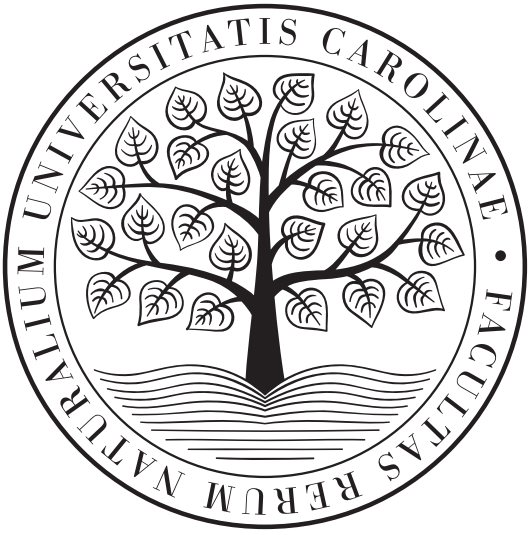
UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Pavlína Šliková

Role posttranslačních modifikací tubulinu v regulaci mikrotubulárních procesů
Roles of tubulin post-translational modifications in regulation of microtubule-based processes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.
Konzultant bakalářské 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 ....

Pavlína Šliková

Poděkování

Děkuji Iliovi Zhernovovi, Ph.D., RNDr. Zdeňkovi Lánskému, Ph.D. a RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za vedení mé práce.

Abstrakt

Mikrotubulární cytoskelet hraje zásadní roli v nejrůznějších buněčných pochodech, jako je vnitrobuněčný transport, buněčná motilita či segregace chromosomů při buněčném dělení. Tubulin, stavební jednotka mikrotubulů, prochází mnohými posttranslačními modifikacemi, které ovlivňují dynamiku mikrotubulů, jejich organizaci a interakci s dalšími proteiny. Porozumění tomu, jakou roli posttranslační modifikace hrají v zajištění rozmanitých funkcí a vlastností mikrotubulů, je klíčové k pochopení dynamiky mikrotubulárního cytoskeletu jako celku. Přesné mechanismy, jakými posttranslační modifikace na mikrotubulární cytoskelet působí, však nejsou zcela objasněny. V této práci byl zkoumán vliv přítomnosti posttranslačních modifikací na růst mikrotubulů a na jejich interakci s motorovým proteinem kinesinem-1. Pomocí fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem a interferenční reflekční mikroskopie bylo zjištěno, že vysoká míra posttranslačních modifikací na mikrotubulech snižuje délku jejich interakce s kinesinem, zatímco afinita kinesinu k mikrotubulům a průměrná rychlost, kterou se po nich pohybuje, se u vysoce a málo modifikovaných mikrotubulů významně neliší. Dále bylo zjištěno, že absence polyglutamylace na podjednotkách tubulinu vede k rychlejší polymerizaci mikrotubulů. Tyto výsledky ukazují, že posttranslační modifikace jsou důležitým regulátorem mikrotubulární dynamiky a interakce motorových proteinů s mikrotubuly.

Klíčová slova

cytoskelet, mikrotubuly, tubulin, posttranslační modifikace, polyglutamylace, molekulární motory, kinesin, fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem

Abstract

Microtubular cytoskeleton plays crucial roles during diverse cellular processes, such as intracellular transport, cell motility and chromosome segregation during cytokinesis. Tubulin, the building block of microtubules, undergoes numerous post-translational modifications which affect microtubular dynamics and organization as well as their interaction with associated proteins. Understanding the role post-translational modifications play in the diversification of functions and properties of microtubules is key for our comprehension of the dynamics of the complex microtubule cytoskeleton. However, mechanisms behind the effect of post-translational modifications on microtubule cytoskeleton are not fully understood. In this work, we focus on the influence of post-translational modifications on microtubule polymerization and interaction with molecular motor kinesin-1. Using total internal fluorescence and interference reflection microscopy techniques, we here show that high levels of post-translational modifications on microtubules decrease the time of microtubule-kinesin interaction whereas binding affinity and median velocity are not significantly different on modified and unmodified microtubules. Further, we show that the absence of polyglutamylation on tubulin isotypes leads to a faster microtubule polymerization. These results show that post-translational modifications are pivotal regulators of microtubule dynamics and interaction with motor proteins.

Keywords

cytoskeleton, microtubules, tubulin, post-translational modifications, polyglutamylation, molecular motors, kinesin, total internal fluorescence microscopy

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek 8

1. Úvod 9

2. Literární přehled 10

2.1 Cytoskelet – tubulin a mikrotubuly 10

2.1.1 Mikrotubulární cytoskelet a jeho role v buňce 10

2.1.2 Mikrotubulární dynamika 11

2.1.3 Tubulin 13

2.2 Posttranslační modifikace tubulinu 14

2.2.1 Význam posttranslačních modifikací tubulinu 14

2.2.2 Polyglutamylace 17

2.3 Mikrotubulární molekulové motory 20

2.3.1 Definice a funkce motorových proteinů 20

2.3.2 Kinesin-1 20

3. Cíle práce 23

4. Materiál a metody 24

4.1 Použité proteiny a chemikálie 24

4.2 Použité přístroje 25

4.3 Purifikace proteinů 25

4.4 Příprava mikrotubulů a kinesinu 25

4.5 Příprava vzorku 26

4.6 Fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem 27

4.7 Interferenční reflekční mikroskopie 29

4.8 Analýza obrazu 31

5. Vliv posttranslačních modifikací tubulinu na interakci molekulárního motoru kinesinu-1 s mikrotubuly 33

5.1 Uspořádání experimentu 33

5.2 Výsledky 34

5.2.1 Vazebná afinita 34

5.2.2 Motilitní parametry 35

6. Vliv polyglutamylace tubulinu na polymerizaci mikrotubulů 41

6.1 Uspořádání experimentu 41

6.2 Výsledky 42

7. Diskuse 44

8. Závěr 46

9. Literatura 47

Seznam použitých symbolů a zkratek

ATP	adenosintrifosfát
AU	arbitrární jednotka (angl. „arbitrary unit“)
BRB80	Brittonův-Robinsonův pufr (angl. „Britton–Robinson buffer“)
CCP	cytosolická karboxypeptidasa (angl. „cytosolic carboxypeptidase“)
DTT	dithiothreitol
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
GDP	guanosindifosfát
GFP	zelený fluorescenční protein (angl. „green fluorescent protein“)
GMPCPP	guanylyl-(α,β)-methylen-difosfonát
GTP	guanosintrifosfát
HeLa	imortalizovaná linie lidských epiteliálních buněk (izolovaná z karcinomu Henrietty Lacksové, odtud název)
IRM	interferenční reflekční mikroskopie
IS	interval spolehlivosti
kin-1	kinesin-1
MAP	proteiny asociované s mikrotubuly (angl. „microtubule associated proteins“)
MT	mikrotubuly
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (angl. „messenger ribonucleic acid“)
PBS	fosfátový pufr (angl. „phosphate-buffered saline“)
PIPES	piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina)
rkin-430	rekombinantní kinesin-1 zkrácený na aminokyseliny 1 - 430
RNA	ribonukleová kyselina (angl. „ribonucleic acid“)
TTLL	rodina enzymů (angl. „tubulin tyrosine ligase-like protein“)
T7KO	inaktivace enzymu TTLL7 („tubulin tyrosine ligase-like 7 knockout“)
T1T7KO	dvojitá inaktivace enzymů TTLL1 a TTLL7 („tubulin tyrosine ligase-like 1 and 7 knockout“)
TIRF	fluorescence s úplným vnitřním odrazem (angl. „total internal reflection fluorescence“)
WT	přirozená forma tubulinu (angl. „wild type“)

1. Úvod

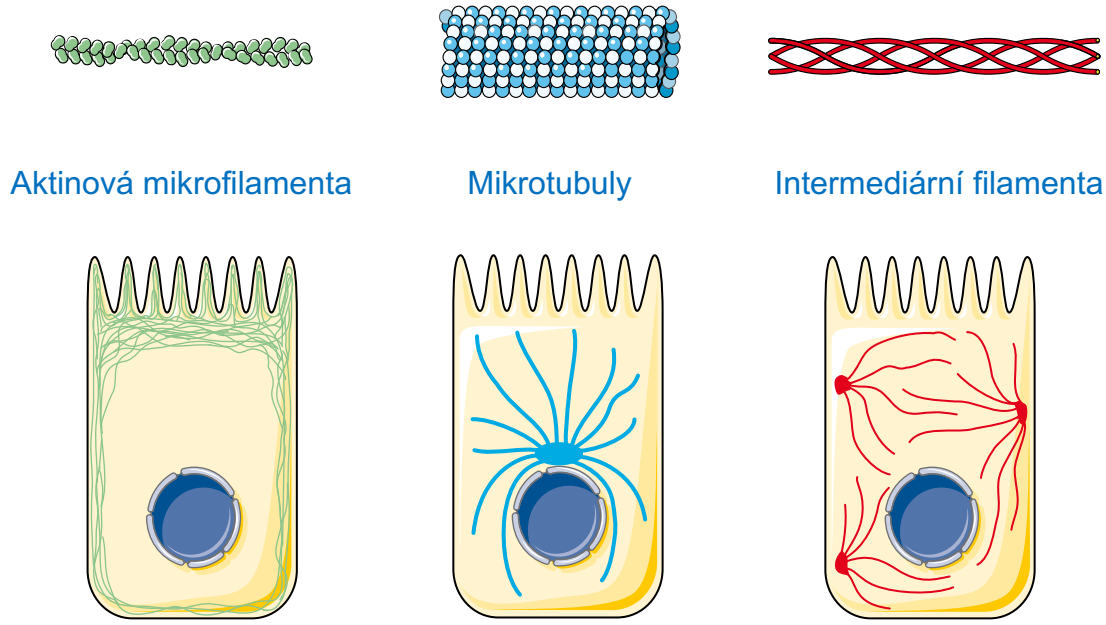
Mikrotubulární cytoskelet propojuje všechny oblasti a všechny komponenty v buňce a díky své schopnosti neustále se přizpůsobovat okolním podmínkám a aktuálním požadavkům umožňuje pochody, které jsou podstatou života buňky a její úlohy v organismu. V živých buňkách mikrotubuly interagují s mnohými molekulárními motory a dalšími proteiny regulujícími mikrotubulární dynamiku. Právě to, s jakými konkrétními proteiny bude mikrotubulární cytoskelet v daném místě spolupracovat, udává, co se v tomto místě bude dít. Jaké jsou ale signály pro jednotlivé úkony? Mechanismy stojící za regulací pochodů spojených s mikrotubulárním cytoskeletem nejsou dosud zcela objasněny a zůstávají předmětem intenzivního výzkumu. Posttranslační modifikace tubulinu, stavební jednotky mikrotubulů, se zdají být důležitým regulátorem vnitrobuněčného transportu i celkové dynamiky cytoskeletu. Tato práce odhalí vliv přítomnosti posttranslačních modifikací tubulinu na pohyb molekulárního motoru kinesinu-1 podél vláken a vliv polyglutamylace na polymerizaci mikrotubulů.

2. Literární přehled

2.1 Cytoskelet – tubulin a mikrotubuly

2.1.1 Mikrotubulární cytoskelet a jeho role v buňce

Vnitřní organizace, tvar, motilita a životní cyklus eukaryotické buňky jsou kontrolovány komplexní sítí polymerních proteinových vláken, nazývanou cytoskelet, která zahrnuje aktinová mikrofilamenta, intermediární filamenta a mikrotubuly. Všechny tyto tři struktury cytoskeletu spolu úzce kooperují a kontrolují strukturu, mechaniku i dynamiku buňky. Mikrotubuly se svým vnějším průměrem 25 nm představují největší komponentu cytoskeletu a ve všech buňkách plní celou řadu významných funkcí. Jsou zásadní pro strukturu buňky, její polaritu a dělení, rozmístění organel i pro vnitrobuněčný transport. Skládají se do svazků axonemy řasinek a bičíků, centrioly centrosomů a marginálního svazku trombocytů. Tubulin, ze kterého jsou mikrotubuly sestaveny, je napříč všemi těmito strukturami a napříč všemi organismy z genetického hlediska vysoce konzervovaný protein. O to zajímavější je, jakým způsobem se mikrotubulární systémy adaptují k plnění tak rozličných úkolů, které jim v buňce náleží.



Obrázek 1 *Komponenty cytoskeletu a jejich rozmístění v buňce. Převzato a upraveno [1].*

Mikrotubuly jsou dlouhé rigidní polymery α,β podjednotek tubulinu, které jsou důležitou strukturní a funkční komponentou eukaryotního cytoskeletu. Dimery α- a β-tubulinu se spojují podélnými interakcemi typu „hlava k ocasu“ do protofilament. Třináct těchto protofilament se pomocí interakcí postranních řetězců tubulinů laterálně uskupuje do dutého válečku – mikrotubulu. Tubulinové dimery dávají mikrotubulům polární strukturu; plus konec mikrotubulu je zakončován β-tubulinem, minus konec α-tubulinem. Sousední filamenta jsou mírně stočená, díky čemuž mají mikrotubuly levotočivou helikální strukturu.

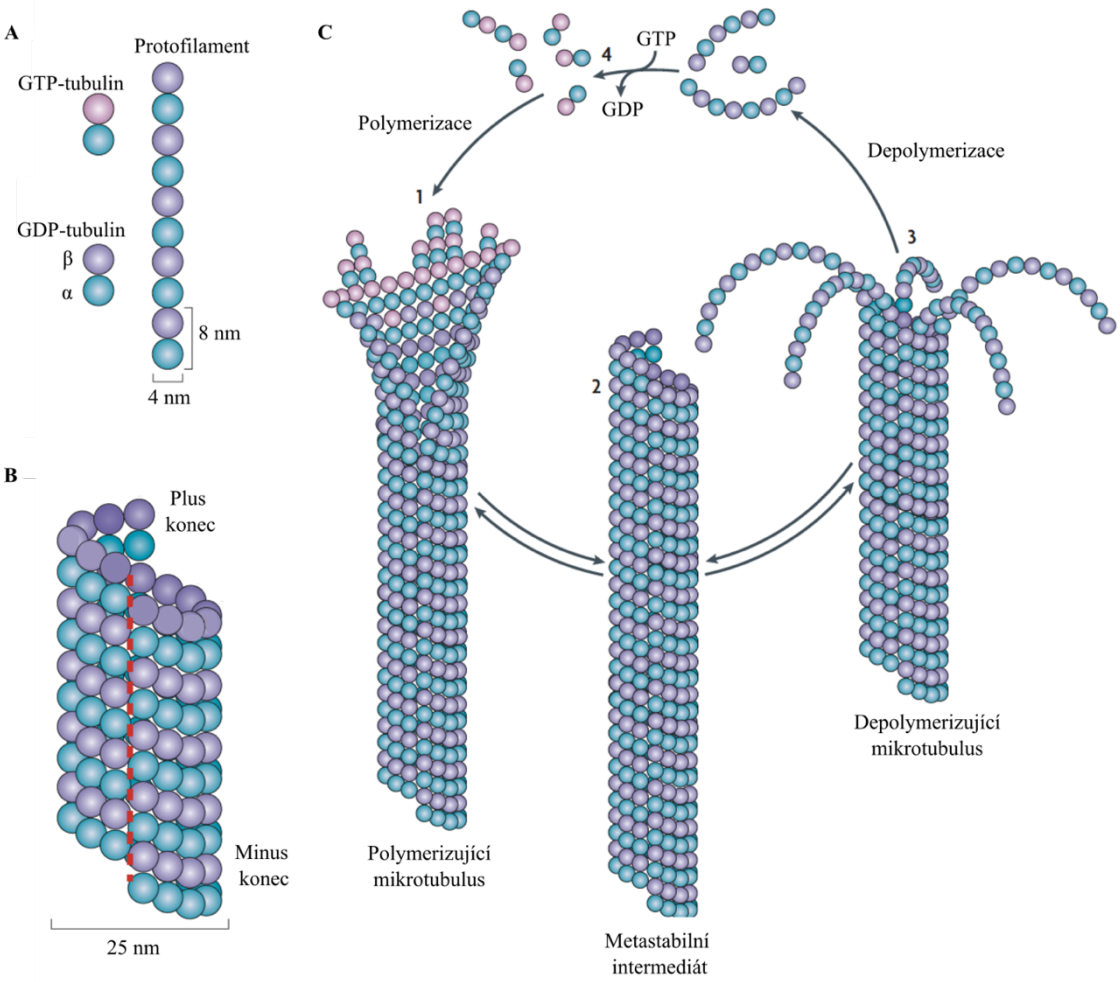
Heterogenitu mikrotubulů udávají tři hlavní faktory: geneticky daná struktura α- a β-tubulinových izotypů posttranslační modifikace tubulinu, které na povrchu mikrotubulů vytváří vzor známý jako „tubulinový kód“ [2] a interakce s dalšími proteiny zvanými *proteiny asociované s mikrotubuly* (MAP, z anglického „microtubule associated proteins“).

Příkladem buňky, ve které jsou mikrotubuly nepostradatelné pro dosažení vysokého stupně morfologické a funkční spletitosti, jsou neurony. Tvorba a údržba složité morfologie neuronů (dlouhé axony s rozvětvenými dendrity) úzce závisí na mikrotubulárním cytoskeletu [3]. Jedním z hlavních úkolů mikrotubulů v diferencovaných neuronech je doručení nákladů, jako jsou organely (mitochondrie, lysosomy, endosomy), proteiny či mRNA, ke specifickými cílovým místům v axonech či dendritech [4].

2.1.2 Mikrotubulární dynamika

Mikrotubuly jsou heterogenní ve své délce a zároveň velmi dynamické. Prochází cykly polymerizace a rychlé depolymerizace, a tedy neustále se svým růstem přizpůsobují okolním podmínkám ve vysoce uspořádaném a řízeném procesu. Neustálé kolísání mezi fázemi polymerizace a depolymerizace tvoří klíčovou vlastnost pro mnoho funkcí mikrotubulů – dynamickou nestabilitu. Tu buňka využívá pro vyvíjení sil např. během segregace chromosomů v mitóze [5]. Náhlý přechod polymerizujícího mikrotubulu do fáze depolymerizace, anglicky „catastrophe“, a opačný přechod z fáze polymerizace do fáze depolymerizace, anglicky „rescue“, zůstávají nejméně pochopeným aspektem dynamické nestability [6].

Rozpustné dimery α-tubulin-β-tubulin polymerizují do mikrotubulů v aktivním procesu spotřebovávajícím GTP. Dynamické mikrotubuly tak rostou přídavkem dimerů tubulinu na konec polymeru pod stabiilizační GTP čepičkou. Navazující se GTP-tubuliny jsou hydrolyzovány a na polymerizovaném mikrotubulu jsou vázány GDP-polymery [7], které jsou pak při depolymerizaci opět fosforylovány na GTP. Nově zabudované GDP-dimery jsou po uvolnění fosfátu v nevýhodné napjaté pozici. Pokud se stane, že k hydrolýze dojde rychleji než k přidání tubulinového dimeru, polymerizující konec ztratí GTP čepičku, čímž se mikrotubulus otevře v místě, kde jsou laterální kontakty mezi tubuliny slabé a dojde k náhlé depolymerizaci (anglicky „catastrophe“).



Obrázek 2 *Dynamika mikrotubulu. Převzato a upraveno [8].* ***A*** *Dimery α-,β-tubulinu se polárními vazbami spojují do protofilament.* ***B*** *Mikrotubulus je dutý váleček tvořený třinácti protofilamenty s rychleji polymerizujícím plus koncem a pomaleji polymerizujícím minus koncem.* ***C*** *Volné GTP-dimery tubulinu polymerizují do protofilament, ve kterých je vázán GDP-tubulin* ***(1)****. Polymerizovaný mikrotubulus je metastabilní intermediát* ***(2)****, jehož konce mohou kdykoli přejít z fáze polymerizace do fáze depolymerizace* ***(3)*** *a naopak. GDP na depolymerizovaném tubulinu je fosforylován na GTP* ***(4)*** *a GTP-tubulin je opět k dispozici pro polymerizaci.*

2.1.3 Tubulin

Stavební jednotkou mikrotubulů jsou heterodimery tubulinu složené z α a β podjednotek. α- a β-tubuliny jsou v eukaryotech evolučně konzervované – sdílejí přes čtyřicet procent své sekvence a mají téměř stejnou sekundární a terciární strukturu [9]. Inkorporace různých izotypů tubulinu do specializovaných mikrotubulů [10] může regulovat jejich vlastnosti a funkce. Je to ale typ regulace málo dynamický, neboť izotypy mohou být do mikrotubulů zařazeny jen při *de novo* polymerizaci. Hlavním zdrojem rozdílnosti ve struktuře tubulinu jsou ale jeho posttranslační modifikace.

Mnohobuněčné organismy mají několik genů kódujících tubulin. Každá tubulinová strukturní jednotka má kompaktně složené „tělo“ a vnitřně neuspořádaný, negativně nabitý C-konec [11]. Tělo tubulinu se účastní intradimerických a interdimerických interakcí při spojování do protofilament. Dimery obsahující dva C-konce utváří vnější povrch mikrotubulů a změny na těchto vyčnívajích C-koncích udávají charakter dané oblasti mikrotubulu – interakce s molekulárními motory a s proteiny asociovanými s mikrotubuly. C-konce nejsou z důvodu potřeby udržet skládání dimerů a funkční polymerizaci mikrotubulů evolučně tolik svázány jako zbytek struktury tubulinu. Proto se právě na nich mohou projevovat variace v sekvenci tubulinu.

Porozumění tomu, jak buňka využívá diverzitu tubulinu, je klíčové k pochopení buněčné fyziologie i patogeneze. Sloučeniny interferující s funkcí tubulinu jsou používány při léčbě mnoha chorob jako je rakovina, infekční či neurodegenerativní onemocnění, ale také v základním výzkumu.

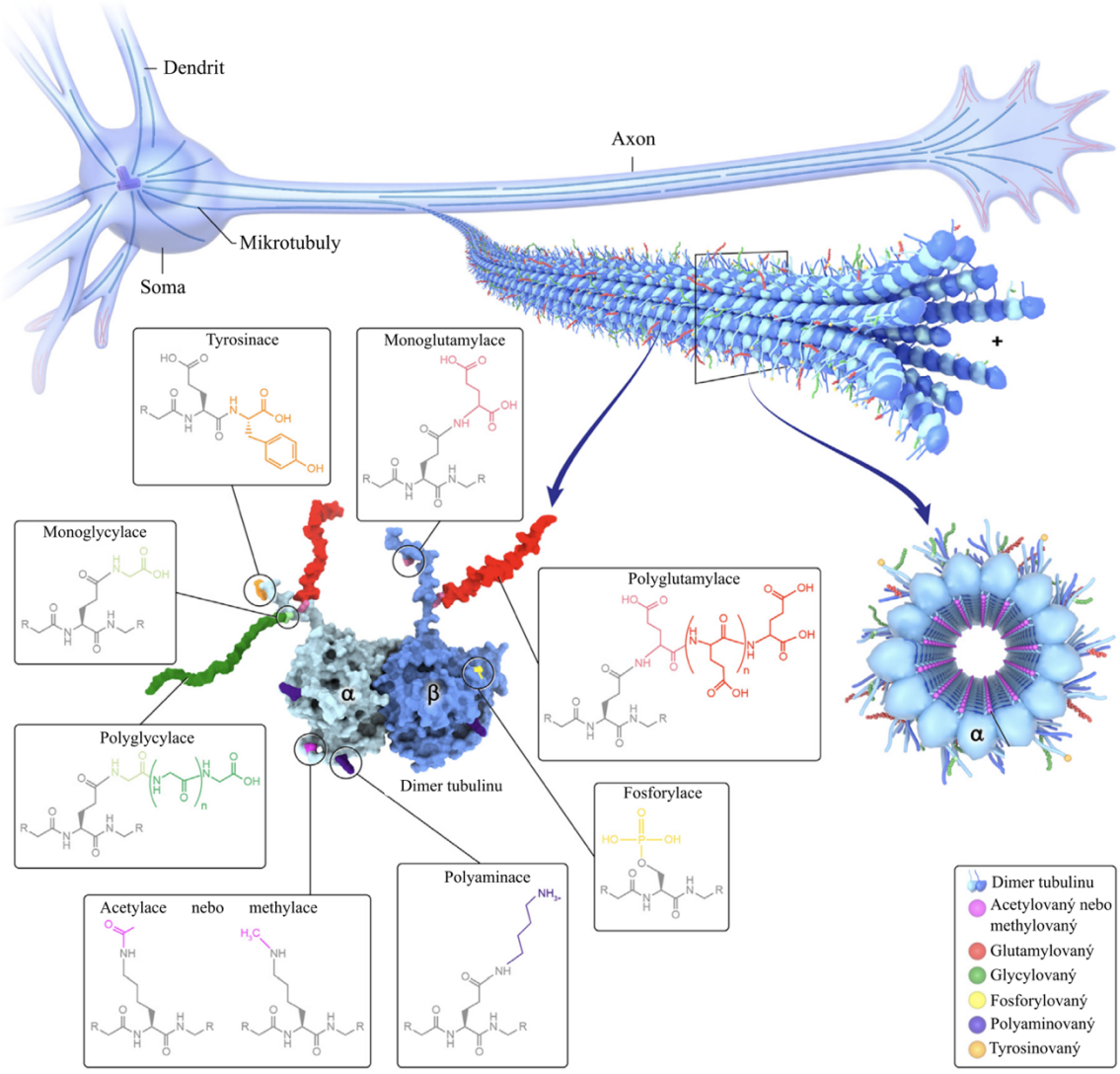
Mimořádná vlastnost tubulinu spočívá v jeho kapacitě vázat celou řadu regulátorů, které následně modulují dynamiku i funkci mikrotubulů. Vazebná místa tubulinu pro tyto regulátory jsou ovlivňovány posttranslačními modifikacemi, které tak na mikrotubulárních drahách vytváří jakési „značky“ pro navigaci molekul putujících cytoskeletální sítí.

2.2 Posttranslační modifikace tubulinu

2.2.1 Význam posttranslačních modifikací tubulinu

Posttranslační modifikace tubulinu ovlivňují nejen dynamiku mikrotubulů, ale taktéž jejich organizaci a interakci s dalšími buněčnými komponentami. Posttranslační modifikace tubulinu byly nalezeny ve všech buňkách, které obsahují mikrotubuly [12], obzvláště různorodé jsou v neuronech [13]. Nezodpovězenou otázkou zůstává poměr tubulinů s danou modifikací, distribuce modifikací podél jednoho mikrotubulu nebo mezi různými mikrotubuly a funkční důsledky mnohých posttranslačních úprav. Přiřazování biologické funkce určité posttranslační modifikaci je komplikováno diverzitou možností její formy výskytu – modifikace mohou být nerovnoměrně rozmístěny na mikrotubulech, rozptýleny nebo naopak koncentrovány v určité oblasti mikrotubulu, rozdílné může být také umístění na tubulinovém dimeru, mohou se vyskytovat jak samostatně, tak i spolu s dalšími úpravami.

Neuronální mikrotubuly jsou specifické vysokou mírou posttranslačních modifikací. Biochemické a imunologické analýzy v minulosti prokázaly obohacení detyrosinovaným [14], acetylovaným [15] a polyglutamylovaným [16,17] tubulinem.



Obrázek 3 *Posttranslační modifikace přítomné na neuronálních mikrotubulech. Převzato a upraveno [18].*

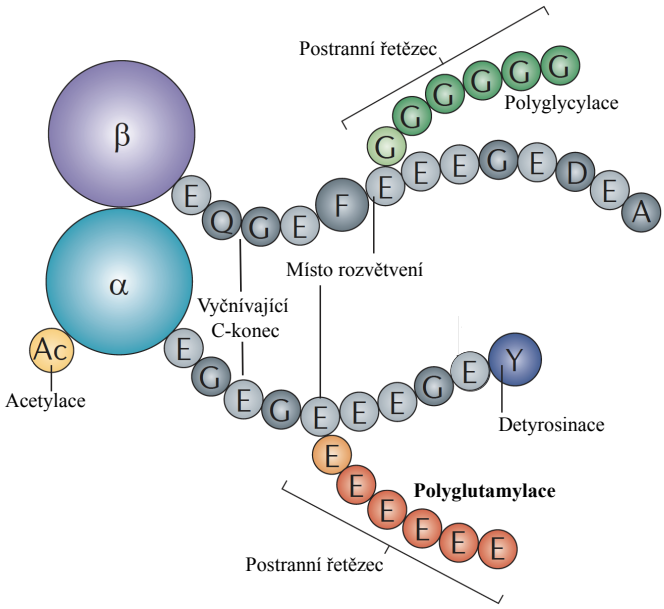
Zdá se, že posttranslační modifikace tubulinu ovlivňují téměř všechny specifické funkce mikrotubulů, ať už významně či jen jako doprovodné faktory. Většina známých posttranslačních modifikací má významnou roli v řasinkách a bičících, kde ovlivňují mikrotubulární struktury axonemy. Výjimečně hojně zastoupeny jsou také v neuronální tkáni. Význam posttranslačních modifikací však zůstával mlhavý, dokud nebyly identifikovány enzymy, které je způsobují. Identifikace těchto enzymů v modelových organismech představuje pokrok v porozumění fyziologickým úlohám posttranslačních úprav a jejich spojitosti s patologiemi – ty mohou být způsobeny mutacemi v genech kódujících enzymy, které úpravy tubulinu katalyzují. Biologické efekty jednotlivých úprav tubulinu jsou na první pohled slabé, během výzkumů byly často přehlédnuty, ale

mohou být významnými rizikovými faktory pomalu se rozvíjejících onemocnění a jsou důležité pro to, jak se díváme na úlohu cytoskeletu v patogenezi. Široká škála posttranslačních modifikací (ať už projev jedné nebo kombinace) může však vytvořit chemické rozdíly tak veliké, že už biologickou odpověď vyvolají [19]. Například zvýšená detyrosinace tubulinu v neuronech vede *in vivo* ke zrušení preference kinesinu-1 přejít na axony, což naznačuje, že právě tyrosinace by mohla stát za navigací kinesinu-1 na axony [20]. *In vitro single molecule* experimenty tuto hypotézu však nepotvrdily – zdá se tedy, že za biologickým projevem bude stát kombinace několika faktorů, které do studií *in vitro* zařazeny nebyly. Je tak vhodné studovat jak jednotlivé posttranslační modifikace samostatně, tak i modely zahrnující jejich kombinace.

Vzhledem k tomu, že mikrotubuly jsou zcela zásadní pro všechny savčí buňky, deregulace modifikací tubulinu mohou vést k řadě patologií – neurodegenerativní onemocnění, poruchy krevních destiček, rakovina (buněčné dělení), ciliární poruchy. Víme například, že mutace genu způsobujícího polyglutamylaci v Purkyňových buňkách vede k nahromadění polyglutamátových zbytků v oblastech nervového systému narušených degenerací [21,22].

Posttranslačně modifikované mikrotubuly se vyznačují svou stabilitou a dlouhověkostí. Například detyrosinace je v mnoha buněčných typech přítomna ve zvýšené míře na dlouhověkých mikrotubulech [23]. Detyrosinace však nestabilizuje mikrotubuly sama o sobě [24]. Je známo, že mikrotubuly depolymerizující kinesiny-13 preferenčně depolymerizují ty mikrotubuly, které jsou naopak tyrosinované [25].

Tubulin prochází řadou posttranslačních modifikací, z nichž většina může být jak na α, tak β podjednotce. Enzymatické řízení těchto úprav je využíváno ke studiu jejich vlivu na buněčné pochody. Lokalizace posttranslační modifikace na tubulinu určuje, jaký vliv bude daná úprava mít na funkci mikrotubulu. Mnohé posttranslační modifikace jsou přítomny na C-konci α- i β-tubulinu [26,27]. Jelikož C-konce vyčnívají na vnějším povrchu mikrotubulů a jsou klíčovým místem interakce s MAP, byly navrženy hypotézy, že detyrosinace, glutamylace a glycylace by mohly regulovat interakci a aktivitu MAP a molekulárních motorů [19,28,29]. Posttranslační úpravy nemusí být přítomny jen na flexibilních koncích, ale také na zbytcích zakomponovaných v těle tubulinu [30].



Obrázek 4 *Schematické znázornění některých posttranslačních modifikací na α-β-tubulinovém dimeru. Polyglutamylace a polyglycylace jsou specifické pro vyčnívající C-konec, zatímco acetylace je zabudována v těle tubulinu. Převzato a upraveno [31].*

Tubulin používaný v experimentálních studiích je nejčastěji izolován z neuronální tkáně prasat nebo myší a obsahuje nám neznámé množství různých typů posttranslačních modifikací. Pro lepší kontrolu nad výzkumem se tak stává klíčovým využití nástrojů genového inženýrství. Zejména genetické úpravy u myší, umožňující regulaci pomocí inaktivace enzymů katalyzujících jednotlivé posttranslační modifikace tubulinu, jsou důležitým prostředkem ve výzkumu mikrotubulů a mikrotubulárních systémů. Nejhojněji zastoupenou modifikací tubulinu v nervovém systému dospělého savčího jedince je (poly)glutamylace [32,33]. Ta má v neuronech významnou roli, nejspíše reguluje motorové proteiny a MAP.

2.2.2 Polyglutamylace

Polyglutamylace je progresivní adice glutamátů na γ-karboxylovou skupinu jednoho nebo více glutamátových zbytků v blízkosti C-konce polymerizovaného tubulinu [16,34]. Zvýšené množství polyglutamátových řetězců nacházíme v centriolách centrosomů a na dělícím vřeténku v buňkách ve fázi dělení. V neuronech je polyglutamylace hojně přítomna zejména během diferenciace. Udržuje homeostázu neuronů a zajišťuje axonální transport na dlouhé vzdálenosti a nervové spojení skrze synaptický přenos.

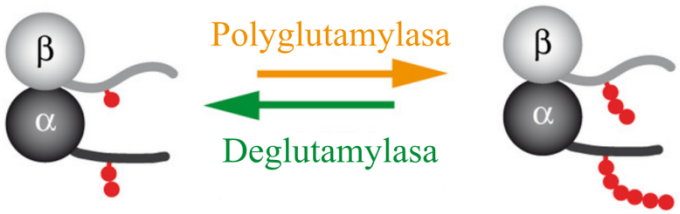
U řasinek a bičíků se polyglutamylace vyskytuje především v axonemálních mikrotubulech a zajišťuje jejich motilitu, roli hraje i ve spermatogenezi a pohyblivosti spermií. Nedostatečná polyglutamylace může narušit motilitu řasinek, naopak nadměrná glutamylace tubulinu může řasinky destabilizovat a zkracovat [35].

(Poly)glutamylace je oproti jiným posttranslačním modifikacím heterogenní v tom, že se může vyskytovat jak na α-, tak na β-tubulinu a může tvořit jak krátké, tak dlouhé řetězce. α- i β-tubulin navíc mají několik potenciálně modifikovatelných míst [36,37].

Stejně jako mnohé další posttranslační modifikace může polyglutamylace ovlivňovat interakce proteinů s mikrotubuly [38] a stimuluje enzymatické štěpení mikrotubulů [39]. Dále ovlivňuje motilitu motorových proteinů kinesinu-1 [40] a dyneinu [41].

Polyglutamylace tubulinu je posttranslační modifikace mikrotubulárního cytoskeletu, která je zaváděna enzymaticky pomocí enzymů z rodiny tubulintyrosinligase podobných proteinů (TTLL, z anglického „tubulin tyrosine ligase-like“) [42]. Zpětná reakce, tedy deglutamylace, je katalyzována deglutamylasami z rodiny cytosolických karboxypeptidas (CCP, z anglického „cytosolic carboxypeptidase“). Specifičnost glutamylas je dána jejich preferencí pro izotypy α- nebo β-tubulinu nebo pro iniciaci či elongaci glutamátových řetězců. V myších modelech bylo ukázáno, že polyglutamátové řetězce jsou na α-tubulin zaváděny glutamylasou TTLL1 [43] a na β-tubulin glutamylasou TTLL7 [44]. Nadměrné nahromadění polyglutamylace v neuronech způsobuje jejich degeneraci a narušuje axonální transport [45].

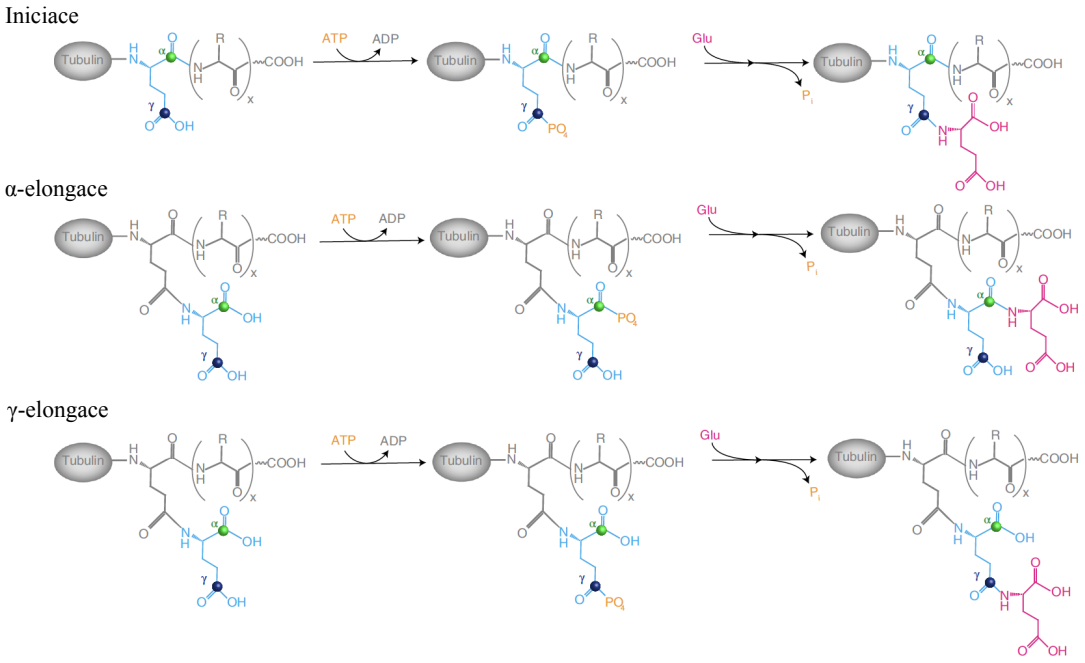
U myší, kterým chybí deglutamylasa CCP1, se polyglutamylasa TTLL1 účastní hyperglutamylace způsobující degeneraci Purkyňových buněk a myelinovaných axonů periferních nervů [45]. Naopak ztráta TTLL1 způsobuje sníženou motilitu dýchacích řasinek [46] či infertilitu myších samců [47]. Fyziologické projevy po ztrátě či zvýšení aktivity enzymů spojených s glutamylací tubulinu jsou důkazem významu posttranslačních modifikací v homeostáze organismů.



Obrázek 5 *Enzymatická regulace polyglutamylace tubulinu. Převzato a upraveno [48].*

Enzymatická aktivita TTLL enzymů byla poprvé charakterizována v neuronální tkáni, kde je polyglutamylace nejhojněji zastoupenou posttranslační modifikací [49]. Prvotní biochemické studie enzymatické aktivity neuronální polyglutamylasy ukázaly zvýšení polyglutamylace během brzkých stádií vývoje mozku, kdy je cytoskelet velmi dynamický a vyžaduje rychlý obrat mikrotubulů, a tedy i jejich posttranslačních modifikací. V pozdějších stádiích vývoje mozku jsou stabilní mikrotubuly vysoce polyglutamylovány, zatímco celková aktivita enzymu je již nižší [50].

Enzymy s TTLL doménou přidávají aminokyselinové zbytky na tubulin během RNA-independentní enzymatické reakce. TTLL1 a TTLL7 iniciují přidávání glutamylového postranního řetězce přidáním prvního postranního zbytku na γ-karboxylovou skupinu glutamátu zakomponovaného v tubulinu přes isopeptidovou vazbu. Takto iniciovaný postranní řetězec může být aktivitou enzymu TTLL7 dále prodloužen, čímž vniká polyglutamátový řetězec [42,51].



Obrázek 6 *Glutamylace probíhá ve dvou krocích: iniciace a elongace. Iniciace sestává z adice glutamátových zbytků na γ-karboxylovou skupinu glutamátu polypeptidového řetězce. Při elongaci je několik dalších glutamátů přidáváno na α- nebo γ-karboxylovou skupinu glutamátu zavedeného během iniciace. Převzato a upraveno [52].*

Rozsah posttranslačních modifikací tubulinu může být kontrolován na několika úrovních, například přítomností enzymů. Pro výzkumné účely může být enzymatická aktivita inhibována inaktivací příslušného genu pomocí nástrojů genového inženýrství.

Vzhledem k tomu, kolik zásadních funkcí mikrotubuly plní v neuronech, není překvapením, že mnohá neurodegenerativní onemocnění souvisí právě s mikrotubuly a jejich asociovanými proteiny [53]. Přesné cytoskeletální mechanismy, které jsou v těchto onemocněních narušovány, však stále nejsou zcela objasněny. Komplexita tubulinového kódu na povrchu mikrotubulů a dopad změn v jejich struktuře na buněčné pochody pouze začínají být odhalovány.

2.3 Mikrotubulární molekulové motory

2.3.1 Definice a funkce motorových proteinů

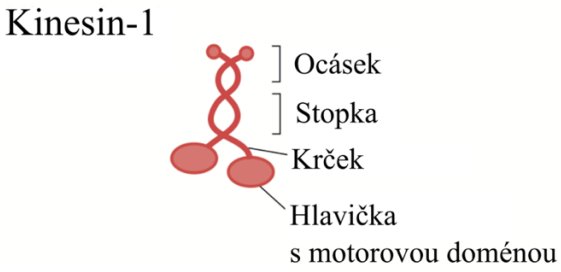
Dynamika a funkce mikrotubulů jsou modulovány interakcemi s asociovanými proteiny či s molekulovými motory. Dvěma hlavními rodinami mikrotubulárních motorových proteinů jsou kinesiny a dyneiny. Kinesiny se pohybují po mikrotubulu směrem k plus konci, dyneiny se naopak pohybují k minus konci, přičemž oba tyto proteiny fungují za hydrolýzy ATP. Rodina kinesinů zahrnuje též nepohyblivé proteiny, které mohou například depolymerizovat mikrotubuly. Dyneiny jsou součástí axonem v pohyblivých řasinkách a bičících, kde vytváří sílu pohánějící jejich pohyb.

Molekulové motory vytvářejí síly, které mohou být buňkou využity k nejrůznějším účelům, zejména pro vnitrobuněčný transport. V neuronech jsou náklady transportovány od těla buňky až k synapsi na dlouhou vzdálenost [54]. Kromě transportních funkcí motory generují síly také pro pohyb řasinek [55] a pro samoorganizaci svazků mikrotubulů mitotického vřeténka [56].

2.3.2 Kinesin-1

Kinesiny jsou rozmanitou rodinou ATP-dependentních motorových proteinů. Transportují náklady podél mikrotubulů a ovlivňují samotnou organizaci mikrotubulárních sítí [57]. Pohybují se směrem k plus konci mikrotubulu, výjimkou je však kinesin-14, který se pohybuje ve směru opačném. Všechny kinesiny mají společnou motorovou doménu o velikosti přibližně 40 kDa, která jim poskytuje širokou škálu motilitních a remodelačních mechanismů. Konkrétní mechanismy závisí na drobných změnách ve struktuře motorové domény.

Všechny kinesiny sdílí stejnou základní doménovou organizaci: motorová doména s vazebnými místy pro ATP a mikrotubuly (hlavička), alfa-helikální dimerizační doména (krček), stopka a ocásek, který slouží jako receptor a interaguje s vezikulami nebo organelami přes lehké řetězce [58].



Obrázek 7 *Struktura kinesinu-1. Převzato a upraveno [59].*

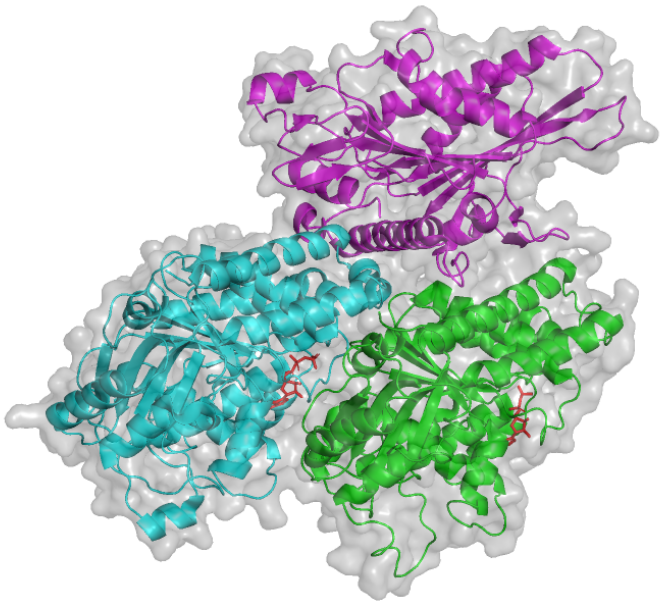
Pozice motorové domény se u jednotlivých typů kinesinů liší, v případě kinesinu-1 se nachází na N-konci [60] . Kinesiny, které mají motorovou doménu na N-konci pohánějí řízený transport k plus konci; motorová doména na C-konci pohání transport k minus konci. Kinesiny s motorovou doménou uprostřed proteinu depolymerizují mikrotubuly.

Kinesiny často slouží k transportu navázaného nákladu, který je zajištěn pohybem motorového proteinu podél mikrotubulů. Přesný mechanismus tzv. kráčení kinesinů není zcela objasněn. Známo však je, že ATP je po vazbě na motorovou doménu hydrolyzováno a uvolněná energie je použita na změnu konfigurace proteinu, čímž se kinesin posune přibližně o 8 nm [61]. Plynulý pohyb podél mikrotubulů je zajištěn opakováním tohoto „kroku“.

Kinesiny jsou základním aktérem rychlého axonálního transportu [62], slouží například k transportu mitochondrií. Transport mitochondrií v různých buněčných typech různých tkání je prostorově regulován tak, aby odpovídal na lokální požadavky potřeby produkce energie a signalizace vápenatými ionty, která je zvláště důležitá v neuronech z důvodu jejich délky a potřeby transportu na velkou vzdálenost [63]. Rychlý axonální transport s rychlostmi mezi 0,25 – 1 $\mu m \cdot s^{-1}$ je poháněn kinesiny v anterográdním směru od těla buňky k distálním částem axonu a k synapsi. Retrográdní transport pak závisí na dyneinech, které se pohybují směrem k tělu buňky, k minus konci mikrotubulu [64]. Tento dvousměrný transport mitochondrií podél axonálních

mikrotubulů využívá ve všech eukaryotních buňkách stejné molekulární motory a stejné principy. V kontrastu s uniformní polaritou v axonech obsahují dendrity mikrotubuly se smíšenou polaritou, přičemž úhrnný počet plus a minus konců na povrchu buňky je zhruba stejný. Z tohoto důvodu určuje orientace mikrotubulárních „kolejí“ směr transportu a druh zúčastněného motoru [65,66].

Kinesin-1, první objevený protein z rodiny kinesinů, je heterotetramerický motorový protein složený ze dvou identických motorových podjednotek a dvou lehkých řetězců. Rozvoj analýzy na úrovni jedné molekuly a zjištění, že jednotlivé molekuly kinesinu-1 se pohybují procesivně podél mikrotubulů [67], umožnily měření kroků a sil jediného motoru. Pozdější studie ukázaly, že kinesin-1 hraje důležitou roli v transportu vezikul v neuronálních buňkách [68] a dnes je považován za nejdůležitější motorový protein anterográdního mitochondriálního transportu v axonech [69].



Obrázek 8 *Zobrazení motorové domény kinesinu na tubulinovém dimeru vytvořené v softwaru PyMOL. Šedě je zobrazen povrch komplexu, barevně jsou rozlišeny jednotlivé proteiny: modře α-tubulin, zeleně β-tubulin, magentou těžký řetězec kinesinu-1. Červeně jsou zobrazeny molekuly GDP na β-tubulinu a GTP na α-tubulinu. PDB kód 3J8X, α- a β-tubulin pochází z prasete divokého, kinesin-1 z lidských buněk, struktury byly vyřešeny pomocí kryoelektronové mikroskopie [70].*

3. Cíle práce

Tato práce se zaměřuje na studium mikrotubulárních procesů v *in vitro* rekonstituovaných systémech. Cílem práce je pomocí fluorescenční mikroskopie úplného odrazu a interferenční reflekční mikroskopie sledovat:

1. Vliv přítomnosti posttranslačních modifikací na pohyb molekulárního motoru kinesinu-1 podél mikrotubulů
2. Vliv polyglutamylace na polymerizaci mikrotubulů

4. Materiál a metody

4.1 Použité proteiny a chemikálie

ATP	Jena Bioscience, Německo
DTT	Sigma-Aldrich, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, USA
Glukosa	Sigma-Aldrich, USA
Glukosa katalasa	Sigma-Aldrich, USA
Glukosa oxidasa	Sigma-Aldrich, USA
GMPCPP	Jena Bioscience, Německo
GTP	Jena Bioscience, Německo
Kasein	Sigma-Aldrich, USA
KOH	Sigma-Aldrich, USA
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich, USA
Monoklonální protilátka proti biotinu	Sigma-Aldrich, USA
Monoklonální protilátka proti β-tubulinu	Sigma-Aldrich, USA
PBS	Sigma-Aldrich, USA
PIPES	Sigma-Aldrich, USA
Pluronic F127	Sigma-Aldrich, USA
Polysorbát-20	Sigma-Aldrich, USA
Tubulin:	
Biotinylovaný tubulin	Cytoskeleton Inc., USA
HeLa tubulin	Carsten Janke Laboratory, Institut Curie, Paříž, Francie
HiLyte647-tubulin	Cytoskeleton Inc., USA
Rhodamin-tubulin	Cytoskeleton Inc., USA
WT, T7KO, T1T7KO tubulin	Carsten Janke Laboratory, Institut Curie, Paříž, Francie
Voda nanopure	GORO, Česká republika

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy LAG 124i	VWR International, USA
Centrifuga Microfuge® 18 Centrifuge	Beckman Coulter, USA
s vestavěným rotorem MM-TB-001	Beckman Coulter, USA
Kamera sCMOS ORCA-flash 4.0 LT	Hamamatsu Photonics, Japonsko
Lasery LU-N4/N4S	Nikon, Japonsko
LED lampa Intensilight C-HGFIE	Nikon, Japonsko
Magnetické míchadlo s ohřevem RCT basic	IKA, Německo
pH metr inoLab® pH 720	WTW, Česká republika
Stolní centrifuga Z 100 M	Hermle, Německo
Tepelný inkubátor Thermo-Shaker	UniEquip, Německo
Tělo mikroskopu Ti-E Eclipse	Nikon, Japonsko

4.3 Purifikace proteinů

Neuronální tubulin byl purifikován z mozků prasat dle [71]. HeLa tubulin a myší neuronální tubuliny (přirozená forma, inaktivace enzymu TTLL7 a dvojitá inaktivace enzymů TTLL1-TTLL7) byly dodány z laboratoře Carstena Jankeho (Institut Curie, Paříž). Rekombinantní kinesin-1 byl purifikován dle protokolu uvedeného v *Příloze 1*.

4.4 Příprava mikrotubulů a kinesinu

Mikrotubuly byly polymerizovány *in vitro* z tubulinových dimerů připravených dle předchozího odstavce. Rhodaminem značený tubulin byl připraven smísením vlastního izolovaného tubulinu s rhodamin-tubulinem v hmotnostním poměru 5 : 1. Tubulin značený fluorescenční značkou HiLyte647 byl připraven smísením vlastního izolovaného tubulinu s HiLyte647-tubulinem v hmotnostním poměru 20 : 1. Biotinylovaný tubulin byl připraven smísením vlastního izolovaného tubulinu s biotinylovaným tubulinem v hmotnostním poměru 50 : 1.

Mikrotubuly byly polymerizovány v pufru BRB80 (PIPES 80 mmol·dm^{-3}, $MgCl_2$ 1 mmol·dm^{-3}, EGTA 1 mmol·dm^{-3}, pH 6,8 upraveno KOH) s GMPCPP o koncentraci 300 μmol·dm^{-3} z tubulinu o koncentraci 72,7 μmol·dm^{-3}. GMPCPP je pomalu

hydrolyzující analog GTP používaný k přípravě stabilních mikrotubulů, které při laboratorní teplotě samy nedepolymerizují. Mikrotubuly byly ponechány polymerizovat 30 min při 37 °C a poté byly centrifugovány po dobu 5 min při 14 000 × *g*. Po odebrání supernatantu byla peleta rozpuštěna v pufru BRB80.

V experimentu zkoumajícím interakci kinesinu-1 s mikrotubuly (oddíl *5*) byl kinesin-1 (rkin-430-GFP o koncentraci 79,4 mol·dm^{-3}) zředěn v motilitním pufru (BRB80, DTT 10 mmol·dm^{-3}, ATP 1 mmol·dm^{-3}, polysorbát-20 0,01 % (w/v), kasein 1,04 μmol·dm^{-3}, glukosa 20 mmol·dm^{-3}, glukosa oxidasa 1,53 μmol·dm^{-3}, glukosa katalasa 83,3 nmol·dm^{-3}) v různých koncentracích uvedených ve výsledcích. Kinesin rkin-430-GFP je krátký konstrukt kinesinu-1 (KIF5b) zkrácený pouze na aminokyseliny 1 – 430, obsahuje tedy motorovou doménu a je zkrácen o lehký řetězec, který *in vivo* slouží k vazbě nákladů.

V experimentu zkoumajícím vliv polyglutamylace na polymerizaci mikrotubulů (oddíl *6*) byla připravena nukleační centra v přítomnosti GMPCPP o koncentraci 1 mmol·dm^{-3} v pufru BRB80. Tubulinové dimery pro další polymerizaci z těchto nukleačních center byly zředěny na koncentraci 8 μmol·dm^{-3} v polymerizačním pufru (BRB80, GTP 4 mmol·dm^{-3}, glukosa 80 mmol·dm^{-3}, methylcelulosa 0,2 % (w/v), glukosa oxidasa 1,53 μmol·dm^{-3}, glukosa katalasa 83,3 nmol·dm^{-3}).

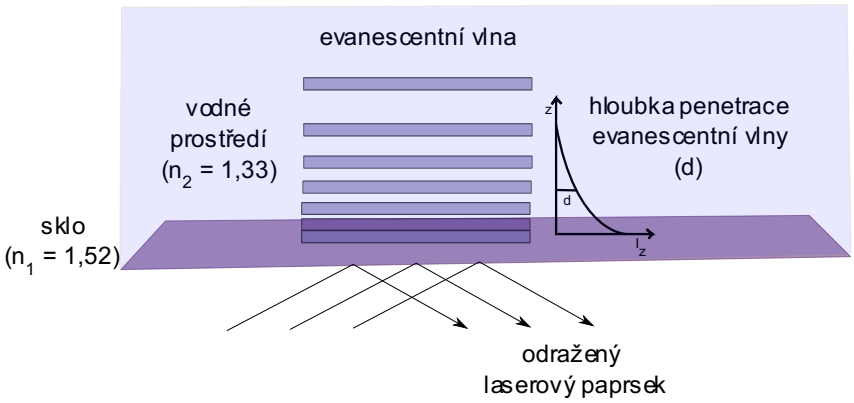
4.5 Příprava vzorku

Podložní mikroskopická skla byla pokryta vrstvou dichlordimethylsilanu [72] za účelem vytvoření hydrofobního povrchu. Jedno větší sklo o rozměrech 22×22 mm a jedno menší sklo o rozměrech 18×18 mm byly spojeny proužky parafilmu, čímž byly na dvojitém skle vytvořeny průtokové kanálky. Takto připravené sklo bylo následně 5 min inkubováno s monoklonální protilátkou (proti biotinu, o koncentraci 4,17 μmol·dm^{-3}, nebo proti β-tubulinu, o koncentraci 20,0 μmol·dm^{-3}, v PBS) a následně byl povrch skla zablokován 1% (w/v) roztokem Pluronic F127 (inkubováno 60 min). Mikrotubuly byly naplaveny do kanálku a přichyceny skrze vazbu na protilátku na povrchu skla.

4.6 Fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem

Mikroskopické zobrazení jednotlivých molekul proteinů a proteinových komplexů bylo umožněno vývojem pokročilých technik optické mikroskopie, zejména mikroskopie fluorescenční a později i mikroskopice superrozlišovací. Rozvoj poznání fungování cytoskeletu nastal zejména s příchodem TIRF (fluorescence s úplným vnitřním odrazem, z anglického „total internal reflection fluorescence“) mikroskopie [73]. Ta se stala rozšířenou technikou pro studium dynamiky cytoskeletálních vláken [72,74] a pozorování jednotlivých molekul motorových proteinů [75].

TIRF je mikroskopická metoda založená na úplném odrazu excitačního paprsku na rozhraní dvou prostředí s různými indexy lomu. Při úplném vnitřním odrazu paprsku na rozhraní průsvitného materiálu (v našem případě mikroskopické sklíčko) a tekutiny (pufr s biomolekulami) vznikne velmi tenké elektromagnetické pole o stejné frekvenci jako dopadající záření. Toto elektromagnetické pole se nazývá evanescentní vlna (viz *Obrázek 9*) a je jím excitována tenká vrstva vzorku, v níž jsou detekovány fluorescenčně označené molekuly. K excitaci pouze tenké vrstvy dochází v důsledku exponenciálního poklesu intenzity evanescentní vlny (viz rovnice *(4)*) se vzdáleností od povrchu pevného materiálu (sklíčka). Excitovaná vrstva bývá hluboká zhruba od 30 do 300 nm v závislosti na indexech lomu, úhlu dopadu a vlnové délce excitačního paprsku [76]. Pro porovnání je v případě konfokální mikroskopie excitovaná vrstva přibližně pětkrát tlustší) [77]. Výhodou takto malé ozářené oblasti je vysoký poměr signálu k šumu (šum je více než dva tisíce krát nižší než u klasické epifluorescenční mikroskopie [78]), dále to, že nesnímáme žádnou fluorescenci mimo zaostřenou oblast, a že vzorek je celkově vystaven menší dávce záření.



Obrázek 9 *Evanescentní vlna.*

Uvažujme kolimovaný světelný paprsek šířící se z opticky hustšího prostředí skla (n_1) do opticky řidšího vodného prostředí (n_2). Na rozhraní těchto dvou prostředí se paprsek láme podle Snellova zákona:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \tag{1}$$

kde n_1 je index lomu hustšího prostředí, n_2 index lomu řidšího prostředí, θ_1 úhel dopadu a θ_2 úhel lomu. Je-li úhel dopadu větší než tzv. kritický úhel (θ_k), kterému odpovídá úhel lomu 90 °, pak paprsek podléhá úplnému vnitřnímu odrazu.

Základním principem TIRF mikroskopie je průchod excitačního paprsku sklíčkem pod velkým úhlem dopadu. Lom a odraz světla na rozhraní závisí na úhlu dopadu a rozdílu mezi indexy lomu skla (n_1) a vodného prostředí vzorku (n_2). V případě TIRF mikroskopie paprsek světla vzorkem neprochází a je na rozhraní skla a vody úplně odražen pod tzv. kritickým úhlem (θ_κ):

$$\theta_k = arcsin(n_2/n_1) \tag{2}$$

Hloubka evanescentní vlny je funkcí úhlu dopadu, θ, vlnové délky laserového paprsku, λ_0, a rozdílu indexů lomu prostředí n_1 a n_2:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2\theta - n_2^2}} \tag{3}$$

Intenzita evanescentní vlny exponenciálně klesá se vzdáleností od povrchu sklíčka:

$$I(z) = I_0 \exp(-z/d) \tag{4}$$

kde I_0 představuje intenzitu dopadajícího laserového paprsku, z je vzdálenost na kolmici k rozhraní skla a vodného prostředí a d je hloubka penetrace evanescentní vlny.

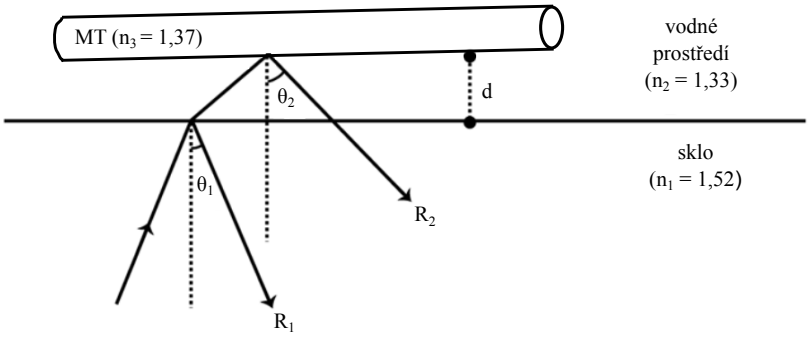
S nízkou hladinou osvětlení a vysokým prostorovým rozlišením je TIRF mikroskopie klíčovou zobrazovací metodou buněčných komponent jak *in vivo*, tak *in vitro*. Po imobilizaci cytoskeletálních vláken na povrchu sklíčka lze TIRF mikroskopii využít k vizualizaci interakcí mikrotubulů s jejich asociovanými proteiny a ke studiu dynamiky mikrotubulárních systémů.

V experimentální části této práce byl použit invertovaný mikroskop s olejovým imerzním objektivem (1,49 N.A.) o zvětšení 60×. K excitaci fluorofory byly použity lasery o vlnových délkách 488 nm, 561 nm a 640 nm. Mikroskop byl též vybaven LED lampou pro interferenční reflekční mikroskopii. Měření probíhala při laboratorní teplotě.

4.7 Interferenční reflekční mikroskopie

Vedle právě popsané TIRF mikroskopie byly snímky na uvedeném mikroskopu pořízeny též pomocí interferenční reflekční mikroskopie (IRM, z anglického „interference reflection microscopy“). Tuto metodu lze použít pro studium dynamických procesů bez potřeby odlišení jednotlivých komponent pomocí fluorescence. IRM je vhodná metoda zejména, hrozí-li poškození pozorovaného vzorku fotobělením (angl. „photobleaching“) či nechtěná interakce fluoroforů se studovanými proteiny [79], zatímco poskytuje zobrazení mikrotubulů v kvalitě srovnatelné se snímky získanými pomocí TIRF díky podobnému poměru signálu k šumu [80,81].

IRM může být provedena na TIRF mikroskopu, který je vybaven vysokoúčinným zdrojem světla. Obraz objektu na povrchu skla je vytvořen pomocí lineárně polarizovaného světla, které se částečně odráží na rozhraní skla a vodného prostředí. Část světla projde vzorkem a odrazí se na rozhraní vodného prostředí pufru a biologického objektu – mikrotubulu (viz *Obrázek 10*). Intenzita signálu závisí na vzdálenosti objektu od povrchu skla. Pokud je objekt imobilizován na povrchu skla, dojde po odrazu světla od povrchu skla k posunu o polovinu vlnové délky původního paprsku. Světlo, které se odrazí od biologického objektu bude ve fázovém posunu oproti světlu, které se odrazí od skla – paprsky se navzájem vyruší, dojde k tzv. destruktivní interferenci, která se následně na snímku projeví jako tmavý signál. Na místech, kde se žádný biologický objekt nenachází, bude detekováno pouze světlo, které se odrazilo od skla, a výsledný signál bude zaznamenán jako světlý pixel (viz *Obrázek 11 B*).



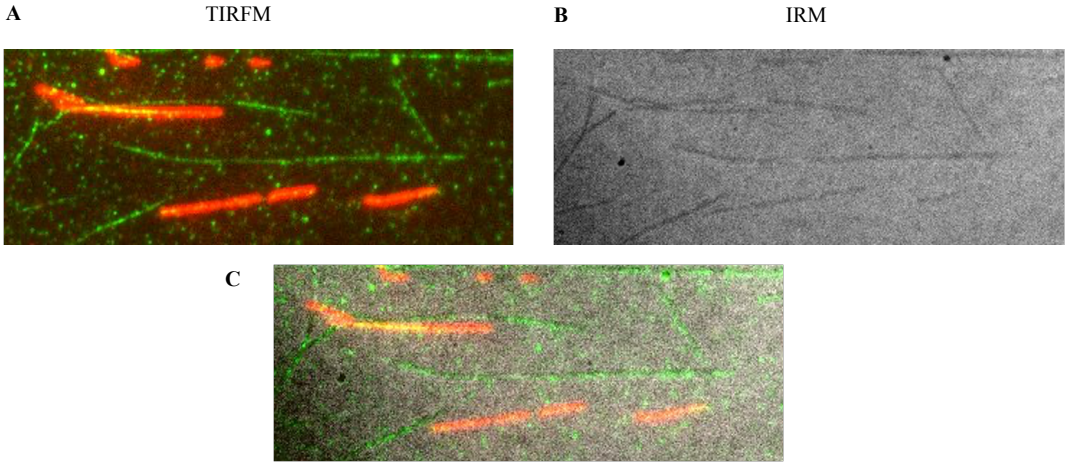
Obrázek 10 *Schematické znázornění interferenčního odrazu způsobeného mikrotubulem na skle. Mikrotubulus je od skla oddělený tenkou vrstvou o průměru* d*. K prvnímu odrazu,* R_1*, dochází na rozhraní skla a vodného prostředí pod úhlem* θ_1*. Lomený paprsek prostupuje do vodného prostředí a na rozhraní vodného prostředí a mikrotubulu dochází k druhému odrazu,* R_2*, pod úhlem* θ_2*. V závislosti na vzdálenosti* d *optické dráhy prvního a druhého odrazu vedou ke konstruktivní (světlý signál) nebo destruktivní (tmavý signál) interferenci. Převzato a upraveno [82].*

Částečný odraz je způsoben rozdílem v indexu lomu na rozhraní dvou materiálů. Míra odrazu je dána reflekčním koeficientem, $r_{1,2}$:

$$r_{1,2} = (n_1 - n_2)/(n_1 + n_2) \tag{5}$$

kde n_1 je index lomu prvního prostředí a n_2 index lomu druhého prostředí.

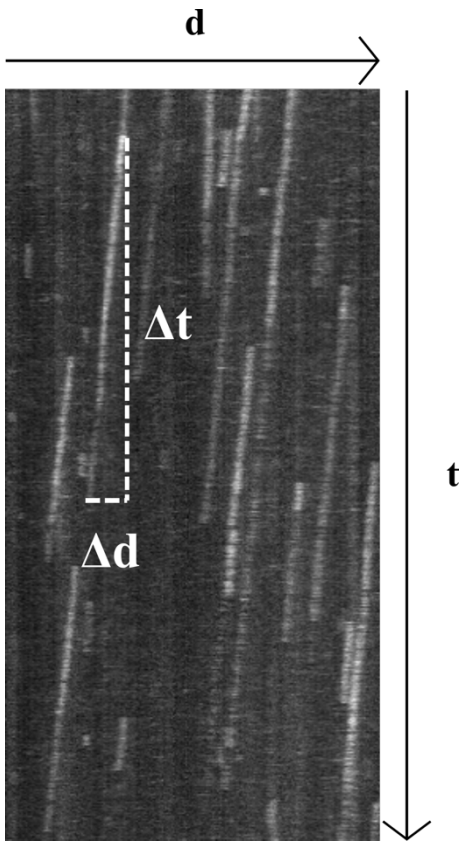
Snímky z mikroskopického pozorování v této práci byly získány kombinací TIRF a reflekční interferenční mikroskopie, viz *Obrázek 11*.



Obrázek 11 A *Zobrazení fluorescenčně značených objektů pomocí TIRF mikroskopie. Červeně jsou vidět fluorescenčně značené mikrotubuly, zeleně molekuly kinesinu-1. Červeně jsou zobrazeny neuronální mikrotubuly (tubulin-HiLyte647), zeleně molekuly kinesinu-1 (rkin-430-GFP).* ***B*** *Zobrazení neznačených HeLa mikrotubulů pomocí IRM.* ***C*** *Superpozice snímků z TIRFM a IRM.*

4.8 Analýza obrazu

Snímky získané z mikroskopu byly analyzovány v softwaru Fiji [83]. Rychlost pohybu molekul kinesinu-1 podél mikrotubulů byla vyhodnocena pomocí rozšíření „KymographBuilder“. Kymograf (viz *Obrázek 12*) je 1D časoprostorový diagram, který znázorňuje hodnoty intenzit po předem definované dráze za určitý čas. Získán je analýzou sekvence snímků pořízených v různých časových okamžicích. Kinesiny se váží k mikrotubulům, ujdou po nich určitou vzdálenost a stochasticky se odvazují. Proto byl zkoumán čas interakce („chůze“) molekul kinesinu s mikrotubulem a vzdálenost, kterou během své chůze urazil.



Obrázek 12 *Analýza pohybu molekul kinesinu-1 po mikrotubulech. Kymograf představuje dráhy jednotlivých molekul kinesinu-1. Horizontální osa představuje vzdálenost* d*, vertikální osa představuje čas* t*. Pro ilustraci je v kymografu bíle zobrazen rozdíl vzdálenosti a rozdíl času pro jednu náhodně vybranou molekulu.*

Ze získaných vzdáleností a časů byla dále vypočítána rychlost „chůze“ kinesinu po mikrotubulech jako podíl vzdálenosti, *d*, a času pozorování, *t*, dle rovnice *(6)*.

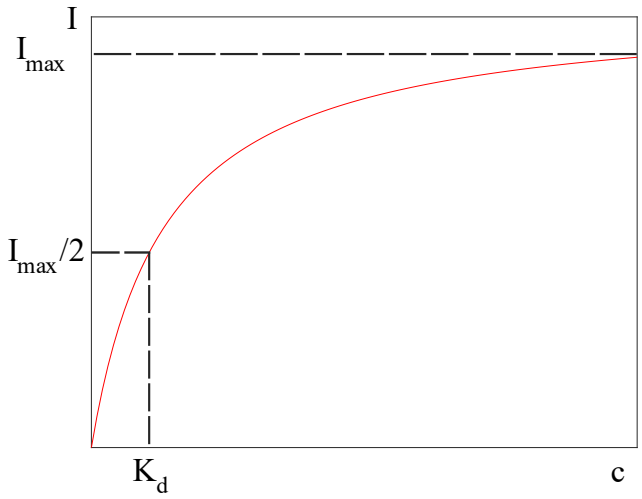
$$v = \Delta d / \Delta t \tag{6}$$

Vzdálenost a čas chůze kinesinu-1 po mikrotubulech byly estimovány pomocí funkce pravděpodobnosti přežití dle Kaplana a Meiera [84]. Výpočty, grafy a statistická testování byly zhotoveny v prostředí MATLAB. Funkce pravděpodobnosti přežití byla testována pomocí skriptu *MatSurv* [85], v ostatních případech byly provedeny dvouvýběrové t-testy.

Vazebná afinita kinesinu-1-GFP k mikrotubulům byla analyzována v softwaru Fiji porovnáním intenzity GFP signálu podél mikrotubulů a přilehlého pozadí pomocí parametru *RawIntDen*. Během měření byly postupně přidávány zvyšující se koncentrace kinesinu do průtokového kanálu. Se zvyšující se koncentrací kinesinu rostla i intenzita dle

$$I = (I_{max}\, c)/(K_d + c) \tag{7}$$

kde I představuje intenzitu, I_{max} maximální intenzitu, c koncentraci a K_d disociační konstantu. Maxima intenzita dosáhla po zaplnění všech vazebných míst kinesinu na mikrotubulu. Disociační konstanta je koncentrace kinesinu, při které je obsazena polovina vazebných míst na mikrotubulu (viz *Obrázek 13*). Čím menší je hodnota disociační konstanty, tím vyšší je afinita kinesinu k mikrotubulům. Hodnoty disociační konstanty byly vypočítány pomocí rozšíření *Curve Fitter* v prostředí MATLAB.



Obrázek 13 *Náčrt vazebné křivky získané z měření intenzity fluorescence. Křivka dle rovnice (6) je obdobná modelu Michaelise-Mentenové.* I *je intenzita GFP signálu kinesinu podél mikrotubulů,* I_{max} *je maximální intenzita, při které jsou všechna vazebná místa na mikrotubulu obsazena,* c *je koncentrace vázajících se molekul kinesinu a* K_d *je disociační konstanta.*

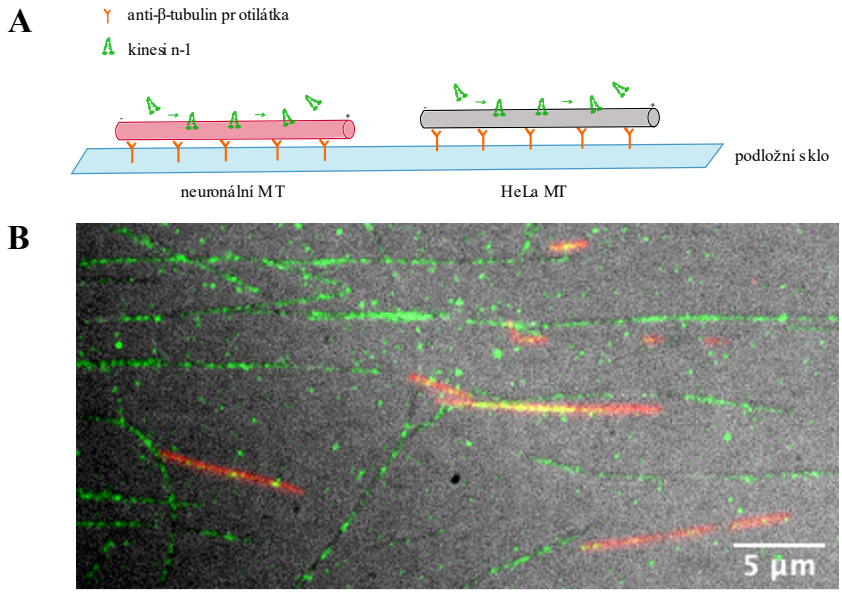
Růst mikrotubulů byl analyzován pomocí stupně polymerizace, tedy délky, o kterou mikrotubulus narostl za sledovaný čas. Délky mikrotubulů byly změřeny manuálně v softwaru Fiji. Diagram a t-test byly zhotoveny v prostředí MATLAB.

5. Vliv posttranslačních modifikací tubulinu na interakci molekulárního motoru kinesinu-1 s mikrotubuly

5.1 Uspořádání experimentu

Přítomnost posttranslačních modifikací na tubulinu je vysoce variabilní mezi tkáněmi i v rámci jedné buňky. Neuronální mikrotubuly jsou vysoce heterogenní díky přítomnosti různých tubulinových izotypů [86] a vysoké míře posttranslačních modifikací [17,87]. HeLa, imortalizovaná buněčná linie lidských epiteliálních buněk, se naopak vyznačuje nízkou mírou posttranslačně modifikovaných mikrotubulů [88]. Z důvodu vysokého kontrastu mezi málo modifikovanými HeLa a vysoce modifikovanými neuronálními mikrotubuly byly tyto dva modely vybrány pro studium vlivu posttranslačních modifikací tubulinu na interakci molekulárního motoru kinesinu-1 s mikrotubuly.

Interakce kinesinu-1 s mikrotubuly byla studována na mikrotubulech, které byly z izolovaných dimerů α,β-tubulinu polymerizovány *in vitro*. Za využití mikroskopických technik s rozlišením na úrovni jedné molekuly byla určena afinita kinesinu k mikrotubulům. Ve druhém kroku byly z měření (5 minut, 2 snímky za sekundu) určeny vzdálenost, čas a rychlost chůze jednotlivých molekul kinesinu po mikrotubulech.



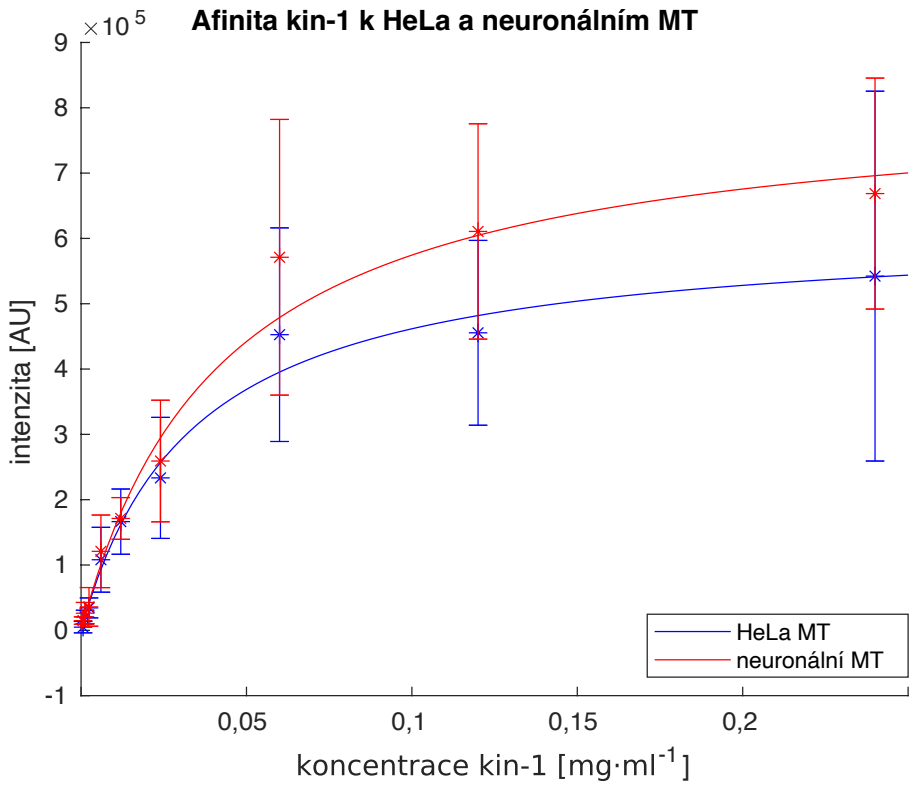
Obrázek 14 A *Schéma provedení experimentu. Mikrotubuly polymerizované in vitro byly naplaveny do kanálu připraveného na podložním skle. Mikroskopické pozorování bylo provedeno TIRF technikou na povrchu skla, k němuž byly mikrotubuly přichyceny pomocí protilátky proti β-tubulinu.* ***B*** *Snímek z mikroskopického pozorování. Červeně jsou zobrazeny neuronální mikrotubuly, černě HeLa mikrotubuly a zeleně molekuly kinesinu-1.*

Pro měření vazebné afinity byly vzorky se zvyšující se koncentrací kinesinu-1 postupně přidávány do jednoho kanálu. Použité koncentrace kinesinu byly: $6{,}0 \cdot 10^{-1}$ mg·ml^{-1}; $2{,}4 \cdot 10^{-1}$ mg·ml^{-1}; $1{,}2 \cdot 10^{-1}$ mg·ml^{-1}; $6{,}0 \cdot 10^{-2}$ mg·ml^{-1}; $2{,}4 \cdot 10^{-2}$ mg·ml^{-1}; $1{,}2 \cdot 10^{-2}$ mg·ml^{-1}; $6{,}0 \cdot 10^{-3}$ mg·ml^{-1}; $2{,}4 \cdot 10^{-3}$ mg·ml^{-1}; $1{,}2 \cdot 10^{-3}$ mg·ml^{-1}; $6{,}0 \cdot 10^{-4}$ mg·ml^{-1}. Pozn. koncentrace kinesinu $6{,}0 \cdot 10^{-1}$ mg·ml^{-1} odpovídá molární koncentraci 7,94 µmol·dm^{-3}.

5.2 Výsledky

5.2.1 Vazebná afinita

Vazebná afinita kinesinu k mikrotubulům byla určena z intenzit signálu kinesinu na mikrotubulech. Byla sestrojena křivka (*Obrázek 15*) závislosti intenzity na koncentraci kinesinu v roztoku přidaném do průtokového kanálu podložního skla, dle rovnice *(6)*.



Obrázek 15 *Afinita kinesinu-1 k HeLa a neuronálním mikrotubulům. Na základě jednoho nezávislého měření, za použití IRM a TIRF mikroskopie. Pro každou koncentraci bylo analyzováno pět mikrotubulů každého druhu. Intenzita vázaného kinesinu byla spočítána s odečtením šumu pozadí. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku.*

Byly spočítány hodnoty disociačních konstant pro jeden mikrotubulus při různých koncentracích, z nichž byly získány průměrné disociační konstanty se směrodatnou odchylkou:

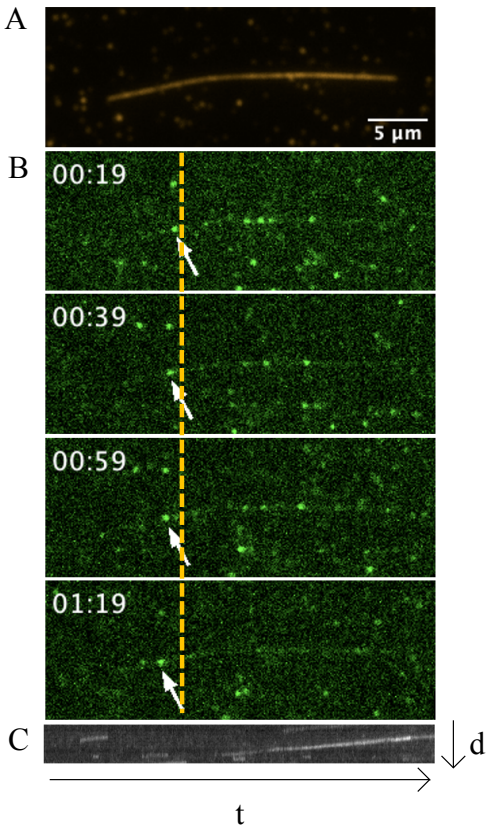
$$K_{d,\ neuronální} = 1{,}82 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}449 \cdot 10^{-2}\ \text{AU}$$

$$K_{d,\ HeLa} = 1{,}61 \cdot 10^{-2} \pm 0{,}411 \cdot 10^{-2}\ \text{AU}$$

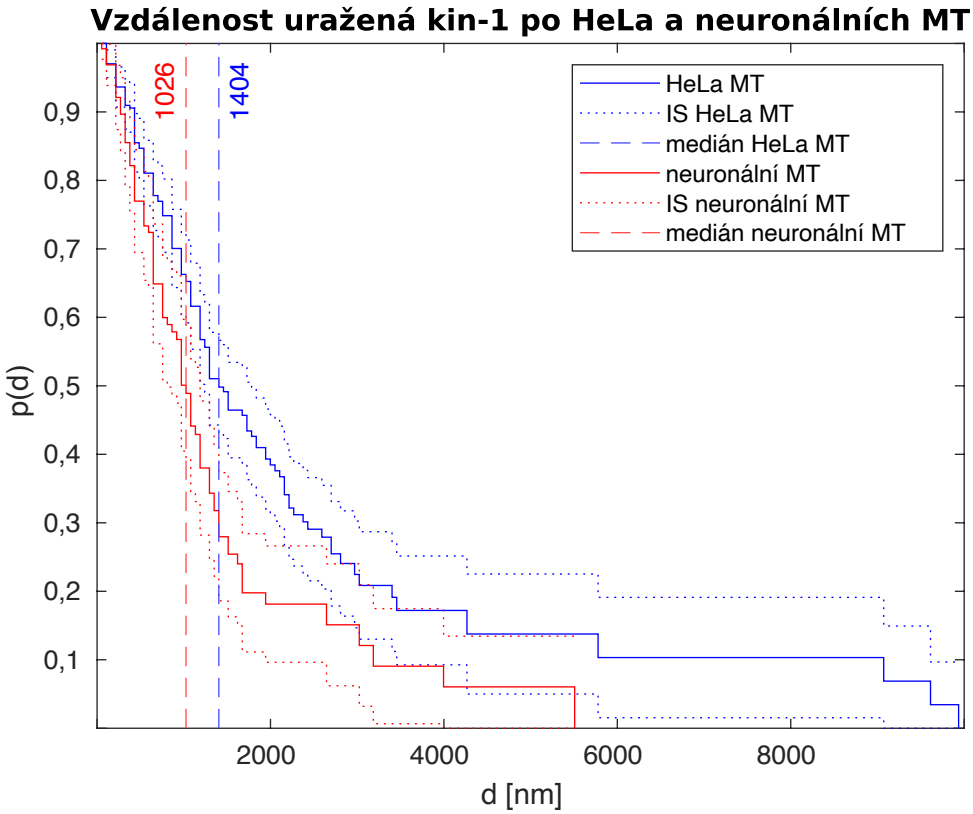
Porovnáním všech hodnot disociačních konstant neuronálních mikrotubulů oproti hodnotám disociačních konstant HeLa mikrotubulů byla po provedení dvouvýběrového t-testu, u něhož nepředpokládáme shodnost rozptylů, získána p-hodnota 0,51. Na hladině významnosti 0,05 nemůžeme zamítnout nulovou hypotézu, že hodnoty disociačních konstant pro oba typy mikrotubulů jsou shodné. Rozdíl disociačních konstant kinesinu-1 na modifikovaných neuronálních a nemodifikovaných HeLa mikrotubulech tedy není statisticky významný.

5.2.2 Motilitní parametry

Po provedení experimentu (viz *Obrázek 14*) byly dále sledovány motilitní parametry pohybu kinesinu-1 po mikrotubulech (*Obrázek 16*). Měřena byla vzdálenost, kterou molekuly kinesinu urazily po dráze mikrotubulů (*Obrázek 17*) a čas, který na mikrotubulu strávily, než se odvázaly (*Obrázek 18*). Kinesin-1 byl použit v koncentraci 1,2 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (0,159 $nmol \cdot dm^{-3}$).

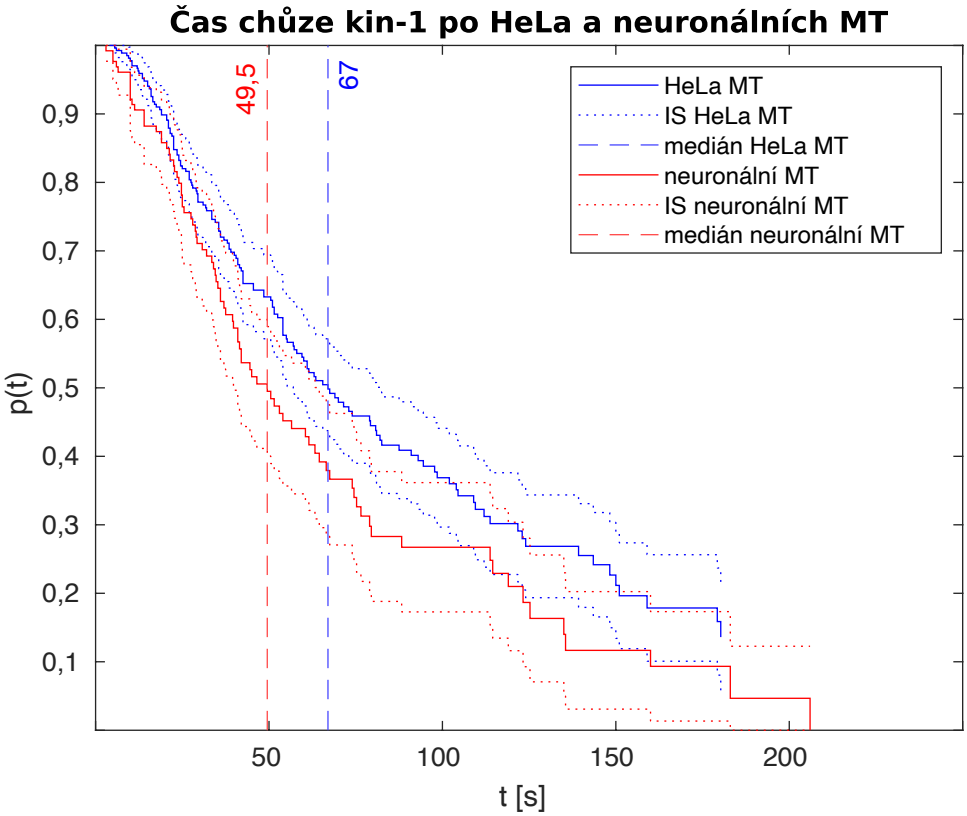


Obrázek 16 *Pohyb molekul kinesinu-1 po neuronálních mikrotubulech.* ***A*** *Snímek mikrotubulu (fluorescenčně značený tubulin-rhodamin).* ***B*** *Snímky molekul kinesinu-1 (fluorescenčně značený rkin-430-GFP) v různých časech. Snímky odpovídají molekulám pohybujícím se po mikrotubulu ukázaném na obrázku A. Jednotlivé snímky byly pořízeny v časech 19 s, 39 s, 59 s a 1 min 19 s. Bílé šipky ukazují na jednu sledovanou molekulu kinesinu-1 ve čtyřech časových okamžicích. Žlutá přerušovaná čára slouží jako osa pro lepší viditelnost posunu sledované molekuly v čase.* ***C*** *Dráha molekuly sledované na obrázku B zobrazená v kymografu. Horizontální osa představuje čas* t*, po který se molekula zdržela na mikrotubulu. Vertikální osa představuje vzdálenost* d*, kterou molekula po mikrotubulu urazila.*



Obrázek 17 *Vzdálenost* d*, kterou molekuly kinesinu-1 urazily po HeLa a neuronálních mikrotubulech. Křivky představují odhad funkce pravděpodobnosti přežití* p(d)*. Plnou čarou je uvedena křivka pravděpodobnosti, že kinesin urazí určitou vzdálenost, tečkovanou čarou 95% intervaly spolehlivosti a přerušovanou čarou hodnoty mediánů pro jednotlivé typy mikrotubulů. Uvedené hodnoty mediánů odpovídají nejmenšímu času, při kterém je pravděpodobnost přežití rovna 0,5.*

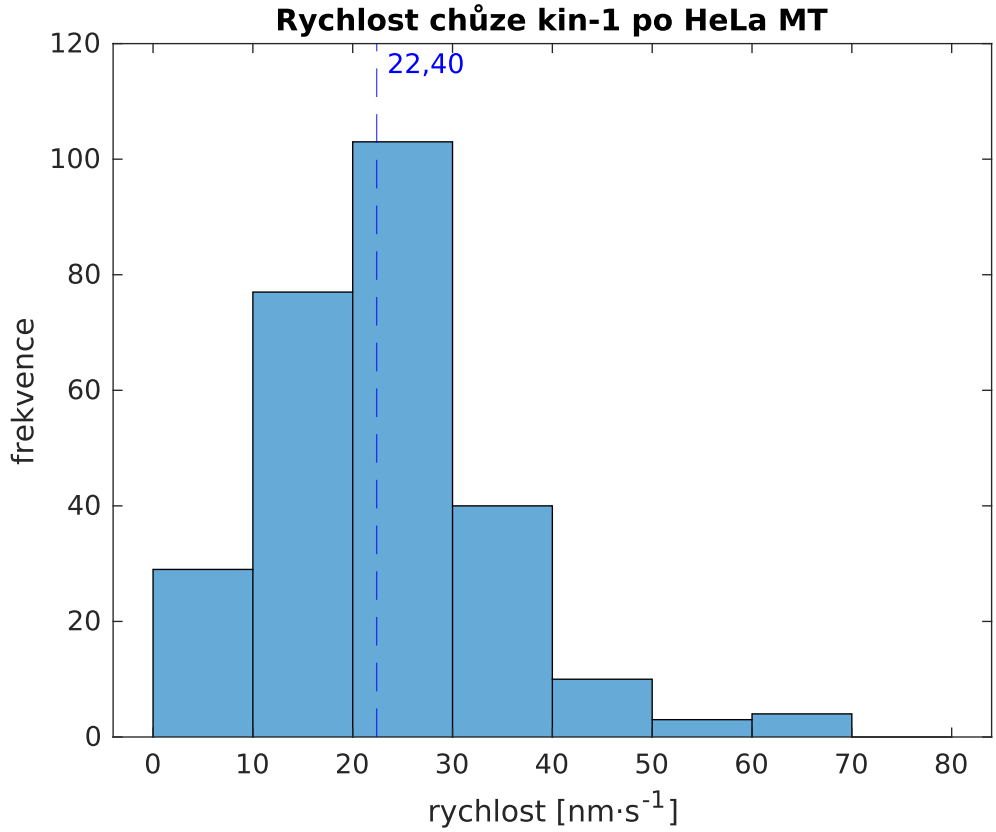
Porovnáním funkcí pravděpodobnosti přežití pro vzdálenost, kterou molekuly kinesinu-1 urazily po HeLa a neuronálních mikrotubulech, byla získána p-hodnota $2{,}3 \cdot 10^{-4}$. Na hladině významnosti 0,05 tedy můžeme zamítnout nulovou hypotézu, že křivky jsou si rovny. Rozdíl ve vzdálenosti, kterou molekuly kinesinu urazily po neuronálních a HeLa mikrotubulech, je statisticky významný.



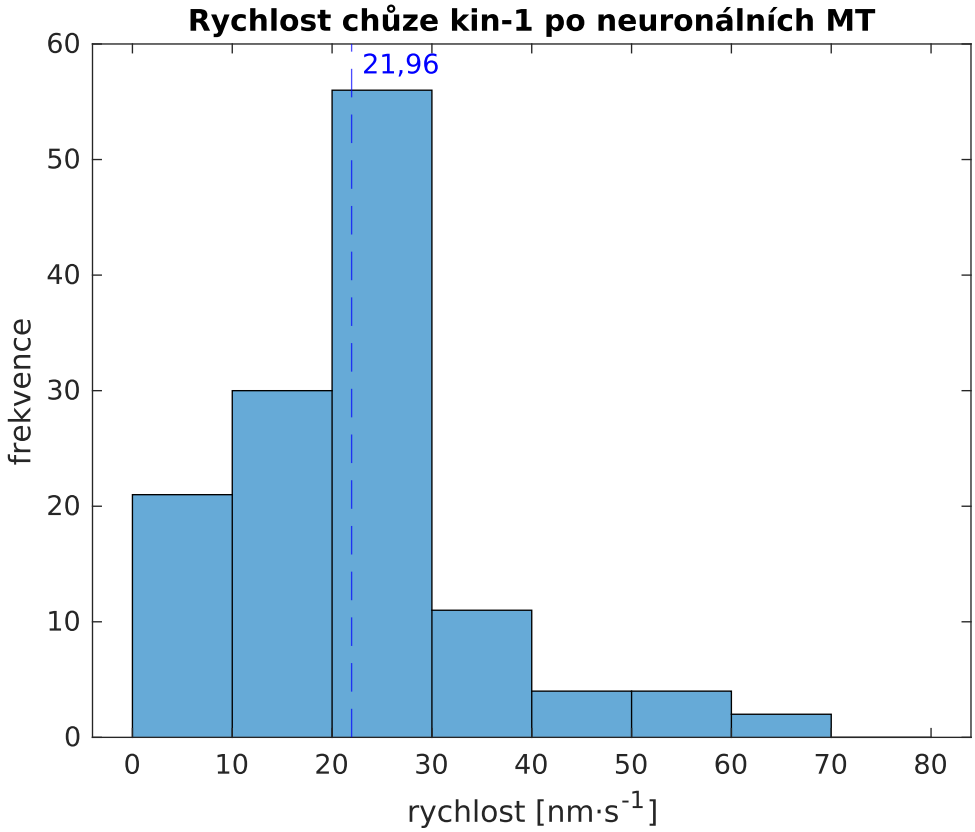
Obrázek 18 *Čas* t*, po který se molekuly kinesinu-1 pohybovaly po dráze HeLa a neuronálních mikrotubulů. Křivky představují odhad funkce pravděpodobnosti přežití* p(t)*. Plnou čarou je uvedena pravděpodobnost, že kinesin se bude po mikrotubulu pohybovat určitý čas, tečkovanou čarou 95% intervaly spolehlivosti a přerušovanou čarou hodnoty mediánů pro jednotlivé typy mikrotubulů. Uvedené hodnoty mediánů odpovídají nejmenšímu času, při kterém je pravděpodobnost přežití rovna 0,5.*

Porovnáním funkcí pravděpodobnosti přežití pro čas chůze molekul kinesinu-1 po HeLa a neuronálních mikrotubulech byla získána p-hodnota 0, 013. Na hladině významnosti 0,05 tedy můžeme zamítnout nulovou hypotézu, že křivky jsou si rovny. Rozdíl v čase, který molekuly kinesinu strávily na neuronálních a HeLa mikrotubulech před tím, než se odvázaly, je statisticky významný.

Z časů a vzdáleností, které kinesin urazil po jednotlivých mikrotubulech, byla spočítána rychlost zobrazená v histogramech (*Obrázky 19 a 20*).



Obrázek 19 *Histogram rychlosti, kterou se molekuly kinesinu-1 pohybovaly po HeLa mikrotubulech. Uvedená hodnota zobrazená přerušovanou čarou odpovídá mediánu rychlostí. Frekvence představuje počet molekul, které měly rychlost z daného intervalu.*



Obrázek 20 *Histogram rychlosti, kterou se molekuly kinesinu-1 pohybovaly po neuronálních mikrotubulech. Uvedená hodnota zobrazená přerušovanou čarou odpovídá mediánu rychlostí. Frekvence představuje počet molekul, které měly rychlost z daného intervalu.*

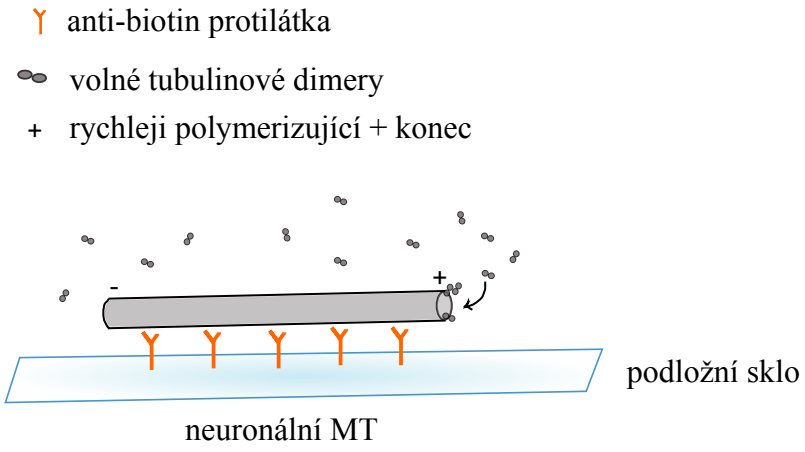
Po provedení dvouvýběrového t-testu, u něhož nepředpokládáme shodnost rozptylů, byla získána p-hodnota rovna 0,07. Na hladině významnosti 0,05 nemůžeme zamítnout nulovou hypotézu, že střední hodnoty jsou si rovny. Rozdíl v rychlosti chůze kinesinu-1 po HeLa a neuronálních mikrotubulech tedy není statisticky významný.

Z předchozích výsledků (viz oddíl *Vazebná afinita*) vyplývá, že kinesin má stejnou afinitu pro HeLa a neuronální mikrotubuly. Z histogramů (*Obrázky 19 a 20*) a získaných p-hodnot dále vyplývá, že kinesin-1 chodí déle a dále po HeLa mikrotubulech, které nejsou tolik posttranslačně modifikovány jako neuronální mikrotubuly. Avšak po porovnání histogramů (*Obrázky 19 a 20*) můžeme říci, že se pohybuje stále přibližně stejnou rychlostí.

6. Vliv polyglutamylace tubulinu na polymerizaci mikrotubulů

6.1 Uspořádání experimentu

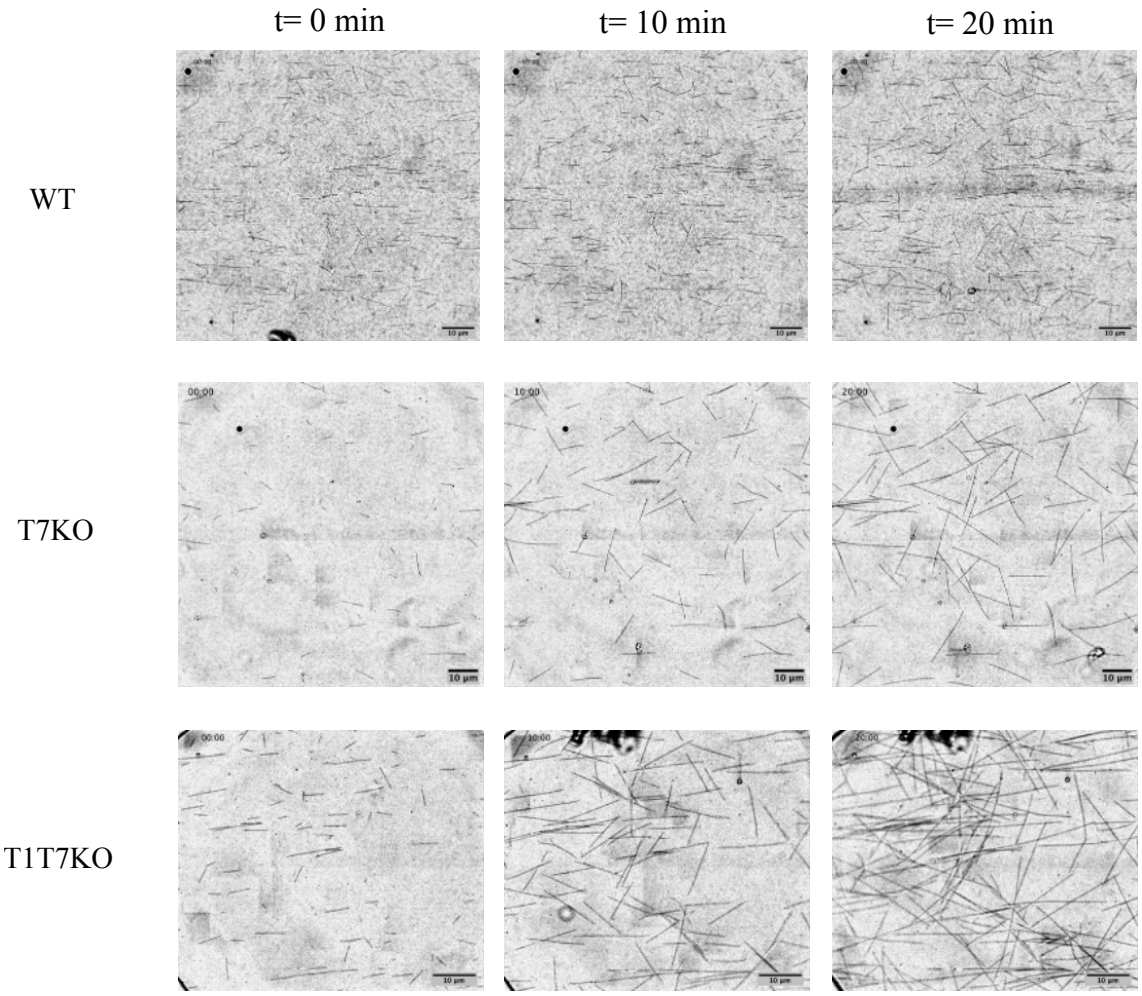
Byla pozorována míra polymerizace mikrotubulů z volných tubulinových dimerů (viz *Obrázek 21*) v roztoku o koncentraci 8 μmol·dm^{-3}. Za účelem studia vlivu přítomnosti polyglutamylace na polymerizaci mikrotubulů byla použita přirozená forma tubulinu, u něhož byla přítomna polyglutamylace na obou izotypech (WT, z anglického „wild type"), dále tubulin, u něhož polyglutamylace chyběla na β-tubulinu (inaktivace enzymu TTLL7) a tubulin, u něhož polyglutamylace chyběla na obou izotypech tubulinu (inaktivace enzymů TTLL1 a TTLL7). Stupeň polymerizace byl vypočítán jako délka, o kterou mikrotubulus narostl za dobu měření. V provedených experimentech nebyl pozorován žádný náhlý přechod polymerizujícího mikrotubulu do fáze depolymerizace.



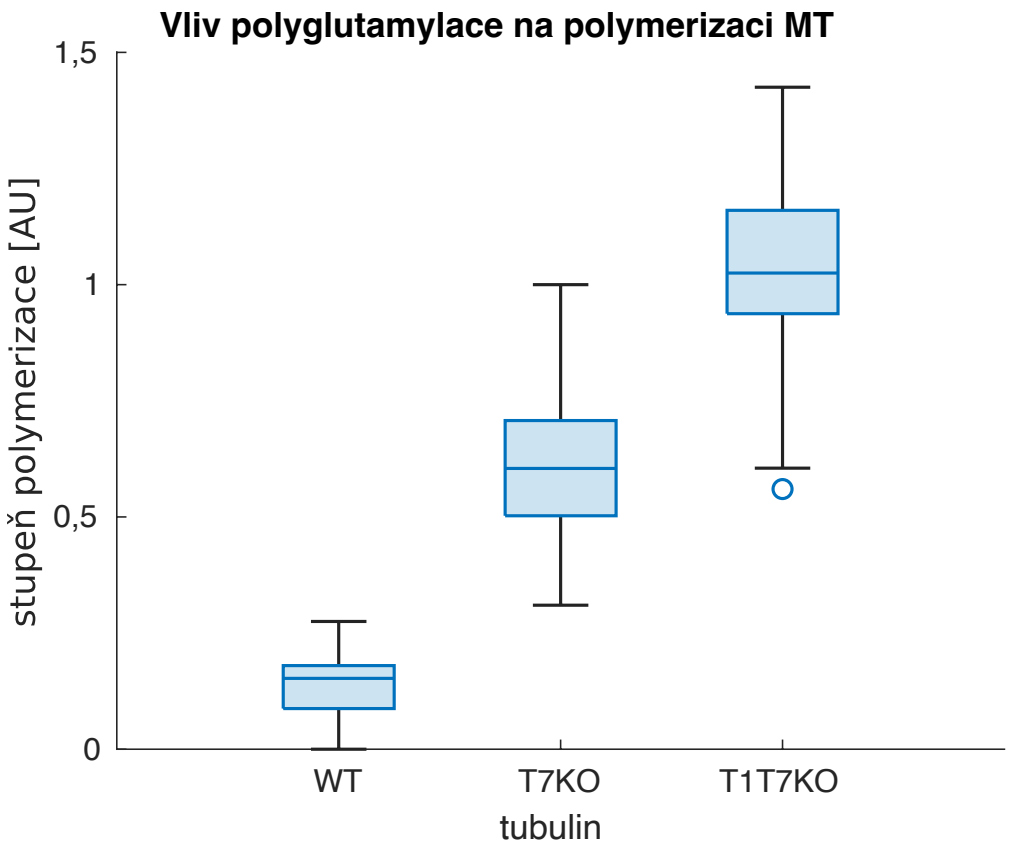
Obrázek 21 *Schéma provedení experimentu. Na podložní sklo byla pomocí protilátky proti biotinu přichycena nukleační jádra předem polymerizovaná in vitro. Byly přidány volné tubulinové dimery v roztoku a byla sledována polymerizace z nukleačních jader. Použitý tubulin byl biotinylovaný.*

6.2 Výsledky

Byl sledován růst mikrotubulů z nukleačních center po dobu 20 min snímáním pomocí IRM rychlostí dvanáct snímků za minutu. Byly opakovaně pořízeny snímky jednoho zorného pole v časech 0 min, 10 min a 20 min (viz *Obrázek 22*). Série snímků byla analyzována manuálně měřením délky mikrotubulů, zaznamenán byl nárůst jednotlivých mikrotubulů za dobu měření. Výsledné stupně polymerizace pro jednotlivé typy mikrotubulů jsou uvedeny v krabicovém diagramu (*Obrázek 23*).



Obrázek 22 *Polymerizace mikrotubulů v čase. Porovnání polymerizace přirozené formy tubulinu s polyglutamylací přítomnou na α- i β-podjednotce (WT, „wild type“), tubulinu s inaktivovanou polyglutamylací β-tubulinu (T7KO, „TTLL7 knockout“) a tubulinu s inaktivovanou polyglutamylací α- i β-tubulinu (T1T7KO, „TTLL1-TTLL7 knockout“). Měřítko 10 µm.*



Obrázek 23 *Vliv přítomnosti polyglutamylace na polymerizaci mikrotubulů. Porovnání polymerizace přirozené formy tubulinu (WT), tubulinu s inaktivovanou polyglutamylací β-tubulinu (T7KO) a tubulinu s inaktivovanou polyglutamylací α- i β-tubulinu (T1T7KO). Stupeň polymerizace je uveden v arbitrárních jednotkách. Zobrazeny jsou mediány, spodní a horní kvartil a v případě T1T7KO jedno odlehlé měření. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Analyzováno bylo 40 mikrotubulů každého druhu.*

Pomocí dvouvýběrových t-testů byly navzájem porovnány stupně polymerizace mezi WT – T7KO (p-hodnota = $2{,}20 \cdot 10^{-24}$), WT – T1T7KO (p-hodnota = $1{,}14 \cdot 10^{-32}$) a T7KO – T1T7KO (p-hodnota = $1{,}67 \cdot 10^{-18}$). Na hladině významnosti 0,05 můžeme zamítnout nulovou hypotézu, že stupně polymerizace jsou si rovny. Rozdíl ve stupních polymerizace tedy je statisticky významný.

Z výsledků vyplývá, že rychlost polymerizace mikrotubulů záleží na stupni polyglutamylace tubulinu. Menší míra polyglutamylace tubulinových dimerů vede k významnější polymerizaci za jednotku času.

7. Diskuse

Dynamika mikrotubulů a jejich interakce s dalšími proteiny představují jeden z ústředních aspektů fungování cytoskeletu. Výsledky této práce odhalují vliv posttranslačních modifikací tubulinu na mikrotubulární dynamiku a proteinovou interakci. Poskytují informaci o vazbě modifikovaných a nemodifikovaných mikrotubulů s motorovým proteinem a o růstu mikrotubulů v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti jedné konkrétní posttranslační modifikace.

Pro účel zkoumání interakce mikrotubulů s motorovým proteinem byl vybrán model vysoce modifikovaných neuronálních mikrotubulů a málo modifikovaných HeLa mikrotubulů a motorový protein kinesin-1. Výsledky ukazují, že zatímco afinita kinesinu k oběma druhům mikrotubulů a rychlost, kterou se po nich pohybuje, jsou přibližně stejné, celková délka dráhy a doba chůze kinesinu jsou významně vyšší na nemodifikovaných HeLa mikrotubulech. Dle modelu tubulinového kódu, který mikrotubuly přirovnává k silnici a posttranslační modifikace k dopravním značkám, si lze představit, že na dráze bez značek (nemodifikované HeLa mikrotubuly) se kinesin pohybující se stále stejnou rychlostí zdrží déle, než ze silnice odbočí.

Výsledky afinity a motility kinesinu-1 na modifikovaných a nemodifikovaných mikrotubulech mohou být přirovnány k publikovanému výzkumu o vlivu posttranslačních modifikací tubulinu na schopnost kinesinu-1 rozpoznávat mikrotubulární dráhy během neuronálního vývoje [89], který naznačuje, že zvýšení kombinace acetylace, detyrosinace a polyglutamylace snižuje selektivitu translokace kinesinu-1 a vede ke tvorbě axonů. Volba porovnání vysoce modifikovaných a téměř nemodifikovaných mikrotubulů v této práci je tak přínosná, neboť i další publikované výzkumy naznačují, že za mnohými mikrotubulárními procesy stojí kombinace několika posttranslačních modifikací [29,89]. Některé výzkumy též volí studium vlivu jedné konkrétní modifikace na kinesin-1 [20,90] či na určité mikrotubulární procesy [31]. Hodnoty rychlosti pohybu kinesinu-1 po mikrotubulech uvedené v této práci (cca 22 nm· s^{-1}) jsou výrazně nižší než hodnoty uváděné v literatuře (814 nm· s^{-1} [91]). To může být dáno experimentálními podmínkami, zejména nižší teplotou při pozorování, jelikož laboratoř byla klimatizována na cca 20 °C.

Výsledky této práce dále ukazují, že přítomnost polyglutamylace na tubulinu snižuje rychlost, kterou se tubulinové dimery uspořádávají do mikrotubulů. Přirozená

forma tubulinu, která obsahuje polyglutamylaci na obou podjednotkách, polymerizovala výrazně pomaleji než tubulin, kterému chyběla polyglutamylace na β-podjednotce a tubulin, který neměl polyglutamylaci ani na jednom izotypu tubulinu, polymerizoval významně nejrychleji. Během sledování polymerizace mikrotubulů s či bez polyglutamylace nebyly pozorovány žádné náhlé přechody mezi polymerizací a depolymerizací, ačkoli tyto procesy patří mezi základní rysy mikrotubulární dynamiky. To může taktéž souviset s experimentálními podmínkami či s vlastnostmi izolovaného tubulinu. Jelikož však všechna pozorování pro jednotlivé experimenty byla prováděna ve stejných podmínkách, jsou výsledky mezi sebou porovnatelné a dobře vypovídají o vztahu mezi polymerizací mikrotubulů a posttranslačními modifikacemi.

Závěry této práce jsou v souladu s dříve uváděnými informacemi o regulaci mikrotubulární dynamiky a motorových proteinů skrze posttranslační modifikace [31]. Tubulin bez polyglutamylace na jedné či obou podjednotkách dodaný z laboratoře Carstena Jankeho (Institut Curie, Paříž) byl kromě našich experimentů sledován v dalších výzkumech [45], které odhalily fyziologické projevy různých vzorců polyglutamylace způsobených různými enzymy. Polyglutamylace a posttranslační modifikace obecně mají taktéž vysoký potenciál pro budoucí bádání, jelikož posttranslační modifikace jsou spojeny s mnohými onemocněními [92], samotná polyglutamylace je spojována především s neurodegenerací a neuronálním transportem [45,48].

8. Závěr

V této bakalářské práci byla pomocí TIRF a interferenční reflekční mikroskopie sledována mikrotubulární dynamika a interakce s motorovým proteinem kinesinem-1 v závislosti na posttranslačních modifikacích tubulinu v *in vitro* rekonstituovaných systémech. V první experimentální části byla studována interakce kinesinu-1 s vysoce posttranslačně modifikovanými a téměř nemodifikovanými mikrotubuly. Bylo zjištěno, že interakce kinesinu s nemodifikovanými mikrotubuly je delší, ale rychlost, kterou se tento molekulární motor pohybuje a afinita k mikrotubulům nejsou přítomností či nepřítomností posttranslačních modifikací významně ovlivněny. Ve druhé části této práce bylo zjištěno, že přítomnost polyglutamylace významně snižuje rychlost polymerizace mikrotubulů.

Výsledky této práce vypovídají o roli posttranslačních modifikací v mikrotubulárních procesech. Vzhledem k významu mikrotubulárního cytoskeletu ve všemožných buněčných pochodech a k tomu, že posttranslační modifikace se zdají být důležitým aktérem zajišťujícím diverzitu mikrotubulů, je možné i v budoucnu studovat vlivy posttranslačních modifikací tubulinu jak *in vitro*, tak i v *in vivo* experimentech.

9. Literatura

1 SMART. Figure modified with text, markings (stars), and annotation after adaptation of “Stomach” from Servier Medical Art by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

2 Verhey, K. J. and Gaertig, J. (2007) The Tubulin Code. Cell Cycle, Taylor & Francis **6**, 2152–2160.

3 Conde, C. and Cáceres, A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. Nat Rev Neurosci, Nature Publishing Group **10**, 319–332.

4 Maday, S., Twelvetrees, A. E., Moughamian, A. J. and Holzbaur, E. L. F. (2014) Axonal Transport: Cargo-Specific Mechanisms of Motility and Regulation. Neuron **84**, 292–309.

5 Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. Nature, Nature Publishing Group **312**, 237–242.

6 Brouhard, G. J. (2015) Dynamic instability 30 years later: complexities in microtubule growth and catastrophe. MBoC, American Society for Cell Biology (mboc) **26**, 1207–1210.

7 Carlier, M. F. and Pantaloni, D. (1981) Kinetic analysis of guanosine 5’-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. Biochemistry, American Chemical Society **20**, 1918–1924.

8 Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. Nat Rev Mol Cell Biol **9**, 309–322.

9 Nogales, E. and Downing, K. H. (2008) Tubulin and Microtubule Structures. In The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology (Fojo, T., ed.), pp 211–225, Humana Press, Totowa, NJ.

10 Wilson, P. G. and Borisy, G. G. (1997) Evolution of the multi-tubulin hypothesis. BioEssays **19**, 451–454.

11 Nogales, E., Wolf, S. G. and Downing, K. H. (1998) Structure of the αβ tubulin dimer by electron crystallography. Nature, Nature Publishing Group **391**, 199–203.

12 Wloga, D. and Gaertig, J. (2010) Post-translational modifications of microtubules. Journal of Cell Science **123**, 3447–3455.

13 Janke, C. and Kneussel, M. (2010) Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. Trends in Neurosciences **33**, 362–372.

14 Gundersen, G. G., Kalnoski, M. H. and Bulinski, J. C. (1984) Distinct populations of microtubules: Tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. Cell **38**, 779–789.

15 Black, M. M. and Keyser, P. (1987) Acetylation of alpha-tubulin in cultured neurons and the induction of alpha-tubulin acetylation in PC12 cells by treatment with nerve growth factor. J. Neurosci., Society for Neuroscience **7**, 1833–1842.

16 Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.-P., Desbruyères, E., Gros, F. and Denoulet, P. (1990) Posttranslational Glutamylation of α-tubulin. Science, American Association for the Advancement of Science **247**, 83–85.

17 Alexander, J. E., Hunt, D. F., Lee, M. K., Shabanowitz, J., Michel, H., Berlin, S. C., MacDonald, T. L., Sundberg, R. J., Rebhun, L. I. and Frankfurter, A. (1991) Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. Proceedings of the National Academy of Sciences, Proceedings of the National Academy of Sciences **88**, 4685–4689.

18 Roll-Mecak, A. (2020) The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding. Developmental Cell **54**, 7–20.

19 Westermann, S. and Weber, K. (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. Nat Rev Mol Cell Biol, Nature Publishing Group **4**, 938–948.

20 Konishi, Y. and Setou, M. (2009) Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. Nat Neurosci, Nature Publishing Group **12**, 559–567.

21 Mullen, R. J., Eicher, E. M. and Sidman, R. L. (1976) Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences, Proceedings of the National Academy of Sciences **73**, 208–212.

22 Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M. M., Bosc, C., Deloulme, J.-C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N. D., Lacroix, B., Grau, M. B., et al. (2010) A Family of Protein-Deglutamylating Enzymes Associated with Neurodegeneration. Cell **143**, 564–578.

23 Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. and Borisy, G. G. (1987) Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. Proceedings of the National Academy of Sciences, Proceedings of the National Academy of Sciences **84**, 9040–9044.

24 Khawaja, S., Gundersen, G. G. and Bulinski, J. C. (1988) Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. Journal of Cell Biology **106**, 141–149.

25 Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A. T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L. and Andrieux, A. (2009) Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. Journal of Cell Biology **185**, 1159–1166.

26 Redeker, V., Le Caer, J. P., Rossier, J. and Promé, J. C. (1991) Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to alpha-tubulin. Journal of Biological Chemistry **266**, 23461–23466.

27 Redeker, V., Melki, R., Promé, D., Le Caer, J.-P. and Rossier, J. (1992) Structure of tubulin C-terminal domain obtained by subtilisin treatment The major α and β tubulin isotypes from pig brain are glutamylated. FEBS Letters **313**, 185–192.

28 Gaertig, J. and Wloga, D. (2008) Chapter 4 Ciliary Tubulin and Its Post-Translational Modifications. In Current Topics in Developmental Biology, pp 83–113, Academic Press.

29 Hammond, J. W., Cai, D. and Verhey, K. J. (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. Current Opinion in Cell Biology **20**, 71–76.

30 Yu, I., Garnham, C. P. and Roll-Mecak, A. (2015) Writing and Reading the Tubulin Code*. Journal of Biological Chemistry **290**, 17163–17172.

31 Janke, C. and Chloë Bulinski, J. (2011) Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nat Rev Mol Cell Biol, Nature Publishing Group **12**, 773–786.

32 Wolff, A., de Néchaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyères, E., Audebert, S., Eddé, B., Gros, F. and Denoulet, P. (1992) Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. Eur J Cell Biol **59**, 425–432.

33 Wolff, A., Denoulet, P. and Jeantet, C. (1982) High level of tubulin microheterogeneity in the mouse brain. Neuroscience Letters **31**, 323–328.

34 Rüdiger, M., Plessman, U., Klöppel, K.-D., Wehland, J. and Weber, K. (1992) Class II tubulin, the major brain β tubulin isotype is polyglutamylated on glutamic acid residue 435. FEBS Letters **308**, 101–105.

35 O'Hagan, R., Piasecki, B. P., Silva, M., Phirke, P., Nguyen, K. C. Q., Hall, D. H., Swoboda, P. and Barr, M. M. (2011) The Tubulin Deglutamylase CCPP-1

Regulates the Function and Stability of Sensory Cilia in C. elegans. Current Biology **21**, 1685–1694.

36 Redeker, V., Levilliers, N., Vinolo, E., Rossier, J., Jaillard, D., Burnette, D., Gaertig, J. and Bré, M.-H. (2005) Mutations of Tubulin Glycylation Sites Reveal Cross-talk between the C Termini of α- and β-Tubulin and Affect the Ciliary Matrix in Tetrahymena*. Journal of Biological Chemistry **280**, 596–606.

37 Sahab, Z. J., Kirilyuk, A., Zhang, L., Khamis, Z. I., Pompach, P., Sung, Y. and Byers, S. W. (2012) Analysis of Tubulin Alpha-1A/1B C-Terminal Tail Post-translational Poly-glutamylation Reveals Novel Modification Sites. J. Proteome Res., American Chemical Society **11**, 1913–1923.

38 Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P. and Larcher, J. C. (2001) Differential Binding Regulation of Microtubule-associated Proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by Tubulin Polyglutamylation*. Journal of Biological Chemistry **276**, 12839–12848.

39 Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N. D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D. W. and Janke, C. (2010) Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. Journal of Cell Biology **189**, 945–954.

40 Sirajuddin, M., Rice, L. M. and Vale, R. D. (2014) Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. Nat Cell Biol, Nature Publishing Group **16**, 335–344.

41 Kubo, T., Yanagisawa, H., Yagi, T., Hirono, M. and Kamiya, R. (2010) Tubulin Polyglutamylation Regulates Axonemal Motility by Modulating Activities of Inner-Arm Dyneins. Current Biology **20**, 441–445.

42 Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A. V., Strub, J.-M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., et al. (2005) Tubulin Polyglutamylase Enzymes Are Members of the TTL Domain Protein Family. Science, American Association for the Advancement of Science **308**, 1758–1762.

43 Ikegami, K., Heier, R. L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., et al. (2007) Loss of α-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. Proceedings of the National Academy of Sciences, Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 3213–3218.

44 Ikegami, K., Mukai, M., Tsuchida, J., Heier, R. L., MacGregor, G. R. and Setou, M. (2006) TTLL7 Is a Mammalian β-Tubulin Polyglutamylase Required for Growth of MAP2-positive Neurites*. Journal of Biological Chemistry **281**, 30707–30716.

45 Bodakuntla, S., Yuan, X., Genova, M., Gadadhar, S., Leboucher, S., Birling, M.-C., Klein, D., Martini, R., Janke, C. and Magiera, M. M. (2021) Distinct roles of α- and β-tubulin polyglutamylation in controlling axonal transport and in neurodegeneration. EMBO J **40**, e108498.

46 Ikegami, K., Sato, S., Nakamura, K., Ostrowski, L. E. and Setou, M. (2010) Tubulin polyglutamylation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. Proceedings of the National Academy of Sciences, Proceedings of the National Academy of Sciences **107**, 10490–10495.

47 Vogel, P., Hansen, G., Fontenot, G. and Read, R. (2010) Tubulin Tyrosine Ligase–Like 1 Deficiency Results in Chronic Rhinosinusitis and Abnormal Development of Spermatid Flagella in Mice. Vet Pathol, SAGE Publications Inc **47**, 703–712.

48 Magiera, M. M., Bodakuntla, S., Žiak, J., Lacomme, S., Marques Sousa, P., Leboucher, S., Hausrat, T. J., Bosc, C., Andrieux, A., Kneussel, M., et al. (2018) Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. EMBO J **37**, e100440.

49 Audebert, S., Desbruyères, E., Gruszczynski, C., Koulakoff, A., Gros, F., Denoulet, P. and Eddé, B. (1993) Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. MBoC, American Society for Cell Biology (mboc) **4**, 615–626.

50 Audebert, S., Koulakoff, A., Berwald-Netter, Y., Gros, F., Denoulet, P. and Edde, B. (1994) Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. Journal of Cell Science **107**, 2313–2322.

51 Mukai, M., Ikegami, K., Sugiura, Y., Takeshita, K., Nakagawa, A. and Setou, M. (2009) Recombinant Mammalian Tubulin Polyglutamylase TTLL7 Performs both Initiation and Elongation of Polyglutamylation on β-Tubulin through a Random Sequential Pathway. Biochemistry, American Chemical Society **48**, 1084–1093.

52 Mahalingan, K. K., Keith Keenan, E., Strickland, M., Li, Y., Liu, Y., Ball, H. L., Tanner, M. E., Tjandra, N. and Roll-Mecak, A. (2020) Structural basis for polyglutamate chain initiation and elongation by TTLL family enzymes. Nat Struct Mol Biol, Nature Publishing Group **27**, 802–813.

53 Matamoros, A. J. and Baas, P. W. (2016) Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. Brain Research Bulletin **126**, 217–225.

54 Sheetz, M. P., Steuer, E. R. and Schroer, T. A. (1989) The mechanism and regulation of fast axonal transport. Trends in Neurosciences **12**, 474–478.

55 Lindemann, C. B. and Lesich, K. A. (2010) Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. Journal of Cell Science **123**, 519–528.

56 Surrey, T., Nédélec, F., Leibler, S. and Karsenti, E. (2001) Physical Properties Determining Self-Organization of Motors and Microtubules. Science, American Association for the Advancement of Science **292**, 1167–1171.

57 Endow, S. A., Kull, F. J. and Liu, H. (2010) Kinesins at a glance. Journal of Cell Science **123**, 3420–3424.

58 Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. and Niwa, S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nat Rev Mol Cell Biol, Nature Publishing Group **10**, 682–696.

59 Kruppa, A. J. and Buss, F. (2021) Motor proteins at the mitochondria–cytoskeleton interface. Journal of Cell Science **134**, jcs226084.

60 Kim, A. J. and Endow, S. A. (2000) A kinesin family tree. Journal of Cell Science **113**, 3681–3682.

61 Coy, D. L., Wagenbach, M. and Howard, J. (1999) Kinesin Takes One 8-nm Step for Each ATP That It Hydrolyzes*. Journal of Biological Chemistry **274**, 3667–3671.

62 Allen, R. D., Metuzals, J., Tasaki, I., Brady, S. T. and Gilbert, S. P. (1982) Fast Axonal Transport in Squid Giant Axon. Science, American Association for the Advancement of Science **218**, 1127–1129.

63 Seager, R., Lee, L., Henley, J. M. and Wilkinson, K. A. (2020) Mechanisms and roles of mitochondrial localisation and dynamics in neuronal function. Neuronal Signaling **4**, NS20200008.

64 Pilling, A. D., Horiuchi, D., Lively, C. M. and Saxton, W. M. (2006) Kinesin-1 and Dynein Are the Primary Motors for Fast Transport of Mitochondria in Drosophila Motor Axons. MBoC, American Society for Cell Biology (mboc) **17**, 2057–2068.

65 van Spronsen, M., Mikhaylova, M., Lipka, J., Schlager, M. A., van den Heuvel, D. J., Kuijpers, M., Wulf, P. S., Keijzer, N., Demmers, J., Kapitein, L. C., et al.

(2013) TRAK/Milton Motor-Adaptor Proteins Steer Mitochondrial Trafficking to Axons and Dendrites. Neuron **77**, 485–502.

66 Yan, J., Chao, D. L., Toba, S., Koyasako, K., Yasunaga, T., Hirotsune, S. and Shen, K. (2013) Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in Caenorhabditis elegans. eLife (Polleux, F., ed.), eLife Sciences Publications, Ltd **2**, e00133.

67 Howard, J., Hudspeth, A. J. and Vale, R. D. (1989) Movement of microtubules by single kinesin molecules. Nature, Nature Publishing Group **342**, 154–158.

68 Saxton, W. M., Hicks, J., Goldstein, L. S. B. and Raff, E. C. (1991) Kinesin heavy chain is essential for viability and neuromuscular functions in Drosophila, but mutants show no defects in mitosis. Cell **64**, 1093–1102.

69 Campbell, P. D., Shen, K., Sapio, M. R., Glenn, T. D., Talbot, W. S. and Marlow, F. L. (2014) Unique Function of Kinesin Kif5A in Localization of Mitochondria in Axons. J. Neurosci., Society for Neuroscience **34**, 14717–14732.

70 Shang, Z., Zhou, K., Xu, C., Csencsits, R., Cochran, J. C. and Sindelar, C. V. (2014) High-resolution structures of kinesin on microtubules provide a basis for nucleotide-gated force-generation. eLife (Hyman, A. A., ed.), eLife Sciences Publications, Ltd **3**, e04686.

71 Castoldi, M. and Popov, A. V. (2003) Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization–depolymerization in a high-molarity buffer. Protein Expression and Purification **32**, 83–88.

72 Gell, C., Bormuth, V., Brouhard, G. J., Cohen, D. N., Diez, S., Friel, C. T., Helenius, J., Nitzsche, B., Petzold, H., Ribbe, J., et al. (2010) Chapter 13 - Microtubule Dynamics Reconstituted In Vitro and Imaged by Single-Molecule Fluorescence Microscopy. In Methods in Cell Biology (Wilson, L., and Correia, J. J., eds.), pp 221–245, Academic Press.

73 Axelrod, D., Thompson, N. L. and Burghardt, T. P. (1983) Total internal reflection fluorescent microscopy. Journal of Microscopy **129**, 19–28.

74 Bailey, M., Conway, L., Gramlich, M. W., Hawkins, T. L. and Ross, J. L. (2013) Modern methods to interrogate microtubule dynamics. Integrative Biology **5**, 1324–1333.

75 Yildiz, A. and Vale, R. D. (2015) Tracking Movements of the Microtubule Motors Kinesin and Dynein Using Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. Cold Spring Harb Protoc, Cold Spring Harbor Laboratory Press **2015**, pdb.prot086355.

76 Oheim, M., Loerke, D., Chow, R. H. and Stühmer, W. (1999) Evanescent-wave microscopy: a new tool to gain insight into the control of transmitter release. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**, 307–318.

77 Fish, K. N. (2009) Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. Current Protocols in Cytometry **50**, 12.18.1-12.18.13.

78 Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. and Yanagida, T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. Nature, Nature Publishing Group **374**, 555–559.

79 Toseland, C. P. (2013) Fluorescent labeling and modification of proteins. J Chem Biol **6**, 85–95.

80 Mahamdeh, M. and Howard, J. (2019) Implementation of Interference Reflection Microscopy for Label-free, High-speed Imaging of Microtubules. J Vis Exp.

81 Mahamdeh, M., Simmert, S., Luchniak, A., Schäffer, E. and Howard, J. (2018) Label-free high-speed wide-field imaging of single microtubules using interference reflection microscopy. J Microsc **272**, 60–66.

82 Barr, V. A. and Bunnell, S. C. (2009) Interference reflection microscopy. Curr Protoc Cell Biol **Chapter 4**, Unit 4.23.

83 Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods, Nature Publishing Group **9**, 676–682.

84 Kaplan, E. L. and Meier, P. (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. Journal of the American Statistical Association, Taylor & Francis **53**, 457–481.

85 Creed, J. H., Gerke, T. A. and Berglund, A. E. (2020) MatSurv: Survival analysis and visualization in MATLAB. Journal of Open Source Software **5**, 1830.

86 Eddé, B., de Nechaud, B., Denoulet, P. and Gros, F. (1987) Control of isotubulin expression during neuronal differentiation of mouse neuroblastoma and teratocarcinoma cell lines. Developmental Biology **123**, 549–558.

87 Gundersen, G. G. and Bulinski, J. C. (1986) Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin. Eur J Cell Biol **42**, 288–294.

88 Bulinski, J. C., Richards, J. E. and Piperno, G. (1988) Posttranslational modifications of alpha tubulin: detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells. Journal of Cell Biology **106**, 1213–1220.

89 Hammond, J. W., Huang, C.-F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G. and Verhey, K. J. (2009) Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons. MBoC, American Society for Cell Biology (mboc) **21**, 572–583.

90 Dunn, S., Morrison, E. E., Liverpool, T. B., Molina-París, C., Cross, R. A., Alonso, M. C. and Peckham, M. (2008) Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. Journal of Cell Science **121**, 1085–1095.

91 Schnitzer, M. J., Visscher, K. and Block, S. M. (2000) Force production by single kinesin motors. Nat Cell Biol, Nature Publishing Group **2**, 718–723.

92 Magiera, M. M., Singh, P., Gadadhar, S. and Janke, C. (2018) Tubulin Posttranslational Modifications and Emerging Links to Human Disease. Cell **173**, 1323–1327.

Příloha 1 - Purifikace rekombinantního kinesinu-1 (rkin-430-GFP) s histidinovou kotvou z hmyzích buněk

Přehled pufrů:

500 mM Na-fosfátový pufr, pH 7,5:

33,49 g Na2HPO4 + 6,59 g NaH2PO4, doplnit do 500 ml ultračistou vodou, zahřát na 40 °C pro zvýšení rozpustnosti

His Trap zásobní pufr:

Konečná koncentrace	**Chemikálie**	**Zásobní koncentrace**	**Přidat**
10 % (w/v)	Glycerol	100 % (w/v)	100 ml
100 mmol·dm^{-3}	Na-fosfátový pufr, pH 7,5	0,5 mol·dm^{-3}	200 ml
600 mmol·dm^{-3}	KCl	2 mol·dm^{-3}	300 ml
2 mmol·dm^{-3}	$MgCl_2$	1 mol·dm^{-3}	2 ml
0,2 % (w/v)	Polysorbát-20	100 % (w/v)	2 ml
–	ddH_2O	–	396 ml
–	**Konečný objem**	–	**1 l**

2 mol·dm^{-3} Imidazol, pH 7,5:

6,81 g imidazolu (68,08 g·mol^{-1}) rozpustit v ultračisté vodě, konečný objem 50 ml, pH upravit na 7,5 pomocí HCl

His Trap pufr:

Konečná koncentrace	**Chemikálie**	**Zásobní koncentrace**	**Přidat**
–	His Trap zásobní pufr	–	59,8 ml
20 mmol·dm^{-3}	β-merkaptoethanol	14 mol·dm^{-3}	86 µl
0,2 mmol·dm^{-3}	ATP	100 mmol·dm^{-3}	120 µl
–	**Konečný objem**	–	**60 ml**

Lyzační pufr:

Konečná koncentrace	**Chemikálie**	**Zásobní koncentrace**	**Přidat**
–	His Trap pufr	–	25 ml
30 mmol·dm^{-3}	Imidazol	2 mol·dm^{-3}	0,75 ml
1 tableta/50 ml	Inhibitor proteázy		1 tableta
1×	Benzonasa	$4 \cdot 10^4$×	1,25 µl
–	ddH_2O	–	23 ml
–	**Konečný objem**	–	**50 ml**

Promývací pufr:

Konečná koncentrace	**Chemikálie**	**Zásobní koncentrace**	**Přidat**
–	His Trap pufr	–	10 ml
60 mmol·dm^{-3}	Imidazol	2 mol·dm^{-3}	600 µl
–	ddH_2O	–	9,4 ml
–	**Konečný objem**	–	**20 ml**

Eluční pufr:

Konečná koncentrace	**Chemikálie**	**Zásobní koncentrace**	**Přidat**
–	His Trap pufr	–	5 ml
360 mmol·dm^{-3}	Imidazol	2 mol·dm^{-3}	1,8 ml
–	ddH_2O	–	3,2 ml
–	**Konečný objem**	–	**10 ml**

Pracovní postup:

Pozn.: exprese kinesinu-1 byla provedena v Laboratoři strukturní biologie, Biotechnologický ústav AVČR. Buňky s exprimovaným proteinem byly odstředěny a peleta byla uložena při – 80 °C.

Příprava buněčného lyzátu:

1. Rozpustit peletu buněk ve 20 ml lyzačního pufru vychlazeného na 4 °C (ve třech krocích: nejprve přidat 10,5 ml, poté 5 ml a 5 ml).
2. Homogenizovat buněčný roztok pomocí pipety.
3. Centrifugace buněk při 100 000 × *g* po dobu 60 min při 4 °C .

Příprava afinitní chromatografické kolony:

1. Přidat 4 ml 50% suspenze Ni-NTA kuliček do kolony (objem kolony, CV = 2 ml).
2. Ekvilibrace kolony 5 CV ultračisté vody a poté 7,5 CV lyzačního pufru.

Purifikace – 1. část (při 4 °C):

1. Přidat buněčný extrakt do kolony a promíchat s Ni-NTA kuličkami.
2. Přenést směs Ni-NTA kuliček a buněčného extraktu do zkumavky a ponechat na rotační třepačce po dobu 60 min.
3. Směs Ni-NTA kuliček a buněčného extraktu přenést zpět do kolony a odebrat kapalinu, která kolonou protekla.
4. Promýt kolonu 8,5 CV promývacího pufru ve dvou krocích (nejdříve 5 CV a poté 3,5 CV) a odebrat frakce.
5. Eluce kolony 2,5 CV elučního pufru, odebrat jednotlivé frakce.

Odštěpení histidinové kotvy (při 4 °C):

1. Do kolony s 2 ml Ni-NTA a 3 ml promývacího pufru přidat 50 µl proteázy (4 $mg \cdot ml^{-1}$).
2. Přenést směs do zkumavky a inkubovat přes noc na rotační třepačce.

Purifikace – 2. část:

1. Přenést směs po odštěpení histidinové kotvy do kolony a odebrat kapalinu, která protekla.
2. Koncentrovat roztok proteinu v koncentrační koloně (centrifugace při 14 000 × *g*, 5 min při 4 °C) a změřit koncentraci.
3. Provést SDS elektroforézu pro kontrolu čistoty získaného proteinu.
4. Získaný protein uchovávat při – 80 °C.