

Přírodovědecká fakulta university Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie

Bakalářská práce

**Lokalizace aktinu a aktin vazebných proteinů
v buněčném jádře**

Jakub Kukla

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.



2007/2008

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně, na základě uvedené literatury .

V Praze dne 14.4.2008

Jakub Kukla

Použité zkratky:

PSF... polypyrimidine-tract-binding-proteinassociated splicing factor

NonO ...non-pousdomain octamer-binding protein

snRNP... small nuclear ribonucleoproteins

hnRNP... heterogeneous ribonucleoprotein particles

ARPs... actin related proteins

FRAP ... fluorescence recovery after photobleaching

CBs ... Cajal bodies

N-WASP... neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein

NLS... nuclear localization signal

DHT... dihydrotestosterone

Obsah

1. Abstrakt/Abstract	5-6
2. Úvod	7-8
3. Aktin	
3.1. Struktura aktinu	8-9
3.2. Stavba mikrofilament	9
3.3. Dynamika aktinu	9-10
3.4. Lokalizace aktinu v buněčném jádře	10-12
3.5. Polymerní forma aktinu v jádře?	13-15
4. Aktin vazebné proteiny	
4.1. Aktin vazebné proteiny	16
4.1.1. Aktin vazebné proteiny lokalizované v jádře	17
4.1.1.1. Profilin	17-18
4.1.1.2. Thymosin.....	18
4.1.1.3. ADF/Cofilin.....	18-19
4.1.1.4. CapZ	19-20
4.1.1.5. Gelsolin.....	20
4.1.1.6. Myopodin.....	20-21
4.1.1.7. Aktinin.....	21
4.1.1.8. Filamin A.....	21
4.1.1.9. Spektrin.....	22
5. Závěr	23-25
6. Perspektivy	26
7. Seznam literatury.....	27-33
8. Poděkování.....	34

1. Abstrakt

Až do nedávna byl aktin v buněčném jádře nejasným tématem. Nyní je účast β -isoformy aktinu v jaderných procesech brána jako skutečnost. Aktin je důležitou molekulou pro řádnou funkci všech tří typů RNA-polymeráz, spolu s některými aktin vazebními proteiny byl nalezen v chromatin remodelačních komplexech, kde stimuluje ATPasovou aktivitu jejich podjednotek. Dále se předpokládá, že je důležitý v procesu úpravy a transportu mRNA. Kromě aktinu byla v jádře lokalizována celá řada aktin vazebních proteinů, přičemž u některých z nich byla prokázána souvislost s regulací transkripce či opravě DNA. Pokud některé z funkcí aktinu v jádře vyžadují polymerní formu, není zatím jasné. Avšak existují experimenty, které navrhují úlohu komplexu aktin-myosin v jádře, například v jaderném transportu mRNA nebo malých podjednotek ribosomů. V takovém případě by byla přítomnost filamentární formy aktinu opodstatněná. I když nevíme v jakých formách se aktin v jádře vyskytuje, musí být jeho dynamika velmi důsledně regulována. Ukázalo se totiž, že mnoho aktin vazebních proteinů, uplatňujících se v regulaci dynamiky aktinu v cytoplasmě, rovněž migruje do buněčného jádra. Aby bylo možné dělat závěry ohledně funkce jaderného aktinu a aktin vazebních proteinů, je potřeba nejdříve začít s odkrýváním všech neznámých vazebních partnerů. Pro tento účel by byla nejsnažší cesta pomocí imunoprecipitací, imunofluorescenčních metod, elektronové mikroskopie a exprese mutovaných forem zkoumaných proteinů.

Klíčová slova:

jaderný aktin, aktin vazebné proteiny, buněčné jádro, jaderná matrix, transkripce

Abstract

A question of actin in cell nucleus was unclear topic till recent time. Today it is taken as a fact that actin β-isoform is involved in nuclear processes. Actin is important molecule for proper function of all three RNA polymerases, it was spotted together with some actin binding proteins as a part of chromatin-remodelling complexes, where it stimulates ATPase activity of their subunits. Further it is supposed that actin is involved in processing and nuclear transport of mRNA. Except actin the whole plethora of actin binding proteins was localized to the cell nucleus. In case of some of them the connection to transcription regulation was shown. If there is any function in nucleus which involves a polymeric form of actin is not known for this time. Though there are some experiments which propose the role of actin-myosin complex in nucleus, perhaps in nuclear transport of mRNA or small ribosomal subunits. In such a case the existence of polymeric form of actin would be well-founded. Even when we do not know what forms of actin can be found in nucleus, its dynamics has to be tightly regulated. It has been shown that many of actin binding proteins, involved in control of the actin dynamics, shuttle between cytoplasm and nucleoplasm. So far we want make conclusions about function of nuclear actin and actin binding proteins, we have to start with identifying all of the unknown binding partners. For such a procedure would be the simplest approach to start with immunoprecipitations, immunofluorescence methods, electron microscopy and expression of mutated forms of the investigated proteins.

Key words:

nuclear actin, actin-binding proteins, cell nucleus, nuclear matrix, transcription

2. Úvod

Aktin je molekulou v prvé řadě známou díky své úloze při svalové kontrakci, kde je spolu s myosinem základní složkou kontraktilelního aparátu. Další jeho funkce v buňce vyplývají ze skutečnosti, že je součástí cytoskeletu. Cytoskeletální systém, v tomto případě tvořen aktinovými mikrofilamenty, hraje roli při pohybu transportních váčků skrz buňku, pohybu buněk, buněčném dělení a zpevňování buněčných struktur. Jeho známé funkce byly až do nedávna omezeny pouze na cytoplasmický prostor. I když se již v 70. a 80. letech dvacátého století objevovaly první zprávy o jeho lokalizaci v jaderném kompartmentu (Clark, Meriam , 1977; Bremer et. al., 1981; Peters et. al., 1982 ; Nakayasu, Ueda, 1983 ; Nakayasu, Ueda, 1985), nedočkaly se tyto články velké odezvy a aktin v jádře zůstaval stále nejasným tématem. Tyto experimenty nebyly oceněny uznáním od většiny odborné veřejnosti vzhledem k možné kontaminaci jaderné frakce cytoplasmickým aktinem. Ke skepticismu také přispěla skutečnost, že jaderný aktin nelze vizualizovat pomocí phalloidinu, který je k lokalizaci aktinu v cytoplasmě hojně využíván. Ovšem to může být například tím, že vazebná místa pro phalloidin jsou nedostupná, nebo jsou aktinová filamenta příliš krátká. Rostoucí počet experimentů prokazující přítomnost aktinu a aktin vazebných proteinů v jádře, které jsou shrnuty v uvedených review (Pederson, Aebi, 2002; Bettinger et. al. , 2004; Olave et. al., 2002; Uribe, Jaz, 2007), pomalu ale jistě prolomil negativní postoj odborné veřejnosti. Myšlenka aktinu v jádře otevřela tak další prostor k bádání ohledně role jaderného aktinu a aktin vazebných proteinů, které by mohly být pro buňku strategicky důležité jako regulátory dostupnosti aktinu pro jaderné funkce.

Nabízejí se dvě zásadní otázky a to:

S jakými molekulami aktin a aktin vazebné proteiny v jádře kolokalizují?

Vyskytuje se aktin v jádře jako monomer, nebo ho tu najdeme i ve filamentární formě?

Na výše zmíněné otázky jsem se v této rešerži snažil najít odpověď a ukázat na současné hypotézy ohledně funkce jaderného aktinu a aktin vazebních proteinů, které v tomto kompartmentu jistě můžou hrát, s ohledem na přítomnost aktinu, svou neméně významnou roli při regulaci jaderných dějů, se kterými je aktin ať přímo či nepřímo svázán. Zaměřil jsem se především na buňky živočišné, na buňky savců, člověka. Vzhledem k tomu, že existuje řada proteinů, které se váží k aktinu, rozepsal jsem se v této práci jen o několika z nich. Některé z nich jsou také předmětem současného výzkumu v laboratoři Biologie buněčného jádra na ústavu molekulární genetiky AVČR pod vedením prof. Pavla Hozáka.

3. Aktin

3.1. Struktura aktinu

Aktin je protein účastnící se mnoha důležitých biologických procesů. Je to globulární protein o velikosti téměř 42 kDa. Patří mezi vysoce konzervované proteiny lišící se od sebe jen nepatrně, pokud sledujeme jeho zástupce od řas až k člověku. U vyšších eukaryot bylo zjištěno několik až desítky genů pro aktin. U člověka byly identifikovány 3 základní isoformy aktinu zapisované jako α , β a γ . α -aktin se vyskytuje výhradně ve svalových buňkách, zatímco β -aktin a γ -aktin i v buňkách nesvalových (Herman, 1993). Hmotnostní spektrometrií (Jonsson et. al., 2001) z jaderné frakce bylo určeno, že aktin v jádře je isoforma β . Aktin se vyskytuje ve dvou formách zvaných G a F-aktin, mezi nimiž může přecházet. Jeho nepolymerizovaná forma jsou globulární bílkoviny aktinu (G-aktin) zatímco polymerní forma je tvořena mnoha propojenými aktinovými molekulami a vytváří tak filamentum. Takto poskládané aktinové molekuly nazýváme filamentární formou aktinu, tedy F-aktinem.

Konformace monomerního aktinu (actin fold) je dobře známa. Právě actin fold je strukturou spojující aktin a aktinu podobné proteiny (actin related proteins) do jedné velké nadrodiny aktinu. Bylo identifikováno 11 podrodin aktinu podobných proteinů (Arps), do nichž byly Arps zařazeny podle sekvenční podobnosti s aktinem (Muller et. al., 2005). Na globulární molekule aktinu rozlišujeme 2 velké domény, které se ještě dále dělí na dvě subdomény. Actin fold je konformací umožňující správnou ATPasovou funkci vytvořením ATP-vazebné kapsy uprostřed molekuly. Mezi jeho důležité vlastnosti patří vazba a hydrolýza ATP a s tím související tvorba a rozpad aktinových vláken. Pro jeho řádnou funkci jsou též zapotřebí Mg^{2+} ionty. Každá molekula G-aktinu má jedno vazebné místo pro ATP,

které je situováno uprostřed molekuly a směrováno k mínu konci pokud je inkorporován do aktinového filamenta.

Podíl aktinu na celkovém množství proteinů v buňce je až 5 %, ve svalových buňkách může jeho zastoupení dosáhnout hodnoty až 10% z celkového množství proteinů v buňce. Koncentrace aktinu v nesvalových buňkách se pohybuje od 0.1 do 0.5 mM. Ve specializovaných strukturách jako jsou mikroplýky to může být až 5 mM.

3.2. Stavba mikrofilament

Mikrofilamenta vznikají díky velkému množství nekovalentních interakcí, kdy dochází k překládání aktinových monomerů k sobě za vzniku F-aktinu, tedy jeho polymerní formy. Mikrofilamenta jsou tvořena dvěma vlákny F-aktinu, které jsou okolo sebe obtočené. Tloušťka mikrofilamenta tvořeného dvojicí okolo sebe ovinutých aktinových vláken je přibližně 7 nm. Jejich délka je proměnlivá v závislosti na fyziologickém stavu buňky a mohou dosahovat délky až v řádech mikrometrů. Mikrofilamenta jsou polárními strukturami, kde je možné rozlišit tzv. plus a minus konec. Plus koncem nazýváme tu část filamenta, kde přidávání dalších aktinových monomerů probíhá rychleji než na druhém, minus konci. Aktinová mikrofilamenta vyžadují při svém vzniku a dalšímu větvení přítomnost ARPs (actin related proteins). Například komplex ARP 2/3 poskytuje počátek z kterého probíhá napojování dalších, už aktinových, podjednotek mikrofilamenta. V případě větvených mikrofilament je v určitých oblastech inkorporován komplex Arp2/3, který umožňuje, svým podélným přiložením k filamentu a následnou adicí dalších aktinových podjednotek k sobě, tvorbu větvení aktinového vlákna, kdy bočné vlákno se od "mateřského" odchyluje o 70°. Takovým způsobem pak mohou vznikat různě složité sítě, k jejichž dokonalosti a zpevnění pak přispívají aktin vazebné proteiny jako například filamin , α -actinin nebo fimbrin.

3.3. Dynamika aktinu

V cytoplazmě eukaryotických buněk bývá 50% aktinu v G-formě a 50% v F-formě. Přidávání aktinových podjednotek do mikrofilamenta je buňkou řízeno dle potřeby pomocí aktin vazebných proteinů, které svojí přítomností zvyšují či snižují kritickou koncentraci aktinu, což je právě taková koncentrace aktinu, která je nutná pro jeho polymeraci a tvorbu mikrofilament. Filament treadmiling je proces popisující dynamiku aktinového vlákna, kdy nedochází k změně celkové délky, ale k rovnovážnému stavu, kde se počet monomerů přidaných k plus konci vyrovná počtu monomerů aktinu opuštějících minus konec.

Mezi aktin vazebné proteiny uplatňující se v regulaci dynamiky aktinu patří profilin a thymosin. Thymosin vyvazuje aktinové monomery, tím znemožňuje polymeraci do F-aktinu a zároveň brání hydrolyze či výměně vázaného nukleotidu. Naopak profilin kompetuje s thymosinem o aktinové monomery a pokud monomery naváže, blokuje místo kterým by se normálně mohly vázat k minus konci a tím způsobuje adici aktinových monomerů přednostně k plus konci, tedy podporuje růst F-aktinu. Po navázání aktin-profilinového komplexu k F-aktinu dojde k vlivem změny konformace k oslabení vazby mezi profilinem a aktinem a následnému uvolnění profilinu. Po přidání aktinových podjednotek do filamenta dochází po určité době k hydrolyze vázaného ATP a vzniku ADP-F-aktinu, jehož přítomnost činí danou oblast méně stabilní a je příčinou postupného rozpadu mikrofilamenta. U rostoucího mikrofilamenta můžeme tedy najít na rostoucím, plus-konci, ATP-F-aktin neboť nově navázané aktinové podjednotky ještě nestihly hydrolyzovat ATP zatímco co zbytek "starého" filamenta je tvořen již ADP-aktinem. Mikrofilamenta *in vivo* procházejí velmi rychlými změnami v růstu. Jednu chvíli rostou rychle, jindy se zastaví a nebo dojde k jejich rapidnímu odbourání. Tyto děje jsou buňkou velice dobře regulovány pomocí aktin vazebních proteinů. Mezi další aktin vazebné proteiny, ovlivňující aktinovou dynamiku, patří takové, které se váží podél filamenta (tropomyosin, cofilin) nebo se připojují ke koncům filamenta. Jako příklad lze uvést proteiny CapZ a tropomodulin, kde CapZ se váže k plus konci a tropomodulin k minus konci F-aktinu. Vliv těchto aktin vazebních proteinů je buď stabilizační (tropomyosin) nebo urychlují rozpad aktinového vlákna (cofilin). Aktin vazebné proteiny lze rozdělit do několika skupin, podle toho jakým způsobem se váží k aktinu. Jednou skupinou jsou proteiny přikládající se podélně k aktinovému filamentu (gelsolin, Arp2/3 complex), další skupinou jsou tzv. čapkovací proteiny (z angl. capping proteins), neboli proteiny připojující se ke koncům filament (capZ, tropomodulin) a poslední skupinou jsou takové, které váží monomery aktinu a regulují tak jejich dostupnost pro polymeraci do filament (thymosin, profilin).

3.4. Lokalizace aktinu v buněčném jádře

Aktin je nezbytnou součástí eukaryotického buněčného skeletu, který slouží k přepravě transportních váčků, adhezi buněk, k buněčnému pohybu, poskytuje mechanickou oporu buňce, pomáha při dělení buněk a je zahrnut v buněčné signalizaci. Přesvědčivé důkazy o přítomnosti aktinu v jádře způsobily rozšíření úlohy aktinu i na jaderné procesy. Bylo dokázáno, že aktin je součástí některých chromatin remodelačních komplexů (Chen and Shen, 2007). Tyto komplexy svou aktivitou mění architekturu nukleosomů a způsobují tak buď lokální rozvolnění chromatinu, nebo jeho kondenzaci. Svojí aktivitou tedy

přispívají k regulaci transkripce a to buď tak že kovalentně modifikují N-terminální části histonů (například histon acetyltransferasy), nebo interferují s vazbou histon-DNA (SWI/SNF rodina chromatin-remodelujících komplexů).

Aktin je spolu s BAF53 důležitou podjednotkou lidského SWI/SNF-like BAF chromatin-remodelačního komplexu, kde je důležitý pro optimální ATPasovou aktivitu Brg1 podjednotky komplexu (Zhao, 1998; Shen et. al., 2003). BAF53 spolu s aktinem byly nalezeny i v TIP60 komplexu, který patří mezi histon acetyltransferasy (Ikura et.al., 2000). Dále byla v buňkách kvasinek prokázána asociace aktinu a některých ARPs s INO80 chromatin-remodelačním komplexem (ARP4,5,8) (Shen et.al.,2000) a NuA4 HAT komplexem (ARP4) (Galarneau et. al.,2000). Ve všech výše zmíněných případech se autoři domnívají, že aktin tvoří důležitý strukturní prvek komplexu a vyskytuje se zde jako monomer.

Tabulka č.1 podává přehled o chromatin remodelačních komplexech, ve kterých jsou aktin a aktinu podobné proteiny (ARPs) zastoupeny

Table 1

Summary of actin and actin-related proteins

Subfamily	Localization	Function	Organisms	Complexes
Actin	Cytoplasm	Cell skeleton, cell motility	Human to yeast	Microfilament, dynein, Arp2/3
	Nucleus	Transcription, mRNA processing, chromatin remodeling, nucleoskeleton	Human to yeast	INO80, SWR1, NuA4, PIC, dBAP, BAF, dPBAP, hSWI/SNF, hPBAF, hp400, hTip60
Arp1	Cytoplasm	Dynein motor function	Human to yeast	Dynein
Arp2	Cytoplasm	Actin polymerization, actin filament branching	Human to yeast	Arp2/3
Arp3	Cytoplasm	Actin polymerization, actin filament branching	Human to yeast	Arp2/3
Arp4	Nucleus	Chromatin remodeling, histone binding	Human to yeast	INO80, SWR1, NuA4, dBAP, dPBAP, hSWI/SNF, hPBAF, hWINAC, hSRCAP, hp400, hTip60
Arp5	Nucleus	Chromatin remodeling	Human to yeast	INO80
Arp6	Nucleus	Chromatin remodeling, heterochromatin binding	Human to yeast	SWR1, dISWI, hSRCAP
Arp7	Nucleus	Chromatin remodeling	Yeast	SWI/SNF, RSC
Arp8	Nucleus	Chromatin remodeling, histone binding	Human to yeast	INO80
Arp9	Nucleus	Chromatin remodeling	Yeast	SWI/SNF, RSC
Arp10	Cytoplasm	Dynein motor function	Human to yeast	Dynein
Arp11	Cytoplasm	Dynein motor function	Human to yeast	Dynein

(Převzato z publikace od Chen, Shen, 2007)

Kromě kolokalizace aktinu s proteinovými podjednotkami chromatin-remodelačních komplexů bylo zjištěno, že se účastní i dalších jaderných dějů jakými jsou transkripce a

mRNA-processing. Aktin je důležitou složkou všech tří typů RNA polymeráz (Percipalle et al., 2003; Hofmann et. al., 2004; Kukalev et. al., 2005; Philimonenko et. al., 2004; Hu, 2004). Ačkoliv se neví dostatečně mnoho o vazebných partnerech aktinu v komplexu RNA-polymeráz, zjistilo se že aktin váže jednu z podjednotek, která je všem třem RNA-polymerázám společná. Touto podjednotkou jsou proteiny RPABC2 a RPABC3 (Hu et. l., 2004). Aktin je tedy nezbytný pro správné sestavení preiniciačního komplexu a také důležitý při elongační fázi RNA-polamerázy II (Kukalev et. al., 2005), při které zřejmě váže histon-acetylasový komplex, který svou svou činností udržuje daný úsek chromatinu v transkripčně aktivním stavu (Miralles, Visa, 2006). Asociace aktinu s některými malými jadernými ribonukleoproteiny (snRNPs), které se účastní mRNA processingu a vazba aktinu na heterogenní ribonukleoproteiny (hnRNPs) navrhují možnou roli aktinu při sestřihu a transportu mRNA (Kimura et al. 2000; Percipalle et al., 2002; Kukalev et al., 2005). Mimo jiné se zdá, že se účastní procesu sestavování jaderného obalu (de Lanerolle et. al., 2005).

Kromě asociace s komplexy RNA-polymeráz se ukázalo, že aktin může regulovat transkripci i jiným způsobem, třeba v tomto případě se jedná o jeho možnou účast při translokaci některých transkripčních koaktivátorů, jakými jsou MAL, PREP2 homeoprotein a transkripční represor YY1. Komplex G-aktin-MAL reguluje translokaci koaktivátoru MAL. Jakmile se vazba mezi aktinem a MAL přeruší, dochází k akumulaci MAL v jádře. To může být jak tím, že vazbou aktinu dojde k vystavení jaderné exportní sekvence, nebo k přikrytí jaderné lokalizační sekvence.

Tabulka č.2 je přehledem vazebných partnerů aktinu v eukaryotických transkripčních komplexech

Aktin vazebné proteiny	RNA polymerasa	Reference
RPABC2, RPABC3	pol-I pol-II pol-III	Hu et. al., 2004
RPC3	pol-III	Hu et. al., 2004
Fosforylovaná CTD	elongační fáze pol-II	Kukalev et. al., 2005
Pre-mRNA vazebné proteiny	elongační fáze pol-II	Kukalev et. al., 2005
Lidský hnRNP A/B		Percipalle et. al., 2002
Lidský hnRNP U		Kukalev et. al., 2005
C. tentans HRP36		Percipalle et. al., 2001
C. tentans HRP65-2		Percipalle et. al., 2003

(podle Percipalle, Visa, 2007)

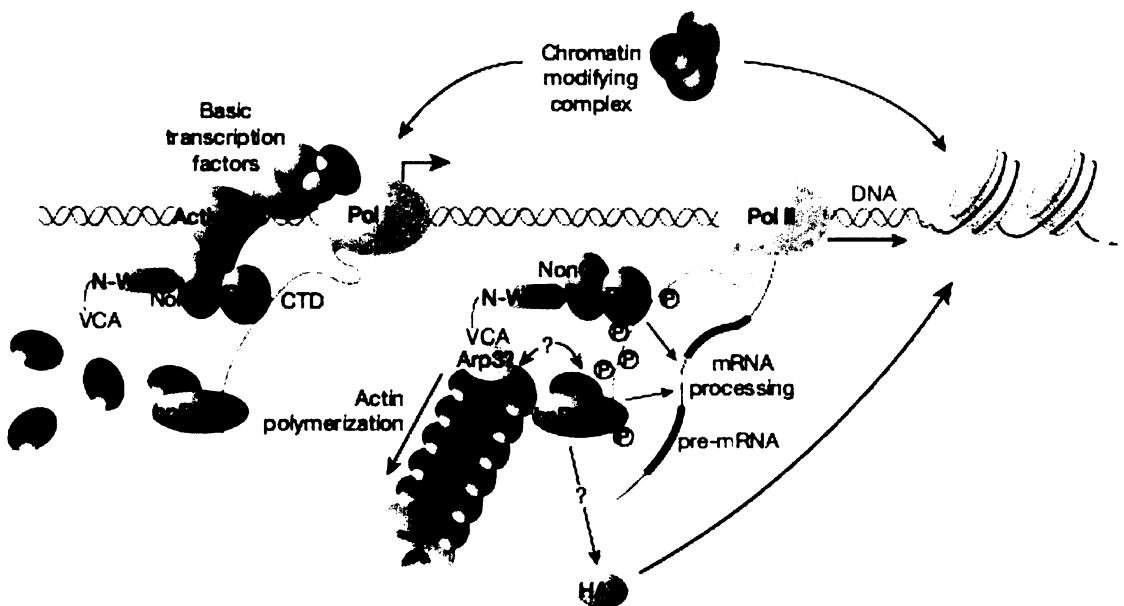
3.5. Polymerní forma aktinu v jádře?

První pokusy o vizualizaci filamentární formy jaderného aktinu nebyly úspěšné. Obvyklé značení pomocí phalloidinu nepodávalo důkaz o vazbě na jaderný F-aktin. Důvodů může být několik: buďto se aktin v jádře vyskytuje jen jako monomer, nebo jsou vlákna příliš krátká pro významnou detekci. Je známo, že například často používaný phalloidin vyžaduje pro úspěšnou vazbu vlákno tvořené alespoň ze 7 molekul aktinu (Visegrady et. al., 2005). Možné je také to, že aktin zaujímá konformace odlišné od klasického cytoplasmického F-aktinu nebo mohou být vazebná místa blokována aktin vazebními proteiny.

Nedávné pokusy využívající metody FRAP podaly zprávu o přítomnosti 2 různých populací aktinu v jádře. Přičemž dynamika těchto populací byla natolik rozdílná, že je možné přemýšlet zde o výskytu jak monomerního, tak polymerního aktinu. Podle experimentu, který provedl Mc. Donald s kolegy se zdá, že minimálně 20% jaderného aktinu je v polymerní formě (Mc. Donald et. al., 2006). Pokud byl použit Lantrunculin A, který způsobuje depolymerizaci aktinu, nebyla detekována žádná filamentární forma. Stejně tak dopadl pokus s mutovaným aktinem neschopným polymerace. Dalším zjištěním, které může hrát ve prospěch polymerní formy aktinu v jádře, je pozorování změny umístění genového lokusu, které vyžadovalo poměrně velký pohyb (2-3 μ m) části chromosomu z obvyklé „klidové“ polohy. Totiž během interfáze a transkripční neaktivitě nedochází k větším posunům částí chromosomů, protože se předpokládá, že si víceméně udržují pozici ve svém chromosomálním teritoriu. Ovšem situace se mění jakmile dojde k aktivaci transkripce. To lze demonstrovat právě na příkladu Kachalových tělísek (angl. Cajal bodies) a genového lokusu U2 snRNA. Je nutno vyzdvihnout, že toto přeskupení genového lokusu vůči CBs je závislé na přítomnosti aktinu se schopností polymerovat. Použitím mutovaného aktinu neschopného polymerovat, došlo ke změně distribuce genových lokusů vůči CBs. Lokusy za takových podmínek nebyly v těsné blízkosti u CBs jako je tomu v případě nemutovaného aktinu, tedy nedošlo k zásadnímu pohybu sledované, transkripčně aktivní části chromatinu. Předpokládá se, že se na těchto chromosomálních „pohybech“, které provázejí transkripčně aktivní úseky, podílejí aktin spolu s jaderným myosinem (Chuang et. al., 2006; Hoffman et. al., 2006). Samozřejmě tento pokus nemůžeme považovat za pádný důkaz, protože použití mutované formy aktinu mohlo působit na přeskupení CBs vůči genovému lokusu nepřímo, třeba tím, že byla omezena exprese jiného proteinu, který je za tento jev zodpovědný. Nicméně je to zajímavé zjištění. Představa aktin-myosinového komplexu ovlivňujícího lokalizaci transkripčně aktivních genových lokusů je jistě lákavá, ale taková funkce by vyžadovala ukotvení k nějaké další struktuře v jádře, která by ovšem měla být relativně stálá.

V současné době není pochyb, že chromatin v jádře je dobře organizován, samotná přítomnost chromosomálních teritorií vyvolává pocit, že něco jako jaderný skelet (či jaderná matrix) organizující rozmístění chromatinu v buňce existuje (Hozák, 1996). Další návrhem účasti aktinu spolu s myosinem na jaderném transportu se týká malých ribosomálních podjednotek, kde byl konkrétně sledován protein S6. Výstupem experimentu (Cisterna et. al., 2006) bylo zjištění, že většina ribosomálních podjednotek je transportována energeticky nenáročným procesem difuze, avšak přibližně 10% využívá pro svůj transport proces vyžadující energii a bylo dokázáno, že protein S6 kolokalizuje s aktinem i myosinem. Zdá se tedy, že v buněčném jádře může docházet k transportu nejen energeticky nenáročnou difuzí, ale i aktivním procesem, při kterém aktin a myosin umožní buňce reagovat na zvýšenou potřebu transportu některých molekul. Existence aktivního i pasivního transportu by pak pro buňčné jádro znamenalo v tomto případě výhodu.

Aby nebylo podnětů na podporu myšlenky filamentárního aktinu v jádře málo, vyšla v roce 2006 publikace, která popisuje možnou úlohu proteinu N-WASP v transkripci RNA-polymerázy II (Wu et. al., 2006). S využitím hmotnostní spektroskopie byly identifikovány někteří jeho vazební partneři v jádře a to proteiny NonO a PSF. Proteiny NonO a PSF se váží na C-terminální doménu RNA-polymerázy II a jsou důležité pro mRNA processing. Protein N-WASP je v cytoplasmě regulátorem polymerace aktinu (Dayel, Mullins, 2004), kde aktivuje komplex Arp2/3, který je odpovědný za nukleaci filament a vznik větvených vláken. Samotný protein N-WASP je schopen vázat monomerní aktin. Představa autorů obrázku č.1, uvedeného na následující straně, pramení ze skutečnosti, že přítomnost proteinů N-WASP, NonO, PSF, aktinu v komplexu RNA polymerázy II a výskyt proteinu Arp3 v jádře, není náhodná, ale má svoje opodstatnění, které úzce souvisí s aktin vazebnou schopností proteinu N-WASP a jeho rolí v nukleaci aktinových filament. Pomocí imunoprecipitace chromatinu byla potvrzena asociace N-WASP proteinu s promotorem. Při vyčerpání N-WASP nebo NonO proteinu pomocí RNA interference došlo k poklesu transkripce. Další pokusy narušit funkci této proteinů byla inkubace s protilátkami, které svou vazbou taktéž snižovaly úrověň transkripce. Ke stejným výsledkům došly i pomocí exprese mutovně formy N-WASP proteinu neschopné vázat aktin a vystavení látkám bránících polymeraci aktinu jako jsou cytochalasin D a lantrunculin A (Vieu, Hernandez, 2006).



Obr. č. 1 Uvádí na scénu jednu z variant, jak může být F-aktin zahrnutý v transkripci jako platforma pro vazbu dalších faktorů účastnících se mRNA processingu. Také je tu znázorněna funkce aktinu jako strukturní součásti preiniciačního komplexu a vazebného partnera hnRNP U, který může hrát roli při udržení chromatinu v transkripčně kompetentním stavu pomocí vazby s histonacetylačními komplexy.

(převzato z publikace Vieu, Hernandez, 2006)

Velmi zajímavá je publikace hovořící o lokalizaci myosinu VI v jádře a jeho funkční provázanost s transkripcí RNA-polymerázy II (Vreugde et. al. 2006). Myosin VI je unikátním molekulárním motorem i proto, že jako jediný z rodiny myosinů cestuje k mínes konci aktinového filamenta. Imunofluorescence i imunoprecipitace potvrdily, že myosin VI je v kontaktu s komplexem RNA-polymerázy II a že se vyskytuje na transkripčně aktivních genech. Protilátky proti myosinu VI snižovaly úrověň transkripcie a imunofluorescence spolu s imunoprecipitací dále dosvědčily, že myosin VI je spolu s komplexem RNA-polymerázy II na aktivně transkribujících se genech. Při inaktivaci transkripcie se kolokalizace s RNA-polymerázou vytratila.

4. Aktin vazebné proteiny

Protože je více známo o jejich cytoplasmických funkcích, jejichž pochopení je vodítkem k určení možné úloze v buněčném jádře, rozepíšu se tu krátce obecně o celé množině aktin vazebných proteinů. Polymerace a depolymerace aktinu v buňce je řízena velkým množstvím aktin vazebných proteinů, které mohou dynamiku aktinu ovlivňovat různými způsoby. Mohou přispívat ke vzniku aktinových filament sestavením nukleačního centra (Arp2/3 komplex), dále jsou schopny štěpit filamentum na menší (gelsolin, cofilin), čímž urychlují přestavení aktinového skeletu, uplatňují se při vzniku složitějších mikrofilamentálních uspořádání jako jsou aktinové sítě (Arp2/3 komplex) či stresová vlákna a také disponují tzv. sequestrační aktivitou (thymosin, profilin), nebo-li schopností vázat monomerní aktin takovým způsobem, který buďto brání polymeraci omezením dostupnosti G-aktinu (thymosin), nebo podporuje přidávání G-aktinu k plus koncům filament, čímž polymeraci napomáhá (profilin). Většina z nich vytváří pouze binární komplex spolu s aktinem, ale některé i ternární. Lze tedy říci že až na výjimky (například DNAasa I, Aip1, cofilin), je vazba negativně kooperativní. Aktin vazebné proteiny o vazbu s aktinem většinou kompetují (profilin, thymosin). Protože mezi ně patří obrovský počet proteinů, které jsou mnohdy co do struktury zcela odlišné, není rozdelení aktin vazebných proteinů do hierarchicky odlišených skupin jednoduchou záležitostí, spíše by to vzhledem k velkému počtu členů, nebylo praktické. Nabízí se možnost rozčlenit je podle toho zda se váží k monomernímu či polymernímu aktinu a podle toho jaký mají efekt na dynamiku aktinu.

Dos Remedios s kolegy ve svém review (Dos Remedios et. al., 2003) takto rozdělili aktin vazebné proteiny do 7 skupin:

1. Monomer-vazebné proteiny, které brání polymeraci aktinu (např. thymosin β 4, DNase I)
2. Filamentum-depolymerizující proteiny (např. CapZ, cofilin)
3. Tzv. čapkující proteiny, které se váží na plus a mínus konce filament
(např. CapZ, tropomodulin)
4. Proteiny vážící se ke stránám filamenta, čímž způsobují jeho rozdelení na kratší filamenta
(např. gelsolin)
5. Proteiny, které obsahují alespoň dvě vazebná místa pro aktin a vytváří tak aktinové sítě.
(např. Arp2/3, fimbrin)
6. Stabilizační proteiny, které se váží ze strany k filamentu a brání jeho rozpadu.
(např. tropomyosin)
7. Motorové proteiny, které využívají F-aktin jako dráhu po které se pohybují. (myosiny)

4.1. Aktin vazebné proteiny lokalizované v buněčném jádře

První jaderný aktin vazebný protein byl objeven až v roce 1987, kdy skupina japonských vědců zjistila, že cofilin je přítomný jak v jádře tak v cytoplasmě (Nishida et. al., 1987). Od té doby byla objevena celá řada dalších jaderných aktin vazebných proteinů mezi nimi profilin, thymosin β 4, CapG, gelsolin, flightless I, myopodin, α -actinin, plastiny (fimbriny), supervillin, filamin A, myosin I, myosin VI, protein 4.1, tropomyosin (Gettemans et. al., 2005). Protože aktin vazebné proteiny nejsou striktně definovanou skupinou proteinů, ale spíše množinou do které spadají všichni vazební partneři aktinu, můžeme mezi ně zařadit i aktinu podobné proteiny (z angl. actin related proteins) a myosiny. Nejvíce dat nashromážděných ohledně funkce aktin-vazebných proteinů a jejich asociace s aktinem v jádře se týká hlavně ARPs a myosinů. V předchozích kapitolách bylo uvedeno, že ARPs mají velmi důležitou roli jako součást remodelačních komplexů a myosin I je přítomný spolu s aktinem v transkripčně aktivním chromatinu. Mimo jiné bylo zjištěno, že myosin I je důležitý pro transkripci ribosomálních genů RNA-polymerázou I (Philimonenko et. al., 2004) a také je vazebným partnerem RNA-polymerázy II (Pestic-Dragovich et. al., 2000).

Kromě myosinu I bylo nedávno upozorněno na lokalizaci myosinu VI v jádře. Nebudu se tu rozepisovat o myosinech ani o ARPs, jelikož tyto proteiny byly víceméně již diskutovány v předchozích kapitolách. Raději se zaměřím na některé z vybraných proteinů, které hrají roli v organizaci aktinového skeletu a v řízení jeho dynamiky. Vzhledem k velkému množství možných kandidátů a omezenému prostoru v této rešerži jsem si vybral jen několik proteinů, o kterých jsem se snažil zjistit jejich lokalizaci v jaderném kompartmentu, hlavně z toho důvodu, že některé z nich jsou možným předmětem mé budoucí diplomové práce. Protože se naše laboratoř zabývá převážně buněčným jádrem a organizací chromatinu, píšu o proteinech, které jsou zajímavé z hlediska možné regulace aktinu v jaderné matrix, která je za organizaci chromatinu odpovědná, tedy pokud připustíme existenci nukleoskeletu.

4.1.1.1. Profilin

Profilin je malý (14-18 kDa) protein, který specificky interaguje s monomerním aktinem. Urychluje výměnu nukleotidu na aktinu, katalyzuje přeměnu ADP-aktin v ATP-aktin. Nedávné studie dokazují přítomnost profilinu (Gieseman et. al 1999) v jádře, kde byla objevena asociace profilinu II (neurální isoforma) s „the survival motor neuron protein“ (SMN). SMN je potřebný k sestavení správně fungujícího splicingového komplexu (spliceosomu). V cytoplasmě pomáhá sestavení komplexu z snRNP s snurportinem1 a

importinem- β . Interakce profilinu s SMN proto navrhuje možný způsob regulace pre-mRNA splicingu modulací interakce SMN s ostatními komponentami spliceosomu. Skare s kolegy objevili, že profilin I kolokalizuje s snRNP proteiny a s Cajal bodies (které také obsahují SMN) v lidských fibroblastech a HeLa buňkách (Skare et. al ,2003). Protilátky proti profilinu inhibovaly pre-mRNA splicing adenoviru a β -globinu. Profilin také plní funkci kofaktoru exportinu 6, který je důležitý pro jaderný export aktinu (Stuven et. al, 2003).

4.1.1.2. Thymosin

Thymosin β je nejhojněším G-aktin vazebným proteinem v cytoplasmě savčích buněk. Díky své schopnosti vyvazovat G-aktin patří mezi tzv. „sequestrační“ proteiny, které svojí aktivitou snižují dostupnost aktinu pro možnou polymeraci. Thymosin β 4 hraje roli také v angiogenezi, zánětu, hojení, apoptose a v rakovinných metastázích (Huff et. al, 2001). Pokusy s vyčerpáním polyaminů v buňkách ukázaly, že pokud dojde k poklesu polyaminů, dojde zároveň k zesílení značení thymosinu jak v cytoplasmě tak v jádře. Poylaminy jsou důležité pro proliferaci, adhezi a migraci buněk v kultuře (McCormack et. al, 1999). Zvýšená exprese thymosinu β v myších plicních rakovinových buňkách měla za následek taktéž silné jaderné značení thymosinu (Cha et. al 2003). Experimenty s užitím mikroinjekce a exprese thymosinu v různých buňkách poukázaly na to, že thymosin do jádra nevstupuje pouhou difuzí, ale je aktivně translokován neznámým proteinem. Thymosin β 4 tedy nemůže být faktorem, který směruje aktin do jádra, jelikož komplexy aktin-thymosin nebyly nikdy v jádře detekovány (Huff et. al, 2004).

4.1.1.3. ADF/Cofilin („actin depolymerizing factor“)

Cofilin patří mezi proteiny regulující aktinovou dynamiku a to tím, že je schopen způsobovat rozpad aktinových vláken na menší a depolymerizaci „starých“ vláken obsahujících ADP-aktin (Maciver et. al 2002). Už v roce 1987 bylo popsáno že cofilin je komponentou tzv. „actin rods“, které byly v buněčném jádře indukovány pomocí tepelného šoku nebo přidáním DMSO (Nishida et. al 1987). Cofilin obsahuje funkční NLS sekvenci (jaderná lokalizační sekvence) ,NLS (30 KKRKK 34). Fosforylace cofilinu na Ser-3 pomocí LIM kinasi negativně reguluje vazbu k aktinu (Nebl et. al 1996, Arber et. al 1998). V mutantech S3A cofilinu se cofilin akumuloval v jádře NIH3T3 buněk (Nebl et. al 1996). Defosforylace cofilinu v 3Y1 krysích fibroblastech je také doprovázena jadernou translokací cofilinu (Ohta et. al 1989). Avšak například v thyroidních buňkách bylo dokázano že indukovaná defosforylace cofilinu nevede k jeho jaderné translokaci (Saito T, 1994). Z toho vyplývá že

korelace mezi translokací cofilinu do jádra a jeho defosforylací je závislá na buněčném typu, tedy nedá se toto zjištění generalizovat pro všechny typy buněk. Cofilin ovšem může být zahrnut v jaderné translokaci aktinu. Nedávná studie (Pendleton et. al, 2003) ukázala, že stresem indukovaný rozpad F-aktinu (pomocí lantruculinu B nebo vyčerpáním ATP) indukoval jeho jadernou translokaci. Akumulace aktinu v jádře byla ovšem inhibována po přidání protilátek proti cofilinu. Z toho všeho se tedy zdá že cofilin by mohl být faktor zodpovědný za jaderný import aktinu. Další studie odhalila že glukokortikoidní receptor je cílem cofilinu v jádře (Ruegg et. al, 2004).

4.1.1.4. CapZ

Je členem Gelsolinové rodiny proteinů. CapZ reguluje dynamiku aktinu tím, že se váže na plus konec mikrofilament a stabilizuje je, tedy brání jejich rozpadu.

Avšak na rozdíl od gelsolinu, se kterým má některé sekvenční homologie, není schopen vlákno stěpit. CapZ je jediným proteinem z rodiny Gelsolinu, který se pravidelně nachází jak v jádře tak v cytoplasmě zárověň (Prendergast et. al 1991, Onoda et. al 1993).

ABPs které jsou strukturálně podobné proteinu CapZ, například fragmin a severin, obsahují N-terminální „Rev-like“ jadernou exportní sekvenci, která není v CapZ přítomna. Přidáním této sekvence do proteinu CapZ způsobilo jeho jaderný export a deince této sekvence u fragminu a severinu vedla k jejich jaderné translokaci podobné normálnímu rozložení CapZ v buňce (Van Impe et. al 2003). Protože jaderný CapZ se jeví více fosforylován než jeho cytoplasmatická frakce, bylo navrhнуто že právě fosforylační stupeň proteinu by mohl být zodpovědný za jadernou lokalizaci CapZ proteinu (Onoda , Yin 1993) . CapZ obsahuje sekvenci bohatou na zásadité aminokyseliny, která se podobá obvyklé jaderné lokalizační sekvenici (PAAIKKLYQVKGKK). Avšak bylo zjištěno že mutace všech lysinových a prolinových zbytků nedošlo ke změně lokalizace CapZ. Ovšem sekvence PA(A) byla určena determinující sekvenci pro funkci jaderné lokalizační sekvence (Makkerh et.al. 1996). Deince různých domén proteinu a fúzní experimenty dokázaly, že za jadernou lokalizaci CapZ jsou zodpovědné ještě další místa v subdoménách CapZ. „In vitro import assays“ ukázaly že jaderný import CapZ je energeticky závislý a protilátky proti importinu- β blokují jeho transport do jádra, zatímco importin- α byl z této role vyloučen (De Corte et. al. 2004). Zvýšená exprese CapZ se ukázala jako doprovodný jev mnoha nádorů (Lal , Lash , et.al 1999, Van Ginkel et. al. 1998). Za použití „Collagen type I invasion assay“ bylo objeveno, že zvýšená koncentrace CapZ opravdu koreluje se zvýšením invazivity nádorů (De Corte et. al 2004). Zabránění jaderné lokalizace CapZ pomocí fúze s jadernou exportní sekvencí, zabránilo invazi do

„collagen type I“ formy. Vzhledem k tomu že aktin se váže jak k BAF tak k CapZ, bylo navrženo, že přítomnost CapZ by mohla nějakým způsobem ovlivňovat asociaci jaderného aktinu s BAF a tím kontrolovat aktivitu genů, tedy místa kde bude docházet k převážné tvorbě heterochromatinu, kondenzaci chromosómů a naopak místa tvorby euchromatinu, kde bude transkripcí genů, vzhledem k volnějšímu přístupu proteinů k DNA, umožněna (Rando et. al. 2002).

4.1.1.5. Gelsolin

Důkazy o přítomnosti gelsolingu v jádře jsou útržkovité, jelikož jaderný gelsolin ještě nebyl postoupen datailnějšímu výzkumu. Gelsolin nemá typickou jadernou lokalizační sekvenci, ale i přesto se objevují stále nové důkazy o jeho jaderné lokalizaci. Salazar s kolegy našli gelsolin v jádřech diferencovaných endoteliálních buněk (Salazar et. al. 1999). Dále byla zjištěna přítomnost gelsolingu ve stresových vláknech a jádřech fibroblastů NR6, které byly uvrženy do prostředí s nedostatkem séra (Chou et. al. 2002). Další přítomnost gelsolingu byla detekována v jádřech mesenchymatických kmenových buněk (Wang 2004). Návrhem na možnou funkci gelsolingu v jádře by pak mohl být experiment, kde dokázali že gelsolin se účastní modulace transkripcí androgenního receptoru (Nishimura et. al. 2003). Také bylo objeveno že při stimulaci 5 α-dihydrotestosteronem dochází k přechodnému vstupu gelsolingu do jádra.

4.1.1.6 Myopodin

Myopodin patří do synaptopodinové rodiny proteinů. Gen pro myopodin je lokalizován na chromosomu 4q25 a je velmi často deletován u buněk podílejících se na rakovině prostaty (Lin et. al. 2001). Exprese myopodinu v PC3 a LNCaP rakoviných buňkách prostaty snižuje invazivitu a potlačuje buněčnou proliferaci. Injekce PC3 buněk, které produkují myopodin v nadměrném množství, redukuje růst nádoru u imunodeficientní myši. Invazivní nádory močového měchýře také vykazují sníženou expresi myopodinu. Dále snižuje pravděpodobnost tvorby metastází a mortalitu (Jing et. al. 2004) . Rozložení myopodinu se v buňce během buněčného cyklu a diferenciace buněk mění (Sanchez-Carbayo et. al., 2003). Převážně jaderná lokalizace myopodinu se během diferenciace myoblastů posune ve prospěch cytoplasmy (Weins et. al., 2001). Tepelný šok a leptomycin B způsobují hromadění myopodinu v buněčném jádře. Pro3-Leu24 byla identifikována jako slabá exportní sekvence, ale zdá se že ještě jiné regiony proteinu řídí jeho lokalizaci (Van Impe K et. al. 2003).

Při nadměrné produkci myopodinu v myoblastech a při tepelném šoku dochází k tvorbě tzv. „actin-rods“ a „actin-loops“, které obsahují myopodin. Z tohoto by se dalo usuzovat že myopodin by v jádře mohl regulovat funkci jaderného aktinu.

4.1.1.7. Aktinin

Zatímco klasická forma aktinin-1 se nachází především ve stresových vláknech a ve fokálních adhezních kontaktech, je aktinin-4 lokalizován především v buněčném jádře MCF-7 buněk, rakoviných buněk KU7 močového měchýře a fibroblastů děložní sliznice (Rajfur et. al. 2002). Pokles exprese aktininu-4 koreluje s rozvojem rakoviny prsu (Honda et. al. 1998). U buněk exprimujících protein Vpx, bylo dokázáno, že aktinin-1 je importován do jádra prostřednictvím interakce s proteinem Vpx, kde se váže na C-terminální oblast bohatou na aminokyselinu prolin (Mueller et. al. 2004). Myší α -aktinin-2 vykazuje také pozitivní vliv na aktivitu androgenního receptoru. Koaktivátor p160 (GRIP1) se váže přímo na hormon vážící doménu androgenního receptoru a právě α -aktinin-2 byl zjištěn jako vazebný partner proteinu GRIP1 a zvušuje jeho vazebnou aktivitu k androgennímu receptoru (Huang et. al 2004).

4.1.1.8. Filamin A

Je známo že filamin v cytoplasmě plní funkci proteinu, který váže aktinová vlákna k sobě a vytváří tak síť a tāke ukotvuje membránové proteiny k aktinové síti pod membránou (Feng , Walsh 2004). Filamin interaguje s pantovou oblastí androgenního receptoru. Vazba filaminu k androgennímu receptoru je umocněna přítomností steroidního hormonu DHT (Loy et. al. 2003). Avšak na rozdíl od supervillinu a gelsolinu je jeho účinek na aktivitu androgenního receptoru spíše inhibiční, jelikož způsobuje rozpad aktivačního komplexu. Zdá se že filamin hraje roli v transportu androgenního receptoru do jádra, jelikož eGFP-značený androgenní receptor nebyl lokalizován v jádře u filamin deficientních buněk (Ozanne et. al. 2000). Filamin A deficientní buňky vykazují také zvýšenou senzitivitu pro poškození DNA, což nasvědčuje možné úloze v buněčné odpovědi na poškození DNA (Meng et. al. 2004). Filamin A také interaguje s nádorovým supresorem BRCA2, který zvyšuje aktivitu androgenního receptoru pomocí vazby k koaktivátoru androgenního receptoru p160 GRIP1 (Yuan , Shen, 2001; Shin , Verma, 2003) . Není zatím jasné zda filamin moduluje interakci BRCA2-AR nebo BRCA2 moduluje interakci Filamin A-AR.

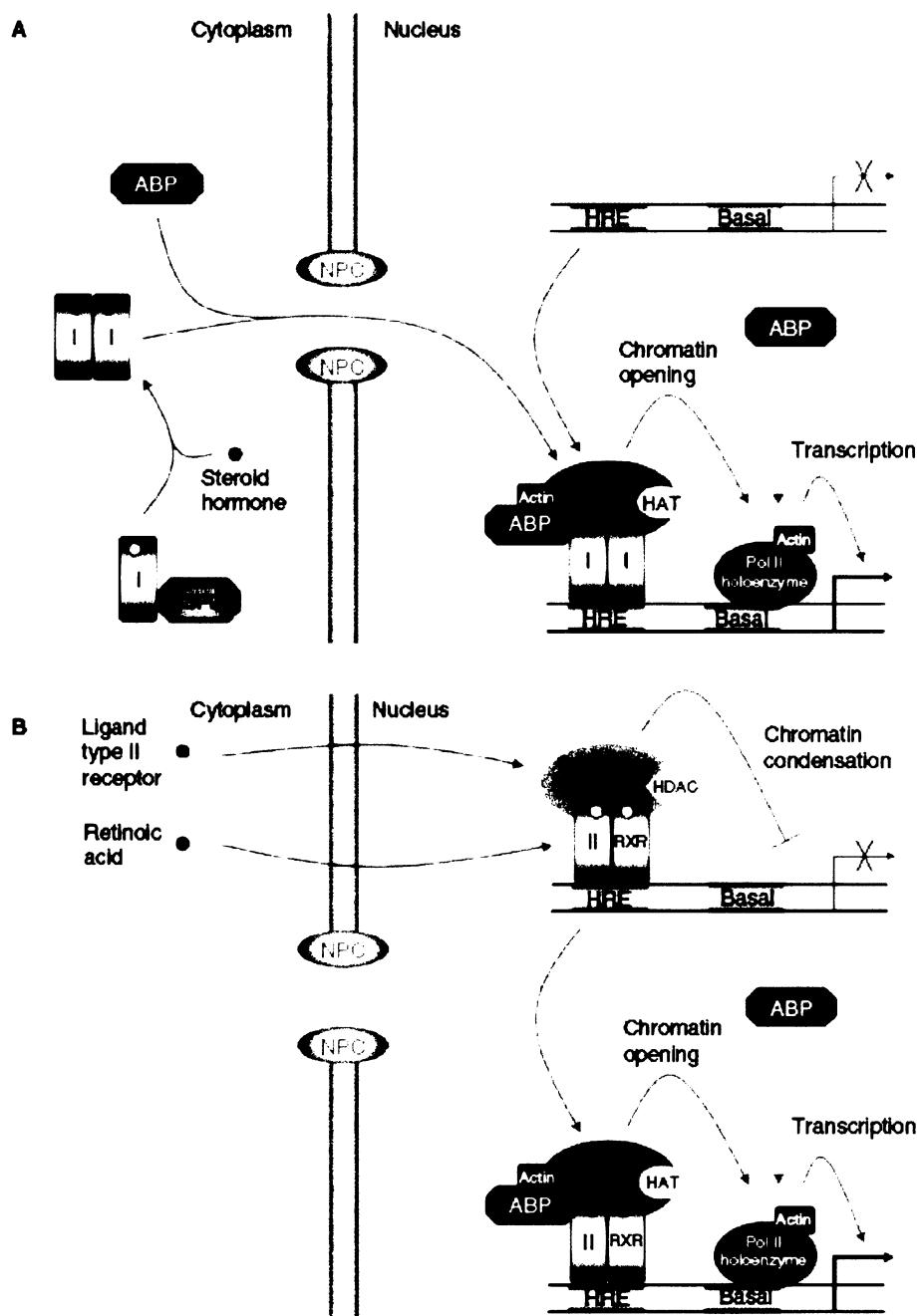
4.1.1.9. Spektrin

Tento aktin vazebný protein, který byl původně objeven v erythrocytech, kde má strukturní úlohu a slouží spolu s aktinem a proteinem 4.1 jako mechanická podpora membrány červených krvinek, slouží s největší pravděpodobností i v buněčném jádře, kde byl také lokalizován. Pomocí imunoprecipitace se podařilo identifikovat různé vazebné partnery spektrinu, mezi které patří například proteiny zahrnuté v opravě DNA, proteiny účastnící se chromatinové remodelace, transcripční faktory a faktory podílející se na zrání RNA. Konkrétně byl pro tyto pokusy použit neerythroidní α -spektrin. Také bylo objeveno že spektrin je deficentní v buňkách trpících Fanconi anemii. Tato nemoc je genetického původu a jejími příznaky jsou špatná krvetvorná funkce kostní dřeně a častější výskyt nádorů hlavy, zažívacího traktu a pohlavního ústrojí. α -spektrin vytváří v jádře komplex s FA proteiny (ty které jsou mutovány ve Fanconi anemii) a přepokládá se že vytváří jako si kostru či pojivo mezi FA proteiny, které mají zřejmě roli v opravě poškození DNA. Takže nedostatek spektrinu koreluje se zvýšeným poškozením DNA ve Fanconi buňkách (Sridharan et. al., 2006).

5. Závěr

Přítomnost aktinu, myosinu a spousty dalších aktin vazebných proteinů v jádře, dokazují jak všeobecné může být využití aktinu buňkou. Zdá se, že je pro buňku vskutku cenným nástrojem, který není omezen jen na určitou funkci, ale může se účastnit mnoha rozličných dějů zároveň. Transkripce, mRNA processing, transport molekul, remodelace chromatinu, to všechno jsou děje, ve kterých může aktin vystupovat díky své schopnosti hydrolyzovat ATP a vázat celou řadu aktin vazebných proteinů, které mohou kdykoliv a kdekoliv v buňce modifikovat jeho zařazení do jaderných dějů. Skutečnost, že byly v buněčném jádře spolu identifikovány aktin, myosin I, myosin VI, ARP3,4,5,8, N-WASP a určena jaderná lokalizace mnoha dalších aktin vazebných proteinů jako například profilin, filamin A, spektrin, aktinin, myopodin, atd., dokazuje, že aktin vazebné proteiny neplní funkci pouze v cytoplasmě při organizaci aktinových mikrofilament. Některé z nich mají důležité funkce i v jaderném kompartmentu, kde pomáhají modulovat úroveň transkripce genů. Jestli jsou tyto funkce podmíněny interakcí s jaderným aktinem nebo s jinými proteiny, zůstáva stále ještě předmětem výzkumu. O mnohých aktin vazebných proteinech také není jasný mechanismus transportu do jádra, jsou transportovány spolu s aktinem nebo zvlášť? Co se týče přítomnosti polymerní formy aktinu v jádře, nelze to potvrdit ani vyvrátit. Tato otázka zůstává stále otevřená. Pokud polymerní aktin v jádře existuje, je možné že zaujímá odlišnou konformaci od cytoplasmického F-aktinu a proto ho nemůžeme jednoduše vizualizovat. Ovšem tuto záležitost nám pomůže vysvětlit pouze další hledání vazebných partnerů aktinu a specifických protilátek, které by neznačili F-aktin v cytoplasmě, ale pouze v jádře. Tedy za předpokladu, že se jaderný F-aktin bude dostatečně lišit svými epitopy. Také je možné, že tvoří pouze krátká vlákna, která unikají detekci, nebo jsou vazebná místa zakryta aktin vazebnými proteiny. Zajímavá je také představa, že by F-aktin v jádře spolu s laminy mohl být součástí nukleoskeletu, který by hrál roli v kompartmentalizaci jádra. V budoucnosti můžeme očekávat mnoho zajímavých zjištění o funkci jaderného aktinu, jeho formách a způsobu regulace aktin vazebnými proteiny.

Obrázek č. 2 Znázorňuje představu autorů článku (Gettemans et. al., 2005) o jedné z možných funkcí ABPs v jádře:



(Převzato z publikace Gettemans et. al., 2005)

Obr.č.2:

A) Model ukazuje jadernou translokaci ABP spolu s receptorem steroidního hormonu typu I (receptor pro estrogen, androgenní receptor, glukokortikoidní receptor).

Asociace ABP s receptorem může probíhat buď v cytoplasmě nebo v jádře.

Po vazbe ligandu se receptory typu I váží jako homodimery k HREs (hormone response elements). Poté dochází k vazbě HAT (histon acetyltransferásy) a dalších proteinových koaktivátorů, což vede k rozvolnění chromatinu a umožňuje vazbu

preiniciačního komplexu, který již obsahuje RNA polymerasu II. Interakce jaderných ABPs s jadernými receptory typu I (nebo s dalšími koaktivátory) pak buď zesiluje nebo inhibuje transkripci. Interakce jaderného aktinu a RNA polymerasy II také zesiluje transkripcii a je proto možné že některé jaderné ABPs také ovlivňují vazbu Aktin-RNA pol II a tím modulují transkripcii.

B) Receptory typu II (thyroidní receptor, receptor kyseliny retinové) inhibují transkripcii tím způsobem že, pokud není přítomen ligand, váží HDAC (histon deacetylasu), která způsobuje kondenzaci chromosomů a tím inhibici transkripce v dané oblasti. Jaderné ABPs interagují s těmito receptory za přítomnosti ligandu tak, že stimulují výměnu HDAC za HAT, tedy pomáhají aktivaci transkripce

6. Perspektivy

Jelikož jsou aktin vazebné proteiny v buněčném jádře doposud neprozkoumanou problematikou, nabízí se jako počáteční postup jejího řešení plošný průzkum lokalizace aktin vazebných proteinů, jaderného aktinu a dalších proteinů jako jsou například transkripční faktory, splicingové faktory, všechny tři typy RNA polymeras a další důležité jaderné proteiny. Při řešení tohoto úkolu by bylo nejdříve vhodné využít fluorescenční a konfokální mikroskopii pro shromáždění dat o lokalizaci zkoumaných proteinů v jádře, případně o jejich kolokalizaci. K bližšímu prozkoumání kolokalizací se nabízí elektronová mikroskopie, kde je možné s poměrně velikou přesností určovat zda spolu zkoumané proteiny kolokalizují či nikoliv. S využitím statistického programu (například Ellipse), je možně zjistit, zda je pozorované značení statisticky významné, nebo zda je kolokalizace zkoumaných proteinů náhodná. Dalším možným přístupem pro důkaz zkoumaného proteinu v jaderné či cytoplasmické frakci a jeho interakcí s jinými proteiny, by byla imunoprecipitace. Pokud se ujistíme, že protein skutečně v jádře je, můžeme přistoupit k odhalování jeho funkce a to pomocí různých metod, mezi které patří například nadměrná exprese proteinu, exprese mutované formy proteinu, fenotypové umlčení genu pro daný protein pomocí siRNA, případně další metody. V současnosti rychle přibývá nových zpráv o lokalizaci řady aktin vazebných proteinů v jádře, což samo o sobě otevírá jedinečnou příležitost nových objevů o roli aktinu v jádře a způsobu jeho regulace.

7. Seznam použité literatury:

- Arber S**, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P, (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*;393:805–809
- Bettinger BT**, Gilbert DM, Amberg DC, (2004) Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:410–415
- Bremer JW**, Busch H, Yeoman LC, (1981) Evidence for a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and muscles actins. *Biochemistry* 20, 2013–2017.
- Cha HJ**, Jeong MJ, Kleinman HK, (2003) Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*;95:1674–1680
- Chen M** and Shen X, (2007) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 19:326–330
- Chuang CH**, Carpenter AE, Fuchsova B, Johnson T, de Lanerolle, Belmont AS, (2006) Long- range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr Biol* 16:825-831
- Chou J**, Stoltz D., Burke N., Watkins S., Wells A, (2002) Distribution of gelsolin and phosphoinositol 4,5-bisphosphate in lamellipodia during EGF-induced motility. *Int J Biochem Cell Biol.*;34:776–790
- Cisterna B**, Necchi D, Prosperi E, Biggiogera M, (2006) Small ribosomal subunits associate with nuclear myosin and actin in transsit to the nuclear pores. *FASSEB J*. 20, E1257-E1263
- Clark, TG**, and Merriam, R W, (1977) Diffusible and bound actin in nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell* 12, 883–891.
- Dayel MJ** and Mullins RD, (2004) Activation of Arp2/3 complex: Addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2. *PLoS Biol* 2, E91
- De Corte V**, Van Impe K, Bruyneel E, Boucherie C, Mareel M, Vandekerckhove J, Gettemans J, (2004) Increased importin-beta dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *J Cell Sci*;117:5283–5292
- Dos Remedios CG**, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ, (2003) Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83:433-473

- Feng Y, Walsh CA, (2004) The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling.** *Nat Cell Biol*;6:1034–1038
- Galarneau L, Nourani A, Boudreault A , Zhang Y, Heliot L, Allard S., Savard J., Lane W S., Stillman DJ and Cote J, (2000) Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol. Cell* 5,927 -937.**
- Gettemans J, Van Impe K, Delanote V, Hubert, Vandekerckhove J, and De Corte V, (2005) Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription.** *Traffic* 6:847–857
- Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H, (1999) A role for proline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems.** *J Biol Chem*;274:37908–37914
- Herman IM, (1993) Actin isoforms.** *Current Opinion in Cell Biology* 5:48-55
- Hozák P., (1996)**
The nucleoskeleton and attached activities. *Exp Cell Research* 229, 267-271
- Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ , (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II.**
- Nat Cell Biol, 6:1094-1101**
- Hofmann W and de Lanerolle P (2006) Nuclear actin: to polymerize or not to polymerize**
Journal of Cell Biology Vol.172,No.4 495-496
- Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, GotohM, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S, (1998) Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol*;140:1383–1393**
- Huang SM, Huang CJ, Wang WM, Kang JC, Hsu WC, (2004)**
The enhancement of nuclear receptor transcriptional activation by a mouse actinbinding protein, alpha actinin 2. *J Mol Endocrinol*;32:481–496
- Huff T, Rosorius O, Otto AM, Muller CS, Ballweber E, Hannappel E, Mannherz HG, (2004) Nuclear localization of the G-actin sequestering peptide thymosin beta4. *J Cell Sci*;117:5333–5341**
- Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E, (2001) Beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol*;33:205–220**
- Hu P, Wu S, Hernandez N, (2004) A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription.** *Genes Dev* 18:3010-3015

- Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Hori-koshi M, Scully R, Qin J, and Nakatani Y** (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis *Cell* 102, 463–473.
- Jing L, Liu L, Yu YP, Dhir R, Acquafondada M, Landsittel D, Cieply K, Wells A, Luo JH,** (2004) Expression of myopodin induces suppression of tumor growth and metastasis. *Am J Pathol*;164:1799–1806
- Jonsson AP, Aissouni Y, Palmberg C, Peripalle P, Nordling E, Daneholt B, Jorrnvall H, Bergman T,** (2001) Recovery of gel-separated proteins for in-solution digestion and mass spectrometry. *Anal Chem* 73:5370-5377
- Kimura T, Hashimoto I, Yamamoto A, Nishikawa M, Fujisawa JI,** (2000) Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 gag mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B. *Genes Cells* 5:289–307
- Kukalev A, Nord Y, Palmberg C, Bergman T, Percipalle P,** (2005) Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*;12:238–244
- Lai A, Lash A, Altschul S, Velculescu V, Zhang L, McLendon R, Marra M, Prange C, Morin P, Polyak K, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler K, Strausberg R,** Riggins G., (1999) A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res*;59:5403–5407
- Lin F, Yu YP, Woods J, Cieply K, Gooding B, Finkelstein P, Dhir R, Krill D,** Becich MJ, Michalopoulos G, Finkelstein S, Luo JH, (2001) Myopodin, a synaptopodin homologue, is frequently deleted in invasive prostate cancers. *Am J Pathol*;159:1603–1612
- Loy CJ, Sim KS, Yong EL,** (2003) Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:4562–4567
- Maciver SK, Hussey PJ,** (2002) The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol*;3:reviews 3007
- Makkerh JP, Dingwall C, Laskey RA,** (1996) Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol*;6:1025–1027
- McCormack SA, Ray RM, Blanner PM, Johnson LR,** (1999) Polyamine depletion alters the relationship of F-actin, G-actin, and thymosin beta4 in migrating IEC-6 cells. *Am J Physiol*;276:C459–C468

Mc. Donald , Carrero, Andrin C, de Vries G, Hendzel M, (2006) Nucleoplasmic β-actin exist in a dynamic equilibrium between low mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. J. Cell Biol., 172:541-552

Meng X, Yuan Y, Maestas A, Shen Z, (2004) Recovery from DNA damageinduced G2 arrest requires actin-binding protein filamin-A/actin-binding protein 280.
J Biol Chem;279:6098–6105

Miralles F., Visa N. , (2006) Actin in transcription and transcription regulation.
Current Opinion in Cell Biology 18:261-266

Muller J, Oma Y, Vallar L, Friederich E, Poch O, Winsor B, (2005)
Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. Mol Biol Cell, 16:5736-5748.

Mueller SM, Jung R, Weiler S, Lang SM, (2004) Vpx proteins of SIVmac239 and HIV-2ROD interact with the cytoskeletal protein alpha-actinin 1. J Gen Virol;85:3291–3303

Nakayasu H and Ueda K, (1983) Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. Exp. Cell Res. 143, 55–62

Nakayasu H, Ueda K, (1985) Association of rapidly-labelled RNAs with actin in nuclear matrix from mouse L5178Y cells. Exp Cell Res 160:319–330

Nebi G, Meuer SC, Samstag Y, (1996) Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. J Biol Chem;271:26276–26280

Nishida E, Lida K, Yonezawa N, Koyasu S, Yahara I, Sakai H, (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in Cultured Cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:5262–5266

Nishimura K, Ting H, Harada Y, Tokizane T, Nonomura N, Kang H, Chang H, Yeh S, Miyamoto H, Shin M, Aozasa K, Okuyama A, Chang C, (2003)
Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. Cancer Res;63:4888–4894

Ohta Y, Nishida E, Sakai H, Miyamoto E, (1989) Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock-induced nuclear accumulation of cofilin. J Biol Chem;264:16143–16148

Olave I A, Samara L. Reck-Peterson, and Gerald R. Crabtree, (2002). Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. Annu. Rev. Biochem. 71:755–81

Onoda K, Yu FX, Yin HL, (1993) gCap39 is a nuclear and cytoplasmic protein.
Cell Motil Cytoskeleton;26:227–238

- Onoda K, Yin HL.**, (1993) gCap39 is phosphorylated. Stimulation by okadaic acid and preferential association with nuclei. *J Biol Chem* ;268:4106–4112
- Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN,** (2000) Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin (Mol Endocrinol;14:1618–1626)
- Pendleton A, Pope B, Weeds A, Koffer A,** (2003) Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem*;278:14394–14400
- Pederson T, Aebi U,** (2002) Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol* 140:3–9
- Pestic-Dragovich L, Stojiljkovic L, Philimonenko AA, Nowak G,** Ke Y, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Hozák P, de Lanerolle P (2000) A myosin I isoform in the nucleus. *Science* 290:337–341
- Peters KE, Okada A., Comings D,** (1982) Chinese hamster nuclear proteins. An electrophoretic analysis of interphase, metaphase and nuclear matrix preparations. *Eur. J. Biochem.* 129, 221–232
- Percipalle P, Fomproix N, Kylberg K, Miralles F, Bjorkroth B, Daneholt B, Visa N,**(2003) An actin-ribonucleoprotein interaction is involved in transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:6475–6480
- Percipalle P, Jonsson A, Nashchekin D, Karlsson C, Bergman T, Guialis A, Daneholt B,** (2002) Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res* 30: 1725–1734
- Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingova H, Kysela K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, de Lanerolle P, Hozák P, Grummt I** (2004) Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 6:1165–1172
- Prendergast GC, Ziff EB,** (1991) Mbh 1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization in vivo. *EMBO J*;10:757–766
- Rando O, Zhao K, Janmey P, Crabtree GR,** (2002) Phosphatidylinositoldependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci USA*;99:2824–2829
- Rajfur Z, Roy P, Otey C, Romer L, Jacobson K,** (2002) Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins. *Nat Cell Biol*;4:286–293
- Ruegg J, Holsboer F, Turck C, Rein T,** (2004) Cofilin 1 is revealed as an inhibitor of glucocorticoid receptor by analysis of hormone-resistant cells. *Mol Cell Biol*;24:9371–9382

- Saito T**, Lamy F, Roger PP, Lecocq R, Dumont JE, (1994) Characterization and identification as cofilin and destin of two thyrotropin- and phorbol esterregulated phosphoproteins in thyroid cells. *Exp Cell Res*;212:49–61
- Sanchez-Carbayo M**, Schwarz K, Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Mundel P, (2003) Tumor suppressor role for myopodin in bladder cancer: loss of nuclear expression of myopodin is cell-cycle dependent and predicts clinical outcome. *Oncogene*;22:5298–5305
- Salazar R**, Bell SE, Davis GE, (1999) Coordinate induction of the actin cytoskeletal regulatory proteins gelsolin, vasodilator-stimulated phosphoprotein, and profilin during capillary morphogenesis in vitro. *Exp Cell Res*;249:22–32
- Shin S**, Verma IM, (2003) BRCA2 cooperates with histone acetyltransferases in androgen receptor-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:7201–7206
- Shen X**, Ranallo R, Choi E, Wu C, (2003) Involvement of Actin-Related Proteins in ATP-Dependent Chromatin Remodeling. *Molecular Cell*, Vol. 12, 147–155
- Shen X**, Mizuguchi G, Hamiche A, and Wu C (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541–544
- Skare P**, Kreivi JP, Bergstrom A, Karlsson R, (2003) Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing *Exp Cell Res*;286:12–21
- Stuven T**, Hartmann E, Gorlich D, (2003) Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin actin complexes. *EMBO J*;22:5928–5940
- Sridharan D.**, McMahon L., Lambert M., (2006) Spectrin interacts with five groups of functionally important proteins in the nucleus. *Cell Biology International*, Vol.30 Issue 11 pages 866-878
- Uribe R**, Jaz D, (2007) A review of actin binding proteins: new perspectives. *Mol Biol Rep* Oct 16 [Epub ahead of print]
- Van Ginkel PR**, Gee RL, Walker TM, Hu DN, Heizmann CW, Polans AS, (1998) The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma. *Biochim Biophys Acta*;1448:290–297
- Van Impe K**, De Corte V, Eichinger L, Bruyneel E, Mareel M, Vandekerckhove J, Gettemans J, (2003) The nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins. *J Biol Chem*;278:17945–17952
- Vieu E**, Hernandez N, (2006) Actin's latest act: polymerizing to facilitate transcription? *Nature Cell Biol.*, volume 8, number 7

Visegrady B, Lorinez D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M, (2005) A simple model for the cooperative stabilization of actin filaments by phalloidin and jaskplakinolide. FEBS Lett. 579:6-10

Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Massimo P Crippa, Bussi M, Biffo S, (2006) Nuclear Myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. Molecular Cell 23, 749–755

Wang D, Park J, Chu J, Krakowski A, Luo K, Chen D, Li S, (2004) Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation. J Biol Chem;279:43725–43734

Weins A, Schwarz K, Faul C, Barisoni L, Linke WA, Mundel P, (2001) Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. J Cell Biol;155:393–404

Wu X, Yoo Y, Okuhama N, Tucker P, Gang L, Guan J, (2006) Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. Nature cell biology, vol. 8, 756-763

Yuan Y, Shen Z, (2001) Interaction with BRCA2 suggests a role for filamin-1 (hsFLNa) in DNA damage response. J Biol Chem;276:48318–48324

Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A, Kornberg RD (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. Cell 95, 625–636

8. Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Pavlu Hozákovi, DrSc. za jeho vedení a také Mgr. Vladě Philimonenko, PhD. za poskytnutí praktických zkušeností pro mé experimenty. Děkuji i RNDr. Martinu Kalousovi, CsC. který mi poskytl cenné rady ohledně zpracování bakalářské práce. Zároveň děkuji laborantkám Ivaně Novákové, Ivě Jelínkové a Vladimíře Bayerové za uvedení do laboratorní praxe a zásobování kvalitními vzorky pro mé pokusy, které budou součástí budoucí diplomové práce. Mé díky patří i rodičům, kteří mě během studia finančně a psychicky podporovali.