

SOUHRN

Mikrotubuly (MTs) jsou dynamické struktury nezbytné pro vnitřní buněčnou organizaci a transport, propagaci signálu, buněčnou diferenciaci, pohyb a dělení. Pro vykonávání těchto funkcí vytvářejí složitá uspořádání, schopná rychle a přesně reagovat na různé signály. MTs jsou regulovány mnoha faktory, které mají vliv na jejich nukleaci, stabilitu a dynamiku. Žírné buňky z kostní dřene (BMMCs) jsou důležitou součástí imunitního systému. Narušení jejich funkcí však může vést ke vzniku závažných nemocí. V průběhu aktivace BMMCs dochází k podstatné reorganizaci MTs. Molekulární mechanismy, které regulují tyto změny, jsou ale často neznámé. V této práci jsme charakterizovali funkci signálních proteinů GIT1/ β PIX, kinázy PAK1 a Ca^{2+} signalizace v regulaci nukleace MTs u BMMCs a v dalších buněčných typech. Rovněž jsme popsali funkci působení miltefosinu (hexadecylphosphocholinu), nové slibné látky pro léčbu onemocnění způsobených žírnými buňkami.

Zjistili jsme, že GIT1/ β PIX proteiny interagují s γ -tubulinem, a že jsou lokalizovány v centrozomech žírných buněk. Nukleace MTs je pozitivně ovlivňována GIT1 proteinem a Ca^{2+} , zatímco β PIX reguluje nukleaci MTs negativně. Cytosolický Ca^{2+} ovlivňuje vlastnosti γ -tubulinu a stimuluje jeho interakci s GIT1 a proteiny γ -tubulinového komplexu. Kromě toho vytváří γ -tubulin v aktivovaných BMMCs komplexy s GIT1 proteiny fosforylovanými na tyrozinech. Naše data dokumentují nový mechanismus regulace MTs v aktivovaných BMMCs pomocí tyrozinových kináz, GIT1/ β PIX proteinů a Ca^{2+} signalizace.

Ukázali jsme, že signální proteiny GIT1/ β PIX společně s PAK1 kinázou ovlivňují nukleaci MTs z interfázních centrozomů v různých buněčných liniích. GIT1 a PAK1 představují pozitivní a β PIX negativní regulátory tohoto procesu. Úroveň nukleace MTs koreluje s množstvím γ -tubulinu na centrozomech. Prokázali jsme, že PAK1 fosforyluje GIT1 i β PIX proteiny a určili jsme jejich vazebné domény pro interakci s γ -tubulinem. Na základě těchto výsledků jsme navrhli nový mechanismus, kterým GIT1/ β PIX signální proteiny a PAK1 kináza regulují nukleaci MTs v interfázních buňkách.

Poprvé jsme ukázali, že miltefosin ovlivňuje BMMCs jak na plazmatické membráně, tak i v cytosolu. Miltefosin inhibuje degranulaci, reorganizaci MTs a chemotaxi za antigenem. Zatímco prokřížení a tyrozinová fosforylace IgE receptorů je v aktivovaných BMMCs působením miltefosinu potlačena, vtok Ca^{2+} do buňky inhibován není. Miltefosin dále ovlivňuje pohyb granul, dynamiku MTs v závislosti na Ca^{2+} a inhibuje fosforylaci proteinů interagujících s EB1 proteinem vázajícím se na rostoucí konec MTs. Působením miltefosinu na různých místech v BMMCs lze vysvětlit jeho efektivitu při léčbě nemocí způsobených žírnými buňkami.