

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Účast proteinů γ -tubulinových komplexů na regulaci dynamiky plus konce mikrotubulů

The role of γ -tubulin complex proteins in the regulation of the dynamics on
microtubule plus-ends

Zuzana Hájková

3. ročník, Molekulární biologie a biochemie organismů

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Pavel Dráber, CSc.

Oddělení Biologie cytoskeletu

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a s použitím citované literatury.

V Praze 22. dubna 2008

Zuzana Hájková
Zuzana Hájková

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména svému školiteli Doc. RNDr. Pavlu Dráberovi, CSc. za odborné vedení mé práce, cenné rady a velikou trpělivost.

Ráda bych touto cestou poděkovala také RNDr. Eduardě Dráberové, CSc. za vedení mých experimentů, díky kterým mi umožnila hlouběji proniknout do problematiky biologie cytoskeletu.

Děkuji také všem ostatním z kolektivu Oddělení biologie cytoskeletu ÚMG AV ČR za přátelské prostředí a ochotné podání pomocné ruky, kdykoliv bylo třeba.

Abstrakt

Mikrotubuly jsou cytoskeletální struktury nezbytné pro fungování základních buněčných procesů. Jejich stavební komponentou jsou $\alpha\beta$ -tubulinové heterodiméry tvořící dlouhé duté trubice s vnějším průměrem 25 nm. Mikrotubuly jsou polární struktury u kterých, s ohledem na rychlost přidávání heterodimérů k polymeru, rozeznáváme (+) a (-) konec. Minus konec je v buňkách většinou ukotven v MTOC (microtubule organizing center) a (+) konec směřuje k periférii buňky. V buňce se mikrotubuly většinou vyskytují buď ve fázi polymerace nebo depolymerace a vykazují tak tzv. dynamickou nestabilitu. Rychlá přestavba mikrotubulů v reakci na podněty z vnějšího a vnitřního prostředí je zásadní pro většinu jejich funkcí. Dynamika mikrotubulů je *in vivo* regulována řadou regulačních proteinů. Tyto proteiny se váží podél mikrotubulu, na jeho (+) nebo (-) konec. Důležitým proteinem (-) konce polymeru je γ -tubulin. Nedávné experimenty dokazují vliv γ -tubulinu a s ním asociovaných proteinů (GCP) na regulaci dynamiky (+) konce mikrotubulů. Nejčastěji užívaným experimentálním modelem je kvasinka *S. pombe* obsahující ve svých γ -tubulinových komplexech vedle γ -tubulinu (Gtb1) i GCP homologní proteiny (Alp4, Alp6, Alp16). Mutace těchto proteinů vede k ovlivnění dynamiky (+) konce mikrotubulů. Zatímco u nemodifikovaných kvasinek byly interfázní mikrotubuly krátké a přímé, u mutantních kvasinek byly pozorovány dlouhé mikrotubuly, které se u kraje buňky ohýbaly. Stejný fenotyp všech mutant naznačuje, že dynamika (+) konce mikrotubulů je regulována v závislosti na expresi proteinů γ -tubulinových komplexů.

Klíčová slova

Mikrotubuly, γ -tubulin, γ -tubulinový komplex, GCP proteiny, plus konce mikrotubulů

Abstract

Microtubules are cytoskeletal structures essential for crucial cell processes. Structural components of microtubules are $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers that form long hollow tubes with the diameter about 25 nm. Microtubules are also polar structures with (+) and (-) end that differ in the rate of assembly. The minus end in the cell is usually anchored in MTOC (microtubule organizing center) and (+) end is directed to the periphery of the cell. Microtubules in cells usually alternate between the state of polymeration and depolymeration, so called the microtubule dynamic instability. Active reconstruction in the reaction to the outward and inward signals is crucial for the majority of microtubule functions. Microtubule dynamic is *in vivo* regulated by the set of regulation proteins. These proteins bind along the microtubules, to their (+) ends or to their (-) ends. The important protein located on the microtubule (-) end is a γ -tubulin. Recent experiments demonstrate a role of the γ -tubulin and its associated proteins (GCP) in the regulation of the microtubule (+) end dynamic. The fission yeast *S. pombe* is frequently used as an experimental model. This organism's γ -tubulin complexes contain the γ -tubulin (Gtb1) and GCP homologs (Alp4, Alp6, Alp16). Mutations in these proteins affect the dynamic of the microtubule (+) ends. While microtubules in the wild type are short and straight, long interphase microtubules, curved around the cell tip, were seen in mutant yeasts. The same phenotyp in all tested mutants indicates that the dynamic of the microtubule (+) end is altered, depending on the expression of γ -tubulin complex proteins.

Keywords

Microtubules, γ -tubulin, γ -tubulin complex, GCP proteins, microtubule plus-ends

Zkratky

+TIP	proteiny přednostně lokalizované na (+) konci mikrotubulů (+ end tracking proteins)
γ -TuC	γ -tubulinový komplex (γ -tubulin complex)
γ -TuRC	velký γ -tubulinový komplex (γ -tubulin ring complex)
γ -TuSC	malý γ -tubulinový komplex (γ -tubulin small complex)
GCP	proteiny γ -tubulinových komplexů (γ -tubulin complex proteins)
GDP	guanosin-5'-difosfát
GTP	guanosin-5'-trifosfát
Grips	proteiny γ -tubulinových komplexů (γ -tubulin ring complex proteins)
MAPs	proteiny asociované s mikrotubuly (microtubule associated proteins)
MTOC	organizační centrum mikrotubulů (microtubule organizing center)
SPB	organizační centrum mikrotubulů u kvasinek (spindle pole body)

Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Cytoskelet.....	9
3.	Dynamika mikrotubulů	10
4.	Regulace dynamiky mikrotubulů	10
4.1.	Regulace dynamiky na (+) konci mikrotubulů pomocí +TIP proteinů.....	11
4.1.1.	CLIP 170 a jeho homology	13
4.1.2.	EB1	14
4.1.3.	XMAP215.....	14
4.1.4.	APC.....	15
4.2.	Regulační molekuly na (-) konci mikrotubulů.....	15
4.2.1.	γ -Tubulin.....	15
4.2.2.	γ -Tubulinové komplexy	17
5.	GCP proteiny u <i>Schizosacharomyces pombe</i> (Alp4, Alp6, Alp16).....	19
6.	Vliv γ -tubulinu na dynamiku (+) konce mikrotubulů	20
7.	Vliv GCP proteinů na dynamiku (+) konce mikrotubulů	21
8.	Mto1 protein a jeho vliv na regulaci dynamiky mikrotubulů.....	22
9.	Distribuce proteinů γ -TuC podél mikrotubulů	22
10.	Možné mechanismy regulace (+) konce mikrotubulů.....	23
11.	Závěr.....	24
12.	Literatura.....	25

1. Úvod

Mikrotubuly patří mezi jednu z hlavních složek cytoskeletu. Jejich správná organizace a dynamika je naprosto nezbytná pro základní buněčné procesy. Rychlá přestavba těchto cytoskeletálních vláken v reakci na vnější a vnitřní změny umožňuje mikrotubulům správně vykonávat své funkce. Mikrotubuly jsou polární struktury, u kterých je v buňce dynamika velmi přesně regulována. Regulace dynamiky, zvláště na (+) konci mikrotubulů, je intenzivně studována od 90. let 20. stol.

V posledních letech byly zaznamenány nové, dosud nepříliš známé možnosti regulace. Bylo publikováno několik článků zabývajících se proteiny, které ovlivňují jak (+) tak i (-) konce mikrotubulů. Mezi tyto proteiny patří γ -tubulin. Provedené experimenty podávají důkaz o vlivu γ -tubulinu, ale i dalších proteinů γ -tubulinových komplexů na regulaci (+) konce mikrotubulů. Studium účasti γ -tubulinových komplexů na regulaci dynamiky (+) konce mikrotubulů je však teprve v počátku. V této bakalářské práci jsou shrnuty současné poznatky o účasti γ -tubulinu a jeho komplexů v těchto pochodech.

2. Cytoskelet

Cytoskelet eukaryotní buňky je dynamická struktura tvořená třemi typy navzájem interagujících vláknitých struktur - mikrotubuly, středními filamenti a mikrofilamenty. Tyto struktury se liší stavbou i svými funkcemi. Dohromady tvoří složitý systém umožňující buňce vykonávat řadu specializovaných funkcí jako je vnitrobuněčný transport, pohyb buňky, ochrana před mechanickým stresem, segregace chromozómů, adheze k povrchu a udržování tvaru buňky.

Střední filamenta patří s ohledem na své složení mezi nejvariabilnější složku cytoskeletu. Jejich vlákna mají průměr 10 nm a jsou velmi pevná. Tato vlastnost předurčuje střední filamenta především k ochraně buněk a tkání před mechanickým stresem.

Základní stavební proteiny středních filament se liší v závislosti na tkáňovém původu buněk. Rozdělujeme je do šesti tříd. Do tříd I a II patří kyselé a bazické keratiny, které se vyskytují především v epiteliálních buňkách. III. skupina je zastoupena těmito stavebními filamenti: vimentinem (mezenchymální buňky), desminem (svalové buňky), gliálním fibrilárním proteinem (gliové buňky) a periferinem (periferní neurony). Pro neurony je charakteristická IV. třída, kam patří neurofilamenta. Nukleární laminy jsou stavební komponentou středních filament v jádře buňky a řadí se do V. skupiny. Mezi proteiny VI. typu patří filensin a phakinin. Oba proteiny jsou lokalizované v oční čočce.

Mikrofilamenta jsou vysoce dynamická cytoskeletální vlákna. Jsou složena z aktinu a asociujících proteinů. Vnější průměr mikrofilament je 7 nm a jejich hlavní funkcí je zajištění buněčného pohybu. Pomocí mikrofilament dochází například k migraci buněk, svalové kontrakci, fagocytóze a dělení buňky.

Mikrotubuly rovněž představují dynamické struktury a jejich základní stavební komponentou je heterodimér $\alpha\beta$ -tubulinu. Jde o dlouhé duté trubice s vnějším průměrem 25 nm (Obr. 1). Každý mikrotubul je sestaven z 13 protofilament vznikajících „head-to-tail“ polymerací $\alpha\beta$ -tubulinu. Vznik nového vlákna je regulován pomocí mnoha interagujících proteinů.

Mikrotubuly jsou polární struktury. Rozeznáváme (+) konec, kde je exponován β -tubulin, a (-) konec zakončený α -tubulinem. Minus konec mikrotubulů je většinou ukotven v MTOC (microtubule organizing center), na rozdíl od (+) konce, který převážně směřuje k periférii buňky. Mezi základní funkce mikrotubulů patří zejména udržování tvaru buňky, určení pozice vnitřních membránových organel, vnitrobuněčný transport a buněčné dělení. Jsou také součástí stabilních struktur, jako jsou řasinky a bičíky.

3. Dynamika mikrotubulů

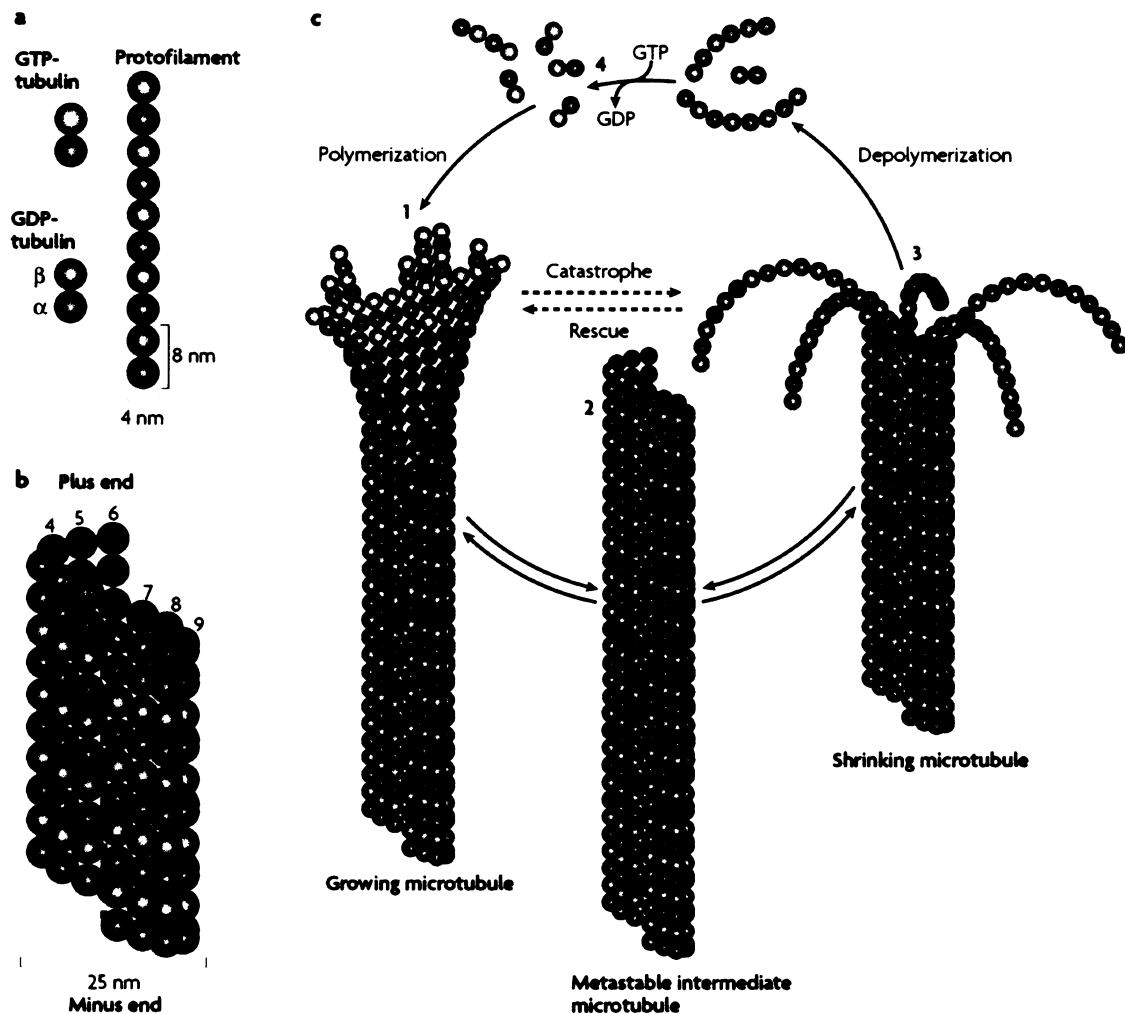
Mikrotubuly jsou prodlužovány polymerací tubulinových dimérů za účasti GTP. Dimér s navázaným GTP na β podjednotce se připojí na stávající mikrotubul. Krátce poté dochází k hydrolýze GTP. V případě polymerace jsou molekuly tubulinu přidávány rychleji, než dochází k hydrolýze a vzniká tzv. „GTP-čepička“. „GTP-čepička“ stabilizuje (+) konec mikrotubulu a zabraňuje tak depolymeraci. V případě nedostatku volných $\alpha\beta$ -dimérů převládne hydrolýza GTP a dochází k rychlé depolymeraci vlákna. Ta je způsobena změnou konformace molekuly po hydrolýze GTP, a tím snížením síly vazeb mezi $\alpha\beta$ -diméry. Během depolymerace jsou tedy uvolňovány $\alpha\beta$ -podjednotky s navázaným GDP. Tento jev, kdy dochází k přepínání mezi stavem polymerace a depolymerace se nazývá „dynamická nestabilita mikrotubulů“ (shrnutí Desai and Mitchison, 1997). Dynamickou nestabilitu mikrotubulů charakterizují čtyři základní parametry: rychlost polymerace a depolymerace a frekvence katastrof a záchran. Katastrofa nastává při přechodu ze stavu polymerace do stavu depolymerace. Záchrana je opakem katastrofy, tj. nastává při přepnutí depolymerace do stavu polymerace mikrotubulů (Obr. 1).

Dynamika polymerace a depolymerace je stěžejní pochod pro biologické funkce mikrotubulů. Umožňuje jim rychle reagovat na potřeby buňky, které odpovídají na podněty z vnějšího okolí. Dynamika se liší v průběhu buněčného cyklu. V některých případech mohou mikrotubuly dokonce vytvářet mechanickou práci.

Na (+) konci dochází *in vitro* k rychlejšímu růstu mikrotubulů. Převládají zde tubulinové diméry s navázaným GTP. Na (-) konci dochází naopak k rychlejší depolymeraci a vyskytují se zde heterodiméry s navázaným GDP. Stav, kdy je rychlost polymerace na (+) konci stejná jako rychlost depolymerace na (-) konci se nazývá „treadmilling“. Kromě výše zmíněných stavů se mohou mikrotubuly vyskytovat také v klidovém stavu. V tomto případě nedochází k polymeraci ani k depolymeraci (shrnutí Desai and Mitchison, 1997).

4. Regulace dynamiky mikrotubulů

Stabilita a mechanické vlastnosti nově vzniklých mikrotubulů jsou dány kromě přítomnosti pomalu hydrolyzující „GTP-čepičky“ zejména výskytem řady regulačních proteinů. Tyto proteiny se mohou vázat na monomery nebo na polymery tubulinu, a to podél mikrotubulu nebo na jeho (+) a (-) konec. Různé typy proteinů svou vazbou snižují či zvyšují volnou energii polymerů, a tím dochází ke stabilizaci nebo destabilizaci mikrotubulů.



Obr. 1. **Struktura mikrotubulu a dynamická nestabilita** (podle Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Mezi nejpočetnější skupinu patří tzv. strukturní MAPs (microtubule associated proteins), které jsou lokalizovány podél mikrotubulů. Kromě MAPs je dynamika mikrotubulů výrazně ovlivňována také proteiny, které asociují s jejich konci. Na (+) konci mikrotubulů jde zejména o +TIPs (+ end tracking proteins), na (-) konci se jedná o proteiny či proteinové komplexy sloužící primárně k nukleaci polymerace.

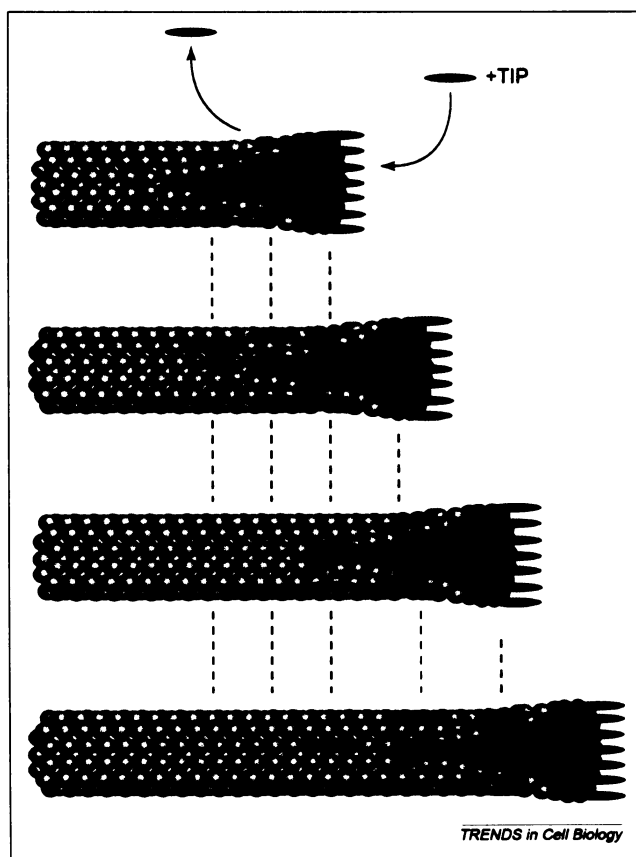
Z novějších studií vyplývá, že i proteiny vyskytující se především na (-) konci mohou mít vliv i na regulaci dynamiky (+) konce mikrotubulu (Fujita et al., 2002; Masuda et al., 2006; Paluh et al., 2000; Tange et al., 2004; Vardy and Toda, 2000; Zimmerman and Chang, 2005).

4.1. Regulace dynamiky na (+) konci mikrotubulů pomocí +TIP proteinů

Buňky využívají +TIP proteiny pro zprostředkování interakce mezi (+) koncem mikrotubulu a kinetochory nebo plazmatickou membránou. Umožňují rychlou remodelaci

(+) konců v odpovědi na buněčné signály. +TIP proteiny se také pravděpodobně mohou podílet na využití dynamiky mikrotubulů i pro vytvoření síly.

Bylo prokázáno, že vazba proteinů na (+) konec polymeru je svázána s dynamikou mikrotubulů. „GTP-čepička“ se zdá být místem preferenční vazby +TIPs. Byly navrženy tři základní způsoby, kterými se tyto proteiny akumulují na (+) konci mikrotubulů. Jde o „treadmilling“, „hitchhiking“ a transport pomocí molekulárních motorů (shrnutí Carvalho et al., 2003). Treadmilling je nejlépe prostudovaným mechanismem. Může probíhat dvěma způsoby. Buď molekuly +TIP proteinu sami rozpoznají rostoucí polymer a váží se na jeho (+) konec nebo kopolymerují s tubulinovými diméry (Folker et al., 2005). Brzy po vazbě na mikrotubul, v oblasti GDP tubulinu, jsou +TIPs opět uvolněny. Tím, že se ale konec mikrotubulu stále prodlužuje, zdá se, jakoby molekuly +TIP proteinů po vlákně „surfovaly“ (Obr. 2). Druhou alternativou, jak se mohou proteiny akumulovat na rostoucím konci je „hitchhiking“. V tomto případě jde o přemísťování pomocí vazby na jiný +TIP protein. Posledním navrženým způsobem je využití transportu závislého na molekulárních motorech pohybujících se po cytoskeletálních vlákněch, tj. v případě mikrotubulů jde o kinesiny a dyneiny.



Obr. 2. **Treadmilling.** Obrázek znázorňuje rostoucí mikrotubul a vazbu +TIP proteinů (podle Carvalho et al., 2003).

Kromě těchto konvenčních způsobů transportu +TIPs je možné, že některé proteiny používají pro pohyb podél mikrotubulu laterální difúzi zprostředkovanou elektrostatickými interakcemi s tubuliny vázanými v polymeru (Brouhard et al., 2008). Některé proteiny mohou využívat více způsobů akumulace najednou. U řady +TIPs není také zcela jasné, zda se na mikrotubuly váží přímo či zprostředkovaně.

+TIP proteiny jsou rozmanitou, evolučně konzervovanou skupinou. Mezi hlavní proteiny řadící se u savců mezi +TIPs patří: CLIP 170 a jeho homology (Tip1 u *S. pombe*, Bik1 u *S. cerevisiae*), EB1 a jeho homology (Mal3 u *S. pombe*, Bim1 u *S. cerevisiae*), XMAP215 a APC protein (shrnuto Carvalho et al., 2003). V dalším textu bude pojednáno pouze o některých +TIP proteinech a jejich hlavních rolích v regulaci dynamiky mikrotubulů (Tab. 1).

Tab. 1. Charakterizace +TIP proteinů a jejich homologů (podle Carvalho et al., 2003; upraveno).

Typ proteinu		Potenciální mechanism transportu k (+) konci MT	Vliv na dynamiku MT
APC homology	APC	Mikrotubulární motory	Podpora polymerizace MT <i>in vitro</i> ; stabilizace MT <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>
CLIP homology	CLIP-170/CLIP-150	Treadmilling/N.D.	Exprese D.N. snižuje záchran MT
	Tip1 (<i>S. pombe</i>)	N.D	Delece zvyšuje katastrofy MT
	Bik1 (<i>S. cerevisiae</i>)	N.D	Delece způsobuje velmi krátké nebo chybějící cytoplazmatické MT
EB1 homology	EB1	Treadmilling	Zvýšení záchran
	Bim1 (<i>S. cerevisiae</i>)	N.D.	Delece způsobuje pomalejší depolymeraci, méně záchran a katastrof a více MT v klidovém stavu
p150 ^{Glued} homology	p150 ^{Glued}	Treadmilling	Podpora nukleace MT <i>in vitro</i>
LIS1 homology	LIS1	N.D.	Snížení katastrof MT <i>in vitro</i>
CLASP homology	CLASP	N.D.	Overexprese podporuje stabilizaci MT

Vysvětlivky: N.D., neurčeno; D.N., dominantně negativní; MT, mikrotubuly.

4.1.1. CLIP 170 a jeho homology

CLIP-170 (cytoplasmic linker protein 170) je tzv. „rescue“ faktor, což znamená, že podporuje záchranu mikrotubulů po depolymeraci *in vivo*. V jeho nepřítomnosti klesá frekvence záchran sedmkrát a prodlužuje se doba zkracování. N-koncová doména, obsahující CAP-Gly motiv, ovlivňuje dynamiku mikrotubulů buď přímo jako vlastní záchranný faktor nebo nepřímo ovlivňováním jiného záchranného faktoru (Komarova et al., 2002). Možným mechanismem funkce CLIP-170 je podpora vzniku zahnutých oligomerů tubulinů (Arnal et al., 2004).

Tyto *in vitro* studie ukázaly, že kromě zvýšení frekvence záchran, stimuluje CLIP-170 i nukleaci mikrotubulů (Arnal et al., 2004).

4.1.2. EB1

EB1 (end binding 1) protein se v buňce vyskytuje převážně jako homodimér. Monomer EB1 obsahuje dvě vysoce konzervované domény na C- a N-konci proteinu, spojené méně konzervovanou propojovací sekvencí. N-terminální globulární doména slouží k vazbě proteinu na mikrotubul. C-terminální doména obsahuje coiled-coil motiv, který umožňuje paralelní dimerizaci monomerů. Homodimér EB1 tvoří na své C-koncové doméně EB1-motiv nazývaný také EBH doména (end-binding homology). EBH doména slouží jako vazebné místo dalších proteinů (shrnutí Akhmanova and Steinmetz, 2008). EB1 zvyšuje frekvenci záchran a potlačuje vznik katastrof, což vede k rychlejší a častější polymeraci mikrotubulů. Proces depolymerace je utlumen a počet klidových mikrotubulů je v buňce nižší (Tirnauer et al., 2002). EB1 homology zvyšují dynamiku mikrotubulů. Mitotické mikrotubuly v nepřítomnosti EB1 jsou natolik nestabilní, že není možné měřit jednotlivé parametry dynamické nestability.

4.1.3. XMAP215

Protein XMAP215 je během interfáze lokalizován v centrosomech a podél mikrotubulů (Tournebize et al., 2000). V buňce funguje jako „procesivní polymeráza“ (Brouhard et al., 2008). S volným tubulinovým dimérem vytváří XMAP215 komplex 1:1, který poté interaguje s mikrotubulem. Laterální difúzi je tento komplex transportován k (+) konci polymeru, kde je tubulinový dimér připojen k rostoucímu mikrotubulu. Protein XMAP215 po určitou dobu na (+) konci zůstává a katalyzuje zde přidávání dalších tubulinových heterodimérů (Brouhard et al., 2008).

Imunodeplece XMAP215 z vaječných extraktů *Xenopus laevis* ukázala, že tento protein funguje jako stabilizační faktor mikrotubulů (Tournebize et al., 2000). XMAP215 působí během interfáze proti proteinu XKCM1. XKCM1 patří do rodiny kinesinů a v buňce funguje jako destabilizační faktor. Potlačováním funkce XKCM1 dochází ke snížení frekvence katastrof (Tournebize et al., 2000). Při nedostatku volných tubulinových dimérů v cytoplazmě může naopak XMAP215 urychlovat depolymeraci mikrotubulů (Brouhard et al., 2008). XMAP215 zvyšuje dynamiku mikrotubulů v závislosti na koncentraci volných tubulinových dimérů a přítomnosti proteinu XKCM1 (Brouhard et al., 2008; Tournebize et al., 2000).

4.1.4. APC

APC (adenomatous polyposis coli) patří mezi +TIP proteiny, které v buňce slouží jako stabilizační faktory. Shlukují se na (+) koncích mikrotubulů a chrání je před vznikem katastrof. Zároveň APC proteiny podporují záchrany a klidové stavy mikrotubulů (shrnutí Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Strukturně patří APC mezi multidoménové proteiny obsahující dlouhé bazické sekvence a sekvence bohaté na serin. Tyto oblasti u C-konce proteinu řídí interakce s mikrotubuly a EB1. Interakce proteinu EB1 s APC C-terminální doménou umožňuje EB1 stabilizovat mikrotubuly (shrnutí Akhmanova and Steinmetz, 2008; Carvalho et al., 2003).

4.2. Regulační molekuly na (-) konci mikrotubulů

Mikrotubuly jsou v buňce většinou svým (-) koncem ukotveny v MTOC, které zároveň slouží jako místo nukleace nově vznikajících vláken. Ve většině živočišných buněk nese funkci MTOC tzv. centrozóm. Centrozóm se nachází v blízkosti jádra, obsahuje dvě na sebe kolmé centrioly a je zde lokalizován i γ -tubulin. Centrioly organizují centrozomální matrix. Spindle pole body (SPB) je MTOC nacházející se u kvasinek a hub. Vyšší rostliny nukleují mikrotubuly z jaderné membrány. Ve všech eukaryontních buňkách byl nalezen γ -tubulin, který slouží jako nukleátor mikrotubulů.

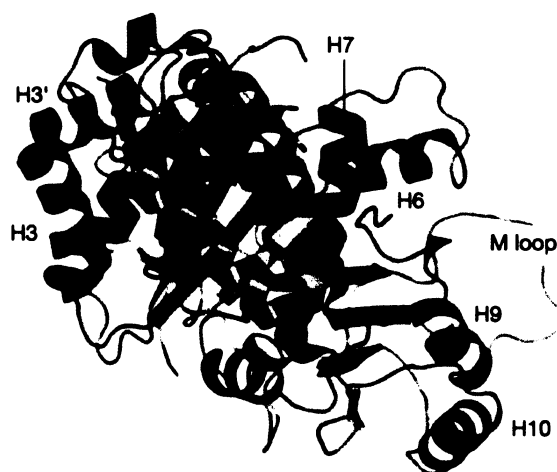
4.2.1. γ -Tubulin

γ -Tubulin je stěžejní molekula potřebná pro nukleaci a organizaci mikrotubulů *in vivo*. Tento tubulin byl objeven v 90. letech. Patří do tubulinové „nadrodiny“, která kromě α - (alfa) a β - (beta) tubulinu zahrnuje také δ - (delta), ϵ - (epsilon), ζ - (zeta), η - (eta), ι - (iota), θ - (theta) a κ - (kappa) tubuliny. Na rozdíl od α -, β - a γ -tubulinu se ostatní tubuliny nevyskytují ve všech eukaryotech a nejde o vysoce fylogeneticky konzervativní proteiny (shrnutí Dutcher, 2003). Identita mezi γ -tubulinem a α - a β -podjednotkami je ~30%.

γ -Tubulin existuje ve dvou formách, kódovaných dvěma různými geny, TUBG1 a TUBG2. Identita aminokyselinové sekvence proteinů kódovaných lidskými geny TUBG1 a TUBG2 je více než 97% (Wise et al., 2000). Na rozdíl od TUBG1, který je exprimován ve všech tkáních, se TUBG2 vyskytuje zejména v mozku (Yuba-Kubo et al., 2005). Oba funkční geny γ -tubulinu, TUBG1 i TUBG2, jsou lokalizovány na chromozómu 17 (Wise et al., 2000). Studium funkce TUBG1 a TUBG2 ukázalo, že oba geny nejsou funkčně ekvivalentní. TUBG1 kóduje konvenční γ -tubulin, který přímo reguluje organizaci mikrotubulárního cytoskeletu. Přesná funkce γ -tubulinu 2 (TUBG2) nebyla dosud určena (Yuba-Kubo et al., 2005). Kromě TUBG2 byl

identifikován ještě γ -tubulinový pseudogen TUBG1P lokalizovaný na chromozómu 7 (Wise et al., 2000).

Vysoce konzervativní sekvence proteinů tubulinové „nadrodiny“ naznačovaly, že tyto proteiny budou mít i podobné struktury. Později popsána 2.7 Å krystalová struktura lidského γ -tubulinu vázaného GTP- γ S (nehydrolyzovatelný analog GTP) tuto domněnku potvrdila (Obr. 3) (Aldaz et al., 2005).



Obr. 3. **Struktura γ -tubulinu** (podle Aldaz et al., 2005; upraveno).

γ -Tubulin, stejně jako ostatní tubulinové proteiny, váže GTP nebo GDP. GTP váže s podobnou afinitou jako β -tubulin a oba proteiny vykazují také obdobnou preferenci pro vazbu GTP před GDP (Aldaz et al., 2005).

Stejně jako tubulinové heterodiméry i γ -tubulin podléhá posttranslačním modifikacím. Tub4p z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je homologem lidského γ -tubulinu a je *in vivo* fosforylován (Vogel et al., 2001). Hyperfosforylace proteinu nastává během G1 fáze, naopak během mitózy je γ -tubulin defosforylován. Modifikace γ -tubulinu je důležitá pro kontrolu počtu nukleovaných mikrotubulů. Tím je ovlivněna jejich organizace během buněčného cyklu.

Přímý důkaz specifické vazby γ -tubulinu na (-) konec mikrotubulů byl podán v roce 1995. Stechiometrie vazby je 12.6 +/- 4.9 molekul γ -tubulinu na jeden mikrotubul (Li and Joshi, 1995). *In vitro* snižuje monomerní γ -tubulin velikost tubulinového jádra ze sedmi na tři tubulinové podjednotky, a tím umožňuje snazší nukleaci mikrotubulů. γ -Tubulin interaguje s β -tubulinem a zároveň zabraňuje růstu (-) konce mikrotubulů. Tím slouží jako „capping“ protein (-) konce polymeru (Leguy et al., 2000).

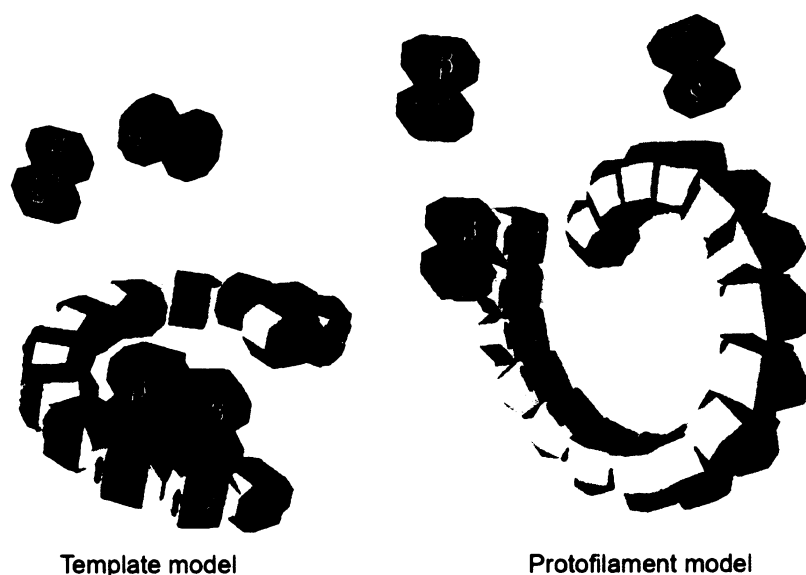
I když γ -tubulin vázaný v MTOC hraje důležitou roli při nukleaci mikrotubulů, většina exprimovaného γ -tubulinu se vyskytuje volně v cytoplazmě.

4.2.2. γ -Tubulinové komplexy

γ -Tubulin se v buňce vyskytuje ve dvou hlavních proteinových komplexech (γ -TuCs; γ -tubulin complexes): v malém komplexu (γ -TuSC; γ -tubulin small complex) nebo ve velkém γ -tubulinovém komplexu (γ -TuRC; γ -tubulin ring complex). γ -TuCs se vyskytují buď volně v cytoplazmě nebo jsou vázány v MTOC. γ -TuCs obsahují kromě γ -tubulinu ještě další proteiny netubulinové povahy označované GCPs (γ -tubulin complex proteins). Tyto proteiny se někdy označují také jako Grips (γ -tubulin ring complex proteins).

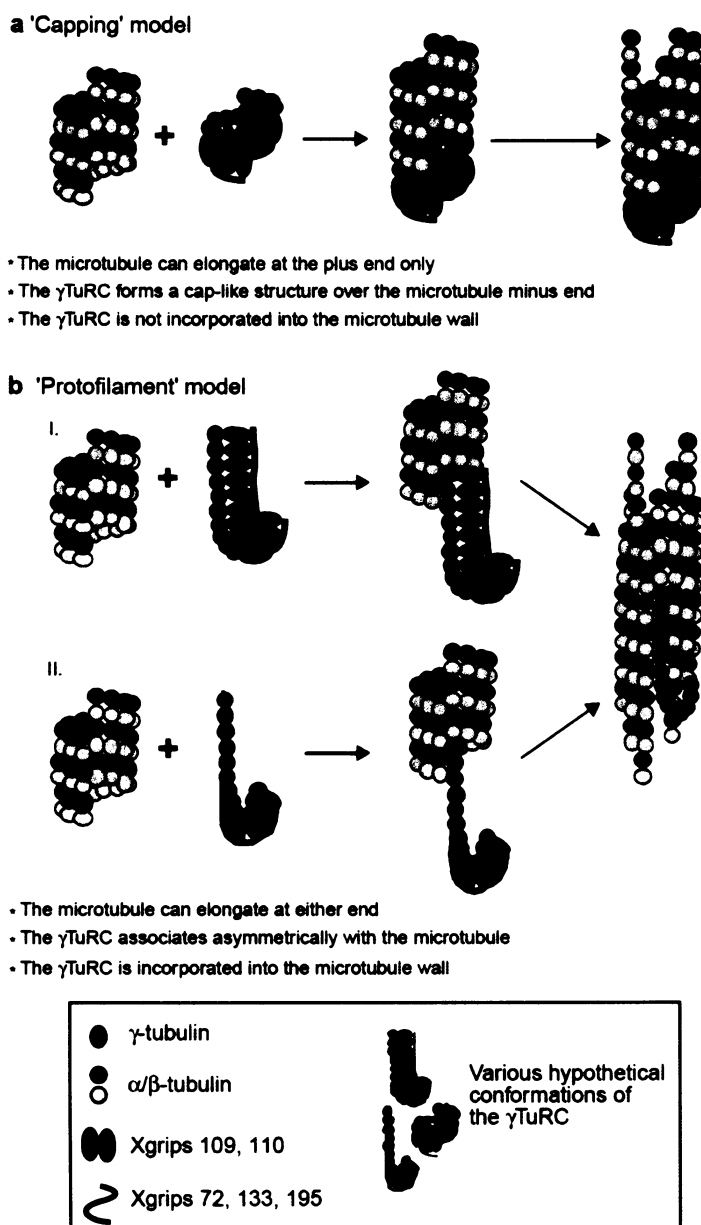
γ -TuSC je evolučně konzervativní heterotetramer. Skládá se ze dvou molekul γ -tubulinu a po jedné molekule proteinu GCP2 a GCP3. γ -TuSC je esenciální pro nukleaci mikrotubulů. Nově objevená struktura komplexu umožnila navrhnout mechanismus jeho funkce (Kollman et al., 2008). γ -TuSC má tvar písmene Y. GCP2 a GCP3 proteiny tvoří prodloužené tělo s dvěma rameny, s jejichž konci je asociována vždy jedna molekula γ -tubulinu. Konformační změnou dojde k posunutí pohyblivého ramena, γ -tubuliny se přiblíží a vytvoří se tak templát pro nukleaci mikrotubulů.

γ -TuRC obsahuje 6 kopií γ -TuSC a další proteiny označované GCP4, GCP5 a GCP6 (shrnutí Erickson, 2000; Raynaud-Messina and Merdes, 2007). γ -TuRC je zodpovědný za nukleaci mikrotubulů z MTOC. Ačkoliv nejsou ještě známy přesné molekulární mechanismy fungování γ -TuRC, byly navrženy dva způsoby, jak by mohl γ -TuRC nukleaci umožňovat (Obr. 4) (Wiese and Zheng, 2000).



Obr. 4. „Templátový“ a „protofilamentový“ model nukleace mikrotubulů (podle Erickson, 2000).

„Templátový“ model předpokládá, že γ -TuRC tvoří kroužek 13ti γ -tubulinů, na který nasedají $\alpha\beta$ -tubulinové diméry tvořící 13 protofilament. V „protofilamenovém“ modelu připomíná γ -TuRC zahnuté protofilamentum, které je strukturně podobné protofilamentu vznikajícímu během depolymerace mikrotubulu. U tohoto modelu jsou tubulinové diméry přikládány laterálně a γ -TuRC je částečně inkorporován do stěny mikrotubulu (shrnutí Erickson, 2000).



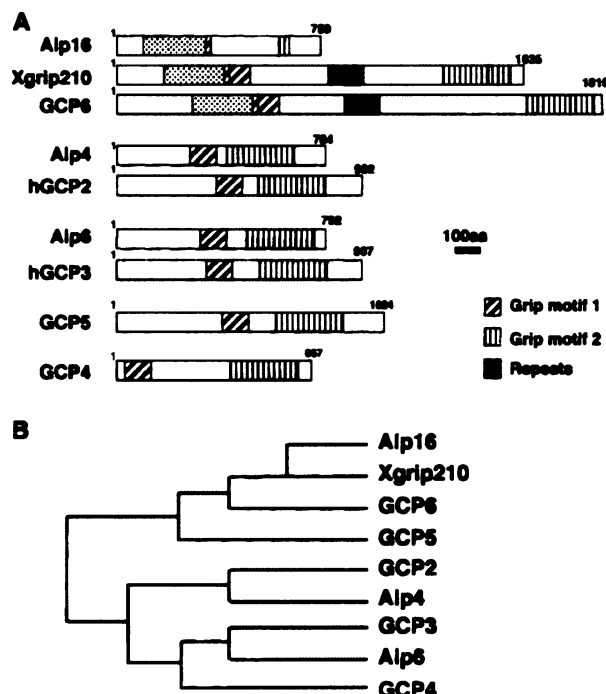
Obr. 5. **Modely pro „capping“ aktivitu γ -TuRC.** „Capping“ model je odvozen od „templátového“ modelu a umožňuje „capping“ aktivitu (a). I. a II. reprezentují dvě možná uspořádání „protofilamentového“ modelu. *In vitro* by mohlo docházet k polymeraci na obou koncích mikrotubulů (b) (podle Wiese and Zheng, 2000).

γ -TuRC se neúčastní pouze nukleace mikrotubulů, ale ovlivňuje také jejich dynamiku (Wiese and Zheng, 2000). γ -TuRC byl *in vitro* lokalizován na (-) konci mikrotubulů, kde zabráňuje inkorporaci tubulinových podjednotek a brání depolymeraci mikrotubulu. Každý γ -tubulin v γ -TuRC je v kontaktu s tubulinovými podjednotkami na (-) konci mikrotubulů a γ -TuRC tudíž slouží jako „capping“ protein.

Oba procesy, nukleace i capping aktivita, jsou na sobě nezávislé. Pouze necelá polovina mikrotubulů nukleovaných *in vitro* je asociována s γ -TuRC. Zřejmě je to způsobeno poměrně nízkou afinitou γ -TuRC k (-) konci mikrotubulů (Wiese and Zheng, 2000). Jak lze vidět na Obr. 5, navrhovaný „capping“ model vychází z „templátového“ modelu nukleace mikrotubulů.

5. GCP proteiny u *Schizosacharomyces pombe* (Alp4, Alp6, Alp16)

V posledních letech se několika laboratořím podařilo prokázat vliv γ -tubulinu či GCP proteinů na dynamiku (+) konce mikrotubulů. Mutace v těchto proteinech různým způsobem regulovaly jejich dynamiku, tj. měnila se délka polymeru, rychlost katastrof či doba klidového stavu. Experimentálním modelem zmíněných studií byly převážně příčně se dělící kvasinky *Schizosacharomyces pombe*. γ -TuC *S. pombe* se skládá z homologů GCP proteinů (Obr. 6) a homologů γ -tubulinu.



Obr. 6. Porovnání struktury kvasinkových a lidských γ -TuC proteinů

Schematický diagram ukazující konzervativní motivy mezi jednotlivými proteiny (a).
 Flygenetický strom γ -TuC proteinů (b) (podle Fujita et al., 2002).

Alp4 a Alp6 proteiny jsou homology lidských GCP2, resp. GCP3 proteinů (Vardy and Toda, 2000). Alp4 i Alp6 byly lokalizovány ve SPB a v některých MTOC. Stejně jako jejich lidské homology, jde pro kvasinky o esenciální proteiny. Pomocí teplotně senzitivních mutant *alp4* a *alp6* byly zjištěny základní funkce obou těchto proteinů (Vardy and Toda, 2000). Alp4 i Alp6 řídí organizaci mikrotubulů a jsou nutné pro správnou segregaci chromozómů. Protein Alp4 během mitózy řídí tvorbu bipolárních vřetének. Homologem γ -tubulinu je v *S. pombe* Gtb1/Tug1 protein.

Poslední nově izolovanou komponentou γ -TuC je pro *S. pombe* neesenciální protein Alp16 (Fujita et al., 2002). Obsahuje dva konzervativní motivy vyskytující se i v dalších proteinech γ -TuC a stejně jako tyto proteiny i Alp16 ovlivňuje dynamiku mikrotubulů. Lokalizace Alp16 je na SPB a na některých MTOC. Ačkoliv je Alp16 součástí γ -TuRC, není pro jeho vytvoření nezbytný. Fujita et al. (2002) také navrhli dva možné mechanismy fungování proteinu Alp16. V prvním by Alp16 umožňoval tvorbu stabilních γ -TuCs. Druhým navrhovaným mechanismem je možná účast při lokalizaci γ -TuCs na SPB.

6. Vliv γ -tubulinu na dynamiku (+) konce mikrotubulů

γ -Tubulin je primárně považován za buněčný nukleátor či případně za protein s „capping“ aktivitou. Neočekávaně však bylo objeveno, že mutace v γ -tubulinu (*gtb1*) mění dynamiku a organizaci mikrotubulů (Paluh et al., 2000). Mikrotubuly zakotvené ve SPB vykazovaly větší stabilitu a zároveň s astrálními mikrotubuly se výrazně prodloužily, příp. se u okraje buňky zahuly. Pozměněná dynamika byla pozorována také u cytoplazmatických mikrotubulů. Na rozdíl od divokých kmenů, kde se vlákna vyskytují ve více svazcích, v *gtb1* kvasinkách se při okraji cytoplazmy objevovalo několik či pouze jeden veliký svazek mikrotubulů. Ten byl zároveň delší než mikrotubuly v nemutovaných buňkách (Obr. 7).



Obr. 7. **Abnormální mikrotubuly u *gtb1* kvasinek.** Porovnání mikrotubulů u *gtb1* mutant s mikrotubuly divokého kmenu kvasinek (WT). Imunofluorescenční značení s protilátkou proti α -tubulinu (zeleně) a 4',6-diamidino-2-phenylindolen ke značení DNA (červeně). Měřítko 5 μ m (podle Tange et al., 2004).

Tyto nálezy byly dále potvrzeny, když byly izolovány *gtb1* mutanty, které sloužily jako supresory teplotně senzitivních *alp4* mutací (Tange et al., 2004). Kombinace obou mutací nevedla k odstranění defektních mikrotubulů, tj. nedošlo k supresi mutace. Ačkoliv byla u *gtb1alp4* buněk obnovena správná funkce vřeténka, mikrotubuly zůstaly stále defektní.

7. Vliv GCP proteinů na dynamiku (+) konce mikrotubulů

Kromě γ -tubulinu se na regulaci dynamiky (+) konce mikrotubulů podílí i další komponenty γ -TuC. U všech tří homologů lidských GCP proteinů, tj. Alp4, Alp6 i Alp16, byl zdokumentován prokazatelný vliv na dynamiku těchto cytoskeletálních vláken.

Po objevení Alp4 a Alp6 proteinů v *S. pombe* a po následném bližším prozkoumání fenotypu *alp4* a *alp6* mutant bylo zřejmé, že je dynamika mikrotubulů pozměněna. Mutanty vykazovaly abnormálně dlouhé cytoplazmatické mikrotubuly. Na rozdíl od výchozích buněk, kde jsou mikrotubuly uspořádány podél buňky a nikdy nejsou zahnuty, u mutant docházelo k zahnutí rostoucího polymeru kolem pólů buňky. Mutantní mikrotubuly se vždy vázaly, nebo alespoň procházely přes SPB, na rozdíl od mikrotubulů v divokých kmenech kvasinek, které se SPB neinteragovaly. Tyto výsledky poukazují na možnost, že změny v mikrotubulech jsou způsobeny chybou jejich organizace ve SPB. Je také možné, že mikrotubuly v *alp4* defektních buňkách jsou vlivem častějšího kotvení ve SPB stabilnější, a právě díky tomu delší (Vardy and Toda, 2000). Podobných výsledků bylo dosaženo na buňkách *gtb1* s mutací v γ -tubulinu (Paluh et al., 2000). Ačkoliv se obě práce zásadně lišily v použití mutovaného genu, mikrotubuly v obou případech měnily svoji dynamiku stejným způsobem.

Bližší studie Alp4p ukázaly, že dynamiku mikrotubulů ovlivňuje přímo C-konec proteinu (Masuda et al., 2006). Nadprodukce C-terminální domény Alp4 (Alp4C) pozměnila dynamiku (+) konce vláken, což mělo, kromě ohýbání mikrotubulů okolo pólů buňky, za následek posun jádra. Prodloužené stabilnější mikrotubuly směřující proti směru pohybu jádra, působily na jádro silou, a tím jej posouvaly. Naopak méně stabilní mikrotubuly směřující ve směru pohybu jádra vykazovaly časté frekvence růstu a katastrof.

Ačkoliv Alp16 není pro buňky esenciálním proteinem, je nutný pro tvorbu normálních interfázních mikrotubulů. Stejně jako ostatní proteiny komplexů, i *alp16* mutantní buňky vykazovaly delší cytoplazmatické mikrotubuly, které se často ohýbaly kolem konce buňky (Fujita et al., 2002).

8. Mto1 protein a jeho vliv na regulaci dynamiky mikrotubulů

Kromě proteinů nacházejících se přímo v γ -TuCs, vyskytují se v okolí komplexů i další asociované proteiny. Mto1 je γ -TuC-asociovaný protein v kvasinkách, který specificky doplňuje γ -TuCs v MTOC a interfázních mikrotubulech. Mnoho z *mto1Δ* mutantních buněk bylo ohnutých a dělilo se nerovnoměrně, což naznačilo pravděpodobný defekt mikrotubulů (Zimmerman and Chang, 2005). *Mto1Δ* mutanty vykazovaly dlouhé a stále se prodlužující mikrotubuly bez katastrof na (+) konci. Po dosažení pólu buňky se, stejně jako u *alp4/6*, *gtb1* mutantních buněk, mikrotubuly ohnuly. Kromě toho docházelo k depolymerizaci na (-) konci vláken. Díky tomu mikrotubuly vykazovaly „treadmilling“. Jelikož *mto1Δ* kvasinky postrádaly cytoplazmatické MTOC, vyrůstaly mikrotubuly z vřetének nebo z jiných intranukleárních mikrotubulů.

V dalších experimentech se Zimmerman et al. (2004) pokusili prokázat, zda k ovlivňování dynamiky mikrotubulů dochází prostřednictvím γ -TuCs. Pokud by tato domněnka byla správná, pak by i mutanty v proteinech γ -TuC vykazovaly stejný fenotyp. Ke studiu použili *alp4* buňky a dosáhli velmi podobného fenotypu mikrotubulů. Tím prokázali, že změna dynamiky mikrotubulů je regulována snížením funkčnosti γ -TuCs.

9. Distribuce proteinů γ -TuC podél mikrotubulů

Dynamika (+) konce mikrotubulů je regulována GCP proteiny vyskytujícími se v MTOC nebo volně v cytoplazmě. Proteiny γ -TuC byly lokalizovány také na dalších buněčných strukturách (Zimmerman et al., 2004). Nově identifikovaný protein v *S. pombe* Rsp1 se vyskytuje v MTOC a na mikrotubulech. Slouží k přestavbě ekvatoriálního MTOC, na interfázní MTOC a přispívá tak vzniku správně organizovaného interfázního cytoskeletu. Rsp1p byl společně s GCP proteiny lokalizován v tzv. „satelitech“ pohybujících se oběma směry podél mikrotubulů. Rychlost a charakter pohybu naznačil, že satelity jsou asociovány s jedním či více molekulárními motory. U *rsp1* mutovaných kvasinek se satelity nevyskytovaly nebo byl jejich počet výrazně redukován. Autoři navrhli, že Rsp1 protein je nutnou komponentou tvorby satelitů, tj. dopravních prostředků, které transportují γ -TuCs a usnadňují tak reorganizaci MTOC.

γ -TuCs i Rsp1 byly v satelitech lokalizovány také přímo na (+) konci mikrotubulů (Zimmerman et al., 2004). Tato práce podala první důkaz výskytu γ -tubulinu a GCP proteinů na (+) konci mikrotubulů.

10. Možné mechanismy regulace (+) konce mikrotubulů

Ačkoliv ještě není známo, jakým způsobem je (+) konec mikrotubulů regulován, bylo navrženo několik možných modelů (Zimmerman and Chang, 2005).

Prvním mechanismem je ovlivňování (+)-koncových faktorů. Tip1 je homologním proteinem CLIP-170 a v *S. pombe* je namířen proti katastrofám mikrotubulů. Mutantní kvasinky *mtol1Δtip1Δ* vykazovaly kratší nezahnuté mikrotubuly, které po dosažení okraje buňky depolymerovaly. U *mtol1Δ* mutantů byla zároveň zaznamenána vyšší koncentrace Tip1 proteinů na (+) konci mikrotubulů, což by vysvětlovalo zvýšenou stabilitu a sníženou frekvenci katastrof. Ovlivňováním Tip1 proteinu by tudíž γ -TuC mohl regulovat dynamiku mikrotubulů (Zimmerman and Chang, 2005).

Dalším možným modelem je vliv ukotvení (-) konce vlákna. U *mtol1Δ* buněk jsou (-) konce mikrotubulů volné (Zimmerman and Chang, 2005). Když poté vlákno polymeru dosáhne okraje buňky, není na něj kladen tak velký tlak, jako na ukotvené mikrotubuly, a tím nedochází ke katastrofě. Tento model ale není pravděpodobně příliš reálný, protože v *alp1* defektních kvasinkách jsou některé mikrotubuly stále vázané na jádro, a přesto ke katastrofám nedochází. Navíc bylo prokázáno, že se mikrotubuly v *alp1* defektních buňkách častěji vázaly na SPB. Delší vlákna je možné vysvětlit zvýšenou stabilitou mikrotubulů způsobenou právě kotvením do SPB (Vardy and Toda, 2000). Kromě toho se i v divokých kmenech kvasinek vyskytují volné mikrotubuly vykazující normální frekvenci katastrof.

Třetím navrženým mechanismem je vliv zvýšení volné frakce $\alpha\beta$ -tubulinových dimérů. Většina mutantních kvasinek má méně mikrotubulů než nemutované buňky. Díky tomu se mění poměr solubilní frakce tubulinových dimérů oproti polymerizovaným ve prospěch volných dimérů. Tento posun v koncentracích může také určitým způsobem napomáhat snazší polymeraci a snížení frekvence katastrof.

Dalším navrženým modelem je vliv na změnu struktury mikrotubulu nukleovaného defektním γ -TuC. Nelze také vyloučit, že solubilní γ -TuCs mohou ovlivňovat dynamiku +TIP proteinů vytvářením společných komplexů v cytoplazmě.

11. Závěr

Dosud publikované práce jasně dokazují, že γ -tubulin i další proteiny γ -TuC mají vliv na dynamiku (+) konce mikrotubulů. Stále však ale nejsou přesně známy molekulární mechanismy toho, jak proteiny tyto funkce vykonávají. Do dnešní doby bylo navrženo několik možných modelů, avšak žádný z mechanismů nebyl dosud experimentálně potvrzen. Kromě přesného mechanismu fungování γ -tubulinu a GCP proteinů není také objasněna otázka vlastní regulace těchto proteinů. Doposud není zřejmé, jaké signály musí přijít, aby tyto proteiny aktivně pozměnily dynamiku mikrotubulů. Jednou z potenciálních možností regulace γ -tubulinu a GCP proteinů je modulace těchto proteinů fosforylací. Výsledky naší laboratoře ukazují, že γ -tubulin se v buňce vyskytuje v komplexech s protein tyrosin kinázami a rovněž se ukazuje, že i GCP proteiny mohou být fosforylovány. Lze také očekávat, že proteomická studia povedou k získání nových poznatků o dalších proteinech interagujících s γ -tubulinem. Tyto proteiny by se také mohly účastnit organizace a regulace mikrotubulů. Nová zajímavá data se v budoucnu dají očekávat také ze studií interakcí mitotických kinezinů s γ -tubulinem. Tyto molekulární motory by mohly transportovat γ -tubulin a GCP proteiny k (+) konci mikrotubulů, a tím se podílet na regulaci jejich dynamiky. Otevřenou otázkou dále zůstává, zda k ovlivňování (+) konce mikrotubulů γ -TuCs dochází pouze u mikrotubulů kotvených v MTOC nebo i u mikrotubulů nukleovaných mimo tyto oblasti, např. z vnitrobuněčných membrán.

Závěrem je možno říci, že v blízké budoucnosti lze očekávat prudký rozvoj poznatků, které povedou k pochopení regulace na (+) konci mikrotubulů.

12. Literatura

- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 309-22.
- Aldaz, H., Rice, L. M., Stearns, T. and Agard, D. A.** (2005). Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin. *Nature* **435**, 523-7.
- Arnal, I., Heichette, C., Diamantopoulos, G. S. and Chretien, D.** (2004). CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol* **14**, 2086-95.
- Brouhard, G. J., Stear, J. H., Noetzel, T. L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S. C., Howard, J. and Hyman, A. A.** (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**, 79-88.
- Carvalho, P., Tirnauer, J. S. and Pellman, D.** (2003). Surfing on microtubule ends. *Trends Cell Biol* **13**, 229-37.
- Desai, A. and Mitchison, T. J.** (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117.
- Dutcher, S. K.** (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr Opin Microbiol* **6**, 634-40.
- Erickson, H. P.** (2000). Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament? *Nat Cell Biol* **2**, E93-6.
- Folker, E. S., Baker, B. M. and Goodson, H. V.** (2005). Interactions between CLIP-170, tubulin, and microtubules: implications for the mechanism of Clip-170 plus-end tracking behavior. *Mol Biol Cell* **16**, 5373-84.
- Fujita, A., Vardy, L., Garcia, M. A. and Toda, T.** (2002). A fourth component of the fission yeast gamma-tubulin complex, Alp16, is required for cytoplasmic microtubule integrity and becomes indispensable when gamma-tubulin function is compromised. *Mol Biol Cell* **13**, 2360-73.
- Kollman, J. M., Zelter, A., Muller, E. G., Fox, B., Rice, L. M., Davis, T. N. and Agard, D. A.** (2008). The Structure of the {gamma}-Tubulin Small Complex: Implications of Its Architecture and Flexibility for Microtubule Nucleation. *Mol Biol Cell* **19**, 207-15.
- Komarova, Y. A., Akhmanova, A. S., Kojima, S., Galjart, N. and Borisy, G. G.** (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J Cell Biol* **159**, 589-99.
- Leguy, R., Melki, R., Pantaloni, D. and Carlier, M. F.** (2000). Monomeric gamma-tubulin nucleates microtubules. *J Biol Chem* **275**, 21975-80.

- Li, Q. and Joshi, H. C.** (1995). gamma-tubulin is a minus end-specific microtubule binding protein. *J Cell Biol* **131**, 207-14.
- Masuda, H., Miyamoto, R., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y.** (2006). The carboxy-terminus of Alp4 alters microtubule dynamics to induce oscillatory nuclear movement led by the spindle pole body in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **11**, 337-52.
- Paluh, J. L., Nogales, E., Oakley, B. R., McDonald, K., Pidoux, A. L. and Cande, W. Z.** (2000). A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the kinesin-like protein pkl1p. *Mol Biol Cell* **11**, 1225-39.
- Raynaud-Messina, B. and Merdes, A.** (2007). Gamma-tubulin complexes and microtubule organization. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 24-30.
- Tange, Y., Fujita, A., Toda, T. and Niwa, O.** (2004). Functional dissection of the gamma-tubulin complex by suppressor analysis of gtb1 and alp4 mutations in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **167**, 1095-107.
- Tirnauer, J. S., Grego, S., Salmon, E. D. and Mitchison, T. J.** (2002). EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell* **13**, 3614-26.
- Tournebize, R., Popov, A., Kinoshita, K., Ashford, A. J., Rybina, S., Pozniakovsky, A., Mayer, T. U., Walczak, C. E., Karsenti, E. and Hyman, A. A.** (2000). Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat Cell Biol* **2**, 13-9.
- Vardy, L. and Toda, T.** (2000). The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *Embo J* **19**, 6098-111.
- Vogel, J., Drapkin, B., Oomen, J., Beach, D., Bloom, K. and Snyder, M.** (2001). Phosphorylation of gamma-tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Dev Cell* **1**, 621-31.
- Wiese, C. and Zheng, Y.** (2000). A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat Cell Biol* **2**, 358-64.
- Wise, D. O., Krahe, R. and Oakley, B. R.** (2000). The gamma-tubulin gene family in humans. *Genomics* **67**, 164-70.
- Yuba-Kubo, A., Kubo, A., Hata, M. and Tsukita, S.** (2005). Gene knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice. *Dev Biol* **282**, 361-73.
- Zimmerman, S. and Chang, F.** (2005). Effects of {gamma}-tubulin complex proteins on microtubule nucleation and catastrophe in fission yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 2719-33.

Zimmerman, S., Tran, P. T., Daga, R. R., Niwa, O. and Chang, F. (2004). Rsp1p, a J domain protein required for disassembly and assembly of microtubule organizing centers during the fission yeast cell cycle. *Dev Cell* **6**, 497-509.