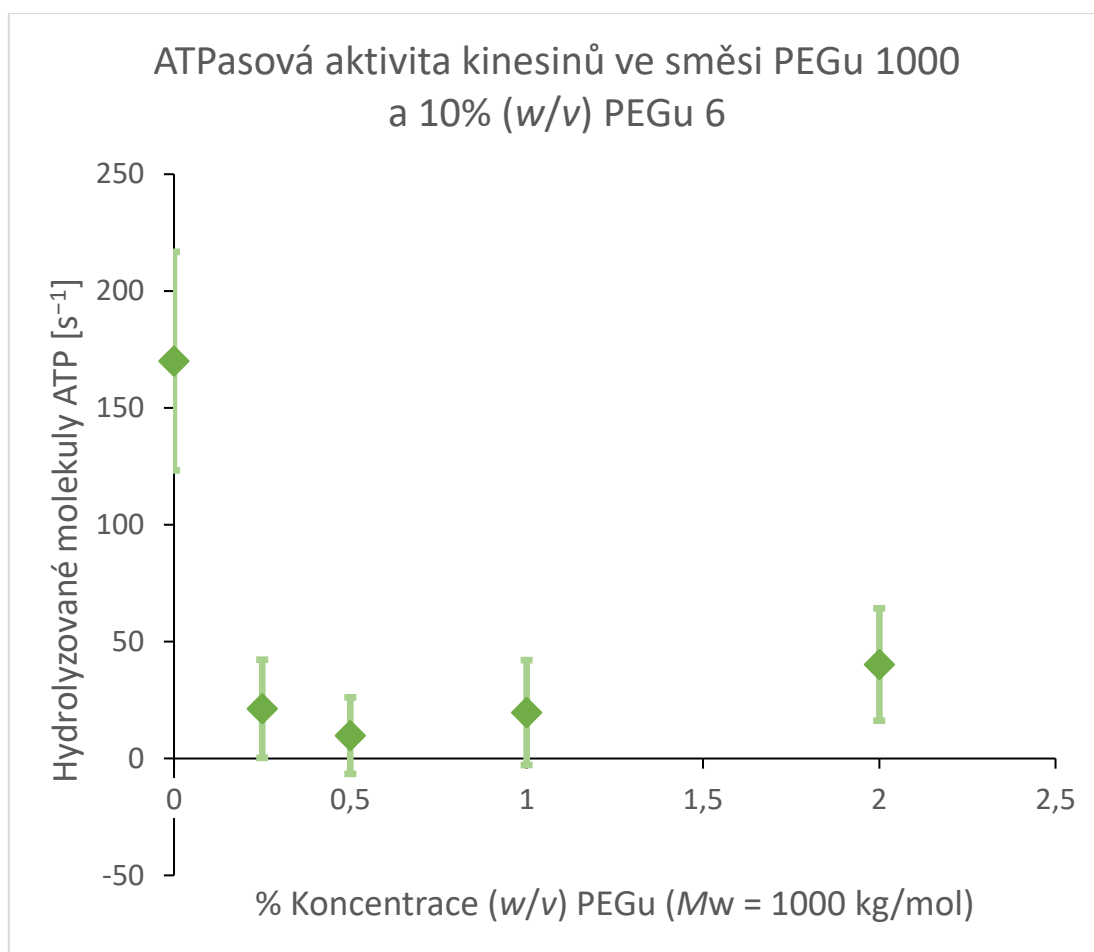
Obr. 4.5 Rychlosti a ATPasové aktivity kinesinů při různých koncentracích PEGu 1000 v roztoku. Oranžové body opět reprezentují naměřené rychlosti jednotlivých kinesinů, modré průměrnou rychlost kinesinů při dané koncentraci PEGu 1000 a zelené body průměrnou ATPasovou aktivitu. Koncentrace (w/v) PEGu v měřicím pufru byly 0,25 %; 0,5 %; 1 % a 2 %. Tyto koncentrace pokrývají viskozitní škálu odpovídající měřicím roztokům z experimentu s PEGem 6 [44]. Rychlosti kinesinů zůstávají vyrovnané, není patrný výrazný pokles rychlostí k nule při zvyšování koncentrace makromolekul PEGu v roztoku.

4.4 Rychlost kinesinu-1 ve směsi PEGů, $M_w = 6$ a 1000 kg/mol

Kinesiny byly sledovány v prostředí 10% (w/v) PEGu 6, do kterého byly přidány různé koncentrace (w/v) PEGu 1000 (0,25 %; 0,5 %; 1 %; 2 %). Přidání samotného PEGu 1000 ovlivňuje zanedbatelně pohyb kinesinu (Obr. 4.5). Cílem bylo ověřit hypotézu, že v přítomnosti makromolekul, jejichž rozměry přibližně odpovídají rozměrům motorové domény kinesinů (PEG 6), se efekt přidání větších makromolekul (PEG 1000) projeví výrazněji než v nepřítomnosti menších makromolekul. Byly sledovány tytéž veličiny jako v předchozích experimentech. Výsledky jsou shrnuty v grafech (Obr. 4.6–4.7, str. 44–45).



Obr. 4.6 Průměrná rychlost kinesinů v PEGu 6 a ve směsi 10% PEGu 6 a PEGu 1000. Modré body zastupují průměrné rychlosti kinesinů při různých koncentracích PEGu 6 (totožné s koncentracemi na Obr. 4.5, tedy 5 %; 7,5 %; 10 % a 14 % w/v). Při 10% koncentraci (w/v) PEGu 6 v roztoku bylo patrné zpomalení kinesinů přibližně na polovinu oproti rychlosti v měřicím pufru bez přidání PEGu. Při této koncentraci byl také do roztoku přidáván PEG 1000, a to ve stejných koncentracích jako v Experimentu 2. Výsledná rychlost byla výrazně nižší oproti roztoku pouze s PEGem 6, ještě výraznější byl pokles oproti roztokům, ve kterých byly dané koncentrace PEGu 1000 bez přítomnosti PEGu 6.



Obr. 4.7 Graf ATPasové aktivity kinesinu-1 při titraci 10% PEGu 6 PEGem 1000. Počet hydrolyzovaných molekul ATP za sekundu se při nulové koncentraci PEGu 1000 a 10% (w/v) PEGu 6 pohybuje kolem 170. Už malý přídavek PEGu 1000 způsobí výrazný pokles ATPasové aktivity kinesinů. Koncentrace PEGu 1000 byly 0,25 %; 0,5 %; 1% a 2 % (w/v).

Porovnáním poklesu rychlosti kinesinu-1 za přítomnosti PEGu 1000 a směsi PEG 6-PEG 1000 bylo zjištěno, že přítomnost malých inertních makromolekul zvyšuje vliv velkých makromolekul na pohyb kinesinu-1. Statistické vyhodnocení pomocí Studentova t-testu ukazuje signifikantní rozdíl v chování mezi soubory kinesinů, které se pohybují ve stejných koncentracích PEGu 1000, ale jednou bez přítomnosti PEGu 6, podruhé v jeho přítomnosti (*Tab. 4.1*).

Tab. 4.1 Dvouvýběrový t-test pro porovnání výběru kinesinů v přítomnosti týchž koncentrací PEGu 1000, výběry se liší přítomností 10% (w/v) PEGu 6. Vypočítáno v programu Microsoft Excel (typ testu: 2). Pro všechny případy platí, že $p < 0,01$. Výběry jsou tedy signifikantně odlišné na hladině významnosti $\alpha = 0,01$.

% (w/v) PEG 1000	0,25	0,5	1	2
Hodnota "p"	4,5E-118	2,1E-118	4,7E-214	5,0E-123

5 Diskuze

Výsledky měření v roztocích s pouze jedním druhem PEGu byly svými trendy ve shodě s výsledky předchozího výzkumu [44]. Obecně se růst koncentrace PEGu 6 projevil nižší rychlostí kinesinů, což znamená, že jeden krok kinesinu trvá déle. Toto pozorování může znamenat, že motorová doména kinesinu potřebuje více času k nalezení dalšího vazebného místa na mikrotubulu, a je tedy v souladu s hypotézou, že motorová doména kinesinu se alespoň částečně pohybuje difúzí během kroku kinesinu. Diskutovány budou drobné odchylky od očekávaného chování.

Vzrůst koncentrace (w/v) PEGu 6 neznamenal vždy pokles rychlosti kinesinů. Při koncentraci PEGu 7,5 % přesáhla průměrná rychlost rychlost při 5% koncentraci. Příčinu tohoto nárůstu lze hledat v teplotě místnosti, která se v případě obou měření mohla lišit, neboť část měření nebyla prováděna ve stejný den. Teplota má na biochemickou aktivitu kinesinů vliv [79]. Odlišnost od očekávaného trendu také může být způsobeno rozdílem v pasivaci mikroskopovacího sklíčka, což může mít za následek větší nebo menší nespécifické interakce kinesinu se skleněným povrchem. O tomto svědčí i pozorování při některých měřeních, kdy bylo možné sledovat nehomogenitu prostředí na sklíčku, ať už šlo o množství přichycených mikrotubulů nebo množství a chování kinesinů na mikrotubulech. Není tedy vyloučeno, že tyto technické faktory do určité míry ovlivní naměřené hodnoty rychlosti.

V případě PEGu 1000 jsou průměrné rychlosti kinesinů přibližně vyrovnané. U všech koncentrací (w/v) byl pozorován mírný pokles v porovnání s roztokem bez jakéhokoliv PEGu. Publikovaný vliv PEGu 1000 je ještě nižší, než bylo pozorováno v rámci této práce [44]. Důvod této rozdílnosti je možné hledat např. v drobné heterogenitě použitého PEGu – ve výskytu malého množství odštěpených menších celků PEGu, které by stály za posílením vlivu sterického bránění motorové domény kinesinů, jako lze pozorovat v případě směsných roztoků PEGů.

Při pohledu na grafy rychlosti kinesinů (*Obr. 4.4–4.5*, str. 42 a 43) je také vidět, že pro každou koncentraci byla naměřena značná šíře rychlostí kinesinů (oranžový sloupec bodů sahá od nulových rychlostí daleko nad průměrnou rychlost). Velmi odlehlých hodnot dosahovalo jen několik jednotek kinesinů, zatímco většina hodnot se pohybovala v blízkosti průměru. Tento rozptyl můžeme vysvětlit heterogenním chováním jednotlivých molekul. Ne každá molekula kinesinu vykazovala přímočarý pohyb. Při vyšších koncentracích PEGu vykazovaly některé kinesiny difúzní pohyb nebo se nepohybovaly. V některých případech nebylo jasné, zda se na kymografu jedná

o záznam kinesinu, shluk kinesinů nebo jiné fluorescenční částice, šířka zaznamenané čáry byla tlustší než většina ostatních záznamů. Tato heterogenita by se dala zmírnit např. vylepšením protokolu pro purifikaci kinesinu.

Přidání PEGu 1000 do 10% (w/v) roztoku PEGu 6 mělo za následek výrazné snížení rychlosti už při nejnižší přidávané koncentraci PEGu 1000 (0,25 %, w/v). Domníváme se, že toto pozorování může být vysvětleno např. tím, že „velké“ molekuly zvýší efektivní koncentrace „malých“ a tím stericky brání pohybu motorové domény kinesinu, čímž kinesin zpomalují a snižují jeho ATPasovou aktivitu. Průměrná rychlost kinesinů však neklesala uspořádaně se zvyšující se koncentrací makromolekul. Při 0,5% koncentraci (w/v) PEGu 1000 byla sice rychlost kinesinů ještě nižší, ale při 1% koncentraci byla naměřená rychlost srovnatelná jako při 0,25% koncentraci a v případě 2% PEGu dokonce rychlost přesáhla ostatní hodnoty. Není jasné, co přesně za touto neuspořádaností stálo. V úvahu opět přichází odchylky v teplotě při měření. Svou roli mohla hrát i velmi vysoká viskozita roztoku. Ačkoli bylo dbáno na co nejdůkladnější promíchání roztoku, mohla se při měření v roztoku vyskytovat lokálně méně promíchané oblasti. Na některých kymografech získaných při 2% koncentraci (w/v) PEGu 1000 ve směsném roztoku bylo možné pozorovat, že některé molekuly kinesinu pohybovaly nečekaně rychle. Ty pak stály za vyšší hodnotou průměrné rychlosti celého vzorku kinesinů. Všechny naměřené rychlosti ve směsném roztoku PEGů byly ale srovnatelné a vždy šlo hodnoty výrazně nižší než v roztoku bez přidaného PEGu 1000. Výsledky experimentu se směsí PEGů jako celek proto neztrácejí svou výpovědní hodnotu.

Několik dekád byly molekulární motory studovány v podmínkách *in vitro*, které se od vnitřního prostředí buňky značně liší. Makromolekuly přítomné v buňce mohou být volně dostupné v cytosolu a jejich vliv na chemomechanický cyklus kinesinů může být značný, ač kvůli nedostatečnému pozorování jejich vlivu *in vivo* není jasné, do jaké míry mohou makromolekuly motorům v pohybu bránit v živých soustavách. Vzhledem ke složitosti vnitřního prostředí buňky a velkému množství druhů přítomných částic se nabízí uvažovat o významném vlivu. K makromolekulám běžně dostupným v cytosolu patří polymery glukosy, peptidy, proteiny, shluky lipidů, nukleové kyseliny, zásobní látky, subcelulární struktury jako ribozomy nebo části cytoskeletu a další.

Studie provedená na kvasinkách hovoří o možnosti regulace rychlosti chemických reakcí a možnost difúze uvnitř buňky pomocí produkce nebo snížení inertních molekul (glykogen a trehalosa) buňkou samotnou [80]. Tento jev, viskoadaptace, byl sledován jako odpověď na změny teploty buňky nebo stresové stavy, kdy dostupnost ATP v buňce

klesla [81]. Regulace fluidity buněčných membrán zabudováváním molekul je již déle známým jevem [82]. Nabízí se myšlenka obecné regulace rychlostí biochemických dějů v buňce produkcí některých inertních makromolekul. Regulace pomocí inertních molekul by se velmi lišila od jiných způsobů regulace, kdy se často jedná o kovalentní nebo nekovalentní vazebné interakce dvou nebo více molekul. Ačkoli k žádné chemické změně zúčastněných partikulí nedocházelo, měnila se jejich biochemická aktivita s tím i buněčné děje. V souladu s těmito hypotézami získané výsledky přímo ukazují, že přidáním inertních makromolekul do roztoku můžeme regulovat enzymovou aktivitu motorových proteinů.

Zahušťování vnitřního prostředí některých částí buňky vede k představě hůře prostupných oblastí pro molekulární motory, kde investice do pohybu motorů představuje pro buňku nevýhody v transportu přenášených nákladů. Vzhledem k podstatě chemomechanického cyklu kinesinů ale pohyb takovým prostředím nepředstavuje ztrátu energetickou, co se týká spotřeby ATP. Lze ovšem uvažovat o architektonické strategii buňky v budování drah z mikrotubulů. Přichází v úvahu možnost, že ve stresových podmínkách, kdy je přenos nákladu do místa potřeby kriticky důležitý, bude buňka spíše budovat dráhy pro transport v místech s nižším zahuštěním cytoplazmy. Naopak vyšší koncentrace makromolekul je možné dát do kontextu se zabráněním difúze částic, které je potřeba po nějakou dobu udržet v určitém okrsku buňky.

Výsledky získané zcela nově v rámci této práce ukazují, jakým způsobem mohou směsi inertních makromolekul ovlivňovat aktivitu enzymu. Vzhledem k tomu, že buněčná cytoplazma je obsahuje přemíru různých biomakromolekul, které ne vždy vzájemně interagují, dá se očekávat, že zde popsáný efekt bude relevantní pro různé buněčné děje.

6 Závěr

Byly provedeny experimenty, při kterých byly mikroskopicky sledovány jednotlivé molekuly fluorescenčně značeného kinesinu-1 a byla zaznamenána průměrná rychlost jejich pohybu po mikrotubulech rekonstituovaných *in vitro*. Pro simulaci buněčného prostředí, zahrnujícího nepřeborné množství subcelulárních částic, byly do měřicího roztoku ke kinesinům přidávány různé koncentrace polyethylenglykolu, a to nejprve o molární hmotnosti 6 kg/mol, poté 1000 kg/mol. Při třetí sérii měření byly oba typy PEGu přidány do roztoku současně, koncentrace PEGu 6 byla vždy 10 % (w/v), koncentrace PEGu 1000 odpovídaly koncentracím při experimentech pouze s PEGem 1000 (0,25 %; 0,5 %; 1 %; 2 %, w/v). Trendy ve výsledcích měření odpovídaly výsledkům experimentů v literatuře [44]. Zvyšování koncentrace PEGu 6 se projevilo klesáním rychlostí kinesinu-1. Při 14% (w/v) koncentraci PEGu 6 v roztoku byly rychlosti pohybu téměř všech sledovaných molekul kinesinu-1 nulové. Přidávky PEGu 1000 do roztoku neměly za následek významné zpomalení kinesinů ani při vysokých viskozitách roztoku.

Nově provedeným experimentem byla kombinace makromolekul heterogenních ve svých velikostech. Jednalo se o molekuly použité v předchozích experimentech, tedy PEG o $M_w = 6$ kg/mol a 1000 kg/mol. Koncentrace PEGu 6 byla při tomto experimentu vždy 10 % (w/v). Při této koncentraci se kinesiny v průměru pohybovaly asi poloviční rychlostí oproti podmínkám, kdy koncentrace PEGu v roztoku byla nulová. Koncentrace PEGu 1000 byly 0,25 %, 0,5 %, 1 % a 2 % (w/v). Při prvních dvou koncentracích se rychlost kinesinů dramaticky snížila, při dalších dvou byla rychlost výrazně nižší než v roztoku se samotným PEGem 6, ale rychlosti neklesaly uspořádaně podle zvyšování koncentrace většího PEGu.

Získané výsledky jsou ve shodě s naší hypotézou a potvrzují, že inertní makromolekuly mohou mít na rychlost a s tím přímo spojenou biochemickou aktivitu molekulárních motorů významný vliv. Podle modelu, při kterém makromolekuly s průměrem podobným rozměrům motorové domény ovlivňují chemomechanický cyklus kinesinu, dokáží makromolekuly bránit difúznímu pohybu motorové domény kinesinu a tím i jeho pohybu. Výsledky získané nově v rámci této práce v souladu s tímto modelem podporují představu, že výrazně větší makromolekuly mohou významně zvýšit sterický efekt menších makromolekul a tím nepřímě snižovat biochemickou aktivitu molekulárních motorů, aniž by docházelo k chemickým interakcím mezi biochemickou aktivitou motoru a makromolekulou.

Získané výsledky poukazují na možnosti regulace molekulárních motorů pomocí inertních chemických látek bez nutnosti chemických zásahů do systému cytoskeletu a molekulárních motorů. Upozorňuje také na problematiku studia molekulárních motorů *in vitro*.

Seznam použité literatury

1. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Essential Cell Biology*. Druhé vyd. Ústí nad Labem, Espero Publishing, 2006.
2. Herrmann, H., Aebi, U. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **8**, 1–22 (2016).
3. Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach*. Druhé vyd. Sunderland, Sinauer Associates, 2000.
4. Roehm, K. H., Koolman, J. *Taschenatlas der Biochemie des Menschen*. Čtvrté vyd. Praha, GRADA, 2017.
5. Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kenelly, P. J., Rodwell, V. W., Weil, P. A. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Páté vyd. Praha, Galén, 2012.
6. Gordon, W. E., Bushnell, A., Burridge, K. Characterization of the intermediate (10 nm) filaments of cultured cells using an autoimmune rabbit antiserum. *Cell.* **13**, 249–61. (1978).
7. Amos, L. A., Hirose, K. The structure of microtubule-motor complexes. *Curr Opin Cell Biol.* **9**, 4–11 (1997).
8. Chen, J., Kholina, E., Szyk, A., Fedorov, V.A., Kovalenko, I., Gudimchuk, N., Roll-Mecak, A. α -Tubulin Tail Modifications Regulate Microtubule Stability Through Selective Effector Recruitment, not Changes in Intrinsic Polymer Dynamics. *Dev Cell.* **56**, 2016-2028 (2021).
9. What are microtubules? URL: <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-is-the-cytoskeleton/what-are-microtubules/> [cit. srpen 14., 2022].
10. Wiese, C., Zheng, Y. Microtubule nucleation: γ -tubulin and beyond. *J Cell Sci.* **119**, 4143–53 (2006).
11. Caplow, M., Shanks, J. Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol Biol Cell.* **7**, 663–75 (1996).
12. Bergen, L. G., Borisy, G. G. Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J Cell Biol.* **84**, 141–50 (1980).
13. Chaaban, S., Brouhard, G. J. A microtubule bestiary: structural diversity in tubulin polymers. *Mol Biol Cell.* **28**, 2924–31 (2017).

14. Xu, Z., Afzelius, B. A. Early changes in the substructure of the marginal bundle in human blood platelets responding to adenosine diphosphate. *J Ultrastruct Mol Struct Res.* **99**, 254–60 (1988).
15. Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., Downing, K. H. High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell.* **96**, 79–88 (1999).
16. Downing, K. H., Nogales, E. Tubulin and microtubule structure. *Curr Opin Cell Biol.* **10**, 16–22 (1998).
17. Wall, K. P., Pagratis, M., Armstrong, G., Balsbaugh, J. L., Verbeke, E., Pearson, C. G., Hough, L. E. Molecular Determinants of Tubulin's C-Terminal Tail Conformational Ensemble. *ACS Chem Biol.* **11**, 2981–90 (2016).
18. Mizuhara, Y., Takano, M. Biased Brownian Motion of KIF1A and the Role of Tubulin's C-Terminal Tail Studied by Molecular Dynamics Simulation. *Int J Mol Sci.* **22**, 1547 (2021).
19. Janke, C., Magiera, M. M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **21**, 307–26 (2020).
20. Wall, K. P., Hart, H., Lee, T., Page, C., Hawkins, T. L., Hough, L. E. C-Terminal Tail Polyglycylation and Polyglutamylation Alter Microtubule Mechanical Properties. *Biophys J.* **119**, 2219–30 (2020).
21. Findeisen, P., Mühlhausen, S., Dempewolf, S., Hertzog, J., Zietlow, A., Carlomagno, T., Kollmar, M. Six Subgroups and Extensive Recent Duplications Characterize the Evolution of the Eukaryotic Tubulin Protein Family. *Genome Biol Evol.* **6**, 2274–88 (2014).
22. Ross, I., Clarissa, C., Giddings, T. H., Winey, M. ϵ -tubulin is essential in *Tetrahymena thermophila* for the assembly and stability of basal bodies. *J Cell Sci.* **126**, 3441–51 (2013).
23. de Loubresse, N. G., Ruiz, F., Beisson, J. Role of delta-tubulin and the C-tubule in assembly of Paramecium basal bodies. *BMC Cell Biol.* **2**:4, 1–7 (2001).
24. Ludueña, R. F., Banerjee, A. The Isotypes of Tubulin. In: *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology. Cancer Drug Discovery and Development.* Fojo, T. (ed.), Totowa, Humana Press, 2008, s. 123–75.
25. Nogales, E., Wolf, S. G., Downing, K. H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* **391**, 199–203 (1998).

26. Parness, J., Horwitz, S. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol.* **91**, 479–87 (1981).
27. Škubník, J., Jurášek, M., Ruml, T., Rimpelová, S. Mitotic Poisons in Research and Medicine. *Molecules.* **25**, 4632 (2020).
28. Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 9552–56 (1993).
29. Snyder, J. P., Nettles, J. H., Cornett, B., Downing, K. H., Nogales, E. The binding conformation of Taxol in β -tubulin: A model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 5312–16 (2001).
30. Rao, S., Krauss, N. E., Heerding, J. M., Swindell, C. S., Ringel, I., Orr, G. A., Horwitz, S. B. 3'-(p-azidobenzamido)taxol photolabels the N-terminal 31 amino acids of beta-tubulin. *J Biol Chem.* **269**, 3132–34 (1994).
31. Mitra, A., Sept, D. Taxol Allosterically Alters the Dynamics of the Tubulin Dimer and Increases the Flexibility of Microtubules. *Biophys J.* **95**, 3252–58 (2008).
32. Schliwa, M., Woehlke, G. Molecular motors. *Nature.* **422**, 759–65 (2003).
33. Vale, R. D., Reese, T. S., Sheetz, M. P. Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility. *Cell.* **42**, 39–50 (1985).
34. Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., Hirokawa, N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 7004–11 (2001).
35. Hepperla, A. J., Willey, P. T., Coombes, C. E., Schuster, B. M., Gerami-Nejad, M., McClellan, M., Mukherjee, S., Fox, J., Winey, M., Odde, D. J., O'Toole, E., Gardner, M. K. Minus-End Directed Kinesin-14 Motors Align Anti-Parallel Microtubules to Control Metaphase Spindle Length. *Dev Cell.* **31**, 61–72 (2014).
36. Chen, Y., Hancock, W. O. Kinesin-5 is a microtubule polymerase. *Nat Commun.* **6**, 8160 (2015).
37. Trofimova, D., Paydar, M., Zara, A., Talje, L., Kwok, B. H., Allingham, J. S. Ternary complex of Kif2A-bound tandem tubulin heterodimers represents a kinesin-13-mediated microtubule depolymerization reaction intermediate. *Nat Commun.* **9**, 2628 (2018).
38. Seog, D. H., Lee, D. H., Lee, S. K. Molecular Motor Proteins of the Kinesin Superfamily Proteins (KIFs): Structure, Cargo and Disease. *J Korean Med Sci.* **19**, 1–7 (2004).

39. Chen, X. Q., Das, U., Park, G., Mobley, W. C. Normal levels of KIF5 but reduced KLC1 levels in both Alzheimer disease and Alzheimer disease in Down syndrome: evidence suggesting defects in anterograde transport. *Alzheimers Res Ther.* **13**, 59 (2021).
40. Amos, L. A. Kinesin from pig brain studied by electron microscopy. *J Cell Sci.* **87**, 105–11 (1987).
41. Shwartz, M. *Limping all the way, protein carries stuff of life across cell*. URL: <https://news.stanford.edu/news/2003/december10/kinesinproof-1210.html> [cit. srpen 14., 2022].
42. Kuznetsov, S. A., Vaisberg, Y. A., Rothwell, S. W., Murphy, D. B., Gelfand, V. I. Isolation of a 45-kDa fragment from the kinesin heavy chain with enhanced ATPase and microtubule-binding activities. *J Biol Chem.* **264**, 589–95 (1989).
43. Rice, S., Lin, A. W., Safer, D., Hart, C. L., Naber, N., Carragher, B. O., Cain, S. M., Pechatnikova, E., Wilson-Kubalek, E. M., Whittaker, M., Pate, E., Cooke, R., Taylor, E.W., Milligan, R. A., Vale, R. D. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* **402**, 778–84 (1999).
44. Sozański, K., Ruhnów, F., Wiśniewska, A., Tabaka, M., Diez, S., Hołyst, R. Small Crowders Slow Down Kinesin-1 Stepping by Hindering Motor Domain Diffusion. *Phys Rev Lett.* **115**, 1–5 (2015).
45. Block, S.M. Kinesin Motor Mechanics: Binding, Stepping, Tracking, Gating, and Limping. *Biophys J.* **92**, 2986–95 (2007).
46. Schief, W. R., Howard, J. Conformational changes during kinesin motility. *Curr Opin Cell Biol.* **13**, 19–28 (2001).
47. Coy, D. L., Wagenbach, M., Howard, J. Kinesin Takes One 8-nm Step for Each ATP That It Hydrolyzes. *J Biol Chem.* **274**, 3667–71 (1999).
48. Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J., Vale, R. D. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature.* **380**, 550–55 (1996).
49. Kraulis, P. J. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Crystallogr.* **24**, 946–50 (1991).
50. Hackney, D. D. Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**, 6314–18 (1988).

51. Ma, Y. Z., Taylor, E. W. Kinetic Mechanism of Kinesin Motor Domain. *Biochemistry*. **34**, 13233–41 (1995).
52. Fisher, A., Smith, C., Thoden, J., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H., Rayment, I. X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP·BeFx and MgADP·AlF₄⁻. *Biochemistry*. **34**, 8960–72 (1995).
53. Kellogg, E. H., Hejab, N. M. A., Poepsel, S., Downing, K. H., DiMaio, F., Nogales, E. Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science*. **360**, 1242–46 (2018).
54. Naseri, N. N., Wang, H., Guo, J., Sharma, M., Luo, W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. **705**, 183–94 (2019).
55. Goldstein, L. S. B. Kinesin molecular motors: Transport pathways, receptors, and human disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 6999–7003 (2001).
56. Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Vidal, R., Crowther, R. A., Ghetti, B., Scheres, S. H. W., Goedert, M. Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature*. **561**, 137–40 (2018).
57. Bilsland, L. G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L., Schiavo, G. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 20523–28 (2010).
58. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*. **26**, 597–604 (2001).
59. Rohwer, J. M., Postma, P. W., Kholodenko, B. N., Westerhoff, H. V. Implications of macromolecular crowding for signal transduction and metabolite channeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 10547–52 (1998).
60. Kim, J., Jeon, C., Jeong, H., Jung, Y., Ha, B. Y. A polymer in a crowded and confined space: effects of crowder size and poly-dispersity. *Soft Matter*. **11**, 1877–88 (2015).
61. Chapman, C. D., Gorczyca, S., Robertson-Anderson, R. M. Crowding Induces Complex Ergodic Diffusion and Dynamic Elongation of Large DNA Molecules. *Biophys J*. **108**, 1220–28 (2015).
62. Minton, A. P. The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *J Biol Chem*. **276**, 10577–80 (2001).

63. Tabaka, M., Sun, L., Kalwarczyk, T., Hołyst, R. Implications of macromolecular crowding for protein–protein association kinetics in the cytoplasm of living cells. *Soft Matter*. **9**, 4386–89 (2013).
64. Nishiyama, M., Higuchi, H., Yanagida, T. Chemomechanical coupling of the forward and backward steps of single kinesin molecules. *Nat Cell Biol.* **4**, 790–97 (2002).
65. Okada, Y., Hirokawa, N. Mechanism of the single-headed processivity: Diffusional anchoring between the K-loop of kinesin and the C terminus of tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 640–45 (2000).
66. Hou, S., Ziebac, N., Kalwarczyk, T., Kaminski, T. S., Wieczorek, S. A., Hołyst, R. Influence of nano-viscosity and depletion interactions on cleavage of DNA by enzymes in glycerol and poly(ethylene glycol) solutions: qualitative analysis. *Soft Matter* **7**, 3092–99 (2011).
67. Hołyst, R., Bielejewska, A., Szymański, J., Wilk, A., Patkowski, A., Gapiński, J., Żywociński, A., Kalwarczyk, T., Kalwarczyk, E., Tabaka, M., Ziebac, N., Wieczorek, S. A. Scaling form of viscosity at all length-scales in poly(ethylene glycol) solutions studied by fluorescence correlation spectroscopy and capillary electrophoresis. *Phys Chem Chem Phys.* **11**, 9025–32 (2009).
68. Tcharkhtchi, A., Nony, F., Khelladi, S., Fitoussi, J., Farzaneh, S. 13 - Epoxy/amine reactive systems for composites materials and their thermomechanical properties. In: *Advances in Composites Manufacturing and Process Design*. Boisse, P. (ed.), Cambridge, Woodhead Publishing, 2015, s. 269–96.
69. Hyeon, C., Onuchic, J. N. Internal strain regulates the nucleotide binding site of the kinesin leading head. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 2175–80 (2007).
70. Zhou, H. X., Rivas, G., Minton, A. P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophys.* **37**, 375–97 (2008).
71. Conway, L., Ross, J. L. Kinesin Motor Transport is Altered by Macromolecular Crowding and Transiently Associated Microtubule-Associated Proteins. (2014) URL: <https://arxiv.org/abs/1409.3455> [cit. srpen 18, 2022].
72. Carter, N. J., Cross, R. A. Mechanics of the kinesin step. *Nature.* **435**, 308–12 (2005).

73. Henrichs, V., Grycova, L., Barinka, C., Nahacka, Z., Neuzil, J., Diez, S., Rohlena, J., Braun, M., Lansky, Z. Mitochondria-adaptor TRAK1 promotes kinesin-1 driven transport in crowded environments. *Nat Commun* **11**, 3123 (2020).
74. Castoldi, M., Popov, A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization–depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr Purif* **32**, 83–88 (2003).
75. Gell, C., Bormuth, V., Brouhard, G.J., Cohen, D.N., Diez, S., Friel, C.T., Helenius, J., Nitzsche, B., Petzold, H., Ribbe, J., Schäffer, E., Stear, J.H., Trushko, A., Varga, V., Widlund, P.O., Zanic, M., Howard, J. Chapter 13 - Microtubule Dynamics Reconstituted In Vitro and Imaged by Single-Molecule Fluorescence Microscopy. In: *Methods in Cell Biology*, **95**. Wilson, J., Correia, J. J. (eds.), Academic Press, USA, 2010, s. 221–45.
76. Barr, V. A., Bunnell, S. C. Interference Reflectance Microscopy. *Curr Protoc Cell Biol*. **45**:4, 1–21 (2009).
77. Du, W., Su, Q. P. Single-molecule in vitro reconstitution assay for kinesin-1-driven membrane dynamics. *Biophys Rev*. **11**, 319–25 (2019).
78. Richter, V., Wagner, M., Schneckenburger, H. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) – novel techniques and applications. *Med Res Arch*. **8**, 1–11 (2020).
79. Kawaguchi, K., Ishiwata, S. Temperature Dependence of Force, Velocity, and Processivity of Single Kinesin Molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. **272**, 895–99, (2000).
80. Persson, L. B., Ambati, V. S., Brandman, O. Cellular Control of Viscosity Counters Changes in Temperature and Energy Availability. *Cell*. **183**, 1572-85, (2020).
81. Shi, L., Sutter, B. M., Ye, X., Tu, B. P. Trehalose Is a Key Determinant of the Quiescent Metabolic State That Fuels Cell Cycle Progression upon Return to Growth. *Mol Biol Cell*. **21**, 1982–90, (2010).
82. Sinensky, M. Homeoviscous Adaptation—A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **71**, 522–25 (1974).