

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Barbora Votavová**

Mechanismus vzniku perinukleárních aktinových mikrofilament a jejich  
funkce v buněčné motilitě

The assembly of perinuclear actin stress fibers and their role in cell  
movement

Diplomová práce

Školitel: Ing. Tomáš Vomastek Ph.D.

Praha, 2018

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především svému školiteli, Tomáši Vomastkovi, za bezbřehou trpělivost, kterou v souvislosti s mým vypracováním diplomové práce prokázal. Dále bych chtěla poděkovat i svým kolegům z Laboratoře buněčné signalizace MBÚ, jmenovitě především Miloslavě Maninové, Pepovi Čáslavskému a Honzovi Raslovi, za cenné rady a morální oporu po celou dobu mé vědecké práce. A v neposlední řadě moc děkuji své rodině, bez jejich podpory by tato práce nevznikla.

## **Prohlášení**

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

V Praze, 13. 8. 2018

Podpis

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABSTRAKT</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>1 ÚVOD</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>2 PŘEHLED LITERATURY</b> .....  | <b>8</b>  |
| 2.1 AKTINOVÝ CYTOSKELET V BUŇCE .....  | 8         |
| 2.1.1 Stresová vlákna.....   | 10        |
| 2.1.2 Fokální adheze .....   | 11        |
| 2.1.3 Actin cap .....  | 12        |
| 2.2 JADERNÁ OBÁLKA A JADERNÁ LAMINA .....                                      | 14        |
| 2.2.1 Proteinové složení jaderné obálky – nespriny a SUN proteiny.....         | 14        |
| 2.2.2 Jaderná lamina .....   | 16        |
| 2.2.3 Napojení perinukleárních aktinových vláken na jádro – LINC komplex ..... | 16        |
| 2.3 BUNĚČNÁ MIGRACE A ÚLOHA AKTINU .....                                       | 18        |
| 2.4 SIGNALIZACE OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU, RESP. ROZPAD AKTINU .....                  | 20        |
| 2.4.1 Rho GTPázy .....   | 21        |
| 2.4.2 Signálizace vedoucí k aktivaci/deaktivaci RhoGTPáz, především RhoA.....  | 24        |
| <b>3 CÍLE PRÁCE</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>4 MATERIÁLY A METODY</b> .....  | <b>28</b> |
| 4.1 MATERIÁLY .....  | 28        |
| 4.1.1 Buněčné linie a kultury.....   | 28        |
| 4.1.2 Seznam siRNA (syntetizováno firmou Eurogentec).....                      | 28        |
| 4.1.3 Seznam plasmidů.....   | 29        |
| 4.1.4 Seznam restrikčních enzymů.....  | 29        |
| 4.1.5 Seznam primárních protilátek.....  | 29        |
| 4.1.6 Seznam sekundárních protilátek.....                                      | 29        |
| 4.2 METODY .....   | 30        |
| 4.2.1 Kultivace buněk.....   | 30        |
| 4.2.2 Fixace buněk pomocí paraformaldehydu a následná permeabilizace .....     | 30        |
| 4.2.3 Fluorescenční mikroskopie .....  | 30        |
| 4.2.4 Time-lapse mikroskopie za použití fázového kontrastu .....               | 31        |
| 4.2.5 Sběr lyzátů a příprava vzorků na SDS-PAGE.....                           | 31        |
| 4.2.6 SDS-PAGE .....   | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.7 Western blot a imunodetekce.....  | 32        |
| 4.2.8 Kalcium-fosfátová transfekce siRNA.....   | 32        |
| 4.2.9 Transfekce DNA vektorů.....   | 33        |
| 4.2.10 Práce s DNA – PCR, restrikce, ligace.....  | 33        |
| 4.2.11 Agarózová DNA elektroforéza + extrakce DNA z gelu.....   | 34        |
| 4.2.12 Replikace plasmidu v kompetentních bakteriích + izolace DNA.....                                     | 34        |
| 4.2.13 Příprava CHD-GFP-KASH konstruktů.....  | 35        |
| <b>5 VÝSLEDKY.....</b>  | <b>37</b> |
| 5.1 ACTIN CAP - JEHO FUNKCE V BUŇKÁCH A STRUKTURA NAPOJENÍ NA JÁDRO.....                                    | 37        |
| 5.1.1 Porovnání různých buněčných typů - přítomnost x nepřítomnost actin capu.....                          | 37        |
| 5.1.2 Migrační mód buněk v závislosti na přítomnosti actin capu.....  | 39        |
| 5.1.3 Vliv snížené exprese laminu A/C na tvorbu actin capu.....   | 43        |
| 5.1.4 Úloha aktin-vazebné domény CHD při tvorbě actin capu v buňkách.....                                   | 46        |
| 5.2 SIGNALIZACE VEDOUcí K TVORBĚ, RESP. ROZPADU ACTIN CAPU.....   | 51        |
| 5.2.1 Úloha GTPázy RhoA na tvorbu actin capu v buňkách HT1080 s inducibilní konstitutivně aktivní RhoA..... | 52        |
| 5.2.2 Důležitost přítomnosti kyseliny lysofosfatidové (LPA) při utváření actin capu.....                    | 54        |
| 5.2.3 Vliv snížené exprese FAK na rozpad a tvorbu actin capu během buněčné polarizace.....                  | 57        |
| 5.2.4 Role p115-RhoGEF, LARG a PDZ-RhoGEF při aktivaci GTPázy RhoA.....                                     | 59        |
| <b>6 DISKUZE.....</b>   | <b>62</b> |
| 6.1 VYHODNOCENÍ ROZDÍLŮ V RYCHLOSTI A SMĚROVANOSTI BUNĚČNÉ MIGRACE.....                                     | 64        |
| 6.2 NAPOJENÍ ACTIN CAPU NA JADERNOU OBÁLKU.....   | 67        |
| 6.3 SIGNÁLNÍ DRÁHY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU ACTIN CAPU.....   | 69        |
| <b>7 ZÁVĚR.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>   | <b>74</b> |

## ABSTRAKT

Pohyb jádra, ke kterému dochází během buněčné migrace a invazivity, je aktivní proces z velké části zprostředkovaný aktino-myozinovým cytoskeletem. Klíčovou roli v přenosu aktino-myozinových sil na jádro hraje proteinový komplex LINC, který se skládá z proteinů SUN a nesprin a který mechanicky spojuje jadernou laminu a cytoskelet. Komplex LINC asociuje s tzv. perinukleárními aktinovými vlákny, která jsou jeho pomocí zakotvena v jaderné obálce. Perinukleární aktinová vlákna jsou zakotvena také ve fokálních adhezích a tak mechanicky spojují extracelulární matrix s komplexem LINC a jádrem. Jelikož perinukleární aktinová vlákna jsou kontraktilní, lze předpokládat, že generují síly, které regulují pohyb jádra a tak optimalizují buněčný pohyb.

V této práci jsme se zaměřili na roli perinukleárních aktinových vláken během buněčné migrace. Hlavním cílem diplomové práce bylo objasnit mechanismy, které se podílí na tvorbě perinukleárních aktinových vláken a jak tyto mechanismy usnadňují migraci buněk. Práce byla zaměřena na charakterizaci úlohy signální dráhy LPA - RhoA při vzniku perinukleárních aktinových vláken, úlohy jednotlivých součástí LINC komplexu v zakotvení aktinových vláken do jaderné obálky a jaký vliv mají tato vlákna na migraci nenádorových a nádorových buněk.

Působení LPA bylo potvrzeno jako jeden z hlavních podnětů pro tvorbu perinukleárních vláken a kináza FAK naopak jako důležitý činitel při jejich rozpadu, ke kterému dochází během polarizace buněk. Naše výsledky také naznačují, že přítomnost actin capu by mohla korelovat se zvýšenou směrovaností buněčné migrace a zároveň nemá vliv na rychlost migrace. Navzdory našemu předpokladu nebylo prokázáno, že by aktin vazebná doména, přítomná v proteinu nesprin-2, hrála významnou roli při napojení perinukleárních aktinových vláken na LINC komplex.

**klíčová slova:** LINC, perinukleární aktin, aktino-myozinová kontraktilita, buněčná migrace, LPA, Rho, FAK

## **ABSTRACT**

Nucleus is the largest cellular organelle in animal cells. Due to its bulky nature and the stiffness of nuclear lamina the nucleus constitutes the substantial problem for migrating cells where nucleus has to move. The actomyosin generated forces and LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) complex, that is composed of SUN and nesprin proteins, play key role in nuclear movement. LINC complex mechanically couples nuclear lamina to the cytoskeleton and allows the forces exerted by the cytoskeleton to move the nucleus. Perinuclear actin fibers, also termed actin cap, mechanically link focal adhesions with nucleus and they may generate forces that position the nucleus in a way that is optimal for cellular movement. However, molecular mechanism of how perinuclear actin fibers and LINC complex orchestrate the nuclear movement and functional significance of this process remain poorly understood.

The specific aim was to determine the mechanisms by which perinuclear actin fibers are formed and how are these mechanisms employed to facilitate cell migration. The role of LPA-RhoA signaling axis and LINC complex in the formation of perinuclear actin fibers was also examined.

It was confirmed that LPA is essential stimulus during actin cap formation. On the other hand, FAK kinase was found necessary for actin cap disassembly during cell polarization. Our results also indicate that actin cap increases directionality of cell migration without affecting cell velocity. In contrast with previous assumption, it was found that actin binding domain of nesprin-2 does not significantly influence connection of perinuclear actin fibres to the LINC complex and formation of actin cap.

**key words:** LINC, perinuclear actin, actomyosin contractility, cell migration, LPA, Rho, FAK

## SEZNAM ZKRATEK

- ABP – aktin vazebné proteiny (actin binding proteins)
- AC – actin cap („aktinová čepička“)
- ACAFA – fokální adheze asociovaná s actin capem (actin cap associated focal adhesion)
- Cdc42 – homolog proteinu 42 kontrolujícího buněčný cyklus (Cell division control protein 42 homolog)
- CHD – doména calponinové homologie (calponin homology domain)
- CS – calf serum
- DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DH – Dbl homology
- DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- dox - doxycyklin
- ECM – extracelulární matrix (extracellular matrix)
- FA – fokální adheze (focal adhesion)
- FAK – kináza fokálních adhezí (focal adhesion kinase)
- FBS – fetal bovine serum
- GFP – zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
- GPCR – receptor spřažený s G-proteiny (G-protein coupled receptor)
- IF – intermediální filamenta
- INM – vnitřní jaderná membrána (inner nuclear membrane)
- KASH - Klarsicht, ANC-1, Syne Homology
- LARG - leukemia-associated Rho GEF
- LEM - LAP2, emerin, MAN1
- LINC - propojení nukleoskeletu a cytoskeletu (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)
- LPA - kyselina lysofosfatidová (lysophosphatidic acid)
- mDia – savčí homolog Diaphanous (mammalian Diaphanous-homolog)
- MLC – lehký řetězec myosinu (myosin light chain)
- MLCP – fosfatáza lehkého myosinového řetězce (myosin light chain phosphatase)
- MTOC – mikrotubuly organizující centrum (mikrotubule organising center)

Nespriny – proteiny jaderného obalu obsahující spektrinové repetice (Nuclear envelope spectrin-repeat proteins)

ONM – vnější jaderná membrána (outer nuclear membrane)

PDZ - PSD-95/DlgA/ZO-1

RGS – regulátory G-proteinové signalizace (regulators of G-protein signaling)

RhoA – Ras homolog A

ROCK – Rho-asociovaná protein kináza (Rho-associated protein kinase)

RTK – tyrosin kinázový receptor (receptor tyrosin kinase)

siRNA – malá interferující ribonukleová kyselina (small interfering ribonucleic acid)

SR – spektrinová repetice (spectrin repeat)

SUN - Sad1, UNC-84

WASP – Wiskott-Aldrich Syndrome protein

WAVE – WASP-family verprolin-homologous protein



# 1 Úvod

Aktinový cytoskelet a síly jím generované hrají v buňce nezastupitelnou roli a závisí na nich mnoho buněčných procesů. Mezi ty patří např. buněčné dělení, buněčná adheze, morfogeneze, endocytóza, fagocytóza a v neposlední řadě i buněčná migrace. Narušení dynamiky tvorby a rozpadu aktinových vláken může vést k závažným poruchám a onemocněním – např. rakovině, neurologickým onemocněním nebo myofibrilárním myopatiím.

Komplikovanou síť aktinových filament tvoří mimo jiné různé typy tzv. stresových vláken, kde jsou jednotlivá paralelní či antiparalelní vlákna navzájem propojena pomocnými aktin-vazebnými proteiny. V migrujících mesenchymálních buňkách rozlišujeme ventrální stresová vlákna, nacházející se na spodní straně buňky, dorsální stresová vlákna, vedoucí od předního konce buňky směrem nad jádro a transversální aktinové oblouky (*transverse actin arcs*), které se nacházejí v přední části buňky a jsou kolmé na dorsální vlákna. Specifickým typem stresových vláken jsou pak tzv. perinukleární aktinová vlákna, nazývaná též actin cap („aktinová čepička“), která se tvoří jen v některých typech buněk. Actin cap se skládá z několika rovnoběžných stresových vláken, která se nacházejí nad jádrem. Na bazální straně buňky se tato vlákna upínají do fokálních adhezí a zajišťují tak napojení na extracelulární matrix (ECM). Actin cap je na rozdíl od ostatních stresových vláken zakotven i na apikální straně jádra.

Výzkum z posledních let ukazuje velký potenciál perinukleárního actin capu jako mechanického propojení ECM a jádra. Byla prokázána např. důležitost actin capu při reorientaci jádra během buněčné polarizace, spekuluje se o jeho významu při regulaci buněčné exprese v závislosti na tzv. mechanosensingu a je téměř jisté, že svou roli hraje i v některých typech buněčné migrace.

Cílem této práce je objasnění dalších funkcí perinukleárního actin capu v buněčné migraci a odhalení signálních drah vedoucích k tvorbě, resp. rozpadu těchto specifických aktinových vláken.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Aktinový cytoskelet v buňce

Buňky musí během své existence překonávat mnoho překážek. Musí být schopny se přizpůsobovat změnám ve svém okolí, být schopny dělení, migrace, udržovat mezibuněčný kontakt a zachovávat tvar. Při všech těchto činnostech se neobejdou bez správně fungujícího aktinového cytoskeletu.

Aktin je jedním z nejhojnějších proteinů v buňkách. Vyskytuje ve dvou základních formách – jako monomerní globulární G-aktin (velikost zhruba 43 kDa) a jako polymerní filamentární F-aktin. Aktin se objevuje ve 3 hlavních isoformách.  $\alpha$ -aktin, který lze nalézt především ve svalových buňkách, a  $\beta$  a  $\gamma$ -aktin, které jsou zastoupeny téměř ve všech typech buněk jakožto mediátoři buněčné motility. F-aktin (též označován jako mikrofilamenta) se tvoří polymerací z jednotlivých monomerů G-aktinu. Tento děj je vysoce dynamický a ovlivňuje ho celá řada dalších proteinů, jak strukturních, tak signálních. Vlákna F-aktinu jsou polarizovaná a rozlišujeme tzv. „pointed“ (-) a „barbed“ (+) konec. Polymerace a prodlužování aktinových vláken probíhá preferenčně na + konci (Oda et al. 2009).

S pomocí dalších aktin-vazebných proteinů (ABP – *actin binding proteins*) pak aktinová vlákna (F-aktin) v buňce utváří mnoho různých struktur – paralelní svazky, rozvětvené aktinové sítě a ve spolupráci s myosinem také antiparalelní kontraktilní vlákna (Blanchoin et al. 2014).

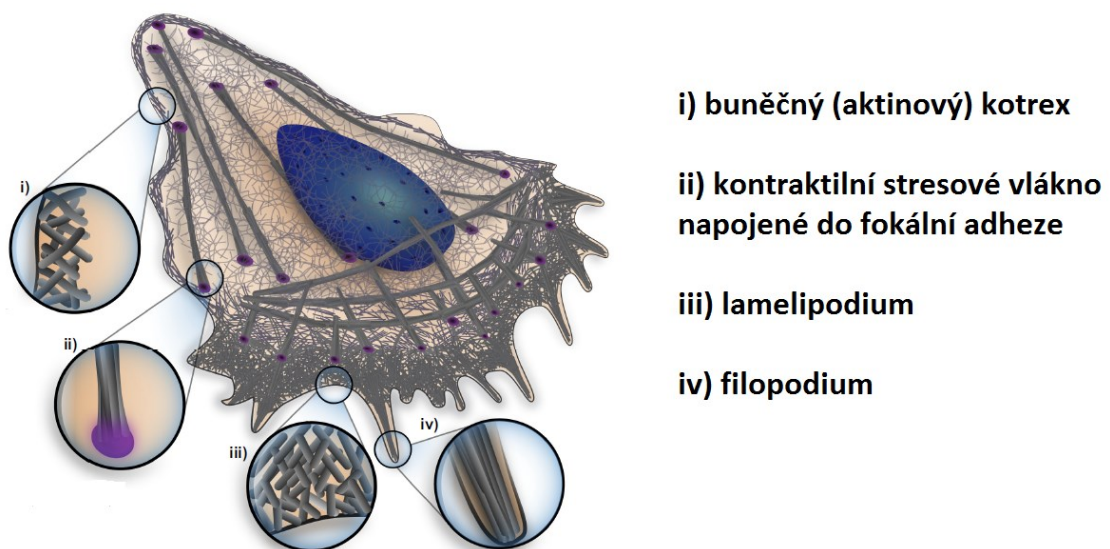
Pro každou tuto aktinovou strukturu je typické umístění v rozdílných buněčných lokacích. Velkou škálu různorodých aktinových struktur lze nalézt například v migrující polarizované mesenchymální buňce, přičemž právě reorganizace cytoskeletu je jedním z nezbytných kroků k ustanovení buněčné polarity (Maninova, Caslavsky, and Vomastek 2017).

Typická migrující mesenchymální buňka zaujímá kónický tvar s rozšířeným tzv. vedoucím okrajem (z angličtiny *leading edge*) a zúženou zadní částí (z angl. *cell rear* nebo *tail*). Na vedoucím okraji můžeme pozorovat tzv. lamelipodium a filopodia. Lamelipodium je široká plochá struktura tvořená hustou aktinovou sítí. Na zesíťování aktinových vláken se podílí především proteiny Arp2/3 (Blanchoin et al. 2014). Na rozdíl od aktinové sítě

v lamelipodii jsou filopodia tvořena tlustými aktinovými svazky propojenými proteiny fimbrin a fascin. Filopodia tvoří drobné cylindrické výrůstky (Obr. 1). V obou těchto strukturách dochází k intenzivní polymeraci F-aktinu na jeho „barbed“ koncích, směřujících směrem z buňky, k odlačování buněčné membrány, tvorbě buněčných výstupků (tzv. protruzí) a tím k pohybu buňky kupředu (Faix and Rottner 2006; Gupton et al. 2007).

V zadní části buňky se tvoří hned několik druhů tzv. stresových vláken (Obr. 1). Tyto kontraktilní aktinomyozinové svazky jsou nezbytné pro ukotvení buňky k substrátu a také pro přitažení buněčného konce (z angl. *tail retraction*) během buněčné migrace. Stresová vlákna jsou tvořena obvykle 10-30 antiparalelními aktinovými vlákny navzájem propojenými především díky působení proteinů  $\alpha$ -actininu a myosinu a jejich konce jsou ve většině případů ukotveny do fokálních adhezí (FA). Fokální adheze jsou multiproteinové komplexy, které zajišťují skrze integrinové receptory propojení extracelulární matrix (ECM) a cytoskeletu (Pellegrin and Mellor 2007).

Po vnějším obvodu buňky můžeme pozorovat tenkou vrstvu aktinového (též buněčného) kortexu, jehož hlavní role je udržování buněčného tvaru (Obr. 1) (Fehon, McClatchey, and Bretscher 2010). Zbytek buňky je vyplněn sítí drobných navzájem propojených filament dynamického charakteru.



**Obr. 1: Základní aktinové struktury nacházející se v polarizované migrující buňce. Na rozšířeném vedoucím okraji buňky se nachází lamelipodium a několik filopodií, v zadní i přední části buňky jsou viditelná stresová vlákna, po obvodu buňky aktinový kortex (převzato z Blanchoin et al. 2014 - upraveno).**

### 2.1.1 Stresová vlákna

Jak již bylo zmíněno výše, hlavní úlohou stresových vláken je produkování tažné síly. To je umožněno díky ATP-poháněnému pohybu myozinu II proti aktinovému vláknu. Jelikož jak vlákna aktinu, tak motorická jednotka myozinu jsou organizovány bipolárně, dochází při tomto pohybu ke kontrakci celého aktinomyozinového vlákna (Tojkander et al. 2011).

Tato vlákna se vyskytují téměř ve všech buňkách, v některých jsou však výraznější než v jiných, např. ve fibroblastech, endoteliálních a svalových buňkách a v některých buňkách rakovinných. Obecně se dá říci, že v nepohyblivých buňkách jsou stresová vlákna silnější a stabilnější, naproti tomu v buňkách migrujících jsou dynamičtější a méně zřetelná (Cramer, Siebert, and Mitchison 1997). Ačkoli role stresových vláken při migraci některých typů buněk je neoddiskutovatelná, existují také buňky, jež se během buněčné motility obejdou zcela bez nich, např. leukocyty (Valerius et al. 1981).

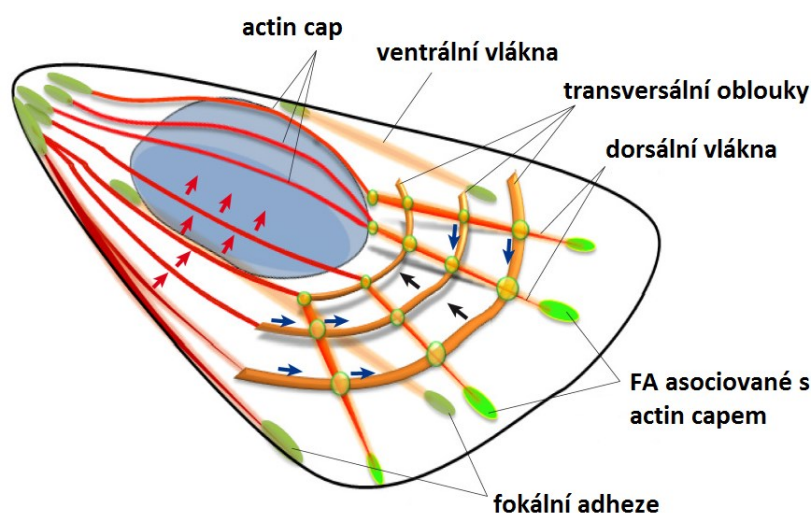
Na základě odlišné morfologie a funkce můžeme stresová vlákna rozlišovat na čtyři druhy. Ventrální vlákna, jejichž oba konce jsou ukotveny do fokálních adhezí (FA), se obvykle nacházejí spíše v zadní části buňky a jejich hlavní úlohou je konstriktce buněčného konce.

Dorsální vlákna, která se upínají do FA v přední části buňky a odtud se zdvihají směrem k centru buňky. Na rozdíl od ostatních stresových vláken neobsahují myozin a nejsou tedy schopná kontrakce. Jejich pravděpodobná funkce je jako „lešení“ pro tvorbu dalších typů vláken (Hotulainen and Lappalainen 2006).

Kontraktilní aktinové transversální oblouky (angl. *actin transverse arcs*) budiž toho příkladem. Tato vlákna se vůbec neupínají do FA, ale váží se na dorsální vlákna a generovanou sílu předávají dál jejich prostřednictvím. Jejich specifikem je postupný posun od vedoucího předního okraje buňky směrem ke středu a to právě díky generované kontrakci a svému postupnému zkracování (Obr. 2). Tento proces se nazývá retrográdní tok (Hotulainen and Lappalainen 2006).

A jako poslední ze čtveřice jsou relativně nedávno objevená perinukleární aktinová vlákna, v angličtině obvykle označovaná pojmem *perinuclear actin cap* (AC) (Khatau et al. 2009). Český ekvivalent k tomuto označení neexistuje, v úvahu připadá „aktinová čepička“ nebo perinukleární aktinová vlákna. V této práci budu používat termínu *actin cap*,

případně perinukleární aktinová vlákna. Actin cap se vyskytuje především u buněk přirozeně rostoucích na planárních substrátech (Khatau et al. 2009). Tato vlákna se oběma svými konci napojují do FA na bazální straně buňky, zároveň však horizontálně prostupují buňkou až nad jádro a vytváří nad ním kopulovitou strukturu. Jak bude detailně popsáno dále, přímo na jádro jsou také fyzicky navázána a regulují tak například reorientaci jádra a dále stabilizují jeho pozici (Maninova and Vomastek 2016).



**Obr. 2: Typy stresových vláken v migrující buňce.** Oranžově jsou znázorněná ventrální, dorsální vlákna a transversální oblouky, červeně perinukleární aktinová vlákna. Modré šipky značí postupné smršťování transversálních oblouků na základě myozinem generované kontrakce, černé šipky retrográdní tok. Červené šipky ukazují jeden z možných mechanismů vzniku actin capu, podrobněji popsáno v kapitole 2.1.3 (převzato z Maninova and Vomastek 2016 - upraveno).

### 2.1.2 Fokální adheze

Fokální adheze však v buňce zajišťují více funkcí, než jen prosté mechanické ukotvení stresových vláken k podkladu. Jedná se o složité proteinové komplexy propojující ECM na vnější straně buňky s jejím vnitřním prostředím a hrají zároveň i roli signální. Tvorba, velikost, konformace a trvalost FA je mimo jiné ovlivněna právě i silami generovanými za pomoci stresových vláken (Balaban et al. 2001).

Fokální adheze jsou komponovány mnoha proteiny. Mezi základní patří integrinové heterodimery složené z  $\alpha$  a  $\beta$ -podjednotek. Interginy jsou členy rodiny membránových receptorů, které na extracelulární straně asociují s ECM. Po aktivaci integrinů dochází na cytoplasmatické straně k akumulaci řady strukturálních a signálních proteinů, které tvoří

fokální adheze. Mezi typické proteiny fokálních adhezí patří p130Cas/BCAR1 - adaptorová molekula umožňující vazbu dalších signálních partnerů; vinkulin a talin - adaptorové proteiny umožňující napojení aktinu do FA; paxilin – signální adaptorový protein, na jehož N-koncovou doménu se mohou vázat např. kináza fokálních adhezí (FAK) a další proteiny (Tojkander, Gateva, and Lappalainen 2012). Tyto proteiny jsou do fokálních adhezí inkorporovány postupně v průběhu tvorby adhezí a tento proces se nazývá maturace fokálních adhezí (Laukaitis et al. 2001).

FA se uplatňují také při vnímání a odpovědi na mechanické změny v extracelulárním prostředí, tzv. mechanosensing a mechanotransdukce. Jak bylo zmíněno, přesné složení a dynamika FA jsou vysoce závislé jak na silách působících ze strany stresových vláken, tak na složení a tvrdosti ECM, případně substrátu, na němž jsou buňky kultivovány. Složení substrátu dále ovlivňuje i složení a organizaci stresových vláken a následně také expresi některých genů (Zemel et al. 2010). Jak fokální adheze, tak stresová vlákna jsou tím výraznější, čím tvrdší substrát je pro kultivaci použit, a tedy čím vyšší míře mechanického stresu jsou buňky vystaveny (Prager-Khoutorsky et al. 2011).

Složení, velikost a přesná úloha FA se liší i podle toho, jaké typy aktinových vláken se do nich upínají. Např. FA, do nichž jsou ukotvena perinukleární aktinová vlákna/actin cap (*actin cap associated FA* – ACAFA), jsou větší než konvenční FA, obsahují více vinkulinu a aktivované proteinkinázy FAK a specializují se právě na signalizaci a přizpůsobování buňky změnám tvrdosti ECM (Kim et al. 2012). Naopak FA tvořené v lamelipodiu jsou jen drobné útvary vykazující vysokou dynamičnost a jejich hlavní úlohou je ukotvování protruzí k substrátu a umožnění generování tažné síly. Někdy jsou označovány jako tzv. fokální komplexy (He and Ji 2017; Nobes and Hall 1995).

### **2.1.3 Actin cap**

Perinukleární aktinová vlákna zastupují v buňce poněkud odlišnou roli, než ostatní stresová vlákna. Jak již bylo zmíněno výše, jako jediná stresová vlákna umožňují přímé mechanické propojení ECM s jádrem a to díky ACAFA a tzv. LINC komplexu (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton* – spojnice jaderného a buněčného skeletu). LINC komplex prostupuje obě jaderné membrány jaderné obálky a propojuje jadernou laminu a buněčný cytoskelet. Toto přímé spojení mezi ECM a jádrem pravděpodobně usnadňuje adaptaci na

vnější stimuly (Maninova, Caslavsky, and Vomastek 2017). Za zmínku také stojí, že perinukleární aktinová vlákna jsou orientována paralelně s osou migrace buňky a mohou tak představovat znak typický pro polarizované, protáhlé buňky (Maninova, Caslavsky, and Vomastek 2017). V souladu s tím je i poznatek, že perinukleární vlákna se vyskytují v buňkách s ustanovenou buněčnou polaritou a naopak chybí v buňkách cirkulárního tvaru (Klimova et al. 2016).

Tvorba perinukleárních aktinových vláken v buňce stále není dokonale objasněna a zdá se, že k ní může docházet kombinací více dějů. Perinukleární aktinová vlákna se tvoří pravděpodobně přechodem z některého jiného typu stresových vláken. Jednou z hypotéz tvorby actin capu je „podsunutí“ buněčného jádra pod existující stresová vlákna ventrální, čímž se z nich vytvoří vlákna actin capu (Kim et al. 2012). V naší laboratoři se povedlo zdokumentovat další z procesů skládání actin capu, který se uplatňuje při polarizaci buněk do rýhy vytvořené v konfluentně narostlých buňkách. Při polarizaci buněk dochází v počáteční fázi nejprve k rozložení existujícího actin capu a reorganizaci aktinového cytoskeletu. Po ustanovení buněčné polarity směrem do rýhy se actin cap znovu vytváří. Podle tohoto modelu se actin cap tvoří poměrně komplexním způsobem, který zahrnuje všechny typy stresových vláken. V první fázi dochází k tvorbě dorzálních vláken a k nim připojených aktinových transversálních oblouků. K některým koncům transverzálních vláken se pak také připojují periferální ventrální vlákna. Celá tato síť se stahuje směrem ke středu buňky díky kontrakci aktinových transversálních oblouků a periferálních ventrálních vláken. Jelikož dorsální vlákna polymerují podél dorsální membrány směrem k apikální straně buňky, celá tato aktinová síť je tažena směrem nad jádro. Na apikální straně jádra jsou pak aktinová vlákna stabilizována interakcí s LINC komplexem a maturují v actin cap (Obr. 2) (Maninova and Vomastek 2016; Versaevel, Grevesse, and Gabriele 2012).

Oproti dalším typům stresových vláken vykazuje AC také vyšší dynamiku. Lze to dokázat například přidáním malého množství latrunkulinu, inhibitoru, který váže monomery aktinu a brání jejich polymeraci. Toto ošetření v buňkách rozkládá specificky přednostně vlákna actin capu, zatímco ostatní stresová vlákna zůstávají zachována (Maninova and Vomastek 2016).

## 2.2 Jaderná obálka a jaderná lamina

Jednoznačně nejvýznamnější odlišností actin capu oproti ostatním stresovým vláknům je však již zmíněné napojení na jadernou obálku a jadernou laminu.

Buněčná obálka je tvořena vnitřní (INM – *inner nuclear membrane*) a vnější (ONM – *outer nuclear membrane*) jadernou membránou. Tyto membrány jsou navzájem propojeny prostřednictvím jaderných pórů a mezi nimi se nachází perinukleární prostor (Stoffler, Fahrenkrog, and Aebi 1999).

Přímo pod INM se nachází jaderná lamina. Jedná se o síť tvořenou intermediálními filamenty (IF), především laminy, která zajišťuje mechanickou podporu pro jadernou obálku a také kotvící místa pro jednotlivé chromatinové domény, jaderné regulační proteiny a transkripční faktory (Burke and Stewart 2013).

### 2.2.1 Proteinové složení jaderné obálky – nespriny a SUN proteiny

INM a ONM se svým proteinovým složením významně odlišují jak mezi sebou navzájem, tak i napříč rozličnými tkáněmi (de las Heras et al. 2013; Schirmer et al. 2003). ONM se svým složením podobá spíše membráně endoplasmatického retikula, naopak INM obsahuje rozsáhlou kolekci proteinů, z nichž některé se napojují na jadernou laminu a chromatin. Jednou z významných složek INM jsou tzv. SUN proteiny obsahující SUN (odvozeno od *Sad1p-UNC-84*) doménu.

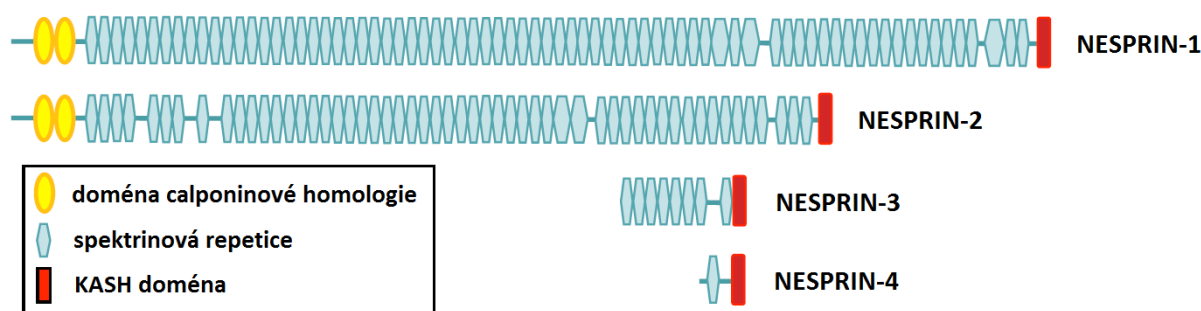
SUN proteiny jsou velmi evolučně konzervované a vyskytují se napříč mnoha organismy, a to včetně hub a rostlin. Společným znakem je pro ně přítomnost alespoň jedné transmembránové domény, jejíž pomocí jsou ukotveny do INM, a SUN domény, která se nachází v perinukleárním prostoru. Mnoho z nich navíc obsahuje další domény umožňující jejich vzájemnou multimerizaci, často trimerizaci (Haque et al. 2006; Sosa et al. 2012). Nukleoplasmatická N-koncová doména se mezi jednotlivými SUN proteiny liší. Většinou však zajišťuje vazbu na lamin nebo chromatin (King, Drivas, and Blobel 2008). V savčích buňkách byly identifikovány 2 zástupci rodiny SUN proteinů – proteiny Sun1 a Sun2 (Haque et al. 2006).

Důležitým proteinem přítomným v ONM pak jsou tzv. KASH proteiny, obsahující vysoce evolučně konzervovanou transmembránovou doménu KASH (**K**larsicht, **A**NC-1



and Syne Homology), která zároveň zasahuje do perinukleárního prostoru mezi INM a ONM (Rajgor and Shanahan 2013).

Jedněmi z nejvýznamnějších a zároveň poměrně nedávno popsanych zástupců KASH proteinů jsou nespriny (*nuclear envelope spectrin-repeat proteins*), tedy proteiny jaderné obálky obsahující spektrínové repetice. V obratlovcích byly popsány celkem 4 geny kódující nespriny 1-4. Nesprin-1 a nesprin-2 jsou ohromné proteiny, oba s velikostí přes 700 kDa, obsahující na N-konci párovou doménu calponinové homologie (CHD - *calponin homology domain*) (Obr. 3) (Zhang et al. 2002). CHD doména je aktin-vazebná. Nesprin-3 a nesprin-4 jsou oproti předchozím dvěma zmíněným výrazně menší a postrádají CHD doménu (Obr. 3). Nesprin-3 je schopný vazby na intermediální filamenta (IF) a aktin skrze adaptorový protein plektin, nesprin-4 váže kinesin (Roux et al. 2009; Wilhelmsen et al. 2005).



**Obr. 3: Schématické znázornění doménové kompozice jednotlivých proteinů nesprínové rodiny.** Všechny nespriny obsahují KASH transmembránovou doménu a alespoň jednu spektrínovou repetici. Nespriny -1 a -2 navíc obsahují CHD aktin vazebnou doménu, nespriny -3 a -4 nikoliv. (převzato z Rajgor and Shanahan 2013 - upraveno)

Nespriny navíc podléhají alternativní transkripci, tedy se v organismech vyskytují v mnoha různých isoformách, lišících se velikostí a tím, zda obsahují či neobsahují koncové domény – ať už KASH či CHD. Zkrácené isoformy s KASH doménou jsou díky menší velikosti schopné pronikat i do INM. Isoformy bez KASH domény lokalizují do mnoha různých buněčných kompartmentů (Rajgor et al. 2012).

Další z proteinů obvykle se vyskytujících v INM je emerín. Tento protein obsahuje tzv. LEM (zkratka pro *LAP2, emerín, MAN1*) doménu, která umožňuje jeho vazbu na chromatin (Brachner and Foisner 2011). Emerín se dále váže i na lamin A/C.

### 2.2.2 Jaderná lamina

Hlavními komponenty jaderné laminy jsou laminy typu A a B. Lamin A má navíc 2 sestřihové varianty – lamin A a lamin C. Často se proto používá souhrnné označení lamin A/C (Rober, Weber, and Osborn 1989). Lamin B má 2 formy – lamin B1 a B2, z nichž každá je kódována jiným genem. Ačkoli má každá ze 4 zmíněných forem laminu v buňce odlišnou roli, zdá se, že do určité míry jsou vzájemně zastupitelné (Guo et al. 2014).

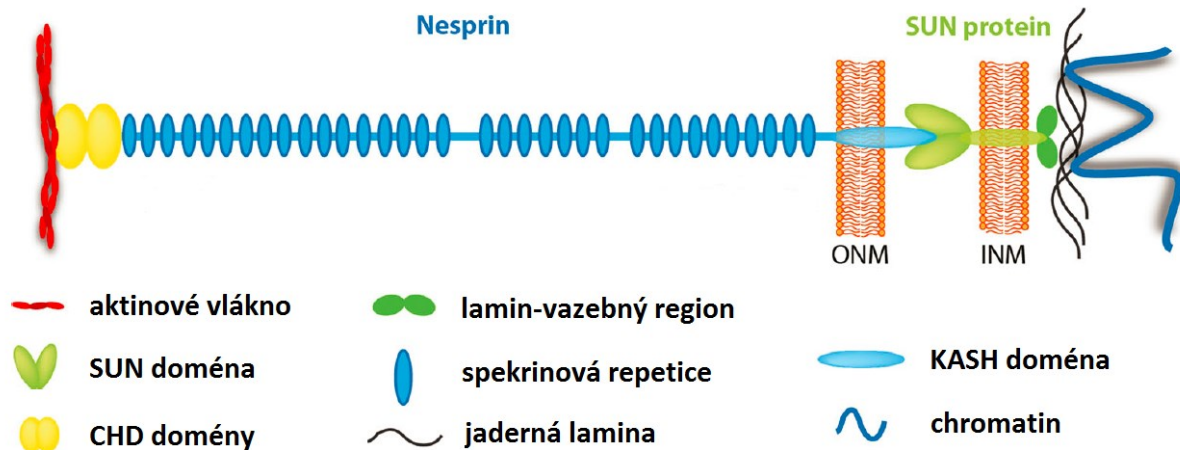
Jak již bylo zmíněno, na jadernou laminu, a potažmo laminy, se upíná velké množství interakčních partnerů. Ať už výše zmíněné SUN proteiny, emerín nebo domény chromatinu (Shimi et al. 2008). Laminy jsou tedy důležité nejen jako strukturní podpora jádra a jaderné obálky, ale např. i během organizace chromatinu, kdy se váží na promotory a usnadňují nasedání transkripčních faktorů (Lund et al. 2013).

### 2.2.3 Napojení perinukleárních aktinových vláken na jádro – LINC komplex

Je zřejmé, že na pomezí ONM, INM a jaderné laminy probíhá mnoho vzájemných interakcí. Velká část proteinů, které se těchto interakcí účastní, jsou součástí tzv. LINC komplexu (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*), případně se na LINC komplex váží.

LINC komplex se skládá ze SUN proteinů na vnitřní jaderné membráně a nesprinů na membráně vnější, přičemž tyto 2 typy proteinů spolu vzájemně fyzicky interagují v perinukleárním prostoru (Obr. 4). KASH doména nesprinů se zde váže na C-terminální SUN doménu SUN proteinů (Crisp et al. 2006).

Tím, že nespriny obsahují ve své cytosolické části mnoho vazebných míst pro různé proteiny a naopak SUN proteiny umožňují svou nukleoplasmickou částí vazbu na jadernou laminu a chromatin, znamená interakce SUN-KASH v podstatě přímé fyzické napojení komponentů cytosolu na laminu, případně dokonce přímo na chromatin.



**Obr. 4: Schématické znázornění kompozice LINC komplexu.** LINC komplex se skládá z nesprinu, ukotveného do vnější jaderné membrány (ONM), a SUN proteinu, ukotveného do vnitřní jaderné membrány (INM). Tyto dva partneři spolu vzájemně interagují v perinukleárním prostoru prostřednictvím svých domén SUN a KASH a zajišťují tak fyzické propojení komponentů cytoplasmy a nukleoplasmy (převzato z Maninova, Caslavsky, and Vomastek 2017- upraveno).

Jedním z cytosolických vazebných partnerů nesprinů je mimo jiné také aktin, konkrétně vlákna perinukleárního actin capu. Actin cap se tedy prostřednictvím LINC komplexu váže na apikální stranu buněčného jádra a je tak fyzicky napojen až na laminu a chromatin.

Pokud navíc uvážíme, že actin cap se zároveň upíná až do fokálních adhezí na bazální straně buňky, lze hovořit o přímém propojení ECM s buněčným jádrem. Rozrušení LINC komplexu vede v buňce k úbytku fokálních adhezí asociovaných s actin capem (Kim et al. 2012).

Z toho plyne několik různých dodatečných úloh, které actin cap může v buňce mít. Bylo např. popsáno, že rozrušení LINC komplexu a následná eliminace actin capu vede ke změnám tvaru buněčného jádra (Khatau et al. 2009). Buňky s narušeným LINC komplexem a rozpadlým actin capem zároveň nejsou schopny efektivní reorientace jádra (Maninova and Vomastek 2016) a buněčné polarizace (Lombardi et al. 2011).

A lze tak vysvětlit i další dříve popsané děje, které ukazovaly na přímé propojení integrinů, napojených na ECM, a buněčného jádra (Maniotis, Chen, and Ingber 1997).

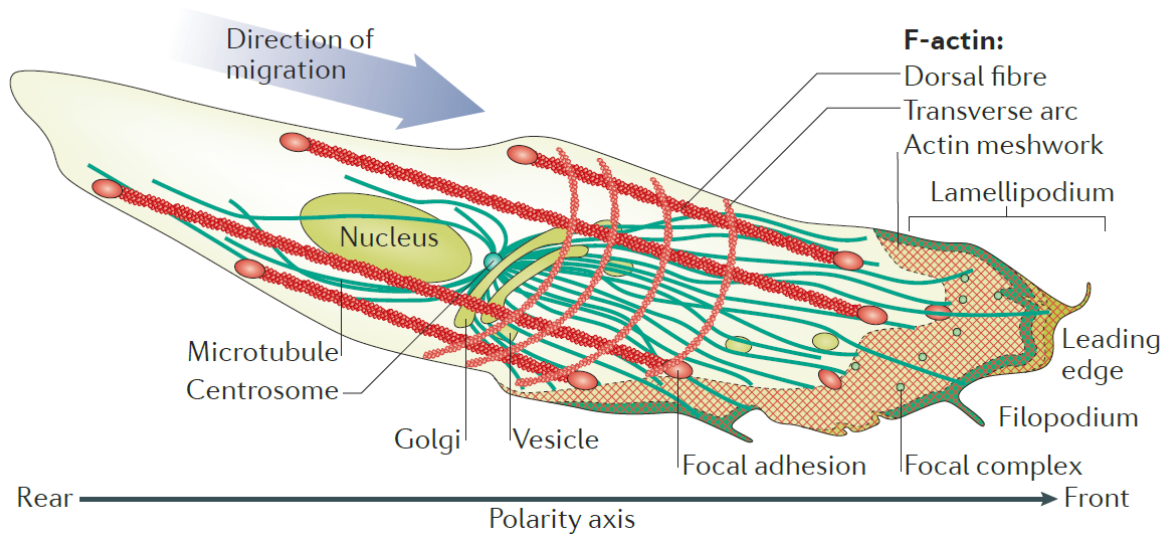
## 2.3 Buněčná migrace a úloha aktinu

Buněčná migrace je jeden z dějů, bez nichž většina buněk, a potažmo i celý organismus, nemůže existovat. Jejím narušením dochází k poruchám embryonálního vývoje, narušení reparačních tkáňových procesů a poruchám imunity. Naopak zvýšenou mírou migrace u buněk, jež by správně migrovat neměly, dochází např. k metastatickému rozsevu a šíření rakovinných buněk z primárního nádoru. Z tohoto důvodu se inhibice buněčné migrace, potažmo inhibice funkce aktinového cytoskeletu, jeví jako vhodný nástroj pro zabránění šíření nádorů v organismu (Gandalovicova et al. 2017).

Buňky mohou migrovat buď každá samostatně, nebo kolektivně. Kolektivní buněčná migrace je založená na principu jedné nebo více vedoucích buněk (*leader cell*) a skupiny buněk následujících (*follower cells*). Tyto buňky jsou mezi sebou propojeny pomocí mezibuněčných spojů (Haeger et al. 2015). Buňky migrující samostatně mohou migrovat jednak mesenchymálním způsobem a pokud dostatečně dediferencují a ztratí kontakt s ECM, mohou využívat i améboidního způsobu migrace (Gandalovicova et al. 2016). Oproti kolektivní migraci vykazují buňky migrující jednotlivě vyšší rychlost, ale zároveň také menší perzistenci pohybu, tedy častěji mění směr (Mayor and Etienne-Manneville 2016).

V této práci se zaměřuji na mesenchymální mód migrace jednotlivých buněk (*mesenchymal single cell migration mode*).

Migrace je obvykle zahájena v závislosti na signálu z vnějšího prostředí buňky. Tím může být např. gradient atraktantu, případně vazba na některý z proteinů ECM. Předpokladem pro úspěšnou migraci je ustanovení buněčné polarity. Polarizovaná buňka je schopná odlišně regulovat rozdílné děje na vedoucím okraji (*leading edge*) a na buněčné zádi (*cell rear*). Příkladem může být odlišná organizace aktinu, která vede k formování zesíleného aktinu a buněčné protruzivitě na vedoucím okraji buňky a tvorbě stresových vláken a neprotrudujících oblastí na buněčné zádi, podrobněji popsáno v kapitole 2.1. Dalším znakem polarizované buňky je umístění MTOC (mikrotubuly organizující centrum) a Golgiho aparátu ve směru migrace před jádro (Obr. 5). Ačkoliv přesný význam pozice MTOC není zcela objasněn, předpokládá se, že je to z důvodu usnadnění transportu vezikulů směrem k vedoucímu konci buňky (Watanabe, Noritake, and Kaibuchi 2005).



**Obr. 5: Vnitřní uspořádání polarizované migrující mesenchymální buňky.** Modrá šipka znázorňuje směr migrace. V přední části buňky lze pozorovat lamelipodium, filopodia a nově se tvořící fokální adheze. V oblasti před jádrem je viditelné mikrotubuly organizující centrum a Golgiho aparát. Červeně jsou pak znázorněna stresová vlákna – dorsální vlákna a transversální aktinové oblouky. (převzato z Mayor and Etienne-Manneville 2016)

Proces buněčné migrace lze rozdělit do čtyř po sobě navazujících kroků. Prvním krokem je protruze vedoucího okraje směrem kupředu. Následuje přichycení protruze k ECM. Dalším krokem je generování tažných sil, které posunují buňku blíže k nově vzniklé adhezi a k přednímu okraji buňky. Celý cyklus je ukončen uvolněním adhezí v zadním konci buňky a přitažení buněčného zadku (Lauffenburger and Horwitz 1996). Správná synchronizace zmíněných kroků je pro úspěšnou migraci nezbytná a každý z těchto kroků se za určitých okolností může stát limitujícím pro rychlost migrace (Gardel et al. 2010). Z hlediska signalizace je nutné, aby do přední a zadní části buňky přicházely odlišné signály. Například je potřeba, aby v přední části docházelo k tvorbě nových fokálních adhezí a v zadní části ve stejný čas k rozpadu starých fokálních adhezí.

Je zřejmé, že velmi důležitou úlohu během migrace hraje aktinový cytoskelet a proteiny s ním asociované. Polymerace a zesíťování aktinu na předním okraji buňky podmiňuje tvorbu protruzí, zatímco aktinová vlákna ve spolupráci s myozinem zajišťují kontraktilní tažné síly potřebné ke změně tvaru buňky a posunu buňky kupředu. Myozinem vyvolané tažné síly působící na nově vzniklé fokální adheze vedou ke stabilizaci FA (Folsom and Sakaguchi 1999; Grashoff et al. 2010).

Bylo zjištěno, že způsob, perzistence, rychlost a typ migrace se liší mezi různými typy buněk. Typické fibroblasty migrují způsobem pohybu, který by se dal popsat jako „přídalkovitý“ (tedy střídavá tvorba protruzí a následná kontrakce buněčného konce) a během migrace zaujímají vřetenovitý či kónický tvar (Maninova, Iwanicki, and Vomastek 2014). Jiné buňky, např. sarkomové buňky U2OS nebo rybí keratocyty, při migraci zaujímají tvar půlměsíce se širokým vedoucím okrajem a pohybují se méně „trhavým“ pohybem, tedy tvorba protruzí a přitahování buněčného konce probíhá kontinuálně (Li et al. 2017). Subjektivně se navíc zdá, že buňky U2OS migrují oproti fibroblastům více chaoticky a často mění směr migrace.

Je tak nasnadě hledat souvislost mezi způsobem organizace aktinu v buňce a typem buněčné migrace, resp. směrovaností, perzistencí a rychlostí migrace.

Nutno však také podotknout, že s pokrokem v zobrazovacích a kultivačních metodách je evidentní, že ne všechny migrující buňky zaujímají tvar a vnitřní uspořádání tak, jak je zde popsáno (Blanchoin et al. 2014).

Další otázkou je, do jaké míry je studium migrace ve 2D relevantní ve vztahu k buněčné migraci *in vivo*. V posledních letech je proto snaha o zavedení vhodného 3D modelu studia migrace buněk (Antoni et al. 2015; Khatau et al. 2012; Liu et al. 2016).

## **2.4 Signalizace ovlivňující tvorbu, resp. rozpad aktinu**

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, migrující buňky vyžadují k udržení polarizovaného charakteru odlišnou signalizaci v přední a zadní části buňky. Na základě odlišné signalizace se pak v různých částech buňky tvoří různé struktury a probíhají odlišné buněčné procesy (Chodniewicz and Klemke 2004).

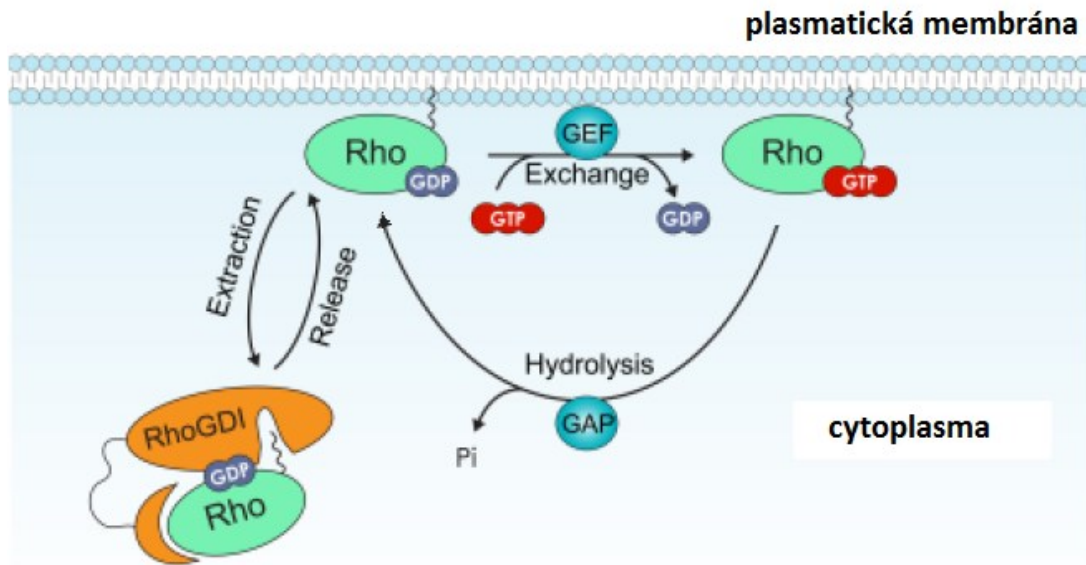
Zcela nepostradatelnými proteiny umožňujícími tuto prostorově specifickou signalizaci jsou proteiny z rodiny malých RhoGTPáz, které jsou podčleny superrodiny Ras proteinů. Skupina savčích RhoGTPáz čítá 20 členů (Boureux et al. 2007). Z nich skutečně dobře prostudované a podle všeho i fyziologicky nejvýznamnější jsou tři – Rac1, Cdc42 a RhoA.

### 2.4.1 Rho GTPázy

RhoGTPázy jsou malé proteiny o velikosti 20 až 40 kDa. Jejich aktivita je podmíněna přepínáním mezi aktivním stavem s navázaným GTP a neaktivním stavem s navázaným GDP. Vazba GTP způsobuje změnu konformace GTPázy a odhalení tzv. efektorové smyčky, která následně umožňuje interakce s efektorovými proteiny (Aspenstrom 1999). Záměna GDP za GTP je zajištěna pomocí proteinů GEFs (faktory zaměňující guaninové nukleotidy, *guanine nucleotide exchange factors*). Hydrolýzu GTP na GDP a fosfát pak spouští proteiny zvané GAPs (GTPázu aktivující proteiny, *GTPase activating proteins*) (Obr. 6) (Etienne-Manneville and Hall 2002).

Aktivované RhoGTPázy mají široký rozsah cílových proteinů, jež svou aktivitou ovlivňují. Konkrétně tři výše zmíněné GTPázy v součtu ovlivňují přes 60 různých efektorů (Etienne-Manneville and Hall 2002). Tím je zajištěna velká škála buněčných procesů a signálních drah, na něž má aktivace RhoGTPáz vliv. Bylo zdokumentováno, že RhoGTPázy se uplatňují především v regulaci buněčné adheze, organizace cytoskeletu a buněčné migrace, svou úlohu ale hrají např. i při apoptóze, proliferaci a v regulaci transkripce (Ridley et al. 2003).

Vliv na aktivitu RhoGTPáz má i jejich buněčná lokalizace. GTPáza Rac je prostřednictvím isoprenylovaného C-konce ukotvena do plasmatické membrány (Grande-Garcia, Echarri, and Del Pozo 2005). Stejně tak RhoA a Cdc42 podstupují posttranslační modifikaci C-konce, která určuje jejich membránovou lokalizaci (Garcia-Mata, Boulter, and Burridge 2011). Nicméně GTPáza RhoA může být sekvestrována v prostoru cytosolu vazbou na inhibitory disociace guaninového nukleotidu (*Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors* – RhoGDIs) (Obr. 6) a tím udržována v neaktivním stavu (Boulter et al. 2010; DerMardirossian and Bokoch 2005).



**Obr. 6: Schéma aktivace a deaktivace RhoGTPázy RhoA.** RhoGEF aktivuje RhoA prostřednictvím záměny GTP namísto GDP. RhoGAP zprostředkovává hydrolyzu GTP na GDP a fosfát a tím RhoA deaktivuje. RhoGDI se váže na neaktivní RhoA v cytoplasmě, brání tak její integraci do membrány, záměně nukleotidů a tím udržuje GTPázu v neaktivním stavu (převzato z Garcia-Mata, Boulter, and Burridge 2011- upraveno).

K aktivaci či inaktivaci RhoGTPáz dochází rozličnými mechanismy, nejčastěji v reakci na aktivaci receptorů spřažených s G-proteiny (*G-proteins coupled receptors* – GPCRs), po aktivaci tyrosin-kinázových receptorů (*receptor tyrosine kinase* - RTK) nebo po aktivaci integrinových receptorů, které nemají enzymovou aktivitu. Tyto typy receptorů bývají aktivovány na základě signálů z vnějšího prostředí buňky. Těmito signály mohou být vazba mitogenů (aktivace GPCRs), růstových faktorů nebo mechanické změny detekované prostřednictvím integrinů (aktivace RTKs) (Zachary and Rozengurt 1992).

Jak již bylo zmíněno, všechny tři výše zmíněné RhoGTPázy, tedy Rac1, Cdc42 i RhoA, hrají významnou roli především v regulaci organizace aktinu. Každá z nich se však uplatňuje při jiných procesech a v jiné části buňky.

K aktivaci GTPáz Rac1 a Cdc42 dochází především na vedoucím okraji migrujících buněk. Rac1 byla prokázána jako esenciální pro polymeraci aktinu na vedoucím okraji buňky, úspěšné formování lamelipodia, tvorbu protruzí a pohyb buňky kupředu. Dále je Rac1 důležitá i pro tvorbu fokálních komplexů v oblasti lamelipodia (Nobes and Hall 1999).



Cdc42 pak zajišťuje správnou tvorbu filopodií a fokálních komplexů a navíc má schopnost aktivovat Rac1. Tím je zajištěno časové a prostorové propojení formování lamelipodia a filopodií. Cdc42 dále hraje dominantní roli v ustavení migrační polariry a narušením funkce Cdc42 dochází zároveň k narušení morfologické polarizace buněk a směrované migrace (Etienne-Manneville and Hall 2002; Nobes and Hall 1995).

Rac1 a Cdc42 sdílí společnou skupinu efektorových proteinů z proteinové rodiny WASP/WAVE. Proteiny WASP/WAVE pak indukují aktivaci komplexu Arp2/3 a zahajují tak polymeraci aktinu na vedoucím okraji buňky (Pollitt and Insall 2009; Takenawa and Miki 2001). Cdc42 dále aktivuje např. protein mDia2 (*mammalian homolog of Diaphanous 2*), ze skupiny forminů, který spouští polymeraci aktinu a formování dlouhých aktinových svazků typicky se nacházejících právě ve filopodiích (Yang et al. 2007). A v neposlední řadě se Cdc42 prostřednictvím aktivace MRCK (*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase*) a fosforylace myosinu uplatňuje také v aktino-myosinové kontraktilitě (Wilkinson, Paterson, and Marshall 2005).

Naproti tomu GTPáza RhoA je aktivní spíše v zadní části buňky, kde má na starost tvorbu fokálních adhezí, stresových vláken a retrakci buněčného zadku. Jednou z hlavních úloh RhoA je regulace fosforylace a defosforylace myosinu a tím regulace kontraktility stresových vláken (ChrzanowskaWodnicka and Burridge 1996). Nicméně RhoA je aktivní i na vedoucí straně migrující buňky, kde společně s Rac1 a Cdc42 koordinuje dynamiku aktinového cytoskeletu (Machacek et al. 2009; Martin et al. 2016).

Jedním z efektorových proteinů RhoA na předním okraji buňky může být např. formin mDia1, který stimuluje nukleaci a následnou polymeraci aktinu (Watanabe et al. 1997) a mimo jiné spouští polymerizaci dorsálních stresových vláken z vedoucího okraje buňky směrem nad jádro (Hotulainen and Lappalainen 2006).

Významnými efektory RhoA jsou kinázy ROCKI a ROCKII (*Rho kinase I and II*). Jejich hlavními funkcemi jsou fosforylace lehkého myozinového řetězce (MLC – *myosin light chain*) a fosforylace MLC fosfatázy (MLCP – *myosin-light-chain phosphatase*). Fosforylací MLCP dochází k její inaktivaci, fosforylací MLC k jeho aktivaci. Oba tyto kroky tedy vedou ke zvýšení myozinové aktivity (Kimura et al. 1996). Kinázy ROCK dále spouští dráhy vedoucí k inhibici proteinů ADF/cofilin, jež rozrušují aktinová vlákna (Maekawa et al. 1999; Van Troys et al. 2008).

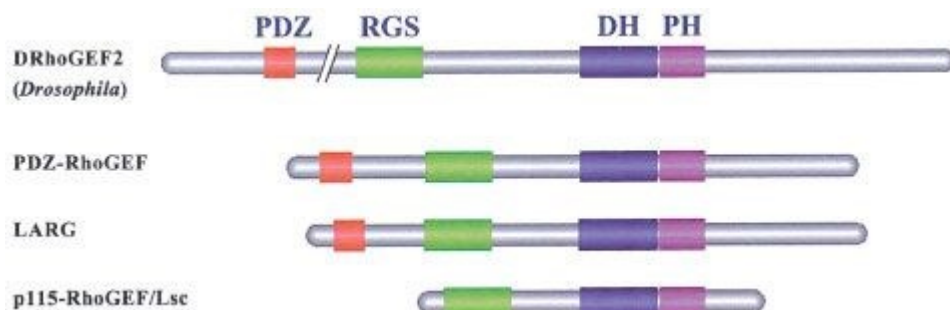
I přestože je obecně vžitá představa, že Cdc42 a Rac1 působí striktně v přední části buňky a RhoA se uplatňuje v zadní části, skutečnost je o poznání složitější. Tyto tři GTPázy nejen že vykazují překryvnou lokalizaci, ale navíc významně interagují i mezi sebou navzájem. Jak bylo zmíněno, GTPáza RhoA je v průběhu migrace aktivní i na přední straně buňky, kde je RhoA schopná inhibovat Rac1 (El-Sibai et al. 2008). Cdc42 může Rac1 naopak aktivovat (Machacek et al. 2009). Stejně tak Rac1 dokáže prostřednictvím aktivace p190RhoGAP inaktivovat RhoA (Bustos et al. 2008). Podle všeho se tedy zdá, že pro správné fungování je nezbytné i zcela přesné načasování aktivity každé z GTPáz. Při tvorbě protruzí ve fibroblastech bylo prokázáno, že počáteční fáze je koordinována GTPázou RhoA a teprve zhruba 40 sekund po iniciování tvorby protruze se v oblasti 2  $\mu\text{m}$  od okraje buňky aktivují GTPázy Rac1 a Cdc42. Ty pak zodpovídají za stabilizaci vzniklé protruze (Machacek et al. 2009).

Bylo prokázáno, že disbalance činností jednotlivých RhoGTPáz může vést k buněčné transformaci a vzniku rakovinného bujení (Stengel and Zheng 2011). Na druhou stranu správně zacílené narušení funkce některé z GTPáz či jejich efektorových proteinů může být úspěšně využito i jako tumor-supresivní terapie (McHardy et al. 2005; Patel et al. 2014).

#### **2.4.2 Signalizace vedoucí k aktivaci/deaktivaci RhoGTPáz, především RhoA**

Jak již bylo řečeno, aktivace RhoGTPáz je závislá na záměně GDP za GTP za pomoci RhoGEFs. Většina RhoGEFs obsahuje katalytickou DH (*Dbl homology*) doménu, jež umožňuje vyvázání GDP z cílové GTPázy, a pomocnou PH (*pleckstrin homology*) doménu, která navádí RhoGEF na membránu, kde je GTPáza umístěna (Obr. 7) (Goicoechea, Awadia, and Garcia-Mata 2014; Ma and Abrams 1999). Některé RhoGEFs aktivující GTPázu RhoA potřebují ke správné funkci homo- nebo heterooligomerizaci. Ta je zajištěna C-koncovou doménou zvanou RGS (*regulators of G-protein signaling*) nebo též RGS-like (RGL) doména (Obr. 7). Po odstranění této domény dochází k nárůstu aktivity RhoGEFs a tím ke zvýšené aktivitě RhoA. Přítomnost RGS domény byla prokázána u p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF a LARG. Skrze RGS doménu dokáží tyto proteiny přímo asociovat s  $\alpha$ -podjednotkami GPCRs  $G\alpha_{12}$  and  $G\alpha_{13}$  a tak představují přímé spojení mezi GPCRs a RhoA (Chikumi et al. 2004; Fukuhara, Chikumi, and Gutkind 2001). Další doménou

vyskytující se však pouze u PDZ-RhoGEF a LARG je doména PDZ (Obr. 7). Ta má mimo jiné za úkol vazbu na  $\alpha$ -podjednotku G proteinů ( $G_{12,13}$ ) a na cytoskelet (Harris and Lim 2001; Siehler 2009).



**Obr. 7: Doménové složení PDZ-RhoGEF, LARG a p115-RhoGEF, které aktivují RhoA, v porovnání s DRhoGEF2, který se vyskytuje u octomilek. U všech výše zmíněných můžeme pozorovat přítomnost katalytické DH domény, pomocné PH domény a RGS-like domény zodpovědné za oligomeraci. U LARG, PDZ-RhoGEF a DRhoGEF2 navíc nalézáme PDZ doménu, jež umožňuje vazbu na cytoskelet (převzato z Fukuhara, Chikumi, and Gutkind 2001).**

Aktivace nebo deaktivace jednotlivých RhoGEFs a RhoGAPs je nejčastěji spouštěna stimulací receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs), vazbou některého růstového faktoru na tyrosin-kinázové receptory (RTKs), případně skrze integriny iniciovanou signalizaci. Na základě každého z těchto podnětů se spouští tvorba celé řady signálních molekul. Každá z nich má obvykle schopnost aktivovat hned několik dalších proteinů a jiné zároveň zase deaktivovat. Jedná se tedy o nesmírně komplexní signalizační síť.

Co se týká regulace aktinového cytoskeletu, velmi významnou roli hraje právě signalizace na základě podnětů z ECM, která je buňkou zpracována integrinovými receptory. Integriny jako takové nedisponují katalytickou aktivitou, tedy další předání signálu je zajištěno tzv. s integriny asociovanými proteiny (Mitra and Schlaepfer 2006). Jedním z nejvýznamnějších zástupců těchto proteinů je kináza FAK (*focal adhesion kinase*, kináza fokálních adhezí).

K aktivaci FAK dochází její fosforylací na Tyr397. Tato fosforylace následně umožňuje nasedání kináz z rodiny Src, které FAK dále fosforylují a tím zvyšují její aktivitu (Lietha et al. 2007). Aktivní FAK poté reguluje mnoho buněčných procesů, z nichž jeden z nejdůležitějších je právě regulace buněčné migrace prostřednictvím malých RhoGTPáz (Iwanicki et al. 2008; Tilghman et al. 2005).

Kináza FAK ovlivňuje lokalizaci a aktivitu hned několika RhoGEFs a RhoGAPs. Velmi významná je aktivace p190A-RhoGAP, která vede k následné deaktivaci GTPázy RhoA (Roof et al. 1998). Za určitých okolností však kináza FAK může zvyšovat aktivitu p190-RhoGEF, PDZ-RhoGEF, p115-RhoGEF a LARG a tím naopak indukovat aktivitu RhoA (Chikumi et al. 2004; Dubash et al. 2007). Důležité je vždy správné načasování daného děje.

Hned dvěma způsoby FAK aktivuje GTPázu Rac1. Interakce s proteinem p130Cas umožňuje nasedání proteinu Crk, tvorbu komplexu p130Cas/Crk a prostřednictvím Dock180GEF aktivaci Rac1 (Premkumar et al. 2010). Druhou cestou je aktivace Rac1 prostřednictvím PI3 kinázy (Reiske et al. 1999).

Další významnou cestou aktivace RhoGTPáz při reorganizaci aktinového cytoskeletu je stimulace GPCRs prostřednictvím působení LPA (*lysophosphatidic acid*, kyselina lysofosfatidová). Touto cestou jsou aktivovány především GTPázy RhoA a Cdc42 (Etienne-Manneville and Hall 2002; Lee et al. 2008; Ren, Kiosses, and Schwartz 1999).

Růstové faktory pak přednostně aktivují RhoGTPázu Rac1 (Liu and Burridge 2000).

### 3 Cíle práce

Z dosavadních poznatků je zřejmé, že perinukleární actin cap, který se napojuje zároveň do fokálních adhezí a na apikální stranu jádra, hraje významnou roli při buněčné migraci. Konkrétní signální dráhy, jež se podílejí na tvorbě a rozpadu těchto perinukleárních vláken jsou však stále obestřeny řadou tajemství. Hlavními cíli této práce jsou:

- Stanovení vlivu přítomnosti perinukleárních aktinových vláken na rychlost a směrovanost buněčné migrace.
- Bližší objasnění způsobu napojení actin capu na jadernou obálku. Zejména se zaměřím na úlohu, jež během tohoto procesu hrají nespriny a lamin A/C.
- Odhalení hlavních signálních drah, které se podílí na tvorbě a rozpadu perinukleárního actin capu. Pozornost bude soustředěna především na
  - úlohu lysofosfatidové kyseliny (LPA) při tvorbě actin capu
  - roli kinázy fokálních adhezí (FAK) během rozkladu actin capu během buněčné polarizace
  - zastupitelnost jednotlivých RhoGEFs, jež aktivují GTPázu RhoA.

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Materiály

V experimentech týkajících se této práce byly použity níže uvedené materiály.

#### 4.1.1 Buněčné linie a kultury

| Buněčná linie                       | Popis buněčné linie   |
|-------------------------------------|---|
| BJ                                  | lidské fibroblasty  |
| HT1080                              | lidské fibrosarkomy   |
| HT1080<br>s inducibilním<br>CA-RhoA | lidské fibrosarkomy; buněčná linie obsahuje stabilně vnesený konstrukt umožňující na základě indukce doxycyklinem expresi konstitutivně aktivní GTPázy RhoA (CA-RhoA) |
| HS913T                              | lidské metastatické fibrosarkomy  |
| NIH/3T3                             | myší embryonální fibroblasty  |
| RAT2                                | potkaní fibroblasty   |
| Saos-2                              | lidské osteosarkomy   |
| U2OS                                | lidské osteosarkomy   |

#### 4.1.2 Seznam siRNA (syntetizováno firmou Eurogentec)

| siRNA           | Sekvence                            |
|-----------------|-------------------------------------|
| ctrl            | 5'- AGG UAG UGU AAU CGC CUU GTT -3' |
| FAK             | 5'- GCU AGU GAC GUA UGG AUG UTT -3' |
| lamin A/C       | 5'- GGU GGU GAC GAU CUG GGC UTT -3' |
| LARG RhoGEF (1) | 5'- GGA GGA AAG UUA CAC CCU U -3'   |
| LARG RhoGEF (2) | 5'- GGA CGG AGC UGU AAU UGC A -3'   |
| p115 RhoGEF (1) | 5'- GGG CUG AGC AGU AUC CUA G -3'   |
| p115 RhoGEF (2) | 5'- GCG ACU AAC CAA AGA CAA A -3'   |
| PDZ RhoGEF (1)  | 5'- CAU GAA AGC UGG UGU GAA A -3'   |
| PDZ RhoGEF (2)  | 5'- GGA GCU CAC CAU CAA GCU U -3'   |

#### 4.1.3 Seznam plasmidů

| Název plasmidu               | Popis   |
|------------------------------|---|
| GFP-KASH pEGFP.C1            | plasmid obsahující doménu KASH, značeno pomocí EGFP   |
| GFP-KASH $\Delta$ L pEGFP.C1 | plasmid obsahující doménu KASH zkrácenou o 23 AMK a tím postrádající SUN vazebné místo, značeno pomocí EGFP |
| CHD-GFP-KASH pEGFP.C1        | plasmid obsahující doménu KASH konjugovanou s CHD doménou, značeno pomocí EGFP                              |

#### 4.1.4 Seznam restrikčních enzymů

| Restrikční enzym | Výrobce             |
|------------------|---------------------|
| AgeI             | New England Biolabs |
| MfeI             | New England Biolabs |
| NheI             | New England Biolabs |
| HindIII          | TaKaRa              |

#### 4.1.5 Seznam primárních protilátek

| Protilátka           | Výrobce        | Původ  | Ředění IF | Ředění WB |
|----------------------|----------------|--------|-----------|-----------|
| FAK                  | Milipore       | myš    | ---       | 1:1000    |
| GFP                  | Exbio          | králík | ---       | 1:1000    |
| lamin A/C            | Cell Signaling | králík | 1:100     | 1:1000    |
| LARG (H-70)          | Santa Cruz     | králík | ---       | 1:500     |
| p115                 | Cell Signaling | králík | ---       | 1:1000    |
| PDZ                  | Invitrogen     | králík | ---       | 1:500     |
| phalloidin-rhodamine | Invitrogen     | ---    | 1:100     | ---       |
| RACK1                | Santa Cruz     | myš    | ---       | 1:1000    |

#### 4.1.6 Seznam sekundárních protilátek

| Protilátka                              | Výrobce           | Původ | Ředění  |
|---|-------------------|-------|---------|
| Sek. protilátka anti-myš konj. s HPR    | Sigma             | koza  | 1:10000 |
| Sek. protilátka anti-králík konj. s HPR | Sigma             | koza  | 1:5000  |
| Alexa488 anti-králík                    | Life Technologies | koza  | 1:100   |

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Kultivace buněk**

Všechny buněčné linie s výjimkou NIH/3T3 byly standardně kultivovány v DMEM (Gibco) médiu s 10% FBS (fetal bovine serum - Gibco) při teplotě 37°C a atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub>. Buňky NIH/3T3 byly kultivovány v DMEM médiu s 10% CS (calf serum - Gibco). Buňky byly pasážovány při konfluenci zhruba 80-90 %, obvykle jednou za 2-3 dny. Během pasáže jim bylo odsáto médium, poté byly opláchnuty 1xPBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10m Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.3) a ponechány 0,05% trypsinu (Life Technologies) v PBS do doby, kdy se odloučily od podkladu (zhruba 1-2 minuty). Poté byly naředěny čerstvým médiem vysety na novou misku.

### **4.2.2 Fixace buněk pomocí paraformaldehydu a následná permeabilizace**

Pro potřeby fluorescenční mikroskopie byly buňky kultivovány na sklíčkách ošetřených fibronectinem (Millipore; sklíčka byla inkubována po dobu 1 hodiny při 37°C v 1 µg/ml roztoku fibronectinu v PBS). Během samotné fixace byly buňky nejprve opláchnuty PBS temperovaným na 37°C a poté po dobu 25-30 minut fixovány pomocí 2% PFA v PBS o teplotě 37°C. Následně byly zafixované buňky permeabilizovány po dobu 4 minut pomocí 0,5% Tritonu-X100 (Sigma-Aldrich) v PBS a 2x10 minut promyty pomocí PBS.

### **4.2.3 Fluorescenční mikroskopie**

Permeabilizované buňky byly zablokovány pomocí 20% kozího séra v PBS po dobu 1h při pokojové teplotě, případně přes noc ve 4°C. Poté byly buňky inkubovány 1h s primární protilátkou v 5% kozím séru v PBS. Po promytí 3x10 minut byly buňky inkubovány se sekundární protilátkou, opět v 5% kozím séru. Phalloidin konjugovaný s rhodaminem byl k buňkám přidán zároveň se sekundární protilátkou. Po dobu inkubace, i po ní, byla sklíčka udržována ve tmě. Po skončení inkubace byly buňky opět 3x10 minut promyty v PBS, opláchnuty destilovanou vodou a celé sklíčko zafixováno do montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories) na podložní sklo. Snímky byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX43.



#### **4.2.4 Time-lapse mikroskopie za použití fázového kontrastu**

Buňky byly kultivovány na 6-jamkové destičce (TPP) ošetřené fibronektinem (1h při 37°C v 1 µg/ml roztoku fibronektinu v PBS). Snímky byly pořízeny na zobrazovací stanici Olympus Cell-R (invertovaný mikroskop Olympus IX71, iluminační zdroj NT20) při 37°C. Aby nedocházelo k vysychání média, bylo médium s buňkami převrstveno minerálním olejem (Sigma). Focení probíhalo tak, že jsem nejprve uložila 7 vhodných pozic z každé jamky a poté nastavila focení každé pozice s odstupem 7 minut po dobu 7 hodin (ve výsledku tedy 60 snímků každé pozice).

#### **4.2.5 Sběr lyzátů a příprava vzorků na SDS-PAGE**

Pro proteinovou elektroforézu byly použity buněčné lyzáty získané lyzací v RIPA pufru (50mM Tris-HCl o pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxycholát, 0,1% SDS, 1mM EDTA, pH=7.3, vše Sigma). Buňky byly nejprve opláchnuty chlazeným PBS o teplotě 4°C a poté na ledu lyzovány zhruba 1 minutu RIPA pufrům o teplotě 4°C. Na 6cm misku bylo použito 300 ul pufru, na jamku 6-jamkové destičky 150 ul. Zbytky buněk byly z podkladu seškrabány stěrkou a lyzáty přeneseny do zkumavky na led. Po dalších 20 minutách byly vzorky stočeny v chlazené centrifuze (14.000 g) a pipetou odebrán supernatant. Pomocí kitu Pierce BCA Protein Assay Kit (postupováno dle návodu výrobce) byla změřena koncentrace proteinů v lyzátech, ke vzorkům byl přidán Laemmli vzorkový pufr (50mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β-merkatoethanol, 12,5mM EDTA, 0,02% bromfenolová modř, vše Sigma) v poměru 4:1 (lyzát:pufr) a vzorky byly povařeny po dobu 10 minut při 100 °C.

#### **4.2.6 SDS-PAGE**

Proteiny z jednotlivých vzorků byly separovány podle velikosti na 10% akrylamidovém gelu (složení separačního a zaostřovacího gelu viz. tabulka níže) v elektroforetickém pufru (25mM Tris-Hcl, 192mM glycin, 0,1% SDS) při konstantním napětí. Všechny reagenty byly od firmy Sigma.

| <b>Zaostřovací gel 4% (4 ml)</b>  |             | <b>Separáční gel 10% (14 ml)</b>  |             |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------|
| 29% Akrylamid,<br>1% bisakrylamid | 530 $\mu$ l | 29% Akrylamid,<br>1% bisakrylamid | 4,6 ml      |
| 0.5M Tris pH 6.8                  | 1 ml        | 1.5M Tris pH 8.8                  | 3,5 ml      |
| 10% SDS                           | 40 $\mu$ l  | 10% SDS                           | 140 $\mu$ l |
| 10% APS                           | 40 $\mu$ l  | 10% APS                           | 140 $\mu$ l |
| TEMED                             | 5 $\mu$ l   | TEMED                             | 14 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O                  | 2,36 ml     | H <sub>2</sub> O                  | 5,7 ml      |

#### **4.2.7 Western blot a imunodetekce**

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE byly za užití aparatury pro western blot přeneseny na nitroceluózovou membránu (Sigma; velikost póru 0,45  $\mu$ m) v transferovém pufru (48mM Tris-HCl, 39mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% metanol, vše Sigma) po dobu 1 hodiny při konstantním proudu 360 mA. Membrány byly blokovány po dobu 1 hodiny v roztoku sušeného odtučněného mléka (5% mléko v PBS). Po proplachu v PBS + 0,05% Tween-20 byla membrána dle potřeb rozstřihána a přes noc inkubována s primární protilátkou v 5% BSA v PBS ve 4°C. Poté byla membrána promyta 3x 10 minut v PBS + 0,05% Tween-20 a po dobu 1h inkubována s příslušnou sekundární protilátkou (myší nebo králičí) konjugovanou s peroxidázou. Po dalším promytí 3x 10 minut v PBS + 0,05% Tween-20 byla provedena detekce signálu za užití kitu SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (postupováno dle návodu výrobce) na autoradiografické filmy. Vyvolání filmů bylo provedeno v temné komoře na přístroji Agfa Curix 60.

#### **4.2.8 Kalcium-fosfátová transfekce siRNA**

Snížení exprese genů pro FAK a lamin a/c bylo provedeno použitím kalcium-fosfátové transfekce. Buňky o konfluenci zhruba 70-80 % byly transfekovány námi připravenou transfekční směsí – do jedné zkumavky bylo odpipetováno 100  $\mu$ l 2x HEBS (274mM NaCl, 10mM KCl, 1,4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15mM D-glukóza, 42mM HEPES, pH 7,1), do druhé 10  $\mu$ l 2,5M CaCl<sub>2</sub> v 10 mM HEPES (pH 7,2), 96  $\mu$ l 1x TE (pH 7,2) a 4  $\mu$ l roztoku siRNA o koncentraci 20 pmol/ $\mu$ l (uvedené množství chemikálií platí pro jednu jamku 6-jamkové destičky).

Obsah druhé zkumavky byl postupně pomalu nakapán do první zkumavky a celý objem byl inkubován po dobu 20 minut při pokojové teplotě pro vytvoření komplexů. Poté byl roztok přikapán do čerstvého média k buňkám na 6-jamkové destičce. Po 6 hodinách byla transfekční směs odmyta za pomoci PBS a k buňkám přidáno čerstvé médium. Účinek siRNA byl stanoven 24-48 hodin po transfekci.

#### 4.2.9 Transfekce DNA vektorů

DNA vektory byly do buněk vneseny za užití reagentie Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Postupováno bylo dle pokynů výrobce. Po 12ti hodinách od transfekce bylo médium s transfekční směsí odsáto, buňky opláchnuty v PBS a přidáno čerstvé médium. Plasmidová DNA byla připravena pomocí kitu QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen) dle doporučeného návodu.

#### 4.2.10 Práce s DNA – PCR, restrikce, ligace

K amplifikaci DNA pomocí PCR byl použit přístroj Minicycler MJ Research. Použitý cyklus odpovídal tabulce níže. Polymerázové reakce probíhaly vždy v objemu 50  $\mu$ l (2x0,3mM DNA primer, Pfu pufr s MgSO<sub>4</sub> [Jena Biosciences], 20 $\mu$ M dNTP [Fermentas], 1  $\mu$ g/ $\mu$ l templátové DNA, 0,5 $\mu$ l Pfu-X DNA polymerázy [Jena Biosciences]).

| PCR program        |         |                       |
|--------------------|---------|-----------------------|
| Č. kroku           | Teplota | Čas                   |
| 1. krok            | 95°C    | 1.5 min               |
| 2. krok (35 cyklů) | 95°C    | 0.5 min               |
|                    | 60°C    | 1 min                 |
|                    | 72°C    | 1 min (pro 1 kbp DNA) |
| 3. krok            | 72°C    | 10 min                |
| 4. krok            | 4°C     | (konec PCR)           |

Restrikce DNA probíhala 2 hodiny při pokojové teplotě podle doporučení výrobce restrikáz (New England Biolabs). Při použití dvou restrikáz současně byly restrikční podmínky optimalizovány na základě stránek výrobce.

K ligaci DNA byla použita T4 DNA ligáza (Thermo scientific) a postupováno bylo dle návodu výrobce. Ligace probíhala přes noc při pokojové teplotě.

#### **4.2.11 Agarózová DNA elektroforéza + extrakce DNA z gelu**

Složení agarózového gelu je následující: prášková agaróza (Lonza) v Tris-acetátovém pufru (TAE; 40mM Tris, 20mM kys. octová, 1mM EDTA), 0,05 µg/ml ethidium bromid. Obvykle byl používán 1% agarózový gel. Vodný roztok DNA byl smíchán s nanášecím puftrem (Thermoscientific) v poměru 1:6 (pufr : objem DNA). Elektroforéza probíhala v TAE pufru při konstantním napětí 80V.

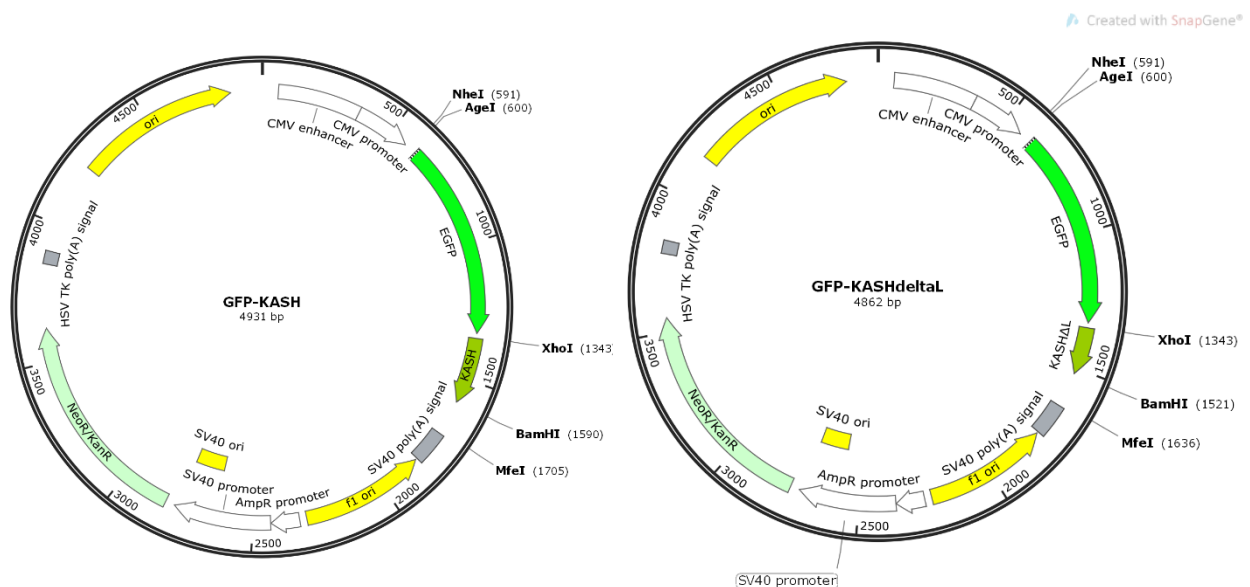
Extrakce námi žádaného fragmentu probíhala tak, že jsem pod UV lampou nejprve rychle nafotila gel a označila pomocí skalpelu oblast obsahující náš fragment. Tuto oblast jsem pak vyřízla a DNA v ní obsaženou jsem z gelu vyextrahovala pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) dle návodu výrobce. DNA byla na závěr eluována do destilované vody.

#### **4.2.12 Replikace plasmidu v kompetentních bakteriích + izolace DNA**

Námi připravený plasmid byl vnesen do kompetentních buněk *E. coli* (kmen DH5α) metodou tepelného šoku. Kultivace bakterií DH5α a následná izolace plasmidové DNA byla provedena dle pokynů výrobce QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen). Ve finálním kroku izolace byla DNA eluována destilovanou vodou.

### 4.2.13 Příprava CHD-GFP-KASH konstruktů

Plazmidy GFP-KASH a GFP-KASH $\Delta$ L připravila již dříve moje kolegyně Miloslava Maninová (Maninova et al. 2013). Plazmidy exprimují zelený fluorescenční protein (GFP) fúzaný na C-konci s KASH doménou nesprinu-2 (GFP-KASH), respektive KASH doménou s chybějící částí zodpovědnou za interakci s proteiny SUN (GFP-KASH $\Delta$ L). Plazmidové mapy obou konstruktů jsou níže.



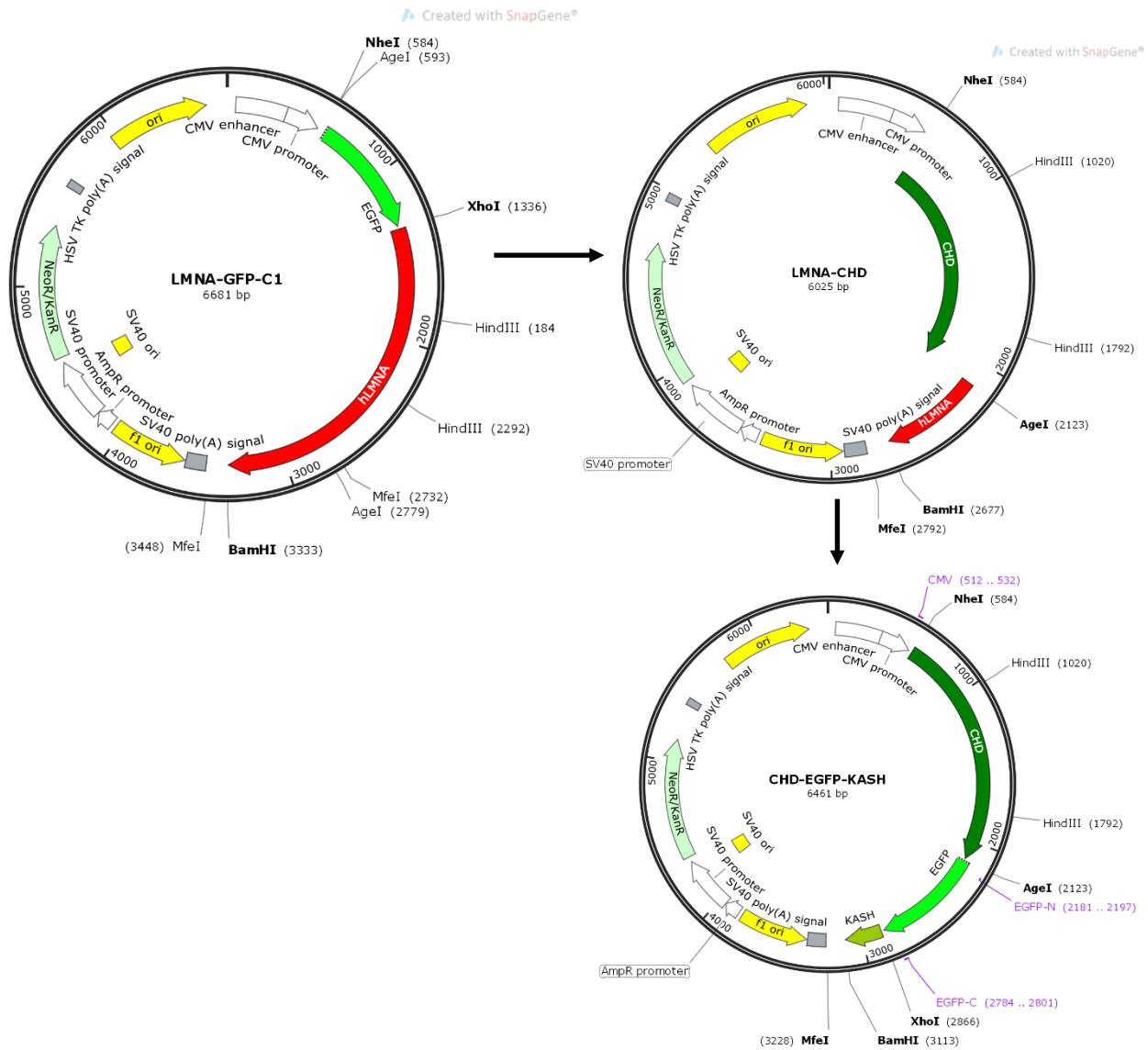
Doména CHD byla získána PCR amplifikací z cDNA knihovny získané z HeLa buněk (Maninova et al. 2013) pomocí primerů

CHD-F 5' aaaaagctagctccatcgagtc aaagaatggcatctagtctgagcttc 3'

CHD-R 5' accggtttc caaatatccaattttgatttca 3'

Po opakovaných nezdařilých pokusech zaklonovat získanou doménu CHD do GFP-KASH plazmidu napřímo pomocí restriktáz NheI a AgeI jsem zvolila postup nejprve zaklonovat CHD doménu do jiného v laboratoři dostupného plazmidu LMNA-GFP-C1 a to pomocí restriktáz AgeI a NheI. Úspěšné zaklonování CHD do vektoru bylo ověřeno restrikcí pomocí HindIII a detekcí na agarózovém gelu. Byla potvrzena přítomnost fragmentů velikosti 772 a 5253 bp.

Následně jsem z plazmidu GFP-KASH pomocí restriktáz MfeI a AgeI vyštěpila fragment GFP-KASH. Tento fragment byl pak užitím stejných restriktáz vložen do plazmidu LMNA-CHD. Produktem je plazmid CHD-GFP-KASH. Zaklonování fragmentu GFP-KASH bylo potvrzeno sekvenací z primerů CMV, EGFP-N a EGFP-C (provedla externí firma). Celý postup znázorněn níže.



## 5 Výsledky

### 5.1 Actin cap - jeho funkce v buňkách a struktura napojení na jádro

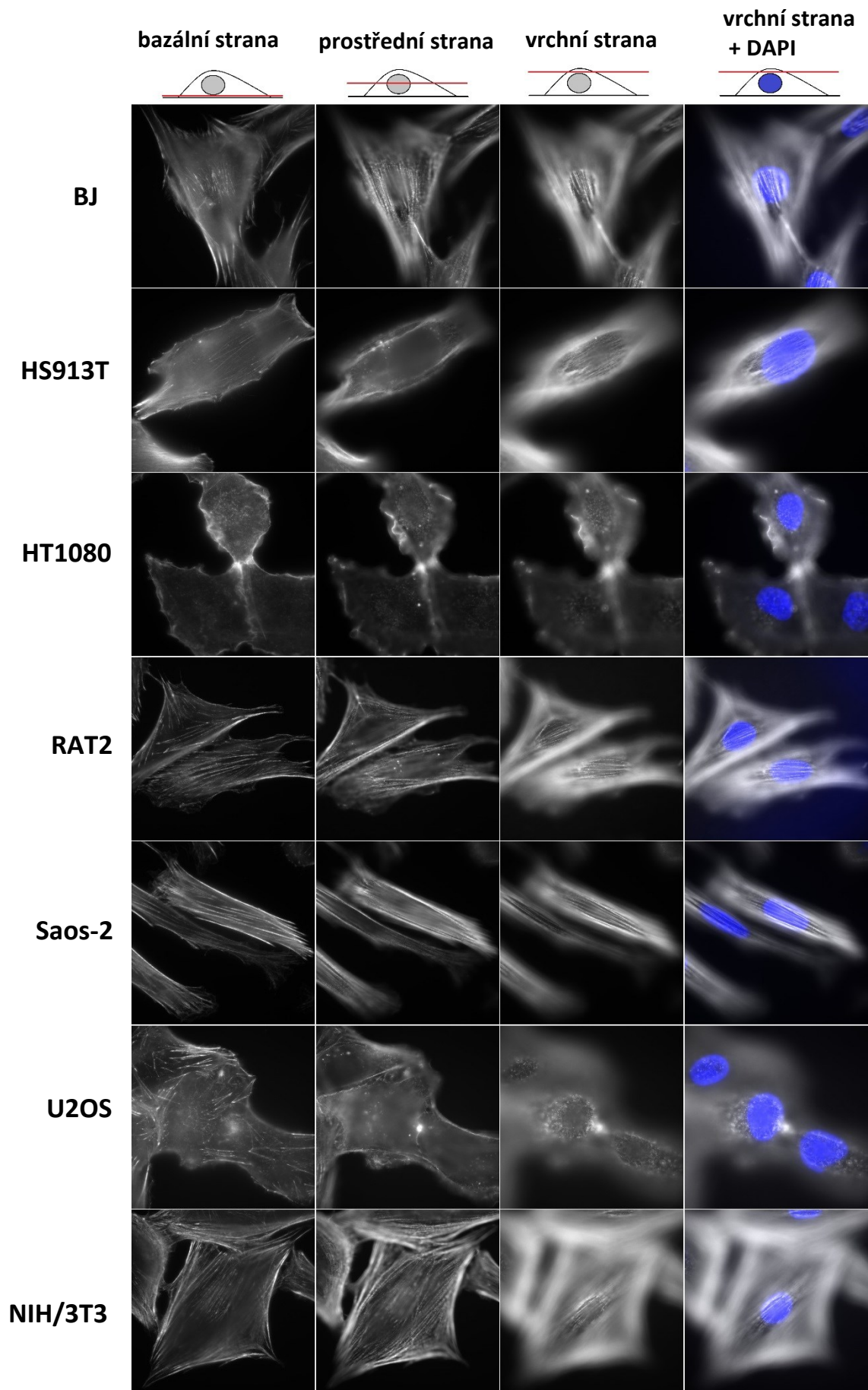
Perinukleární actin cap hraje v buňce pravděpodobně hned několik rolí, ať už je to deformace jádra, jeho reorientace během buněčné polarizace nebo převod signálu z ECM do jádra (Maninova and Vomastek 2016). Obecným cílem této práce bylo objasnit, jaký vliv má přítomnost actin capu na způsob migrace, a zároveň blíže charakterizovat způsob a strukturu napojení těchto aktinových vláken na jaderný obal.

#### 5.1.1 Porovnání různých buněčných typů - přítomnost x nepřítomnost actin capu

Jak již bylo zmíněno, actin cap není přítomen ve všech buněčných liniích. Jako první krok jsem se proto rozhodla zjistit, v jakých dostupných liniích mezenchymálního původu jsou perinukleární aktinová vlákna přítomná. Buňky kultivované na sklíčkách ošetřených fibronectinem byly zafixovány pomocí paraformaldehydu, obarveny fluorescenčně značeným phalloidinem a zafixovány do montovacího média VectaShield s obsahem DAPI.

Pozorovali jsme, že nejvyšší zastoupení actin capu vykazují buněčné linie Saos-2 (lidské osteosarkomy), RAT2 (potkaní fibroblasty), BJ (lidské fibroblasty) a NIH-3T3 (myší embryonální fibroblasty). Naopak v buňkách HT1080 (lidské fibrosarkomy) a U2OS (lidské osteosarkomy) actin cap pozorován nebyl (Obr. 8).

Z těchto výsledků vyplývá, že přítomnost actin capu nesouvisí nutně s původem buněčné linie. Příkladem může být porovnání linií U2OS a Saos-2. Ačkoliv jsou obě linie osteosarkomové, v Saos-2 je actin cap téměř vždy ukázkově přítomen, zatímco U2OS jsme pro další experimenty zvolili jako typický příklad buněk, v nichž se actin cap standardně téměř nevyskytuje.





**Obr. 8 (viz. předchozí strana): Porovnání přítomnosti actin capu napříč buněčnými liniemi.** V prvních 3 sloupcích nafocen ve třech fokálních rovinách aktin barvený pomocí phalloidin-rhodaminu, v posledním sloupci je vrchní fokální rovina zobrazená s jádrem (barveno pomocí DAPI). Fokální hladina byla měněna manuálně, jelikož mikroskop nedisponoval motorizovaným posunem stolku. Z tohoto důvodu nebylo možné zaznamenat přesné z-hodnoty a jednotlivé fokální hladiny jsou orientačně označovány jako bazální strana (spodní strana buňky přilehlá k substrátu), prostřední strana a vrchní strana (fokální hladina zobrazující oblast nad jádrem).

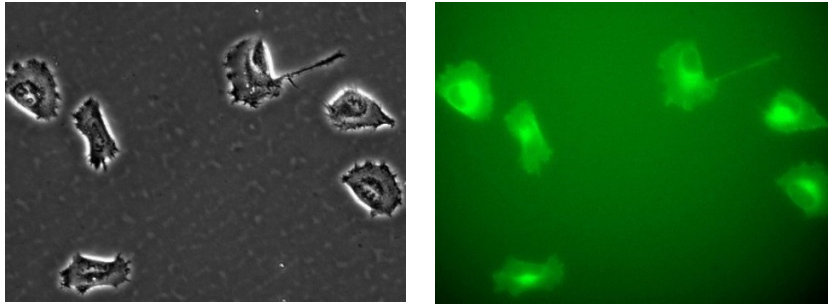
### 5.1.2 Migrační mód buněk v závislosti na přítomnosti actin capu

Následně jsme stanovili, zda přítomnost actin capu koreluje s migračním potenciálem buněčných linií – pro tyto studie byly použity linie RAT2, Saos-2 a NIH-3T3, u kterých je actin cap přítomen, a linie U2OS, u které se actin cap běžně nevyskytuje.

Jako další modelová linie pak byla použita buněčná linie HT1080, která obsahuje stabilně vnesený gen kódující konstitutivně aktivní verzi malé GTPázy RhoA (CA-RhoA) fúzovanou s GFP (tato linie byla laskavě poskytnuta z laboratoře doc. Jana Brábka, PŘF UK). Exprese tohoto genu je řízena z inducibilního promotoru, který je aktivován přidáním doxycyklinu (Dox). Buňky HT1080 za standardních podmínek actin cap nevytváří, nicméně přidání doxycyklinu a exprese CA-RhoA indukuje tvorbu actin capu (podrobněji v kapitole 5.2.1).

Buňky kultivované na fibronektinem ošetřené 6-jamkové destičce byly sledovány pomocí časosběrné mikroskopie na mikroskopu Olympus CellR (7 uložených pozic z každé jamky) po dobu 7 hodin. Trajektorie jednotlivých buněk byla sledována v programu Fiji za užití pluginu Manual tracking (<https://fiji.sc/>) a získaný soubor pozic byl zpracován programem Chemotaxis and Migration Tool (<https://ibidi.com/chemotaxis-analysis/171-chemotaxis-and-migration-tool.html>).

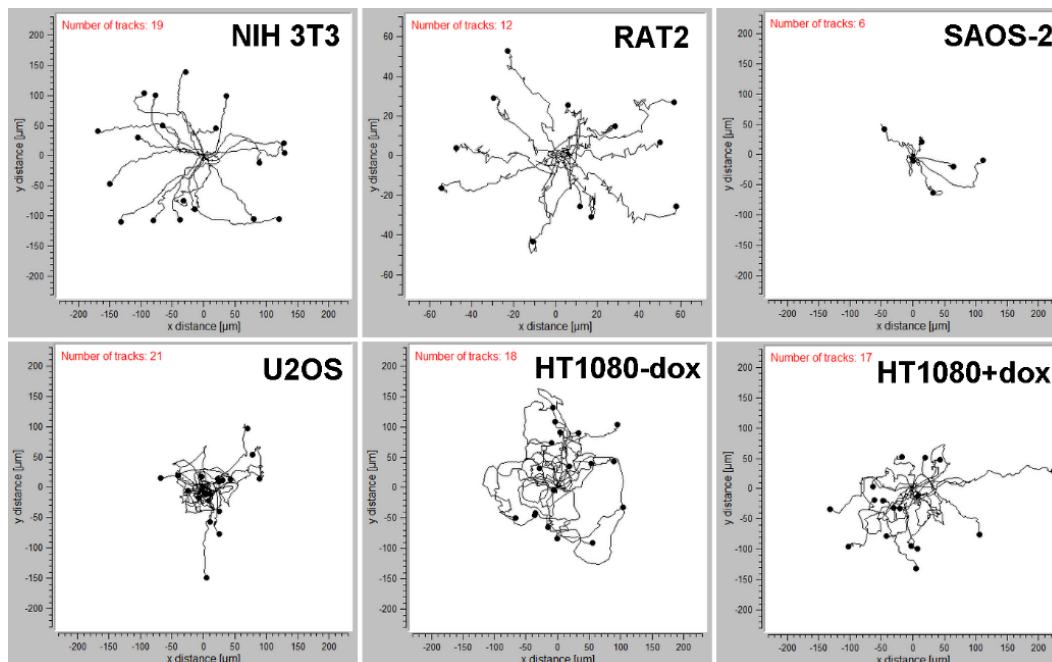
Buňky HT1080 v jedné z jamek byly inkubovány s doxycyklinem, aby byla indukována exprese GFP-CA-RhoA. Exprese CA-RhoA (značený pomocí GFP) byla potvrzena pomocí fluorescenční mikroskopie (Obr. 9)



**Obr. 9:** *Ověření exprese CA RhoA-GFP v HT1080 indukovaných doxycyklinem. Levý panel ukazuje buňky ve fázovém kontrastu, panel vpravo pak GFP signál potvrzující expresi CA RhoA-GFP.*

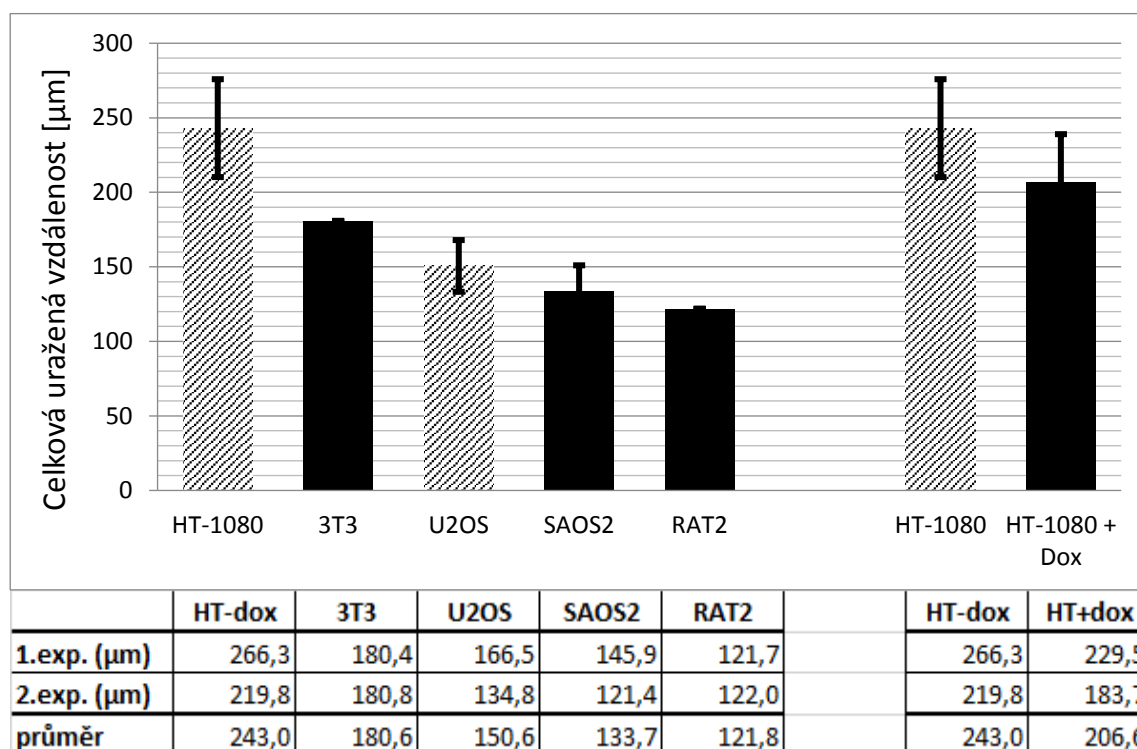
Celý experiment byl proveden ve dvou nezávislých opakováních. Celkem bylo sledováno 26 buněk RAT2 (12 v prvním měření, 14 ve druhém), 18 buněk Saos-2 (6 +12), 45 buněk U2OS (21+24), 43 buněk NIH-3T3 (19+24), 34 buněk HT1080 bez indukce doxycyklinem (18+16) a 28 buněk (17+11) HT1080 exprimujících CA-RhoA - indukováno doxycyklinem.

Příklady trajektorií jednotlivých buněk jsou ukázány na Obr. 10. Z těchto obrázků je zřejmé, že jednotlivé buněčné linie se liší ve dvou parametrech buněčné migrace. Buněčné linie vykazují odlišnou rychlost migrace a směrovanost (perzistenci) pohybu, neboli schopnost se pohybovat beze změny směru.



**Obr. 10:** *Grafy znázorňující trajektorie jednotlivých buněk různých buněčných linií. V grafu ukazujícím trajektorie buněk RAT2 bylo upraveno měřítko z důvodu malé vzdálenosti jejich migrace. Pro přehlednost jsou uvedeny trajektorie buněk pouze z prvního experimentu.*

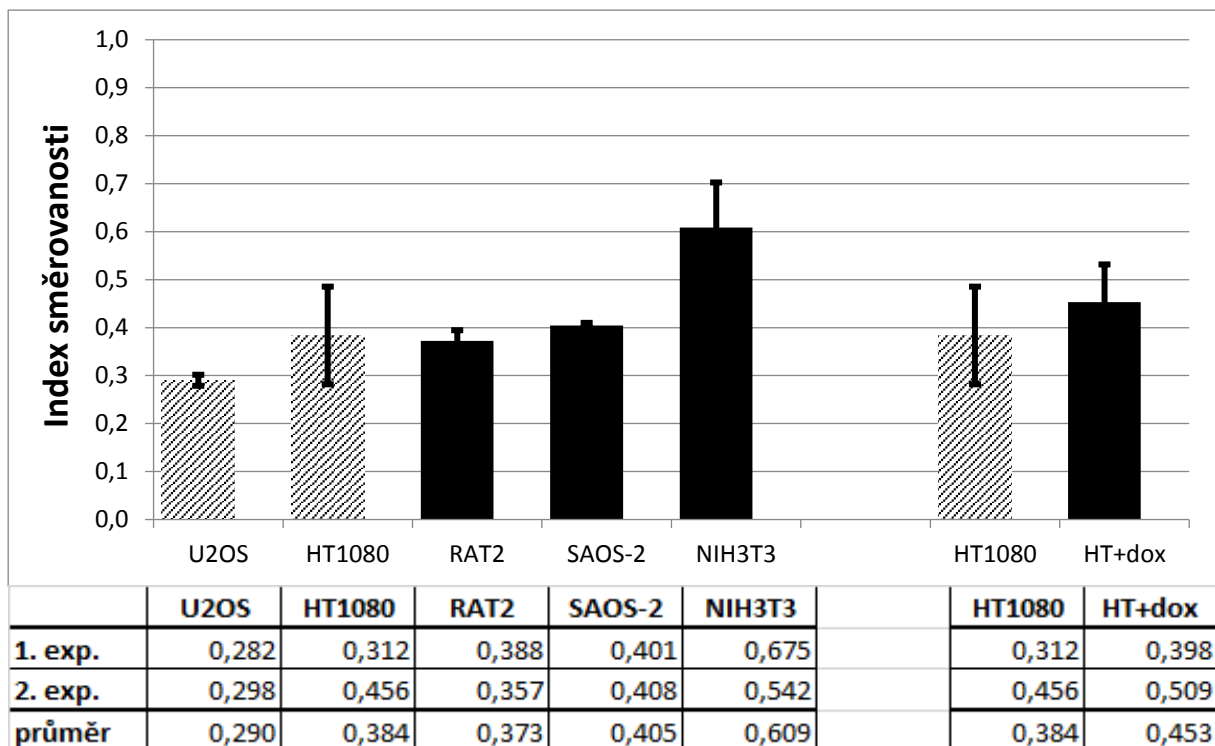
Pro kvantifikaci rychlosti migrace jsem stanovila celkovou vzdálenost, kterou buňky urazily za daný časový úsek (Obr. 11).



**Obr. 11: Porovnání celkové uražené vzdálenosti buněk jednotlivých linií.** V levé části grafu jsou buněčné linie seřazené sestupně dle umigrované vzdálenosti. V pravé části grafu separátně porovnání linie HT1080 a HT1080 s indukovaným CA-RhoA (značena jako HT+dox). Sloupce reprezentující buněčné linie mající actin cap jsou označeny černou barvou, sloupce reprezentující buněčné linie bez actin capu jsou označeny šrafovaně. Do grafu byla pro každou buněčnou linii vynášena průměrná hodnota umigrované vzdálenosti (v µm) získaná ze dvou nezávislých experimentů a příslušná směrodatná odchylka.

Změřená rychlost migrace naznačuje, že přítomnost actin capu nekoreluje s rychlostí migrace. Actin cap je přítomen jak v rychle se pohybujících buňkách (NIH3T3), tak i v buňkách s nízkou migrací (RAT2, Saos-2).

Pro kvantifikaci směrovanosti pohybu jsem stanovila index perzistentní migrace, kdy byla vzdálenost přímo spojující počáteční a konečný bod migrace vydělena vzdáleností, kterou buňka skutečně umigrovala (Obr. 12). V tomto typu kvantifikace hodnota blízká se 1 ukazuje na velkou perzistenci a směrovaný pohyb, s minimálními změnami směru pohybu. Hodnota blízká se 0 pak ukazuje, že buňky se pohybují spíše náhodně s častými změnami směru.



**Obr. 12: Porovnání směrovanosti migrace jednotlivých zkoumaných buněčných linií.** V levé části grafu jednotlivé linie řazené dle přítomnosti (sloupce značeny černě) nebo nepřítomnosti (sloupce značeny šrafovaně) actin capu. V pravé části separátně porovnání buněk linie HT1080 a HT1080 s indukovaným CA-RhoA (značeny jako HT+dox). Do grafu byla pro každou buněčnou linii vynášena průměrná hodnota indexu směrovanosti získaná ze dvou nezávislých experimentů a příslušná směrodatná odchylka.

Dle našich výsledků se zdá, že buňky s actin capem vykazují směrovanější typ migrace. Naopak buňky bez capu se více „točily v kruzích“ a směr migrace častěji měnily (Obr. 10 a Obr. 12). Pro srovnání buňky 3T3 (s actin capem) vykazovaly při obou měření zhruba dvojnásobnou míru indexu směrovanosti migrace oproti buňkám U2OS (bez capu). Index směrovanosti migrace buněk NIH3T3 se pohybuje okolo hodnoty 0,6, což znamená, že skutečná trajektorie NIH3T3 buněk je pouze 1,7x delší než ideální trajektorie přímo spojující počáteční a konečný bod migrace. Buňky U2OS pak vykazovaly 3,5x delší trajektorii.

V některých případech je tento jev i statisticky průkazný, např. v případě srovnání NIH3T3 a HT1080 a U2OS ( $p=2,4E-08$ , respektive  $p=8,6E-09$ , dvouvýběrový nepárový t-test) a v některých případech je na hranici statistické významnosti (RAT2-U2OS,  $p=0,052$ ). Toto je pravděpodobně způsobeno malým počtem naměřených dat, kdy např. pro Saos-2 se podařilo naměřit trajektorie pouhých 18 buněk.

Zajímavé zjištění přineslo srovnání buněk HT1080 a HT1080, u nichž byla indukována tvorba actin capu pomocí doxycyklinu a exprese konstitutivně aktivního RhoA. Buňky s CA-RhoA migrovaly více směrovaně ve srovnání s neošetřenými buňkami HT1080, i když rozdíly opět nebyly statisticky významné ( $p=0,14$ ). Je zřejmé, že tyto experimenty bude nutné ještě několikrát zopakovat pro získání většího souboru dat.

### 5.1.3 Vliv snížené exprese laminu A/C na tvorbu actin capu

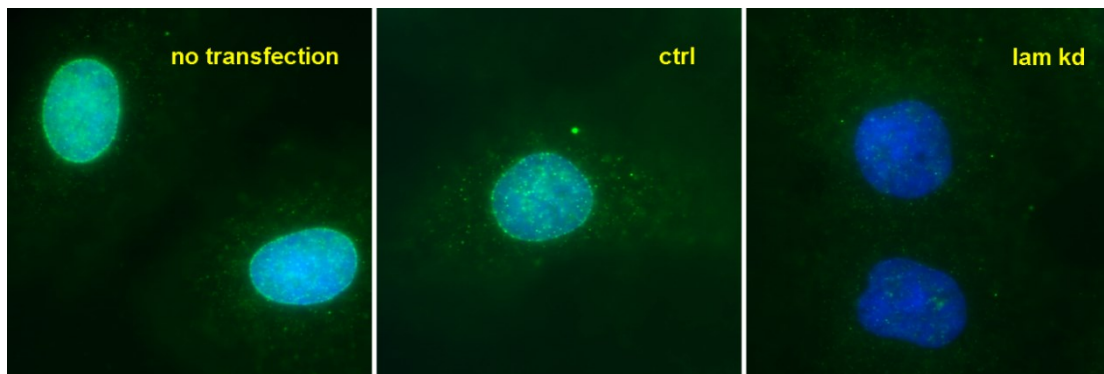
Lamin A/C se přímo váže na LINC komplex. Dá se tedy očekávat, že absence či narušení funkce laminu A/C povede zároveň k narušení správné funkce LINC komplexu, tedy k poškození propojení mezi cytoskeletem a jádrem.

Jelikož rozrušení LINC komplexu má za následek i neschopnost buněk si vytvořit actin cap (Lombardi et al. 2011), předpokládali jsme, že deplece laminu A/C by mohla mít podobný následek.

K ověření této teorie jsem využila snížení exprese laminu A/C v buňkách RAT2 pomocí siRNA. siRNA proti laminu A/C byla vnesena do buněk prostřednictvím kalcium-fosfátové transfekce. Redukci množství laminu A/C jsem se nejprve snažila potvrdit pomocí western blotu. Bohužel použitá protilátka se zdá být při použití na western blot nefunkční. Snížení exprese bylo tedy nakonec prokázáno pomocí imunofluorescenční mikroskopie (Obr. 13).

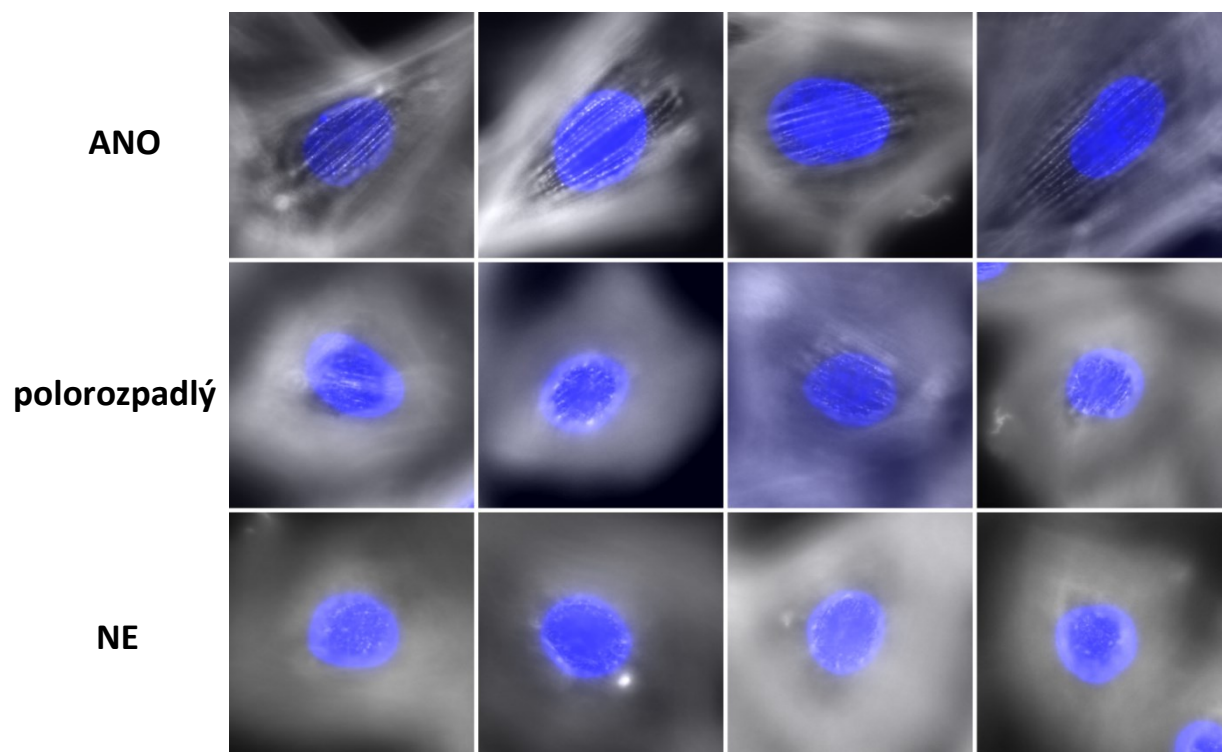
Buňky byly fixovány 36h po transfekci siRNA. Lamin A/C byl barven pomocí králičí protilátky rozeznávající lamin A/C a sekundární protilátky Alexa488. Dále byl vizualizován aktin pomocí phalloidin-rhodaminu a jádro pomocí DAPI. Jako kontrola byly použity buňky zcela netransfekované a buňky transfekované kontrolní siRNA.

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie se podařilo potvrdit, že siRNA výrazně snižuje hladinu laminu A/C (Obr. 13). Nikdy nicméně nedošlo k dokonalému odstranění laminu A/C. Dokonce i po dvojité transfekci bylo malé residuální množství laminu přítomno.



**Obr. 13: Snížení exprese laminu A/C v buněčné linii RAT2 po dvojité kalciumfosfátové transfekci siRNA cílící na lamin A/C. Modře je pomocí DAPI značené jádro, zeleně lamin A/C (použita primární protilátka proti laminu a/c + sekundární protilátka Alexa 488).**

Během kvantifikace přítomnosti actin capu byly jednotlivé buňky zařazeny do jedné ze 3 skupin – buňky s dokonale vytvořeným actin capem, buňky, které jej měly částečně rozpadlý a buňky zcela bez capu (Chambliss et al. 2013; Maninova and Vomastek 2016). Příklady jednotlivých forem actin capu jsou uvedeny na Obr. 14. Stejný způsob kvantifikace byl použit i u několika dalších níže uvedených experimentů.

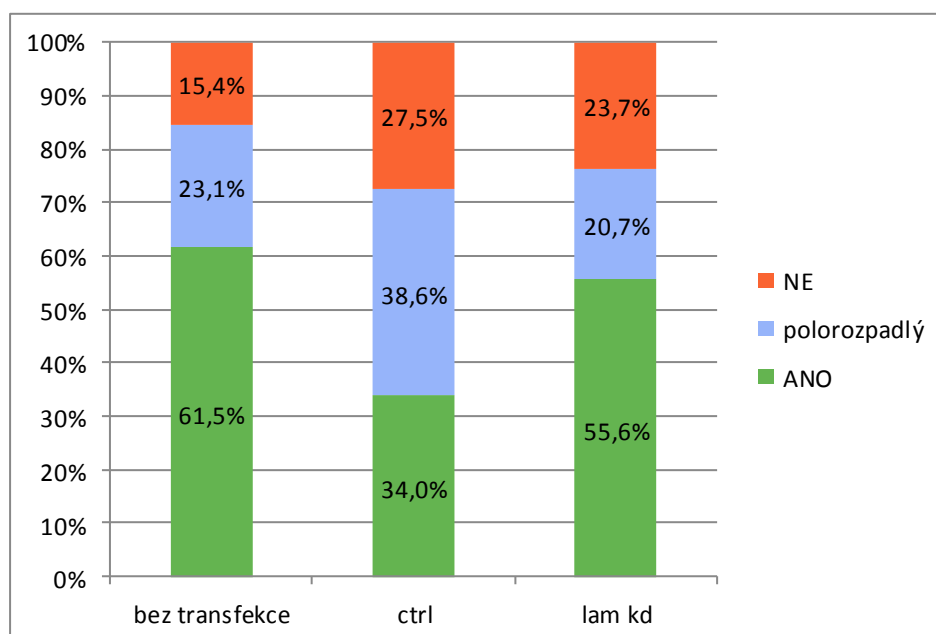


**Obr. 14: Příklady buněk s dokonale vytvořeným actin capem (první řada), buněk s polorozpadlým actin capem (prostřední řada) a buněk zcela bez actin capu (spodní řada). Zobrazena je fokální hladina na svrchní straně jádra (barveného pomocí DAPI, modrá barva). Aktinová vlákna jsou značena bíle.**

Experiment byl jednou zopakován s tím rozdílem, že při opakování bylo pro zvýšení účinnosti využito dvojité transfekce siRNA, kdy druhá transfekce proběhla 36 hodin po první transfekci. Celkem bylo vyhodnoceno 65 buněk netransfekovaných, 153 transfekovaných kontrolní siRNA a 169 transfekovaných laminovou siRNA.

Navzdory našemu očekávání se zdá, že buňky se sníženou expresí laminu A/C (Obr. 15; lam kd) vykazují minimální rozdíly v přítomnosti actin capu vůči netransfekovaným buňkám (Obr. 15; bez transfekce).

Poněkud překvapivé je zjištění, že buňky transfekované kontrolní siRNA (Obr. 15; ctrl) vykazují nejvyšší úbytek perinukleárních aktinových vláken oproti buňkám netransfekovaným nebo buňkám transfekovaným siRNA proti laminu A/C. Toto naznačuje, že námi používaná kontrolní siRNA má nechtěný vedlejší účinek, který se projevuje na struktuře actin capu (detaily v diskuzi, kapitola 6.2).



**Obr. 15: Podíl buněk obsahujících actin cap v populaci buněk RAT2 po snížení exprese laminu A/C.** Ukázány jsou výsledky z experimentu, kde byly buňky transfekovány dvakrát za sebou siRNA proti laminu A/C pro efektivní snížení jeho exprese. Zelené sloupce znázorňují frakci buněk s dokonale vytvořeným actin capem (ANO), modré sloupce znázorňují frakci buněk s narušeným actin capem (polorozpadlý) a oranžové sloupce frakci buněk bez actin capu (NE).

### 5.1.4 Úloha aktin-vazebné domény CHD při tvorbě actin capu v buňkách

Interakce cytoskeletu s jadernou laminou může být zprostředkována proteiny z rodiny nesprinů, které jsou zakotveny ve vnější membráně jaderného obalu. Bylo popsáno, že cytosolická N-koncová doména nesprinu může zajišťovat propojení s cytoskeletem (Rajgor and Shanahan 2013). Na druhé straně, C-koncová doména KASH, nacházející se v prostoru mezi vnitřní a vnější membránou jaderného obalu, hraje zásadní roli při asociaci s proteiny SUN, které asociují s jadernou laminou (Lombardi et al. 2011). Heterodimer nesprin-SUN tak vytváří můstek, který spojuje cytoskelet na cytoplasmatické straně jaderného obalu s jadernou laminou přítomnou na jaderné straně jaderného obalu.

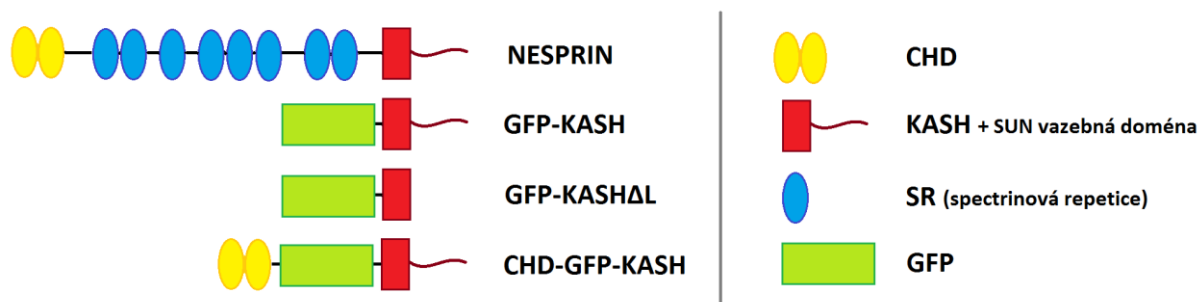
Rozrušení heterodimeru nesprin-SUN lze dosáhnout expresí KASH domény. Pokud je samostatná KASH doména exprimována v nadbytku, může asociovat s proteiny SUN a vytlačit endogenní nesprin z tohoto dimeru. Tím dochází k rozrušení komplexu LINC, jelikož samotná KASH doména není schopná vazby cytoskeletu a znemožňuje tím jeho propojení s jádrem.

Pro rozrušení LINC komplexu je v laboratoři používán plazmid, který kóduje KASH transmembránovou doménu zajišťující lokalizaci do vnější membrány jaderného obalu ve fúzi s GFP (Obr. 16 a Obr. 17). Tento konstrukt se nazývá GFP-KASH. Bylo ukázáno, že exprese GFP-KASH blokuje tvorbu actin capu v polarizujících buňkách (Maninova and Vomastek 2016). Jako negativní kontrola je používán konstrukt GFP-KASH $\Delta$ L, který je oproti GFP-KASH zkrácen o 23 aminokyselin a postrádá SUN-vazebnou doménu (Obr. 16). Integruje se tedy úspěšně do vnější jaderné membrány, ale neinteraguje ani se SUN, ani s aktinem.

Domnívali jsme se, že napojení actin capu k nesprinu by mohlo být způsobeno vazbou aktinu k doméně homologní s calponinem (*calponin homology domain*, CHD doména), která se vyskytuje na N-konci nesprinů-1 a -2 (Obr. 16). Pro ověření významu CHD domény při vazbě na aktin jsem připravila konstrukt „mininesprin“ CHD-GFP-KASH, který obsahoval doménu KASH a CHD doménu fúzovanou s GFP (Obr. 16). Ten by měl být schopný jak vazby proteinů SUN, tak aktinu, a tedy by měl znovu obnovit propojení aktin-jádro a potažmo tvorbu actin capu v buňkách.

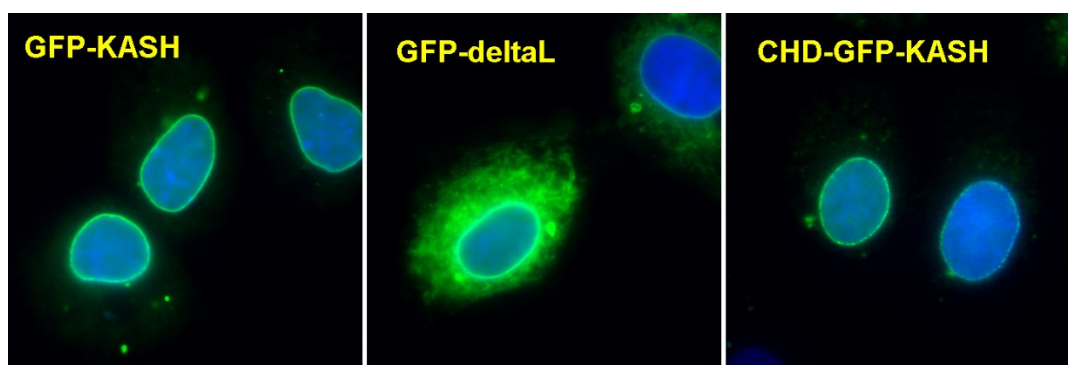


Konstrukty GFP-KASH a GFP-KASH $\Delta$ L připravila moje kolegyně Miloslava Maninová již v roce 2013 (detaily viz. Maninova et al. 2013). Detailní příprava konstruktů CHD-GFP-KASH je popsána v kapitole 4.2.13.



**Obr. 16:** Schématické znázornění doménového uspořádání nesprinů a připravených konstruktů použitých v této práci

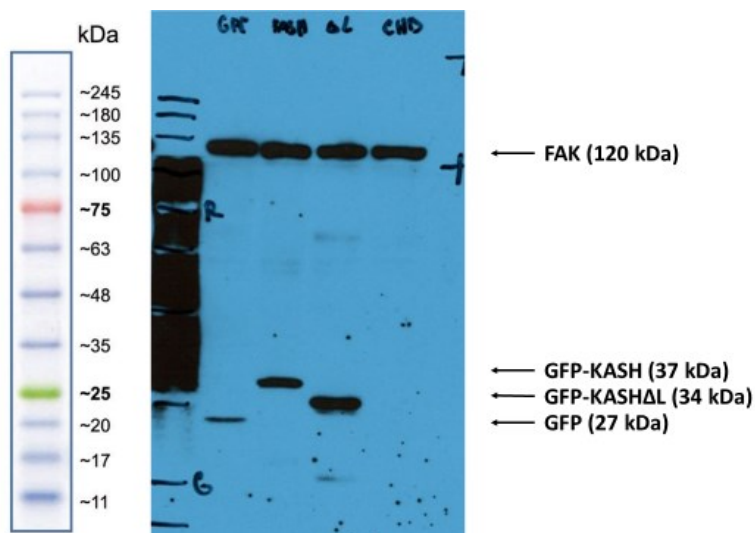
Vektory byly do buněk RAT2 vneseny pomocí transientní transfekce Lipofectaminem 2000. Transfekované buňky byly dále zafixovány, nabarveny pomocí DAPI a phalloidinu konjugovaného s rhodaminem. Dle pozorování transfekovaných buněk pod fluorescenčním mikroskopem se zdá, že konstrukt CHD-GFP-KASH vykazuje v buňkách jen nízkou míru exprese a navíc že podíl transfekovaných buněk v populaci je výrazně nižší, než u buněk transfekovaných pomocí konstruktů KASH či KASH $\Delta$ L (Obr. 17).



**Obr. 17:** Lokalizace KASH konstruktů do jaderné membrány buněk RAT2 (modře DAPI, zeleně GFP značené konstrukty). Exprese konstruktů KASH a KASH $\Delta$ L byla v buňkách velmi dobře patrná, zatímco signál CHD-GFP-KASH byl výrazně slabší a menší byl i podíl GFP pozitivních buněk v populaci. GFP signál byl v tomto případě zesílen, aby ukázal správnou lokalizaci CHD-GFP-KASH do jaderného obalu.

Hladina exprese fúzních proteinů GFP-KASH, GFP-KASH $\Delta$ L a CHD-GFP-KASH byla v buňkách ověřena také pomocí western blotu a následného vyvolání za užití protilátky proti GFP (Obr. 18). Jako kontrola stejného množství nanášky v jednotlivých jamkách gelu

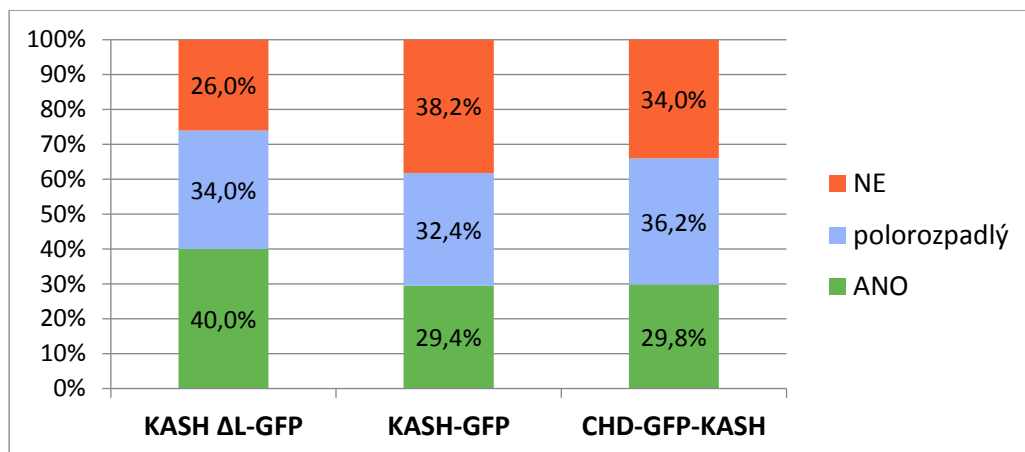
byla použita kináza FAK (120 kDa), jejíž velikost je dostatečně odlišná od velikosti konstruktů. Zde se ukázalo, že signál CHD-KASH konstruktů je v buněčných lyzátech nedetekovatelný. Konstrukty KASH a KASH $\Delta$ L detekovány byly.



**Obr. 18:** Western blot pro ověření množství námi vnesených GFP-značených transgenních KASH proteinů v buňkách. KASH proteiny konjugované s GFP byly detekovány za použití protilátky proti GFP. Pořadí nanášek zleva: marker, GFP (kontrola), GFP-KASH, GFP-KASH $\Delta$ L, CHD-GFP-KASH. Jako kontrola nanášky bylo použito proteinu FAK. Zatímco proteiny KASH a KASH $\Delta$ L byly bez obtíží detekovány, konstrukt CHD-KASH se detekovat nepodařilo.

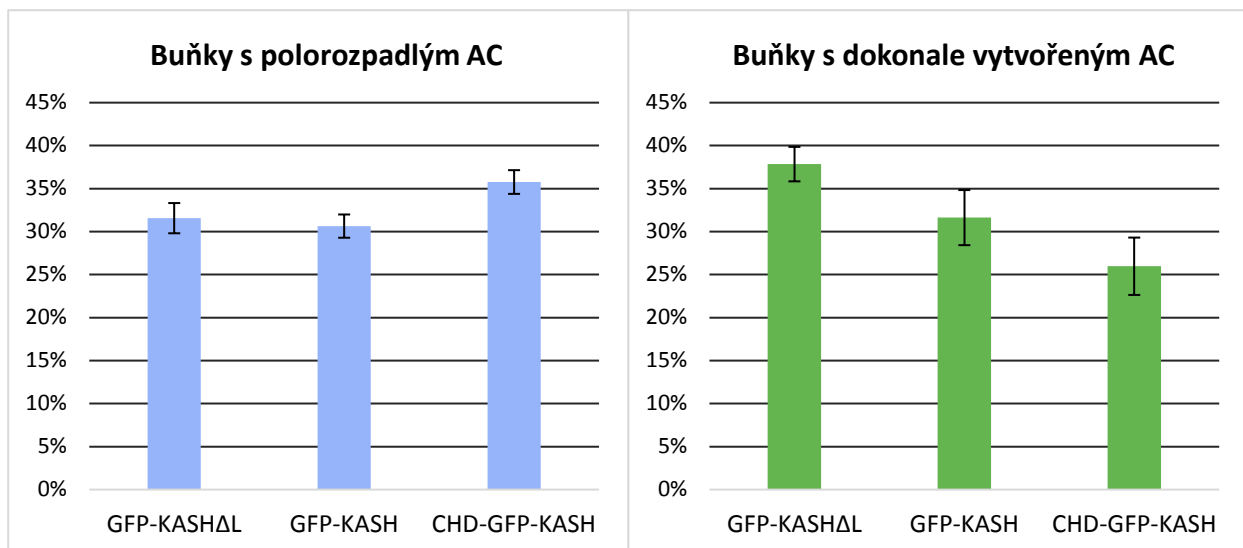
Přítomnost actin capu v jednotlivých transfekovaných buňkách byla kvantifikována stejně, jako v předchozím experimentu (kapitola 5.1.3). Buňky vykazující pouze nízkou míru exprese transgenního produktu, odhadnutou podle intenzity GFP signálu, nebyly do kvantifikace zahrnuty.

Celkově byl experiment proveden ve čtyřech nezávislých opakováních a v součtu bylo vyhodnoceno 304 buněk s konstruktem GFP-KASH, 270 buněk s konstruktem GFP-KASH $\Delta$ L a 201 buněk s konstruktem CHD-GFP-KASH.



**Obr. 19: Vyhodnocení přítomnosti actin capu v buňkách RAT2 v závislosti na přítomnosti různých vnesených konstruktů.** Ukázány jsou výsledky z jednoho z experimentů. Zelené sloupce znázorňují frakci buněk s dokonale vytvořeným actin capem (ANO), modré sloupce znázorňují frakci buněk s narušeným actin capem (polorozpadlý) a oranžové sloupce frakci buněk bez actin capu (NE).

Na základě získaných dat se zdá, že množství buněk s polorozpadlým actin capem je téměř stejné jak mezi jednotlivými konstrukty, tak i mezi skupinami z různých experimentů. Do jednoho grafu jsme proto vynesli průměrné hodnoty procentuálního zastoupení buněk s polorozpadlým actin capem ze všech 4 experimentů (Obr 20.). Potvrdilo se, že polorozpadlý actin cap je zastoupen u všech zkoumaných skupin téměř v totožné míře. Pro další vyhodnocení je tedy možné frakci s polorozpadlým actin capem zcela zanedbat. Do druhého grafu jsme proto samostatně vynesli pouze průměr zastoupení buněk s dokonale vytvořeným actin capem (Obr. 20).



**Obr. 20: Porovnání procentuálního zastoupení buněk s polorozpadlým (vlevo) a dokonale vytvořeným (vpravo) actin capem jako průměr ze všech čtyř provedených experimentů.** Můžeme vidět, že polorozpadlý actin cap (AC) je zastoupen u všech zkoumaných skupin zhruba ve stejné míře. Naproti tomu dokonale vytvořený actin cap se nejvíce vyskytuje u kontrolní skupiny buněk s KASHΔL konstruktem, v menší míře je pak zastoupen v buňkách s vneseným konstruktem KASH a CHD-KASH.

Ve shodě s dříve dosaženými výsledky v naší laboratoři (Maninova and Vomastek 2016) jsme zjistili, že buňky exprimující GFP-KASH mají actin cap přítomný v menší míře než kontrolní buňky exprimující GFP-KASHΔL (Obr. 19 a Obr. 20). Je třeba zmínit, že inhibiční efekt GFP-KASH nebyl tak dominantní jako v předchozích publikovaných výsledcích (Maninová 2016), nicméně i přesto statisticky významný. Provedením neparametrického t-testu jsme při porovnání množství dokonale vytvořeného actin capu mezi skupinami KASH a KASHΔL získali hodnotu  $p=0,0291$ , při porovnání skupin KASHΔL a CHD-KASH je  $p=0,019$ .

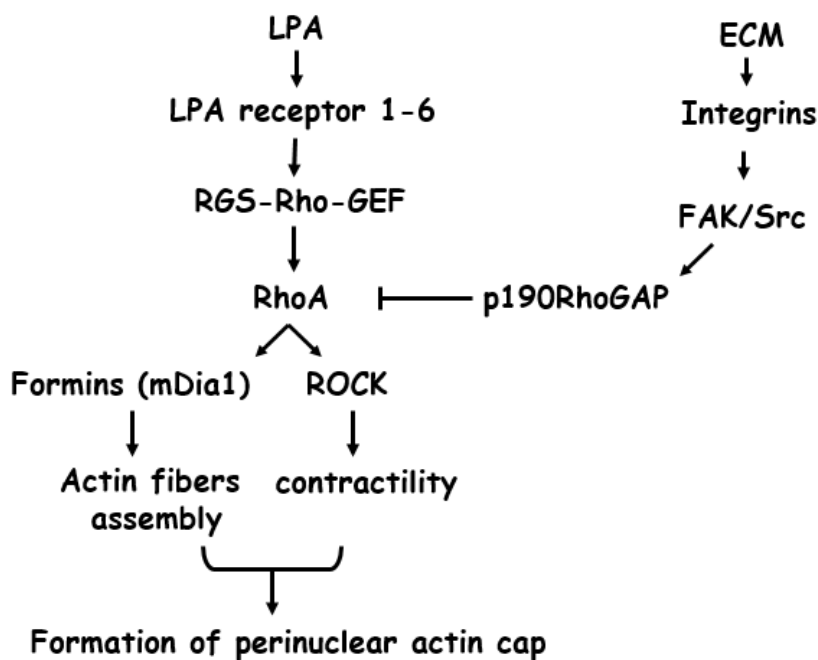
Důvodem může být slabší exprese sledovaných proteinů nebo rozdílné metodické provedení experimentu (podrobněji rozebráno v kapitole Diskuze). Nicméně jsme pozorovali, že konstrukt obsahující CHD doménu snížil zastoupení actin capu podobně jako GFP-KASH. Přítomnost CHD domény tedy nezapříčinila obnovu vazby na aktin a znovu zvýšení procentuálního zastoupení actin capu oproti buňkám s GFP-KASH. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že actin cap není spojen s jaderným obalem skrze aktin vazebnou CHD doménu proteinů nesprin-1 a -2.

## 5.2 Signalizace vedoucí k tvorbě, resp. rozpadu actin capu

V této kapitole se zaměřím na charakterizaci pravděpodobných signálních drah ovlivňujících tvorbu actin capu, resp. i ostatních aktinových struktur v buňce. Vzhledem k tomu, že vlákna actin capu obsahují fosforylovaný lehký řetězec myosinu a jsou tudíž kontraktilní, předpokládali jsme, že ústředním regulátorem tvorby actin capu může být malá GTPáza RhoA, která se významně podílí na udržování aktomyosinové kontraktility v buňkách. RhoA je inaktivní ve formě s navázaným GDP a výměnou GDP za GTP dochází k její aktivaci a schopnosti aktivovat její efektorové proteiny jako jsou forminy mDia a proteinkinázy ROCK (Maekawa et al. 1999). Správně časovaným cyklováním mezi stavy s navázaným GDP a GTP, je zajištěna celá řada buněčných dějů, mimo jiné i správná organizace aktinu, potažmo actin capu. Výměna GDP za GTP je regulována proteiny z RhoGEF rodiny (*guanine nucleotide exchange factor*), zatímco hydrolýza GTP za vzniku GDP je aktivována pomocí proteinů RhoGAP (*GTPase activating protein*).

Jedním z aktivátorů RhoA je kyselina lysyfosfatidová (*lysophosphatidic acid* - LPA), která tak činí prostřednictvím specifické podskupiny RhoGEF, tzv. RGS-RhoGEF (Tanabe et al. 2004). Naopak např. buněčná adheze k proteinům ECM vede k akutní aktivaci kinázy fokálních adhezí (FAK), která zapříčiňuje deaktivaci RhoA, resp. její „zamrznutí“ ve stavu s navázaným GDP. FAK pravděpodobně inaktivuje RhoA skrze působení proteinu p190RhoGAP – jednoho z proteinů RhoGAP (Klimova et al. 2016) (Obr. 21).

Přechozí výsledky dosažené v laboratoři ukázaly, že v průběhu polarizace buněk RAT2 dochází k remodelaci actin capu, kdy během prvních fází polarizace dochází k rozpuštění existujícího actin capu (přibližně do tří hodin po iniciaci polarizace) a poté dojde k novému vytvoření actin capu (Maninova and Vomastek 2016). Polarizace byla indukována rýhou provedenou v konfluentní kultuře. Na základě těchto výsledků jsme předpokládali, že v buňkách dochází během polarizace k tranzientnímu poklesu RhoA, který umožňuje remodelaci actin capu. Tranzientní pokles může být způsoben tvorbou protrudujících oblastí, aktivací integrinů, FAK a p190RhoGAP (Obr. 21).

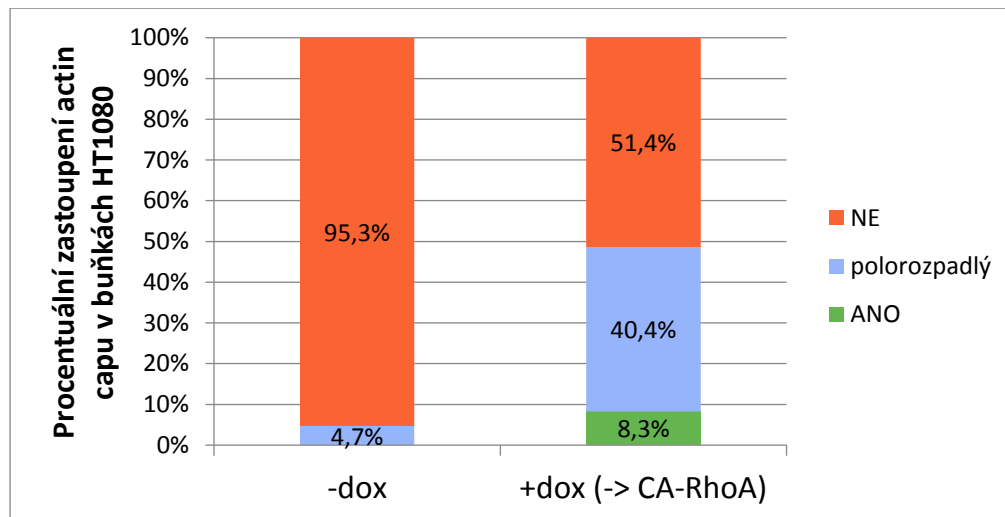


**Obr. 21: Souhrnné schéma předpokládané signální dráhy vedoucí k remodelaci actin capu. Zatímco LPA a RGS-RhoGEF aktivují RhoA, tak integriny, FAK a p190RhoGAP inaktivují RhoA.**

### 5.2.1 Úloha GTPázy RhoA na tvorbu actin capu v buňkách HT1080 s inducibilní konstitutivně aktivní RhoA

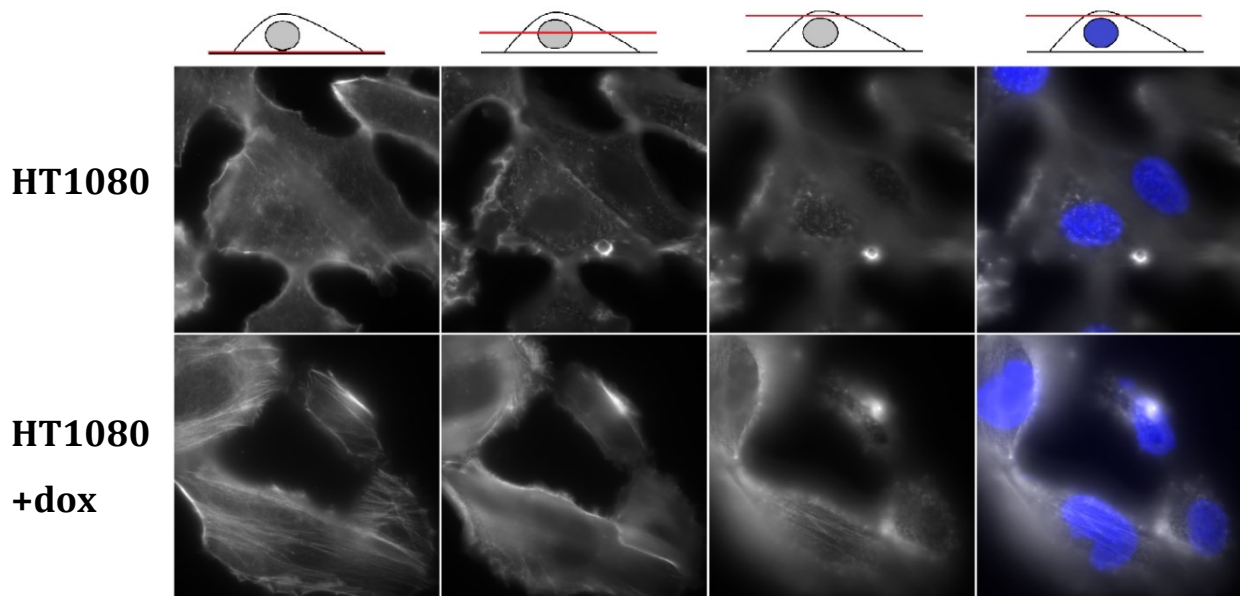
Jak již bylo zmíněno, měli jsme k dispozici linii HT1080 s doxycyklin-inducibilní expresí konstitutivně aktivní RhoA (CA-RhoA). Tato linie je ideálním modelem pro porovnání vlivu aktivní RhoA na actin cap, jelikož tato linie standardně nevytváří actin cap a mimo přidání doxycyklinu (dox) není k aktivaci RhoA potřeba žádná další zásahy, které by mohly negativně ovlivnit kondici buněk.

Pokud tvorba actin capu vyžaduje RhoA aktivitu, tak by exprese CA-RhoA měla způsobit zvýšenou míru tvorby stresových vláken tedy i actin capu v buňkách. Toto jsem ověřila kvantifikací přítomnosti actin capu v buňkách bez doxycyklinu a s přidáním doxycyklinu (výsledná koncentrace 0,5 $\mu$ M) po dobu 24 hodin (postup kvantifikace popsán v kapitole 5.1.3).



**Obr. 22: Nárůst procentuálního zastoupení buněk s actin capem v buňkách HT1080 po expresi CA-RhoA indukované doxycyklinem.** Zelené sloupce znázorňují frakci buněk s dokonale vytvořeným actin capem (ANO), modré sloupce znázorňují frakci buněk s narušeným actin capem (polorozpadlý) a oranžové sloupce frakci buněk bez actin capu (NE).

Celkem bylo během dvou experimentů kvantifikováno 64 buněk bez ošetření a 109 po ošetření doxycyklinem. Výsledky naznačují, že konstitutivně aktivní RhoA dokáže indukovat tvorbu actin capu v linii HT1080 (Obr. 22 a Obr. 23). Nicméně je zřejmé, že actin cap není tak dobře zformován jako v případě např. buněk RAT2. Zastoupena je především forma „polorozpadlého“ actin capu (detekováno u 40 % buněk), který neobsahuje zřetelná, paralelně uspořádaná perinukleární vlákna. Přestože k tvorbě dobře uspořádaného actin capu dochází, jeho výskyt je pouze u zhruba 8 % buněk.



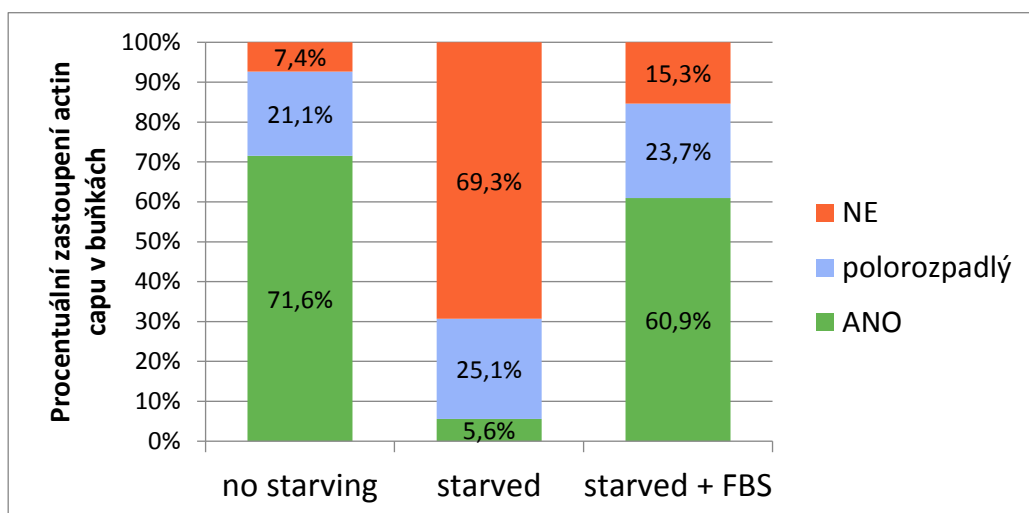
**Obr. 23: Vliv indukovaného CA-RhoA na strukturu aktinu v buňkách HT1080.** Bíle je značen aktin, modře jádro barvené pomocí DAPI. Horní panel ukazuje kontrolní buňky bez indukce CA-RhoA, spodní panel buňky po přidání doxycyklinu (24h, 0,5uM) a indukci exprese CA-RhoA. Aktin byl nafocen ve 3 fokálních hladinách – bazální (zcela vlevo), hladina uprostřed buňky (2. panel zleva) a v hladině nad jádrem (napravo). V některých buňkách s aktivovaným CA-RhoA je v hladině nad jádrem zřejmá indukovaná tvorba actin capu.

### 5.2.2 Důležitost přítomnosti kyseliny lysofosfatidové (LPA) při utváření actin capu

To, že kyselina lysofosfatidová (LPA) je jedním z aktivátorů G-proteinu Rho a tím že indukuje tvorbu stresových aktinových vláken, bylo již opakovaně prokázáno (Ren, Kiosses, and Schwartz 1999). Předpoklad nezbytné přítomnosti LPA pro vytvoření perinukleárního actin capu jsem ověřila kultivací buněk RAT2 v bezsérovém médiu (LPA je jednou ze složek FBS séra) a následným opětovným přidáním sérového média.

Buňky byly starvovány po dobu 48 hodin. Jedné populaci buněk bylo poté vyměněno médium zpět za médium obsahující 10% FBS, druhá byla ponechána v bezsérovém médiu. Za dalších 6 hodin byly buňky zafixovány, nabarveny phalloidin-rhodaminem, nafoceny a byl u nich kvantifikován actin cap. Jako kontrola byly použity buňky po celou dobu standardně kultivované v médiu obsahujícím 10% FBS. Celkově bylo vyhodnoceno 204 kontrolních buněk, 167 starvovaných a 215 starvovaných + následně ošetřených FBS.

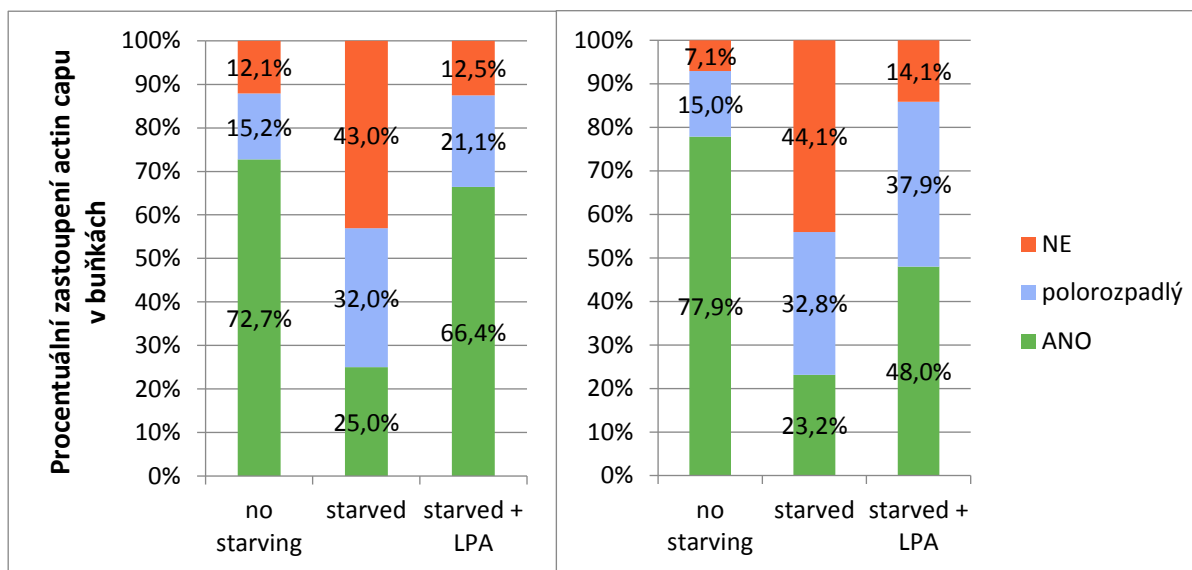




**Obr. 24: Kvantifikace přítomnosti actin capu u buněk RAT2.** Sloupec vlevo ukazuje zastoupení actin capu v kontrolních buňkách (no starving), sloupec uprostřed v buňkách starvovaných po dobu 54h v bezsérovém médiu (starved) a sloupec napravo v buňkách 48h stravovaných a poté po dobu 6 hodin kultivovaných ve standardním sérovém médiu (starved+FBS). Zelené sloupce znázorňují frakci buněk s dokonale vytvořeným actin capem (ANO), modré sloupce znázorňují frakci buněk s narušeným actin capem (polorozpadlý) a oranžové sloupce frakci buněk bez actin capu (NE).

Z výsledků je patrné, že v bezsérovém médiu byla velmi výrazně snížena schopnost buněk utvářet actin cap – pouhých 6 % buněk mělo cap dokonale vytvořený v porovnání se 72 % u kontrolních buněk. Po opětovném přidání FBS byla tato schopnost obnovena a to téměř až do hodnot rovnajících se kontrole – 61 % buněk vytvořilo dokonalý actin cap.

Pro ověření, že LPA je skutečně tou esenciální složkou FBS zodpovědnou za opětovný nárůst tvorby actin capu, jsem experiment zopakovala ještě 2x s tím, že v dalších opakováních jsem po starvování buňkám nepřidala sérové médium, ale pouze médium s 10uM LPA.



**Obr. 25: Porovnání přítomnosti actin capu v buňkách RAT2 po starvování a následném ošetření 10uM LPA.** Každý graf znázorňuje jeden nezávislý experiment. Zelené sloupce znázorňují frakci buněk s dokonale vytvořeným actin capem (ANO), modré sloupce znázorňují frakci buněk s narušeným actin capem (polorozpadlý) a oranžové sloupce frakci buněk bez actin capu (NE).

Tento experiment potvrdil, že tvorba actin capu má přímou souvislost s přítomností LPA. Přestože u starvovaných buněk tentokrát nedošlo k tak razantnímu poklesu zastoupení buněk s capem (pokles zhruba na 24 % buněk oproti 75 % u kontrolních buněk), jedná se stále o dostatečně markantní rozdíl. Přidáním LPA došlo k výraznému nárůstu podílu buněk obsahujících actin cap – v jednom případě na 66 %, ve druhém na 48 %. Celkově bylo v těchto dvou pokusech zkvantifikováno 391 buněk kontrolních (165 v prvním měření + 226 ve druhém), 349 starvovaných (172+177) a 305 po přidání LPA (128+177).

### 5.2.3 Vliv snížené exprese FAK na rozpad a tvorbu actin capu během buněčné polarizace

Kináza fokálních adhezí (FAK) je jedním z regulátorů aktivity RhoA. FAK je významně aktivována adhezí integrinových receptorů k ECM. Aktivovaná kináza FAK následně aktivuje protein p190RhoGAP. Ten je členem rodiny proteinů, které zvyšují GTPázovou aktivitu RhoA vedoucí k hydrolýze GTP na GDP a tím k deaktivaci RhoA. Bez přítomnosti kinázy FAK by tedy mělo docházet k trvalé aktivaci RhoA a stabilizaci aktinu.

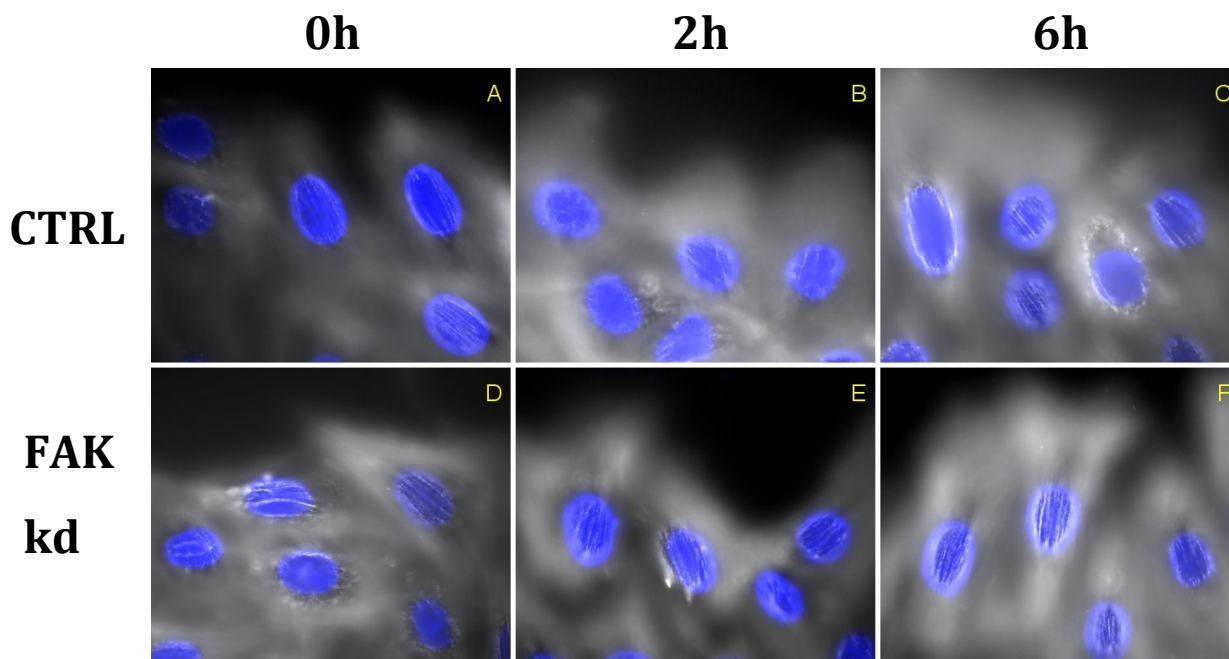
Pro studium významu proteinkinázy FAK při deaktivaci RhoA a destabilizaci aktinových vláken v buňce byla využita metoda hojení rýhy (*wound healing assay*). Při této metodě jsou buňky nejprve ponechány, aby na podkladu narostly až do úplné konfluence, a následně je v jejich vrstvě pomocí vhodného předmětu (v našem případě pomocí 200ul pipetovací špičky) vytvořena rýha. Buňky na kraji této rýhy rozeznávají volný prostor, vytváří protruze směrem k rýze a začínají migrovat směrem do volného prostoru a rýhu postupně zacelovat.

Během tohoto procesu dochází k polarizaci buněk, která umožňuje buňkám rozlišit přední protrudující a zadní neprotrudující části. Během polarizace dochází také k přestavbě aktinového cytoskeletu.

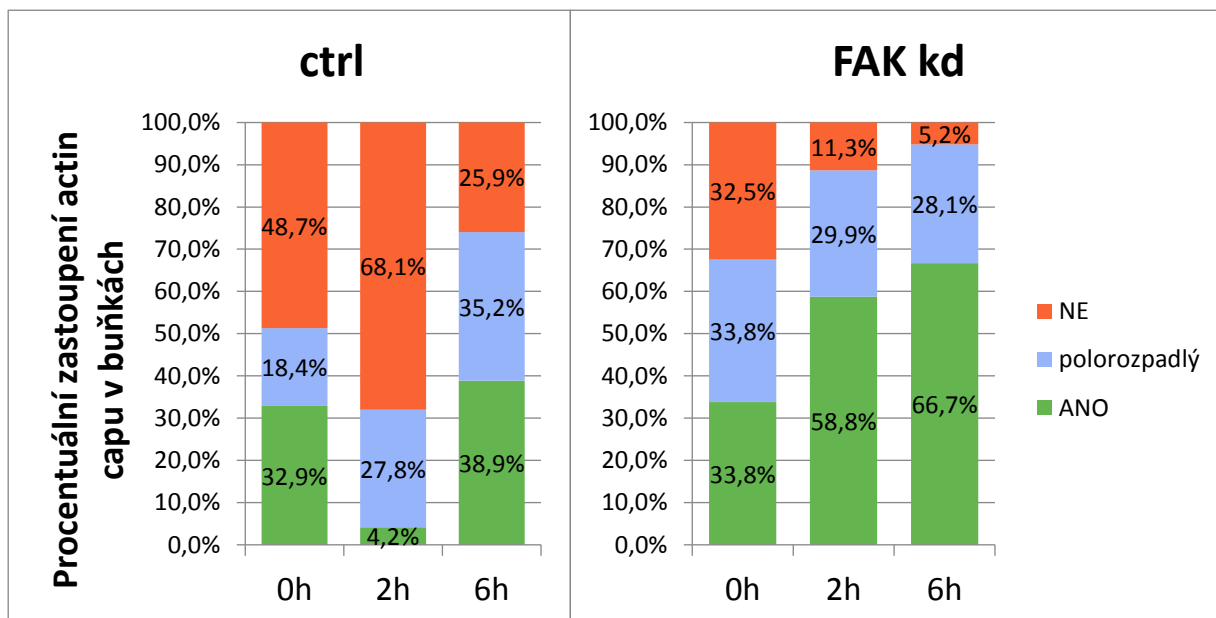
V naší laboratoři bylo zjištěno, že orientace perinukleárních aktinových vláken je v konfluentní kultuře náhodná. V buňkách na okraji rýhy dochází řádově v desítkách minut po jejím vytvoření k rozpadu actin capu a poté po ustanovení směru migrace k jeho opětovnému vytvoření (Maninova and Vomastek 2016). Dle našeho předpokladu by v buňkách bez přítomnosti aktivního FAK měl aktin být natolik stabilizován, že by k tomuto rozpadu nemělo dojít.

Buňky RAT2 kultivované na fibronectinem ošetřených sklíčkách byly proto transfekovány pomocí siRNA proti FAK. Ke kontrolním buňkám byla během transfekce přidána kontrolní siRNA. Buňky byly poté po dobu 24 hodin nechány dorůst do konfluence.

Sklíčka s narostlými buňkami byla rýhována (vždy 1x kontrolní siRNA a 1x FAK siRNA) v odstavu 4 hodin, resp. 2 hodin, tak, aby se v době společného zafixování nacházely ve stavu 6h, 2h a 0h po rýhnutí. Sklíčka byla nabarvena phalloidin-rhodaminem a byla provedena kvantifikace přítomnosti actin capu, kdy byly zahrnuty jen buňky na okraji rýhy (Obr. 26).

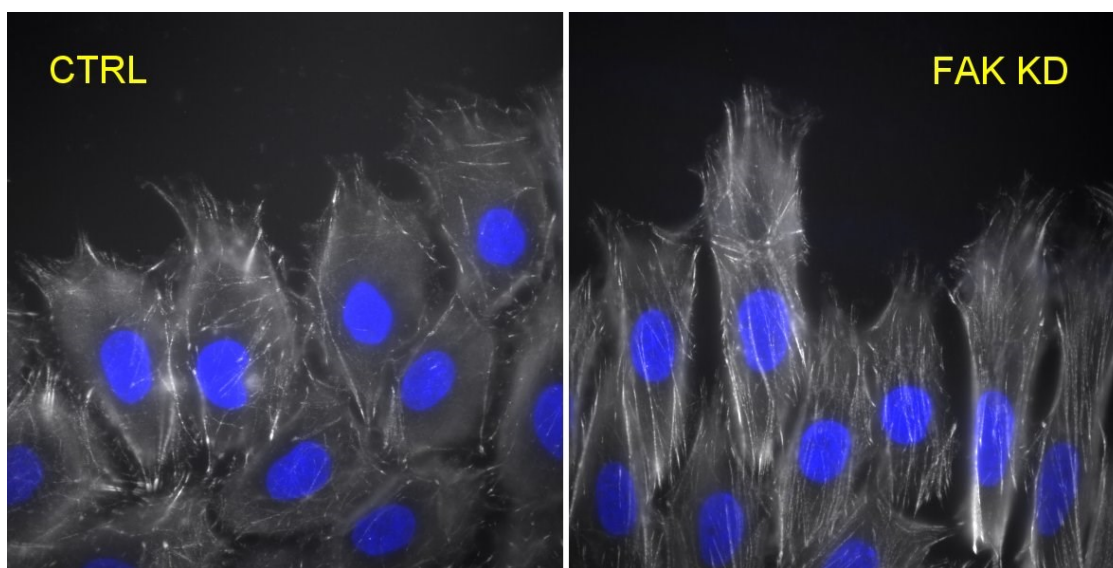


**Obr. 26:** Vývoj přítomnosti actin capu v časovém horizontu 0 až 6 hodin od vzniku rýhy (modře DAPI, bíle aktin). Zatímco u kontrolních buněk dochází k rozpadu actin capu a 2 hodiny od vzniku rýhy jsou patrné pouze jeho náznaky, v buňkách se sníženým množstvím proteinu FAK je plně vyvinutý actin cap přítomen po celou dobu experimentu.



**Obr. 27:** Porovnání množství buněk s actin capem v buňkách kontrolních (ctrl) a buňkách se sníženou expresí FAK (FAK kd). Za povšimnutí stojí především stav po 2 hodinách od vzniku rýhy, kde je vidět markantní rozdíl mezi oběma skupinami. Zelené sloupce znázorňují frakci buněk s dokonale vytvořeným aktin capem (ANO), modré sloupce znázorňují frakci buněk s narušeným actin capem (polorozpadlý) a oranžové sloupce frakci buněk bez actin capu (NE).

Experiment byl z důvodu časové tísně prováděn pouze jednou, nebylo provedeno ani potvrzení snížení exprese FAK pomocí western blotu. Buňky po FAK kd nicméně vykazovaly typický protáhlý fenotyp ve shodě s dřívějšími výsledky (Iwanicki et al. 2008) (Obr. 28), není proto důvod domnívat se, že by knockdown proteinkinázy FAK byl neúspěšný. Celkově bylo vyhodnoceno 76 (0h) + 72 (2h) + 54 (6h) kontrolních buněk a 77 (0h) + 97 (2h) + 96 (6h) buněk se sníženou expresí FAK.



**Obr. 28: Porovnání fenotypu buněk transfekovaných pomocí kontrolní (ctrl) siRNA a pomocí siRNA proti FAK.** Bíle je značen aktin focený v bazální fokální hladině (u substrátu), modře je pomocí DAPI barveno jádro. Buňky transfekované siRNA proti FAK vykazují výrazně protáhlejší fenotyp v porovnání s buňkami kontrolními.

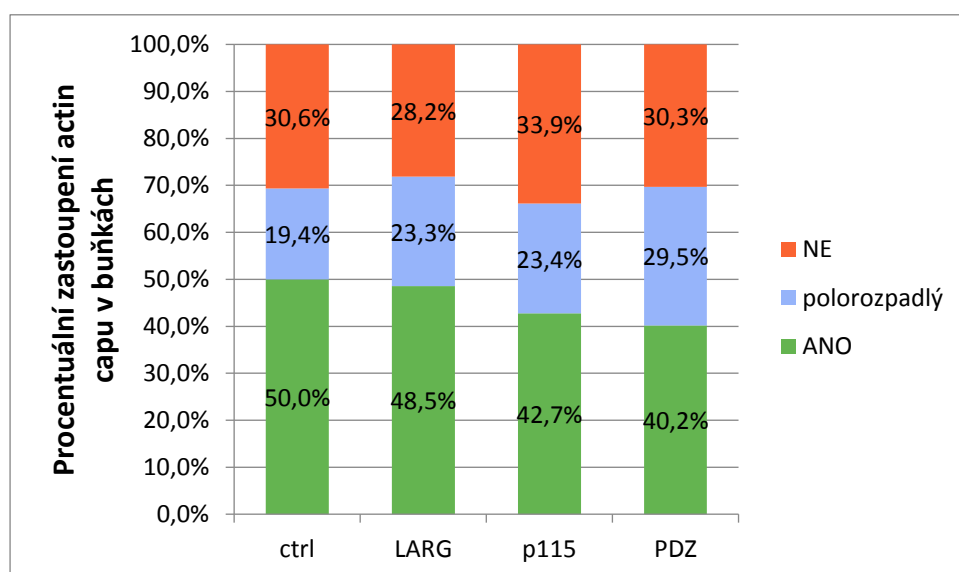
#### 5.2.4 Role p115-RhoGEF, LARG a PDZ-RhoGEF při aktivaci GTPázy RhoA

Proteinů regulujících aktivitu RhoA výměnou GDP za GTP (tzv. Rho GEFs) je v buňkách okolo sedmdesáti. Pro odhalení, který z nich je zodpovědný za aktivaci RhoA během signalizace vedoucí k tvorbě actin capu, jsme vytipovali 3 kandidáty – p115-RhoGEF, LARG a PDZ-RhoGEF. Tyto RhoGEFs proteiny jsou totiž aktivovány pomocí LPA skrze specifickou RGS doménu (*regulator of G-protein signaling*) (Tanabe et al. 2004).

Navrhli jsme dvě sekvence siRNA proti každému z těchto tří RhoGEFs a kalciumfosfátovou transfekcí je vpravili do buněk RAT2. Transfekované buňky jsme 24

hodin po transfekci zafixovali a následně kvantifikovali množství actin capu v každé ze skupin buněk. Jako kontroly byly použity buňky, kterým byla během transfekce přidána kontrolní siRNA.

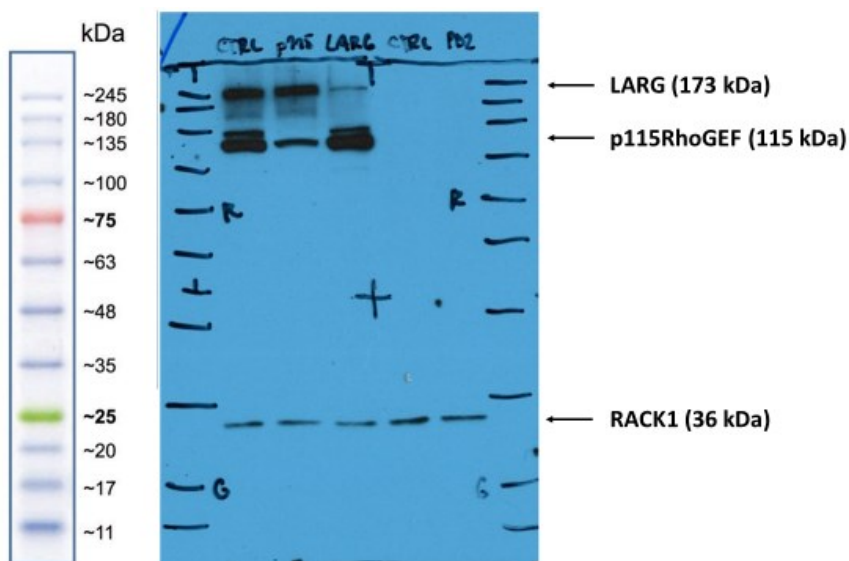
Výsledky kvantifikace ukazují, že určitý pokles tvorby actin capu oproti kontrolním buňkám vykazují buňky se sníženou expresí p115RhoGEF a PDZRhoGEF (Obr. 29). Naproti tomu buňky postrádající LARG mají dokonale vytvořeného actin capu téměř stejně jako buňky kontrolní a pokud započítáme i buňky s polorozpadlým actin capem, množství v kontrolních buňkách dokonce převyšují.



**Obr. 29: Vliv snížení exprese jednotlivých guanine nukleotid exchange faktorů (GEFs) na množství buněk obsahujících actin cap.** Zelené sloupce znázorňují frakci buněk s dokonale vytvořeným actin capem (ANO), modré sloupce znázorňují frakci buněk s narušeným actin capem (polorozpadlý) a oranžové sloupce frakci buněk bez actin capu (NE).

Získaná data tedy nevykazují příliš signifikantní rozdíl mezi buňkami kontrolními a buňkami se sníženou expresí jednotlivých RhoGEFs. Pro ověření, že skutečně došlo k detekovatelnému poklesu exprese, jsme lyzáty transfekovaných buněk podrobili imunodetekci za užití western blotu (Obr. 30). Jako kontrola stejného množství nanášky ve všech jamkách byl použit protein RACK1 (36 kDa).

U proteinů LARG a p115RhoGEF jsme prokázali výrazný pokles jejich množství v buňkách. Bohužel protilátka proti PDZ se ukázala jako nefunkční a tedy jsme nebyli schopni potvrdit, zda k poklesu exprese došlo nebo ne.



**Obr. 30: Ověření snížení exprese p115-RhoGEF, LARG a PDZ-RhoGEF na western blotu.** Pořadí nanášek zleva: marker, ctrl, p115-RhoGEF kd, LARG kd, ctrl, PDZ-RhoGEF kd, marker. Jako kontrola nanášky byl využit protein RACK1. Bylo prokázáno snížení exprese p115-RhoGEF a LARG oproti kontrolním buňkám. Snížení exprese PDZ-RhoGEF se bohužel prokázat nepodařilo z důvodu nefunkční primární protilátky.

Experiment byl jednou opakován, bohužel během druhého experimentu došlo k výraznému poškození buněk během transfekce a tím i ovlivnění výsledných dat. Tato data zde proto nejsou prezentována.

Pro ověření statistické správnosti výsledků z prvního měření by bylo potřeba celý experiment ještě jednou nezávisle zopakovat.

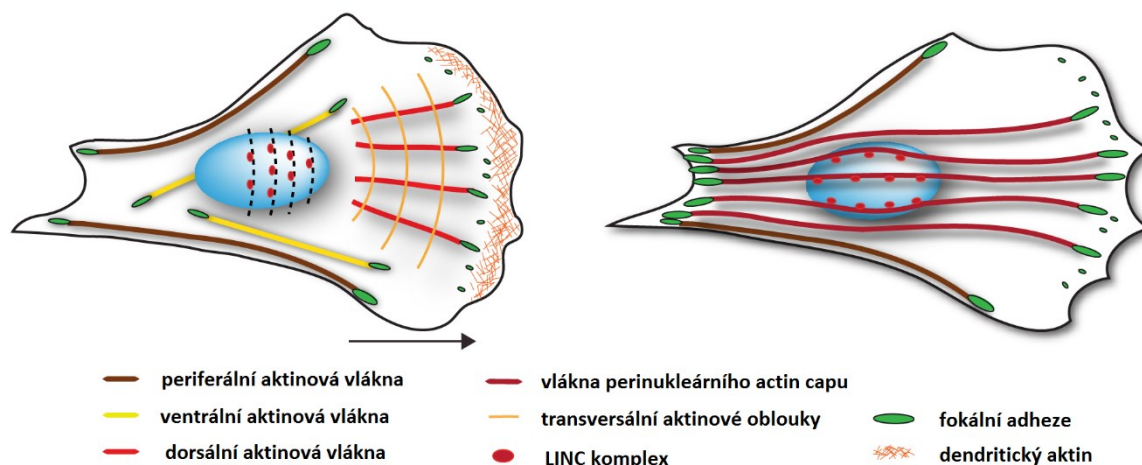
## 6 Diskuze

V této práci jsme se zaměřili na bližší charakterizaci tzv. perinukleárních aktinových vláken. Tato paralelní stresová vlákna se nacházejí nad jádrem a tvoří specifický útvar v literatuře nazývaný actin cap (aktinová čepička) (Khatau et al. 2009; Kim et al. 2012). Na rozdíl od ostatních stresových vláken, jako jsou ventrální stresová vlákna, ale i dorsální vlákna a aktinové oblouky, je jejich regulace a funkce poměrně málo pochopená. To může být důsledek toho, že první charakterizace byla popsána poměrně nedávno (Khatau et al. 2009). Dalším faktorem pak může být, že actin cap se nevyskytuje ve všech buněčných liniích, na rozdíl od ostatních typů stresových vláken, které jsou až na výjimky přítomny univerzálně. Vzhledem k tomu, že pro studium a mikroskopickou analýzu aktinu jsou často používány buňky U2OS, které actin cap nemají (Maninova and Vomastek 2016), je možné, že actin cap mohl uniknout pozornosti.

V polarizovaných migrujících buňkách, kde jsou perinukleární aktinová vlákna přítomna, tvoří tato vlákna specifickou strukturu. Perinukleární aktinová vlákna jsou svými konci zakotvena ve fokálních adhezích na přední a zadní straně buňky a navíc je jejich centrální část zakotvena skrze LINC komplex k apikální straně jádra (Obr. 31). Ve výsledku pak perinukleární aktinová vlákna tvoří jakýsi oblouk nebo dóm, kdy vlákna vychází z fokálních adhezí na předním okraji buňky, stoupají na jádro, které překlenují, a pak klesají k bazální straně buňky, kde končí ve fokálních adhezích na zadní straně buňky (Kim, Chambliss, and Wirtz 2013; Maninova, Caslavsky, and Vomastek 2017). Toto uspořádání je charakteristické orientací vláken paralelně s osou migrace (Maninova, Caslavsky, and Vomastek 2017).

Do jaké míry je však přítomnost perinukleárních aktinových vláken svázána s rychlostí a způsobem migrace, není doposud plně objasněno. Stejně tak není zcela jasné, jakým přesně mechanismem jsou tato vlákna napojena na jadernou obálku, ani to, jaké konkrétní signální molekuly ovlivňují tvorbu a rozklad perinukleárních aktinových vláken. V této práci se nám podařilo podhalit alespoň několik málo z těchto nevyjasněných aspektů.





**Obr. 31: Srovnání buněčné lokalizace a ukotvení různých typů stresových vláken.** Oproti ostatním typům stresových vláken se vlákna actin capu (vpravo) přímo upínají jak do fokálních adhezí na předním a zadním okraji buňky, tak i na jádro prostřednictvím LINC komplexu (převzato z Maninova, Caslavsky, and Vomastek 2017- upraveno).

Studium migračních módů buněk s actin capem a bez něj naznačuje, že buňky disponující actin capem snáze zachovávají směr migrace a tedy vykazují směrovanější pohyb. I přes očekávání, že by přítomnost perinukleárních aktinových vláken mohla zároveň pozitivně ovlivňovat rychlost buněčné migrace, naše výsledky naznačují, že zde není korelace mezi přítomností actin capu a rychlostí migrace.

Také jsme se pokusili charakterizovat základní mechanismy, které napomáhají zakotvení actin capu do jaderného obalu. Ve shodě s předchozími výsledky (Khatau et al. 2009; Maninova and Vomastek 2016) se podařilo ukázat, že exprese KASH domény nesprinu-2, která je schopna rozrušit LINC komplex, vede k narušení a rozpadu actin capu. Přidání aktin-vazebné domény (přítomné v nesprinu-2) ke KASH doméně a exprese tohoto „mininesprinu“ navzdory našemu předpokladu nevedlo k obnovení tvorby actin capu. Tento výsledek naznačuje, že aktin vazebná doména CHD pravděpodobně nemá vliv na napojení aktinových vláken na komplex LINC.

Prokázána byla úloha signalizace spouštěná kinázou fokálních adhezí (FAK) při rozpadu actin capu během buněčné polarizace. Zatímco neošetřené buňky během polarizace actin cap rozkládají (Maninova and Vomastek 2016), buňky postrádající FAK vykazovaly i v průběhu tohoto procesu vysoké zastoupení složeného actin capu.

Stejně tak bylo potvrzeno, že působení kyseliny lysosofatidové (LPA) spouští signální dráhy vedoucí mimo jiné k aktivaci RhoA a k tvorbě actin capu. Nepodařilo se nám již ale zjistit, který z RhoGEF se během této aktivační dráhy uplatňuje.

## 6.1 Vyhodnocení rozdílů v rychlosti a směrovanosti buněčné migrace

Směrovanost neboli perzistence migrace závisí na správné časoprostorové regulaci aktivity malých RhoGTPáz během buněčné migrace. Důležitou úlohu pak pravděpodobně hraje GTPáza Rac1, která indukuje protruzivitu pouze na předním okraji buňky a deregulace aktivity Rac1 pak vede k protruzím i po stranách buňky, k častým změnám ve směru migrace a celkové ztrátě směrovanosti pohybu (Machacek et al. 2009; Pankov et al. 2005). Poznatky z naší laboratoře pak naznačovaly, že rozpad actin capu způsobený inhibítorem myozinové aktivity blebbistatinem či expresí KASH domény vede ke zvýšené protruzivitě mimo přední okraj buňky a tím by actin cap mohl ovlivňovat směrovanost migrace (M. Maninová a T. Vomastek, ústní sdělení). Pro ověření teorie, zdali actin cap ovlivňuje migraci, jsme porovnali několik buněčných linií, některé s actin capem a některé bez něj.

Výběr buněk pro studium migračních módů byl učiněn na základě porovnání přítomnosti actin capu v několika různých buněčných liniích. Soustředili jsme se na buňky mezenchymálního původu, kdy jako typické příklady buněk s actin capem byly zvoleny buňky RAT2, NIH3T3 a Saos-2, jako typická linie bez přítomnosti actin capu pak U2OS. Další vhodný kandidát pro posouzení vlivu actin capu na migraci je linie HT1080 s možností inducibilní exprese konstitutivně aktivního RhoA (CA-RhoA).

Ačkoli dle souhrnných grafů trajektorií jednotlivých buněk (Obr. 10) se zdá, že vliv přítomnosti actin capu na směrovanost migrace je zcela markantní, po vyhodnocení těchto trajektorií v programu Chemotaxis and Migration Tool již nelze závěry odvozovat tak snadno.

Index směrovanosti migrace napovídá, že mezi některými liniemi je rozdíl vskutku významný (0,290 pro buňky U2OS x 0,609 pro buňky 3T3), avšak mezi jinými (0,373 RAT2 x 0,290 U2OS) je spíše neprůkazný. Toto bylo potvrzeno i statistickou analýzou, kdy porovnání RAT2xU2OS bylo na samé hranici statistické průkaznosti. S ohledem na fakt, že buňky RAT2 jsou v naší laboratoři dlouhodobě užívány jako typický model buněk s actin

capem a buňky U2OS naopak jako model buněk bez actin capu, očekávali jsme výrazně průkaznější rozdíl ve směrovanosti jejich migrace.

Ještě hůře dopadlo porovnání buněk HT1080 a buněk HT1080 po přidání doxycyklinu a indukci exprese CA-RhoA. Zatímco buňky HT1080 mají index směrovanosti migrace roven 0,384, buňky stejné linie, avšak po indukci exprese CA-RhoA a následné tvorby actin capu, mají tento index 0,453. Při statistickém porovnání těchto dvou skupin se rozdíl jeví jako statisticky nevýznamný.

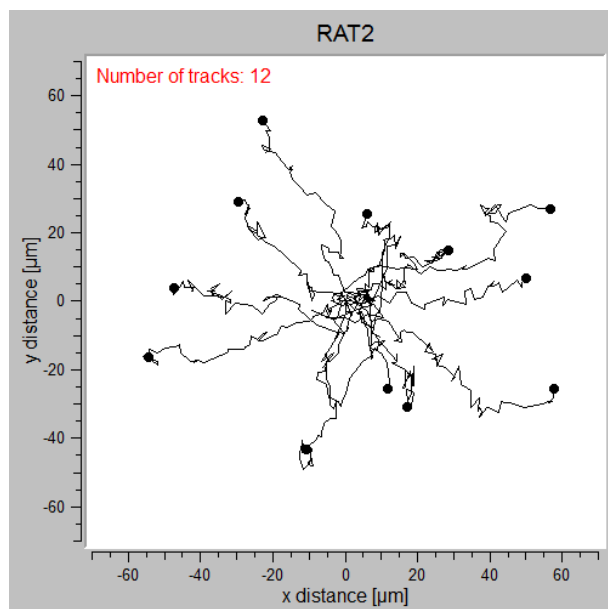
Nepříliš průkazné rozdíly u linie HT1080 po indukci a bez indukce mohou být způsobeny tím, že i po indukci exprese CA-RhoA se v těchto buňkách jen zřídka vytvoří dokonale zformovaný actin cap, konkrétně zhruba u 8 % buněk. U dalších 40 % buněk je actin cap vytvořen alespoň zčásti, nicméně u více než 50 % buněk není cap přítomen vůbec (detaily v kapitole 5.2.1).

Jak HT1080 bez indukce, tak i HT1080 s indukovaným CA-RhoA navíc vykazovaly významné rozdíly i mezi dvěma provedenými nezávislými experimenty. Například neindukované buňky HT1080 měly během prvního měření index směrovanosti 0,312, během druhého měření však 0,456. Tedy nárůst téměř o 50 %.

Na rozdíl od směrovanosti migrace, kde bylo možné vypořádat určitý trend závislosti směrovanosti na přítomnosti actin capu, i když ne statisticky příliš významný, rychlost migrace se zdá být na přítomnosti actin capu zcela nezávislá. S poměrně velkým náskokem vedou tabulku rychlosti neindukované buňky HT1080, následované indukovanými buňkami HT1080 a buňkami NIH3T3. Tedy první místo obsadily buňky bez actin capu, zatímco další dvě místa buňky s vytvořeným capem. Rozdíl mezi indukovanými a neindukovanými buňkami HT1080 je navíc taktéž poměrně nevýznamný – neindukované HT1080 umigrovaly průměrně 243 um, zatímco indukované s CA-RhoA 207 um. Linie buněk RAT2 a Saos-2, které mají obě actin cap zcela ukázkově zformován, obsadily dokonce poslední dvě místa pomyslného žebříčku. Náš původní předpoklad, že s vyšší mírou přítomnosti actin capu roste také rychlost migrace se zdá být mylný a nezdá se, že by mezi přítomností actin capu a rychlostí migrace buněk existovala korelace.

Je také nutno zmínit několik technických problémů, které mohly ovlivnit tyto experimenty. Nízká míra směrovanosti buněk RAT2 může být potencionálně ovlivněna manuálním způsobem zpracování nafocených time-lapse sekvencí. Jelikož buňky RAT2 migrují ze všech zvolených linií jednoznačně nejméně, bylo velmi obtížné přesně stanovit

správné místo, kde se buňka v daný čas nacházela a na trajektoriích se tak vytvořily „zuby“ (Obr. 32). Tyto artefakty velmi pravděpodobně negativně ovlivnili index směrovanosti této buněčné linie.



**Obr. 32: Manuálně zpracované trajektorie buněk RAT2, kde jsou viditelné „zuby“ pravděpodobně způsobené „ukliknutím“ během stopování migrující buňky.**

Druhým faktorem je pak poměrně malý počet měření, a to jak počet jednotlivých buněk, tak také počet opakování. V každém případě, s ohledem na poměrně vysoké směrodatné odchylky, by pro lepší průkaznost bylo vhodné experiment znovu několikrát zopakovat. Protože jsme se rozhodli vliv aktin capu na migraci stanovit přímo pomocí KASH konstruktů s CHD doménou (viz. níže), nebyly tyto experimenty již opakovány.

Volba porovnávání různých linií mezi sebou také nebyla zcela šťastným řešením. V takovém případě totiž migraci ovlivňuje i mnoho dalších faktorů, než jen samotná přítomnost aktin capu. Ideální modelový příklad by byl takový, kdy by byly porovnávány dvě skupiny buněk stejné linie, z nichž jedna by aktin cap obsahovala a druhá nikoliv. Takovým příkladem měly být právě použité buňky HT1080. Bohužel v tomto případě nesplnily výsledky naše očekávání. Další způsob stanovení vlivu aktin capu na migraci by pak mohl spočívat v disrupci aktin capu pomocí blebbistatinu nebo exprese KASH domény, která narušuje funkci LINC komplexu (Khatau et al. 2009; Maninova and Vomastek 2016).

## 6.2 Napojení actin capu na jadernou obálku

Pro rozrušení actin capu jsme se rozhodli použít expresi KASH domény nesprinu-2. Tato doména lokalizuje do jaderné obálky svou transmembránovou částí. V perinukleárním prostoru pak KASH doména interaguje se SUN proteiny, vytěsňuje tak endogenní nespriny z LINC komplexu a způsobuje jeho nefunkčnost (Luxton et al. 2010; Stewart-Hutchinson et al. 2008). Tímto způsobem lze rozrušit i actin cap (Maninova and Vomastek 2016).

Je však nutno podotknout, že expresí KASH domény dochází k narušení LINC komplexů obsahujících všechny nespriny (nesprin 1-4). Jelikož nespriny asociují se všemi typy cytoskeletu, je účinek exprese KASH domény značně nespecifický. Předpokládali jsme, že perinukleární aktinová vlákna mohou asociovat s nesprinem-1 nebo -2 skrze doménu calponinové homologie (CHD), která je schopná vázat aktomyozinová vlákna (Luxton et al. 2010). Abychom potvrdili, že perinukleární aktinová vlákna se váží na CHD doménu, připravili jsme konstrukt, který exprimuje KASH doménu fúzovanou s GFP a s CHD. Domény KASH i CHD pocházejí z nesprinu-2.

Při studiu možné úlohy domény CHD při napojení vláken actin capu na LINC komplex, jsme došli k závěru, že CHD doména pravděpodobně není hlavním aktin vazebným místem pro vazbu vláken actin capu. I přestože jsme očekávali, že vnesení konstruktů CHD-KASH („mininesprin“) do buněk by mělo obnovit formování actin capu v porovnání s konstruktem KASH, nestalo se tak.

Buňky s konstruktem CHD-KASH mají dokonce ještě o zhruba 6 % menší zastoupení dokonale zformovaného actin capu oproti buňkám s vneseným konstruktem KASH. Proti buňkám kontrolním s konstruktem KASH $\Delta$ L je to rozdíl o 12 %. Tyto hodnoty sníženého množství actin capu v buňkách s CHD-KASH byly prokázány jako statisticky významné.

Buňky s konstruktem CHD-KASH navíc vykazovaly výrazně nižší expresi tohoto konstruktů oproti buňkám s konstruktem KASH $\Delta$ L. I přestože jsem se snažila do kvantifikace zahrnout pouze buňky se silnější expresí CHD-KASH, mohla tato nízká exprese negativně ovlivnit výsledky. Je také možné, že například GFP v námi připravené fúzované CHD doméně může stericky bránit vazbě aktinu do vazebného místa. Další alternativou je i to, že úspěšná vazba vláken actin capu na molekulu nesprinu vyžaduje ještě další domény nesprinu, než jen samotnou přítomnost CHD domény.

Vezmeme-li však v úvahu, kolik různých domén obsahují nespriny a všechny jejich isoformy (Rajgor and Shanahan 2013), je poměrně pravděpodobné, že CHD doména skutečně nemusí být hlavním zprostředkovatelem vazby vláken actin capu na LINC komplex. Vazba aktinových vláken může být také zprostředkována nepřímo skrze proteiny schopné asociovat jak s nespriny, tak i s aktinovými vlákny. Tato schopnost byla prokázána např. pro proteiny fascin, FHOD1 a amphiphysin, které jsou schopné asociovat s nespriny-1 a -2 (D'Alessandro et al. 2015; Jayo et al. 2016; Kutscheidt et al. 2014). Vazba actin capu může být zajištěna také za využití nesprinu-3 a jeho vazby na plektin, který je schopný vázat IF a aktin (Ketema et al. 2013; Wilhelmsen et al. 2005).

Zajímavým paradoxem by v takovém případě bylo, že plektin ve své aminokyselinové sekvenci obsahuje aktin-vazebnou doménu, která je součástí domény calponinové homologie 1 (CH1) (Fontao et al. 2001). Tedy domény ze stejné rodiny, jakou jsme i my využili jako potenciálního aktin-vazebného elementu.

V paralelních experimentech jsme se snažili snížit hladinu exprese laminu a/c za předpokladu, že toto povede ke kompletní ztrátě perinukleárních vláken, jak již bylo naznačeno dříve (Kim et al. 2017). Nicméně snížení exprese laminu a/c v buňkách RAT2 za užití siRNA proti laminu a/c nepřineslo očekávané snížení množství actin capu. Ba právě naopak, v porovnání s buňkami transfekovanými pomocí kontrolní siRNA měly buňky se sníženou expresí laminu výrazně více actin capu. Konkrétně u buněk kontrolních mělo dokonale vytvořený actin cap 34 % buněk v populaci, zatímco u buněk transfekovaných siRNA proti laminu a/c to bylo téměř 56 %. Buňky zcela netransfekované vykazovaly 61% zastoupení dokonale zformovaného actin capu v populaci.

Domnívali jsme se, že jednou z možných příčin tohoto jevu je to, že i po transfekci bylo možné v buňkách detekovat zbytkové množství laminu a/c. Experiment byl proto jednou zopakován za užití dvojité transfekce. Množství laminu v buňkách se tak povedlo snížit na minimum. Nicméně výsledky kvantifikace množství actin capu v buňkách toto dodatečné snížení exprese téměř neovlivnilo.

Tento výsledek je velmi překvapivý a je tedy možné, že lamin a/c nehraje významnou roli při napojení LINC komplexu na jadernou laminu. Z literatury se zdá, že LINC komplex a lamin a/c by mohly spíše stabilizovat perinukleární vlákna (Kim et al. 2017; Versaavel, Grevesse, and Gabriele 2012).

Další variantou interpretace výsledků je, že i zmíněné velmi malé zbytkové množství laminu v jádře je dostačující k napojení LINC komplexu na jadernou laminu. Kvantifikace přesného procentuálního poklesu exprese laminu a/c v buňkách bohužel nebyla možná z důvodu nefunkční primární protilátky proti laminu a/c při použití na western blotu.

Ohledně výrazného snížení přítomnosti actin capu při porovnání netransfekovaných buněk a buněk transfekovaných pomocí kontrolní siRNA je nutné podotknout, že kontrolní siRNA používaná v naší laboratoři se nezdá být zcela vhodná při studiu formování aktinových vláken v buňce. Opakovaně jsme pozorovali, že buňky transfekované touto siRNA vykazovaly poměrně výrazné narušení tvorby aktinových vláken v porovnání např. s tak zvanou mock transfekcí, tedy transfekcí za užití prázdných komplexů bez siRNA.

### **6.3 Signální dráhy ovlivňující tvorbu actin capu**

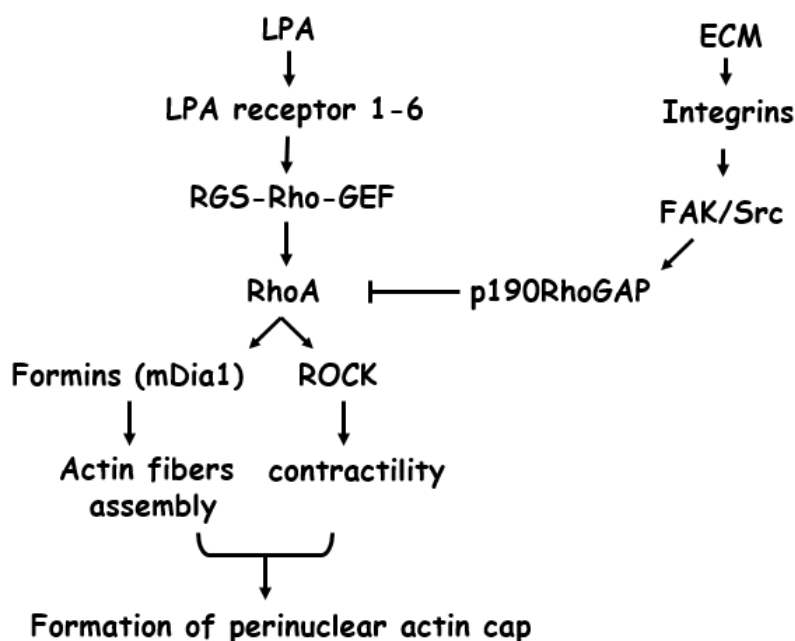
Dále jsem se zaměřila na některé jednotlivé složky dvou signálních drah, u nichž jsme předpokládali, že by měly mít vliv na formování actin capu. První zvolenou signální dráhou je inhibice aktivity GTPázy RhoA prostřednictvím mechanických signálů z ECM skrze integrinové receptory, kinázu fokálních adhezí a p190A-RhoGAP. Druhou dráhou je pak vazba kyseliny lysofosfatidové (LPA) na LPA receptor, následná aktivace RGS-RhoGEF a tím aktivace GTPázy RhoA (Obr. 33).

Vycházelo se z výsledků dosažených v naší laboratoři při studiu pohybu jádra během buněčné polarizace (Maninová 2013, Maninová 2014). Jelikož pohyb jádra závisí na actin capu (Maninová 2016) a zároveň je regulován těmito dvěma antagonistickými signálními drahami (Maninová 2014), předpokládali jsme, že tyto signální dráhy budou regulovat i tvorbu perinukleárního aktinu.

Pracovní model vycházel z výsledků, že actin cap přítomný v konfluentně narostlých buňkách je během polarizace buněk do rýhy rozpuštěn a poté znovu sestaven. Tato přestavba pak vede k typické orientaci actin capu, kdy aktinová vlákna jsou paralelní s osou migrace (Maninová 2016). Předpokládali jsme, že LPA signalizace je nezbytná k tvorbě perinukleárních vláken, jelikož dokáže aktivovat GTPázu RhoA a její aktivátory RGS-RhoGEF. Na druhou stranu, tvorba protruzí během polarizace a migrace do rýhy

může mít za následek akutní adhezi integrinů, aktivaci FAK a p190A-RhoGAP a krátkodobý pokles RhoA aktivity (Maninova, Iwanicki, and Vomastek 2014; Renshaw, Toksoz, and Schwartz 1996). Aktivace signální dráhy integriny-FAK-p190A-RhoGAP tedy může krátkodobě antagonizovat působení LPA a umožnit přeskupení perinukleárních aktinových vláken během buněčné polarizace.

V této práci byla konkrétně zkoumána úloha LPA, kinázy FAK a jednotlivých RhoGEFs v této signální síti.



**Obr. 33:** Dvě námi studované signální dráhy, z nichž jedna vede k aktivaci GTPázy RhoA a druhá k její inaktivaci. Zkoumán byl vliv LPA, FAK a jednotlivých RGS-RhoGEFs na tvorbu actin capu.

Velmi pěkné výsledky přinesl experiment, kdy byla pomocí siRNA snížena exprese kinázy FAK v buňkách RAT2. Zcela dle našeho očekávání byly tyto buňky méně schopné rozložit actin cap během buněčné polarizace. Po 2 hodinách od indukce buněčné polarizace prostřednictvím metody hojení rány (*wound healing assay*) jsme v buňkách se sníženým množstvím kinázy FAK napočítali téměř 59 % buněk s dokonale vytvořeným actin capem. Naproti tomu v buňkách transfekovaných pomocí kontrolní siRNA byl actin cap pozorován pouze u 4 % buněk v populaci.



Po 6 hodinách od vytvoření rýhy vykazovaly buňky s depletovanou kinázou FAK přítomnost actin capu dokonce v 67 % případů, oproti 39 % u buněk kontrolních. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, toto však může být ovlivněno i možným negativním vlivem kontrolní siRNA na formování aktinových vláken v buňce.

I přestože byl experiment z omezených časových důvodů prováděn pouze jednou, a bylo by jistě vhodné jeho zopakování, získané výsledky jsou velmi průkazné. Potvrdili jsme tedy, že působení kinázy FAK umožňuje přestavbu perinukleárních aktinových vláken v buňce. Předpokládáme, že aktivace FAK se pravděpodobně podílí na aktivaci p190A-RhoGAP a následné krátkodobé inaktivaci RhoA. Pokles aktivity RhoA pak umožní rozpad actin capu.

Podobně jednoznačná data jsme získali i při snaze o indukci tvorby vláken actin capu pomocí působení LPA v buňkách, kde byl předtím actin cap rozložen „hladověním“ (*starving*) v bezsérovém médiu. U hladovějících buněk byl actin cap přítomen zhruba u 24 % buněk, zatímco po přidání LPA se jejich množství zvýšilo na 66 % v jednom experimentu, resp. na 48 % při druhém opakování. Role LPA při aktivaci RhoA je tedy neoddiskutovatelná. S ohledem na poměrně velkou odchylku mezi oběma experimenty by pro přesnější statistické vyhodnocení nicméně bylo vhodné ještě minimálně jedno opakování.

Zajímavé je také porovnání experimentů, kdy byla pro indukci znovu vytvoření actin capu použita samotná LPA, a experimentu, kdy byla tvorba actin capu vyvolána pomocí séra (FBS). Po indukci pomocí FBS jsme dosáhli 61% zastoupení buněk s actin capem, což zhruba odpovídá průměru ze dvou experimentů, kdy byla použita pouze LPA. Toto implikuje, že LPA je skutečně centrální složkou séra, která samotná plně dostačuje k tvorbě perinukleárních aktinových vláken.

Vliv LPA na aktivaci RhoA a následně na utváření sítě aktinových vláken v buňce je zprostředkován proteiny ze skupiny RGS-RhoGEF (Tanabe et al. 2004). Který ze tří RhoGEFs obsahujících ve své struktuře tzv. RGS doménu (p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF a LARG) se uplatňuje při samotné aktivaci RhoA, je však zatím neobjasněno. Jedním ze záměrů této práce byla tedy i snaha o porovnání vlivu p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF a LARG na tvorbu actin capu.

Během tohoto experimentu byla za užití siRNA proti jednotlivým RhoGEFs snížena jejich exprese v buňkách a bylo pozorováno, zda snížení množství jednotlivých RhoGEFs má vliv na tvorbu actin capu v buňkách.

Experiment se nám bohužel povedlo provést pouze jednou, při druhém opakování došlo ke značnému poničení buněk vlivem transfekce – buňky měly deformovaná jádra, netypickou morfologii a rozrušený aktinový cytoskelet. Výsledky z prvního experimentu navíc nejsou příliš průkazné. Absence ani jednoho z RhoGEFs nezpůsobila výrazné snížení zastoupení actin capu v buňkách.

Mírné snížení množství actin capu bylo detekováno při použití siRNA proti p115-RhoGEF (pokles na 43 % oproti 50 % v kontrolních buňkách) a PDZ-RhoGEF (pokles na 40 %). Obě skupiny nicméně oproti kontrolním buňkám vykazovaly vyšší zastoupení buněk s nedokonale zformovaným actin capem a pokud bychom tyto dva fenotypy sjednotili, výsledky mezi kontrolní skupinou a skupinami se sníženou expresí PDZ a p115 se neliší již téměř vůbec.

Z těchto výsledků tedy nelze vyvodit žádné závěry a do budoucna bude potřeba experiment ještě několikrát zopakovat.

Pokud bychom obdrželi stejné výsledky i v budoucnu, je možné je interpretovat tak, že jednotlivé RGS-RhoGEFs mohou být při aktivaci RhoA do jisté míry vzájemně zastupitelné. V takovém případě by se nabízelo provedení experimentu, kdy by byla snížena exprese všech tří GEFs naráz, případně vždy po dvojicích.

Pro přesnější zhodnocení nutné přítomnosti zmíněných RhoGEFs pro tvorbu actin capu by navíc pro příště bylo lepší zvolit metodu, při které nejprve dojde k plošnému rozložení actin capu a poté teprve k jeho znovu skládání, tzn. např. během polarizace buněk do rýhy nebo po kultivaci v bezsérovém médiu a znouformování actin capu pomocí LPA. Během námi zvoleného přístupu kultivace buněk na řídko (*sparse*) může být totiž již vytvořený actin cap nesenzitivní vůči depleci jednotlivých RhoGEFs.

Další variantou jak experimentální provedení vylepšit a snížit množství nežádoucích vedlejších vlivů (např. negativní vliv transfekce, nevhodně zvolená kontrolní siRNA, nestejně snížení exprese, apod.) je užití metody CRISPR pro inaktivaci jednotlivých genů (Cong et al. 2013). Tato metoda je však oproti depleci proteinů pomocí siRNA o poznání časově náročnější.

## 7 Závěr

- Perinukleární aktinová vlákna se vyskytují pouze u některých typů mesenchymálních buněk
- Přítomnost perinukleárních aktinových vláken nekoreluje s rychlostí migrace jednotlivých buněčných linií, avšak je možné, že má vliv na směrovanost jejich migrace – přítomnost actin capu částečně koreluje se zvýšenou směrovaností buněčné migrace
- Dle našich výsledků narušení exprese laminu a/c nesnižuje množství actin capu v buňkách
- Bylo potvrzeno, že exprese domény KASH z nesprinu-2 snižuje výskyt actin capu v buňkách
- Aktin vazebná doména CHD z nesprinu-2 se pravděpodobně nepodílí na napojení vláken actin capu na LINC komplex
- Narušení syntézy kinázy FAK znemožňuje rozklad actin capu během buněčné polarizace
- Přítomnost LPA je nezbytná pro tvorbu actin capu v buňkách
- Nebylo zjištěno, který RGS-RhoGEF se podílí na aktivaci RhoA během signalizace vedoucí k tvorbě actin capu

## Seznam použité literatury

- Antoni, D., H. Burckel, E. Josset, and G. Noel. 2015. "Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo." *International Journal of Molecular Sciences* 16 no. 3: 5517-27.
- Aspenstrom, P. 1999. "The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton." *Experimental Cell Research* 246 no. 1: 20-25.
- Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. 2001. "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates." *Nature Cell Biology* 3 no. 5: 466-72.
- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and J. Plastino. 2014. "ACTIN DYNAMICS, ARCHITECTURE, AND MECHANICS IN CELL MOTILITY." *Physiological Reviews* 94 no. 1: 235-63.
- Boulter, E., R. Garcia-Mata, C. Guilluy, A. Dubash, G. Rossi, P. J. Brennwald, and K. Burridge. 2010. "Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1." *Nature Cell Biology* 12 no. 5: 477-U136.
- Boureaux, A., E. Vignal, S. Faure, and P. Fort. 2007. "Evolution of the Rho family of Ras-like GTPases in eukaryotes." *Molecular Biology and Evolution* 24 no. 1: 203-16.
- Brachner, A., and R. Foisner. 2011. "Evolvment of LEM proteins as chromatin tethers at the nuclear periphery." *Biochemical Society Transactions* 39: 1735-41.
- Burke, B., and C. L. Stewart. 2013. "The nuclear lamins: flexibility in function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 no. 1: 13-24.
- Bustos, R. I., M. A. Forget, J. E. Settleman, and S. H. Hansen. 2008. "Coordination of Rho and Rac GTPase Function via p190B RhoGAP." *Current Biology* 18 no. 20: 1606-11.
- Chambliss, A. B., S. B. Khatau, N. Erdenberger, D. K. Robinson, D. Hodzic, G. D. Longmore, and D. Wirtz. 2013. "The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction." *Scientific Reports* 3: 9.
- Chikumi, H., A. Barac, B. Behbahani, Y. Gao, H. Teramoto, Y. Zheng, and J. S. Gutkind. 2004. "Homo- and hetero-oligomerization of PDZ-RhoGEF, LARG and p115RhoGEF by their C-terminal region regulates their in vivo Rho GEF activity and transforming potential." *Oncogene* 23 no. 1: 233-40.
- Chodniewicz, D., and R. L. Klemke. 2004. "Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold." *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1692 no. 2-3: 63-76.
- ChrzanowskaWodnicka, M., and K. Burridge. 1996. "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." *Journal of Cell Biology* 133 no. 6: 1403-15.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. L. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. B. Wu, W. Y. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science* 339 no. 6121: 819-23.
- Cramer, L. P., M. Siebert, and T. J. Mitchison. 1997. "Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: Implications for the generation of motile force." *Journal of Cell Biology* 136 no. 6: 1287-305.
- Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J. B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P. D. Stahl, and D. Hodzic. 2006. "Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex." *Journal of Cell Biology* 172 no. 1: 41-53.
- D'Alessandro, M., K. Hnia, V. Gache, C. Koch, C. Gavriilidis, D. Rodriguez, A. S. Nicot, N. B. Romero, Y. Schwab, E. Gomes, M. Labouesse, and J. Laporte. 2015. "Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus Positioning and Shape by Linking the Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton." *Developmental Cell* 35 no. 2: 186-98.

- de las Heras, J. I., P. Meinke, D. G. Batrakou, V. Srsen, N. Zuleger, A. R. W. Kerr, and E. C. Schirmer. 2013. "Tissue specificity in the nuclear envelope supports its functional complexity." *Nucleus* 4 no. 6: 460-77.
- DerMardirossian, C., and G. M. Bokoch. 2005. "GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation." *Trends in Cell Biology* 15 no. 7: 356-63.
- Dubash, A. D., K. Wennerberg, R. Garca-Mata, M. M. Menold, W. T. Arthur, and K. Burridge. 2007. "A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin." *Journal of Cell Science* 120 no. 22: 3989-98.
- El-Sibai, M., O. Pertz, H. Pang, S. C. Yip, M. Lorenz, M. Symons, J. S. Condeelis, K. M. Hahne, and J. M. Backer. 2008. "RhoA/ROCK-mediated switching between Cdc42- and Rac1-dependent protrusion in MTLn3 carcinoma cells." *Experimental Cell Research* 314 no. 7: 1540-52.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. "Rho GTPases in cell biology." *Nature* 420 no. 6916: 629-35.
- Faix, J., and K. Rottner. 2006. "The making of filopodia." *Current Opinion in Cell Biology* 18 no. 1: 18-25.
- Fehon, R. G., A. I. McClatchey, and A. Bretscher. 2010. "Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 no. 4: 276-87.
- Folsom, T. D., and D. S. Sakaguchi. 1999. "Disruption of actin-myosin interactions results in the inhibition of focal adhesion assembly in *Xenopus* XR1 glial cells." *Glia* 26 no. 3: 245-59.
- Fontao, L., D. Geerts, I. Kuikman, J. Koster, D. Kramer, and A. Sonnenberg. 2001. "The interaction of plectin with actin: evidence for cross-linking of actin filaments by dimerization of the actin-binding domain of plectin." *Journal of Cell Science* 114 no. 11: 2065-76.
- Fukuhara, S., H. Chikumi, and J. S. Gutkind. 2001. "RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho?" *Oncogene* 20 no. 13: 1661-68.
- Gandalovicova, A., D. Rosel, M. Fernandes, P. Vesely, P. Heneberg, V. Cermak, L. Petruzelka, S. Kumar, V. Sanz-Moreno, and J. Brabek. 2017. "Migrastatics-Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges." *Trends in Cancer* 3 no. 6: 391-406.
- Gandalovicova, A., T. Vomastek, D. Rosel, and J. Brabek. 2016. "Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness." *Oncotarget* 7 no. 18: 25022-49.
- Garcia-Mata, R., E. Boulter, and K. Burridge. 2011. "The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 no. 8: 493-504.
- Gardel, M. L., I. C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, and C. M. Waterman. 2010. "Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration." In *Annual Review of Cell and Developmental Biology, Vol 26*, ed. R. Schekman, L. Goldstein and R. Lehmann. Palo Alto: Annual Reviews.
- Goicoechea, S. M., S. Awadia, and R. Garcia-Mata. 2014. "I'm coming to GEF you Regulation of RhoGEFs during cell migration." *Cell Adhesion & Migration* 8 no. 6: 535-49.
- Grande-Garcia, A., A. Echarri, and M. A. Del Pozo. 2005. "Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting." *Biochemical Society Transactions* 33: 609-13.
- Grashoff, C., B. D. Hoffman, M. D. Brenner, R. B. Zhou, M. Parsons, M. T. Yang, M. A. McLean, S. G. Sligar, C. S. Chen, T. Ha, and M. A. Schwartz. 2010. "Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics." *Nature* 466 no. 7303: 263-U143.
- Guo, Y. X., Y. Kim, T. Shimi, R. D. Goldman, and Y. X. Zheng. 2014. "Concentration-dependent lamin assembly and its roles in the localization of other nuclear proteins." *Molecular Biology of the Cell* 25 no. 8: 1287-97.
- Gupton, S. L., K. Eisenmann, A. S. Alberts, and C. M. Waterman-Storer. 2007. "mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration." *Journal of Cell Science* 120 no. 19: 3475-87.
- Haeger, A., K. Wolf, M. M. Zegers, and P. Friedl. 2015. "Collective cell migration: guidance principles and hierarchies." *Trends in Cell Biology* 25 no. 9: 556-66.
- Haque, F., D. J. Lloyd, D. T. Smallwood, C. L. Dent, C. M. Shanahan, A. M. Fry, R. C. Trembath, and S. Shackleton. 2006. "SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to

- provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton." *Molecular and Cellular Biology* 26 no. 10: 3738-51.
- Harris, B. Z., and W. A. Lim. 2001. "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." *Journal of Cell Science* 114 no. 18: 3219-31.
- He, S. J., and B. H. Ji. 2017. "Mechanics of Cell Mechanosensing in Protrusion and Retraction of Lamellipodium." *Acs Biomaterials Science & Engineering* 3 no. 11: 2943-53.
- Hotulainen, P., and P. Lappalainen. 2006. "Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells." *Journal of Cell Biology* 173 no. 3: 383-94.
- Iwanicki, M. P., T. Vomastek, R. W. Tilghman, K. H. Martin, J. Banerjee, P. B. Wedegaertner, and J. T. Parsons. 2008. "FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and trailing-edge retraction in fibroblasts." *Journal of Cell Science* 121 no. 6: 895-905.
- Jayo, A., M. Malboubi, S. Antoku, W. Chang, E. Ortiz-Zapater, C. Groen, K. Pfisterer, T. Tootle, G. Charras, G. G. Gundersen, and M. Parsons. 2016. "Fascin Regulates Nuclear Movement and Deformation in Migrating Cells." *Developmental Cell* 38 no. 4: 371-83.
- Ketema, M., M. Kreft, P. Secades, H. Janssen, and A. Sonnenberg. 2013. "Nesprin-3 connects plectin and vimentin to the nuclear envelope of Sertoli cells but is not required for Sertoli cell function in spermatogenesis." *Molecular Biology of the Cell* 24 no. 15: 2454-66.
- Khatau, S. B., R. J. Bloom, S. Bajpai, D. Razafsky, S. Zang, A. Giri, P. H. Wu, J. Marchand, A. Celedon, C. M. Hale, S. X. Sun, D. Hodzic, and D. Wirtz. 2012. "The distinct roles of the nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in three-dimensional cell migration." *Scientific Reports* 2: 11.
- Khatau, S. B., C. M. Hale, P. J. Stewart-Hutchinson, M. S. Patel, C. L. Stewart, P. C. Searson, D. Hodzic, and D. Wirtz. 2009. "A perinuclear actin cap regulates nuclear shape." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 no. 45: 19017-22.
- Kim, D. H., A. B. Chambliss, and D. Wirtz. 2013. "The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction." *Soft Matter* 9 no. 23: 5516-23.
- Kim, D. H., S. B. Khatau, Y. F. Feng, S. Walcott, S. X. Sun, G. D. Longmore, and D. Wirtz. 2012. "Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing." *Scientific Reports* 2: 13.
- Kim, J. K., A. Louhghalam, G. Lee, B. W. Schafer, D. Wirtz, and D. H. Kim. 2017. "Nuclear lamin A/C harnesses the perinuclear apical actin cables to protect nuclear morphology." *Nature Communications* 8: 13.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. H. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-Associated kinase (Rho-kinase)." *Science* 273 no. 5272: 245-48.
- King, M. C., T. G. Drivas, and G. Blobel. 2008. "A network of nuclear envelope membrane proteins linking centromeres to microtubules." *Cell* 134 no. 3: 427-38.
- Klimova, Z., V. Braborec, M. Maninova, J. Caslavsky, M. J. Weber, and T. Vomastek. 2016. "Symmetry breaking in spreading RAT2 fibroblasts requires the MAPK/ERK pathway scaffold RACK1 that integrates FAK, p190A-RhoGAP and ERK2 signaling." *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1863 no. 9: 2189-200.
- Kutscheidt, S., R. J. Zhu, S. Antoku, G. W. G. Luxton, I. Stagljar, O. T. Fackler, and G. G. Gundersen. 2014. "FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement." *Nature Cell Biology* 16 no. 7: 708-+.
- Lauffenburger, D. A., and A. F. Horwitz. 1996. "Cell migration: A physically integrated molecular process." *Cell* 84 no. 3: 359-69.
- Laukaitis, C. M., D. J. Webb, K. Donais, and A. F. Horwitz. 2001. "Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells." *Journal of Cell Biology* 153 no. 7: 1427-40.
- Lee, Z., C. T. Cheng, H. L. Zhang, M. A. Subler, J. H. Wu, A. Mukherjee, J. J. Windle, C. K. Chen, and X. J. Fang. 2008. "Role of LPA(4)/p2y9/GPR23 in Negative Regulation of Cell Motility." *Molecular Biology of the Cell* 19 no. 12: 5435-45.

- Li, Z. Q., L. Lu, S. J. Liu, W. J. Wu, L. Zhao, and Y. S. Hao. 2017. "Inhibition of proliferation and migration of osteosarcoma cells U2OS by phenformin." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 10 no. 8: 11969-76.
- Lietha, D., X. M. Cai, D. F. J. Ceccarelli, Y. Q. Li, M. D. Schaller, and M. J. Eck. 2007. "Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase." *Cell* 129 no. 6: 1177-87.
- Liu, B. P., and K. Burridge. 2000. "Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta 1 integrins." *Molecular and Cellular Biology* 20 no. 19: 7160-69.
- Liu, L. L., Q. Luo, J. H. Sun, and G. B. Song. 2016. "Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration." *Experimental Cell Research* 348 no. 1: 56-65.
- Lombardi, M. L., D. E. Jaalouk, C. M. Shanahan, B. Burke, K. J. Roux, and J. Lammerding. 2011. "The Interaction between Nesprins and Sun Proteins at the Nuclear Envelope Is Critical for Force Transmission between the Nucleus and Cytoskeleton." *Journal of Biological Chemistry* 286 no. 30: 26743-53.
- Lund, E., A. R. Oldenburg, E. Delbarre, C. T. Freberg, I. Duband-Goulet, R. Eskeland, B. Buendia, and P. Collas. 2013. "Lamin A/C-promoter interactions specify chromatin state-dependent transcription outcomes." *Genome Research* 23 no. 10: 1580-89.
- Luxton, G. W. G., E. R. Gomes, E. S. Folker, E. Vintinner, and G. G. Gundersen. 2010. "Linear Arrays of Nuclear Envelope Proteins Harness Retrograde Actin Flow for Nuclear Movement." *Science* 329 no. 5994: 956-59.
- Ma, A. D., and C. S. Abrams. 1999. "Pleckstrin induces cytoskeletal reorganization via a Rac-dependent pathway." *Journal of Biological Chemistry* 274 no. 40: 28730-35.
- Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G. L. Johnson, K. M. Hahn, and G. Danuser. 2009. "Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion." *Nature* 461 no. 7260: 99-103.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno, and S. Narumiya. 1999. "Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* 285 no. 5429: 895-98.
- Maninova, M., J. Caslavsky, and T. Vomastek. 2017. "The assembly and function of perinuclear actin cap in migrating cells." *Protoplasma* 254 no. 3: 1207-18.
- Maninova, M., M. P. Iwanicki, and T. Vomastek. 2014. "Emerging role for nuclear rotation and orientation in cell migration." *Cell Adhesion & Migration* 8 no. 1: 42-48.
- Maninova, M., Z. Klimova, J. T. Parsons, M. J. Weber, M. P. Lwanicki, and T. Vomastek. 2013. "The Reorientation of Cell Nucleus Promotes the Establishment of Front-Rear Polarity in Migrating Fibroblasts." *Journal of Molecular Biology* 425 no. 11: 2039-55.
- Maninova, M., and T. Vomastek. 2016. "ZE Dorsal stress fibers, transverse actin arcs, and perinuclear actin fibers form an interconnected network that induces nuclear movement in polarizing fibroblasts." *Febs Journal* 283 no. 20: 3676-93.
- Maniotis, A. J., C. S. Chen, and D. E. Ingber. 1997. "Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 no. 3: 849-54.
- Martin, K., A. Reimann, R. D. Fritz, H. Ryu, N. L. Jeon, and O. Pertz. 2016. "Spatio-temporal coordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics." *Scientific Reports* 6: 14.
- Mayor, R., and S. Etienne-Manneville. 2016. "The front and rear of collective cell migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 no. 2: 97-109.
- McHardy, L. M., K. Warabi, R. J. Andersen, C. D. Roskelley, and M. Roberge. 2005. "Strongylophorine-26, a Rho-dependent inhibitor of tumor cell invasion that reduces actin stress fibers and induces nonpolarized lamellipodial extensions." *Molecular Cancer Therapeutics* 4 no. 5: 772-78.
- Mitra, S. K., and D. D. Schlaepfer. 2006. "Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells." *Current Opinion in Cell Biology* 18 no. 5: 516-23.

- Nobes, C. D., and A. Hall. 1995. "RHO, RAC, AND CDC42 GTPASES REGULATE THE ASSEMBLY OF MULTIMOLECULAR FOCAL COMPLEXES ASSOCIATED WITH ACTIN STRESS FIBERS, LAMELLIPODIA, AND FILOPODIA." *Cell* 81 no. 1: 53-62.
- Nobes, C. D., and A. Hall. 1999. "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." *Journal of Cell Biology* 144 no. 6: 1235-44.
- Oda, T., M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maeda, and A. Narita. 2009. "The nature of the globular-to fibrous-actin transition." *Nature* 457 no. 7228: 441-45.
- Pankov, R., Y. Endo, S. Even-Ram, M. Araki, K. Clark, E. Cukierman, K. Matsumoto, and K. M. Yamada. 2005. "A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration." *Journal of Cell Biology* 170 no. 5: 793-802.
- Patel, R. A., Y. Liu, B. Wang, R. Li, and S. M. Sebt. 2014. "Identification of novel ROCK inhibitors with anti-migratory and anti-invasive activities." *Oncogene* 33 no. 5: 550-55.
- Pellegrin, S., and H. Mellor. 2007. "Actin stress fibres." *Journal of Cell Science* 120 no. 20: 3491-99.
- Pollitt, A. Y., and R. H. Insall. 2009. "WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly." *Journal of Cell Science* 122 no. 15: 2575-78.
- Prager-Khoutorsky, M., A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger, and A. D. Bershadsky. 2011. "Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing." *Nature Cell Biology* 13 no. 12: 1457-U178.
- Premkumar, L., A. A. Bobkov, M. Patel, L. Jaroszewski, L. A. Bankston, B. Stec, K. Vuori, J. F. Cote, and R. C. Liddington. 2010. "Structural Basis of Membrane Targeting by the Dock180 Family of Rho Family Guanine Exchange Factors (Rho-GEFs)." *Journal of Biological Chemistry* 285 no. 17: 13211-22.
- Rajgor, D., J. A. Mellad, F. Autore, Q. P. Zhang, and C. M. Shanahan. 2012. "Multiple Novel Nesprin-1 and Nesprin-2 Variants Act as Versatile Tissue-Specific Intracellular Scaffolds." *Plos One* 7 no. 7: 15.
- Rajgor, D., and C. M. Shanahan. 2013. "Nesprins: from the nuclear envelope and beyond." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 15: 17.
- Reiske, H. R., S. C. Kao, L. A. Cary, J. L. Guan, J. F. Lai, and H. C. Chen. 1999. "Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration." *Journal of Biological Chemistry* 274 no. 18: 12361-66.
- Ren, X. D., W. B. Kiosses, and M. A. Schwartz. 1999. "Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton." *Embo Journal* 18 no. 3: 578-85.
- Renshaw, M. W., D. Toksoz, and M. A. Schwartz. 1996. "Involvement of the small GTPase Rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase." *Journal of Biological Chemistry* 271 no. 36: 21691-94.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz. 2003. "Cell migration: Integrating signals from front to back." *Science* 302 no. 5651: 1704-09.
- Rober, R. A., K. Weber, and M. Osborn. 1989. "DIFFERENTIAL TIMING OF NUCLEAR LAMIN A/C EXPRESSION IN THE VARIOUS ORGANS OF THE MOUSE EMBRYO AND THE YOUNG ANIMAL - A DEVELOPMENTAL-STUDY." *Development* 105 no. 2: 365-78.
- Roof, R. W., M. D. Haskell, B. D. Dukes, N. Sherman, M. Kinter, and S. J. Parsons. 1998. "Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation." *Molecular and Cellular Biology* 18 no. 12: 7052-63.
- Roux, K. J., M. L. Crisp, Q. Liu, D. Kim, S. Kozlov, C. L. Stewart, and B. Burke. 2009. "Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 no. 7: 2194-99.
- Schirmer, E. C., L. Florens, T. L. Guan, J. R. Yates, and L. Gerace. 2003. "Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics." *Science* 301 no. 5638: 1380-82.



- Shimi, T., K. Pflieger, S. I. Kojima, C. G. Pack, I. Solovei, A. E. Goldman, S. A. Adam, D. K. Shumaker, M. Kinjo, T. Cremer, and R. D. Goldman. 2008. "The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription." *Genes & Development* 22 no. 24: 3409-21.
- Siehl, S. 2009. "Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors." *British Journal of Pharmacology* 158 no. 1: 41-49.
- Sosa, B. A., A. Rothballer, U. Kutay, and T. U. Schwartz. 2012. "LINC Complexes Form by Binding of Three KASH Peptides to Domain Interfaces of Trimeric SUN Proteins." *Cell* 149 no. 5: 1035-47.
- Stengel, K., and Y. Zheng. 2011. "Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis." *Cellular Signalling* 23 no. 9: 1415-23.
- Stewart-Hutchinson, P. J., C. M. Hale, D. Wirtz, and D. Hodzic. 2008. "Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness." *Experimental Cell Research* 314 no. 8: 1892-905.
- Stoffler, D., B. Fahrenkrog, and U. Aebi. 1999. "The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics." *Current Opinion in Cell Biology* 11 no. 3: 391-401.
- Takenawa, T., and H. Miki. 2001. "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." *Journal of Cell Science* 114 no. 10: 1801-09.
- Tanabe, S., B. Kreutz, N. Suzuki, and T. Kozasa. 2004. "Regulation of RGS-RhoGEFs by G alpha 12 and G alpha 13 proteins." *Regulators of G-Protein Signaling, Pt B* 390: 285-94.
- Tilghman, R. W., J. K. Slack-Davis, N. Sergina, K. H. Martin, M. Iwanicki, E. D. Hershey, H. E. Beggs, L. F. Relchardt, and J. T. Parsons. 2005. "Focal adhesion kinase is required for the spatial organization of the leading edge in migrating cells." *Journal of Cell Science* 118 no. 12: 2613-23.
- Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen. 2012. "Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles." *Journal of Cell Science* 125 no. 8: 1855-64.
- Tojkander, S., G. Gateva, G. Schevzov, P. Hotulainen, P. Naumanen, C. Martin, P. W. Gunning, and P. Lappalainen. 2011. "A Molecular Pathway for Myosin II Recruitment to Stress Fibers." *Current Biology* 21 no. 7: 539-50.
- Valerius, N. H., O. Stendahl, J. H. Hartwig, and T. P. Stossel. 1981. "DISTRIBUTION OF ACTIN-BINDING PROTEIN AND MYOSIN IN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES DURING LOCOMOTION AND PHAGOCYTOSIS." *Cell* 24 no. 1: 195-202.
- Van Troys, M., L. Huyck, S. Leyman, S. Dhaese, J. Vandekerckhove, and C. Ampe. 2008. "Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation." *European Journal of Cell Biology* 87 no. 8-9: 649-67.
- Versaevol, M., T. Grevesse, and S. Gabriele. 2012. "Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells." *Nature Communications* 3: 11.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B. M. Jockusch, and S. Narumiya. 1997. "p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." *Embo Journal* 16 no. 11: 3044-56.
- Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. "Regulation of microtubules in cell migration." *Trends in Cell Biology* 15 no. 2: 76-83.
- Wilhelmsen, K., S. H. M. Litjens, I. Kuikman, N. Tshimbalanga, H. Janssen, I. van den Bout, K. Raymond, and A. Sonnenberg. 2005. "Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin." *Journal of Cell Biology* 171 no. 5: 799-810.
- Wilkinson, S., H. F. Paterson, and C. J. Marshall. 2005. "Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion." *Nature Cell Biology* 7 no. 3: 255-U45.

- Yang, C., L. Czech, S. Gerboth, S. I. Kojima, G. Scita, and T. Svitkina. 2007. "Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells." *Plos Biology* 5 no. 11: 2624-45.
- Zachary, I., and E. Rozengurt. 1992. "FOCAL ADHESION KINASE (P125(FAK)) - A POINT OF CONVERGENCE IN THE ACTION OF NEUROPEPTIDES, INTEGRINS, AND ONCOGENES." *Cell* 71 no. 6: 891-94.
- Zemel, A., F. Rehfeldt, A. E. X. Brown, D. E. Discher, and S. A. Safran. 2010. "Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells." *Nature Physics* 6 no. 6: 468-73.
- Zhang, Q. P., C. Ragnauth, M. J. Greener, C. M. Shanahan, and R. G. Roberts. 2002. "The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300." *Genomics* 80 no. 5: 473-81.