

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Vývojová a buněčná biologie



RNDr. Barbora Hořejší

TUBULINOVÉ IZOTYPY V PROCESU NÁDOROVÉHO ZVRATU

Disertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Pavel Dráber, CSc.

Akademie věd České republiky

Ústav molekulární genetiky

Oddělení biologie cytoskeletu

Praha, 2011

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Pavlu Dráberovi a celému kolektivu Oddělení biologie cytoskeletu za velice podnětnou a příjemnou spolupráci během doktorského studia. Dík patří i моým rodičům za neustálou podporu a hlídání моých dvou dětí. Vzpomínka patří i mé sestře, která byla vždy моým vzorem a ukazovala mi cestu.

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, 25.5.2011

OBSAH

ZKRATKY.....	6
I. ÚVOD.....	7
I.1. MIKROTUBULY.....	7
I.1.1. Funkce a struktura mikrotubulů	
I.1.2. Izotypy α - a β -tubulinu	
I.1.3. Posttranslační modifikace	
I.1.4. +TIP proteiny	
I.1.5. Dynamika mikrotubulů	
I.1.6. Proteiny interagující s mikrotubuly	
I.2. GAMA-TUBULIN.....	17
1.2.1. Lokalizace a funkce gama-tubulinu	
1.2.2. Izotypy gama-tubulinu	
1.2.3. Gama-tubulinové komplexy	
1.2.4. Regulace gama-tubulinu	
1.2.5. Další funkce gama-tubulinu	
I.3. CENTROZÓM A GENOMOVÁ NESTABILITA.....	25
1.3.1. Centrozómy	
1.3.2. Amplifikace centrozómů	
II. CÍLE PRÁCE.....	29
III. KOMENTÁŘ K PŘILOŽENÝM PUBLIKACÍM.....	30
III.1. Altered cellular distribution and subcellular sorting of gamma-tubulin in diffuse astrocytic gliomas and human glioblastoma cell lines	30
III.2. Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells.....	31
III.3. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary	

acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity.....	32
III.4. Nuclear gamma-tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein C53.....	33
IV. DOPOSUD NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY.....	38
IV.1. Příprava a charakterizace nových monoklonálních protilátek proti GCP2 proteinu.....	38
IV.2. Charakterizace monoklonální protilátky NF-07 rozpoznávající TPX2 protein.....	42
V. ZÁVĚRY.....	48
VI. LITERATURA.....	50
VII. PŘILOŽENÉ PUBLIKACE.....	91
VII.1. Katsetos C.D., Reddy G., Dráberová E., Šmejkalová B., Del Valle L., Ashraf Q., Tadevosyan A., Yelin K., Maraziotis T., Mishra O.P., Mörk S., Legido A., Nissanov J., Baas P.W., de Chadarévian J.P., Dráber P.: <i>Altered cellular distribution and subcellular sorting of gamma-tubulin in diffuse astrocytic gliomas and human glioblastoma cell lines.</i> Journal of Neuropathology and Experimental Neurology , 65:465-477, 2006.	
VII.2. Katsetos C.D., Dráberová E., Šmejkalová B., Reddy G., Bertrand L., de Chadarévian J.P., Legido A., Nissanov J., Baas P.W., Dráber P.: <i>Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells.</i> Neurochemical Research , 32:1387-1398, 2007.	
VII.3. Dráberová E., Del Valle L., Gordon J., Marková V., Šmejkalová B., Bertrand L., de Chadarévian J.P., Agamanolis D.P., Legido A., Khalili K., Dráber P., Katsetos C.D.: <i>Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity.</i> Journal of Neuropathology and Experimental Neurology , 67:341-354, 2008.	

VII.4. Hořejší B., Vinopal. S., Sládková V., Dráberová E., Sulimenko V., Sulimenko T., Vosecká V., Philimonenko A., Hozák P., Katsetos Ch.D. and Dráber P.: *Nuclear gamma-tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein C53*. **Journal of Cellular Physiology**, DOI 10- 0837, 2011.

ZKRATKY

APC	(<u>A</u> denomatous <u>p</u> olyposis <u>c</u> oli)
ATR	kináza (<u>A</u> taxia <u>t</u> elangiectasia and <u>R</u> ad3 related)
ATM	kináza (<u>A</u> taxia <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated)
BRCA1	(<u>b</u> reast <u>c</u> ancer type <u>1</u> susceptibility protein)
CAP-Gly	(<u>c</u> ytoskeletal <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein <u>g</u> lycine-rich)
Cdk	kináza závislá na cyklinu (cyclin- <u>d</u> eendent kinase)
CLASP	(<u>C</u> ytosplasmic <u>l</u> inker <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein)
CLIP	(<u>C</u> ytosplasmic <u>l</u> inker <u>p</u> rotein)
EB	protein vázající se na (+) konce mikrotubulů (<u>e</u> nd <u>b</u> inding protein)
GCP	protein γ -tubulinového komplexu (gamma-tubulin <u>c</u> omplex <u>p</u> rotein)
Grips	(γ -tubulin <u>r</u> ing <u>p</u> roteins)
MAPs	proteiny asociované s mikrotubuly (<u>m</u> icrotubule- <u>a</u> ssociated <u>p</u> roteins)
MCAK	(<u>M</u> itotic <u>c</u> entromere <u>a</u> ssociated <u>k</u> inetin)
MTB	vazebná doména pro mikrotubuly (<u>m</u> icrotubule <u>b</u> inding <u>d</u> omain)
MTOCs	organizační centra mikrotubulů (<u>m</u> icrotubule <u>o</u> rganizing <u>c</u> enters)
PCM	pericentriolární <u>m</u> atrix
PTM	posttranslační modifikace (posttranslational <u>m</u> odification)
SAC	(<u>s</u> pindle <u>a</u> sssembly <u>c</u> heckpoint)
TOG	(<u>t</u> umour <u>o</u> verexpressed <u>g</u> ene)
γ -TuSC	malý γ -tubulinový komplex (γ - <u>t</u> ubulin <u>s</u> mall <u>c</u> omplex)
γ -TuRC	velký γ -tubulinový komplex (γ - <u>t</u> ubulin <u>r</u> ing <u>c</u> omplex)
+TIPs	proteiny vázající se na plus konce mikrotubulů (plus-end interacting proteins)

I. ÚVOD

Buněčný cytoskelet eukaryotní buňky se skládá ze třech typů polymerních struktur: mikrotubulů, mikrofilament a středních filament. Zatímco mikrotubuly a mikrofilamenta jsou tvořeny polymery tubulinu nebo aktinu a jsou vysoce dynamické, střední filamenta jsou spíše stabilní a jejich hlavní charakteristikou je odolnost k mechanickému stresu (Lodish et al., 1995). Tato disertační práce se věnuje mikrotubulům, zvláště pak jejich strukturním a nukleačním proteinům, tubulinům, a změnám při nádorovém zvratu.

I.1. MIKROTUBULY

I.1.1. Funkce a struktura mikrotubulů

Mikrotubuly se vyskytují u všech eukaryot a díky své jedinečné vlastnosti, rychle se reorganizovat dle potřeby buňky, plní řadu funkcí. Ať už se jedná o pohyb pomocí bičků a cílií, vnitrobuněčný transport organel za využití buněčných motorů, buněčný růst, udržení polarity buňky a přenos signálů (Lodish et al., 1995). Mikrotubuly také tvoří specializované orgány jako jsou axonema neuronu, centrioly, telofázní tělísko a dělicí vřetenko. Protože hrají také nezastupitelnou úlohu při buněčném dělení, staly se cílem při léčbě nádorů. Široká skupina chemicky syntetizovaných nebo přírodních látek má za cíl změnit dynamiku mikrotubulů a ve vyšších koncentracích je rozrušit a tím zastavit buněčné dělení. Mikrotubulární antimitotické drogy můžeme rozdělit do dvou základních skupin. První skupina inhibuje polymeraci mikrotubulů při vysokých koncentracích a patří sem např. vinka alkaloidy a kolchicin. Druhou skupinu tvoří látky stabilizující mikrotubuly jako je taxol nebo některé steroidy (Jordan, 2002).

Mikrotubuly se nejčastěji v buňce vyskytují v podobě jednoduchých tubulů, ale mohou vytvářet dublety v cíliích nebo triplety v centriolech a bazálních těliscích (Verhey a Gaertig, 2007). Cytoplazmatické mikrotubuly jsou nukleovány a zakotveny v nukleačních centrech, MTOCs (microtubule organizing centers). Mikrotubuly jsou tvořeny $\alpha\beta$ -tubulinovými heterodimery (o přibližných rozměrech 4 nm x 5 nm x 8 nm), které se spojují v krátký polymer. Ten je z obou stran prodlužován reverzibilní, nekovalentní adicí tubulinových

podjednotek za využití energie z hydrolyzy GTP. Vzniklý polymer (protofilamentum) interaguje laterálně s 12 dalšími filamenti a tvoří tak dutý válec, mikrotubul, o vnějším průměru 25 nm (Tilney et al, 1973) a vnitřním 14 nm (Amos et al., 1978; Kelleher et al., 1978). Jednotlivá protofilamenta jsou vzájemně posunuta a heterodimery tak vytvářejí levotočivou dvoušroubovici. *In vitro* se šroubovice vyskytuje v β formě, to znamená, že není kontinuální a na mikrotubulu vzniká „šev“ (Wade a Hyman, 1997). Ve stěně mikrotubulu jsou mezi sousedními protofilamenty „okna“, o velikosti 1,5 x 2 nm, kterými mohou molekuly pronikat do nitra struktury (Nogales et al., 1999). α, β -tubulinové dimery jsou stabilní a jen ojediněle disociují při obvyklé koncentraci tubulinu v buňce (10-20 μ M).

Kromě α a β existuje v současné době sedm členů tubulinové rodiny. Jedná se o γ -tubulin, nezbytný pro nukleaci mikrotubulů, dále pak delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ) a eta (η) tubulin (Chang and Stearns, 2000; Dutcher and Trabuco, 1998; Oakley, 2000; Ruiz et al., 2000; Vaughan et al., 2000). U *Paramecia* byly dále nalezeny iota (ι), theta (θ) a kappa (κ) tubulin (Dutcher, 2003). Většina z nich se ovšem nevyskytuje u všech eukaryot, tvoří méně než 1% z celkového množství tubulinu, nepolymerují v mikrotubuly, ale uplatňují se při tvorbě centriol a bazálních tělísek.

Délka mikrotubulů se může pohybovat od několika desítek nm až ke 3 mm, např. u žebernatek (*Ctenophora*) (Bermudes et al., 1994). Na povrch mikrotubulů se váže řada proteinů, jako jsou buněčné motory, klasické asociované proteiny (MAPs; microtubule-associated proteins) molekuly signálních a regulačních drah, pro které mikrotubuly představují ideální místa pro vzájemné interakce.

V savčích buňkách představuje tubulin asi 3-4% z celkového množství proteinů, v neuronech je to až 20%. Molekulová hmotnost každé z tubulinových podjednotek je přibližně 55 kDa. Izoelektrický bod tubulinu se pohybuje mezi 5,2-5,8 (Williams et al., 1999). Aminokyselinové sekvence α - a β -tubulinu jsou identické z 30-40%. Pomocí elektronové krystalografie bylo prokázáno, že rovněž jejich terciární struktura, tvořena 3 strukturními doménami, je totožná z více než 90% (Nogales et al., 1998). V N-terminální doméně se váže GTP, následuje intermediální doména a C-terminální doména, která je exponovaná na povrchu mikrotubulu. Právě tato koncová doména, respektive posledních 20 aminokyselin, je zdrojem největší odlišnosti α - a β -tubulinů. Je zodpovědná za funkční specifitu tzv. tubulinových izotypů a je často místem posttranslačních modifikací (Mckean et al., 2001).

Nacházejí se zde vazebná místa pro MAPs.

I.1.2. Izotypy α - a β -tubulinu

U většiny eukaryotních organismů jsou α - i β -tubuliny kódovány násobnými geny. Často se jedná o evolučně konzervativní rozdíly, které odrážejí funkční specifitu izotypů. U člověka existuje osm genů pro α - a sedm pro β -tubulin (Ludueña et al., 1998). Exprese izotypů je tkáňově specifická a mění se v průběhu ontogeneze. Jednotlivé izotypy se liší schopností tvořit mikrotubuly, jejich dynamikou, konformací, GTPázovou aktivitou a interakcí s mikrotubulárními drogami (Jordán a Kamath, 2007; Ludueña a Banerjee, 2008). Bylo prokázáno, že nádorové buňky mění zastoupení jednotlivých izotypů tak, aby získaly rezistenci na léčiva (Haber et al., 1995).

S ohledem na izotypy je větší heterogenita u β -tubulinů. β I-tubulin je exprimován ve většině tkání. β II-tubulin se nachází zejména v mozku, periferních nervech a svalech. Byl nalezen i v jádrech některých typů nádorů (Ranganathan et al., 1996; Yeh a Ludueña, 2004; Wells-Bass et al., 2002). Obvykle je β III-tubulin považován za „marker“ buněk neuronálního původu a znak neuronální diferenciaci. Byl však také detegován u Sertoliho buňkách varlete. Přestože chybí u glií, podpůrných buněk mozku, je přítomen u gliomů. Jeho exprese roste s invazivitou, přispívá k progresi nádorů a je zodpovědná za rezistenci nádorů na cytostatika (Lu a Ludueña, 1993). Zatímco β IVa-tubulin je exprimován pouze v mozku, β IVb-tubulin je nejvíce zastoupen u řasinek a bičíků (Jensen-Smith et al., 2003). β VI-tubulin je specifický pro hematopoetické buňky, megakaryocyty a krevní destičky. Distribuce β V-tubulinu zatím není plně zdokumentována. Jednotlivé izotypy jsou jen částečně zaměnitelné. Např. u *Drosophily* nebyl při spermiogenezi β III-tubulin schopen plně nahradit funkci β II-tubulinu. Naproti tomu exprese izotypů α -tubulinu není tak tkáňově specifická.

Na rozdíl od eukaryot u protist byl nalezen jen omezený počet izotypů α - a β -tubulin. Hlavním zdrojem variability tubulinů u těchto organismů jsou tak posttranslační modifikace (Libusová a Dráber, 2006).

I.1.3. Posttranslační modifikace

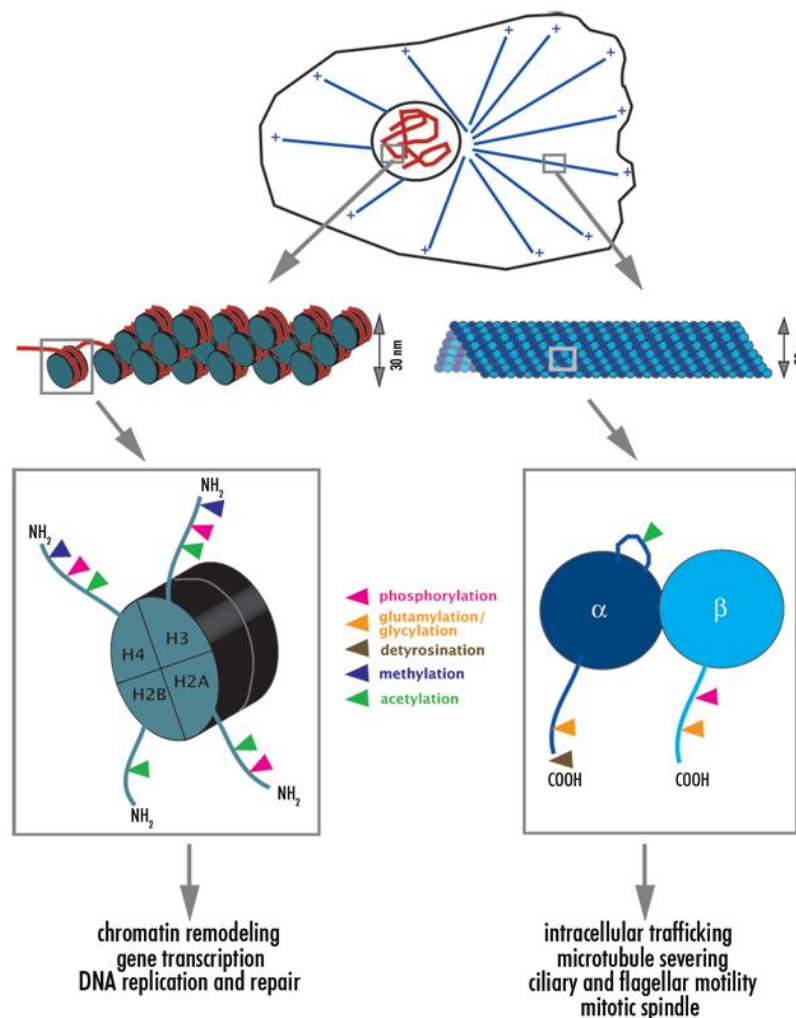
V mozku bylo pomocí izoelektrické fokuzace nalezeno okolo 20 nábojových variant tubulinů (izoforem), což je více než počet známých izotypů tubulinů (Linhartová et al., 1992). Tento fakt odráží existenci posttranslačních modifikací (PTMs; posttranslational modifications) (Ludueña, 1998). Většina PTMs probíhá až po polymeraci a modifikované proteiny nejsou rozloženy rovnoměrně podél mikrotubulu. Silně modifikované, extrémně stabilní mikrotubuly jsou přítomné ve specializovaných strukturách jako jsou centrioly, cílie, bazální tělíska a axony neuronů. PTMs ovlivňují nejen dynamiku ale i funkci mikrotubulů v jednotlivých částech buňky.

Acetylace Lys 40 α -tubulinu je charakteristickým rysem stabilních mikrotubulů (L'Hernault a Rosenbaum, 1985). Objevuje se na polymerovaných mikrotubulech a určuje tak jejich stáří (Gundersen et al., 1984).

Detyrosinace je nejlépe zdokumentovanou modifikací α -tubulinu, typickou pro stabilní mikrotubuly. Dochází při ní k odštěpení C-koncového tyrosinového zbytku. Jedná se o reverzibilní proces, tyrosin může být navázán zpět tubulin tyrosin ligázou (TTL). Detyrosinovaný α -tubulin může být dále převeden na $\Delta 2$ -tubulin ireverzibilním odštěpením glutamátového zbytku (Paturle-Lafanecher et al., 1991). Tato modifikace je již nezvratná a snižuje tak množství α -tubulinu, které může být převedeno do původního nemodifikovaného stavu.

Polyglutamylace (Edde et al., 1990) a polyglycinace (Redeker et al., 1994) představují navázání polypeptidového řetězce glutamátu a glycinu na glutamátový zbytek v C-koncové oblasti α - a β -tubulinu. Zatímco glycinace se uplatňuje v cíliích a bičících savčích buněk (Iftode et al., 2000), polyglutamylace má širší uplatnění. Fosforylace α -, β -tubulinu se objevuje méně často, zřejmě z toho důvodu, že tubulin je sám o sobě silně negativně nabitý a vnesení další záporně nabitě fosfátové skupiny nemusí být dostačující pro změnu struktury tubulinu. α -tubulin může být také ubiquitinován (Solinger et al., 2010). Palmitoylace tubulinu může přispívat k jeho asociaci s membránami (Ozols a Caron, 1997). Je známa také glykosylace α - a β -tubulinu (Hino et al., 2003) a jeho arginylace (Wong et al., 2007). Byla popsána i methylace lysinu α -tubulinu (Iwabata et al., 2005), methylace glutamové kyseliny obou podjednotek (Xiao et al., 2010) a sumoylace α -tubulinu (Rosas-Acosta et al., 2005).

Nitrace α -tubulinu byla popsána u P12 buněk a předpokládá se, že přispívá k regulaci mikrotubulů při neuronální diferenciaci (Cappelletti et al., 2003).



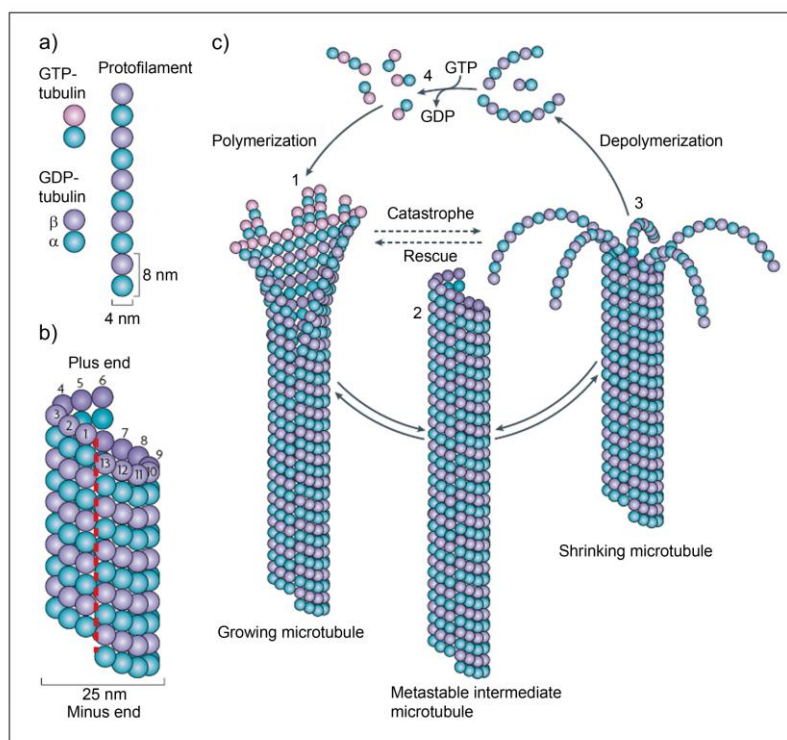
Obr.1. Podobnost histonového a tubulinového kódu u eukaryotní buňky. DNA v jádře (červeně) je navinuta na histony. Výsledný nukleozóm je stočen do vlákna o průměru 30 nm a to může tvořit vyšší struktury. V cytoplazmě interfázních buněk mikrotubuly vybíhají směrem k buněčnému kortexu. Jak histony tak mikrotubuly mohou být posttranslačně modifikovány. Modifikace probíhají na povrchu těchto struktur a ovlivňují vazbu proteinových komplexů. (Verhey a Gaerting; *Cell Cycle* 6:17, 2007)

PTM představují „tubulinový kód“, který je čten faktory vázající se na mikrotubuly (Westermann a Weber, 2000). Místa s PTM se mohou lišit biochemicky i funkčně a mikrotubulům v různých buněčných kompartmentech tak udělují jiné vlastnosti (**Obr.1**). Modifikované mikrotubuly se liší i svou afinitou pro molekulární motory a MAPs, které tak mohou preferenčně nasedat jen na určitou podskupinu mikrotubulů v buňce. Detyrosinace tubulinu ovlivňuje dynamiku tzv. (+) konců mikrotubulů (viz. I.1.4.) tím, že brání nasedání +TIPs (plus-end interacting proteins) proteinů (viz I.1.6.) s vazebným motivem CAP-Gly (cytoskeletal associated protein glycine-rich). Ty se váží jen na tyrosylované mikrotubuly (Peris et al., 2006). Polyglutamylace poskytuje široké spektrum signálů. Ovlivňuje specifitu tubulinových podjednotek délkou postranního řetězce. Má ale i destabilizační vliv prostřednictvím regulace proteinů štěpících mikrotubuly (katanin, spastin). Některé kineziny preferenčně interagují s acetylovanými a detyrosinovanými mikrotubuly. Molekulární motory se váží spíše na stabilní než na dynamická vlákna (Cai et al., 2009).

I.1.4. Dynamika mikrotubulů

Protože $\alpha\beta$ -tubulinové dimery na sebe nasedají orientovaně („head-to-tail“), dochází k polarizaci mikrotubulu, s β -tubulinem exponovaným na (+) konci a α -tubulinem na (-) konci mikrotubulů. Na (+) konci dochází k rychlejší polymeraci a růst mikrotubulů probíhá ve směru od (-) k (+) konci. U většiny buněk je (-) konec zakotven v MTOCs, zatímco (+) konec, směřuje k plazmatické membráně. Výjimku tvoří dendrity neuronů, kde jsou některé mikrotubuly orientovány svými (-) konci směrem k periférii buňky. V závislosti na typu signálu, mikrotubuly procházejí fázemi růstu, stagnace a zkracování. Tento jev je označován jako dynamická nestabilita mikrotubulů a provází ho strukturální změny na (+) konci mikrotubulů. (Desai and Mitchison, 1997). Přechod z růstu ke zkracování je nazýván „katastrofou“ a následný růst se nazývá „záchrana“. Energie z GTP není nutná k sestavení mikrotubulu jako takového, ale k přechodu z fáze růstu do fáze zkracování. Rostoucí konec mikrotubulu je flexibilní a mění svou konformaci ze slabě zahnuté do rovné. Předpokládá se, že hydrolyza GTP mění tvar protofilament a vede k většímu prohnutí u formy vázající GDP (Wang a Nogales, 2005). Rostoucí mikrotubul je kryt „čepičkou GTP“, jejíž ztráta vede k rychlé depolymeraci. Na zkracujícím se konci jsou jednotlivá protofilamenta ohnuta směrem k (-) konci a mají typické spirálové uspořádání. Tato konformační změna

destabilizuje příčné vazby mezi jednotlivými protofilamenty. Cyklus depolymerace je zakončen výměnou GDP za GTP (**Obr.2**).



Obr.2. Struktura mikrotubulů a dynamická nestabilita

(a) Mikrotubuly jsou složeny z $\alpha\beta$ -tubulinových heterodimerů, které nasedají orientovaně (head-to-tail) a vytváří protofilamentum. (b) In vivo je stěna mikrotubulů tvořena 13 protofilamenty. Diskontinuita ve stěně mikrotubulu je označena červenou přerušovanou čarou. (c) Dynamická nestabilita. Polymerace mikrotubulů je zahájena s tubuliny vázající GTP. Hydrolýzou GTP dochází ke změně konformace protofilament. Tyto se proto více ohýbají, než je tomu u protofilament vázajících GTP. Rostoucí mikrotubul je zakončen „GTP čepičkou“, která pomáhá stabilizovat mikrotubul (1). Uzavřením mikrotubulu dochází k tvorbě tupě zakončené přechodné struktury (2), která může procházet fází stagnace, dalšího růstu nebo depolymerace. Zkracující se mikrotubul má typické spirální uspořádání protofilament (3). Cyklus polymerace–depolymerace je završen výměnou GDP za GTP (4). (Akhmanova a Steinmetz; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 309-322, 2008).

U mikrotubulů, které nejsou zakotveny v centrozómech, dochází ke specifické fluktuaci tubulinu. Jestliže koncentrace tubulinových dimerů překročí tzv. kritickou koncentraci (C_c),

tubulin polymeruje v mikrotubuly, pod kritickou koncentrací dochází k depolymeraci. V případě, že se koncentrace na obou koncích liší, vyšší Cc na (-) konci vede ke zkracování polymeru, zatímco nižší Cc na (+) konci k pomalému růstu (Panda et al., 1999). U mikrotubulů s volnými konci tak dochází ke kontinuálnímu posunu tubulinu z (+) na (-) konec. Jev je označován jako „treadmilling“ a je charakteristický pro dělicí vřeténko, jehož konce, přestože směřují k pólům a kinetochorům, zůstávají volně přístupné pro přesun tubulinu.

Stabilita mikrotubulů je značně variabilní. Na rozdíl od rigidních cílů a bičků jsou cytoplazmatické mikrotubuly dynamické. Tato vlastnost umožňuje mikrotubulům „prozkoumávat“ prostor buňky a vyhledávat cíle jako jsou kinetochory, buněčný kortex a aktinová filamenta (Desai a Mitchison., 1997). V populaci cytoplazmatických mikrotubulů rozlišujeme vlákna stabilní s poločasem rozpadu kolem 1-2 hod a dynamická s poločasem rozpadu 5-15 min (Saxton et al., 1984). Reorganizace je klíčová při buněčném dělení, kdy dochází k tvorbě dělicího vřeténka, napojování na kinetochory a přesun chromozómů k pólům buňky. Astrální mikrotubuly určují pozici dělicího vřeténka tak, aby došlo k rovnoměrné distribuci organel do dceřiných buněk (Wittman et al., 2001).

Stabilita a dynamika mikrotubulů je regulována několika mechanismy: (1) expresí různých izotypů tubulinu a jejich posttranslační modifikací, (2) stabilizací mikrotubulů asociovanými proteiny, (3) regulací dynamiky jejich (+) konců, (4) nukleací a zakotvením mikrotubulů v organizačních centrech a (5) vazbou různých ligandů. Často se jedná o cytostatika (např. vinblastin, kolchicin, deriváty taxolu), která potlačují dynamiku mikrotubulů a zasahují tak do dělení buňky.

I.1.5. Proteiny interagující s mikrotubuly

Na mikrotubuly se váže řada proteinů, které ovlivňují jejich růst, stabilitu a interakce s organelami. Buněčné motory (kineziny a dyneiny) využívají mikrotubuly k intracelulárnímu transportu. Další skupinu tvoří klasické proteiny interagující s mikrotubuly (MAPs). Často nesou kladný náboj, který usnadňuje interakci se záporně nabitými mikrotubuly. Strukturální MAPs jsou termostabilní a obsahují konzervativní MTB (microtubule binding) doménu tvořenou 3 nebo 4 vazebnými místy pro mikrotubuly. Zatímco MAPs nasedají svými tubulin-

vazebnými doménami podél protofilament, zbytek molekuly ční do prostoru a propojuje tak mikrotubuly s membránami, jinými mikrotubuly nebo dalšími cytoskeletálními polymery (Chapin a Bulinski, 1992). Celá skupina má stabilizační vliv a uplatňuje se v regulaci cytoskeletu. Prodlužují poločas rozpadu mikrotubulů z několika minut na hodiny. Dále jsou zodpovědné za vazbu s mikrofilamenty, signálními proteiny a regulaci buněčného transportu. MAP často vznikají alternativním sestřihem mRNA transkribované z jednoho genu (Chung et al., 1996). Skupina asociovaných proteinů MAP2/tau zahrnuje MAP2 (A,B,C), MAP4 a tau protein. Během ontogeneze se může zastoupení MAPs v organismu měnit (Mavilia et al., 1993). Zatímco MAP2C a MAP2D se nalézají převážně v embryonálním mozku, u dospělých jedinců jsou nahrazeny MAP2A a MAP2B. Podobně i rodina MAP1 (A,B,C) stabilizuje mikrotubuly. MAP1A a MAP1B jsou exprimovány zvláště v neuronech, kde se podílejí na tvorbě a růstu axonů a dendritů.

Nově popsanou skupinou MAPs jsou proteiny štěpící mikrotubuly, tvořící tak nové (+) a (–) konce mikrotubulů. Tvorba krátkých fragmentů mikrotubulů bez potřeby depolymerovat mikrotubuly je důležitá při reorganizaci cytoskeletu (Zhang et al., 2007). Patří sem např. katanin z rodiny AAA (ATPases associated with various cellular activities) s 60 kDa katalytickou a 80 kDa regulační podjednotkou. Uplatňuje se v mitóze a neuronální diferenciaci. Spastin, další člen této rodiny, je zajímavý tím, že mutace jeho genu je hlavní příčinou spastické paraplegie. Schopnost štěpit mikrotubuly mají také fidgetin a VPS4 proteiny (Roll-Mecak a McNally, 2010). Rozpadu mikrotubulů může být také dosaženo vyvázáním tubulinových dimerů. Stathmin (onkoprotein 18) se váže na tubulin a snižuje tak dostupnost volného tubulinu pro polymeraci. Dochází k potlačení růstu mikrotubulů a zvýšení frekvence depolymerace. Při tvorbě dělicího vřeténka dochází k inhibici tohoto proteinu mitotickými kinázami. V mnoha nádorových buňkách byla zjištěna vysoká hladina stathminu (Baldassarre et al., 2005).

I.1.6. +TIP proteiny

Plus konce mikrotubulů jsou vhodným místem pro regulaci dynamiky mikrotubulů, která se děje i prostřednictvím interakce se specifickou skupinou proteinů označovaných jako proteiny vázající se na plus-konce mikrotubulů (+TIPs.) Tyto proteiny se vyskytují u všech eukaryot a

od ostatních MAPs se liší tím, že se koncentrují na rostoucích koncích mikrotubulů. +TIPs rozpoznávají a interagují s (+) konci mikrotubulů přímo nebo nepřímo v komplexech s jinými proteiny, které je dopraví k (+) konci mikrotubulu (Schuyler a Pellman, 2001).

+TIPs tvoří skupinu strukturně i funkčně rozdílných proteinů, která zahrnuje signální a adaptorové proteiny a některé mikrotubulární motory. Mezi klasické +TIPs patří CLIP-170 (cytoplasmic linker protein), EB (end binding) proteiny, podjednotka dynaktinu p150^{Glued}, CLASP (cytoplasmic linker associated protein), tumor supresor APC (Adenomatous polyposis coli), kinezin MCAK (mitotic centromere-associated kinesin) a další (Diamantopoulos et al., 1999; Perez al., 1999; Hoogenraad et al., 2000). EB1 je malý dimerický protein dekorující jen rostoucí konce mikrotubulů a ze „stárnoucích mikrotubulů“ rychle odpadá (Bieling et al., 2007). EB proteiny mají vysoce konzervativní N-terminální doménu CH (calponin-homology) (Korenbaum a Rivero, 2002), která je zodpovědná za vazbu na mikrotubuly (Hayashi a Ikura, 2003). Dále obsahují jedinečnou EB doménu a na C-konci EEY/F motiv (Komarova et al., 2005). Přes tyto domény na sebe EB proteiny váží další +TIPs a tvoří tak základ celého komplexu (Akhmanova a Steihmetz, 2010). Např. STIM1 (stromal interacting molecule) a CDK5RAP2 interagují s mikrotubuly pouze prostřednictvím EB proteinů (Fong et al., 2009).

Další velká skupina proteinů obsahuje tzv. SxIP motiv, který má funkci lokalizačního signálu na (+) konec mikrotubulů (tzv. MtLS; microtubule localization signal). Je rozpoznáván EB doménou (Honnappa et al., 2009). Patří sem APC, spectraplakín, MACF (microtubule-actin crosslinking factor), MCAK (Akhmanova a Steihmetz, 2010).

Charakteristickým motivem +TIPs je i TOG-like doména (Colonic, hepatic tumor over-expressed gene) dlouhá 250 aminokyselin. Mezi TOG proteiny se řadí, XMAP215/Dis1 a CLASP. Polymeráza XMAP215 urychluje růst mikrotubulů až desetinásobně a to skokově, v jednom kroku o více než 60 nm (Kerssemakers et al., 2006). Pro CLIP a velkou podjednotku dynaktinového komplexu p150^{glued} je typická CAP-Gly doména.

Kromě regulace dynamiky mikrotubulů katalyzují +TIPs i adici tubulinu na (+) konci (XMAP215), urychlují „katastrofu“ mikrotubulů (MCAK) nebo jejich „záchranu“ (CLIP170). Vytvářejí spojení mezi konci mikrotubulů a dalšími strukturami jako je buněčný kortex (CLASP, APC, MACF), mikrofilamenta (spektroplakín, Tea1-Tea4). Dále koordinují napojování mikrotubulů k mitotickým kinetochorům (Dam1, CLIP170, CLASP, dynein). Pomáhají nakládat vezikly při buněčném transportu směřujícím k (-) konci (CLIP170,

dynactin) nebo další mikrotubuly např. při tvorbě dělicího vřeténka (Akhmanova a Steihmetz, 2010).

Některé +TIPs byly popsány i na centrozómu a jiných organizačních centrech. Zakotvují a stabilizují zde mikrotubuly a podílejí se i na jejich nukleaci (Hestermann et al., 2002). EB1 společně s APC se nalézá na mateřské centriole a to zcela nezávisle na přítomnosti mikrotubulů (Louie et al., 2004). K organizaci mikrotubulů dále přispívají FOP a CAP350 (Yan et al., 2006), CDKRAP2, který se váže přímo na γ -TuRC (γ -tubulin ring complex) (Fong et al., 2009). Na pólech mitotického vřeténka byl nalezen i XMAP215 (Peset et al., 2005). +TIPs byly lokalizovány i na membránách Golgiho aparátu. Jedná se o CLASP a vazebný faktor γ -TuRC, AKAP450/CG-NAP (A-kinase-associated protein) (Efimov et al., 2007). Na kinetochorech byl popsán Dgt6 protein, podjednotka augminu, vazebného proteinu γ -TuRC (Bucciarelli et al., 2009).

I.2. GAMA-TUBULIN

1.2.1. Lokalizace a funkce gama-tubulinu

γ -Tubulin byl nalezen při vyhledávání supresorů β -tubulinové mutace u *Aspergillus nidulans* (Oakley and Oakley, 1989). Následně byl výskyt potvrzen u všech eukaryot (Joshi et al., 1992, Stearns et al., 1991). γ -Tubulin se vyskytuje na centrozómech v interfázních buňkách, na pólech mitotického vřeténka (LaJoie-Mezanec et al., 1994; Nováková et al., 1996) a na telofázním tělísku (Julian et al., 1993). U acentriolárních rostlin se γ -tubulin nalézá podél interfázních mikrotubulů, na pólech mitotického vřeténka, na jaderné membráně a fragmoplastu. Byl detekován rovněž na acentriolárním vřeténku myších oocytů (Palacios et al., 1993). V polarizovaných buňkách epitelu se γ -tubulin nachází pod apikální membránou v bazálních tělískách (Muresan et al., 1993). Byl také lokalizován na marginálním svazku mikrotubulů kuřecích erytrocytů (Linhartová et al., 2002), podél mikrotubulů axonem protozoí (Libusová et al., 2004) a na antiparalelních svazcích mikrotubulů kvasinek (Janson et al., 2005). Byl popsán i na membránách (Dryková et al., 2003; Macůrek et al., 2008) včetně Golgiho aparátu (Chabin-Brion et al., 2001). Vyskytuje se i na kinetochorech a v jádře rostlin (Binarová et al., 1998 a 2000). γ -Tubulin byl nalezen i v jádře savčích buněk se zvýšenou

expresí Rad51 proteinu, s kterým kolokalizoval (Lesca et al., 2005).

Kolem 80% z celkového množství se γ -tubulin nalézá v cytoplazmě. Hladina γ -tubulinu v centrozómu je relativně stejná během interfáze, ale dramaticky se zvyšuje v průběhu mitózy, kdy se zvětšuje velikost a nukleační kapacita centrozómu, a opět klesá po skončení dělení. Výměna γ -tubulinu mezi jednotlivými kompartmenty probíhá během celého buněčného cyklu nezávisle na mikrotubulech (Khodjakov a Rieder, 1999).

γ -tubulin je klíčový pro nukleaci mikrotubulů. Jeho role byla demonstrována mutací *mipA* u *A. nidulans*, která způsobila výrazné snížení počtu mikrotubulů, došlo k jejich zkrácení a absenci dělicího vřeténka (Oakley et al., 1990). Jestliže byla do savčích buněk mikroinjikována protilátka proti γ -tubulinu, došlo k zablokování růstu mikrotubulů po jejich depolymeraci. Z toho rovněž vyplývá, že γ -tubulin je zodpovědný za nukleaci mikrotubulů (Joshi et al., 1992). Funkce γ -tubulinu je zachována u různých organismů. γ -tubulin člověka je schopný plně substituovat funkci γ -tubulinu kvasinky (Horio and Oakley, 1994). Rovněž deplece pomocí siRNA u U2OS buněk potvrdila nezastupitelnou funkci γ -tubulinu pro tvorbu cytoplazmatických mikrotubulů a dělicího vřeténka (Lüders et al., 2006).

I.2.2. Izotypy gama-tubulinu

Homologie mezi γ -tubulin a $\alpha\beta$ -tubuliny dosahuje 30%. Množství γ -tubulinu u savčích buněk představuje méně než 1% z celkového množství tubulinových heterodimerů (Stearns et al., 1991). U *A. nidulans* je mRNA pro γ -tubulin 20x méně než mRNA pro β -tubulin (Oakley and Oakley, 1989). γ -tubulin je vysoce konzervativní napříč celou škálou organismů. Homologie mezi *A. nidulans* a člověkem dosahuje 67,4% (Zheng et al., 1995), u obratlovců je ještě vyšší, např. mezi člověkem a *X. laevis* dosahuje až 98%. (Oakley a Akkari, 1999). Výjimkou jsou kvasinky *S. cerevisiae*, kde se γ -tubulin (produkt genu *Tub4*) výrazně odlišuje od ostatních organismů, homologie dosahuje pouze 35,6% (Sobel and Snyder, 1995) a γ -tubulin *C. elegans*, kde homologie dosahuje 40-45%. Otázkou zůstává, zda tato odlišnost odráží i funkční různorodost. U evolučně odlišných organismů jako je *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 1994), *Zea mays* (Lopez et al., 1995), *Physarum polycephalum* (Lajoie-Mazenec et al., 1996), *Euplotes crassus* (Tan and Heckmann, 1998), *Paramecium tetraurelia* (Ruiz et al.,

1999), *Drosophila melanogaster* (Wilson and Borisy, 1997), člověk (Wise et al., 2000) a myš (Yuba-Kubo et al., 2005) byly nalezeny dva izotypy γ -tubulinu. Detailní fylogenetická analýza ukázala, že γ -tubulinové geny vznikly duplikací ze společného genu a tato duplikace proběhla u obratlovců nezávisle na duplikaci genu u *Drosophily* (Yuba-Kubo et al., 2005). U *D. melanogaster* existují 2 geny, γ Tub23C a γ Tub37C (Tavosanis et al., 1997). Zatímco γ Tub23C hraje roli v organizaci mikrotubulů při mitóze a samčí meióze (Sunkel et al., 1995), γ Tub37C je důležitý při samičí meióze (Llamazares et al., 1999). Přestože oba izotypy mají jiné biochemické vlastnosti a jinou tkáňovou expresi, jsou vzájemně zaměnitelné. U myši byly popsány rovněž dva izotypy. TUBG1 je exprimovaný ve všech tkáních a embrya bez TUB1 umírají ještě před implantací do dělohy z důvodů abnormálního dělicího vřeténka (Yuba-Kubo et al., 2005). Exprese TUBG2 je u myši vyšší v tkáních mozku, s výjimkou mozečku. U TUBG2^{-/-} myši nebyla snížena plodnost, ale byly zaznamenány poruchy ve vnímání cirkadiálního rytmu a v reakcích na bolestivé podněty (Yuba-Kubo, osobní sdělení). U člověka je TUBG1 a TUBG2 lokalizován ve vzdálenosti 20 kB v oblasti q21 na chromozómu 17, pseudogen TUBG1P pak na chromozómu 7 (Wise et al., 2000). Homologie proteinů kódovaných gen TUBG1 a TUBG2 dosahuje až 97,3%. Proteiny se liší pouze 12 aminokyselinami na C konci molekul. Přestože jsou proteiny téměř identické, nejsou *in vivo* funkčně ekvivalentní. Předpokládá se, že TUBG1 představuje u myši konvenční γ -tubulin, zatímco TUBG2 by mohl mít speciální roli v mozku (Yuba-Kubo et al., 2005).

γ -Tubulin váže GTP s podobnou afinitou jako β -tubulin (60nM) s tím, že upřednostňuje vazbu GDP před GTP. γ -Tubulin také mění konformaci v závislosti na vazbě α -tubulinu a/nebo hydrolyze GTP. Tato změna konformace má vliv na schopnost γ -tubulinu nukleovat mikrotubuly. Ze znalosti krystalové struktury bylo odvozeno, že molekuly γ -tubulinu jsou schopné vzájemné laterální interakce, a to je předurčuje pro jejich roli při nukleaci mikrotubulů (Aldaz et al., 2005).

I.2.3. Gama-tubulinové komplexy

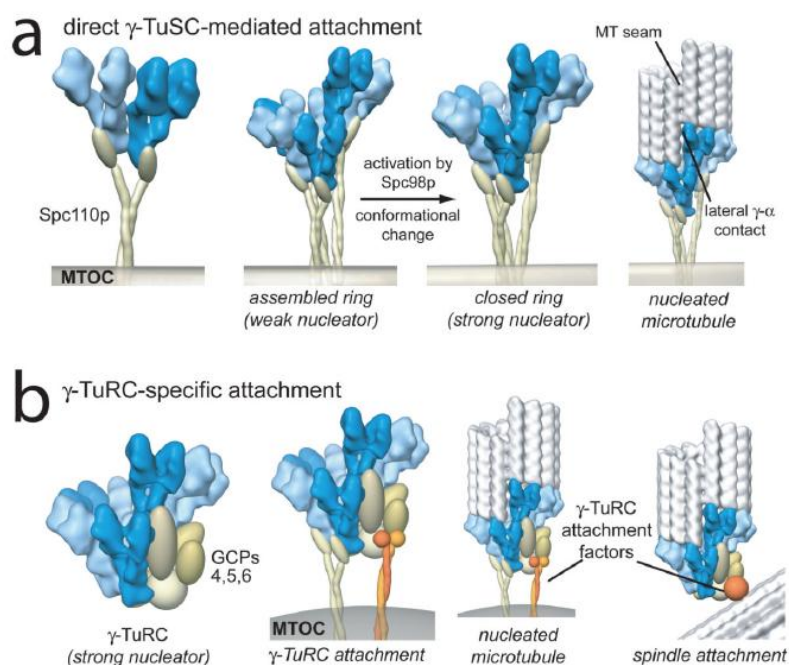
γ -Tubulin se nachází na MTOC ve formě multiproteinového komplexu (γ -TuC: γ -tubulin complex). U pučivých kvasinek velikost komplexu závisí na podmínkách přípravy buněčného extraktu (Vinh et al., 2002). Tub4 komplex, o velikosti 9S, se skládá ze dvou molekul γ -

tubulinu, jedné molekuly Spc97 (SPC: spindle pole body component) a jedné molekuly Spc98 proteinu (Geissler et al., 1996). Větší 22S komplex je zřejmě oligomerem a jeho přesné složení není známo (Vinh et al., 2002). U poltívkých kvasinek γ -tubulinový komplex migruje nejčastěji jako 22S (Fujita et al., 2002) a skládá se z Tug1/Gtb1 (γ -tubulin), ortologů Spc97 a Spc98 označovaných Alp4 a Alp6 (Vardy and Toda, 2000) a nejméně dvou dalších proteinů Gfh1 a Alp16 (Fujita et al., 2002). U kvasinky *S.cerevisiae* byla pomocí elektronové mikroskopie určena struktura γ -TuSC (γ -tubulin small complex) s rozlišením 25-Å. Bylo zjištěno, že γ -TuSC má tvar písmene ypsilon, skládá se ze dvou ramen, tvořenými Spc97 a Spc98, a γ -tubuliny se nacházejí na koncích obou ramen. Na C-terminální doméně Spc97 a Spc98 jsou konzervativní motivy grip1 a grip2, které jsou vazebnými místy pro Tub4p (Kollman et al., 2008).

U buněk živočichů roznáváme dva základní komplexy: malý (γ -TuSC) a velký (γ -TuRC). Pro označení podjednotek γ -TuRC se nejčastěji používá těchto dvou nomenklatur: Grips (γ -tubulin ring proteins, např. Dgrip u *Drosophily* a Xgrip u *Xenopa*) a GCPs (γ -tubulin complex proteins). γ -TuSC je analogický Tub4p komplexu pučivých kvasinek, sedimentační koeficient je kolem 32S u člověka a tvoří ho 2 molekuly γ -tubulinu, 1 molekula ortologu Spc97 (označovaná jako Dgrip84 u *Drosophily*, Xgrip110 u *Xenopa* a hGCP2 u člověka) a 1 molekula ortologu Spc98 (označovaná jako Dgrip91 u *Drosophily*, Xgrip109 u *Xenopa* a hGCP3 u člověka). Pomocí analýzy γ -TuSCs a γ -TuRCs izolovaných z embryí *Drosophily* bylo zjištěno, že γ -TuRC je tvořen několika γ -TuSC a dalšími asociovanými proteiny; Dgrip75, Dgrip128, Dgrip163 a Dgp71-WD (Oegema et al., 1999). Současný model uspořádání Grip v γ -TuRC je takový, že soudržnost jednotlivých γ -TuSCs je zajištěna „čepičkou“ tvořenou asociovanými proteiny (Wiese and Zheng, 2006). Tyto proteiny jsou konzervativní a obsahují rovněž konzervativní sekvenční motiv grip (Gunawardane et al., 2000). Vyjimku tvoří Dgp71WD/GCP-WD/Nedd1, který tento motiv neobsahuje a není nedílnou součástí γ -TuRC (Haren et al., 2006). Přestože γ -TuRCs jsou tvořeny γ -tubulinem a proteiny s grip motivy, složení není totožné u všech organizmů.

Byly navrženy dva modely vysvětlující úlohu γ -TuRC při nukleaci mikrotubulů. Prvním z nich je templátový model, předpokládající, že γ -TuRC funguje jako vzor pro sestavování podjednotek tubulinu (Zheng et al., 1995). V tomto případě sousedící molekuly γ -tubulinu

interagují laterálně za vzniku otevřeného kruhu, na který nasedají $\alpha\beta$ -tubulinové dimery. Na druhou stranu, model protofilament předpokládá vznik krátkého vlákna z molekul γ -tubulinu, na který by se vázaly $\alpha\beta$ -tubulinové dimery. (Erickson and Stoffler, 1996). Za využití kryoelektronové mikroskopie bylo prokázáno, že samotné γ -TuSC jsou schopné tvořit prstenec pro nukleaci 13ti protofilament (Kollman et al., 2010) i bez přispění dalších asociovaných proteinů (**Obr.3**). Adaptorový protein Spc110 prstenec stabilizuje a umožňuje tvorbu polymerů. Proteiny γ -TuRC zřejmě nefungují jako pomocné lešení pro nukleaci, ale spíše stabilizují nukleační prstenec tvořený γ -TuSC, podporují jeho nukleační aktivitu a zakotvují do MTOC. Toto zjištění je v souladu s předchozím nálezem, kdy deplece proteinů γ -TuRC nezměnila nukleační aktivitu centrozómů (Vérollet et al., 2006).



Obr. 3. Modely zakotvení a aktivace γ -tubulinového nukleačního komplexu.

(a) Organismy bez komponent γ -TuRC (*Saccharomyces*). Spc110p, přímo váže γ -TuSC k organizačnímu centru. Předpokládá se, že konformační změna Spc98 napomáhá nukleaci přeskupením γ -tubulinu v přesný templát pro mikrotubuly. (b) Organismy obsahující kompletní γ -TuRC. Aktivní komplexy se váží přímo k organizačním centrům přes γ -TuSC. Lokalizace γ -TuRC u dělicího vřeténka je zprostředkována specifickými proteiny γ -TuRC. V obou případech je geometrie nukleačního templátu určena interakcemi γ -TuSC (Kollman et al. ; *Nature* **12**; 466, 2010).

U živočišných buněk přispívá k nukleaci mikrotubulů spíše γ -TuRC, než γ -TuSC. Dokládá to několik experimentů: (1) purifikovaný γ -TuRC má 30x vyšší nukleační aktivitu než purifikovaný γ -TuSC (Oegema et al., 1999); (2) purifikovaný γ -TuRC zůstává navázaný na (-) koncích mikrotubulů (Keating and Borisy, 2000); (3) všechny podjednotky γ -TuRC byly nalezeny na centrozómu.

Důležitou roli při směřování γ -TuRC na centrozóm hraje GCP-WD/Nedd1 (Haren et al., 2006). Zatímco vazba γ -TuRC s mikrotubuly dělicího vřeténka vyžaduje fosforylaci GCP-WD, při interakci γ -TuRC s centrozómem není fosforylace GCP-WD nezbytná (Lüders et al., 2006).

I.2.4. Regulace gama-tubulinu

Bylo prokázáno, že u *S. cerevisiae* je γ -tubulin fosforylován neznámou kinázou v G1 fázi a defosforylován v mitóze (Vogel et al., 2001). K fosforylaci dochází na tyrozinu v pozici 445 u *S. cerevisiae*. Tento tyrozinový zbytek je součástí aminokyselinového motivu nezbytného pro organizaci mikrotubulů u *S. cerevisiae*. (Vogel and Snyder, 2000). Deplece tohoto motivu vede k poruchám v lokalizaci Bim1 (homolog EB1) a Kar9 proteinů na SPB (Cuschieri et al., 2006). Další fosforylační místa na TuB4 byla nalezena hmotnostní spektrometrií na serinech v pozicích 74, 100 a 360 (Lin et al. 2011). U savčích buněk byla nalezena fosforylace γ -tubulinu na serinu v pozici 131 v přítomnosti SADB kináz, které se nacházejí na centrozómech a regulují jejich duplikaci (Alvarado-Kristenson et al., 2009). Rovněž protein tyrosin kinázy mohou ovlivňovat nukleaci mikrotubulů (Colello et al., 2010; Sulimenko et al., 2006). Kináza Scr může regulovat akumulaci γ -tubulinu v MTOC několika způsoby: (1) podporovat tvorbu γ -TuRC a jeho nasedání na centrozóm, (2) fosforylovat součást γ -TuRC a ovlivnit interakci s NEDD1/GCP-WD (Luders et al., 2006), (3) nepřímo regulovat aktivitu PCM nebo proteinů zakotvujících γ -TuRC. Významná je i tvorba komplexů γ -tubulinu s dalšími kinázami. U myších buněk byl izolován komplex γ,α,β -tubulinu s PLK (polo-like kinase) o velikosti 669 a 2500 kDa (Feng et al., 1999). U *Drosophily* byla v γ -TuRC detekována Wee1 kináza, která fosforyluje γ -tubulin (Stumpff et al., 2005). V lidských buňkách byly popsány komplexy obsahující MARK4 (microtubule affinity-regulating

kinase 4) a Syk tyrozin kinázu (Trinczek et al., 2004; Zyss et al., 2005). V lyzátu buněk hlodavců pak byly identifikovány komplexy γ -tubulinu s PI3-kinázou, Lyn a Fyn (Kapeller et al., 1995; Dráberová et al., 1999; Kukharsky et al., 2004).

γ -Tubulin je ubiquitinylován na lyzinu v pozici 48 a 344 ubiquitin ligázou BRCA1/BARD1 (Starita et al., 2004). Mutace lyzinu 48 vede k amplifikaci centrozómů. Rovněž *in vitro*, doména BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein) (504-803) je schopná interakce s γ -tubulinem (Zhao et al., 2005). Dále bylo prokázáno, že γ -tubulin koprecipituje ubiquitin ligázu parkin (Rommelaere et al., 2001). γ -Tubulin je sbalován pomocí TCP-1/c-cpN chaperoninu (Melki et al., 1993). Nesbalený nebo špatně sbalený γ -tubulin je dopravován do tohoto komplexu pomocí heterohexamerního chaperonu prefoldinu (Vainberg et al., 1998). Vazebný motiv pro prefoldin, lokalizovaným v pozici mezi aminokyselinami 10-35 a 219-253, byl také identifikován u dalších členů tubulinové rodiny a u proteinů příslušejícím k aktinům (Rommelaere et al., 2001). Další protein, UXT, se strukturním motivem prefoldinu je schopný interakce s γ -tubulinem. Jeho zvýšená exprese vede ke zborcení struktury centrozómu a byla pozorována u některých lidských nádorů (Zhao et al., 2005).

Mezi další proteiny interagující s γ -tubulinu patří proteiny PCM: pericentrin, AKAP450/CG-NAP, ninein, Nlp1 (ninein-like protein 1) (Dictenberg et al., 1998; Takahashi et al., 2002; Mogensen et al., 2000; Casenghi et al., 2003). Ty upevňují γ -TuRCs na centrozóm ať už přímou interakcí s γ -tubulinem nebo pomocí GCP proteinů (Takahashi et al., 2002). Bylo zjištěno, že γ -tubulin dále koprecipituje protein z Golgiho membrány GMAP210 a protein CPAP/CENP-J (Hung et al., 2000; Ríos et al., 2004). Tento výčet ukazuje, že funkce γ -tubulinu mohou být modulovány nejen posttranslačními modifikacemi, ale i interakcemi s dalšími proteiny.

I.2.5. Další funkce gama-tubulinu

Kromě nukleace mikrotubulů se γ -tubulin a γ -TuRC podílejí na regulaci buněčného cyklu, zvláště při ukončení mitózy a při cytokinezi a to nezávisle na mikrotubulech (Cuschieri et al., 2007). Byla popsána termosenzitivní mutace mipAD159 u *A. nidulans*, která vedla k poruchám při rozchodu chromozómů a dokončení mitózy, přestože nukleace mikrotubulů

v interfázních buňkách i tvorba dělicího vřeténka nebyla porušena (Prigozhina et al., 2004). U těchto buněk nedocházelo k akumulaci cyklinu B/Cdk1 (cyclin dependent kinase) a fosfatázy Ancdc14 v jádrech, a buňky tak nemohly projít S a M fází buněčného cyklu. Ukázalo se, že nedochází k aktivaci APC/C (anaphase-promoting-complex/cyclosome) ubiquitin ligázy, která posílá mitotické proteiny k degradaci a přispívá tím k ukončení mitotického dělení. APC/C je obvykle inaktivován v interfázi tak, aby mohla být zahájena replikace DNA a syntéza mitotických proteinů. Tento krok byl u mipAD159 mutanta potlačen. Otázkou zůstává, jak γ -tubulin inaktivuje APC/C u normálních buněk (Nayak et al., 2010). V přítomnosti mutovaného γ -tubulinu došlo u *A. nidulans* k poruchám v průběhu pozdních fází mitózy, respektive anafáze A a anafáze B a rozdělení chromozómů (Prigozhina et al., 2004). U *A. thaliana* nízká hladina γ -tubulinu sice nezablokovala mitotické dělení, ale byl ovlivněn průběh cytokineze (Binarová et al., 2006).

γ -Tubulinové komplexy dále monitorují kontrolní body buněčného cyklu a sledují integritu dělicího vřeténka. U zdravých buněk existuje kontrolní mechanismus (SAC; spindle assembly checkpoint), který v případě vzniku aberantního dělicího vřeténka zastaví buněčný cyklus. Bylo zjištěno, že některé mutace γ -tubulinu umožňují obejít tento kontrolní bod (Hendrickson et al., 2001). Jestliže jsou S2 buňky *Drosophily* ovlivněny kolchicinem, aktivuje se SAC mechanismus a dajde k zablokování mitózy. V případě, že byl v buňkách depletován Dgrip84 protein a zároveň aplikován kolchicin, došlo k výraznému zvýšení mitotického indexu. To dokazuje, že i přes poškození dělicího vřeténka, mohly buňky projít přes kontrolu SAC (Colombié et al., 2006). Další studie na S2 buňkách a lidských kulturách ukázaly, že pro správnou funkci SAC je nezbytná integrita celého γ -TuRC a pro aktivaci SAC je důležitá i interakce s proteiny Cdc20 a BubR1 (Müller et al., 2006).

Proteiny MTOCs mohou rovněž regulovat organizaci a dynamiku mikrotubulů a to zřejmě prostřednictvím +TIPs proteinů. Např. u kvasinek byla prokázána interakce γ -tubulinu s mitotickými kineziny (Paluh et al., 2000). Rovněž delece Mto1 a Alp4 proteinů asociovaných s γ -tubulinem vedla k prodloužení mikrotubulů oproti normálu v důsledku akumulace proteinu Tip1, ortologu CLIP170 (Zimmermann a Chang, 2005). Tyto a další výsledky naznačují, že proteiny MTOCs ovlivňují lokalizaci a koncentraci +TIPs proteinů na mikrotubulech a zároveň tvorbu jejich funkčních komplexů. γ -Tubulin tak může koordinovat signály přicházející do MTOC s ději odehrávajícími se v oblasti buněčného kortexu a

kinetochorů (Usui et al., 2003).

Protože byl γ -tubulin nalezen v komplexu s proteinem Rad51, předpokládá se, že by se mohl nějakým způsobem podílet na opravě DNA homologní rekombinací (Lesca et al., 2005). Navíc v případě mutace Rad51 dochází k disperzi centrozomálních markerů (Bertrand et al., 2003), deplece interakčních proteinů Rad51, tedy proteinů p53, BRCA1 a BRCA2, vede k amplifikaci centrozómů a zároveň p53 a BRCA1 se v mitóze nalézají na centrozómu (Deng et al., 2002). Bylo rovněž prokázáno, že γ -tubulin interaguje s kinázami ATM (ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related), které se uplatňují v kontrolních bodech monitorující poškození DNA. Během mitózy byly obě kinázy detegovány na centrozómu. Zároveň v interfázních jádrech byly nalezeny komplexy γ -tubulinu s ATR. Poškození DNA vedlo k poklesu hladiny kináz na centrozómu, avšak množství γ -tubulinu vzrostlo. Tyto výsledky také poukazují na spojitost mezi nukleací mikrotubulů a opravnými mechanismy DNA (Zhang et al., 2007).

I.3. CENTROZÓM A GENOMOVÁ NESTABILITA

I.3.1. Centrozómy

V interfázi se centrozóm v nenádorové buňce nachází jen v jedné kopii a to v těsné blízkosti jádra, se kterým je mechanicky spojen (Bornens, 1977). Na přechodu G2/M dochází k jeho reorganizaci a nukleačním centrem se stávají póly dělicího vřeténka. Typické mitotické vřeténko savčích buněk obsahuje více než 3000 mikrotubulů (Kuriyama, 1984). U některých vysoce specializovaných buněk obratlovců jako jsou polarizované epiteliální buňky jater, ledvin nebo střeva jsou centrozómy lokalizovány na apikálním konci buňky. U myších buněk vnitřního ucha vytváří centrozomální proteiny pás pod plazmatickou membránou na apikální části buňky (Tucker et al., 1992). Při diferenciaci svalových buněk ve svalové vlákno se centrozomální proteiny soustřeďují kolem vnější jaderné membrány (Tassin et al., 1985). U některých terminálně diferenciovaných buněk, jako jsou megakaryocyty, myocyty a erytrocyty nebo v průběhu meiotického dělení centrozóm degeneruje.

Na rozdíl od jiných buněčných organel není centrozóm obalen membránou, svůj tvar udržuje prostřednictvím proteinových interakcí. Centrozóm zaujímá prostor přibližně $1 \mu\text{m}^3$,

je tvořen párem centriol, který je umístěn v centru pericentriolární matrix (PCM: pericentriolar matrix). Centrioly se účastní tvorby astrálních mikrotubulů. Jejich nepřítomnost vyvolává poruchy v průběhu cytokineze (Khodjakov a Rieder, 2001). Centrioly tedy nejsou kriticky důležité pro buněčné dělení, spíše zajišťují vysokou přesnost segregace genetické informace (Murray, 2001). Většinu proteinů PCM lze z centrozómu odstranit pomocí roztoku o vysoké koncentraci solí (Moritz et al., 1998). Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo identifikováno asi 500 proteinů (Andersen et al., 2003), střízlivější odhady hovoří o 100 proteinech s 60 na interfázních centrozómech (Wilkinson et al., 2004). Proteiny, které tvoří jádro centrozómu, jsou přítomny po celou dobu buněčného cyklu a zůstávají s ním spojeny i po působení chladu nebo látek depolymerizujících mikrotubuly (Schatten, 2008).

V současné době je obecně přijímaný názor, že kromě nukleace mikrotubulů je centrozóm zapojený do řady buněčných dějů, jako je buněčný pohyb, udržení polarity a tvaru buňky, určení polohy buněčných organel, transport vesikulů a makromolekulárních komplexů a signalování. Kromě toho se podílí na řízení buněčného cyklu: reguluje vstup buňky do mitózy, anafáze, cytokineze, G1/S fáze a monitoruje poruchy v integritě DNA (Krämer, 2004). Centrozóm je některými enzymy nebo jejich substráty využíván jako „odstavná plocha“, kde čekají na svou aktivaci nebo jako „řídící středisko“, které využívá mikrotubuly k propagaci signálu. Rovněž některé viry, bakterie a paraziti využívají centrozomální proteiny pro své přežití v hostitelské buňce (Coppens et al., 2006).

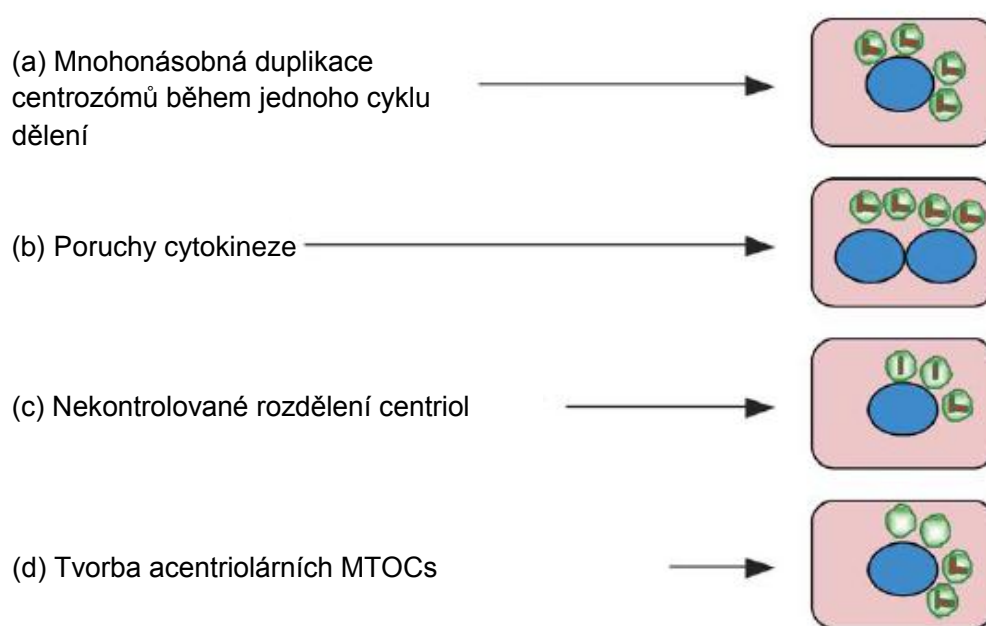
I.3.2. Amplifikace centrozómů

Aby se normální buňka stala buňkou nádorovou, je potřeba řada mutací specifických genů (protoonkogenů a tumor supresorů). Mutace nebo jejich kombinace mohou vyústit v maligní fenotyp, jako je např. ztráta adhezivity buněk a tkáňové specifity, získání nesmrtelnosti a růst nezávislý na mitogenech. U nádorových buněk byla nalezena řada genetických poškození zahrnující mutace v sekvenci DNA (např. bodové mutace, inserce, delece, rekombinace) a chromozomové mutace (např. translokace, aneuploidie). Nelze říci, která z mutací přispívá ke kancerogenezi větší měrou, ale je zřejmé, že aneuploidie (ztráta nebo získání chromozómu) hraje v procesu transformace značnou úlohu. Bylo popsáno několik mechanismů vedoucích k destabilizaci chromozómů např. pomocí deregulace kontrolních bodů buněčného cyklu nebo

selháním funkcí kinetochorů. Velká pozornost je věnována amplifikaci centrozómu, což je souhrnný název označující změny v počtu, struktuře a funkci této organely. Bylo prokázáno, že centrozomální aberace jsou velice časté téměř ve všech typech solidních nádorů, zahrnující nádory prsu, močového měchýře, mozku, jater, plic, tlustého střeva, prostaty, slinivky břišní, vaječníků, varlat, děložního čípku, kostí, ale i u některých typech leukémií a lymfomů. U nádorových buněk byla také zaznamenána abnormální fosforylace centrozomálních proteinů a nahromadění proteinů PCM (Schatten et al., 2000). Nadpočetné centrozómy mohou indukovat tvorbu multipolárního vřetenka. V případě tripolárního dělicího vřetenka dochází často k následnému buněčnému dělení a dceřiné buňky mohou být životaschopné, ovšem aneuploidní. U diploidní buňky může ztrátu jedné alely kompenzovat druhý chromozóm páru. U buněk s více než třemi póly nedochází k buněčnému dělení a vzniká buňka dvojjaderná nebo velká jednojaderná. V tomto případě zasahuje protein p53 a spouští procesy vedoucí k buněčné smrti poškozených buněk. Výjmečně se zmnožené centrozómy mohou seskupit do dvou oblastí připomínající normální bipolární dělicí vřetenko (pseudo-bipolární) a to za pomoci mikrotubulárního motoru dyneinu (Quintyne et al., 2005). Zde je vznik aneuploidních buněk minimální, nejčastěji získají dceřinné buňky správnou sadu chromozómů. (Fukasawa, 2005).

Je známo několik mechanismů vedoucích k amplifikaci centrozómů: 1) několikanásobnou duplikací během jednoho buněčného cyklu, 2) selháním buněčného dělení (cytokineze), 3) nekontrolovaným oddělením centriol páru a 4) *de novo* tvorbou acentriolárních centrozómů (**Obr.4**). K prvnímu případu dochází při selhání separázy, která za normálních okolností zajišťuje rozdělení páru centriol v anafázi (Tsou a Stearns, 2006). Bylo prokázáno, že replikace centrozómů může proběhnout i po skončení S fáze a to v případě, kdy je aktivován mechanismus opravy DNA. Nekontrolovaná amplifikace byla pozorována u buněk, které měly mutace v proteinech účastnících se oprav DNA jako jsou BRCA1, BRCA2 a Rad 51 (Bertrand et al., 2003, Tutt et al., 1999). BRCA1 patří mezi tumorsupresory a účastní se v buňce řady dějů. Kromě opravy DNA pomocí homologní rekombinace to je regulace transkripce (Welch et al., 2002), remodelace chromatinu (Bochar et al., 2000) a má rovněž funkci ubiquitin ligázy (Baer a Ludwig, 2002). Protein BRCA1 je za normálních okolností fosforylován v S-fázi buněčného cyklu nebo při poškození DNA. Pouze v hypofosforylovaném stavu interaguje s γ -tubulinem. Je-li hyperfosforylován, klesá jeho množství na centrozómu a zároveň dochází i k poklesu γ -tubulinu v MTOCs. Následkem toho

vzniká multipolární dělicí vřeténko (Hsu et al., 2001). Rovněž absence tumor supresoru p53 proteinu v buňce usnadňuje nekontrolovanou duplikaci centrozómů (Hinchcliffe et al., 1999). Mezi další příčiny vedoucí k tvorbě multipolárního vřeténka patří nekoordinované rozdělení centriol, tvorba acentriolárního MTOC z nahromaděné PCM nebo zvýšená exprese některých kináz (Aurora A, Aurora B, Plk1) interagujících s γ -tubulinem (Hut et al., 2003). Ukazuje se, že i další tumor supresory mohou být v komplexech s γ -tubulinem (Abe et al., 2006; Nguyen et al., 2007), fyziologický význam těchto komplexů je neznámý.



Obr.4. Mechanizmy amplifikace centrozómu. (a) V jednom buněčném cyklu proběhne několikrát duplikace centrozómu. (b) Buňka nepodstoupí cytokinezi a dochází ke zdvojení genomu i centrozómů. (c) Pár centriol se rozdělí a vytvoří samostatný centrozóm. (d) De novo tvorba MTOC bez centriol (Fukasawa; *Cancer Lett.* **230**; 6, 2005).

II. CÍLE PRÁCE

Oddělení biologie cytoskeletu se dlouhodobě zabývá studiem mikrotubulů, jejich dynamikou a molekulární charakterizací proteinů asociovaných s organizačními centry mikrotubulů (MTOCs). Zvláště pak jejich klíčovým proteinem, γ -tubulinem, který je nezbytný pro nukleaci mikrotubulů. Ukázali jsme, že γ -tubulin je kromě centrozómů lokalizován na buněčných membránách (Macůrek et al., 2008), kinetochorových mikrotubulech rostlin (Dryková et al., 2003) a na marginálním svazku mikrotubulů v embryonálních kuřecích erytrocytech (Linhartová et al., 2002). γ -Tubulin také vytváří komplexy s tyrozin kinázami, které by mohly regulovat nukleaci mikrotubulů (Sulimenko et al., 2006, Macůrek et al., 2008). V poslední době se ukazuje, že správná funkce centrozomálních proteinů je klíčová k udržení genové stability buňky. Je známo, že γ -tubulin se účastní regulace buněčného cyklu (Vardy et al., 2002) a mohl by hrát roli při spouštění opravných mechanismů při poškození DNA. V nedávné době byla prokázána jeho interakce s jadernými proteiny, jako je ATR kináza (Zhang et al., 2007) nebo proteinem Rad51 (Lesca et al., 2005). Proto se γ -tubulin začíná spojovat s procesem nádorového zvratu. U nádorových buněk byly rovněž prokázány změny v expresi izotypů β -tubulinu (Katsetos et al., 2003). Zvláště zvýšená exprese β III-tubulinu je dávana do souvislosti s progresí nádorového bujení a rezistencí vůči léčivům používaným k léčbě některých nádorů (Ferlini et al., 2007). Ve své disertační práci jsem se pokusila získat nové poznatky o funkci tubulinů, zejména u nádorových buněk.

Cíle předkládané disertační práce byly následující:

1. Porovnat změny v distribuci a expresi tubulinů (γ - a β III-tubulin) u normálních a nádorových buněk.
2. Funkčně charakterizovat jaderný γ -tubulin.
3. Charakterizovat proteiny organizačních center mikrotubulů pomocí nových monoklonálních protilátek.

III. KOMENTÁŘ K PŘILOŽENÝM PUBLIKACÍM

Diferenciální distribuce a exprese tubulinů u normálních a nádorových buněk

III.1. Katsetos C.D., Reddy G., Dráberová E., Šmejkalová B., Del Valle L., Ashraf Q., Tadevosyan A., Yelin K., Maraziotis T., Mishra O.P., Mörk S., Legido A., Nissanov J., Baas P.W., de Chadarévian J.P., Dráber P.: *Altered cellular distribution and subcellular sorting of gamma-tubulin in diffuse astrocytic gliomas and human glioblastoma cell lines.* **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 65:465-477, 2006.

Charakteristickým rysem nádorových buněk je zmnožení centrozómů vedoucí k tvorbě multipolárního dělicího vřeténka, nerovnoměrné segregaci chromozómů a následné akumulaci genetických defektů. Pochopení mechanismů vedoucích ke vzniku nádoru a jeho progresi do agresivnějších forem jsou nezbytné pro rozvoj efektivních terapií. Jedna z možností, je cíleně ovlivnit dynamiku mikrotubulů nádorových buněk. Gliomy patří mezi nejčastější primární nádory mozku. Z histologického hlediska jsou podle stupně malignity děleny do čtyř skupin, přičemž IV. stádium je v současné době neléčitelné. Gliomy jsou multifokální a vysoce invazivní. Často není možné přikročit k jejich chirurgickému odstranění ani k radioterapii. V 95% případů se nádorové buňky šíří do okolí od okraje resekce a unikají tím běžné léčbě (Johnston et. al., 2003). Tato práce analyzuje expresi a distribuci γ -tubulinu, klíčového centrozomálního proteinu, na 56 primárních gliomech histologicky zařazených do stupně II-IV a 4 lidských glioblastomových liniích (U87MG, U118MG, U138MG a T98G).

Pomocí imunohistochemických metod jsme prokázali, že u gliomů dochází ve srovnání s nenádorovými gliovými buňkami ke zvýšené expresi γ -tubulinu. Výrazný nárůst byl pozorován u astrocytomů s vysokým stupněm anaplázie. U nenádorových buněk byl γ -tubulinu s pomocí protilátek proti C- nebo N- terminálnímu konci molekuly detekován v centrozómech. U primárních nádorů i glioblastomových buněčných linií se však γ -tubulin nalézal nejen v oblasti centrozómu, ale i v cytoplazmě ve formě různě velkých agregátů. γ -Tubulin měl společnou distribuci s dalším centrozomálním proteinem pericentrinem, pouze v oblasti centrozómů. Prokázali jsme, že γ -tubulin se v glioblastomových liniích nalézá jak v solubilní tak i cytoskeletální frakci přibližně ve stejném množství, a to jak u neovlivněných

buněk tak i buněk, u kterých byly mikrotubuly depolymerovány nokodazolem.

Naše výsledky naznačují, že zvýšená exprese γ -tubulinu může sloužit jako znak buněčné transformace. Jeho ektopická distribuce v buňkách gliomů může odrážet anaplastický potenciál buňky. Jde o prvotní nález, který byl poté potvrzen i u dalších typů nádorů (Caracciolo et al., 2010).

V této práci jsem kvantifikovala γ -tubulin u glioblastomových linií pomocí imunoblotingu za využití panelu protilátek proti γ -tubulinu a stanovovala podíl solubilní a cytoskeletální frakce u kontrolních buněk a buněk ovlivněných nokodazolem.

III.2. Katsetos C.D., Dráberová E., Šmejkalová B., Reddy G., Bertrand L., de Chadarevian J.P., Legido A., Nissanov J., Baas P.W., Dráber P.: *Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells.* **Neurochemical Research**, 32:1387-1398, 2007.

V předcházející práci (Katsetos et al., 2006) jsme prokázali aberantní expresi γ -tubulinu v lidských primárních gliomech a u glioblastomových linií. V glioblastomech byla také dříve zjištěna atypická exprese β III-tubulinu, který je obecně považován za ukazatel neuronální diferenciace (Dráberová et al., 1998; Katsetos et al., 2003). β III-tubulin se nalézá jak v centrálním tak i periferním nervovém systému a jeho exprese se zvyšuje při tvorbě axonů. Byl ale také nalezen u Sertolihových buněk a v některých nádorech neneuronálního původu, jako jsou lymfomy a maligní melanomy a jiné (Ludueña, 1993). Otevřenou otázkou však zůstává, zda exprese β III-tubulinu koreluje se zvýšenou expresí γ -tubulinu a zda mohou tyto proteiny vzájemně interagovat.

Na řezech tkání z normálního mozku jsme ukázali, že se β III-tubulin vyskytuje pouze v prekurzorech neuroepiteliálních buněk a není detekován v gliích a mezenchymálních buňkách. U astrocytomů a glioblastomů jeho exprese korelovala se stupněm malignity nádorů. U T98G buněčné linie byla nalezena zvýšená exprese jak γ -tubulinu tak i β III-tubulinu. Po ovlivnění buněk T98G taxolem se β III-tubulin nacházel na svazcích mikrotubulů, zatímco difuzní značení γ -tubulinu zůstalo nezměněno. Rovněž ovlivnění buněk vinblastinem vedlo k inkorporaci β III-tubulinu do tubulinových parakrystalů, avšak distribuce γ -tubulinu

zůstala nezměněna. Vlivem nokodazolu došlo k rozpadu mikrotubulů a snížení intenzity značení s anti- β III-tubulinovou protilátkou, ale lokalizace β III-tubulinu se nezměnila. Pomocí mikrotubulárních drog jsme tak prokázali, že β III-tubulin není součástí nerozpustných γ -tubulinových komplexů. Na druhou stranu bylo pomocí imunoprecipitačních experimentů prokázáno, že oba tubuliny vzájemně interagují v solubilním frakci. Poprvé bylo ukázáno, že zvýšená exprese β III-tubulinu u neoplastických astrocytů je doprovázena zvýšenou expresí γ -tubulinu.

V této práci jsem kvantifikovala množství tubulinů v solubilní a nesolubilní frakci T98G buněk pomocí imunoblotingu a provedla veškeré imunoprecipitační experimenty.

III.3. Dráberová E., Del Valle L., Gordon J., Marková V., Šmejkalová B., Bertrand L., de Chadarevian J.P., Agamanolis D.P., Legido A., Khalili K., Dráber P., Katsetos C.D.: *Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity.* **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 67:341-354, 2008.

Cílem této práce bylo určit, zda β III-tubulin je vhodný marker pro fenotypickou identifikaci lidských embryonálních buněk. Exprese β III-tubulinu a dalších cytoskeletálních proteinů (vimentin, GFAP, MAP2, NFM, NFL, nestin) byla sledována na primární kultuře astrocytů získaných z lidského plodu mezi 18 a 20 týdnem prenatalního vývoje. Primární astrocyty byly udržovány v kultuře po dobu 1-20 dnů bez známek zjevné diferenciaci. Distribuce β III-tubulinu, GFAP a nestinu byla také sledována na řezech vyvíjejícího se mozku.

Naše experimenty ukázaly, že zatímco počet GFAP-pozitivních buněk v kultuře primárních astrocytů klesal v průběhu kultivace, počet β III-tubulin-pozitivních buněk se neměnil po celou dobu kultivace. Prokázali jsme, že exprese β III-tubulinu je konstitutivní a tento fenotyp není výsledkem dlouhodobé kultivace buněk. Společná exprese β III-tubulinu, GFAP a nestinu byla prokázána pomocí imunofluorescence, RT-PCR a imunoblotingu. U GFAP/ β III-tubulin-pozitivních buněk jsme pomocí imunofluorescenční mikroskopie zjistili přítomnost jak nestinu, proteinu středních filament, jenž se vyskytuje u kmenových buněk, tak i vimentinu. Na druhou stranu nebyl detekován CD133 protein, marker embryonálních kmenových buněk.

Přítomnost neuronálních a zároveň gliových markerů u astrocytů ukazuje na velkou plasticitu těchto buněk a nastoluje otázku, zda mohou tyto buňky podstoupit tzv. transdiferenciaci, změnu fenotypu. Zásadním přínosem této práce je zjištění, že přítomnost β III-tubulinu nelze jednoznačně považovat za důkaz neuronální diferenciace. Tento fakt má praktický i teoretický dopad na hodnocení progenitorů při studiu kmenových buněk.

V této práci jsme pomocí imunoblotingu zjišťovala přítomnost cytoskeletálních proteinů v extraktech primární kultury astrocytů a podílela se na imunofluorescenčních experimentech.

Identifikace a funkční charakterizace γ -tubulinu

III.4. Hořejší B., Vinopal. S., Sládková V., Dráberová E., Sulimenko V., Sulimenko T., Vosecká V., Philimonenko A., Hozák P., Katsetos Ch.D. and Dráber P.: Nuclear γ -tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein. **Journal of Cellular Physiology**, DOI 10- 0837, 2011.

Přestože je γ -tubulin považován za výhradně cytosolický protein, bylo publikováno, že by mohl napomáhat opravě poškozené DNA (Lesca et al., 2005). Bylo také ukázáno, že γ -tubulin tvoří komplex s Rad 51 proteinem, který je aktivován při opravě dvouvláknových zlomů DNA pomocí rekombinace. Dále byla zjištěna jeho interakce s proteiny ATR a BRCA1, které se účastní detekce poškození DNA (Zhang et al., 2006). Až doposud však nebyl zjištěn mechanismus, pomocí něhož je γ -tubulin transportován do jádra, jeho interakční partneři v jádře a stejně tak i jeho funkce. Naše předchozí práce vedly k nálezům zvýšené akumulace γ -tubulinu v cytoplazmě glioblastomů. Zaměřili jsme se tedy na detailní studii exprese a distribuce γ -tubulinů v tomto typu buněk.

Na úrovni mRNA i proteinů jsme prokázali, že glioblastomové linie ve srovnání s primární kulturou astrocytů obsahují přibližně 4x více γ -tubulinu. Na úrovni transkriptů byly detekovány změny jak u TUBG1 tak i TUBG2. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie jsme zjistili, že za určitých fixačních podmínek je γ -tubulin detekovatelný i v jádrech lidských linií glioblastomů. Je známo, že expozice epitopu na $\alpha\beta$ -tubulinovém dimeru, ale i γ -tubulinu je hodně závislá na použitém fixačním protokolu (Dráberová et al., 2000). Přítomnost γ -

tubulinu v jádrech buněk byla zcela zřejmá při použití methanolové fixace v kyselém prostředí, nebo po dlouhodobém odmytí preparátů fixovaných methanolem. Násobné značení s markery jadérek (UBF, fibrillarin, nucleolin) prokázalo, že γ -tubulin je lokalizován dominantně v této jaderné oblasti. Nebyl však nalezen v Cajalových tělískách, která často sdílejí stejné proteiny s jadérky. Výsledky byly potvrzeny deplecí γ -tubulinu pomocí siRNA, kdy v oblasti jadérek nebyl detekován téměř žádný signál. Zatímco protilátky namířené proti C- konci molekuly γ -tubulinu značily jadérko s vysokou intenzitou, signál při použití N-koncových protilátek byl výrazně slabší. To naznačuje, že kompaktní struktura jadérka brání zpřístupnění epitopu γ -tubulinu a za obvyklých fixačních postupů není γ -tubulin detekovatelný. To vysvětluje, proč byly zmínky o γ -tubulinu v jádře živočišných buněk velice sporadické a až doposud byl γ -tubulin nalezen jen v jádrech savčích buněk se zvýšenou expresí Rad51 proteinu (Lesca et al., 2005). Rovněž na živých buňkách není GFP-značený γ -tubulin (na C- nebo N-konci molekuly) lokalizován v jadéřkách (Dráberová E., nepublikováno). U rostlin, které na rozdíl od živočichů obsahují větší množství γ -tubulinu, byl jaderný γ -tubulin již popsán (Binarová et al., 2000). Přítomnost γ -tubulinu není specifická jen pro glioblastomy, protože byl lokalizován i na dalších buněčných liniích, včetně primárních kultur.

Jadérka jsou rozdělena do třech základních oblastí: fibrilárních center (FC), denzní fibrilární komponenty (DFC) a granulárních center (GC) (Raška et al., 2006). Při detailnějším studiu za využití imunoelektronové mikroskopie jsme zjistili, že γ -tubulin se nalézá v granulárních centrech, nebo na jejich rozhraní s denzní fibrilární komponentou. Nepodílí se tak zřejmě na transkripci ribozomální DNA, která se odehrává ve fibrilárních centrech.

Přestože jadérko není obaleno membránou, díky své odlišné denzitě je dobře odlišitelné od nukleoplazmy a je možné jej dobře izolovat. Výsledky byly proto podpořeny imunoblotingem a imunofluorescencí na izolovaných jadéřkách. Izolovaná jadérka nebyla kontaminována cytoplazmou ani centrozómami, jak ukázal imunobloting s protilátkami proti typickým cytosolickým a centrozomálním proteinům. Po rozdělení jadéřkové frakce na 2D-PAGE se objevily nejméně tři izoformy proteinu, což dokazuje, že jadéřkový γ -tubulin je posttranslačně modifikován. Konečně naše výsledky byly podpořeny i faktem, že pomocí imunoblotingu a imunofluorescence jsme v jadéřkách byli schopni detekovat i exogenní γ -tubulin, neznačený

nebo opatřený značkou (FLAG, Dendra). Kombinací několika metodických přístupů jsme tak jednoznačně prokázali přítomnost γ -tubulinu v jadéřkách savčích buněk.

Existuje několik základních mechanismů, pomocí nichž se může γ -tubulin dostávat do jádra: aktivním transportem jadernými póry, pasivně difuzí přes jaderné póry a během mitózy. Protože molekula γ -tubulinu obsahuje potenciální jadernou lokalizační sekvenci (NLS) a sekvenci zodpovědnou za export z jádra (NES), mohlo by docházet k aktivnímu transportu přes jaderné póry. Abychom objasnili dynamiku translokace γ -tubulinu, inhibovali jsme jaderný export leptomycinem B. Zatímco u kontrolního proteinu p53 došlo k výrazné akumulaci v jádře, množství γ -tubulinu zůstalo nezměněno. Ani v případě časosběrné kinematografie s využitím γ -tubulinu konjugovaného s fotoaktivovatelným proteinem Dendra2 (po fotoaktivaci mění barvu ze zelené na červenou), jsme neprokázali rychlý aktivní transport. Po fotoaktivaci značeného γ -tubulinu v cytoplazmě, nedošlo k translokaci červeného signálu do jádra ani po 2 hodinách. Samotná Dendra2 se objevila v jádře již po 2 min od aktivace. Podobně se chová i protein putující mezi cytoplazmou a jádrem, protein kináza D3, která se v jádře objevuje rovněž do několika minut po aktivaci v cytoplazmě (Rey et al., 2006). Negativní výsledky byly získány i v experimentech s heterokaryony. Ani po 2 hodinách od fúze 3T3 buněk s U2OS buňkami exprimujícími γ -tubulin-FLAG, nedošlo k nabohacení tohoto γ -tubulinu v jádrech 3T3 buněk. Pouze po 6 hodinách od fúze byl v jádrech 3T3 zaznamenán slabý signál značeného γ -tubulinu. Naproti tomu kontrolní FLAG-nukleofosmin (B23) se v jádrech 3T3 nabohatil. Distribuce jadéřkového γ -tubulinu byla také sledována pomocí konfokální mikroskopie v průběhu mitózy. Z imunofluorescenční analýzy vyplývá, že po rozpadu jaderné membrány zůstává γ -tubulin asociován se zbytky jadérek. Po dokončení cytokineze je γ -tubulin spolu s dalšími proteiny inkorporován do nových jadérek a celé jádro je opět uzavřeno membránou. Podobný mechanismus vstupu do jader byl popsán i pro β II-tubulin u nádorových buněk (Walss-Bass et al., 2001). Výsledky těchto experimentů indikují, že γ -tubulinu se nedostává do jader rychlou difuzí ani rychlým aktivním transportem. γ -Tubulinu je však translokován do jader v průběhu mitózy. Nelze však vyloučit, že část γ -tubulinu by se mohla do jádra dostat i pasivní difuzí po otevření jaderných pórů. Tento mechanismus byl navržen pro import α , β -tubulinového dimeru v případě, že jeho koncentrace vzrostla po depolymeraci mikrotubulů (Schwarzerová et al., 2006; Akoumianaki et al., 2009).

γ -Tubulin se v zásadě nalézá ve dvou typech komplexů: γ -TuSC obsahujících dvě molekuly γ -tubulinu a po jedné molekule GCP2 a GCP3; γ -TuRC obsahuje vedle γ -TuSC i další proteiny včetně GCP5. Zatímco přítomnost GCP2 v izolovaných jadérkách byla prokázána pomocí imunoblotingu a imunoprecipitace (Sulimenková, nepublikováno), nezaznamenali jsme žádný signál pro GCP5. Ani frakcionace jadérek gelovou filtrací nepotvrdila existenci komplexů o hmotnosti cca 2 MDa odpovídající velikosti γ -TuRC. Komplexy GCP2 proteinu byly nalezeny, ale pouze částečně se překrývaly s komplexy γ -tubulinu. Z doposud získaných výsledků není pravděpodobné, že by se v jadérkách nalézal γ -TuRC, ale nemůžeme zcela vyloučit přítomnost γ -TuSC.

Jadérko má dynamickou strukturu, jsou zde uskladněny geny pro rRNA. Kromě jeho hlavní funkce, transkripce rRNA, je zapojeno v editaci RNA, opravě DNA, metabolismu telomer, procesování tRNA a regulaci stability proteinů. Jadérko funguje i jako reservoár pro některé molekuly a reguluje tím jejich dostupnost v buněčném cyklu (Pederson, 2011). Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo v HeLa buňkách identifikováno přes 700 jadérkových proteinů (Andersen et al., 2005). Přesto jen 1/3 se uplatňuje v biogenezi ribozómů.

Kombinací imunoprecipitačních experimentů a hmotnostní spektrometrie jsme zjistili, že jaderný γ -tubulin interaguje s C53 proteinem, který představuje nádorový supresor (Ching et al., 2000). Tento protein se podílí na regulaci aktivity ARF proteinu (Wang et al., 2006) a transkripční aktivity NF κ -B jaderného faktoru (Wang et al., 2007). Kromě toho moduluje aktivitu Cdk1/cyklin B1 komplexu v G2/M kontrolním bodě buněčného cyklu, který se aktivuje při poškození DNA (Jiang et al., 2005). Interakce γ -tubulinu s C53 byla prokázána „pull-down“ experimenty na celých lyzátech buněk i koimunoprecipitací na izolovaných jadérkách. Bylo prokázáno, že C53 protein je lokalizován v mnoha kompartmentech buňky, jako je cytosol, jádro, centrozóm, endoplazmatické retikulum a mikrotubuly (Jiang et al., 2009). S použitím komerčně dostupné protilátky jsme ho specificky detekovali pouze v cytosolu a v jádru/jadérku, což může odrážet expozici epitopu dané protilátky. Lokalizace C53 byla potvrzena i imunoelektronovou mikroskopií.

Vstup buňky do M fáze buněčného cyklu je regulován hladinou komplexu Cdk1/cyklin B. V případě poškození DNA v G2/M kontrolním bodě dochází k inaktivaci Cdc25 fosfatázy a tím i k inaktivaci Cdk1, která zůstává fosforylovaná na Y15 (Lindqvist et al., 2009). Buněčný

cyklus je zastaven, aby nedošlo k předání chybné informace do dceřiných buněk. Bylo prokázáno, že po navození genotoxického stresu pomocí etoposidu, byl u buněk se zvýšenou expresí C53 překonán tento kontrolní bod (Jiang et al., 2005). Jestliže jsme ovlivnili U2OS buňky etoposidem po dobu 20 hod, došlo dle očekávání k aktivaci mechanismu G2/M kontrolního bodu, tedy ATM/ATR kináz a inaktivaci Cdk1 (více než dvojnásobný nárůst inhibiční fosforylace na Y15). U U2OS-C53 buněk jsme po etoposidu zaznamenali snížení inhibiční fosforylace Y15 téměř na polovinu oproti netransfekovaným buňkám. Naopak zvýšenou expresí γ -tubulinu u U2OS-C53 buněk jsme opět docílili akumulace inhibiční fosforylace na Y15 oproti U2OS buňkám. Fakt, že zvýšená exprese γ -tubulinu potlačuje vliv C53, se nám podařilo prokázat i na materiálu izolovaném z jader. Tím bylo prokázáno, že γ -tubulin by mohl modulovat aktivitu C53. Otevřenou otázkou však zůstává, zda γ -tubulin může ovlivnit i další funkce C53.

Závěrem lze shrnout, že jako první jsme několika nezávislými způsoby prokázali přítomnost γ -tubulinu v jádře a jadérku buněk linií i primárních kultur. Zjistili jsme, že γ -tubulin prostřednictvím interakce s C53 proteinem může zasahovat do regulace aktivity G2/M kontrolního bodu při poškození DNA. Kromě již velice dobře známé role při nukleaci mikrotubulů, se tedy γ -tubulin účastní i dějů v jádře buněk.

V této práci jsem navrhovala plán experimentů a prováděla většinu imunofluorescenčních analýz. Optimalizovala jsem metody frakcionace buněk, izolace jadérek a přípravu extraktů pro 2D-PAGE a imunoprecipitační experimenty. Přípravovala jsem buňky ovlivněné LMB pro studium jaderného transportu. Podílela jsem se na vyhodnocování transfekčních a knock-down experimentů a experimentů využívajících heterokaryonu. Podílela jsem se na přípravě rukopisu publikace.

IV. DOPOSUD NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

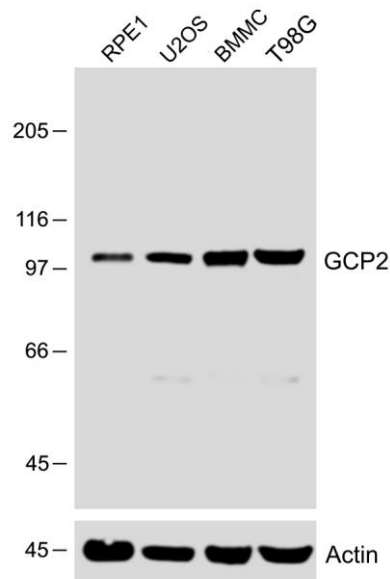
IV.1. Příprava a charakterizace nových monoklonálních protilátek proti GCP2 proteinu

Lidský GCP2 je společně s GCP3 součástí malého gama-tubulinového komplexu; γ -

TuSC. Je lokalizován na centrozómu i v solubilních komplexech. Skupina GCP proteinů zahrnuje dále GCP4, GCP5, GCP6 a GCP/WD; mají společný sekvenční motiv tzv. grip (gamma ring protein). Ten je u živočichů značně konzervativní, což ukazuje na podobný mechanismus nukleace mikrotubulů napříč širokým spektrem organismů (Gunawardane et al., 2000).

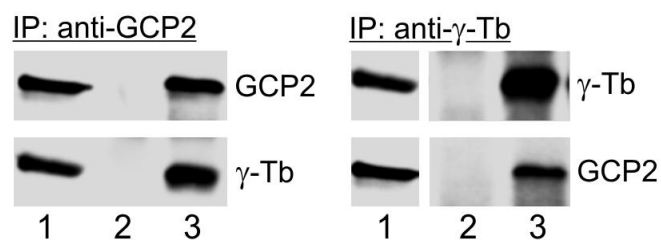
Abychom mohli identifikovat GCP2 v jaderném materiálu (Hořejší et al., 2011), připravili jsme panel hybridomů produkujících monoklonální protilátky proti myšimu GCP2 (Swiss-Prot Q921G8). Fragment GCP2 odpovídající polypeptidu (aa 2-194) byl připraven následovně. Celková RNA z mozku dospělé myši byla izolována pomocí Trizolu (TRIzol® reagent; GibcoBRL). K reverzní transkripci byly použity náhodné hexamery a SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). Fragment kódující GCP2 (GenBank® nucleotide sequence database accession number NM_133755) byl amplifikován PCR. Templát představovala celková cDNA a byly použity následující primery: „forward“ (5_-AGTCGGATCCAGCGAATTTTCGGATTAC-3_) (BamHI restrikční místo je podtrženo) a „reverse“ (5_-AAGCGTCGACTCAGCCAATCAGGAAATCTC-3_) (Sall restrikční místo je podtrženo). Abychom získali GST fúzní protein, byl izolovaný fragment ligován to vektoru GEX-6P-1 (Amersham Biosciences).

Po imunizaci myši F1 (B10AxBalb/c) a následné fúzi slezinných buněk s Sp/2 myelomovými buňkami byly získány hybridomy produkující monoklonální protilátky. Detailní popis fúze, testování pomocí ELISA a klonování byly detailně popsány dříve (Dráber et al., 1988; Viklický et al., 1982). Z panelu 6 hybridomů, které specificky v ELISA testech reagovaly s GCP2-GST, nikoli však se samotným GST byly dále charakterizovány 2 monoklonální protilátky označené GCP2-01 (IgG2b, kappa) a GCP2-02 (IgG1, kappa). Obě protilátky rozpoznávaly v imunoblotingu GCP2 protein na lyzátech z buněk různého druhového a tkáňového původu. Příklad reakce je na **Obr.5**. Buněčné linie se lišily s ohledem na množství GCP2.



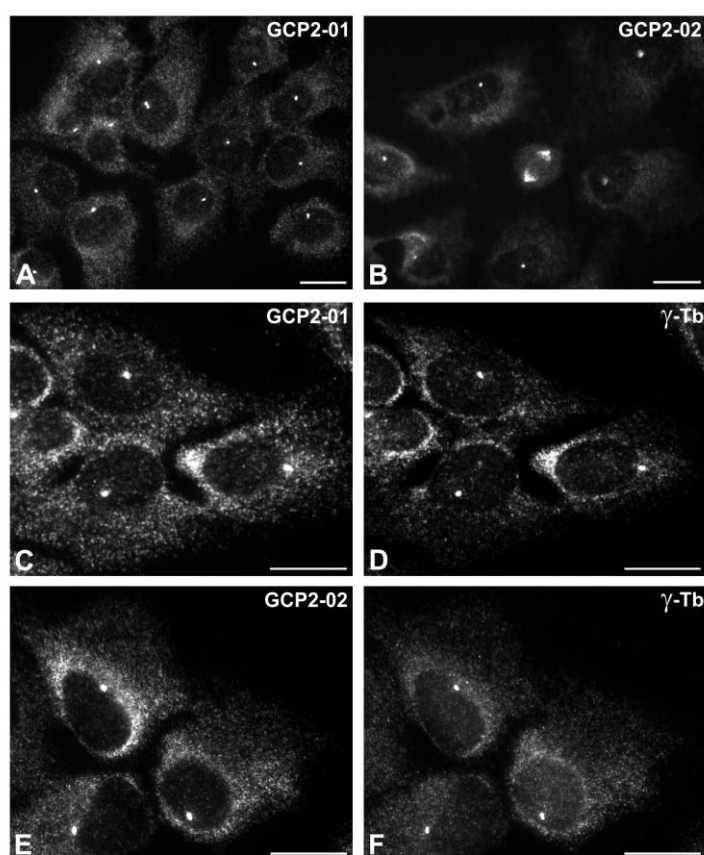
Obr. 5. Reaktivita protilátky GCP2-02 na celých lyzátech buněk. Lyzáty byly připraveny z následujících buněčných linií: RPE1 (lidské immortalizované epiteliální buňky retiny), U2OS (lidský osteosarcom), BMMC (myši žírné buňky z kostní dřeně), T98G (lidský glioblastom). Barveno GCP-02. Aktin byl použit pro kontrolu nanesení stejného množství lyzátu. 7.5% SDS-PAGE.

Protilátka GCP2-01 se ukázala jako vhodná pro imunoprecipitační experimenty, jak je ukázáno na **Obr.6**. Dle očekávání, protilátka proti GCP2 koprecipitovala gama-tubulin a naopak protilátka proti gama-tubulinu koprecipitovala GCP2 z celých lyzátů buněk. Obdobné výsledky byly získány i při precipitaci z extraktů připravených z izolovaných jader i jadérek, což potvrzuje interakci jaderného gama-tubulinu s GCP2.



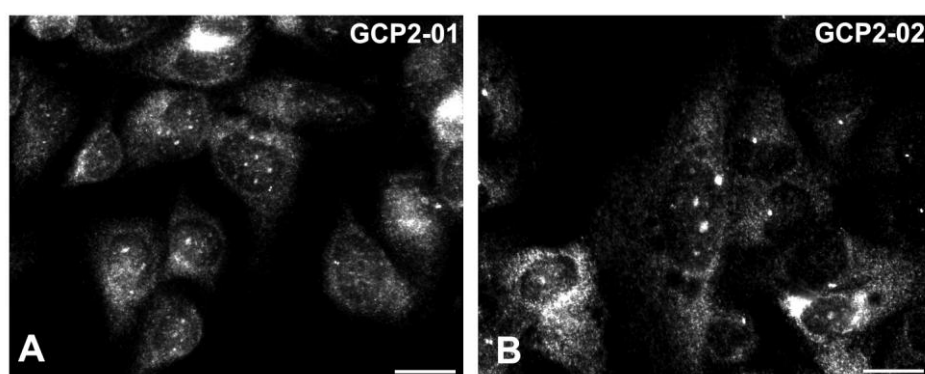
Obr.6. Imunoprecipitace GCP2 a gama-tubulinu. Extrakty z BMMC buněk byly precipitovány s protilátkou GCP2-01 (IgG2b) nebo s protilátkou TU-31 (IgG2b) proti gama-tubulinu. Jako nosič byl použit protein A imobilizovaný na Trisakrylu (Pierce). 1) extrakt, 2) protein A inkubovaný s extraktem, 3) precipitát. K detekci GCP2 na blotech byla použita protilátka GCP2-02, k detekci gama-tubulinu protilátka TU-32. 7.5% SDS-PAGE.

Pro detekci GCP2 ve fluorescenci byly preparáty připraveny za různých fixačních podmínek (Dráberová a Dráber, 1993). Nejvhodnější byla fixace preparátů methanolem. Obě protilátky značily silně oblast MTOC, póly mitotického vřeténka a bylo pozorováno i difuzní značení v cytoplazmě (**Obr.7A-B**). Kolokalizace GCP2 s gama-tubulinem byla potvrzena dvojitým značením s polyklonální protilátkou proti gama-tubulinu. Jak protilátka GCP2-01 (**Obr.7C-D**), tak i protilátka GCP2-02 (**Obr.7E-F**) dávaly velmi obdobné značení jako anti-gama-tubulinová protilátka. Vysycení protilátek antigenem použitým k imunizaci vedlo k inhibici fluorescenčního značení.



Obr.7. Imunofluorescenční detekce GCP2 pomocí monoklonálních protilátek. U2OS buňky byly fixovány methanolem a značeny monoklonálními protilátkami GCP2-01 a GCP2-02. Pro dvojí značení (C-D; E-F) byla použita králičí protilátka proti gama-tubulinu (Sigma, kat. č. T5192). Měřítko, 20 μ m.

Protože za určitých fixačních podmínek je gama-tubulin lokalizován v jadérku (Hořejší et al., 2011), bylo provedeno i imunofluorescenční značení takto připravených preparátů s protilátkami proti GCP2. Za těchto podmínek, podobně jako v případě gama-tubulinu, bylo u obou protilátek pozorováno značení jak centrozómů tak i jadérek (**Obr.8**). Jde o další podpůrný průkaz asociace GCP2 s jadérky. V současné době probíhají experimenty, s využitím imunoelektronové mikroskopie, které mají určit, zda v oblasti jader/jadérek je kolokalizace gama-tubulinu a GCP2.



Obr.8. Imunofluorescenční detekce GCP2 v oblasti jádra. U2OS buňky byly fixovány methanolem a po dlouhodobém odmytí značeny monoklonálními protilátkami GCP2-01 a GCP2-02. Měřítko, 20 µm.

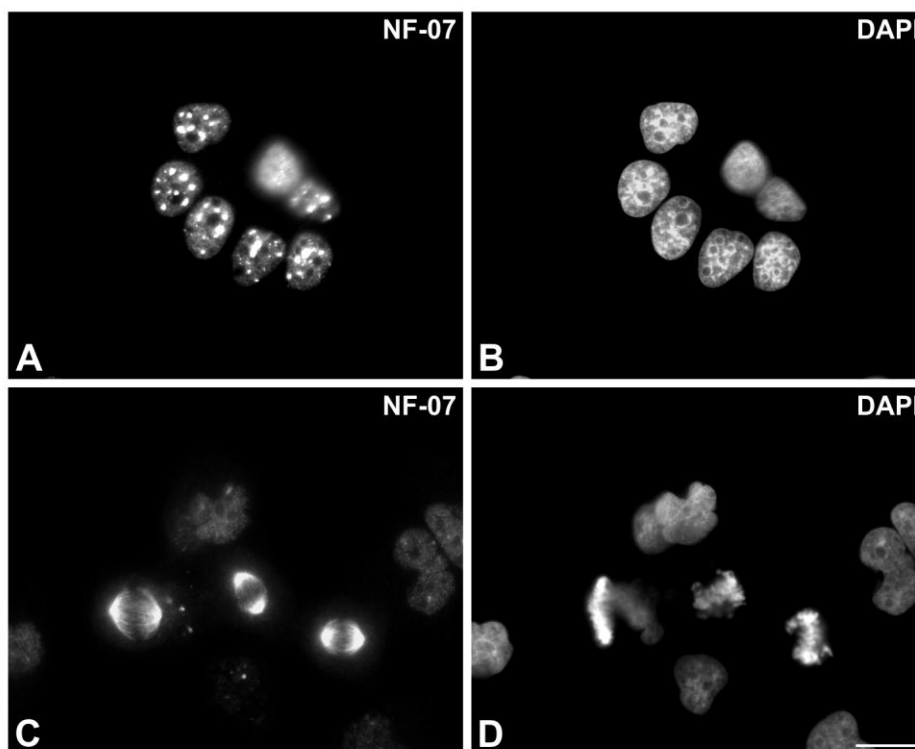
Protože v glioblastomech byla nalezena zvýšená exprese gama-tubulinu, byla zahájeno histochemické testování preparátů glioblastomů na spolupracujícím pracovišti (Prof. CDK Katsetos, Drexel University, Philadelphia). První experimenty na preparátech fixovaných formaldehydem ukazují, že exprese GCP2 je u glioblastomů zvýšena.

Výše uvedené nálezy ukazují, že nové monoklonální protilátky proti GCP2 jsou použitelné pro ELISA testy, imunobloting, imunofluorescenci, imunoprecipitaci a imunohistochemii. V současné době jsou na Oddělení biologie cytoskeletu využívány zejména ke studiu komplexů jaderného gama-tubulinu.

V tomto projektu jsem se podílela na testování protilátek v imunofluorescenci a v imunoblotingu.

IV.2. Charakterizace monoklonální protilátky NF-07 rozpoznávající TPX2 protein

Při charakterizaci protilátek připravených na Oddělení biologie cytoskeletu jsme se blíže zaměřili na monoklonální protilátku NF-07 (IgG1, kappa), která byla připravena při konstrukci hybridomů produkujících monoklonální protilátky namířené proti komponentám neurofilamentového tripletu. NF-07 rozpoznávala na prasečím mozku fosfoepitop na těžkém řetězci neurofilament (NFH) (Porchet et al., 2003). Při imunofluorescenčním značení na buněčných liniích však bylo pozorováno velmi silné značení některých interfázních jader, mikrotubulů mitotického vřeténka a telofázního tělíska. Příklad imunofluorescenčního značení s protilátkou NF-07 je na **Obr.9**.



Obr. 9. Imunofluorescence s NF-07 protilátkou na buňkách lidského glioblastomu T98G. Buňky byly fixovány formaldehydem a extrahovány Tritonem X100. Jádra byla barvena pomocí DAPI. Měřítko, 20 μm .

V imunoblotu protilátka reagovala s proteinem o relativní molekulové hmotnosti kolem 100 kDa. Byly proto provedeny experimenty s cílem určit, na jakém proteinu/proteinech se

tento epitop nachází u buněk tkáňových kultur.

Jádra byla připravena z HEK293 buněk (10 Petriho misek o průměru 14 cm) podle popsaného postupu (Andersen et al., 2005). Buňky byly opláchnuty a resuspendovány v pufru A (10 mM Hepes, pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT) obohaceném proteázami (Protease inhibitor cocktail tabletes; Roche, Basel Switzerland) a inhibitory fosfatáz (1 mM Na₃VO₄ and 1 mM NaF). Rozbity homogenizátorem (Dounce) a centrifugovány 228 g po dobu 5 min. Pelet byl resuspendován v 10 mM MgCl₂ v 0.25 M sacharóze a nanesen na 0.35 M sacharózu obsahující 0.5 mM MgCl₂. Po centrifugaci 1,430 g po dobu 5 min, byl pelet (jaderná frakce) extrahován ve 400 mM NaCl v pufru A. Extrakt byl naředěn 3x v TBST (10mM Tris, pH 7,4; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20), pre-absorbován s proteinem G vázaným na agarosu (Pierce), k eliminaci nespecifické vazby proteinů, a poté inkubován s NF-07 protilátkou vázanou na imobilizovaný protein G. K eluci byl použit Laemmliho vzorkový pufr pro SDS-PAGE a vzorky byly separovány na 8 % SDS-PAGE (50 µl/jamku) za použití “Multigel-Long electrophoretic system” (Biometra, Gottingen, Germany). Gely byly barveny Coomassie Brilliant Blue G-250. Z gelu byl poté vyříznut dobře viditelný proužek o relativní molekulové hmotnosti kolem 100 kDa. Štěpení proteinu v gelu trypsinem, extrakce peptidů a nanesení na “matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) plate” (Bruker Daltonics, Billerica, MA) bylo provedeno jak bylo popsáno dříve (Heneberg et al., 2010). Analýza byla provedena 3x a vždy byl identifikován lidský TPX2 (Targeting protein for Xklp2). Typický výsledek je ukázán na **Obr.10.**, kde sedm různých peptidů (podtrženo) přesně odpovídalo lidskému TPX2, což představuje pokrytí sekvence z 19%.

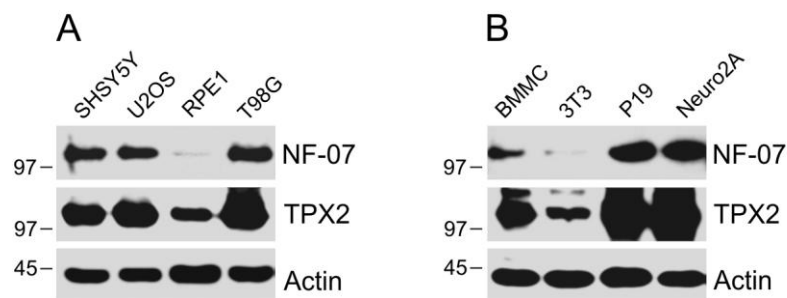
1 MSQVKSSYSY DAPSDFINFS SLDDEGDTQN IDSWFEEKAN LENKLLGKNG

51	TGGLFQGKTP	LRK <u>ANLQQA</u> I	<u>VTPLK</u> PVDNT	<u>YYK</u> EAEKENL	VEQSIPSNAC
101	SSLEVEAAIS	RKTPAQQR	SLRLSAQKDL	EQKEKHHVKM	KAKRCATPVI
151	IDEILPSKKM	KVSNNKKKPE	EEGSAHQDTA	EKNASSPEKA	KGRHTVPCMP
201	PAKQKFLKST	EEQELEKSMK	MQQEVVEMRK	KNEEFKKLAL	AGIGQPVKKS
251	VSQVTK <u>SVDF</u>	<u>HFR</u> TDERIKQ	HPKNQEEYKE	VNFTSELRKH	PSSPARVTKG
301	CTIVKPFNLS	QGKKR <u>TFDET</u>	<u>VSTYVPLAQQ</u>	<u>VEDFHK</u> RTPN	RYHLRSKKDD
351	INLLPSKSSY	TKICRDPQTP	VLQTKHRARA	VTCKSTAELE	AEELEKLQQY
401	KFKARELDPR	ILEGGPILPK	KPPVKPPTEP	IGFDLEIEKR	IQERESKKK <u>I</u>
451	<u>EDEHFEFRSR</u>	PCPTKILEDY	VGVPEKKVLP	ITVPKSPAFA	LKNRIRMPTK
501	EDEEEDPEVV	IKAQVPHYG	VPFKQIPEA	RTVEICPFSF	DSRDKERQLQ
551	KEKKIKELQK	GEVPKFK <u>ALP</u>	<u>LPHFD</u> TINLP	<u>EKKV</u> KNYTQI	EPFCLETDRR
601	GALKAQTWKH	<u>QLEELR</u> QQK	EAACFK <u>ARPN</u>	<u>TVISQ</u> EPFVP	<u>KKEK</u> SVAEG
651	LSGSLVQEPF	QLATEKRAKE	RQELEKMAE	VEAQKAQQL	EARLQEEEQK
701	KEELARLRRE	LVHKANPIRK	YQGLEIKSSD	QPLTVPYSPK	FSTRFHC

Obr.10. Identifikace TPX2 hmotnostní spektrometrií

Aminokyseliny identifikovaných peptidů lidského TPX2 (UniProtKB/Swiss-Prot Q9ULWO) jsou zvýrazněny a podtrženy.

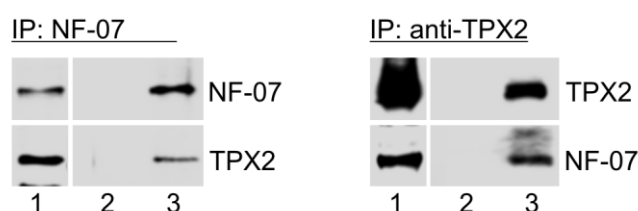
Abychom potvrdili, že NF-07 skutečně rozpoznává TPX2, byla srovnána její reaktivita s komerční králičí protilátkou proti TPX2 proteinu (Abcam, kat. č. Ab70237). NF-07 rozpoznávala v imunoblotingu na lyzátech z buněk různého druhového a tkáňového původu protein s obdobnou relativní molekulovou hmotností jako polyklonální protilátka. Příklad reakce na lidských a myších liniích je uveden na **Obr.11**.



Obr.11. Srovnání reaktivity protilátky NF-07 a komerční anti-TPX2 protilátky v imunoblotingu. Lyzáty byly připraveny z lidských (A) nebo myších (B) linií. Blotované proteiny byly inkubovány s protilátkou NF-07 nebo komerční anti-TPX2 protilátkou. Aktin sloužil jako kontrola množství proteinů. (A) SHSY5Y (lidský neuroblastom), U2OS (lidský osteosarcom), RPE1 (lidské immortalizované epiteliální buňky retiny), T98G (lidský glioblastom). (B) BMMC (myší žírné buňky z kostní dřeně), 3T3 (myší embryonální

fibroblast), P19 (myší embryonální karcinom), Neuro2A (myší neuroblastom). 7.5% SDS-PAGE.

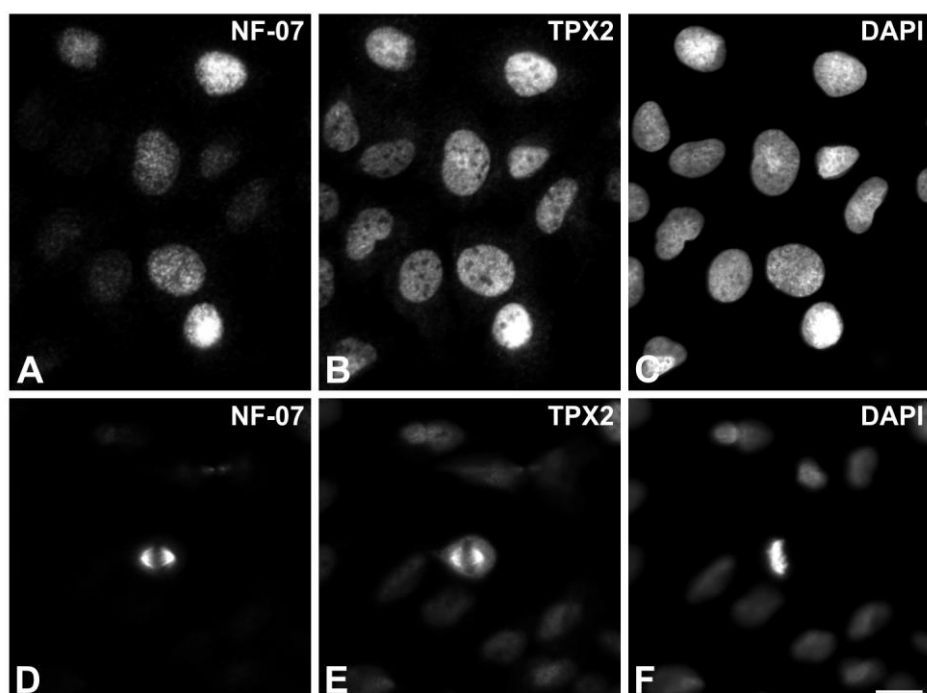
Další důkaz o asociaci epitop rozpoznávaného protilátkou NF-07 s proteinem TPX2 poskytly imunoprecipitační experimenty. Protilátka NF-07 koprecipitovala protein TPX2 a komerční protilátka proti TPX2 koprecipitovala protein nesoucí epitop rozpoznávaný NF-07 (**Obr.12**).



Obr.12. Imunoprecipitace TPX2 pomocí monoklonální NF-07 a polyklonální protilátky.

Extrakty z nukleoplasy T98G buněk byly precipitovány protilátkou NF-07 nebo polyklonální protilátkou proti TPX2. Jako nosič pro imobilizaci NF-07 byl použit protein G vázaný na agarosu (Pierce), pro imobilizaci králičí protilátky protein A imobilizovaný na Trisakrylu (Pierce). 1) extrakt, 2) nosič inkubovaný s extraktem, 3) imunoprecipitovaný materiál. 7.5% SDS-PAGE.

Dalším průkazem bylo srovnání distribuce rozpoznávaných epitopů v nepřímé imunofluorescenci. Při fixaci formaldehyd/Triton X100 značily obě použité protilátky interfázní jádra (**Obr.13A-C**) a mitotické vřeténko (**Obr.13D-F**). U interfázních jader však byly pozorovány rozdíly ve značení s oběma protilátkami. Na rozdíl od králičí protilátky značila NF-07 jen část interfázních buněk (**Obr.13A-B**).



Obr.13. Imunofluorescenční detekce TPX2. U2OS buňky byly fixovány F/Tx a značeny monoklonální NF-07 (A,D) a polyklonální protilátkou proti TPX2 (B,E). DNA byla obarvena pomocí DAPI (C,F). Měřítko, 20 μm .

TPX2 protein se v průběhu interfáze nachází v jádře, ale je uvolněn v časném stádiu mitózy. Hraje klíčovou roli v organizaci dělicího vřetenka, přispívá k nukleaci mikrotubulů jak z centrozómů tak i chromozómů. Dále ovlivňuje aktivitu Aurora A kinázy a zprostředkovává její vazbu na mikrotubuly mitotického vřetenka. Aurora A kináza je aktivována autofosforylací Thr288 a inhibována defosforylací fosfatázou PP1. Vazba TPX2 na Aurora A kinázu způsobí změnu konformace Thr288, který se tak stane pro fosfatázu nedostupný (Asteriti et al., 2010).

TPX2 obsahuje velký počet potenciálně fosforylovatelných epitopů, fyziologická role TPX2 fosforylace je nejasná. Předpokládáme, že protilátka NF-07 rozpoznává právě fosforylovanou formu TPX2. Z toho by mohly vyplývat i rozdíly ve značení interfázních buněk ve fluorescenci. V současné době probíhají experimenty s defosforylací jaderného materiálu, které by měly potvrdit, zda NF-07 rozpoznává fosforylovaný epitop. Při synchronizaci buněk bylo větší značení s protilátkou NF-07 v G2 a M fázi buněčného cyklu. Protilátka by po další charakterizaci (přesné lokalizaci epitopu na molekule TPX2) mohla

představovat užitečný nástroj pro studium regulace tvorby mitotického a meiotického vřeténka.

V tomto projektu jsem se podílela na přípravě materiálu pro hmotnostní spektrometrii, imunofluorescenci, imunoblotingu a imunoprecipitaci.

V. ZÁVĚRY

Výsledky disertační práce lze shrnout takto:

1. Byla prokázána zvýšená exprese γ -tubulinu u nádorů podpůrných buněk mozku (gliomů), a u glioblastomových linií v porovnání s primární kulturou astrocytů nebo buněčných linií. Zvýšená exprese γ -tubulinu korelovala se stupněm anaplázie nádorů. Zvýšená exprese γ -tubulinu však neměla vliv na nukleaci mikrotubulů z MTOC. U glioblastomových linií a fetálních astrocytů jsme prokázali expresi β III-tubulinu. Tento izotyp tubulinu tedy nelze pokládat za vysoce specifický marker buněk neuronálního původu, což má zásadní vliv na studium kmenových buněk.

2. Byla jasně prokázána přítomnost γ -tubulinu v jádře a jadérkách buněčných linií různého tkáňového i druhového původu včetně primárních buněčných linií. γ -Tubulin je lokalizován jak v granulárních centrech tak i na jejich hranici s denzní fibrilární komponentou. Nebyla pozorována jeho akumulace ve fibrilárních centrech, kde dochází k transkripci ribozomální DNA. Přítomnost γ -tubulinu v jádře nesouvisí s transformací buňky. Jaderný γ -tubulin je posttranslačně modifikován.

3. γ -Tubulin se do jader dostává v průběhu mitózy, při rozpadu jaderné membrány. Přestože v interfázních buňkách nebyl prokázán rychlý nukleocytoplazmatický transport γ -tubulinu, nelze v současné době vyloučit i jiný mechanismus vstupu γ -tubulinu do jádra. Přinesli jsme důkazy o asociaci jaderného γ -tubulinu s nádorovým supresorem C53 i GCP2 proteinem, který se podílí na tvorbě γ -tubulinových komplexů. Byla prokázána schopnost γ -tubulinu modulovat aktivitu C53 proteinu při spuštění G2/M kontrolního bodu poškozením DNA.

4. Byl připraven panel monoklonálních protilátek proti GCP2 proteinu. Protilátka GCP2-01 byla využita při studiu jaderného γ -tubulinu. Pomocí imunoprecipitace a hmotnostní spektrometrie jsme identifikovali antigen rozpoznávaný protilátkou NF-07. Protilátka rozpoznává epitop na TPX2 proteinu, který reguluje tvorbu mitotického vřeténka.

VI. LITERATURA

Abe Y., Ohsugi M., Haraguchi K., Fujimoto J., Yamamoto T. (2006) LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Lett.* 6;580(3):782-788.

Akhmanova A., 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.

Akhmanova A., Steinmetz M.O. (2010) Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* 123:3415-3419.

Akoumianaki T., Kardassis D., Polioudaki H., Georgatos S.D., Theodoropoulos P.A. (2009) Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 122:1111-1118.

Aldaz H., Rice L.M., Stearns T., Agard D.A. (2005) Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin *Nature.* 435:523-527.

Alvarado-Kristensson M., Rodríguez M.J., Silió V., Valpuesta J.M., Carrera A.C. (2009) SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* 11(9):1081-1092.

Andersen J.S., Wilkinson C.J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E.A., Mann M. (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature.* 426:570-574.

Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K., Ong S.E., Lyon C.E., Lamond A.I., Mann M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature.* 6;433(7021):77-83.

Amos L. A., Roberts K. Hyams J.S. (1978) Structure of microtubules. *Microtubules.* Academic Press, London.

Asteriti I.A., Rensen W.M., Lindon C., Lavia P., Guarguaglini G. (2010) The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? *Biochim. Biophys. Acta.* 1806(2):230-

Baer R., Ludwig T. (2002) BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor-suppressor complex with ubiquitin ligase activity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:86-91.

Baldassarre G., Belletti B., Nicoloso M.S., Schiappacassi M., Vecchione A., Spessotto P., Morrione A., Canzonieri V., Colombatti A. p27^{KIP1}-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell.* 7:51-63.

Bermudes D., Hinkle G., Margulis L. (1994) *Microbiological Reviews*, p. 387-400.

Bertrand P., Lambert S., Joubert C., Lopez B.S. (2003) Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. *Oncogene.* 22:7587-7592.

Bieling P., Laan L., Schek H., Munteanu E.L., Sandblad L., Dogterom M., Brunner D., Surrey T. (2007) Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature.* 13;450(7172):1100-1105.

Binarová P., Dolezel J., Draber P., Heberle-Bors E., Strnad M., Bögre L. (1998) Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. *Plant J.* 16(6):697-707.

Binarová P., Cenklová V., Hause B., Kubátová E., Lysák M., Dolezel J., Bögre L., Dráber P. (2000) Nuclear gamma-tubulin during acentriolar plant mitosis. *Plant Cell.*12(3):433-442.

Binarová P., Cenklová V., Procházková J., Duskocilová A., Volc J., Vrlík M., Bögre L. (2006) Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18(5):1199-1212.

Bochar D.A., Wang L., Beniya H., Kinev A., Xue Y., Lane W.S. (2000) BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 21:257-265.

Bornens M. (1977) Is the centriole bound to the nuclear membrane. *Nature*. 270:80-82.

Bucciarelli E., Pellacani C., Naim V., Palena A., Gatti M., Somma M.P. (2009) Drosophila Dgt6 interacts with Ndc80, Msp/XP215, and gamma-tubulin to promote kinetochore-driven MT formation. *Curr. Biol.* 19(21):1839-1845.

Cai S., Walczak C.E. (2009) The road less traveled to the spindle equator. *Cell Cycle*. 8(23):3791-3793.

Cappelletti G, Maggioni MG, Tedeschi G, Maci R. (2003) Protein tyrosine nitration is triggered by nerve growth factor during neuronal differentiation of PC12 cells. *Exp. Cell Res.*, 288: 9-20.

Caracciolo V., D'Agostino L., Dráberová E., Sládková V., Crozier-Fitzgerald C., Agamanolis D.P., de Chadarévian J.P., Legido A., Giordano A., Dráber P., Katsetos C.D. (2010) Differential expression and cellular distribution of gamma-tubulin and betaIII-tubulin in medulloblastomas and human medulloblastoma cell lines. *J. Cell Physiol.* 223(2):519-529.

Casenghi M., Meraldi P., Weinhart U., Duncan P.I., Körner R., Nigg E.A. (2003) Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev. Cell*. 5:113-125.

Colello D., Reverte C.G., Ward R., Jones C.W., Magidson V., Khodjakov A., LaFlamme S.E. (2010) Androgen and Src signaling regulate centrosome activity. *J. Cell Sci.* 15;123(Pt 12):2094-2102.

Colombié N., Vérollet C., Sampaio P., Moisan A., Sunkel C., Bourbon H.M., Wright M., Raynaud-Messina B. (2006) The Drosophila gamma-tubulin small complex subunit Dgrip84 is required for structural and functional integrity of the spindle apparatus. *Mol. Biol. Cell.* 17(1):272-282.

Coppens I., Dunn J.D., Romano J.D., Pypaert M., Zhang H., Boothroyd J.C., Joiner K.A. (2006) *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell.* 125:261-274.

Cuschieri L., Miller R., Vogel J. (2006) Gamma-tubulin is required for proper recruitment and assembly of Kar9-Bim1 complexes in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 17:4420-4434.

Cuschieri L., Nguyen T., Vogel J. (2007) Control at the cell center: the role of spindle poles in cytoskeletal organization and cell cycle regulation. *Cell Cycle.* 15;6(22):2788-2794.

Deng CX., (2002) Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene.* 21(40):6222-6227.

Desai A., Mitchison T.J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*13:83-117.

Diamantopoulos G.S., Perez F., Goodson H.V., Batelier G., Melki R., Kreis T.E., Rickard J.E. (1999) Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 144:99-112.

Dictenberg J.B., Zimmerman W., Sparks C.A., Young A., Vidair C., Zheng Y., Carrington W., Fay F.S., Doxsey S.J. (1998) Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* 141:163-174.

Dráber P., Pokorná Z., Nosek J., Hinzová E. (1988) Inhibition of adhesion of F9 embryonal carcinoma cells to substratum by a novel monoclonal antibody, TEC-05, reactive with a developmentally regulated carbohydrate epitope. *Differentiation.*37(3):205-214.

Dráberová E., Dráber P. (1993) A microtubule-interacting protein involved in coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules. *J. Cell Sci.* 106:1263-1273.

Dráberová E., Lukás Z., Ivanyi D., Viklický V., Dráber P. (1998) Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem. Cell Biol.*109(3):231-239.

Dráberová L., Dráberová E., Surviladze Z., Dráber P., Dráber P. (1999) Protein tyrosine kinase p53/p56(lyn) forms complexes with gamma-tubulin in rat basophilic leukemia cells.

Int. Immunol. 11:1829-1839.

Dráberová E., Viklický V., Dráber P. (2000) Exposure of luminal microtubule sites after mild fixation. *Eur. J. Cell. Biol.* 9(12):982-985.

Dryková D., Cenklová V., Sulimenko V., Volc J., Dráber P., Binarová P. (2003) Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell.* 15(2):465-480.

Dutcher S.K., Trabuco E.C. (1998) The UNI3 gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes delta-tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Mol. Biol. Cell.* 9:1293-1308.

Dutcher S.K. (2003) Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:634-640.

Edde B., Rossier J., Le Caer J.P., Desbruyeres E., Gros F., Denoulet P. (1990) Posttranslational glutamylation of α -tubulin. *Science*, 247: 83-85.

Efimov A., Kharitonov A., Efimova N., Loncarek J., Miller P.M., Andreyeva N., Gleeson P., Galjart N., Maia A.R., McLeod I.X., Yates J.R. 3rd, Maiato H., Khodjakov A., Akhmanova A., Kaverina I. (2007) Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev. Cell.* 12(6):917-930.

Erickson H.P., Stoffler D. (1996) Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin. *J. Cell Biol.* 135:5-8.

Feng Y., Hodge D.R., Palmieri G., Chase D.L., Longo D.L., Ferris D.K. (1999) Association of polo-like kinase with alpha-, beta- and gamma-tubulins in a stable complex. *Biochem. J.* 339:435-442.

Ferlini C, Raspaglio G, Cicchillitti L, Mozzetti S, Prislei S, Bartollino S, Scambia G.; (2007), Looking at drug resistance mechanisms for microtubule interacting drugs: does TUBB3 work? *Curr. Cancer Drug Targets.* 7(8):704-712.

Fong K.W., Hau S.Y., Kho Y.S., Jia Y., He L., Qi R.S. (2009) Interaction of CDK5RAP2 with EB1 to track growing microtubule tips and to regulate microtubule dynamics. *Mol. Cell Biol.* 20:3660-3670.

Fujita A., Vardy L., Garcia M.A., Toda T. (2002) A fourth component of the fission yeast gamma-tubulin complex, Alp16, is required for cytoplasmic microtubule integrity and becomes indispensable when gamma-tubulin function is compromised. *Mol. Biol. Cell.* 13:2360-2373.

Fukasawa K. (2005) Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett.* 230:6-19.

Geissler S., Pereira G., Spang A., Knop M., Souès S., Kilmartin J., Schiebel E. (1996) The spindle pole body component Spc98p interacts with the gamma-tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* at the sites of microtubule attachment. *EMBO J.* 15:3899-3911.

Gunawardane R.N., Martin O.C., Cao K., Zhang L., Dej K., Iwamatsu A., Zheng Y. (2000) Characterization and reconstitution of *Drosophila* gamma-tubulin ring complex subunits. *J. Cell Biol.* 151:1513-1524.

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

Haber M., Burkhart C.A., Repase D.L., Madafiglio J., Norris M.D., Horwitz S.B. (1995) Altered expression of M beta 2, the class II beta-tubulin isotype, in murine J774.2 cell line with high level of taxol resistance. *J. Biol. Chem.* 270:31268-31275.

Haren L., Remy M.H., Bazin I., Callebaut I., Wright M., Merdes A. (2006) NEDD1-dependent recruitment of the gamma-tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J. Cell Biol.* 172:505-515.

Hayashi I., Ikura M. (2003) Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding

domain of end-binding protein 1 (EB1). *J. Biol. Chem.* 278:36430-36434.

Hendrickson T.W., Yao J., Bhadury S., Corbett A.H., Joshi H.C. (2001) Conditional mutations in gamma-tubulin reveal its involvement in chromosome segregation and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.*12(8):2469-2481.

Heneberg P., Dráberová L., Bambousková M., Pompach P., Dráber P. (2010) Down-regulation of protein-tyrosine phosphatases activates an immune receptor in the absence of its translocation into lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 23;285(17):12787-12802.

L'Hernault S.W., Rosenbaum J.L. (1985) Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochem.* 24:473-478.

Hestermann A., Rehberg M., Gräf R. (2002) Centrosomal microtubule plus end tracking proteins and their role in Dictyostelium cell dynamics. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23:621-630.

Hinchcliffe E.H., Li C., Thompson E.A., Maller J.L., Sluder G. (1999) Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in Xenopus egg extracts. *Science.* 283:851-854.

Hino M., Minima-Suda I., Nagai Y., Hosoya H. (2003) Glycosylation of the alpha and beta tubulin by sialyloligosaccharides. *Zoolog. Sci.* 20:709-715.

Honnappa S., Gouveia S.M., Weisbrich A., Damberger F.F., Bhavesh N.S., Jawhari H., Grigoriev I., van Rijssel F.J., Buey R.M., Lawera A., Jelesarov I., Winkler F.K., Wüthrich K., Akhmanova A., Steinmetz M.O. (2009) An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell.* 23;138(2):366-376.

Hoogenraad C.C., Akhmanova A., Grosveld F., De Zeeuw C.I., Galjart N. (2000) Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J. Cell Sci.*113:2285-2297.

Horio T., Oakley B.R. (1994) Human gamma-tubulin functions in fission yeast. *J. Cell*

Biol. 126:1465-1473.

Hsu L.C., Doan T.P., White R.L. (2001) Identification of gamma-tubulin binding domain in BRCA1. *Cancer Res.* 61:7713-7718.

Hung L.Y., Tang C.J., Tang T.K. (2000) Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. *Mol. Cell Biol.* 20:7813-725.

Hut H.M., Lemstra W., Blaauw E.H., Van Cappellen G.W., Kampinga H.H., Sibon O.C. (2003) Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 14:1993-2004.

Chabin-Brion K., Marceiller J., Perez F., Settegrana C., Drechou A., Durand G., Poüs C. (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell.* 12(7):2047-2060.

Chang P., Stearns T. (2000) Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat. Cell Biol.* 2:30-35.

Chapin S.J., Bulinski J.C. (1992) Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: a repeat performance. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 23(4):236-243.

Ching Y.P., Qi Z., Wang J.H. (2000) Cloning of three novel neuronal Cdk5 activator binding proteins. *Gene.* 25;242(1-2):285-294.

Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC. (1996) MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J. Neurochem.* 66(3):1273-1281.

Iftode F., Clerot J.C., Levilliers N., Bre M.H. (2000) Tubulin polyglycylation: a morphogenetic marker in ciliates. *Biol. Cell.* 92:615-628.

Iwabata H., Zoshida M., Komatu Y (2005) Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and –methylation in mice by use of anti-acetyllsine and –methyllysine mouse monoclonal antibodies. *Proteomics* 5:4653-4664.

Janson M.E., Setty T.G., Paoletti A., Tran P.T. (2005) Efficient formation of bipolar microtubule bundles requires microtubule-bound gamma-tubulin complexes. *J. Cell Biol.* 169(2):297-308.

Jensen-Smith H.C., Ludueña R.F., Hallworth R. (2003) Requirement for the betaI and betaIV tubulin isotypes in mammalian cilia. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 55:213-220.

Jiang H., Luo S., Li H. (2005) Cdk5 activator-binding protein C53 regulates apoptosis induced by genotoxic stress via modulating the G2/M DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* 27;280(21):20651-20659.

Jiang H., Wu J., He C., Yang W., Li H. (2009) Tumor suppressor protein C53 antagonizes checkpoint kinases to promote cyclin-dependent kinase 1 activation. *Cell. Res.*19(4):458-468.

Johnston A.L., Lun X., Rahn J.J., Liacini A., Wang L., Hamilton M.G., Parney I.F., Hempstead B.L., Robbins S.M. (2003) The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol.*5(8):e212.

Jordan M.A. (2002) Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* 2:1-17.

Jordan M.A., Kamath K. (2007) How do microtubule-targeting drug work? An overview. *Curr. Cancer Drug Targets.* 7:730-742.

Joshi H.C., Palacios M.J., McNamara L., Cleveland D.W. (1992) Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature.* 356:80-83.

Julian M., Tollon Y., Lajoie-Mazenc I., Moisand A., Mazarguil H., Puget A., Wright M. (1993) gamma-Tubulin participates in the formation of the midbody during cytokinesis in

mammalian cells. *J. Cell Sci.* 105:145-156.

Kapeller R., Toker A., Cantley L.C., Carpenter C.L. (1995) Phosphoinositide 3-kinase binds constitutively to alpha/beta-tubulin and binds to gamma-tubulin in response to insulin. *J. Biol. Chem.* 270:25985-25991.

Katsetos C.D., Legido A., Perentes E., Mörk S.J. (2003) Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J. Child. Neurol.* 18(12):851-866.

Katsetos C.D., Dráberová E., Legido A., Dumontet C., Dráber P. (2009) Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin. *J. Cell. Physiol.* 221(3):505-513.

Keating T.J., Borisy G.G. (2000) Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 2:352-357.

Kelleher J. K., Bloodgood R.A., Levandowsky M., Hutner S.H. (1979) Microtubules, *Biochemistry and physiology of protozoa*, vol. 2. Academic Press, New York.

Kerssemakers J., Howard J., Hess H., Diez S. (2006) The distance that kinesin-1 holds its cargo from the microtubule surface measured by fluorescence interference contrast microscopy. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 103:15812-15817.

Khodjakov A., Rieder C.L. (1999) The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J. Cell Biol.* 146:585-596.

Khodjakov A., Rieder C.L. (2001) Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 153:237-242.

Khodjakov A., Rieder C.L., Sluder G., Cassels G., Sibon O., Wang C.L. (2002) De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J. Cell Biol.* 158:1171-1181.

Kimura M., Kotani S., Hattori T., Sumi N., Yoshioka T., Todokoro K., Okano Y. (1997) Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1. *J. Biol. Chem.* 272:13766-13771.

Kimura M., Matsuda Y., Yoshioka T., Okano Y. (1999) Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J. Biol Chem.* 274:7334-7340.

Kollman J.M., Zelter A., Muller E.G., Fox B., Rice L.M., Davis T.N., Agard D.A. (2008) The Structure of the γ -Tubulin Small Complex: Implications of Its Architecture and Flexibility for Microtubule Nucleation. *Mol. Biol. Cell.* 19:207-215.

Kollman J.M., Polka J.K., Zelter A., Davis T.N., Agard D.A. (2010) Microtubule nucleating γ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature.* 466(7308):879-882.

Korenbaum E., Rivero Calponin homology domains at a glance. *J. Cell Sci.* 115:3543-3545.

Komarova Y., Lansbergen G., Galjart N., Grosveld F., Borisy G.G., Akhmanova A. (2005) EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol. Biol. Cell.* 16:5334-5345.

Krämer A., Lukas J., Bartek J. (2004) Checking out the centrosome. *Cell Cycle.* 3:1390-1393.

Kukharsky V., Sulimenko V., Macůrek L., Sulimenko T., Dráberová E., Dráber P. (2004) Complexes of γ -tubulin with nonreceptor protein tyrosine kinases Src and Fyn in differentiating P19 embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 298:218-228.

Kuriyama R.J. (1984) Activity and stability of centrosomes in Chinese hamster ovary cells in nucleation of microtubules in vitro. *Cell Sci.* 66:277-295.

Lajoie-Mazenc .I, Tollon Y., Detraves C., Julian M., Moisand A., Gueth-Hallonet C., Debec A., Salles-Passador I., Puget A., Mazarguil H. (1994) Recruitment of antigenic gamma-tubulin during mitosis in animal cells: presence of gamma-tubulin in the mitotic spindle. *J. Cell Sci.*107:2825-2837.

Lajoie-Mazenc I., Détraves C., Rotaru V., Garès M., Tollon Y., Jean C., Julian M., Wright M., Raynaud-Messina B (1996) A single gamma-tubulin gene and mRNA, but two gamma-tubulin polypeptides differing by their binding to the spindle pole organizing centres. *J. Cell Sci.* 109:2483-2492.

Lesca C., Germanier M., Raynaud-Messina B., Pichereaux C., Etievant C., Emond S., Burlet-Schiltz O., Monsarrat B., Wright M., Defais M. (2005) DNA damage induce gamma-tubulin-RAD51 nuclear complexes in mammalian cells. *Oncogene.* 24:5165-5172.

Libusová L., Sulimenko T., Sulimenko V., Hozák P., Dráber P. (2004) gamma-Tubulin in Leishmania: cell cycle-dependent changes in subcellular localization and heterogeneity of its isoforms. *Exp. Cell Res.* 295(2):375-386.

Libusová L., Dráber P. (2006) Multiple tubulin forms in ciliated protozoan Tetrahymena and Paramecium species. *Protoplasma.* 227(2-4):65-76.

Lin T.C., Gombos L., Neuner A., Sebastian D., Olsen J.V., Hrle A., Benda C., Schiebel E. (2011) Phosphorylation of the Yeast γ -Tubulin Tub4 Regulates Microtubule Function. *PLoS One.* 5;6(5):e19700.

Lindqvist A., Rodríguez-Bravo V., Medema R.H. (2009) The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* 20;185(2):193-202.

Linhartová I., Dráber P., Dráberová E., Viklický V. (1992) Immunological discrimination of beta-tubulin isoforms in developing mouse brain. Post-translational modification of non-class-III beta-tubulins. *Biochem. J.* 288: 919-924.

Linhartová I., Novotná B., Sulimenko V., Dráberová E., Dráber P. (2002) Gamma-tubulin in chicken erythrocytes: changes in localization during cell differentiation and characterization of cytoplasmic complexes. *Dev. Dyn.* 223(2):229-240.

- Liu B., Joshi H.C., Wilson T.J., Silflow C.D., Palevitz B.A., Snustad D.P. (1994) gamma-Tubulin in Arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell*. 6:303-314.
- Llamazares S., Tavosanis G., Gonzalez C. (1999) Cytological characterisation of the mutant phenotypes produced during early embryogenesis by null and loss-of-function alleles of the gammaTub37C gene in Drosophila. *J. Cell Sci*. 112:659-667.
- Lodish H., Baltimore D, Berk A., Zipursky SL., Matsudaira P., Darnell L. (1995) *Mol. Cell Biol*, edn 3, New York: Scientific American Books.
- Lopez I., Khan S., Sevik M., Cande W.Z., Hussey P.J. (1995) Isolation of a full-length cDNA encoding Zea mays gamma-tubulin. *Plant Physiol*. 107:309-310.
- Louie R.K., Bahmanyar S., Siemers K.A., Votin V., Chang P., Stearns T., Nelson W.J., Barth A.I. (2004) Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *J. Cell Sci*. 117:1117-1128.
- Lu Q., Ludueña R.F. (1993) Removal of beta III isotype enhances taxol induced microtubule assembly. *Cell Struct. Funct*. 18:173-182.
- Lüders J., Patel U.K., Stearns T. (2006) GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol*. 8:137-147.
- Ludueña R.F. (1993). Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol. Biol Cell*. 4(5):445-457.
- Ludueña R.F. (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol*. 178:207-275.

- Ludueña R.F., Banerjee A. (2008) The tubulin superfamily. In: The role of microtubules in cell biology, neurobiology and oncology. *T. Fojo, ed. Humana Press, Totowa, NJ*, p.177-191.
- Macůrek L., Dráberová E., Richterová V., Sulimenko V., Sulimenko V., Dráberová L., Marková V., Dráber P. (2008) Regulation of microtubule nucleation from membranes by complexes of membrane-bound gamma-tubulin with Fyn kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. J.* 416(3):421-430.
- Mavilia C., Couchie D., Mattei M.G., Nivez M.P., Nunez J. (1993) High and low molecular weight tau proteins are differentially expressed from a single gene. *J. Neurochem.* 61(3):1073-1081.
- McKean P.G., Vaughan S., Gull K. (2001) The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* 114:2723-2733.
- Melki R., Vainberg I.E., Chow R.L., Cowan N.J. (1993) Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and gamma-tubulin. *J. Cell Biol.* 122:1301-1310.
- Mogensen M.M., Malik A., Piel M., Bouckson-Castaing V., Bornens M. (2002) Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J. Cell Sci.* 113:3013-3023.
- Moritz M., Zheng Y., Alberts B.M., Oegema K. (1998) Recruitment of the gamma-tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 142:775-786.
- Müller H., Fogeron M.L., Lehmann V., Lehrach H., Lange B.M. (2006) A centrosome-independent role for gamma-TuRC proteins in the spindle assembly checkpoint. *Science.* 27;314(5799):654-657.
- Muresan V., Joshi H.C., Besharse J.C. (1993) Gamma-tubulin in differentiated cell types: localization in the vicinity of basal bodies in retinal photoreceptors and ciliated epithelia. *J. Cell Sci.* 104:1229-1237.

Murray A.W. (2001) Cell cycle. Centrioles at the checkpoint *Science*. 291:1499-1502.

Nayak T., Edgerton-Morgan H., Horio T., Xiong Y., De Souza C.P., Osmani S.A., Oakley B.R. (2010) Gamma-tubulin regulates the anaphase-promoting complex/cyclosome during interphase. *J. Cell Biol.* 9;190(3):317-330.

Nguyen C.L., Eichwald C., Nibert M.L., Munger K. (2007) Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the centrosomal component gamma-tubulin. *J. Virol.* 81(24):13533-13543.

Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 8:199-203.

Nogales E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H. (1999) High-resolution model of the microtubule, *Cell*, 96: 79-88.

Novakova M., Draberova E., Schurmann W., Czihak G., Viklicky V., Draber P. (1996) gamma-Tubulin redistribution in taxol-treated mitotic cells probed by monoclonal antibodies. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 33:38-51.

Oakley C.E., Oakley B.R. (1989) Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. 338:662-664.

Oakley B.R., Oakley C.E., Yoon Y., Jung M.K.(1990) Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 61:1289-1301

Oakley B.R., Akkari Y.N. (1999) Gamma-tubulin at ten: progress and prospects. *Cell. Struct. Funct.* 24:365-372 .

Oakley B.R. (2000) An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* 10:537-542.

Oegema K., Wiese C., Martin O.C., Milligan R.A., Iwamatsu A., Mitchison T.J., Zheng Y. (1999) Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in

their ability to nucleate microtubules. *J. Cell Biol.* 144:721-733.

Ozols J., Caron J.M. (1997) Posttranslational modifications of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Mol. Biol. Cell*, 8: 637-645.

Palacios M.J., Joshi H.C., Simerly C., Schatten G. (1993) Gamma-tubulin reorganization during mouse fertilization and early development. *J. Cell Sci.* 104:383-389.

Paluh J.L., Nogales E., Oakley B.R., McDonald K., Pidoux A.L., Cande W.Z. (2000) .A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the kinesin-like protein pkl1p. *Mol. Biol. Cell.* 11(4):1225-1239.

Panda D., Miller H.P., Wilson L. (1999) Rapid treadmilling of brain microtubules free of microtubule-associated proteins in vitro and its suppression by tau. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 26;96(22):12459-12464.

Paturle-Lafanechere L., Edde B., Denoulet P., Van Dorsselaer A., Mazarguil H., Le Caer J.P., Wehland J., Job D. (1991) Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochem.* 30: 10523-10528.

Pedersen L.B., Geimer S., Sloboda R.D., Rosenbaum J.L. (2003) The Microtubule plus end-tracking protein EB1 is localized to the flagellar tip and basal bodies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Biol.* 13:1969-1974.

Pederson T. (2011) The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1;3(3).pii:a000638.doi:10.1101/cshperspect.a00638.

Perez F., Diamantopoulos G.S., Stalder R., Kreis T.E. (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell.* 96:517-527.

Peris L., They M., Fauré J., Saoudi Y., Lafanechère L., Chilton J.K., Gordon-Weeks P., Galjart N., Bornens M., Wordeman L., Wehland J., Andrieux A., Job D. (2006) Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule

plus ends. *J. Cell Biol.* 174:839-849.

Peset I., Seiler J., Sardon T., Bejarano L.A., Rybina S., Vernos I. (2008) Function and regulation of Maskin, a TACC family protein, in microtubule growth during mitosis. *J. Cell Biol.* 170(7):1057-1066.

Prigozhina N.L., Oakley C.E., Lewis A.M., Nayak T., Osmani S.A., Oakley B.R. (2004) gamma-tubulin plays an essential role in the coordination of mitotic events. *Mol. Biol. Cell.* 15(3):1374-1386.

Quintyne N.J., Reing J.E., Hoffelder D.R., Gollin S.M., Saunders W.S. (2005) Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science.* 307:127-129.

Ranganathan S., Dexter D.W., Benetatos C.A., Chapman A.E. Tew K.D., Hudes G.R., (1996) Increase of β III- and β IVa-tubulin isotype in human prostate carcinoma cells as a result of astramustine resistance. *Cancer Res.* 56:2584-2589.

Raška I., Shaw P.J., Cmarko D. (2006) New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.* 255:177-235.

Redeker V., Levilliers N., Schmitter J.M., Le Caer J.P., Rossier J., Adoutte A., Bre M.H. (1994) Polyglycylation of tubulin: a postranslational modification in axonemal microtubules. *Science*, 266: 1688-1691

Rey O, Papazyan R, Waldron RT, Young SH, Lippincott-Schwartz J, Jacamo R, Rozengurt E (2006) The nuclear import of protein kinase D3 requires its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 281:5149-5157.

Rieder C.L., Faruki S., Khodjakov A. (2001) The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol.* 11:413-419.

Ríos R.M., Sanchís A., Tassin A.M., Fedriani C., Bornens M. (2004) GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell.* 118:323-335.

Roll-Mecak A., McNally F.J. (2010) Microtubule-severing enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:96-103.

Rommelaere H., De Neve M., Neiryck K., Peelaers D., Waterschoot D., Goethals M., Fraeyman N., Vandekerckhove J., Ampe C. (2001) Prefoldin recognition motifs in the nonhomologous proteins of the actin and tubulin families. *J. Biol Chem.* 276:41023-41028.

Rosas-Acosta G., Russell W.K., Deyrieux A., Russell D.H., Wilson V.G. (2005) A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol. Cell Proteomics* 4:56-72.

Ruiz F., Beisson J., Rossier J., Dupuis-Williams P. (1999) Basal body duplication in *Paramecium* requires gamma-tubulin. *Curr. Biol.* 9:43-46.

Ruiz F., Krzywicka A., Klotz C., Keller A., Cohen J., Koll F., Balavoine G., Beisson (2000) The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, eta-tubulin. *Curr. Biol.* 10:1451-1454.

Sansam C.L., Wells K.S., Emeson R.B. (2003) Modulation of RNA editing by functional nucleolar sequestration of ADAR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 25;100(24):14018-14023.

Schatten H., Hueser C.N., Chakrabarti A. (2000) From fertilization to cancer: the role of centrosomes in the union and separation of genomic material. *Microsc. Res. Tech.* 49:420-427.

Schatten H. (2008) The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem. Cell Biol.* 129:667-686.

Schuyler S.C., Pellman D (2001) Microtubule „plus-end-tracking proteins“: the end is just the beginning. *Cell* 105:421-424.

Schwarzerová K, Petrášek J, Panigrahi KC, Zelenková S, Opatrný Z, Nick P. (2006).

Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature. *Protoplasma* 227:185-196.

Sobel S.G., Snyder M. (1995) A highly divergent gamma-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131:1775-1788.

Solinger J.A., Paolinelli R., Kloss H., Scorca F.B., Marchesi S., Sander U., Mitsushima D., Capuani F., Sturzenbaum S.R., Cassata G. (2010) The *Caenorhabditis elegans* Elongator komplex regulates neuronal α -tubulin acetylation. *PLoS Genet.* 6:e1000820.

Starita L.M., Machida Y., Sankaran S., Elias J.E., Griffin K., Schlegel B.P., Gygi S.P., Parvin J.D. (2004) BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. *Mol. Cell Biol.* 24:8457-8466.

Stearns T., Evans L., Kirschner M. (1991) Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell.* 65:825-836.

Stumpff J., Kellogg D.R., Krohne K.A., Su T.T. (2005) *Drosophila* Wee1 interacts with members of the gammaTURC and is required for proper mitotic-spindle morphogenesis and positioning. *Curr. Biol.* 6;15(17):1525-1534.

Sulimenko V., Dráberová E., Sulimenko T., Macurek L., Richterová V., Dráber P., Dráber P. (2006) Regulation of microtubule formation in activated mast cells by complexes of gamma-tubulin with Fyn and Syk kinases. *J. Immunol.* 176:7243-7253.

Sunkel C.E., Gomes R., Sampaio P., Perdigão J., González C. (1995) Gamma-tubulin is required for the structure and function of the microtubule organizing centre in *Drosophila* neuroblast. *EMBO J.* 14:28-36.

Takahashi M., Yamagiwa A., Nishimura T., Mukai H., Ono Y. (2002) Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex. *Mol. Biol. Cell.* 13:3235-3245.

- Tan M., Heckmann K. (1998) The two gamma-tubulin-encoding genes of the ciliate *Euplotes crassus* differ in their sequences, codon usage, transcription initiation sites and poly(A) addition sites. *Gene*. 210:53-60.
- Tassin A.M., Maro B., Bornens M. (1985) Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J. Cell Biol.* 100:35-46.
- Tavosanis G., Llamazares S., Goulielmos G., Gonzalez C. (1997) Essential role for gamma-tubulin in the acentriolar female meiotic spindle of *Drosophila*. *EMBO J.* 16:1809-1819.
- Tilney L.G., Bryan J., Bush D.J., Fujiwara K., Mooseker M.S., Murphy D.B., Snyder D.H. (1973) Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.* 59:267-275.
- Trinczek B., Brajenovic M., Ebneth A., Drewes G. (2004) MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes. *J. Biol. Chem.* 279:5915-5923.
- Tsou M.F., Stearns T. (2006) Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature*. 442:947-951.
- Tucker J.B., Paton C.C., Richardson G.P., Mogensen M.M., Russell I.J. (1992) A cell surface-associated centrosomal layer of microtubule-organizing material in the inner pillar cell of the mouse cochlea. *J. Cell Sci.* 102 :215-226.
- Tutt A., Gabriel A., Bertwistle D., Connor F., Paterson H., Peacock J., Ross G., Ashworth A. (1999) Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr. Biol.* 9:1107-1110.
- Usui T., Maekawa H., Pereira G., Schiebel E. (2003) The XMAP215 homologue Stu2 at yeast spindle pole bodies regulates microtubule dynamics and anchorage. *EMBO J.* 15;22(18):4779-4793.

Vainberg I.E., Lewis S.A., Rommelaere H., Ampe C., Vandekerckhove J., Klein H.L., Cowan N.J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell*. 93:863-873.

Vardy L., Toda T. (2000) The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J*. 19:6098-6111.

Vardy L., Fujita A., Toda T. (2002) The gamma-tubulin complex protein Alp4 provides a link between the metaphase checkpoint and cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells*.7:365-373.

Vaughan S., Attwood T., Navarro M., Scott V., McKean P., Gull K. (2000) New tubulins in protozoal parasites *Curr. Biol*. 10:R258-259.

Verhey K.J., Gaertig J. (2007) The tubulin code. *Cell Cycle*. 6:2152-2160.

Vérollet C., Colombié N., Daubon T., Bourbon H.M., Wright M., Raynaud-Messina B. (2006) *Drosophila melanogaster* gamma-TuRC is dispensable for targeting gamma-tubulin to the centrosome and microtubule nucleation. *J. Cell Biol*. 13;172(4):517-528.

Viklický V., Dráber P., Hasek J., Bártek J. (1982) Production and characterization of a monoclonal antitubulin antibody. *Cell Biol. Int. Rep*.6(8):725-731.

Vinh D.B., Kern J.W., Hancock W.O., Howard J., Davis T.N. (2002) Reconstitution and characterization of budding yeast gamma-tubulin complex. *Mol. Biol Cell*. 13:1144-1157.

Vogel J., Snyder M. (2000) The carboxy terminus of Tub4p is required for gamma-tubulin function in budding yeast. *J. Cell Sci*. 113 :3871-3882.

Vogel J., Drapkin B., Oomen J., Beach D., Bloom K., Snyder M. (2001) Phosphorylation of gamma-tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Dev. Cell*. 1:621-631.

Wade RH, Hyman AA. (1997) Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997 9(1):12-7.

Walss-Bass C., Xu K., David S., Fellous A., Ludueña R.F. (2002) Occurrence of nuclear β II-tubulin in cultured cells. *Cell Tissue Res.* 308:215-223.

Wang H.W., Nogales E., (2005) Nukleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates micotule ansambly. *Nature* 435:911-915.

Wang J, He X, Luo Y, Yarbrough WG 2006. A novel ARF-binding protein (LZAP) alters ARF regulation of HDM2. *Biochem J.* 393:489-501.

Wang J, An H, Mayo MW, Baldwin AS, Yarbrough WG 2007. LZAP, a putative tumor suppressor, selectively inhibits NF-kappaB. *Cancer Cell* 12:239-251.

Welsh P.L., Lee M.K., Gonzalez-Hernandez R.M., Black D.J., Mehadevappa M., Swisher E.M. (2002) BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 99:7560-7565.

Wells-Bass C. Xu K., David S., Fellous A., Luduena R.F. (2002) Occurrence of nuclear β III-tubulin in cultured cells. *Cell Tissue Res.* 308:215-223.

Westermann S., Weber K., (2003) post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:938:945.

Wiese C., Zheng Y. (2006) Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J. Cell Sci.* 119:4143-4153.

Wilkinson C.J., Andersen J.S., Mann M., Nigg E.A. (2004) A proteomic approach to the inventory of the human centrosome. In: Nigg E (ed) Centrosomes in development and disease. Wiley-VCA Verlag GmbH & CoKGaG, Weinheim, pp 125–142.

Williams R.C. Jr, Shah C., Sackett D. (1999) Separation of tubulin isoforms by isoelectric

focusing in immobilized pH gradient gels. *Anal Biochem.* 15;275(2):265-267.

Wilson P.G., Borisy G.G. (1997) Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *Bioessays.* 19:451-454.

Wittmann T., Hyman A., Desai A. (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3:E28-34.

Wise D.O., Krahe R., Oakley B.R. (2000) The gamma-tubulin gene family in humans. *Genomics.* 67:164-170.

Wong C.C., Xu T., Rai R., Bailey A.O., Yates J.R., III, Wolf Y.I., Zebroski H., Kasina A. (2007) Global analysis of posttranslational protein arginization. *PLoS Biol.* 5:e258.

Xiao H., El B.K., Verdier-Pinard P., Burd B., Zhang H., Kim K., Fiser A., Angeletti R.H., Weiss L.M. (2010). Post-translational modification to *Toxoplasma gondii* α - and β -tubulins include novel C-terminal methylation. *J. Proteome Res.* 9:359-372.

Yan X., Habedanck R., Nigg E.A. (2006) A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. *Mol. Biol. Cell.* 17(2):634-644.

Yeh I.T., Ludueña R.F. (2004) The β II izotype of tubulin is present in the cell nuclei of a variety of cancers. *Cell Motil. Cytoskel.* 57:96-106.

Yuba-Kubo A., Kubo A., Hata M., Tsukita S. (2005) Gene knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice *Dev. Biol.* 282:361-373.

Zhang D., Rogers G.C., Bister D.W., Sharp D.J. (2007) Three microtubule severing enzymes contribute to the „Packán-flux” machinery that moves chromosomes. *J. Cell. Biol.* 177:231- 242.

Zhang S., Hemmerich P., Grosse F. (2007) Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J. Cell Biochem.* 15;101(2):451-465.

Zhao H., Wang Q., Zhang H., Liu Q., Du X., Richter M., Greene M.I. (2005) UXT is a novel centrosomal protein essential for cell viability. *Mol. Biol. Cell.* 16:5857-5865.

Zheng Y., Wong M.L., Alberts B., Mitchison T. (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378:578-583.

Zimmerman S., Chang F. (2005) Effects of {gamma}-tubulin complex proteins on microtubule nucleation and catastrophe in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 16(6):2719-2733.

Zyss D., Montcourrier P., Vidal B., Anguille C., Mérezègue F., Sahuquet A., Mangeat P.H., Coopman P.J. (2005) The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer Res.* 65:10872-10880.