

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Charles University in Prague, Faculty of Science

Vývojová biologie
Developmental biology



RNDr. Barbora Hořejší

TUBULINOVÉ IZOTYPY V PROCESU NÁDOROVÉHO ZVRATU
TUBULIN ISOTYPES IN CANCEROGENESIS

Disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

Praha, 2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Vývojová biologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Josef Nedvídek, CSc.

Školící pracoviště: ÚMG AV ČR, Oddělení biologie cytoskeletu

Autor: RNDr. Barbora Hořejší

Školitel: Doc. RNDr. Pavel Dráber, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH

I. ABSTRAKT.....	3
II. ÚVOD	3
MIKROTUBULY	
GAMA-TUBULIN	
CENTROZÓM	
III. CÍLE PRÁCE.....	6
IV. VÝSLEDKY.....	6
V. ZÁVĚRY.....	11
VI. LITERATURA.....	12
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	16

I. ABSTRAKT

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 erythrocytech (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.

The long-term goal of the Laboratory of Biology of Cytoskeleton is to explain in molecular terms the role of microtubules in cellular processes and to characterize proteins associated with microtubules and its organizing centers (MTOCs). The main attention of our research is focused on γ -tubulin and its role in microtubule nucleation. We have shown previously that besides its localization on centrosomes, γ -tubulin is found on cellular membranes (Macůrek et al., 2008), plant kinetochores (Dryková et al., 2003) and marginal bend of embryonal chicken erythrocytes (Linhartová et al., 2002). γ -Tubulin also interacts with protein tyrosine kinases, that can regulate microtubule nucleation (Sulimenko et al., 2006; Macůrek et al. 2008). There are growing evidence that centrosomal proteins can affect genetic stability of the cell. γ -Tubulin is involved in the regulation of the cell cycle (Vardy et al., 2002) and can participate in activation of checkpoint mechanism controlling the integrity of DNA. Recently, it has been proved its interaction with nuclear protein ATR (Zhang et al., 2007) and Rad51 (Lesca et al., 2005). That's why γ -tubulin has been connected with the process of cancerogenesis. Cancer cells also display the changes in expression of β -tubulin isotypes (Katsetos et al., 2003). Moreover, increased level of β III-tubulinu has been observed in tumors resistant to drugs (Ferlini et al., 2007). In this work, I try to elucidate some new functions of tubulins mainly in tumor cells.

II. ÚVOD

MIKROTUBULY

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).

Mikrotubuly zajišťují 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. 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). V savcích 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 strukturálními 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.

U většiny eukaryotních organizmů 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 (Jordan 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). V mozku bylo pomocí isoelektrické fokusace nalezeno okolo 20 nábojových variant tubulinů (izoform), 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 tělíška a axony neuronů. PTMs ovlivňují nejen dynamiku ale i funkci mikrotubulů v jednotlivých částech buňky.

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“. 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. Na mikrotubuly se váže řada proteinů, které ovlivňují jejich růst, stabilitu a interakce s organelami. Buněčné motory (kinezy 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. Nově popsanou skupinou MAPs jsou proteiny štěpící mikrotubuly, tvořící tak nové (+) a (-) konce mikrotubulů. 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. 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).

GAMA-TUBULIN

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 vřetenka (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 vřetenka, na jaderné membráně a fragmoplastu. Byl detekován rovněž na acentriolárním vřetenku myších oocytů (Palacios et al., 1993). V polarizovaných buňkách epitelu se γ -tubulin nachází pod apikální membránou v bazálních těliscích (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).

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). 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 organizmů. 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). U evolučně odlišných organizmů 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. 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 se nachází na MTOC ve formě multiproteinového komplexu (γ -TuC: γ -tubulin complex). 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*, Xgrip10 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). 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 předpokládal 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 protofilamentů (Kollman et al., 2010) i bez přispění dalších asociovaných proteinů.

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). 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). Proteiny MTOCs mohou rovněž regulovat organizaci a dynamiku mikrotubulů a to zřejmě prostřednictvím +TIPs proteinů. 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).

CENTROZÓM

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. Na rozdíl od jiných buněčných organel není centrozóm obalen membránou, svůj tvar udržuje prostřednictvím proteinových interakcí. Centrozóm zaujímá prostor přibližně 1 μm^3 , je tvořen párem centriol, který je umístěn v centru pericentriolární matrix (PCM: pericentriolar matrix). 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 polaritativity a tvaru buňky, určení polohy buněčných organel, transport vezikul 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).

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). Velká pozornost je v této souvislosti 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. 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.

III. CÍLE PRÁCE

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.

IV. VÝSLEDKY

Diferenciální distribuce a exprese tubulinů u normálních a nádorových buněk

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 Chadarevian 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 proteínu, 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 -tubulin 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).

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.: 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 diferenciaci (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 detegován 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 solubilní frakci. Poprvé bylo ukázáno, že zvýšená exprese β III-tubulinu u neoplastických astrocytů je doprovázena zvýšenou expresí γ -tubulinu.

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.: 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. Expresce 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 prenatálního 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 imunoblottingu. 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 detegován 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.

Identifikace a funkční charakterizace γ -tubulinu

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.: NuclearQ1 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 detegovány 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 jádru 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 jadérech (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 jádru 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 jadérech. Izolovaná jádru nebyla kontaminována cytoplazmou ani centrozomy, jak ukázal imunobloting s protilátkami proti typickým cytosolickým a centrozomálním proteinům. Po rozdělení jadérekové frakce na 2D-PAGE se objevily nejméně tři izofomy proteinu, což dokazuje, že jadérekový γ -tubulin je posttranslačně modifikován. Konečně naše výsledky byly podpořeny i faktem, že pomocí imunoblotingu a imunofluorescence

jsme v jadérkách 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 jadérkách 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 jsem 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 neohacení 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 jadérového 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 jadérových 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 koimmunoprecipitací 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 aktivace 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. 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 jadérech buněčných linií různého tkáňového i druhového původu včetně primárních buněčných linií. γ -Tubulinu 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 jsem 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Bornens M. (1977) Is the centriole bound to the nuclear membrane? *Nature.* 270:80-82.
- Caracciolo V., D'Agostino L., Dráberová E., Sládková V., Crozier-Fitzgerald C., Agamanolis D.P., de Chadarevian 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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 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 alpha-beta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell.* 15(2):465-480.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- Kelleher J. K., Bloodgood R.A., Levandowsky M., Hutner S.H. (1979) Microtubules, *Biochemistry and physiology of protozoa*, vol. 2. Academic Press, New York.
- Kollman J.M., Polka J.K., Zelter A., Davis T.N., Agard D.A. (2010) Microtubule nucleating gamma-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature.* 12;466(7308):879-882.
- Krämer A., Lukas J., Bartek J. (2004) Checking out the centrosome. *Cell Cycle.* 3:1390-1393.
- 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.
- 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.
- Lodish H., Baltimore D, Berk A., Zipursky S.L., 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.
- 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.
- McKean P.G., Vaughan S., Gull K. (2001) The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* 114:2723-2733.
- 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.
- Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* 8:199-203.
- Nováková M., Dráberová E., Schürmann W., Czihak G., Viklický V., Dráber 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

- 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.
- 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.
- Pederson T. (2011) The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1; 3 (3).pii:a000638.doi:10.1101/cshperspec.a00638.
- Perez F., Diamantopoulos G.S., Stalder R., Kreis T.E. (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell.* 96:517-527.
- Raška I., Shaw P.J., Cmarko D. (2006) New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.* 255:177-235.
- 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.
- Ruiz F., Beisson J., Rossier J., Dupuis-Williams P. (1999) Basal body duplication in *Paramecium* requires gamma-tubulin. *Curr. Biol.*9:43-46.
- Schatten H. (2008) The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem. Cell Biol.* 129:667–686.
- 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.
- Stearns T., Evans L., Kirschner M. (1991) Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell.* 65:825-836.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 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.
- 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.

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

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

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.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ

Podklady disertační práce

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. (IF:4,564)

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.: *Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells.* **Neurochemical Research**, 32:1387-1398, 2007. (IF:2,72)

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.: *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. (IF:4,564)

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. (IF:4,586)

Publikace bez vztahu k tématu disertace

1. **Šmejkalová B.**, Dráber P. (2003) Proteiny organizačních center mikrotubulů. **Biol. Listy**, 68: 313-332. (bez IF)

2. Kovář J., Ehrlichová M., **Šmejkalová B.**, Zanardi I., Ojima I., Gut I. (2009) Comparison of cell death inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells. **Anticancer Res.** 29:2951-2960. (IF:1,41)

