

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Tomáš Zelený

Minoritní členové tubulinové superrodiny
Minor members of tubulin superfamily

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
RNDr. Lenka Libusová, Ph.D.

Praha, 2016

Děkuji své školitelce RNDr. Lence Libusové, Ph.D. za trpělivost a rady při konzultacích. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za podporu po celou dobu psaní.

Prohlášení:

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

V Praze, 24.08.2017

Podpis

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	5
Úvod	6
Centrozomy a bazální tělíska	6
Struktura tubulinů	7
δ-tubulin	8
Funkce δ-tubulinu ve tvorbě C tubulů	8
δ-tubulin ve spermatogenezi	10
ε-tubulin	11
Funkce ε-tubulinu	11
ζ-tubulin	13
Závěr	15
Citovaná literatura	16

Abstrakt

Tubuliny jsou jedny z nejdůležitějších strukturních proteinů eukaryotických buněk. Tři nejnovější členové této proteinové superrodiny byli objeveni na přelomu tisíciletí. Na rozdíl od třech již dříve známých tubulinů jejich funkce přímo nesouvisí s mikrotubuly, ale je těsně spojena s funkcí centrozomů a bazálních tělísek, dvou významných organizačních center mikrotubulů.

Klíčová slova: δ -tubulin, ϵ -tubulin, ζ -tubulin, centrozom, bazální tělísko

Abstract

Tubulins are one of the most important structural proteins of eukaryotic cells. The three newest members of this protein superfamily were discovered at the turn of the millennium. Unlike the three previously known tubulins, their function is not directly associated with microtubules but is closely related to the function of centrosomes and basal bodies, two important microtubule organizing centers.

Keywords: δ -tubulin, ϵ -tubulin, ζ -tubulin, centrosome, basal body

Úvod

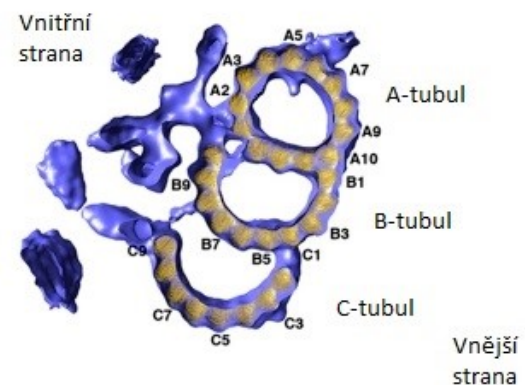
Mikrotubuly patří mezi nejvýznamnější složky cytoskeletu a jsou jeho největší složkou. Skládají se z dimerů α a β tubulinů, které se skládají do řetězců, zvaných protofilamenta (PFs) a ty se skládají do samotných mikrotubulů, dutých, válcovitých útvarů, skládajících se standardně ze 13-ti protofilamentů o celkovém průměru 25 nm. Přitom platí, že v protofilamentu je vždy v kontaktu +konec α -tubulinu s –koncem β -tubulinu a +konec β -tubulinu s –koncem α -tubulinu. Naopak interakce jednotlivých protofilamentů jsou zprostředkována bočními interakcemi α - α a β - β . Vazby + a –konců v rámci jednoho protofilamentu jsou výrazně silnější než boční interakce. (Mandelkow E. M., 1991)

Tyto mikrotubuly jsou organizovány z Mikrotubulinového organizačního centra (MTOC), které je představováno u živočichů primárně centrozomem, sekundárně pak dalšími strukturami, hlavně pak bazálními tělísky.

Centrozomy a bazální tělísky

Co se týče struktury centrozomu, tak se jedná o organelu, složenou ze dvou částí, kde první část představuje dvojce centriol a druhou představuje okolní obal, zvaný pericentriolární matrix (PCM), což je vysoce strukturovaný amorfni obal centriol.

Samotné centrioly jsou cylindrické útvary skládající se z devíti čepelí mikrotubulových tripletů. Každý z těchto tripletů se skládá ze tří mikrotubulů, označených A-, B- a C-tubul. Z těchto tří tubulů je pouze ten první, označený jako A-tubul, tvořen všemi třinácti protofilamenty, jde tedy o jediný kompletní mikrotubul v celém tripletu. Jednotlivé PFs jsou označena A1 až A13 podle směru hodinových ručiček. Zbylé dva mikrotubuly jsou nekompletní, skládají se z deseti protofilamentů, označených analogicky B1 až B10 a C1 až C10. B-tubulus nasedá na A-tubulus v místě protofilamentem B1 v místě protofilamentu označovaného jako A10 a konec B-tubulu nasedá na protofilamentu A1. PFs A11, A12 a A13 tedy tvoří přepážku mezi oběma tubuly a ohraničují prostor vnitřní dutiny obou tubulů. Obdobně i C-tubulus je tvořen pouze deseti protofilamenty a PF C1 nasedá na PF B10 a přepážku tvoří PFs B5 až B8. (Li S., 2012)



Obrázek 1.: Struktura mikrotubulového tripletu. Převzatý z (Li S., 2012)

Nedospělé centrioly se vyznačují přítomností struktury *loukořového kola* (ang. cartwheel). Tato struktura se nachází uvnitř centrioly jako jakési lešení a zaniká v průběhu dospívání centrioly. Naopak během tohoto procesu vznikají na vnějšku centrioly přívěsky v subdistální a distální části centrioly.

Centrozom se duplikují v průběhu buněčného cyklu pouze jednou a to sice v S-fázi, tento proces je pod přísnou regulací. Centrioly se během tohoto procesu duplikují semikonzervativně. Tedy v každém ze dvou nových centrozomů najdeme dvě centrioly, jednu mateřskou a jednu dceřinou.

Bazální tělísky vznikají z maternálních centriol, od kterých mají i odvozenou strukturu devítice tripletových čepelí. C-tubuly jsou pak zakončeny v místě mezi bazálním tělískem a samotným bičíkem v místě takzvaného terminálního plátu (Dute R., 1978). Bazální tělísky mají navíc na

boku struktury, zvané bazální nohy (basal feet), které vznikají z subdistálních přívěsků a kotví bazální tělíska k mikrotubulinové síti. Tyto nohy jsou důležité pro správnou orientaci bazálních tělísek, potažmo celého bičíku. (Kumimoto K., 2012)

Struktura tubulinů

Povrch všech zástupců tubulinové superrodiny lze rozdělit na několik významných domén. Tyto domény byly popsány na α - a β -tubulinu, ale nalezneme je ve více či méně pozměněné podobě u všech zástupců superrodiny. Právě změny v těchto oblastech (a hlavně v evolučně nejstabilnějších motivech v rámci těchto domén) jsou velmi zajímavé, protože lze usuzovat, že tyto změny buď podporují funkci daného tubulinu, nebo brání tomu, aby jeden tubulin plnil funkci jiného.

Tyto domény jsou plus konec na straně směřující k plus konci mikrotubulu a na druhé straně mínus konec. Tyto dvě domény zařizují interakce v rámci protofilament. Další dvě domény zařizující postranní interakce dvou tubulinů v sousedních protofilamentech jsou H3 doména (podle H3 helixu) a ML doména (podle M smyčky, „mikrotubule loop“, smičky mezi H3 helixem a S2 β -listem). Poslední dvě domény jsou NBD (nucleotide binding domain, místo vazby GTP) a C terminální doména. (Nogales, 1999)

Například konkrétně C terminální část má u α - a β -tubulinů výrazně kyselý charakter, nicméně u ϵ -tubulinu tento charakter ztrácí a u δ -tubulinu dokonce chybí. Toto je velmi důležité, protože tento konec najdeme v mikrotubulu na vnějším povrchu, kde interaguje s MAPs proteiny (microtubule-associated proteins) a lze proto předpokládat, že tyto tubuliny nejsou schopné s MAPs proteiny interagovat.

Dalším zajímavým rysem δ -tubulinu je fakt, že se na plus konci výrazně podobá α - a ještě více β - tubulinu, naopak pak jako jediný člen superrodiny ztratil konzervovaný motiv GxxNxD, což naznačuje, že se δ -tubulin váže na mínus konec α -tubulinu, ale není schopen interakce tubulin-tubulin svým mínus koncem.

Naopak v případě ϵ -tubulinu nalezneme největší shodu s mínus koncem α -tubulinu a na plus konci nalezneme inzerci 26-ti aminokyselin, která má nejspíše bránit kontaktu s dalšími tubuliny. Tato struktura by pak znamenala, že ϵ -tubulin může sloužit jako krycí protein na plus konci mikrotubulů v centrozomu. (Inclán Y. F., 2000)



Obrázek 2 Molekula ϵ -tubulinu s barevně zvýrazněnými povrchovými doménami. Převzato z (Ross I, 2013)

δ -tubulin

O objevení dvou nových tubulinů se začalo mluvit již v roce 1995. Konkrétně šlo o objevení δ -tubulinu u *Caenorhabditis elegans* a ϵ -tubulinu u *Sacharomyces cerevisiae*. Normálně jsou členové jedné tubulinové rodiny identické z ~70 % procent, tyto byly identické pouze z ~40 % k γ -tubulinu. (Burns, 1995) Nicméně později bylo ukázáno, že tyto dva tubuliny netvoří nové proteinové rodiny, ale že se jedná o tubuliny vysoce odvozené od γ -tubulinů. (Keeling, 1996)

Později, během výzkumu jednobuněčné zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* byl zaznamenán fenotyp, kdy buňky vytvářely ve zvýšené míře jednobičíkatý a bezbičíkatý fenotyp, přestože má tato řasa normálně bičíky dva. Buňky tedy neplavaly přímým směrem, ale pouze se točily na místě a byly snadno identifikovatelné v mikroskopu. Mutace byla vytvořena inzercí plazmidu $\gamma\Delta$ -1 do genu δ -tubulinu *Chlamydomonas*. Tento mutovaný gen byl označen jako *Uni3* a po použití programů prohledávajících genové databáze byl tento gen označen za tubulin, ale nepasoval do žádné z již známých rodin. Prvních 217 aminokyselin bylo nejpodobnějších γ -tubulinu, ale protein neobsahoval několik konsenzus sekvencí typických pro γ -tubuliny. Konkrétně šlo o motivy DVFFYQ v pozici 51, M/IIDREAE/D v pozici 128, VVVQPYN v pozici 188, KTTVLDMRL v pozici 458 a IIQGEA v pozici 497. Posledních 145 aminokyselin pak spíše odpovídalo β -tubulinům a protein navíc postrádal 60 aminokyselin dlouhý úsek s 30 % shodou aminokyselin, který obsahují tubuliny α - β - a γ - v *Chlamydomonas*. Jelikož tento tubulin vycházel při tvorbách fylogenetických stromů jako odlehlý od původních tří tubulinových rodin, byl rozpoznán jakožto nový člen tubulinové superrodiny, s označením δ -tubulin. (Dutcher, 1998)

Po objevu nového člena tubulinové superrodiny samozřejmě došlo k hledání jeho homologu v lidském genomu a tento homolog byl skutečně nalezen na 17. chromozomu. Protože se tento tubulin shodoval s δ -tubulinem, známým z *Chlamydomonas* jen ze 40 %, byl k potvrzení identity tohoto proteinu použit ClustalW algoritmus, který prokázal, že je tento tubulin z celé známé tubulinové superrodiny nejpříbuznější právě svému protějšku z *Chlamydomonas*. Tento tubulin obsahuje GTP vazebnou doménu, jednu velkou inzerci delší než 20 aminokyselinových zbytků a postrádá C-konec bohatý na kyselinu glutamovou, známý z tubulinů α a β . (Chang, 2000)

Přestože byl δ -tubulin poprvé lokalizován v buňkách U2OS (buňky kosterního nádoru) do prostoru mezi centriolami (Chang, 2000), jeho lokalizace se mění v závislosti na tkáni a buněčném cyklu. Například u C2 myoblastů lokalizuje během dělení buňky do centrozomu, kde ale signál mizí během cytokineze. δ -tubulin navíc kolokalizuje s malou částí γ -tubulinu. Nakonec ve spermatidách je δ -tubulin součástí specifických kruhových struktur zvaných manžety. (Smrzka O. W., 2000)

Funkce δ -tubulinu ve tvorbě C tubulů

Za normálních okolností je proximální konec bazálních tělísek tvořen tripletou mikrotubulů, podobně jako centrioly. Elektronová mikroskopie *Uni3* mutant u *Chlamydomonas* nicméně neukázala u bazálních tělísek žádné C tubuly, byly tedy tvořeny pouze dvojicemi mikrotubulů. Kromě toho tyto buňky vykazují zvýšenou chybovost při dělení buňky, kdy dochází vlivem špatného umístění dělicího vřeténka a dělicí rýhy k nerovnoměrnému rozdělení buňky. (Dutcher, 1998) (O'Toole E.T., 2003)

Kromě toho se ukázalo, že tvoření jednotlivých bičíkatých fenotypů není u těchto mutant náhodné. Buňka s bezbičíkatým fenotypem totiž dává vzniknout jedné dceřiné buňce bez bičíku a jedné buňce s bičíkem. Buňka s jedním bičíkem pak vytváří jednu dceřinou buňku bez bičíku a jednu s bičíky dvěma. Tato buňka „divokého typu“ pak vytváří opět jednu buňku bez bičíku a jednu buňku s bičíky dvěma. *Uni3* mutace tedy narušuje proces dospívání bazálního tělíska, kdy je jednak potřeba k tomu, aby bazální tělísko dospělo, dvou buněčných cyklů, jednak se bazální tělíska do dceřiných buněk nerozcházejí rovnoměrně (vždy jedno mateřské a jedno dceřiné tělísko), ale do jedné buňky se dostanou dvě dceřiná nebo dvě mateřská tělíska. (Dutcher, 1998)

Další výzkum δ -tubulinu, tentokrát na obrveném nálevníkově *Paramecium tetraurelia*, prokázal, že i u jiného organismu vede umlčení δ -tubulinu k poruše tvorby C tubulů, ale proces vzniku nového bičíku, či brvy touto ztrátou narušen není. Co však narušeno je, je kortikální cytoskelet, což ve výsledku vede k delokalizaci bazálních tělísek a jejich následné ztrátě. Ztráta tubulů může dokonce pokračovat i úbytkem části B tubulů a dokonce i A tubulů. Nicméně ani ztráta celých jednotlivých tripletů nemusí přímo vést ke kompletní likvidaci bazálního tělíska, jelikož ostatní proteiny tělíska stále zůstávají přítomny a udržují zbylé dublety mikrotubulů ve tvaru devítistěnu. Z tohoto samotného pozorování není bohužel zcela jasné, jestli je funkce δ -tubulinu omezena čistě na vytváření C tubulů, ale ukazuje, že C tubuly mají pro bazální tělíska funkci stabilizující, ale ne nezbytnou pro duplikaci. (Garreau de Loubresse N, 2001)

Vliv mutace *Uni3-1* na bičíkatý fenotyp *Chlamydomonas* může být i potlačen bodovou mutací v lokusu TUA2 (α_2 -tublin) a to sice záměnou kyseliny asparagové na asparagin v pozici 205 nebo záměnou alaninu na threonin v pozici 208. Tyto dva aminokyselinové zbytky jsou konzervovány v naprosté většině eukaryot, přičemž výjimkou je například bermudský krab *Gecarcinus lateralis*. U *S. cerevisiae* záměna D205 a E206 za alanin vede k vytvoření fenotypu s vysokou citlivostí na chlad. Tyto aminokyseliny leží na N-konci 6 helixu α -tubulinu a jsou zřejmě zásadní pro vazbu α -tubulinu k sousednímu protofilamentu mikrotubulu. Důvod, proč zvládá *Chlamydomonas* tyto substituce bez likvidačních účinků, spočívá pravděpodobně v tom, že je vybaven dvěma identickými kopiemi pro α -tublin. (Fromherz S., 2003)

U *Chlamydomonas* s mutací *Uni3-1* se výrazně snižuje šance na vytvoření dvoubičíkaté buňky, konkrétně až na 25 %, zatímco u divokého typu se toto číslo pohybuje okolo 92 %. Právě mutace v lokusu TUA2 vede k obnovení koncentrace buněk s dvoubičíkatým fenotypem až na hodnotu prakticky se rovnající divokému typu. Elektronová mikroskopie navíc ukázala, že u *TUA2/Uni3-1* mutant dochází k obnově tvorby C tubulů, i když tento jev není stoprocentní, naopak většina bazálních tělísek neměla kompletních tripletů ani polovinu.

Navíc u těchto mutant jsou, na rozdíl od prostých *Uni3-1* mutantů, bazální tělíska schopná projít standardním procesem dospívání. Mutace *TUA2* tedy úplně potlačuje vliv mutace δ -tubulinu na proces dospívání bazálních tělísek a tvorbu bičíků, ale vliv mutace na tvorbu C tubulů obnovuje jen částečně. Jinými slovy, buď je pro dospívání bazálních tělísek potřeba přítomnost C tubulů (buť třeba i jen jednoho), nebo δ -tubulin funguje nezávisle v procesu dospívání bazálních tělísek i v procesu udržování C tubulů. (Fromherz S., 2003)

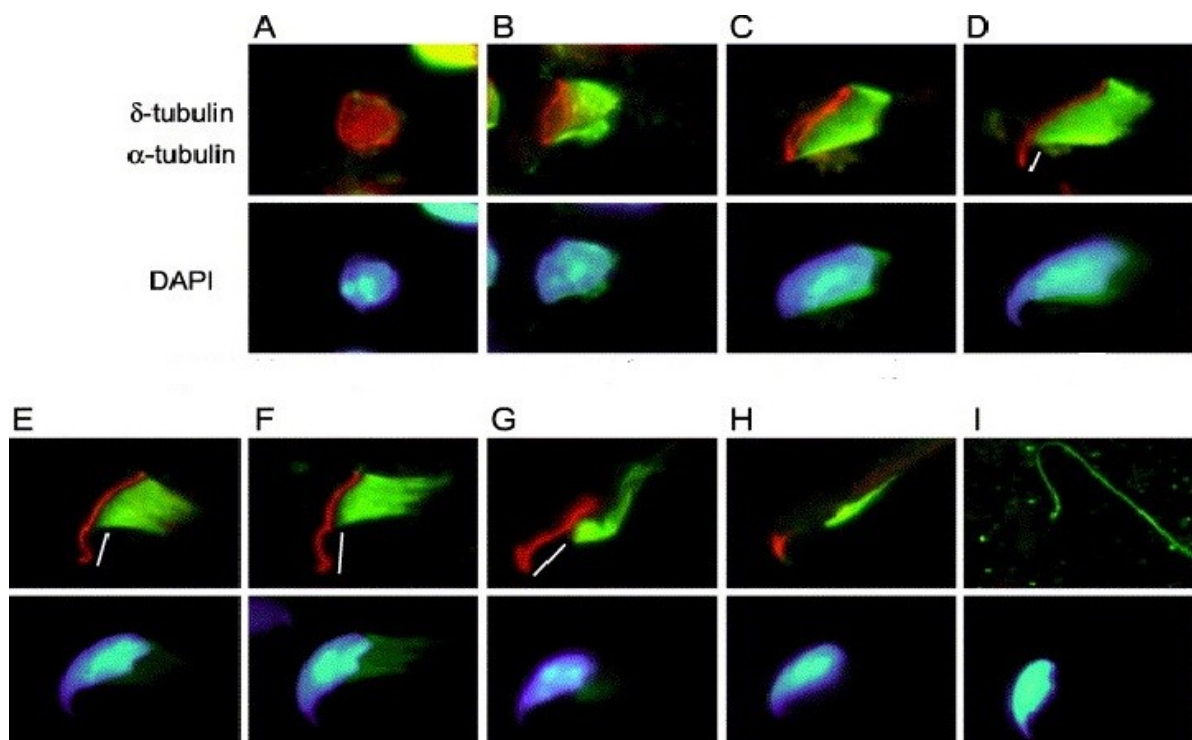
δ -tubulin se svým – koncem dost liší od – konce tubulinů α a β . Je však poměrně významně podobný jejich + konci a M smyčce α -tubulinu. Navíc má δ -tubulin poblíž M-smyčky umístěnou inzerci. Toto, společně s výsledky elektronové krytomografie naznačuje, že δ -tubulin je složkou protofilament C1 bazálních tělísek. Inzerce poblíž M-smyčky mu pak

umožňuje zprostředkovat specifický kontakt PF C1 a PF B4. Právě tuto funkci nejspíše dokáže mutant *TUA2* částečně kompenzovat, protože daná mutanta činí α -tubulin vhodnější pro kontakt s PF B4 v proximální části bazálního tělíska. (Li S., 2012)

Dále bylo zjištěno u *T. brucei*, že vyřazení δ -tubulinu (v tomto případě za pomoci RNAi) vede nejen ke ztrátě C tubulů, ale i ke změně orientace centrálního páru mikrotubulů (CP) v bičíku. Tento pár má normálně vzhledem ke zbytku bičíku (tedy hlavně k jednotlivým mikrotubulinovým párům) pevnou orientaci. Nicméně při vyřazení δ -tubulinu není již pozice CP vzhledem ke zbytku bičíku tak pevně dána. Tento jev je vlastně logickým vedlejším projevem narušení bazálního tělíska vlivem ztráty δ -tubulinu. Pokud je totiž orientace CP za normálních okolností symetrická, tak není tuto symetrii možné udržet, pokud bude narušena souměrnost celé struktury vlivem ztráty tubulů v bazálním tělísku. (Gabelha C., 2006)

δ -tubulin ve spermatogenezi

Zajímavá situace byla v souvislosti s δ -tubulinem popsána u myší, kde byly nalezeny dvě isoformy δ -tubulinu, krátká a dlouhá (delší o 31 aminokyselin, při posttranskripčním sestřihu je zachován jeden exon navíc v mRNA). Z těchto dvou isoform je právě krátká isoforma homologická δ -tubulinu izolovanému z lidské tkáně. Myší isoformy se liší produkcí v rámci jednotlivých tkání. Obě isoformy jsou exprimovány ve všech tkáních, přičemž většinou je více exprimována krátká forma. Delší forma je exprimována více pouze jednou ze zkoumaných tkání, varlaty.



Obrázek 3.: Hlavička spermie v průběhu spermatogeneze. α -tubulin je označen zeleně, δ -tubulin červeně, DNA modře. Převzato z (Kato, 2004)

Toto zjištění vedlo k podrobnějšímu prozkoumání varlat a metodami imunohistologie bylo zjištěno, že δ -tubulin je součástí dvou rozdílných prstencových struktur, které se tvoří na vnitřní straně plazmatických membrán spermatid a hrají důležitou roli ve formování protáhlého tvaru hlavičky spermie. Menší z prstenu byly rozpoznány jako intercelulární mosty (intercellular

bridges), struktury nacházející se v místě nedokončené cytokineze jednotlivých spermatocytů a později i spermatid. Díky existenci těchto mostů spolu komunikují cytoplazmy jednotlivých spermatid a tímto mísením je zajištěno, že všechny propojené spermatidy procházejí jednotlivými fázemi spermatogeneze současně. Díky existenci těchto mostů je taky zajištěn přístup buněk ke genům pohlavních chromozomů. (Kato, 2004)

Větší prstence s obsahem δ -tubulinu byl identifikován jako perinukleární prstenec (perinuclear ring). Tato kruhovitá struktura vzniká v raných stádiích vývoje spermatid v místě budoucího hlavového konce spermie, následně obklopuje jádro v místě konce akrosomu a v posledním stadiu vývoje spermie zaniká. Během spermatogeneze tvoří perinukleární prstenec základnu pro tvorbu manžetových mikrotubulů, struktury mikrotubulů vycházejících z perinukleárního prstence směrem ke krčku a formující tvar hlavičky. O perinukleárním prstenci tedy můžeme mluvit, jako o MTOC pro mikrotubuly manžety, zatímco distální centriola slouží jako organizační centrum pro bičík. Není bez zajímavosti, že u spermatid se δ -tubulin nenalezal v PCM, jako například u lidských U2OS buněk, nebo u *Chlamydomonas*, oproti tomu se nalézal v cytoplazmatických strukturách navázaných na membrány. (Kato, 2004)

ϵ -tubulin

Po objevu δ -tubulinu vyvstaly otázky ohledně jeho rozšíření napříč doménou eukaryot a možné existence nových, dosud neobjevených členů tubulinové rodiny. Tyto otázky vedly k prohledání lidského genomu, kde byl nalezen nejen lidský homolog δ -tubulinu, ale i dosud nepopsaný tubulin, nazvaný ϵ -tubulin. Tento tubulin byl následně potvrzen i u jiných obratlovců, jako myš, králík, nebo *Xenopus*, přičemž hlavně mezi savci vykazoval vysokou míru konzervovanosti. (Chang, 2000)

ϵ -tubulin byl později nalezen u naprosté většiny organismů s bazálními tělísky ve formě devíti mikrotubulových tripletů. ϵ -tubulin pak nenalezneme u organismů, které bazální tělíska vůbec nemají, jako jsou například vyšší rostliny, případně pak u organismů, které mají bazální tělíska atypická. (Hodges M. E., 2010)

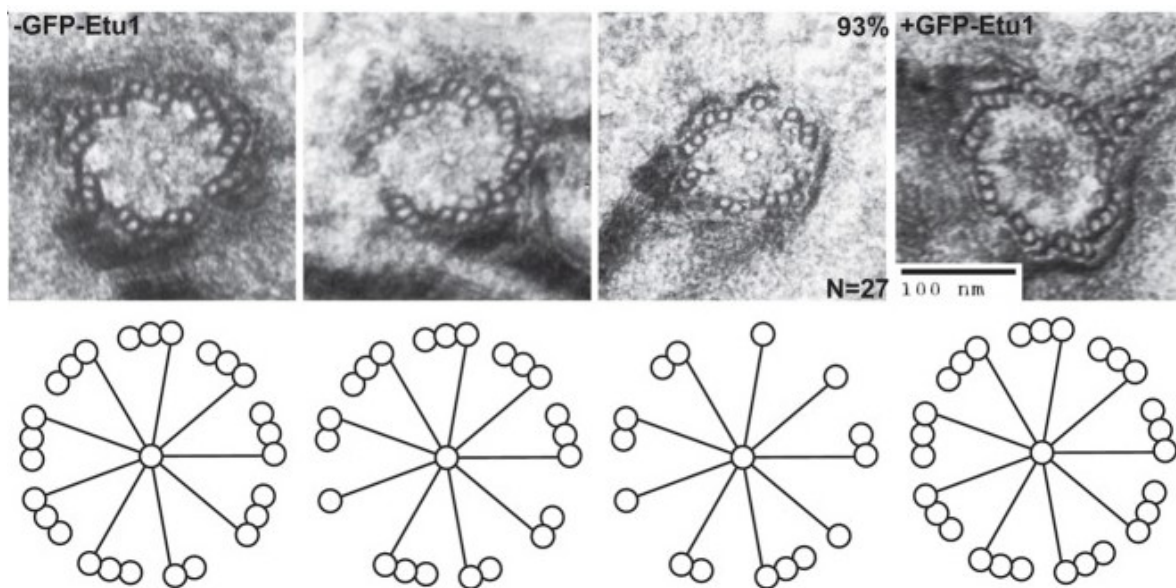
Jako příklady organismů s bazálními tělísky bez ϵ -tubulinu můžeme uvést například *D. melanogaster* nebo *C. elegans*. Nicméně v případě *D. melanogaster* je bazální tělísko tvořeno pouze dublety a v případě *C. elegans* jde pak dokonce pouze o singlety. Navíc se v obou případech rozměry bazálních tělísek pohybují okolo 100 nm na šířku a 150 nm na délku oproti běžným rozměrům bazálních tělísek, které jsou 200 nm na šířku a 500 nm na délku. (Pelletier L., 2006) (Vidwans S. J., 2003)

Funkce ϵ -tubulinu

Pomocí imunofluorescence (výzkum na buňkách U2OS pomocí peptidů získaných z králíka) bylo zjištěno, že ϵ -tubulin lokalizuje do prostoru centrozomu, kde navíc jeho přesná lokalizace záleží na fázi buněčného cyklu. V buňkách s jedním centrozomem totiž ϵ -tubulin kolokalizuje s ostatními centrozomálními proteiny, ale v po duplikaci centrozomu zůstává přítomen ve starším centrozomu a do dceřiného je následně postupně dorekrutován. Nový centrozom tedy z počátku ϵ -tubulin prakticky neobsahuje, ale jeho hladina se zvedá až je v pozdní S/G2 fázi prakticky shodná u obou centrozomů. Přitom mají oba centrozomy i přes rozdílnou koncentraci ϵ -tubulinu stejnou schopnost formovat mikrotubuly. Můžeme tedy říci, že ϵ -tubulin neovlivňuje nukleaci mikrotubulů. (Chang, 2000)

Nerovnoměrné rozložení ϵ -tubulinu v průběhu S/G2 fáze by šla vysvětlit například tím, že rekrutace ϵ -tubulinu je pomalý proces, který zabírá několik hodin. Pokud ovšem zastavíme buněčný cyklus, tak se zastaví i proces rekrutace ϵ -tubulinu a to i při několikanásobném zvýšení exprese. Z toho můžeme usuzovat, že tento proces je aktivně řízen a spojen s regulací průchodu buňky buněčným cyklem. (Chang P., 2003)

Co se týče přesné lokalizace, tak bylo i prokázáno, že ϵ -tubulin není součástí 32S γ -tubulinového komplexu a to i přes to, že má v buněčném extraktu zhruba stejnou koncentraci. (Chang, 2000) Oproti tomu se povedlo ϵ -tubulin poměrně přesně lokalizovat do oblastí subdistálních přívěšků (sub-distal appendages) a to v *Xenopus laevis*. (Chang P., 2003) Oproti tomu v *Tetrahymena thermophila* byl ϵ -tubulin lokalizován po celé délce tubulinového lešení. (Ross I, 2013)



Obrázek 4.: Ukázka ztráty tripletů v důsledku vyčerpání ϵ -tubulinu. (Ross I, 2013)

Vyřazení celého genu pro *ETU1* v *Tetrahymena thermophila* pak vedlo ke ztrátě tripletového charakteru čepelí centriola a bazálních tělísek. Krom toho u postižených buněk došlo ke ztrátě orientace kortikálních bičičků a ke snížení jejich hustoty a dále tyto buňky trpěly poruchami dělení. Toto vše vedlo ke smrti buněk během tří dnů. (Ross I, 2013)

Následné skenování ϵ -tubulinu v *Tetrahymena thermophila* pomocí cílených mutací konkrétních aminokyselin vedl zajímavému zjištění. Jediná mutace, která vedla k výraznému ovlivnění růstu a zároveň nebyla letální, byla totiž nalezena v doméně vázající GTP, konkrétně šlo o mutaci threoninu 150 na valin. Tato mutace vedla k výrazné ztrátě organizace nově vzniklých bazálních tělísek a při teplotě 38 °C i k výraznému zvýšení hustoty bazálních tělísek. Toto zvýšení přitom nebylo zapříčiněno pouze samotnou změnou velikosti buněk, ale došlo i k reálnému navýšení počtu bazálních tělísek, což znamená, že buňky postihnuté touto mutací ztratili při této teplotě i schopnost regulovat tvorbu bazálních tělísek. Krom toho tyto buňky při zablokování buněčného cyklu ztrácely hmotnost bazálních tělísek, což vede i k závěru, že tato mutace negativně ovlivnila stabilitu bazálních tělísek. (Ross I, 2013)

Toto zjištění ukazuje, že se ϵ -tubulin podílí jak na stabilitě bazálních tělísek, tak na prevenci nadměrného zmnožení se tělísek a jejich špatné orientaci. Tyto funkce jsou nejspíše podmíněny vazbou GTP. Je třeba podotknout, že podobný fenotyp (nadměrné zmnožení a špatná orientace bazálních tělísek) má na svědomí i mutace ve stejné doméně jiného člena tubulinové superrodiny, γ -tubulinu. (Shang Y., 2005)

Další zjištění k funkci ϵ -tubulinu plynoucí z výzkumu na *Tetrahymena thermophila* přineslo prozkoumání 36-ti aminokyselinové inzerce za aminokyselinou 221 a C-terminální domény. Inzerce za aminokyselinou 221 je konzervovaná v rámci celé rodiny ϵ -tubulinu, ale samotná její sekvence již konzervovaná není. Dalo se proto očekávat, že tato inzerce je důležitá pro ϵ -tubulin a jeho funkci, ale delece této inzerce vedla k životaschopným buňkám, bez žádné pozorovatelné změny fenotypu, což je velmi překvapivé. Obdobně C-terminální doména je v ϵ -tubulinu specifická, protože na rozdíl od α - a β -tubulinu má neutrální náboj. Průzkum této domény pak vedl k zjištění, že, jednotlivé mutace jsou životaschopné, ale doména jako celek je nezbytná. (Ross I, 2013)

ζ -tubulin

Další člen tubulinové superrodiny byl nalezen při výzkumu δ -tubulinu u *Trypanosomy brucei*. K překvapení výzkumného týmu, po naklonování homologu δ -tubulinu identifikovali dva nové proteiny, které databáze prohledávající programy označily za tubuliny. Situace byla o to zajímavější, že na rozdíl od tubulinů objevených v *S. cerevisiae* a následně označených „pouze“ za γ -tubulin, u *T. brucei* byly již známy čtyři členové tubulinové superrodiny, tubuliny α , β , γ i δ . První nový tubulin byl určen, jako homolog ϵ -tubulinu, objeveného nedávno v lidském genomu, ale druhý tubulin byl označen za nový tubulin, ζ -tubulin. Objev ϵ -tubulinu v *T. brucei* navíc ukázal, že i tento tubulin se, stejně jako δ -tubulin, vyskytuje u více větví eukaryot. (Vaughan, 2000)

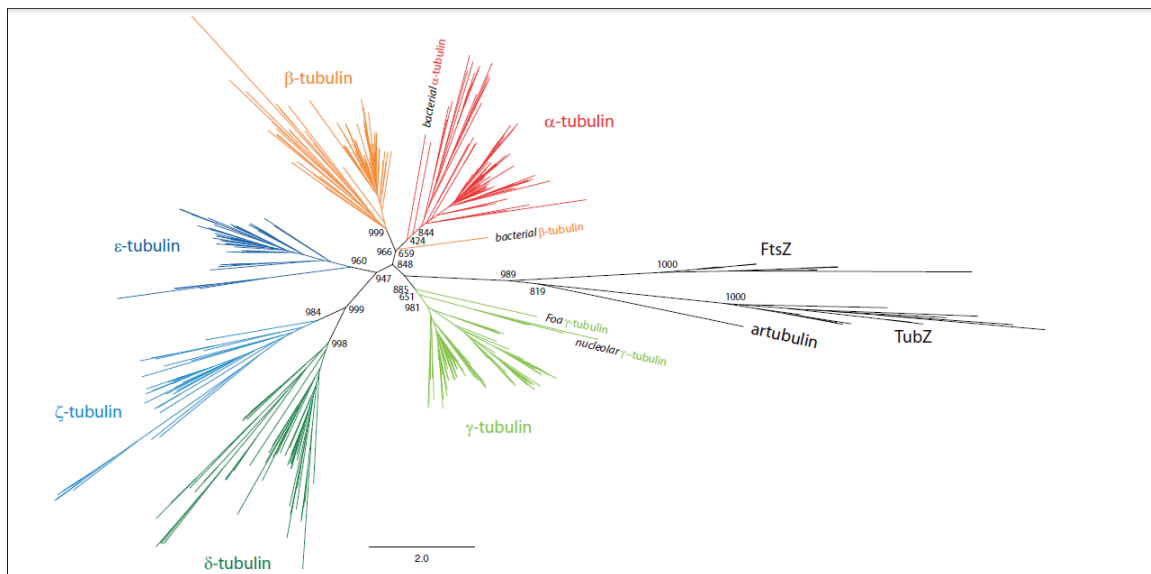
η -tubulin byl objeven v témže roce, jako protein kódovaný genem SM-19, u *Paramecium tetraurelia*. Mutace tohoto genu *sm19-1* způsobovala delokalizaci γ -tubulinu a inhibici dělení basálních tělísek, což vedlo i nepříznivých teplotách k výrazné změně tvaru buňky (zakulacení). Tato mutace nebyla sama o sobě letální a neměla vliv na dělení buněk, ty ale umíraly díky ztrátě řasinkového ústrojí u úst a tedy zhoršenému příjmu potravy. Tento tubulin vykazoval velmi nízkou identitu s ostatními členy tubulinové superrodiny, přičemž nejpodobnější byli lidský a myší δ -tubuliny s identitou 23 % a 21 %. Pro nízkou podobnost s ostatními tubuliny byl zařazen, jako nový η -tubulin. (Ruiz F, 2000)

Krom těchto dvou tubulinů byly ještě objeveny další tubuliny θ , ι a κ . K první velké analýze vztahu tubulinů napříč celým stromem eukaryot došlo až v roce 2014. Analýza ukázala, že všechny dosud objevené rodiny tubulinů (α až κ) jsou vlastně uspořádané do šesti rodin, které jsou přítomné ve všech eukaryotických říších. Podle této studie se tubuliny θ a ι odštěpují ze základy β -tubulinů, κ pak zapadá k α -tubulinům. Tubuliny δ a ϵ tvoří dvě samostatné rodiny. Poslední rodinu tvoří η -tubuliny. Do této rodiny zapadá i ζ -tubulin, objevený jen u rodů *Trypanosoma* a *Leishmania*. Pokud nechceme narušit abecední pořadí názvů v rámci tubulinové superrodiny, můžeme tuto rodinu dále nazývat ζ . (Findeisen P., 2014)

Významný je poznatek, zástupce všech šesti rodin najdeme napříč celou doménou eukaryot. Z toho můžeme vyvodit, že těchto šest rodin bylo přítomno i u posledního společného předka eukaryot a následně došlo ke ztrátě některých rodin během evoluce. Tato analýza také ukazuje, že δ a ζ -tubuliny si jsou evolučně velmi blízké. Kromě toho tyto dvě rodiny nejspíše tvoří jeden konzervovaný evoluční model společně s ϵ -tubulinem. Pro toto tvrzení hovoří fakt, že v naprosté většině organismů, v nichž chybí ϵ -tubulin, chybí i tubuliny δ a ζ . Naopak v organizmech, ve kterých je přítomen ϵ -tubulin je většinou přítomen i alespoň jeden tubulin z dvojce δ a ζ . Na základě toho, že většinou alespoň jeden tubulin z dvojce zůstane, můžeme i říci, že tubuliny δ a ζ zastávají podobnou/částečně se překrývající funkci. (Turk E., 2015)

Funkce ζ -tubulinu byla prozkoumána na drápatce *Xenopus*, tedy modelovém organismu, v jehož genomové výbavě nalezneme zástupce všech šesti členů tubulinové superrodiny. Zde bylo zjištěno, že ζ -tubulin asociuje s distálním koncem bazální nohy, struktury, která zprostředkovává kontakt bazálního tělíska a kortikálních mikrotubulů a zajišťuje tak správnou orientaci bičíků. ζ -tubulin navíc v případě bazálních tělísek *X. laevis* kolokalizuje s ϵ -tubulinem, což podporuje myšlenku, že tyto tubuliny tvoří jednotný model. (Turk E., 2015)

Vyčerpání ζ -tubulinu vedlo ke snížení počtu bazálních tělísek a ke zhoršení jejich orientace. Krom toho toto vyčerpání vedlo i k shlukování bazálních tělísek, což je jev pozorovaný i při depolarizaci aktinových vláken. (Werner ME, 2011) Krom toho byla v buňkách bez ζ -tubulinu narušena apikální i subapikální aktinová síť, což vede k závěru, že se ζ -tubulin přímo, či nepřímo podílí na kontaktu aktinové sítě a bazálního tělíska. (Turk E., 2015)



Obrázek 5.: Fylogenetický strom tubulinové superrodiny, převzatý z (Findeisen P., 2014)

Závěr

V průběhu posledních let byla objevena řada nových tubulinů, ale později se ukázalo, že všechny lze rozdělit do již existujících rodin nebo do tří nových rodin. Tyto tři nové rodiny se vyskytují napříč celou doménou eukaryot a jsou svou funkcí vázány na centrozomy a bazální tělíska vyjma několika organismů, které tyto struktury sice mají, ale v poněkud atypickém stavu.

Z těchto tří rodin jsou většinou přítomny alespoň dvě, ϵ -tubulin v kombinaci s δ -tubulinem a/nebo ζ -tubulinem. To dává tušit, že tyto tubuliny tvoří dohromady evoluční a dost možná i funkční model. Ztráta těchto tubulinů pak vede typicky ke ztrátě C tubulu, případně i B a A tubulu tripletů bazálních tělísek. Krom toho ztráta těchto tubulinů vede k problémům s funkcí bazální nohy, bazální tělíska mají problém s navázáním na kortikální síť cytoskeletu a dochází ke ztrátě organizace těchto struktur.

Bohužel, i přes to, že jsou dobře popsány fenotypy buněk s poškozenými geny pro tyto tubuliny i jejich sekvence, tak stále není známa přesná funkce ani jednoho z těchto tubulinů.

Citovaná literatura

Burns, R.G. 1995. Identification of two new members of the tubulin. *Cell Motility and Cytoskeleton*. 1995, 31.

Dute R., Kung Ch. 1978. Ultrastructure of the proximal region of somatic cilia in *Paramecium tetraurelia*. *The Journal of Cell Biology*. 1978.

Dutcher, Susan K., Trabuco, Emanuel C. 1998. The UNI3 Gene Is Required for Assembly of Basal Bodies of *Chlamydomonas* and Encodes \square -Tubulin, a New Member of the Tubulin Superfamily. *Molecular Biology of the Cell*. Červen 1998, stránky 1293-1308.

Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S, Hertzog J, Zietlow A.,. 2014. Six Subgroups and Extensive Recent Duplications Characterize the Evolution of the Eukaryotic Tubulin Protein Family. *Genome biology and evolution*. 27. 8 2014, stránky 2274-2288.

Fromherz S., Giddings T. H. Jr., Gomez-Ospina N, Dutcher S. K. 2003. Mutations in α -tubulin promote basal body maturation and flagellar assembly in the absence of δ -tubulin. *Journal of Cell Science*. 2003.

Gabelha C., Wickstead B., McKean P. G., a Gull K. 2006. Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. *Journal of Cell Science*. 2006.

Garreau de Loubresse N, Ruiz F, Beisson J, Klotz C. 2001. Role of δ -tubulin and the C-tubule in assembly of *Paramecium* basal bodies. *BMC Cell Biology*. 2001.

Hodges M. E., Scheumann N., Wickstead B., Langdale J. A., Gull K. 2010. Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *journal of Cell Science*. 2010.

Chang P., Giddings T. H. Jr., Winey M., Stearns T. 2003. ϵ -Tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization. *Nature Cell Biology*. 2003.

Chang, P., and Stearns, T. 2000. Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nature Cell Biology*. 2000, 2.

Inclán Y. F., Nogales E. 2000. Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of γ -, δ - and ϵ -tubulin. *Journal of Cell Science*. 2000.

Kato, A., Nagata, Y., Todokoro, K. 2004. δ -tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis. *Development biology*. 2004.

Keeling, P.J., and Logsdon, J.M., Jr. 1996. Highly divergent *Caenorhabditis* and *Saccharomyces* tubulins evolved recently from genes encoding γ -tubulin. *Trends in Cell Biology*. 1996.

Kumimoto K., Yamazaki Y., Nishida T., Shinohara K., Ishikawa H., Hasegawa T., Okanoue T., Hanada H., Noda T., Tamura A., Tsukita S., Tsukita S. 2012. Coordinated Ciliary Beating Requires Odf2-Mediated Polarization of Basal Bodies via Basal Feet. *Cell*. 2012.

- Li S., Fernandez J., Marshall W. F., a Argard D. A. 2012.** Three-dimensional structure of basal body triplet revealed by electron cryo-tomography. *The EMBO Journal*. 2012.
- Mandelkow E. M., Mandelkow E, Milligan R. A. 1991.** Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *Journal of Cell Biology*. 1991.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A. and Downing, K. H. 1999.** High resolution structure of the microtubule. *Cell*. 1999.
- O'Toole E.T., Giddings T.H., McIntosh J.R., Dutcher S.K. 2003.** Three-dimensional organization of basal bodies from wild-type and delta-tubulin deletion strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biology of the Cell*. 2003.
- Pelletier L., O'Toole E., Schwager A., Hyman A. A., Müller-Reichert T. 2006.** Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2006.
- Ross I, Clarissa C, Giddings TH Jr, Winey M. 2013.** ϵ -tubulin is essential in *Tetrahymena thermophila* for the assembly and stability of basal bodies. *Journal of Cell Science*. 2013.
- Ruiz F, Krzywicka A, Klotz C, Keller AM, Cohen J, Koll F, Balavoine G, Beisson J. 2000.** The sm19 gene, required for basal body duplication in *Paramecium*, encodes 'η-tubulin', a new member of the tubulin superfamily. *Current biology*. 2000.
- Shang Y., Tsao C. C., Gorovsky M. A. 2005.** Mutational analyses reveal a novel function of the nucleotide-binding domain of γ -tubulin in the regulation of basal body biogenesis. *Journal of Cell Biology*. 2005.
- Sharp DJ, McDonald KL, Brown HM, Matthies HJ, Walczak C, Vale RD, Mitchison TJ, Scholey JM. 1999.** The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles. *Jurnal of cell biology* . 1999.
- Smrzka O. W., Delgehyr N., Bornens M. 2000.** Tissue-specific expression and subcellular localisation of mammalian δ -tubulin. *Current Biology*. 2000.
- Turk E., Wills A. A., Kwon T. Sedzinski J., Wallingford J. B., Stearns T. 2015.** Zeta-Tubulin Is a Member of a Conserved Tubulin Module and Is a Component of the Centriolar Basal Foot in Multiciliated Cells. *Current Biology*. 2015, 25.
- Vaughan, S., Attwood, T., Navarro, M., Scott, V., McKean, P., Gull, K. 2000.** New tubulins in protozoal parasites. *Current Biology*. 2000.
- Vidwans S. J., Wong M. L., O'Farrell P. H. 2003.** Anomalous centriole configurations are detected in *Drosophila* wing disc cells upon Cdk1 inactivation. *Journam of Cell Science*. 2003.
- Werner ME, Hwang P, Huisman F, Taborek P, Yu CC, Mitchell BJ. 2011.** Actin and microtubules drive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. *Journal of Cell Biology*. 2011.