

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Roman Podhájecký**

Molekulární mechanismus štěpení mikrotubulů kataninem  
Molecular mechanism of microtubule severing by katanin

Bakalářská práce

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

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, 10. 5. 2018

Roman Podhájecký

*Děkuji především svému školiteli RNDr. Zdeňkovi Lánskému, Ph.D. za podporu, vedení a kritické zhodnocení této práce. Poděkování patří mé rodině za laskavost a trpělivost.*

## **Abstrakt**

Mikrotubulový cytoskelet je dynamická filamentární síť, jejíž remodelace je klíčová pro důležité buněčné procesy, jako je buněčná motilita nebo buněčné dělení. Tato remodelace je vysoce závislá na mikrotubul-asociovaných proteinech, které mohou přetvářet jednotlivé mikrotubuly. Jedním z nich je i katanin. Katanin je mikrotubul-asociovaný protein, který za hydrolýzy ATP štěpí mikrotubuly. Tato vlastnost umožňuje rychlou remodelaci mikrotubulové sítě díky rychlé amplifikaci celkového počtu mikrotubulů nebo jejich rychlé degradaci. Mechanismus a regulace aktivity kataninu jsou v posledních letech hojně diskutovány. V této práci se pokusím popsat princip štěpení mikrotubulů a regulaci aktivity kataninu na molekulární úrovni.

Klíčová slova:

cytoskelet, remodelace mikrotubulových sítí, mikrotubuly, enzymy štěpící mikrotubuly, katanin

## **Abstract**

Microtubule cytoskeleton is a dynamic filamentous network, whose reorganization underpins important cellular processes, such as cell motility or cell division. This remodeling highly depends on microtubule-associated proteins that can remodel individual microtubules, such as katanin. Katanin is a microtubule-associated protein that employs ATP hydrolysis to sever microtubules. This function can rapidly reorganize microtubule networks by providing fast amplification of the microtubule polymer number as well as microtubule fast degradation. The exact mechanism of microtubule severing and its regulation by katanin is largely discussed nowadays. In this project I would like to describe katanin's mechanism of action and its regulation on a molecular level.

Key words:

cytoskeleton, remodelling of microtubule networks, microtubules, microtubule severing enzymes, katanin

## Seznam zkratek

$\gamma$ TuRC	$\gamma$ -Tubulin Ring Complex
AAA	ATPase Associated with diverse cellular Activities
ASPM	Abnormal Spindle-like, Microcephaly-associated
ATP	Adenosintrifosfát
CDK1	Cyklin Dependent Kinase 1
CHIP	C terminus of HSC70-Interacting Protein
GDP	Guanosindifosfát
GFP	Green Fluorescent Protein
GMPCPP	Guanosin-5'-[( $\alpha,\beta$ )-methylene]trifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
HBD	Helix Bundle Domain
HS-AFM	High-Speed Atomic Force Microscopy
MAP	Microtubule Associated Protein
MIT	Microtubule Interacting and Trafficking
MT	Mikrotubuly
NBD	Nucleotide Binding Domain
PHOT1	Phototropin 1
PHOT2	Phototropin 2
PLK2	Polo-Like Kinase 2
TIRF	Total Internal Reflection Fluoreacence
USP47	Ubiquitin Specific Peptidase 47
VPS4	Vesicular Sorting Protein 4

# Obsah

<b>Abstrakt</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Seznam zkratek</b>	<b>6</b>
<b>1 Úvod</b>	<b>3</b>
<b>2 Cytoskelet</b>	<b>4</b>
2.1 Struktura a dynamika mikrotubulů . . . . .	4
2.2 Mikrotubulární síť . . . . .	5
<b>3 Katanin</b>	<b>7</b>
3.1 Podjednotka p60 . . . . .	7
3.2 Podjednotka p80 . . . . .	9
3.3 Regulace aktivity . . . . .	11
<b>4 Katanin v buněčných procesech</b>	<b>16</b>
4.1 Katanin během vývoje neuronů . . . . .	16
4.2 Depozice rostlinné buněčné stěny . . . . .	17
4.3 Mitóza . . . . .	18
<b>5 Otázky bez odpovědí</b>	<b>20</b>
<b>6 Závěr</b>	<b>24</b>

# 1 Úvod

Cytoskelet je nedílnou součástí každé buňky. Buňce zajišťuje esenciální funkce jako je motilita, segregace chromozomů, konstituce buňky, signalizace anebo transport. Variabilita takového systému ovšem vyžaduje komplexní síť proteinů, jež budou dodávat tomuto systému konkrétní vlastnosti. Příkladem může být katanin, což je enzym odpovědný za štěpení mikrotubulů. Pojmenování získal na počest japonského meče. První charakterizace se dočkal v roce 1993 [McNally and Vale, 1993], ačkoli již předtím existovaly důkazy o existenci proteinu s těmito vlastnostmi [Vale, 1991]. Od té doby se odhalilo několik důležitých buněčných procesů napříč evolučním stromem života, ve kterých hraje klíčovou roli. V rostlinné říši se jeho aktivita studuje během reorientace kortikálních mikrotubulů. Z obecnějšího hlediska se také uplatňuje při správném formování dělicích vřetének anebo správném vývoji neuronů. Patologie mutací v tomto proteinu se u člověka projevuje především malformacemi vývoje mozkové kůry [Mishra-Gorur et al., 2014]. Tato práce se zaměřuje především na shrnutí poznatků molekulárních mechanismů regulace a účinků kataninu na charakter mikrotubulární sítě.



## 2 Cytoskelet

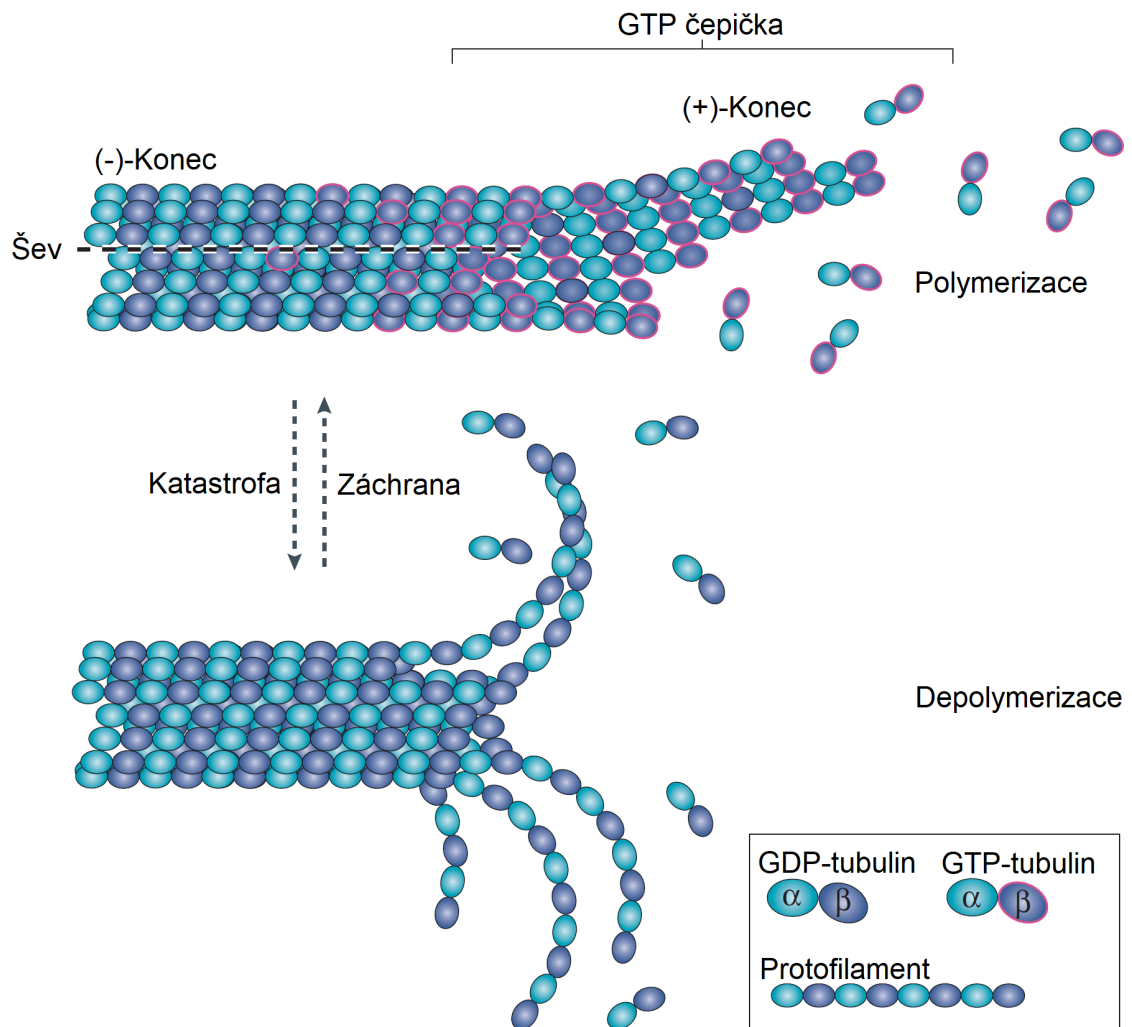
Eukaryotní cytoskelet je dynamická polymerní síť, která může dramaticky měnit svoji podobu a uspořádání. Můžeme ji rozdělit do tří základních kategorií. Mikrofilamenta, střední filamenta a mikrotubuly. Ve všech případech se jedná o polymerní proteinové struktury, které rozlišujeme převážně podle typu proteinu, z něhož jsou složeny. Nejtenčí mikrofilamenta jsou tvořena aktinem a uplatňují se například v buněčné motilitě nebo tvaru buňky. Střední filamenta jsou tvořena laminy, keratiny nebo neurofilamenty a podílejí se na udržování integrity buněčného jádra nebo pevnosti epiteliálních tkání. Mikrotubuly jsou tvořeny heterodimery  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu. Funkce mikrotubulů je nezastupitelná například při rozchodu chromatid během dělení buněk nebo v aktivním buněčném transportu [Lodish, 2013].

### 2.1 Struktura a dynamika mikrotubulů

Obě podjednotky jak  $\alpha$ -tubulin, tak  $\beta$ -tubulin mají molekulovou hmotnost přibližně 55 kD a nejčastěji je nalezneme ve formě heterodimerů díky poměrně nízké disociační konstantě [Montecinos-Franjola et al., 2016]. Napříč eukaryotickou říší se jedná o poměrně konzervované struktury, kde k nejvyšší variabilitě dochází na C-terminálním konci. Obě podjednotky pak mají GTP-vazebnou doménu, ale hydrolizovatelný nukleotid je pouze v  $\beta$ -tubulinu. Přítomnost GTP nebo GDP je základním faktorem určujícím dynamiku mikrotubulů [Lodish, 2013].

Tubuliny mohou za vhodných podmínek oligomerizovat a tvořit jádra, ze kterých s přibývajícemi podjednotkami vzniká mikrotubul. Ten má charakter "trubky", jejíž stěna je tvořena nejčastěji 13 protofilamenty. Avšak není to pravidlem, mohou vznikat mikrotubuly tvořené vyšším či nižším počtem protofilamentů [Pierson et al., 1978]. Zároveň mají mikrotubuly orientovaný charakter, rozpoznáváme tedy (+)-konec a (-)-konec. (+)-konec se nachází na konci s obnaženými  $\beta$ -tubuliny, kdežto  $\alpha$ -tubuliny jsou exponované na (-)-konci. Konce jsou také specifické svým dynamickým charakterem polymerizace a depolymerizace. Přechod mezi polymerizací a depolymerizací se nazývá katastrofa a záchrana (viz obrázek 1).

Polymerizace mikrotubulů *in vitro* vyžaduje vysoké koncentrace tubulinových podjednotek, abychom převážili přirozenou tendenci tubulinových oligomerů se rozpadat. Koncentrace, při které dochází ke vzniku relativně stabilního nukleačního jádra, nazýváme kritickou koncentrací. Nukleační jádra následně výrazně usnadňují další polymerizaci mikrotubulů. Hodnotu kritické koncentrace můžeme snížit, pokud usnadníme tvorbu takových jader například látkami jako je taxol nebo GMPCPP, které napomáhají tvorbě stabilních mikrotubulů [Roostalu and Surrey, 2017].



Obrázek 1: Dynamická povaha mikrotubulů. Upraveno podle [Roostalu and Surrey, 2017]

## 2.2 Mikrotubulární síť

V buněčném kontextu však musíme brát ohled nejen na koncentrace tubulinu či složení roztoku, ale i na proteiny asociované s mikrotubuly (MAP). Některé mohou usnadňovat polymerizaci mikrotubulů a tak snižovat potřebnou koncentraci tubulinu pro růst mikrotubulů. Například  $\gamma$ -tubulinem v komplexu s dalšími proteiny ( $\gamma$ TuRC) se účastní nukleace mikrotubulů na centrosomu anebo při větvení z již existujícího mikrotubulu, což se uplatňuje mimo jiné v rostlinné síti kortikálních mikrotubulů [Nakamura et al., 2010]. Jiné MAP mohou hrát roli ve stabilizaci již existujících mikrotubulů, jako je tomu například u tau proteinu, jenž se hojně vyskytuje v nervové tkáni. Stabilizace tau proteinem se projevuje sníženou pravděpodobností katastrofy a zvýšenou rychlostí polymerizace [Bowne-Anderson et al., 2015]. Dalším příkladem modulace mikrotubulové sítě mohou být proteiny, které naopak mřížku mikrotubulu destabilizují a způsobují jejich depolymerizaci. Například molekulární motor kinesin-13 zvyšuje pravděpodobnost kata-

strofy a uplatňuje se tak například během mitózy, při udržování tonu dělicího vřeténka jeho depolymerizací na (-)-konci [Rogers et al., 2004].

V některých fyziologických procesech by pouhá regulace rychlosti růst či degradace konců mikrotubulů nebyla dostačující. Katanin tak přináší variabilitu do repertoáru regulačních mechanismů mikrotubulových sítí svoji schopností je štěpit.

### 3 Katanin

Katanin spadá do skupiny AAA-ATPáz (APTáza asociovaná s různými buněčnými aktivitami), pro které je typické transformování chemické energie z ATP na mechanickou sílu [Yedidi et al., 2017]. Proteiny v této skupině jsou definované tak, že obsahují AAA motiv, což je sekvence o délce 230 až 250 aminokyselin. AAA-ATPázy můžeme dále rozdělit do podtypů podle toho, kolik obsahují AAA motivů do dvou skupin. Typ I s jednou a typ II se dvěma těmito sekvencemi. Tento motiv ovšem nedefinuje buněčnou funkci těchto enzymů. Zástupce této rodiny můžeme nalézt v různých procesech, jako je biogeneze organel, degradace proteinů, či fúze váčků [Patel and Latterich, 1998]. Do této skupiny mimo jiné spadá i katanin a jemu příbuzné enzymy spastin a fidgetin. Katanin dělíme do dvou podjednotek p60 a p80. Podjednotka p60 obsahuje AAA motiv a v buňkách je aktivní ve formě hexameru. Podjednotka p80 je považována za regulační a s podjednotkou p60 může dimerizovat. Důsledkem aktivity kataninu je destabilizace mikrotubulové mřížky, která způsobí následný zlom mikrotubulu. Taková aktivita má nezastupitelné místo v řadě buněčných procesů [McNally and Vale, 1993].

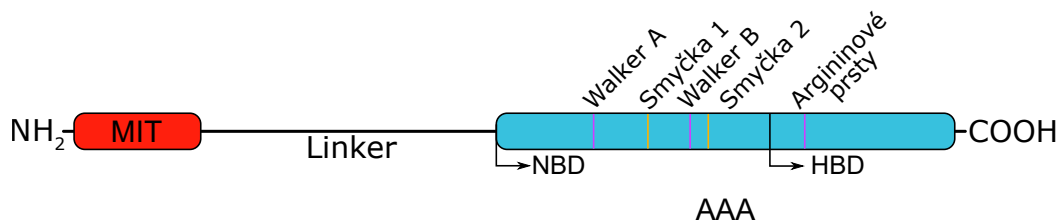
Jako u jiných proteinů i u kataninu můžeme nalézt různé sestřihové varianty nebo izoformy v rámci jediného organismu. Například v lidském genomu se nachází dvě izoformy kanonické podjednotky p60 vzniklé alternativním sestřihem a dva geny pro p60-like podjednotky. Geny pro kanonickou podjednotku můžeme nalézt pod názvy KATNAL1, případně pro p60-like podjednotky KATNAL1 a KATNAL2. U podjednotky p80 můžeme nalézt jeden gen pro kanonickou (KATNB1) a jeden pro p80-like podjednotku (KATNBL1) [Cheung et al., 2016].

#### 3.1 Podjednotka p60

Malá podjednotka kataninu dosahuje molekulové hmotnosti 60 kDa, podle čehož také získala své pojmenování. U člověka nalezneme kanonickou podjednotku dlouhou 491 a její sestřihovou variantu 311 aminokyselin.

Sekvenci můžeme rozdělit do několika domén a strukturních elementů (viz obrázek 2). První od N-konce je MIT (*Microtubule Interacting and Trafficking domain*; doména interagující s mikrotubuly), linker oddělující MIT od AAA-ATPázové katalytické části. AAA-ATPázovou doménu můžeme následně rozdělit do dvou subdomén NBD (*Nucleotide Binding Domain*; nukleotid vazebná doména) a HBD (*Helix Bundle Domain*; doména helixových svazků) [Zehr et al., 2017].

MIT doména je složena ze tří paralelně uspořádaných  $\alpha$ -helixů. Nekovalentní interakce mezi MIT a tubulinem je primárně zprostředkována několika kladně nabitými aminokyselinami a mutace v nich narušuje afinitu k tubulinu. Ovšem samotná doména k vazbě na



Obrázek 2: Sekvence podjednotky p60 s vyznačenými doménami a klíčovými sekvencemi.

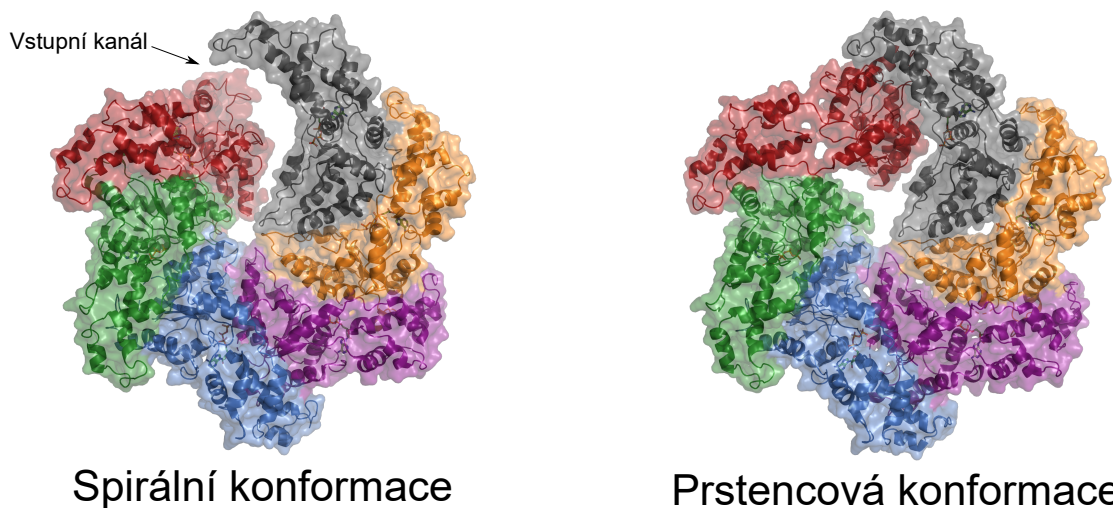
mikrotubuly nestačí a vyžaduje přítomnost AAA domény, která usnadňuje vazbu k povrchu mikrotubulu [Roll-Mecak and Vale, 2005] [Iwaya et al., 2010].

V NBD se nachází několik strukturních motivů, které se uplatňují v jeho katalytické funkci. Za prvé Walker motivy A a B, což jsou sekvence konzervované napříč proteiny pracující s ATP. Účastní se vazby  $Mg^{2+}$  a ATP a následně zprostředkovávají za přispění argininových residuí jeho hydrolyzu [Walker et al., 1982]. Za druhé jsou to dvě smyčky lokalizované v lumen póru složeného hexameru. První smyčka obsahuje aromatickou aminokyselinu tryptofan. Aromatické residuum v podobných smyčkách je zároveň konzervované napříč spektrem AAA-ATPáz. Druhá smyčka je tvořena hlavně bazickými aminokyselinami a je jí možné nalézt i u příbuzných enzymů, jako je spastin. Mutace těchto struktur negativně ovlivňuje aktivitu jak kataninu, tak spastinu [Matsushita-Ishiodori et al., 2009] [Johjima et al., 2015].

Monomery podjednotky p60 hexamerizují za přítomnosti ATP a mikrotubulů [Hartman and Vale, 1999]. S navázaným ATP tvoří hexamer pravotočivou spirálou o vnějším průměru až 250 Å, což přibližně odpovídá průměru mikrotubulu. V takovém stavu se mezi prvním a posledním protomerem komplexu vytváří mezera, která je následně vstupní branou pro substrát, kterým je C-konec tubulinu (viz obrázek 3). Svoji roli zde tedy hraje i linker, jenž propojuje MIT s AAA-ATPázovou doménou. Ten dovoluje poměrně vysokou flexibilitu a navíc spojení je uskutečněno ze strany enzymu, která přímo interaguje s povrchem mikrotubulu [Zehr et al., 2017].

Hydrolyza ATP na prvním protomeru vede ke změně konformace ze spirální formy na cirkulární formu. V takové situaci dochází k interakci smyček uvnitř póru s C-koncem tubulinu a jeho povytažení z mřížky mikrotubulu. Cyklickým opakováním následně dochází ke změně konformace tubulinové podjednotky. Jeho úplná translokace pórem kataninu údajně není nutná. Avšak vytažení jediné podjednotky tubulinu pravděpodobně k vytvoření zlomu nestačí a celý proces se tak musí několikrát opakovat [Zehr et al., 2017].

Zároveň je tubulin, získaný aktivitou kataninu z mřížky mikrotubulu, stále schopen polymerizace [McNally and Vale, 1993]. V kontextu dříve popsáního mechanismu, který



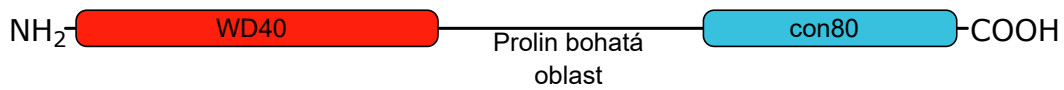
Obrázek 3: Porovnání spirální a prstencové konformace hexamerů AAA domén. Na červeném protomeru je patrná konformační změna způsobená hydrolyzou ATP. Ve spirální konformaci je také patrný vstupní kanál, kterým vstupuje C-konec tubulinu do enzymu. Struktura publikovaná v [Zehr et al., 2017].

předpokládá pro vytažení tubulinové podjednotky změnu její konformace, se to zdá být v rozporu. Vysvětlením může být vratnost konformačních změn, které katanin vytváří.

O úloze C-konce tubulinu také svědčí experimenty s "holými" mikrotubuly, které byly opůsobeny subtilisinem. Takové mikrotubuly postrádají C-konce a nereagují na aktivitu kataninu, ačkoli stimulují hydrolyzu ATP [McNally and Vale, 1993]. Otázkou zůstává, za konec které podjednotky katanin tahá. Deleční experimenty C-konců jednotlivých tubulinových podjednotek ukazují, že štěpení se objevuje pouze v přítomnosti obou konců [Johjima et al., 2015]. Popsaný mechanismus, že katanin pracuje současně s oběma konci, se nezdá být příliš pravděpodobný. Studie provedená na spastinu indikuje, že tato AAA-ATPáza pro svoji aktivitu vyžaduje přítomnost C-konce  $\beta$ -podjednotky a konec druhé pouze napomáhá celému procesu [Valenstein and Roll-Mecak, 2016].

### 3.2 Podjednotka p80

Podjednotka p80, též nazývaná regulační podjednotka, dosahuje délky sekvence přibližně 655 aminokyselin. Můžeme ji rozdělit do tří domén (viz obrázek 4): WD40 (Přibližně 1-260), prolín bohatá oblast, C-terminální doména (přibližně 480-660) [McNally et al., 2000]. Doména WD40 se vyznačuje až šestinásobným opakováním motivu ohraničeného aminokyselinami tryptofan-aspartát. WD40 doména byla identifikována u jiných proteinů například  $\beta$ -transducinu nebo Tup a předpokládá se, že zprostředkovává protein-protein interakce [Komachi, 1994].



Obrázek 4: Sekvence podjednotky p80 s vyznačenými doménami.

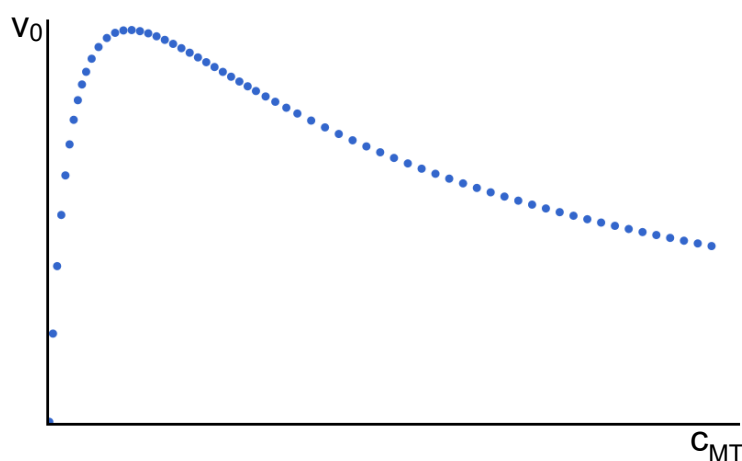
Tato vlastnost se předpokládá i u podjednotky p80, jelikož její přítomnost je klíčová pro kolokalizaci kataninu s centrosomem. To potvrdily také experimenty na buňkách MSU1.1 *in vivo* se samotnou doménou WD40 sfúzovanou s GFP [Hartman et al., 1998]. Zároveň HeLa buňky transfekované se samotnou WD40 doménou se během buněčného cyklu zpozdily s mitózou, což bylo pravděpodobně způsobeno chybným zformováním mitotického aparátu, kvůli vazbě domény WD40 na některý centrozomální protein [McNally et al., 2000]. Tyto výsledky také podporuje interaktom podjednotky p80, který vykazuje afinitu pro centrozomální proteiny [Cheung et al., 2016].

Prolin v proteinech hraje zvláštní roli kvůli jeho strukturně chemickým vlastnostem. Za prvé kvůli vazbě -CH<sub>2</sub>- na dusík a za druhé kvůli přítomnému cyklu je omezena rotace mezi dusíkem a  $\alpha$ -uhlíkem. To v důsledku vede k rozrušení formace jak  $\alpha$ -helixu, tak  $\beta$ -listu. Sekvence bohaté na prolin jsou tedy vysoce flexibilní, což poměrně ztěžuje získání krystalické struktury [Williamson, 1994]. To se pravděpodobně týká i podjednotky p80. Ačkoli se na prolin bohaté oblasti mohou účastnit interakcí protein-protein, u podjednotky nebyla taková vlastnost nikdy popsána, pravděpodobně se tedy jedná pouze o strukturu s funkcí linkeru.

C-terminální doména, též nazývána con80, zprostředkovává interakci mezi podjednotkou p60 a p80. Vazba je převážně stabilizována hydrofóbními interakcemi a postranními vodíkovými můstky. Vazba je také specifická v porovnání s příbuznými AAA-ATPázami a jejich interakčními partnery, jako je spastin nebo VSP4, jelikož se vyznačuje nejvyšší styčnou plochou, což v důsledku vede k výrazně nižší disociační konstantě oproti zmíněným proteinům [Rezabkova et al., 2017].

### 3.3 Regulace aktivity

Jedním ze základních mechanismů regulace enzymatické aktivity kataninu je podvojný vliv substrátu, tedy mikrotubulů. Z obecných principů reakčních kinetik enzymů platí, že s rostoucí koncentrací substrátu (1), se zvyšuje aktivita enzymu. Ovšem při popisu aktivity kataninu si můžeme povšimnout, že trend neodpovídá klasickému popisu dle Michaelis-Mentenové rovnice (2) [Voet and Voet, 2011], ale můžeme nalézt optimální koncentraci mikrotubulů, při které je aktivita nejvyšší (Graf 1). Při dalším navyšování koncentrace mikrotubulů je aktivita kataninu inhibována. Průběh počáteční reakční rychlosti kataninu je následně možné popsat pomocí dvou kompetujících Michaelis-Mentenových rovnic (2) [Hartman and Vale, 1999]. Tento jev můžeme vysvětlit tím, že mikrotubuly převádějí katanin z roztoku (3D) do plochy svého povrchu (2D), což je důležité pro sestavení hexameru. Formování hexameru lze popsat podle reakce 1. Zároveň aktivita kataninu koreluje s množstvím vzniklých hexamerů. Lze tedy předokládat, že inhibiční efekt vysokých koncentrací mikrotubulů je daný sníženou plošnou koncentrací kataninů navázaných na mikrotubulech [Hartman and Vale, 1999].



Graf 1: Znárodnění závislosti počáteční reakční rychlosti na koncentraci mikrotubulů za konstantní koncentrace podjednotky p60. Předpis podle rovnice (2) [Hartman and Vale, 1999].

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

- $v_0$  je počáteční reakční rychlost.
- $[S]$  je koncentrace substrátu.
- $V_{\max}$  je maximální reakční rychlost.
- $K_M$  je Michaelisova konstanta.



$$v_0 = \frac{A[MT]}{B + [MT]} - \frac{C[MT]}{D + [MT]} \quad (2)$$

- $v_0$  je počáteční reakční rychlost.
- $[MT]$  je koncentrace mikrotubulů.
- $A$ ,  $B$ ,  $C$  a  $D$  jsou konstanty.



Reakce 1: Popis formování aktivního hexameru.

- $p_{60}$  je katalytická podjednotka.
- $MT$  je mikrotubul.
- $p_{60}:MT$  je podjednotka  $p_{60}$  navázaná na povrchu mikrotubulu.
- $6x(p_{60}):MT$  je sestavený aktivní hexamer.

Tento jev mohu demonstrovat následujícím odvozením z obecné teorie adsorpce plynu na pevné látce podle Langmuirovy izotermy. Pro zjednodušení celého příkladu předpokládám, že podjednotky navzájem neinteragují a na povrchu mikrotubulu se nepohybují. Zároveň uvažuji, že veškerý tubulin je zpolymerovaný do mikrotubulu. Pokud tedy uvádím koncentraci mikrotubulů uvažuji koncentraci tubulinových podjednotek, ze kterých jsou tvořeny.

$$\theta = \frac{S_K}{S}; S_K = a\bar{n}; S = bC_{MT} \quad (3)$$

- $\theta$  popisuje poměrné obsazení povrchu mikrotubulů.
- $S$  je plocha povrchu mikrotubulů.
- $S_K$  je plocha povrchu obsazeného monomery podjednotky  $p_{60}$ .
- $\bar{n}$  je látkové množství navázaného kataninu.
- $C_{MT}$  je koncentrace tubulinových podjednotek.
- $a$  a  $b$  jsou konstanty, které popisují převodní vztah.

$$K_d = \frac{C_K^o C_{MTfree}}{\overline{C}_K} \sim \frac{C_K^o (1 - \theta)}{\theta}; C_K^o = \frac{n^o}{V} \quad (4)$$

- $K_d$  je disociační konstanta.
- $C_{MT}^o$  je koncentrace volných tubulinů.
- $\overline{C}_K$  je koncentrace navázaného kataninu.
- $C_K^o$  je koncentrace volného kataninu.
- $\frac{C_{MT}^o}{C_K}$  je možné nahradit poměrným obsazením povrchu  $\frac{1-\theta}{\theta}$ .
- $n^o$  je látkové množství volného kataninu.
- $V$  je celkový objem.

$$n = n^o + \overline{n} \quad (5)$$

- $n$  je látkové množství kataninu vstupujícího do reakce.

$$\theta = \frac{an - \frac{aK_d\theta V}{1-\theta}}{S}$$

$$0 = \theta^2 S - \theta(an + aK_d V + S) + an \quad (3, 4, 5)$$

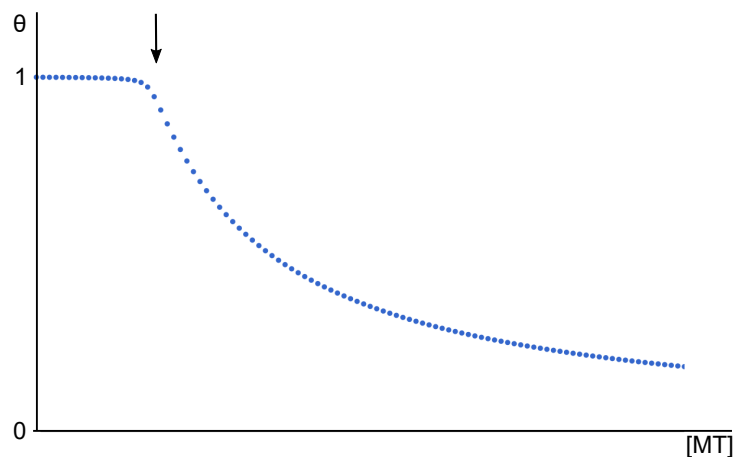
$$\theta = \frac{(an + aK_d V + S) - \sqrt{(an + aK_d V + S)^2 - 4San}}{2S}$$

$$\theta = \frac{(an + aK_d V + bC_{MT}) - \sqrt{(an + aK_d V + bC_{MT})^2 - 4San}}{2bC_{MT}} \quad (6)$$

Dosažením rovnic (4,5) do (3) a následným vyjádřením  $\theta$  získáváme rovnici (6) s proměnnou  $S$ , která popisuje změnu pokrytí povrchu v závislosti na koncentraci mikrotubulů, jelikož  $S = bC_{MT}$ .

Výsledná rovnice (6) popisuje poměrné obsazení povrchu mikrotubulů kataninem. Pokud rovnice (6) je funkcí  $\theta$  s proměnnou  $C_{MT}$  získáme graf 2. Za vhodných podmínek se  $\theta$  výrazně nemění, až po mezní koncentraci. Délka této plató fáze je závislá na koncentraci kataninu vstupujícího do reakce a koeficientu  $a$ . Strmost s jakou se projeví přechod z plató fáze do hyperbolické fáze ovlivňuje disociační konstanta  $K_d$ .

Na grafu 2 lze demonstrovat chování kataninu, které pozorovali *Hartman* a *Vale* (viz Graf 1) [Hartman and Vale, 1999]. Zpočátku je katanin vysycován z roztoku na mikrotubulech a jeho aktivita roste spolu s koncentrací mikrotubulů. V okamžiku, kdy katanin již není v nadbytku, rapidně poklesne  $\theta$ , což znamená nižší plošnou koncentrací navázaného kataninu. Právě plošná koncentrace navázaného kataninu je klíčová pro sestavení aktivního



Graf 2: Znárodnění poměrného pokrytí mikrotubulů  $\theta$  v závislosti na koncentraci mikrotubulů. V tomto příkladu uvažují dostatečně vysokou koncentraci kataninu, se kterou vstupují do reakce, takže zpočátku je povrch mikrotubulů zcela nasycený. Šipka označuje mezní koncentraci mikrotubulů, při které bude aktivita kataninu nejvyšší díky vysoké koncentraci substrátu a zároveň bude plošná koncentrace kataninu na mikrotubulech optimální pro tvorbu hexameru.

hexameru. Můžeme tedy očekávat mezní rozhraní hodnot  $\theta$ , při kterém bude katanin hexamerizovat s vysokou pravděpodobností a tedy dosáhne vrcholu své aktivity (viz Graf 1).

Interakci p60:mikrotubul následně moduluje několik různých faktorů. Prvním z nich je přítomnost podjednotky p80. Kromě toho, že C-terminální doména zprostředkovává interakci s druhou podjednotkou, samotná vykazuje, byť nízkou, afinitu k mikrotubulům [McNally et al., 2000]. To může být jedna z příčin jevu, kdy podjednotka p80 stimuluje vazbu podjednotky p60 na mikrotubuly. K tomu mohou přispívat vyvolané konformační změny v MIT doméně p60. Ovšem regulační podjednotka kataninu nemá pouze stimulační roli, ale i inhibiční. Důkazem může být markantní zvýšení aktivity kataninu v přítomnosti pouze domény con80 podjednotky p80, zatímco tento efekt se výrazně neprojevil při plné délce regulační podjednotky [McNally et al., 2000] [Cheung et al., 2016]. Vzájemný poměr podjednotek p60:p80 tedy ovlivňuje aktivitu kataninu.

Mezi faktory regulující aktivitu kataninu se řadí i post-translační modifikace. V experimentech na embryích žab *Xenopus laevis* se podařilo identifikovat kinázu, která negativně reguluje aktivitu enzymu. Tato kináza, Aurora B, fosforeluje podjednotku p60 na serinu lokalizovaném na linkeru propojující MIT a AAA-ATPázovou doménu [Loughlin et al., 2011]. V lidském genomu se nachází hned několik potenciálních kináz, které vykazují specifickou interakci s rodinou podjednotek p60. Můžeme mezi nimi nalézt kinázy účastnící se regulace průběhu mitózy jako je Aurora A, PLK2, CDK1 a další [Cheung et al., 2016].

Následující *in vitro* experimenty s fosfo-mimikující mutací serinu na kyselinu glutamovou opět poukazují na sníženou aktivitu kataninu. Jsou tedy konzistentní s *in vivo* pozorováním. Překvapivě tato mutace nesnížila afinitu podjednotky p60 k mikrotubulům [Whitehead et al., 2013]. Ovšem je zapotřebí brát v potaz i výpovědní hodnotu takových mutací, jelikož charakter a podobnost postranního řetězce fosfo-serinu a kyseliny glutamové není příliš velká [Castranova et al., 2016].

Vliv na aktivitu enzymu nemají pouze post-translační modifikace kataninu, ale i jeho substrátu, tedy tubulinu. Uplatňuje se několik typů modifikací, jednak polyglutamylace a detyrosinace C-konce tubulinu, ale i například acetylace lysinu, který se nachází na  $\alpha$ -tubulinu uvnitř lumen mikrotubulu. Jak již bylo řečeno výše, pro aktivitu enzymu jsou esenciální aromatické a bazické aminokyseliny na smyčkách v póru hexameru. Modulací interakcí mezi těmito aminokyselinovými zbytky a C-koncem tubulinu, ať už mutací v samotném enzymu nebo modifikací substrátu, je možné regulovat aktivitu kataninu. Studie příbuzného spastinu ukázaly podvojný efekt polyglutamylace, jelikož záleží i na její samotné míře. S přibývajícemi zbytky kyseliny glutamové se zprvu zvyšuje afinita povrchu mikrotubulu pro spastin, a tedy se zvyšuje i jeho aktivita. Zároveň se zvyšující se mírou modifikací vzrůstá její inhibiční efekt na samotnou aktivitu spastinu [Valenstein and Roll-Mecak, 2016]. Ovšem efekt na katanin může být odlišný. To ostatně dokazuje rozdílná citlivost acetylovaných mikrotubulů pro tyto dva enzymy *in vivo*. Zatímco spastin nevykazuje nijak zvláštní preferenci pro acetylované mikrotubuly, katanin je v hojně míře štěpí [Sudo and Baas, 2010].

Jedním z nekonvenčních způsobů regulace aktivity kataninu může být přítomnost defektů v mřížce mikrotubulu. Přítomnost takových defektů naznačilo pozorování pomocí mikroskopu atomárních sil. Předpovědi, jak by takové chyby mohly vypadat, se dají shrnout do tří typů: bodové defekty, defekty na přechodu mezi mikrotubuly složenými z různého počtu protofilamentů a axiální defekty mezi protofilamenty vzniklé například ohybem mikrotubulu [Schaap et al., 2004]. Mechanismus, jakým by defekty v mřížce mikrotubulu zvyšovaly aktivitu kataninu, může být nižší síla vazby mezi tubuliny ve stěně mikrotubul. Takovému mechanismu odpovídají i simulace *in silico* [Davis et al., 2002]. Částečně o tom svědčí i pozorování zvýšené pravděpodobnosti stříhu na přechodu mezi rozdílnými tloušťkami mikrotubulu [Díaz-Valencia et al., 2011].

## 4 Katanin v buněčných procesech

### 4.1 Katanin během vývoje neuronů

Cytoskelet hraje nezastupitelnou roli ve vývoji a funkci neuronů. Účastní se migrace neuronů, jejich polarizaci či formování a udržování axonů. Mikrotubuly jsou v axonech uspořádány se stejnou polaritou, tedy (+)-konce mikrotubulů směřují k synapsi a (-)-konce k tělu neuronu. Takové uspořádání má zásadní dopad na transport váčků, mitochondrií a dalších komponent napříč axonem. Zajímavou otázkou je původ axonálních a jiných necentrosomálních mikrotubulů. Centrosom se uplatňuje jako primární induktor polymerizace mikrotubulů, ale mimo něj bylo zdokumentováno několik jiných mechanismů, jakými mohou mikrotubuly vznikat *de novo*. Jednak nukleace mikrotubulu z  $\gamma$ -tubulinu lokalizované na membráně Golgiho aparátu, anebo z úlomků mikrotubulů, které slouží jako nukleační jádra [Kuijpers and Hoogenraad, 2011].

Zde ke slovu opět přichází katanin, který je pravděpodobně zodpovědný za uvolňování mikrotubulů z centrozómu. Provedené knock-down experimenty se na fenotypu buněk projevily rapidním zkrácením axonů, elongací stávajících mikrotubulů a celkovým snížením jejich počtu [Ahmad et al., 1999]. Nabízí se hypotéza, že primární funkcí kataninu je regulace délky mikrotubulů a geneze krátkých mikrotubulů. Ty by následně mohly být transportovány do periferie, kde slouží jako nukleační jádra. Tím by se zvýšila celková suma mikrotubulů, které jsou lešením rostoucího axonu [Ahmad et al., 1999]. Tuto hypotézu potvrzuje i fakt, že uvnitř axonů probíhá aktivní transport jednotlivých mikrotubulů [Wang and Brown, 2002]. Nicméně pohyb krátkých mikrotubulů z centrozomu do periferie doposud nebyl zdokumentován .

Úroveň exprese podjednotek p60 a p80 se liší v závislosti na buněčném typu i na fázi diferenciacce buněk. V průběhu prenatálního vývoje myšlího nervového systému se nejvyšší hladiny exprese podjednotky p60 nacházejí ve spinálních gangliích, kůře mozkové, hypokampu a tectu. To je příznačné pro buňky proliferující, migrující a buňky s aktivním axonálním růstem. V dalším prenatálním a následně postnatálním vývoji se hladiny exprese snižují. To platí i pro jiné tkáně, jako jsou plíce a srdce, ovšem s tím rozdílem, že se liší celkový poměr podjednotek p60:p80. V neurálních tkáních se poměr exprese pohybuje mezi 0,7-7 (p60:p80), kdežto v plicích a srdci se poměr pohybuje mezi 10-20 [Yu et al., 2005].

Za pozornost stojí, že koncentrace podjednotky p60 v axonech rapidně klesá po napojení axonu na cílovou buňku [Karabay et al., 2004]. Mechanismus, který za tímto poklesem stojí, bude patrně degradace kataninu v proteasomech. Tomu předchází polyubiquitinilace E3 ligazou CHIP. Do procesu promlouvá i enzym USP47, který je zodpovědný za deubiquitinilaci. Jejich vzájemný poměr následně určuje osud podjednotky p60 [Yang et al., 2013].

Další fenomén, který byl v neuronech popsán, je vliv proteinu tau a podobných MAP na stabilitu mikrotubulů. To se neprojevuje pouhou stabilizací mřížky mikrotubulu, ale pravděpodobně i fyzickým zabráněním přístupu dalších proteinů k jeho povrchu [Baas and Qiang, 2005]. To platí i pro katanin, který v neuronech se sníženou hladinou tau proteinu způsobuje rapidní pokles velikosti masy mikrotubulů [Yu et al., 2008]. V porovnání s příbuzným spastinem se funkce tau proteinu zdá být poněkud odlišná, jelikož jeho přítomnost neovlivňuje aktivitu spastinu tak markantním způsobem. Může tak hrát prim při rozkládání procesů vedoucích k větvení axonu [Qiang et al., 2006]. Nicméně bližší charakterizace vztahu mezi kataninem (případně spastinem) a tau proteinem chybí.

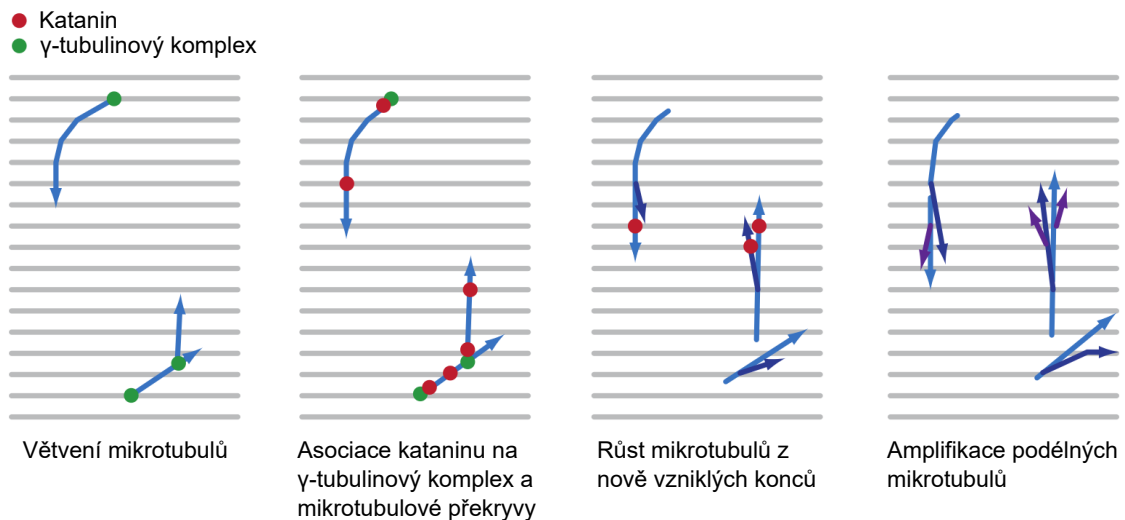
## 4.2 Depozice rostlinné buněčné stěny

Etiolizace rostlin, tedy jejich růst ve tmě, se projevuje několika faktory, kterými na takové podmínky reagují. První na pohled patrný jev je značný dlouhivý růst, který má rostlině posloužit k nalezení zdroje světla. Na tvar a morfologii rostlinné buňky má zásadní vliv struktura a vlastnosti její buněčné stěny. Ta je z velké části tvořena organizovanými vlákny celulózy, která jsou nad plazmatickou membránou syntetizována celuloz-syntázou. Pozoruhodné je, že tato vlákna nejsou organizována náhodně, ale jejich orientace značně koreluje s uspořádáním kortikálních mikrotubulů [Burk, 2002]. Jedním z faktorů kontrolujícím orientaci mikrotubulů je modré světlo. V epidermálních buňkách koleoptyle a hypokotylu klíčících rostlin určuje přítomnost modrého světla, zda budou mikrotubuly orientovány podélně ve směru růstu rostliny nebo při jeho nepřítomnosti či nedostatku transverzálně, tedy příčně na směr růstu [Zandomeni and Schopfer, 1993].

Pro takovouto masivní remodelaci cytoskeletu je nutná aktivita kataninu. V buňkách *Arabidopsis thaliana* mutace v genu kódující p60-like podjednotku vedla k dezorganizaci kortikální sítě mikrotubulů, což zároveň korelovalo se změnou v depozici buněčné stěny z uspořádané ve více méně neuspořádanou [Burk, 2002].

Ukazuje se, že katanin specificky rozpoznává místa, kde se navzájem mikrotubuly kříží. Zde dochází ke štěpení jednoho z mikrotubulů. Část populace nově vzniklých (+)-konců pak pokračuje v růstu, kdežto zbytek depolymeruje. Celému procesu pak napomáhá komplex  $\gamma$ -tubulinu, který umožňuje nukleaci mikrotubulům *de novo* na boku již existujících mikrotubulů preferujících úhly  $0^\circ$  a  $40^\circ$ . V případě, kdy se mikrotubuly větví, vznikají nové překryvy, na kterých může katanin působit. Za pozornost také stojí, že kataninem jsou preferenčně rozpoznávány nově vzniklé mikrotubuly, což dohromady s faktem, že (-)-konce jsou převážně stabilní, vede k amplifikaci podélně rostoucích mikrotubulů (viz obrázek 5). Odpověď je zároveň závislá na modrém světle skrze aktivitu fototropinů PHOT1 a PHOT2 [Nakamura et al., 2010] [Lindeboom et al., 2013].

Absenci tohoto reorientačního mechanismu můžeme nalézt v mutantních *Arabidopsis thaliana*, které postrádají funkční podjednotku p80. Ta, jak se zdá, napomáhá rozpoznávání a účinnému střihání na překříženích [Wang et al., 2017]. *In vitro* byla také pozorována zvýšená preference pro překryvy komplexem podjednotek p60:p80, ovšem jednalo se o analogy z *Caenorhabditis elegans* [McNally et al., 2014]. To může indikovat dva fenomény. Prvním je dostatečnost samotného kataninového komplexu pro rozpoznávání křížících se mikrotubulů a za druhé tento mechanismus nemusí být vlastní pouze rostlinné říši.



Obrázek 5: Schéma mechanismu reorientace kortikálních mikrotubulů kataninem. Upraveno podle [Lindeboom et al., 2013].

### 4.3 Mitóza

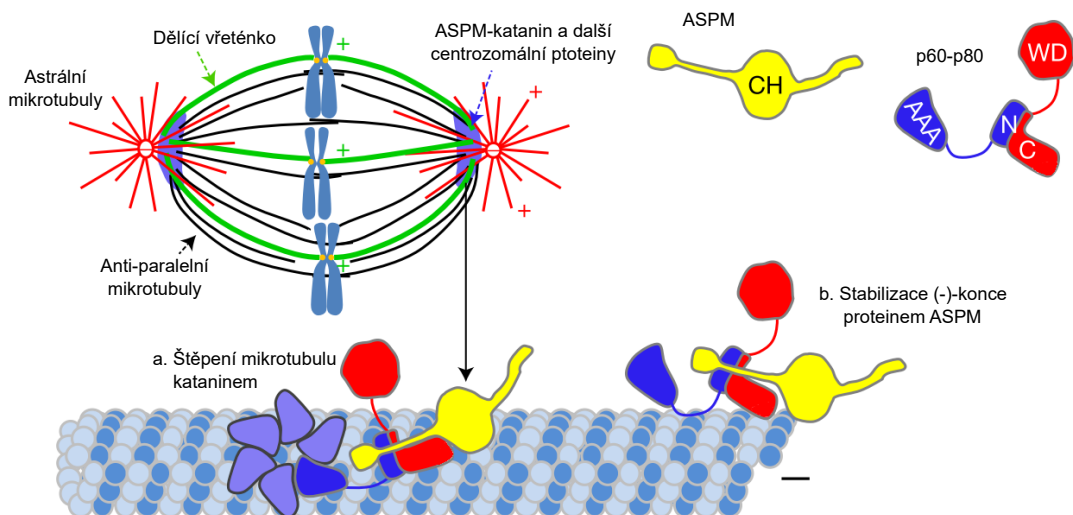
Správná segregace chromozomů je naprosto krucální pro životaschopnost dceřiných buněk. Proto na konci metafáze dochází k seřazení chromatid do ekvatoriální roviny a zároveň se jedná o jeden z kontrolních bodů průběhu mitózy. Tento stav však musí být aktivně řízeným procesem, kterého se účastní mikrotubuly a s nimi asociované proteiny. Klíčovou roli zde hraje dynamická povaha mikrotubulů, která se uplatňuje i při udržování ekvatoriální roviny. Dochází ke kontinuální polymerizaci mikrotubulů na (+)-konci u kinetochory a depolymerizaci na (-)-konci u centrozómu. Rovnováha jednotlivých faktorů, které ovlivňují tyto vlastnosti mikrotubulů určují konečnou délku dělících vřetének [Lodish, 2013].

Katanin se v průběhu mitózy převážně vyskytuje v oblasti (-)-konců mikrotubulů. Centrosomální lokalizaci zprostředkovává primárně podjednotka p80 skrze interakce s dalšími proteiny. Je pravděpodobné, že p80 má více než jednoho interakčního partnera. Důkazem toho může být fakt, že doména WD40 se samostatně kolokalizuje s centrozómem

a zároveň zprostředkovává vazbu s proteinem ASPM nezávisle na doméně WD40 [Hartman et al., 1998] [Jiang et al., 2017].

ASPM je, stejně jako katanin, spojován s dědičným onemocněním mikrocefalií, které se projevuje primárně defektním vývojem mozku. ASPM asociuje s (-)-konci mikrotubulů a pravděpodobně zprostředkovává jejich vzájemné provázání. Stojí za povšimnutí, že ASPM je možné nalézt na koncích paralelních mikrotubulů nukleujících podélně z dělících vřetének a anti-paralelních mikrotubulů. Následně je možné pozorovat jejich translokaci směrem k centrosomu, což je pravděpodobně způsobeno kontinuálním "tokem" mikrotubulů [Ito and Goshima, 2015].

Nově se ukazuje spojitost mezi ASPM a kataninem. V místě kontaktu MIT domény podjednotky p60 a domény con80 podjednotky p80 se váže ASPM pomocí motivu na N-konci. *In vitro* experimenty ukazují schopnost tohoto komplexu se vázat a stabilizovat (-)-konce mikrotubulů. Na druhou stranu je katanin stále schopný tvořit hexamery a katalyticky je štěpit. *In vivo* se rozrušení vazby mezi ASPM a p60:p80 projevuje především chybnou organizací vřetének a astrálních mikrotubulů. Zároveň přítomnost ASPM:p60:p80 u centrosomu zvyšuje úroveň "toku" mikrotubulů, což se při inhibici aktivity komplexu projevuje nárůstem vzdálenosti mezi centrosomy. Hypotéza pro tento mechanismus předpokládá, že katanin je pomocí ASPM zacílený na (-)-konce mikrotubulů u centrosómu, kde je následně uvolňuje (viz obrázek 6). Na tyto volné konce se poté mohou navázat další proteiny například kinesin-13, který stimuluje jeho depolymerizaci [Jiang et al., 2017] [Loughlin et al., 2011]. Za povšimnutí také stojí, že se tímto odhalí nový (+)-konec, který může sloužit jako nukleační jádro nového mikrotubulu.



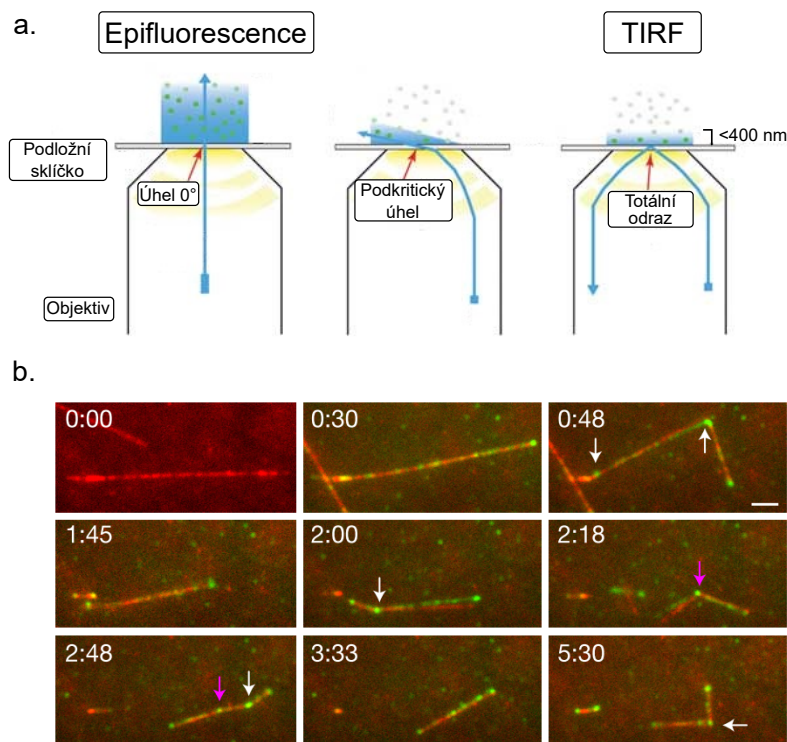
Obrázek 6: Předpokládaný efekt ASPM na katanin. ASPM rozpoznává (-)-konec mikrotubulu a tím i zvyšuje koncentraci kataninu. Převzato z [Jiang et al., 2017]



## 5 Otázky bez odpovědí

Přestože byly provedeny podrobné strukturní a mechanistické studie, není stále jasné, jakým způsobem jsou hexamery kataninu navázány na mikrotubuly. Zda jsou navázány všemi svými podjednotkami na povrchu mikrotubulu nebo jen některými. Pochybnosti mohou vzbuzovat samotné rozměry kataninu, které se blíží rozměrům mikrotubulů. S tím souvisí i preference kataninu pro místa překřížení mikrotubulů. Elegantním vysvětlením tohoto specifického rozpoznávání je vazba jednou polovinou hexameru na povrch jednoho mikrotubulu a druhou na druhý. Charakter, jakým se na mikrotubuly katanin váže, závisí primárně na ohebnosti a délce linkeru mezi MIT a AAA-ATPázovou doménu. Existuje více možností, jak by bylo možné identifikovat charakter interakce a způsob skládání jednotlivých podjednotek. Například mikroskopie jednotlivých molekul (viz obrázek 7) umožňuje sledování pohybu jak monomerů, tak oligomerů a jejich následnou kvantifikaci. Můžeme tak určit počet podjednotek v oligomeru, jejich rychlost difuze a pozorovat tak katanin přímo při štěpení mikrotubulů. Informace o počtu molekul v oligomeru v porovnání s rychlostí difuze může pomoci identifikovat způsob, jakým je kataninový hexamer navázaný na mikrotubulu, jelikož rychlost difuze by měla být nepřímo úměrná počtu navázaných podjednotek.

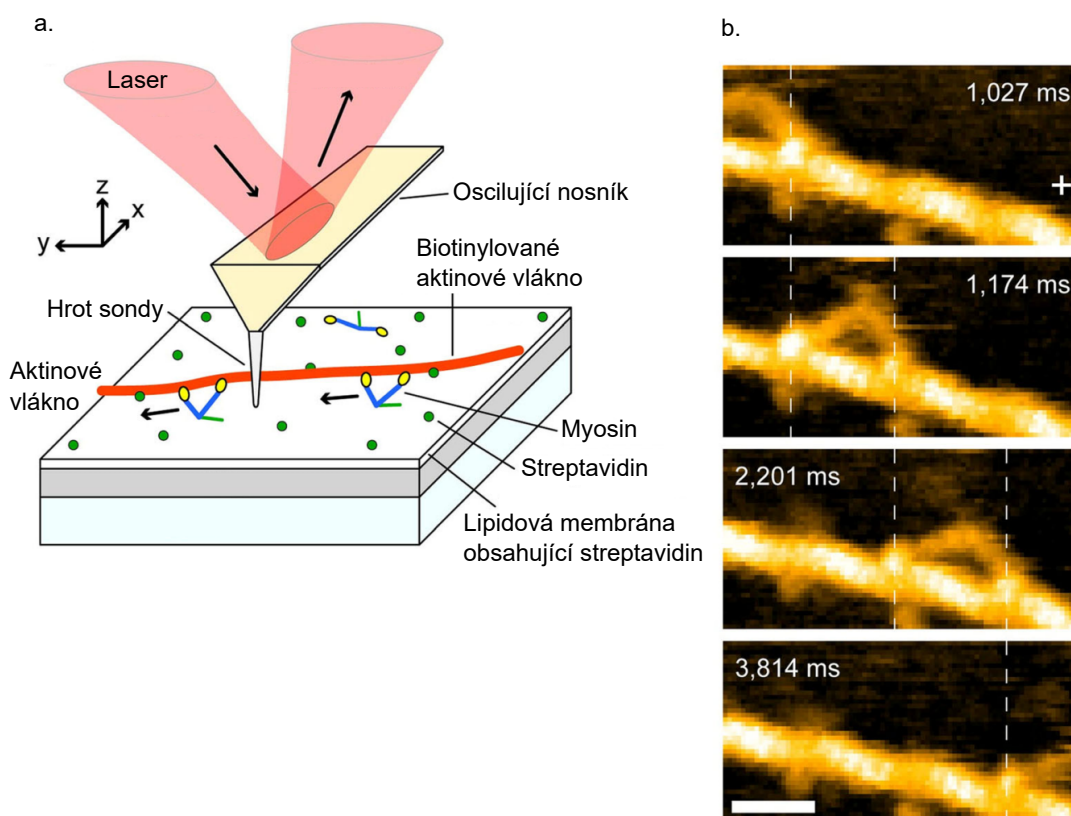
Druhou možností může být pozorování aktivity kataninu pomocí vysokorychlostního mikroskopu atomárních sil (HS-AFM, viz obrázek 8). Ten byl úspěšně použit například pro sledování aktivity endonukleázy cas9 nebo myosinu na vláknu aktinu [Shibata et al., 2017] [Kodera and Ando, 2014]. HS-AFM by také mohlo osvětlit i jevy pozorované *in vitro*: za prvé zlomení mikrotubulu během stříhání [Davis et al., 2002], za druhé zakrucování konců mikrotubulů v přítomnosti kataninu (viz obrázek 9) [Jiang et al., 2017].



Obrázek 7: a. Schéma TIRF mikroskopie. TIRF (z anglického *Total Internal Reflection Fluorescence*) je metoda, která umožňuje excitaci molekul pouze blízko povrchu podložního sklíčka. Zajišťuje tak nižší hladinu pozadí a tím snazší pozorování jednotlivých molekul. Upraveno z [Savage, 2011] b. Příklad využití TIRF mikroskopie. Mikrotubuly jsou červené, katanin zelený. Převzato z [Jiang et al., 2017]

Podrobnější popis vyžaduje také mechanismus chránění mikrotubulů tau proteinem, případně jinými asociovanými proteiny. Nic nenasvědčuje tomu, že by mezi nimi a kataninem probíhala specifická interakce [Cheung et al., 2016]. Ukazuje se, že účinek tau na molekulární motory spočívá především ve frekvenci nasedání na mikrotubuly, ale samotná rychlost motoru zůstává zachována [Baas and Qiang, 2005] [Seitz et al., 2002]. Je možné stejný mechanismus aplikovat i na katanin? V takovém modelu by tau snižoval plošnou koncentraci na povrchu mikrotubulů, a tím snižoval pravděpodobnost sestavení hexameru. Případně by určitou protekční roli mohl mít jako sterická bariéra, která sice nebrání vzniku hexameru, ale neumožňuje jeho katalytickou aktivitu.

Zajímavým fenoménem popsáným v kapitole o depozici rostlinné buněčné stěny je preference kataninu pro novější mikrotubul u dvou křížících se mikrotubulů. Jakým způsobem je toho dosaženo, zůstává neobjasněno. Jedním z mechanismů by mohlo být rozpoznávání mikrotubulů podle množství defektů v mřížce mikrotubulu. Ovšem to neodpovídá jiným hypotézám, že by katanin mohl hrát roli v odstraňování starých mikrotubulů [Davis et al., 2002]. Dalším vysvětlením by mohly být MAP, které by chránily již existující mikrotubuly,

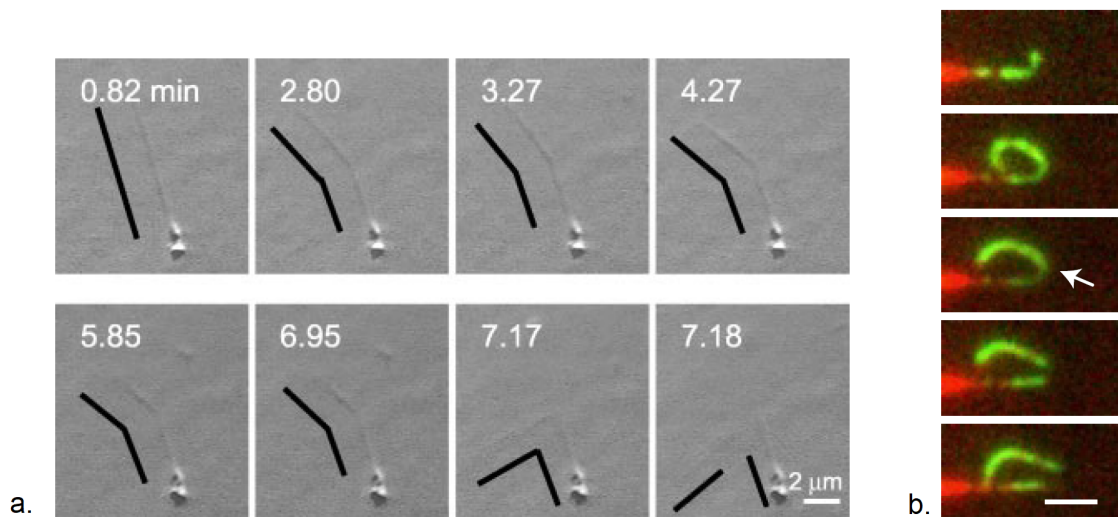


Obrázek 8: a. Schéma experimentu pomocí HS-AFM. b. Záznam aktivního myosinu, který se pohybuje směrem k (+)-konci navázaný na aktinovém vlákne . Měřítka 30 nm. Převzato z [Kodera and Ando, 2014]

ale nově polymerující by před aktivitou kataninu chráněny nebyly. Nebo se nové a staré mikrotubuly mohou lišit v post-translačních modifikacích.

Dále zůstává neobjasněno, jakým způsobem je reorientace kortikálních mikrotubulů řízena do stavu, kdy jsou orientovány převážně ve směru růstu rostliny a nedochází k další reorientaci. *Lindeboom* naznačil ve své práci, že se v čase snižuje četnost postranního větvení mikrotubulů z  $\gamma$ -tubulinu a v závěru celého procesu nedochází k dalšímu střihání na křížích [Lindeboom et al., 2013]. Zůstává otázkou, jak je celý proces řízen a jak je finální stav rozpoznáván.

V této práci jsem se převážně zabýval kanonickým kataninem, ačkoli lidský genom je poněkud bohatší na varianty jak katalytické podjednotky p60, tak regulační podjednotky p80. Například KATNAL2 (p60-like) vůbec neobsahuje MIT doménu, a tak nevykazuje specifickou interakci s podjednotkami p80. Nebo KATNBL1 neobsahuje doménu WD40 a místo toho na N-konci obsahuje dvě jaderné lokalizační sekvence [Cheung et al., 2016]. Není jasné, jak se tyto varianty liší ve své fyziologické funkci, případně zda formují



Obrázek 9: a. Zlom mikrotubulu po dokončení enzymatické aktivity podjednotky p60. Převzato z [Davis et al., 2002]. b. Zakrucování konců za přítomnosti heterodimeru p60:con80. Šipka ukazuje místo stříhu mikrotubulu. Měřítka 1  $\mu\text{m}$ . Převzato z [Jiang et al., 2017].

například heterogenní komplexy tvořené různými izoformami a jaké vlastnosti z toho mohou plynout.

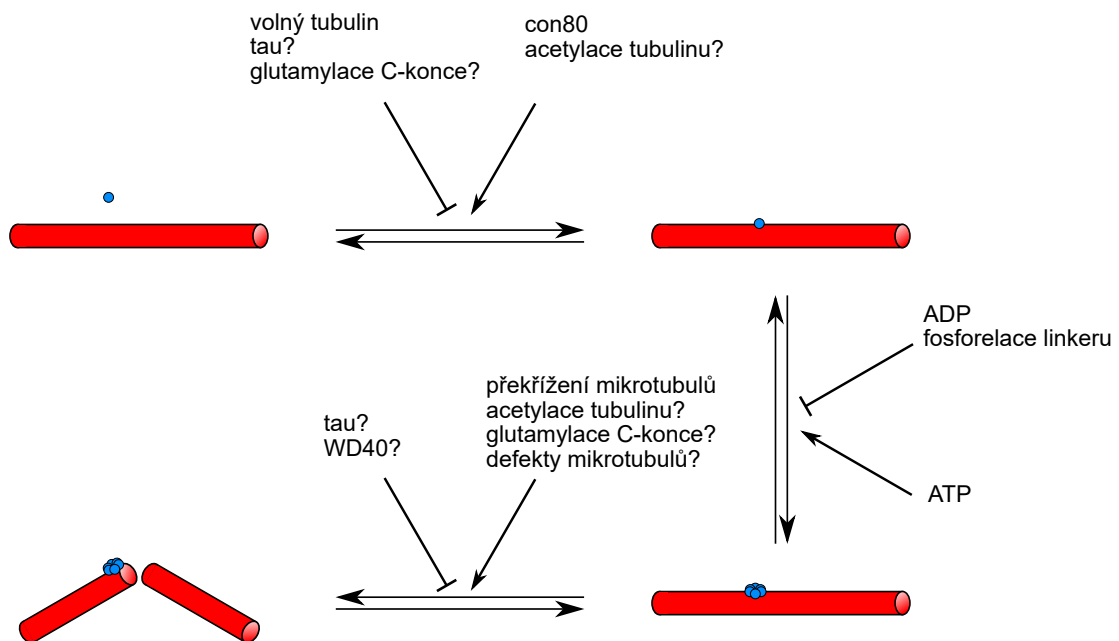
V lidském genomu se nachází několik různých izoform jak  $\alpha$ -tubulinu, tak  $\beta$ -tubulinu. Ikdyž jsou si izoformy sekvenčně velice podobné, můžeme nalézt rozdíly na C-koncích tubulinových podjednotek [Yu et al., 2015]. Vzhledem k tomu, že v *in vitro* experimentech se využívá tubulin extrahovaný z mozků dobytka, který se následně nechá stochasticky zpolymerovat. Tím ovšem ztrácíme informaci o uspořádání a distribuci jednotlivých izoform v neuronu. Může tak docházet ke vzniku artefaktů při aplikaci pozorovaných jevů *in vitro* na jevy pozorované *in vivo*. Což je ovšem cena, kterou snadno vyváží jednoduchost a exaktnost *in vitro* experimentů.

## 6 Závěr

Katanin je příslušník rozlehlé rodiny AAA-ATPáz, které se uplatňují v nejrůznějších buněčných funkcích. Můžeme ho nalézt téměř v celé eukaryotické říši, kde spolu s příbuzným spastinem a figetinem zajišťují štěpení mikrotubulů, čímž se stávají nepostradatelnými při regulaci a organizaci mikrotubulové sítě. Katanin můžeme rozdělit do dvou podjednotek. První je podjednotka p60, která je odpovědná za samotnou katalytickou aktivitu a druhá je podjednotka p80, které je přisuzován regulační charakter. V posledních letech se podařilo charakterizovat strukturu katalytické podjednotky, která přiblížila mechanismus, jakým jsou mikrotubuly štěpeny.

Na kataninu můžeme popsat širokou škálu úrovní, na kterých může být jeho aktivita řízena. Klíčovým mechanismem regulace je samotné sestavení hexameru, jelikož jediné v takové formě je aktivní. To je klíčový bod, kterým se řídí mnoho regulačních drah. V obrázku 10 jsem se pokusil shrnout některé faktory regulující aktivitu kataninu.

Do budoucna zbývá charakterizovat celou škálu faktorů, o kterých nyní víme, že ovlivňují jeho aktivitu, ale netušíme přesný mechanismus. Ostatně i u samotného mechanismu vytvoření zlomu mikrotubulu známe pouze střípky celého děje.



Obrázek 10: Schéma možných regulačních uzlů aktivity kataninu. Červeně jsou mikrotubuly a modré body jsou monomery podjednotky p60.

## Reference

- [Ahmad et al., 1999] Ahmad, F. J., Yu, W., McNally, F. J., and Baas, P. W. (1999). An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron. *The Journal of cell biology*, 145(2):305–15.
- [Baas and Qiang, 2005] Baas, P. W. and Qiang, L. (2005). Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends in cell biology*, 15(4):183–7.
- [Bowne-Anderson et al., 2015] Bowne-Anderson, H., Hibbel, A., and Howard, J. (2015). Regulation of Microtubule Growth and Catastrophe: Unifying Theory and Experiment. *Trends in Cell Biology*, 25(12):769–779.
- [Burk, 2002] Burk, D. H. (2002). Alteration of Oriented Deposition of Cellulose Microfibrils by Mutation of a Katanin-Like Microtubule-Severing Protein. *the Plant Cell Online*, 14(9):2145–2160.
- [Castranova et al., 2016] Castranova, V., Asgharian, B., Sayre, P., Virginia, W., and Carolina, N. (2016). HHS Public Access. pages 1922–2013.
- [Cheung et al., 2016] Cheung, K., Senese, S., Kuang, J., Bui, N., Ongpipattanakul, C., Gholkar, A., Cohn, W., Capri, J., Whitelegge, J. P., and Torres, J. Z. (2016). Proteomic Analysis of the Mammalian Katanin Family of Microtubule-severing Enzymes Defines Katanin p80 subunit B-like 1 (KATNBL1) as a Regulator of Mammalian Katanin Microtubule-severing. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 15(5):1658–69.
- [Davis et al., 2002] Davis, L. J., Odde, D. J., Block, S. M., and Gross, S. P. (2002). The importance of lattice defects in katanin-mediated microtubule severing in vitro. *Biophysical journal*, 82(6):2916–27.
- [Díaz-Valencia et al., 2011] Díaz-Valencia, J. D., Morelli, M. M., Bailey, M., Zhang, D., Sharp, D. J., and Ross, J. L. (2011). *Drosophila* katanin-60 depolymerizes and severs at microtubule defects. *Biophysical Journal*, 100(10):2440–2449.
- [Hartman et al., 1998] Hartman, J. J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R. D., and McNally, F. J. (1998). Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell*, 93(2):277–87.
- [Hartman and Vale, 1999] Hartman, J. J. and Vale, R. D. (1999). Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science*, 286(5440):782–785.

- [Ito and Goshima, 2015] Ito, A. and Goshima, G. (2015). Microcephaly protein Asp focuses the minus ends of spindle microtubules at the pole and within the spindle. *Journal of Cell Biology*, 211(5):999–1009.
- [Iwaya et al., 2010] Iwaya, N., Kuwahara, Y., Fujiwara, Y., Goda, N., Tenno, T., Akiyama, K., Mase, S., Tochio, H., Ikegami, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. (2010). A common substrate recognition mode conserved between katanin p60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22):16822–16829.
- [Jiang et al., 2017] Jiang, K., Rezabkova, L., Hua, S., Liu, Q., Capitani, G., Altelaar, A. F., Heck, A. J., Kammerer, R. A., Steinmetz, M. O., and Akhmanova, A. (2017). Microtubule minus-end regulation at spindle poles by an ASPM-katanin complex. *Nature Cell Biology*, 19(5):480–492.
- [Johjima et al., 2015] Johjima, A., Noi, K., Nishikori, S., Ogi, H., Esaki, M., and Ogura, T. (2015). Microtubule Severing by Katanin p60 AAA+ ATPase Requires the C-terminal Acidic Tails of Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulins and Basic Amino Acid Residues in the AAA+ Ring Pore. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18):11762–11770.
- [Karabay et al., 2004] Karabay, A., Yu, W., Solowska, J. M., Baird, D. H., and Baas, P. W. (2004). Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *Journal of Neuroscience*, 24(25):5778–5788.
- [Kodera and Ando, 2014] Kodera, N. and Ando, T. (2014). The path to visualization of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Biophysical Reviews*, 6(3-4):237–260.
- [Komachi, 1994] Komachi, K. E. A. (1994). The WD repeats of Tup 1 interact with the homeo domain protein a 2. *Genes & Development*, Volume 8 n:2857–2867.
- [Kuijpers and Hoogenraad, 2011] Kuijpers, M. and Hoogenraad, C. C. (2011). Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 48(4):349–358.
- [Lindeboom et al., 2013] Lindeboom, J. J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., Emons, A. M. C., Mulder, B. M., Kirik, V., and Ehrhardt, D. W. (2013). A Mechanism for Reorientation of Cortical Microtubule Arrays Driven by Microtubule Severing. *Science*, 342(6163):1245533.
- [Lodish, 2013] Lodish, H. F. (2013). *Molecular cell biology*. W.H. Freeman and Co, New York, 7th ed. edition.

- [Loughlin et al., 2011] Loughlin, R., Wilbur, J. D., McNally, F. J., Nédélec, F. J., and Heald, R. (2011). Katanin contributes to interspecies spindle length scaling in xenopus. *Cell*, 147(6):1397–1407.
- [Matsushita-Ishiodori et al., 2009] Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K., Hashimoto, H., Esaki, M., and Ogura, T. (2009). Conserved aromatic and basic amino acid residues in the pore region of *Caenorhabditis elegans* spastin play critical roles in microtubule severing. *Genes to Cells*, 14(8):925–940.
- [McNally and Vale, 1993] McNally, F. J. and Vale, R. D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, 75(3):419–429.
- [McNally et al., 2014] McNally, K., Berg, E., Cortes, D. B., Hernandez, V., Mains, P. E., and McNally, F. J. (2014). Katanin maintains meiotic metaphase chromosome alignment and spindle structure in vivo and has multiple effects on microtubules in vitro. *Molecular biology of the cell*, 25(7):1037–49.
- [McNally et al., 2000] McNally, K. P., Bazirgan, O. a., and McNally, F. J. (2000). Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin. *Journal of cell science*, 113 ( Pt 9:1623–1633.
- [Mishra-Gorur et al., 2014] Mishra-Gorur, K., Çağlayan, A. O., Schaffer, A. E., Chabu, C., Henegariu, O., Vonhoff, F., Akgümüş, G. T., Nishimura, S., Han, W., Tu, S., Baran, B., Gümüş, H., Dilber, C., Zaki, M. S., Hossni, H. A. A., Rivière, J.-B., Kayserili, H., Spencer, E. G., Rosti, R. Ö., Schroth, J., Per, H., Çağlar, C., Çağlar, Ç., Dölen, D., Baranoski, J. F., Kumandaş, S., Minja, F. J., Erson-Omay, E. Z., Mane, S. M., Lifton, R. P., Xu, T., Keshishian, H., Dobyns, W. B., Chi, N. C., Šestan, N., Louvi, A., Bilgüvar, K., Yasuno, K., Gleeson, J. G., and Günel, M. (2014). Mutations in KATNB1 cause complex cerebral malformations by disrupting asymmetrically dividing neural progenitors. *Neuron*, 84(6):1226–39.
- [Montecinos-Franjola et al., 2016] Montecinos-Franjola, F., Schuck, P., and Sackett, D. L. (2016). Tubulin dimer reversible dissociation: Affinity, kinetics, and demonstration of a stable monomer. *Journal of Biological Chemistry*, 291(17):9281–9294.
- [Nakamura et al., 2010] Nakamura, M., Ehrhardt, D. W., and Hashimoto, T. (2010). Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nature Cell Biology*, 12(11):1064–1070.
- [Patel and Latterich, 1998] Patel, S. and Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in cell biology*, 8(2):65–71.



- [Pierson et al., 1978] Pierson, G. B., Burton, P. R., and Himes, R. H. (1978). Alterations in number of protofilaments in microtubules assembled in vitro. *The Journal of cell biology*, 76(1):223–8.
- [Qiang et al., 2006] Qiang, L., Yu, W., Andreadis, A., Luo, M., and Baas, P. W. (2006). Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(12):3120–9.
- [Rezabkova et al., 2017] Rezabkova, L., Jiang, K., Capitani, G., Prota, A. E., Akhmanova, A., Steinmetz, M. O., and Kammerer, R. A. (2017). Structural basis of katanin p60:p80 complex formation. *Scientific Reports*, 7(1):14893.
- [Rogers et al., 2004] Rogers, G. C., Rogers, S. L., Schwimmer, T. A., Ems-McClung, S. C., Walczak, C. E., Vale, R. D., Scholey, J. M., and Sharp, D. J. (2004). Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature*, 427(6972):364–370.
- [Roll-Mecak and Vale, 2005] Roll-Mecak, A. and Vale, R. D. (2005). The *Drosophila* homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Current biology : CB*, 15(7):650–5.
- [Roostalu and Surrey, 2017] Roostalu, J. and Surrey, T. (2017). Microtubule nucleation: Beyond the template. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(11):702–710.
- [Savage, 2011] Savage, L. (2011). Improving plant cell analysis requires good tIRF. Převzato z [https://www.photonics.com/a48690/Improving\\_Plant\\_Cell\\_Analysis\\_Requires\\_Good\\_TIRF](https://www.photonics.com/a48690/Improving_Plant_Cell_Analysis_Requires_Good_TIRF).
- [Schaap et al., 2004] Schaap, I. A. T., de Pablo, P. J., and Schmidt, C. F. (2004). Resolving the molecular structure of microtubules under physiological conditions with scanning force microscopy. *European Biophysics Journal*, 33(5):462–467.
- [Seitz et al., 2002] Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E.-M., Song, Y.-H., and Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *The EMBO journal*, 21(18):4896–905.
- [Shibata et al., 2017] Shibata, M., Nishimasu, H., Kodera, N., Hirano, S., Ando, T., Uchihashi, T., and Nureki, O. (2017). Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nature Communications*, 8(1):1430.
- [Sudo and Baas, 2010] Sudo, H. and Baas, P. W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *Journal of Neuroscience*, 30(21):7215–7226.

- [Vale, 1991] Vale, R. D. (1991). Severing of stable microtubules by a mitotically activated protein in xenopus egg extracts. *Cell*, 64(4):827–839.
- [Valenstein and Roll-Mecak, 2016] Valenstein, M. L. and Roll-Mecak, A. (2016). Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation. *Cell*, 164(5):911–21.
- [Voet and Voet, 2011] Voet, D. and Voet, J. G. (2011). *Biochemistry*. John Wiley & Sons.
- [Walker et al., 1982] Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M., and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1(8):945–951.
- [Wang et al., 2017] Wang, C., Liu, W., Wang, G., Li, J., Dong, L., Han, L., Wang, Q., Tian, J., Yu, Y., Gao, C., and Kong, Z. (2017). KTN80 confers precision to microtubule severing by specific targeting of katanin complexes in plant cells. *The EMBO journal*, 36(23):3435–3447.
- [Wang and Brown, 2002] Wang, L. and Brown, A. (2002). Rapid movement of microtubules in axons. *Current Biology*, 12(17):1496–1501.
- [Whitehead et al., 2013] Whitehead, E., Heald, R., and Wilbur, J. D. (2013). N-Terminal Phosphorylation of p60 Katanin Directly Regulates Microtubule Severing. *Journal of Molecular Biology*, 425(2):214–221.
- [Williamson, 1994] Williamson, M. P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical Journal*, 297(2):249–260.
- [Yang et al., 2013] Yang, S. W., Oh, K. H., Park, E., Chang, H. M., Park, J. M., Seong, M. W., Ka, S. H., Song, W. K., Park, D. E., Baas, P. W., Jeon, Y. J., and Chung, C. H. (2013). USP47 and C Terminus of Hsp70-Interacting Protein (CHIP) Antagonistically Regulate Katanin-p60-Mediated Axonal Growth. *Journal of Neuroscience*, 33(31):12728–12738.
- [Yedidi et al., 2017] Yedidi, R. S., Wendler, P., and Enenkel, C. (2017). AAA-ATPases in Protein Degradation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4:42.
- [Yu et al., 2015] Yu, I., Garnham, C. P., and Roll-Mecak, A. (2015). Writing and reading the tubulin code. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28):17163–17172.
- [Yu et al., 2008] Yu, W., Qiang, L., Solowska, J. M., Karabay, A., Korulu, S., and Baas, P. W. (2008). The Microtubule-severing Proteins Spastin and Katanin Participate

Differently in the Formation of Axonal Branches. *Molecular Biology of the Cell*, 19(4):1485–1498.

[Yu et al., 2005] Yu, W., Solowska, J. M., Qiang, L., Karabay, A., Baird, D., and Baas, P. W. (2005). Regulation of microtubule severing by katanin subunits during neuronal development. *Journal of Neuroscience*, 25(23):5573–5583.

[Zandomeni and Schopfer, 1993] Zandomeni, K. and Schopfer, P. (1993). Reorientation of microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles by phytochrome, blue-light photoreceptor, and auxin. *Protoplasma*, 173(3-4):103–112.

[Zehr et al., 2017] Zehr, E., Szyk, A., Piszczek, G., Szczesna, E., Zuo, X., and Roll-Mecak, A. (2017). Katanin spiral and ring structures shed light on power stroke for microtubule severing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(9):717–725.