

1. ABSTRAKT

Myosiny jsou proteiny, které přeměňují chemickou energii uloženou v ATP na mechanickou sílu, která se aplikuje na vlákna aktinu. Jaderný myosin 1 (NM1) byl první myosin detekován v jádře buňky. Spolu s jaderným aktinem hraje důležitou roli při transkripci DNA a remodelaci chromatinu. Nicméně, molekulární mechanismy funkce NM1 jsou zatím neznámé. K získání dalších poznatků o tomto molekulárním motoru jsme studovali expresi a distribuci NM1 v tkáních, mechanismus jeho jaderné lokalizace a také jeho další molekulární interakce.

V první části byla studována exprese NM1 v různých tkáních myši. Bylo prokázáno, že NM1 se vyskytuje v buněčných jádrech všech myších tkání, přičemž do studia nebyly zahrnuty buňky v terminálním stádiu spermatogeneze. Kvantitativní PCR a western blot prokázaly, že exprese NM1 je různá v jednotlivých myších tkáních a nejvyšší je v plicích. NM1 je izoforma dříve objeveného myosinu 1c (Myo1c), který byl popsán nejprve jako protein cytosolový. Jediný známý rozdíl mezi těmito dvěma proteiny je přítomnost 16 aminokyselin na N-konci NM1. V další části byl proto studován vliv NM1 domén, včetně N-koncového peptidu, na subcelulární lokalizaci tohoto proteinu. Zjistili jsme, že N-koncový peptid NM1 není nezbytný pro jeho vstup do jádra. Jaderný lokalizační signál jsme objevili v doméně NM1 která také váže lehký řetězec, kalmodulin. Tato doména je přítomna také v "cytoplasmatické" isoformě, v proteinu Myo1c. Potvrdili jsme přítomnost obou izoform v buněčném jádře. Použitím polyklonálních protilátek proti N-konci NM1 a monoklonální protilátky proti ocasu NM1/Myo1c bylo ukázáno, že endogenní NM1 a Myo1c kolokalizují ve zvýšené míře v jádře a na plazmatické membráně. Nakonec jsme použitím techniky ko-imunoprecipitace identifikovali nové interakční partnery NM1 zejména aktin- a fosfolipid-vázajících proteiny. Zajímavé je, že některé z identifikovaných proteinů byly rovněž popsány v komplexu s Myo1c. Závěrem vyslovujeme hypotézu, že NM1 a Myo1c by mohly být stejné funkční varianty jednoho genu.

V této práci jsou prezentovány výsledky, které zvýšily naše znalosti o expresi a lokalizaci NM1 v tkáních, mechanismu jeho jaderné lokalizace a jeho molekulárních interakcí. Nejzajímavějším výsledkem je, že NM1 je více podobný Myo1c, než bylo původně předpokládáno. Proto cílem dalších experimentů bude ověřit, zda NM1 a Myo1c jsou funkčně totožné proteiny.