

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Karel Beránek

Úloha GIT-PIX signální kazety při regulaci cytoskeletu

Role of GIT-PIX signaling cassette in cytoskeleton regulation

Bakalářská práce

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

Oddělení Biologie cytoskeletu

Ústav molekulární genetiky AV ČR v. v. i.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 27. 8. 2012

Karel Beránek

Abstrakt

Cytoskelet je buněčná struktura tvořená z proteinových vláken mikrofilament, středních filament a mikrotubulů. Tato vlákna jsou vysoce dynamická a mění své uspořádání a vlastnosti podle aktuálních potřeb buňky. Systém cytoskeletálních polymerů je regulován pomocí řady interagujících proteinů, mezi které patří i GIT proteiny. GIT proteiny se vyznačují velkým počtem interakčních domén a vytvářejí oligomery, které slouží jako „lešení“ pro vazbu asociovaných proteinů. Napomáhají tak specifické subcelulární lokalizaci řady proteinů a jejich komplexů. GIT proteiny obsahují katalytickou ARF-GAP doménu, která reguluje funkce ARF GTPáz. S GIT proteiny interagují proteiny PIX. Ty slouží jako GEF faktory pro Rho GTPázy a regulují tak signální dráhy ovlivňující cytoskelet. Proteiny GIT a PIX spolu pomocí svých „coiled-coil“ domén interagují a vytvářejí komplexy označované jako „GIT-PIX signální kazeta“. Ta reguluje zejména mikrofilamenta při ustanovování buněčné polarity, tvorbě membránových výběžků a při pohybu a adhezi buněk. Výsledky publikované v posledních letech naznačují, že by GIT-PIX signální kazeta mohla hrát roli také při regulaci mikrotubulů.

Klíčová slova

Cytoskelet, GIT-PIX signální kazeta, GIT proteiny, malé GTPázy, mikrofilamenta, mikrotubuly, PIX proteiny, regulace cytoskeletu

Abstract

The cytoskeleton is a cellular structure comprised of three types of protein filaments called microfilaments, intermediate filaments and microtubules respectively. These filaments are highly dynamic and can change their organisation and properties according to the current needs of a cell. This system of cytoskeletal polymers is regulated by a plethora of interacting proteins, among which belong the GIT proteins. GIT proteins contain a great amount of interaction domains, and they form oligomers which function as a scaffold for the binding of associated proteins. In this way they facilitate specific subcellular localisation of many proteins and their complexes. GIT proteins contain a catalytic ARF-GAP domain that regulates the function of ARF GTPases.

GIT proteins interact with PIX proteins. These proteins function as GEFs for Rho GTPases and thus regulate signal transduction influencing the cytoskeleton. GIT and PIX interact with each other by the means of their coiled-coil domains and form complexes called "GIT-PIX signalling cassettes". The cassettes regulates mostly microfilaments during the establishment of cell polarity, formation of membrane protrusions, and in cell motility and adhesion. Results of experiments published in the last few years suggest that the GIT-PIX signalling cassette could play a role also in the regulation of microtubules.

Key words

Cytoskeleton, GIT-PIX signalling cassette, GIT proteins, microfilaments, microtubules, PIX proteins, regulation of cytoskeleton, small GTPases

Zkratky

ADP	adenosin-5'-diphosphate
APC	Adenomatous polyposis coli
ARF	ADP ribosylation factor
ATP	adenosin-5'-triphosphate
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CLIP-170	Cytoplasmic linker protein 170
DAG	diacylglycerol
Db1	Diffuse b-cell lymphoma
DH	Db1 homology
EB1	End binding 1 protein
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
fMLP	formyl-Met-Leu-Phe
GAP	GTPase activating protein
GCP	γ -tubulin complex protein
GDP	guanosin-5'-diphosphate
GEF	guanin nucleotide exchange factor
GIT	G-Protein-coupled receptor kinase-interactor
GRK	G-protein-coupled receptor kinase
GTP	guanosin-5'-triphosphate
IP ₂	inositol bisphosphate
IP ₃	inositol triphosphate
IP ₅	inositol pentakisphosphate
IQGAP	IQ motif containing GTPase activating protein
LD4	N-koncová sekvence paxillinu s motivem LDXLLXXL
MAPs	Microtubule associated proteins
MEK1	MAP Erk kinase 1
MTOC	Microtubule organizing center
PAK	p21-activated kinase
PIX	p21-activated kinase interacting exchange factor
PLC γ	phospholipase C γ
PTP ζ	Protein tyrosine phosphatase ζ
Spa	Spindle pole antigen
SHD	Spa2-homology domain
TCoB	Tubulin cofactor B
+TIPs	+ end tracking proteins

Obsah

1. Úvod
2. Cytoskelet
 - 2.1. Stavba a funkce mikrofilament
 - 2.2. Stavba a funkce středních filament
 - 2.3. Stavba a funkce mikrotubulů
3. Komponenty GIT-PIX signální kazety
 - 3.1. GIT
 - 3.2. PIX
 - 3.3. GIT-PIX signální kazeta
4. Úloha GIT-PIX signální kazety v regulaci mikrofilament
 - 4.1. Regulace buněčné polarity
 - 4.2. Regulace chemotaxe
 - 4.3. Regulace tvorby fokálních kontaktů
5. Úloha GIT-PIX signální kazety v regulaci mikrotubulů
6. Závěr
7. Literatura

1. Úvod

Cytoskelet je dynamická struktura tvořená z vláknitých proteinových polymerů. Je tvořen ze tří hlavních typů vláken - mikrofilament, středních filament a mikrotubulů. Jak mikrotubuly, tak mikrofilamenta jsou polární struktury, jejichž konce se liší rychlostí přidávání jejich strukturních komponent; aktinu nebo tubulinu. Tato vlákna vzájemně interagují prostřednictvím asociovaných proteinů. Cytoskelet je vysoce dynamická struktura, která rychle reaguje na vnější a vnitřní podněty svým uspořádáním a interakcemi s dalšími buněčnými komponentami. Tím mění své vlastnosti podle aktuálních potřeb buňky. Umožňuje tak buňce vykonávat celou řadu nezbytných funkcí. Reorganizace cytoskeletu je regulována pomocí velkého množství asociovaných proteinů. Mezi ně patří i proteiny GIT a PIX. Které tvoří tzv. signální kazetu regulující signální dráhy, které ovlivňují cytoskelet. Vliv této signální kazety byl nejdříve popsán při regulaci mikrofilament. Výsledky publikované v posledních letech však naznačují, že by tato signální kazeta mohla ovlivňovat i dynamiku a organizaci mikrotubulů.

V této bakalářské práci jsou shrnuty současné poznatky o struktuře a funkci GIT-PIX signální kazety a její roli při regulaci mikrofilament a mikrotubulů.

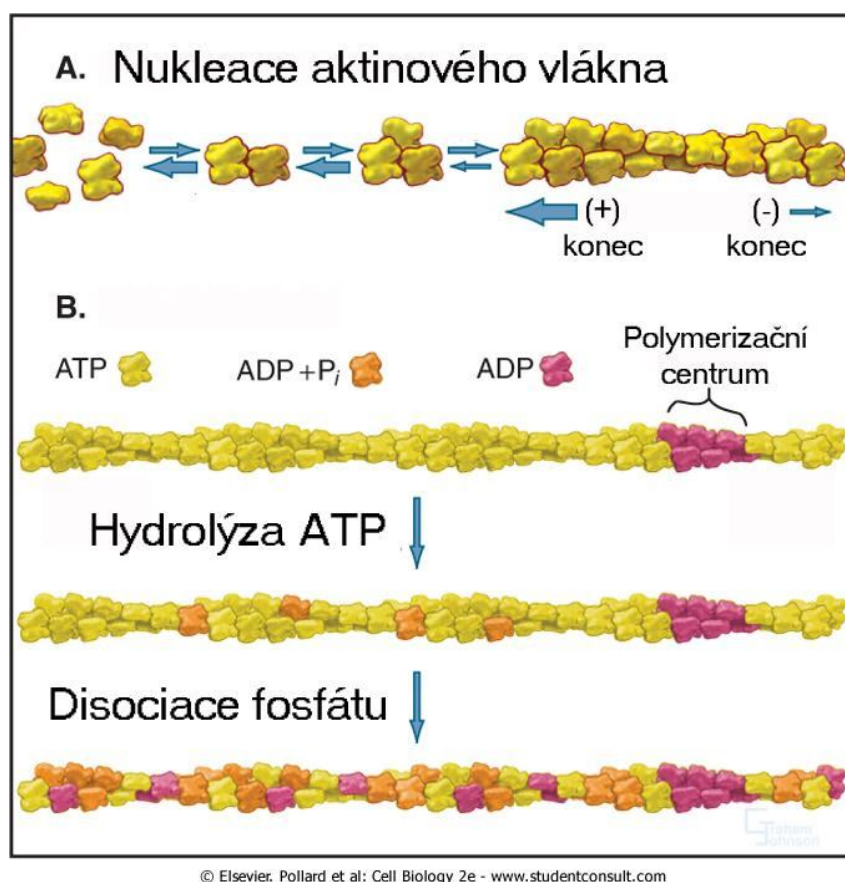
2. Cytoskelet

Cytoskelet je systém dynamických proteinových polymerů, které zastávají v eukaryotní buňce mnoho funkcí. Jsou nezbytné pro segregaci chromozómů, vnitrobuněčný transport, nebo pro rozmístění organel. Dále se účastní na pohybu buňky, adhezi, zajišťuje mechanickou odolnost, určuje buněčný tvar a podílí se na ustanovení buněčné polaridy.

Cytoskelet je tvořen třemi druhy vzájemně interagujících vláken – mikrofilamenty, středními filamenty a mikrotubuly. Tato vlákna mají odlišné složení, vnější průměr, vlastnosti i funkce.

2.1 Stavba a funkce mikrofilament

Mikrofilamenta, též nazývaná aktinová filamenta, se nalézají ve všech eukaryotních buňkách. Jsou nezbytná pro pohyb buněk, pohyb organel, udržování tvaru buňky a při dělení buněk. Jsou tvořena z monomerů globulárního proteinu aktinu, který polymerací tvoří stočený řetězec o vnějším průměru 7 nm. Samotná vlákna jsou většinou nestabilní a snadno podléhají depolymeraci. U mikrofilament rozeznáváme (+) a (-) konec. Na (+) konci probíhá polymerace rychleji, než na (-) konci. Aktin tvoří cca 1 až 5 % hmotnosti proteinů buňky, větší koncentrace je ve svalových buňkách. Zhruba polovina aktinu je v monomerní formě, druhá polovina je polymerována ve vláknech. Monomerní aktin váže ATP. Krátce po navázání k jiné molekule aktinu, dojde k hydrolýze ATP (adenosin-5'-phosphate) na ADP (adenosin-5'-phosphate), což snižuje pevnost vazby mezi jednotlivými aktiny. Navázaný ADP kvůli jeho orientaci uvnitř vlákna již nelze vyměnit znovu za ATP. Koncentrace monomerního aktinu v buňce je velmi vysoká, mnohem vyšší, než je *in vitro* potřeba pro polymeraci. Proto je polymerace regulována navázáním dalších proteinů na aktinové monomery i na celá vlákna. Tyto proteiny pak regulují dynamiku polymerace a depolymerace aktinu a podle potřeb buňky. Na mikrofilamenta se váže také mnoho dalších proteinů. Tyto proteiny pak umožňují vzájemné propojení aktinových vláken a vytvoření rozmanitých síťovitých struktur, které vykonávají mnoho funkcí.



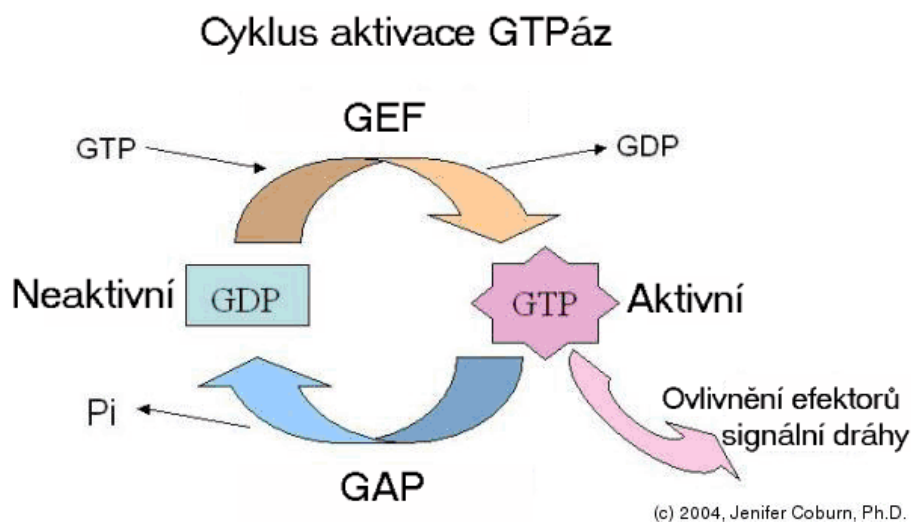
Obr. 1. Nukleace aktinového vlákna (upraveno dle Pollard, 2008)

V pohybujících se buňkách tvoří aktinová vlákna rozvětvené sítě v lamellipodiích, širokých plochých výběžcích v přední části buňky. U mnoha buněk tvoří aktin paralelní svazky tzv. stresová vlákna. Vlákna jsou tvořena z mikrofilament, myosinu II a dalších proteinů a jsou ukotvena v plazmatické membráně v místech fokálních adhezí. U dělících se buněk tvoří aktinová vlákna kontraktilní prstenec, který napomáhá rozdělení buněk. Aktinová vlákna také ovlivňují tvar buňky a utváření povrchových struktur, jako jsou podosomy a invadopodia (Draber et al, 2012).

Buňky mají na svém povrchu mnoho druhů receptorů, které v reakci na vnější signály spouštějí signální kaskády, které vedou k přeorganizování aktinového cytoskeletu a ke změnám jeho funkcí. Efektory těchto signálních drah jsou GTPázy

rozdělené do tří skupin – Rho GTPázy, Rac GTPázy a Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) GTPázy.

GTPázy jsou proteiny schopné vázat GTP (guanosin-5'-triphosphate) a měnit svou funkci v závislosti na jeho navázání. Jsou regulovány pomocí GAP (GTPase activating protein) proteinů, které katalyzují hydrolýzu GTP na GDP (guanosin-5'-diphosphate) a pomocí GEF (Guanin nucleotide exchange factor) proteinů, které vyměňují GDP za GTP. Rho GTPázy aktivují formování stresových vláken a fokálních adhezí. Rac GTPázy aktivují formování lamelipodií a výběžků cytoplazmatické membrány. Cdc42 GTPázy spouští formování filopodií. Všechny tyto GTPázy jsou aktivní ve formě s navázaným GTP.



Obr. 2. Cyklus aktivace GTPáz

(Převzato z <http://ocw.tufts.edu/Content/2/CourseHome/191262/191287>)

2.2 Stavba a funkce středních filament

Střední filamenta tvoří pevná vlákna o průměru 10 nm. Svým složením patří k nejvariabilnějším složkám cytoskeletu. Jejich hlavní funkcí je převážně ochrana buňky před mechanickým stresem. Jsou tvořena z vláknitých proteinů, jejichž tělo je

tvoreno α -helixem s globulárními doménami na C a N koncích. Oblast s α -helixem je konzervativní, oproti tomu složení koncových domén je velmi variabilní. V místech α -helixů se skládají proteiny paralelně k sobě a vytváří dimer. Dimery se pak spojují antiparalelně a vytváří tetramer. Z těchto tetramerů se pak vytvářejí vlákna středních filament, která mohou být vzájemně propojená. Na rozdíl od aktinových vláken a mikrotubulů jsou střední filamenta nepolární a neslouží jako dráhy pro molekulární motory.

Rozeznáváme 6 tříd středních filament podle jejich aminokyselinového složení. Do první třídy patří kyselé keratiny vyskytující se převážně v epitelech. Do druhé třídy patří bazické keratiny, také převážně v epitelech. Třetí třídu tvoří vimentin vyskytující se v mezenchymálních buňkách, periferin v periferních nervových buňkách, desmin ve svalových buňkách a GFAP (Glial fibrillary acidic protein), vyskytující se v gliových buňkách. Do čtvrté třídy patří neurofilamenta, která jsou v nervových buňkách a nestin v kmenových buňkách. Pátou třídu tvoří nukleární laminy, které formují jadernou laminu. Do šesté skupiny patří proteiny z oční čočky – filesin a phakinin.

2.3 Stavba a funkce mikrotubulů

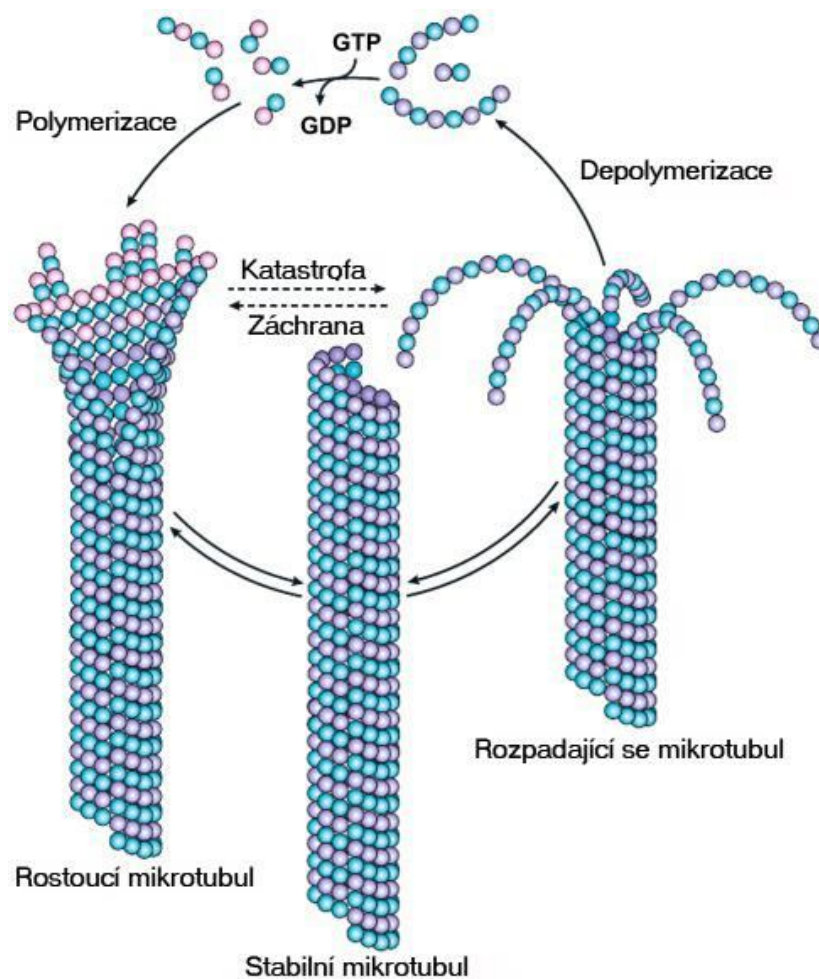
Mikrotubuly jsou duté cytoskeletální struktury s vnějším průměrem 25 nm. Jsou tvořeny heterodimery α -tubulinu a β -tubulinu. Tubuliny jsou evolučně velmi konzervované a jsou kódovány více geny. V lidských buňkách existuje osm izotypů α -tubulinu a sedm β -tubulinu. Polymerací tubulinových heterodimerů, vznikají protofilamenta. Mikrotubulární vlákno se obvykle skládá z 13 protofilament. Jelikož jsou $\alpha\beta$ -tubulinové dimery spojovány v řadě za sebou; α -tubulin jednoho dimeru se váže na β -tubulin druhého dimeru (head-to-tail), jsou pak protofilamenta a tím i celý mikrotubul polární. α -Tubulin je na tzv. (-) konci a β -tubulin na (+) konci mikrotubulu. Na (+) konci dochází k rychlejší polymeraci než na (-) konci, na kterém převládá depolymerace. Tato polarita je velmi důležitá a umožňuje mikrotubulům vykonávat mnoho funkcí. Mikrotubuly určují buněčnou polaritu, regulují směr

transportu váčků a organel, oddělují chromosomy při buněčném dělení a účastní se translokace signálů v buňce. Vlastnosti jednotlivých mikrotubulů jsou ovlivňovány inkorporací různých tubulinových izotypů a jejich post-translačních modifikací. Mezi nejčastější post-translační modifikace patří acetylace, detyrosinace, polyglutamylace a polyglycyllace.

Mikrotubuly jsou v buňce většinou ukotvené svým (-) koncem v organizačním centru mikrotubulů MTOC (microtubule organizing center), kde se nachází i komplexy γ -tubulinových proteinů. Tyto komplexy vytvářejí prstencový základ pro vznik nového mikrotubulu, na který se pak váže $\alpha\beta$ -tubulinový dimer svou α -podjednotkou. Nukleace mikrotubulů může probíhat nejen z centrozomu, ale také z pólů mitotického vřetenka a u buněk s řasinkami v bazálních tělískách. γ -Tubulinové komplexy jsou tvořeny γ -tubulinem dalšími proteiny nazývanými GCP (γ -tubulin complex protein). Malý γ -tubulinový komplex (γ TuSC; γ -tubulin small complex) je tvořen z dvou molekul γ -tubulinu a jedné molekuly GCP2 a GCP3. Velký γ -tubulinový komplex (γ TuRC; γ -tubulin ring complex) je tvořen z malých komplexů a proteinů GCP4, GCP5 a GCP6.

Zhruba polovina $\alpha\beta$ -tubulinových dimerů je v buňce volných, druhá polovina je polymerována do vláken. Volné dimery mají navázaný GTP na β -podjednotce, který se krátce po navázání k vláknu hydrolyzuje na GDP, tím se oslabí jeho vazba k ostatním dimerům. V případě polymerace jsou dimery k vláknu přidávány rychleji, než dochází k hydrolýze jejich GTP. Na (+) konci mikrotubulu se tak utváří oblast s navázaným GTP (tzv. „GTP čepička“), která stabilizuje mikrotubulové vlákno a zabraňuje jeho depolymeraci. Pokud je nedostatek $\alpha\beta$ -tubulinových dimerů a GTP na přidaných dimerech hydrolyzuje rychleji, než se přidávají nové dimery, dojde ke ztrátě této stabilizující čepičky, na špičce převládne GDP a dochází k depolymeraci mikrotubulu (Obr 1). Ta může vést k úplné depolymeraci mikrotubulu, ale může se také po chvíli zastavit a následně dojde k polymeraci. Tato vlastnost mikrotubulů se nazývá „dynamická nestabilita mikrotubulů“ a umožňují buňce rychlou přestavbu mikrotubulů v odpovědi na vnější a vnitřní signály. (Desai & Mitchison, 1997) Dynamická nestabilita mikrotubulů je regulována pomocí proteinů vážících se na

mikrotubuly. Největší skupinu tvoří strukturální MAPs (Microtubule associated proteins), které se vážou podél mikrotubulových vláken. Skupina proteinů, vážících se na (+) konec mikrotubulů se nazývá +TIP proteiny. Ty se podílejí jak na regulaci dynamiky mikrotubulů, tak také zprostředkovávají kontakt (+) konce s kinetochory, nebo s plazmatickou membránou. Mezi typické +TIP proteiny patří: EB1 (end binding 1) protein, který stabilizuje mikrotubuly. CLIP-170 (cytoplasmic linker protein 170), který přepíná ze stavu depolymerace na polymeraci. APC (adenomatous polyposis coli), který stabilizuje mikrotubuly a chrání je před depolymerací.



Obr. 3. Struktura mikrotubulu a jeho dynamická nestabilita.

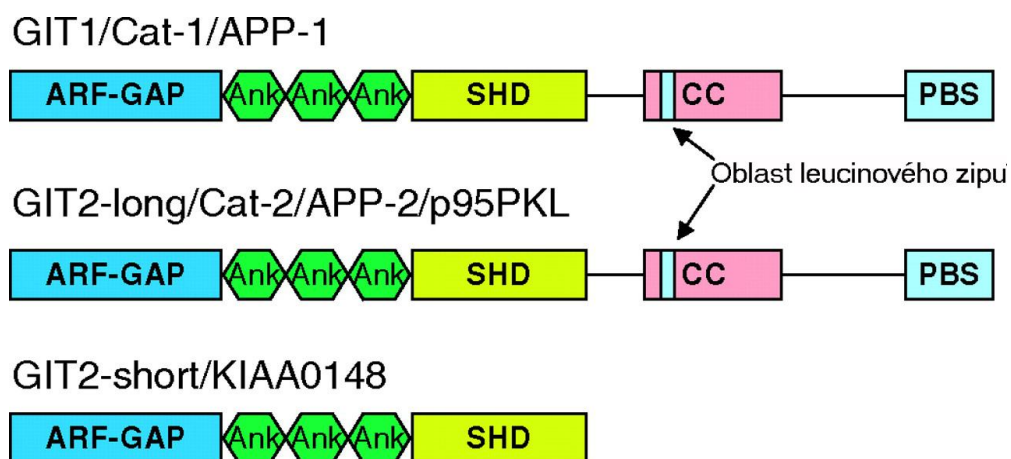
(upraveno dle Akhmanova & Steinmetz, 2008)

3. Komponenty GIT-PIX signální kazety

Jednou skupinou proteinů, které ovlivňují tvorbu mikrofilamentových struktur jsou proteiny GIT-PIX signální kazety. V poslední době se ukazuje, že by tyto proteiny mohly regulovat i stavbu mikrotubulů.

3.1 GIT proteiny

GIT (G-Protein-Coupled Receptor Kinase-Interactor, nazývaný také ARF GTPase-activating protein GIT, ARF GAP GIT, Cool-Associated and Tyrosine Phosphorylated Protein, GRK-Interacting-Protein, p95 paxillin kinase linker, p95PKL a Paxillin interacting protein) rodina proteinů sestává z orthologů GIT1 a GIT2. Oba představují vysoce konzervované proteiny a jsou exprimovány ve všech buňkách savců a ptáků. Lidský GIT1 a GIT2 jsou z 65% sekvenčně identické a mají 85 % podobnost. Odlišnosti mezi nimi se nacházejí převážně ve střední části proteinu, mimo důležité vazebné domény. GIT1 lidských buněk je tvořen 761 aminokyselinami a má molekulovou hmotnost 84,3 kDa. U GIT2 u lidských buněk je to 759 aminokyselin s molekulovou hmotností 84,5 kDa (viz databáze Uniprot - www.uniprot.org). GIT1 existuje u buněk jen v jedné variantě, zatímco GIT2 má mnoho variant, alternativně sestřižených podle druhu tkáně. Existuje nejméně 10 sestřihových variant a teoreticky až 32 odlišných transkriptů (Premont et al, 2000). Zkrácená isoforma (GIT2-short) je tvořena začleněním alternativního exonu obsahujícího stop kodón a má nepřekládanou 3' oblast (Ohara et al, 1997). Tato zkrácená verze GIT2-short se nachází pouze v buňkách imunitního systému (Premont et al, 2000). GIT1 a GIT2 mohou tvořit homo a heterodimery prostřednictvím jejich α -helikálních coiled-coil domén (Paris et al, 2003).



Obr. 4. Isoformy GIT a znázornění rozložení jejich domén.

Domény: ARF-GAP (ADP ribosylation factor - GTPase activating protein), Ank (Ankyrinové repetice), SHD (Spa2-homology domain), CC (coiled-coil doména), PBS (Paxilin binding site) (Hoefen & Berk, 2006)

Díky své schopnosti vytvářet homo- a heterodimery a díky svým vazebným doménám, slouží GIT proteiny často jako „lešení“, které umožňuje funkci ostatních proteinů. Mezi hlavní funkce GIT proteinů patří regulace dynamiky cytoskeletu při pohybu buněk pomocí inhibice Rac1. Umožňuje také ustanovit buněčnou polaritu směrováním aktivního Rac do směru růstu. V neuronech aktivuje GIT pomocí své ARF-GAP (ADP ribosylation factor - GTPase activating protein) domény protein ARF6, nezbytný pro růst axonů (Albertinazzi et al, 2003). Cytoskeletální funkce GIT proteinů jsou podrobněji probrány v kapitolách 4 a 5.

Další funkcí GIT proteinů je internalizace receptorů. GIT proteiny ovlivňují internalizaci receptorů endocytózou zprostředkovanou clathrinem. Při nadprodukci GIT1 a GIT2 (dlouhá varianta) proteinů došlo k přerušení běžné internalizace receptorů s navázanými agonisty, což vedlo k inhibici opětovné senzitivace těmito agonisty. Tyto pokusy neměly vliv na receptory, které jsou internalizovány bez clathrinu (Claing et al, 2000). Deaktivace ARF-GAP domény GIT proteinu přerušila účinky jeho zvýšené exprese (Premont et al, 1998). Internalizace se účastní také ARF6 (ADP ribosylation factor 6). Při pokusech s ARF6 mutanty s trvale navázaným GDP,

případně GTP, proběhla inhibice internalizace receptorů a jejich desenzitizace podobným způsobem, jako při pokusech s overexprimovanými GIT1 a GIT2 (dlouhá varianta) (Clainig et al, 2001). Přesný mechanismus, kterým ARF-GAP doména GIT proteinů reguluje internalizaci receptorů, zatím není znám. Pravděpodobně v něm však bude hrát roli interakce GIT s kinázami GRK (G-protein-coupled receptor kinase), které umožní přiblížení GIT proteinů k membráně.

GIT1 se váže na patogenní mutantní protein huntingtin a tak se pravděpodobně podílí na pozmeněném transportu vesikulů, což způsobuje rozvoj Huntingtonovy choroby. Hromadění mutantního huntingtinu narůstá v odpovědi na expresi mutantní verze GIT1, který postrádá ARF-GAP aktivitu. V neuronech pacientů s Huntingtonovou chorobou byly identifikovány varianty GIT1 s nižší molekulovou hmotností, než u normálního GIT1, což by mohlo být způsobeno chybějící ARF-GAP doménou (Goehler et al, 2004).

Funkce proteinů GIT jsou často ovlivňovány fosforylací. Hlavní kinázy fosforylující GIT jsou tyrosin kinázy Src a FAK (Focal adhesion kinase) (Haendeler et al, 2003; Yin et al, 2004). FAK kináza je schopná autofosforylace na tyrosinu 397, což vede k navázání Src kinázy na toto místo. Navázaná Src kináza poté fosforyluje GIT1. Tímto mechanismem reguluje FAK kináza působení Src kináz na GIT1 (Bagrodia et al, 1999). Vliv fosforylací je odlišný u GIT1 a GIT2. Zatímco u GIT2 je nutná fosforylace pro lokalizaci do fokálních komplexů, u GIT1 tato fosforylace potřeba není (Brown et al, 2005). Jediná známá fosfatáza pro defosforylací GIT proteinů je PTP ζ (Protein tyrosine phosphatase ζ) (Kawachi et al, 2001).

Protein GIT obsahuje mnoho vazebných domén, pomocí nichž interaguje s řadou dalších proteinů. Mezi tyto domény patří:

ARF-GAP doména

ARFs (ADP ribosylation factors) jsou proteiny patřící do skupiny GTP-vázcích proteinů. Regulují přenos váčků a interagují s jejich obalovými proteiny. Jejich aktivita je řízena pomocí ARF-GAP proteinů, které obsahují „zinc-finger-like“ motiv, který je nutný pro jejich aktivaci. GIT proteiny mají ARF-GAP doménu, která

aktivuje ARF1, ARF2, ARF3, ARF5 a ARF6.

Aktivita ARF-GAP domény GIT proteinů je stimulována pomocí IP₃ (inositol triphosphate). IP₂ (inositol bisphosphate), IP₅ (inositol pentakisphosphate) a DAG (diacylglycerol) na její funkci vliv nemají (Vitale et al, 2000). Díky své ARF-GAP doméně je GIT1 lokalizován u buněčné membrány a v reakci na signál reguluje přenos váčků v buňce. Pokusy s GIT1 proteinem s odstraněnou ARF-GAP doménou, nebo s mutacemi zabraňujícími její správné funkci vedly k utváření velkých recyklujících endosomů, které nebyly pozorovány v nemutovaných buňkách (Matafora et al, 2001). Z výsledků pokusů vyplývá, že funkce ARF-GAP domény u GIT je nutná pro správné fungování membránového transportu a lokalizaci GIT na periferii buňky.

Ankyrinové repetice

GIT má 3 ankyrinové (Ank) repetice jejichž hlavní funkcí je zprostředkovávat vazbu mezi proteiny. Oblast okolo první ankyrinové repetice je sekvenčně podobná vinculinu v místech, kde se váže paxillin. Afinity GIT proteinů k paxillinu však byla prokázána pouze u krátké verze GIT2 (GIT2-short) (Turner et al, 1999). Pokusy s mutacemi a s malými fragmenty prokázaly, že první ankyrinová repetice je zodpovědná za vazbu GIT k endosomu (Di Cesare et al, 2000; Paris et al, 2002).

Spa2-homologní doména

SHD (Spa2-homology domain) je tandemová repetice, která se vyskytuje pouze u GIT1 a GIT2 proteinů a u proteinů Spa2 (Spindle pole antigen 2) a Sph1 (Spa2 homolog 1) které se nacházejí u kvasinek. Spa2 a Sph1 jsou nutné pro ustanovení polarity, směr růstu a pro morfologické změny během zrání kvasinek (Arkowitz & Lowe, 1997). U GIT1 a GIT2 slouží tyto domény k interakcím s dalšími proteiny, které často utvářejí velké proteinové komplexy (viz Obr.5). Na SHD se váže protein PIX (p21-activated kinase interacting exchange factor), kterému je věnována kapitola 3.2 a kináza MEK1 (MAP Erk kinase 1) (Yin et al, 2004). MEK1 je kináza která fosforyluje ERK1 (Extracellular signal-regulated kinase 1) a ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 2). GIT1 je pro tuto funkci MEK1 kinázy nutný, protože utváří lešení, které napomáhá správné prostorové konformaci MEK1 kinázy

a ERK1/2 (Yin et al, 2004). Byla také prokázána kolokalizace GIT a ERK1/2 v místech fokálních adhezí (Yin et al, 2005). tato funkce GIT1 a MEK1 je evolučně konzervována. Na SHD doménu Spa2 proteinů kvasinek se vážou kvasinkové orthology MEK1 (Sheu et al, 1998).

Na SHD se také váže PLC γ (phospholipase C γ). Ta katalyzuje hydrolýzu PIP $_2$ (phosphatidylinositol 4,5 diphosphate) na IP $_3$ (inositol 1,4,5 triphosphate) a DAG (diacylglycerol). Na rozdíl od ostatních isoform PLC se stejnou funkcí, je PLC γ aktivována fosforylací na tyrosinu. V odpovědi na rozličné podněty jsou GIT1 a PLC γ fosforylovány Src kinázou. Vazba PLC γ na GIT1 však fosforylací není ovlivněna. Snížení exprese GIT1 vedlo k inhibici fosforylace PLC γ a k inhibici uvolnění Ca $^{2+}$. (Haendeler et al, 2003).

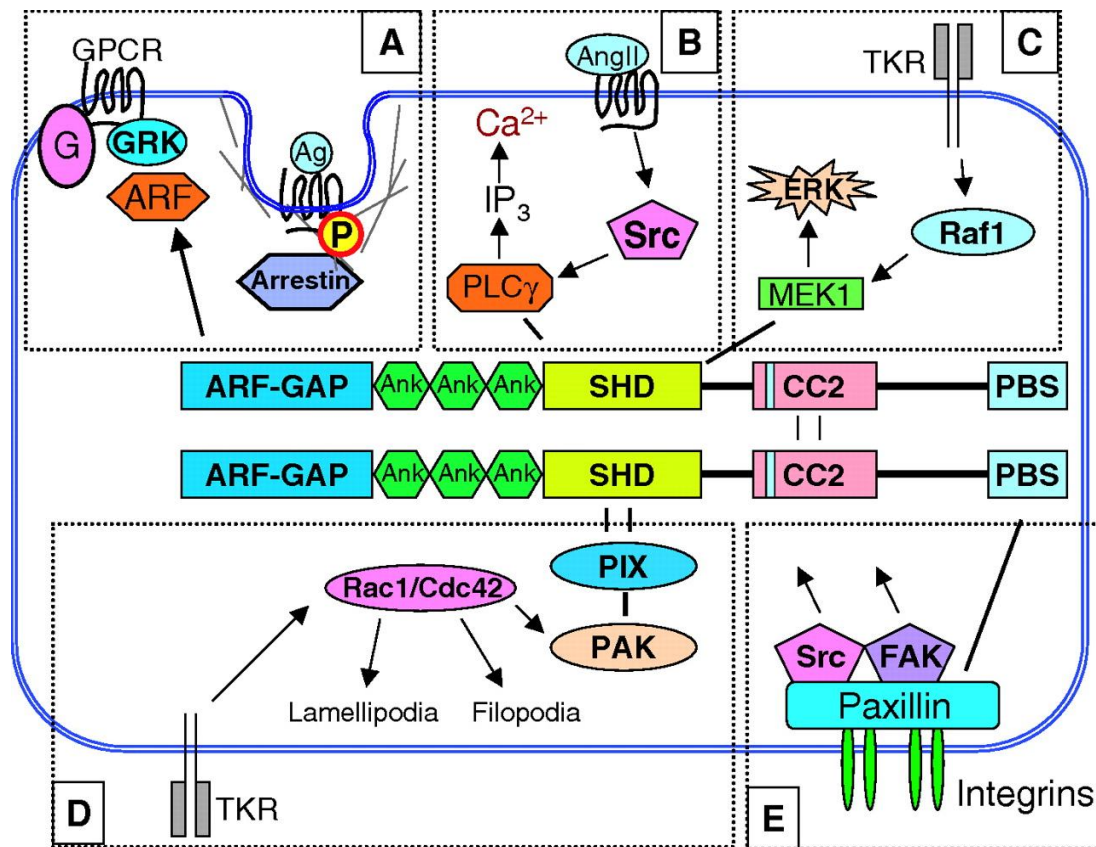
„Coiled-coil“ doména

GIT1 a GIT2-long obsahují 3 coiled-coil struktury. První se nachází v SHD, druhá v PBS (Paxilin binding site) doméně (Zhao et al, 2000) a třetí, která leží mezi nimi, není součástí žádné známé funkční domény. Díky těmto coiled-coil doménám může GIT1 a GIT2 vytvářet homo- a heterodimery (Paris et al, 2003; Schlenker & Rittinger, 2009).

Vazebná doména pro paxillin

Paxillin je adaptorový protein nacházející se ve fokálních adhezích. Paxillin se svojí LD4 (N-koncová sekvence s motivem LDXLLXXL) doménou váže na GIT1 a dlouhou verzi GIT2 v oblasti C-koncové PBS (Paxillin binding site) domény (Zhao et al, 2000). Do oblasti PBS se také váží proteiny Hic-5 a leupaxin, které též obsahují LD motiv. Interakce GIT s paxilinem je nezbytná pro lokalizaci GIT do fokálních komplexů. To bylo prokázáno při pokusech s deletovanou LD4 doménou u paxillinu nebo PBS u GIT proteinů. Při pokusech pouze se samostatným krátkým C-koncem GIT byl tento konec mnohem více vázán do fokálních komplexů, než v případě celého GIT proteinu (Brown et al, 2002). To naznačuje, že v případě celého GIT bude vazba na PBS nejspíše regulována jinou částí GIT, případně jeho vazebnými partnery. Tuto teorii podporují výsledky, při kterých, u mutantního GIT neschopného interagovat

s PIX, nedocházelo k transportu GIT-PIX do oblasti fokálních komplexů (Brown et al, 2002).



Obr. 5. Schematické zobrazení dimery GIT1 a jeho interakčních partnerů při endocytóze GPCR receptorů (A), aktivaci PLCγ a spuštění vápníkové signalizace (B), při aktivaci MEK1 kinázy (C), regulaci cytoskeletu (D), a při tvorbě fokálních komplexů (E). (Hoefen & Berk, 2006)

Zkratky použité v obrázku:

Ag (agonista), AngII (Angiotensin II), ARF (ADP ribosilation factor), Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog), ERK (Extracellular signal-regulated kinase), FAK (Focal adhesion kinase), G (G-protein), GPCR (G-protein coupled receptor), GRK (G-protein coupled receptor kinase), MEK1 (MAP Erk kinase 1), P (Phosphate), PAK (p21-activated kinase), PIX (p21-activated kinase interacting exchange factor), PLCγ (Phospholipase Cγ), TKR (tyrosin kinase receptor),

Na GIT proteiny se také váží GRKs (G-protein-coupled receptor kinases). GIT interaguje s GRK přímo, ale místo interakce není známo. GRKs váží a fosforylují GPCRs (G-protein-coupled receptors) s navázanými agonisty, což vede k jejich internalizaci endocytózou zprostředkovanou clathrinovými váčky (Premont et al, 2000). Protože přenos GRKs k plazmatické membráně představuje časnou odpověď na vazbu agonistů na GPCRs, může tato interakce způsobovat navedení GIT k plazmatické membráně. GRK2-dependentní vazba GIT k membráně byla prokázána *in vitro* (Premont et al, 1998).

3.2 PIX

PIX, celým názvem PAK-interacting exchange factor, též nazýván Cool (Cloned-out of library), případně Rho guanine nucleotide exchange factor, je protein, který byl poprvé izolován jako přímý interakční partner PAK (p21-activated kinase) (Bagrodia et al, 1998; Manser et al, 1998). Také byl identifikován při hledání proteinů s SH3 doménou (Oh et al, 1997). Dvě hlavní formy tohoto proteinu jsou α PIX a β PIX. Ty se vzájemně liší jak expresí v tkáních, tak i svými funkcemi. α PIX je tvořen 776 aminokyselinami a má molekulovou hmotnost 87,5 kDa. Velikost β PIX je tvořen 803 aminokyselinami a má molekulovou hmotnost 90,0 kDa (www.uniprot.org). α PIX je exprimován převážně v buňkách krvetvorby a ve svalech (Manser et al, 1998), zatímco β PIX je exprimován ve všech tkáních a má mnoho sestřihových variant, obzvláště v mozku (Koh et al, 2001; Manser et al, 1998).

DH doména

Oba proteiny, α PIX i β PIX, obsahují DH (Dbl [Diffuse b-cell lymphoma] homology) doménu, která je, spolu s PH (Pleckstrin homology) doménou, nutná pro správnou GEF (Guanine nucleotide exchange factor) funkci těchto proteinů. Pomocí této domény katalyzují u specifických GTPáz výměnu GDP (Guanosine-5'-diphosphate) za GTP (Guanosine-5'-triphosphate). Rodina PIX proteinů má GEF specifitu pro GTPázy Rho, Rac a Cdc42.

PH doména

PH (Pleckstrin homology) doména se nalézá u α PIX i β PIX proteinů. Tato doména

váže phosphatidylinositoly a také interaguje s $\beta\gamma$ podjednotkami trimerních G-proteinů a s protein kinázou C (Yao et al, 1994).

SH3 doména

Všechny PIX proteiny mají také N-koncovou SH3 (Src homology 3) doménu, která se váže s vysokou afinitou na úseky obsahující PXXXPR motiv na PAK1 (Bagrodia et al, 1998; Manser et al, 1998), c-Cbl ubiquitin ligáze (Flanders et al, 2003) a na Rac1 (ten Klooster et al, 2006).

GIT vazebná doména

Většina sestřihových variant má také GIT-vazebnou doménu (GBD, GIT binding domain), díky které vytváří komplexy s GIT proteiny (Bagrodia et al, 1999; Di Cesare et al, 2000; Turner et al, 1999; Zhao et al, 2000).

Prolin rich region

Dále obsahují na prolin bohatý region, který váže POPX1 a POPX2 fosfatázy, které inaktivují PAK (Koh et al, 2002).

Oba PIX proteiny také váží Calpain 4, což je regulační podjednotka proteáz μ -Calpain a m-Calpain, závislých na vápníku. K této vazbě je potřeba jak SH3 doména, tak také PH a DH domény (Rosenberger et al, 2005).

I když mají α PIX a β PIX mnoho společných domén a motivů, lze u nich nalézt i rozdíly. Na rozdíl od α PIX proteinu nemá β PIX N-koncovou calponin-homologní doménu (CH domain), která je nutná pro interakci s proteinem fokálních adhezí β -parvinem (někdy též nazývaným affixin) (Bagrodia et al, 1998; Manser et al, 1998). Pouze β PIX obsahuje také na C-konci motiv, pro vazbu proteinů obsahujících PDZ doménu (PDZ je zkratka tvořená prvními písmeny tří proteinů u kterých byla tato doména poprvé objevena; Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor a Zonula occludens-1 protein.) (Audebert et al, 2004; Park et al, 2003). β PIX také obsahuje T1 inzert, přiléhající k PH doméně (Pleckstrin homology domain), který inhibuje GEF aktivitu (Feng et al, 2002). Při pokusech *in vitro* byla GEF aktivita velice slabá, ale v živých buňkách se ukázalo, že fosforylace β PIX

proteinu Src kinázou na tyrosinu 442 vypne inhibiční funkci T1 inzertu a β PIX má poté GEF aktivitu specifickou pro Cdc42 (Cell division control protein 42) (Feng et al, 2006).

U α PIX je jeho GEF aktivita také regulována jeho dimerizací. Dimerizace probíhá v místech coiled-coil motivu (Kim et al, 2001; Koh et al, 2001). Monomer α PIX má GEF aktivitu pro Cdc42 a Rac, zatímco dimer α PIX má GEF aktivitu pouze pro Rac. Po aktivaci GPCRs se navážou podjednotky G-proteinu β a γ na PAK a ten se poté váže na SH3 doménu α PIX dimeru. Dojde k disociaci na monomery, což vede k spuštění GEF aktivity, specificky cílené na Cdc42. Cdc42 po navázání GTP získává schopnost se vázat k DH (Dbl homology) doméně α PIX dimeru a způsobí konformační změny, které vedou k GEF aktivitě tohoto dimeru specificky na Rac. Tento mechanismus vede ke koordinované aktivaci Cdc42 a Rac. (Baird et al, 2005; Feng et al, 2004).



Obr. 6. Distribuce domén u proteinů α PIX a β PIX.

(upraveno dle Frank & Hansen, 2008)

Zkratky použité v obrázku:

CC (Coiled-coil region), CH (Calponin homology domain), DH (Dbl homology domain), GBD (GIT binding domain), PH (Plekstrin homology domain), PR (Proline rich region), SH3 (Src homology 3 domain), ZB (motiv vážící PDZ doménu)

3.3 GIT-PIX signální kazeta

GIT proteiny se váží přímou vazbou svou SHD doménou na GBD doménu PIX proteinů. Tyto domény jsou u obou proteinů umístěné blízko jejich „coiled-coil“ oblastí, které umožňují jejich homopolymerizaci. GIT a PIX proteiny se vyskytují

v buňkách ve velkých komplexech složených zhruba z deseti až dvaceti proteinů o hmotnosti 1 až 2 MDa (Premont et al, 2004). Krystalografické strukturální a hydrodynamické studie ukázaly, že GIT a PIX proteiny tvoří *in vitro* velmi stabilní heteropentamer, tvořený homotrimerem β PIX proteinů a homodimerem GIT1 proteinů. V tomto heteropentameru se GBD domény dvou β PIX proteinů vázaly na SHD domény obou GIT1 proteinů, zatímco GBD doména na třetím β PIX zůstala pro GIT1 nedostupná, pravděpodobně díky sterickému bránění zbylých dvou β PIX proteinů (Schlenker & Rittinger, 2009).

GIT-PIX komplexy se v buňce nalézají u buněčného povrchu, ve fokálních komplexech, v cytoplazmatických komplexech a také v centrozomu (Loo et al, 2004; Zhao et al, 2005). Vzájemná interakce GIT a PIX proteinů je nutná pro správnou lokalizaci. Mutované GIT a PIX proteiny, neschopné tvorby GIT-PIX komplexů a také mutované PIX proteiny, neschopné homodimerizace, byly pozorovány volně rozptýlené v cytoplazmě (Loo et al, 2004).

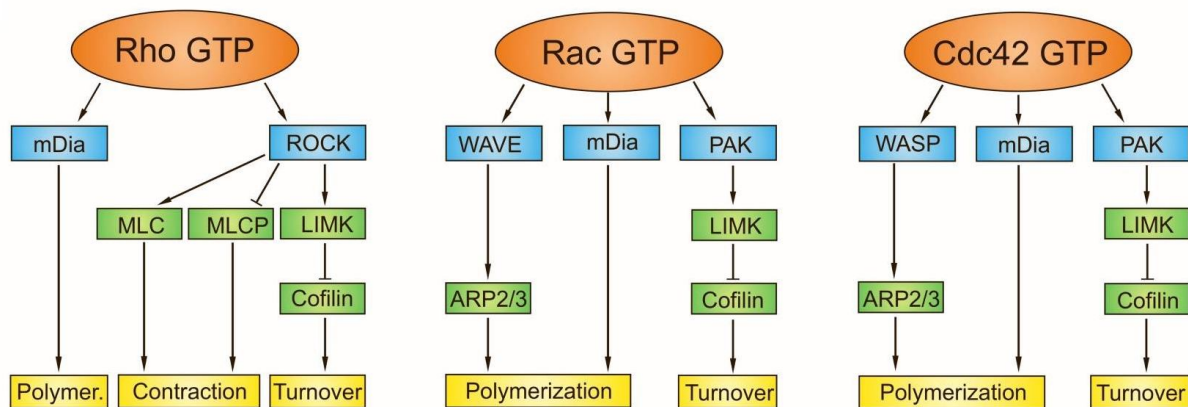
GIT-PIX komplex vytváří lešení, které propojuje signální dráhy Arf a Rho rodin GTPáz. Na GIT-PIX se váže také mnoho dalších proteinů, které mohou ovlivňovat jak funkce, tak i lokalizaci tohoto komplexu. Hlavní funkce GIT-PIX komplexu jsou regulace buněčné polarity, pohyb buňky, tvorba fokálních komplexů a tvorba a synapsí (Manabe et al, 2002; Saneyoshi et al, 2008; Zhao et al, 2000).

4. Úloha GIT-PIX signální kazety v regulaci mikrofilament

Funkce mikrofilament jsou regulovány převážně pomocí signálních drah obsahujících Rho, Rac a Cdc42 GTPázy.

Rho, Rac i Cdc42 GTPázy mají schopnost aktivovat protein mDia, který podporuje růst nerozvětvených mikrofilament. Oproti tomu proteiny WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), které aktivují Cdc42 GTPázy a proteiny WAVE (WASP-family verprolin homologous protein), které mohou být aktivovány Rac GTPázami, interagují s komplexem Arp2/3 a stimulují růst rozvětvených mikrofilamentárních struktur. Pak1, který je efektoem GTPáz Rac a Cdc42, po aktivaci fosforyluje LIMK

(LIM-motif containing kinase), která inhibuje cofilin a vede k spuštění přestavby mikrofilamentových struktur. Rho GTPázy ovlivňují protein ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase), který působí na MLC (myosin II light chain) a MLCP (myosin light chain phosphatase), ty ovlivňují interakce aktinu s myosiny a spouští kontrakce mikrotubulů.



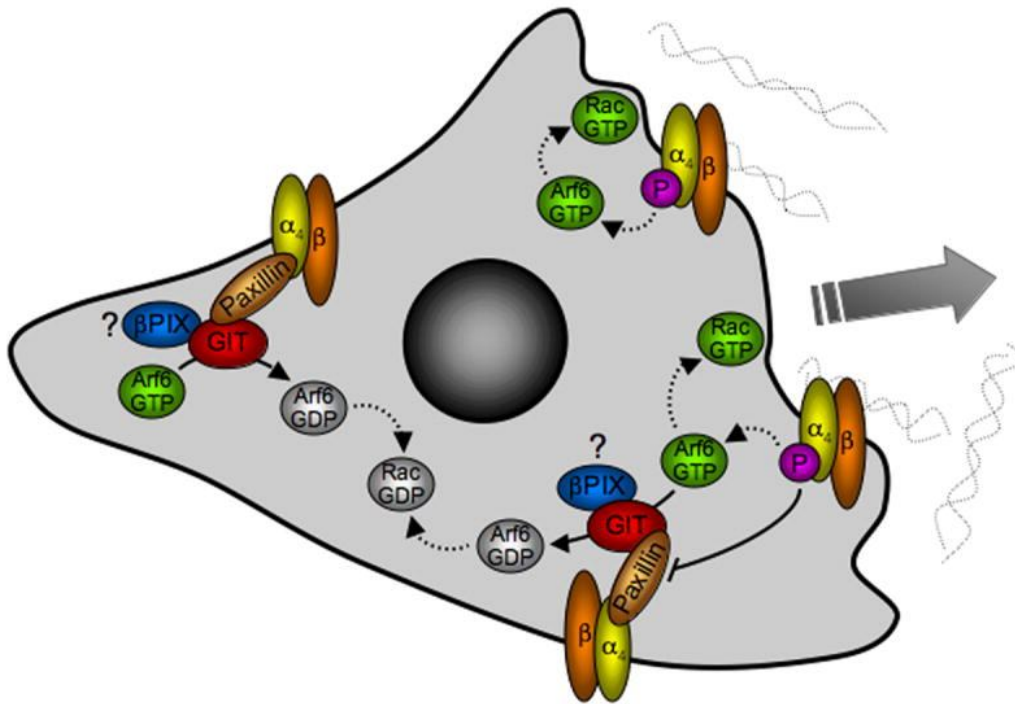
Obr. 7. Schématické znázornění vlivu Rho, RAC a Cdc42 GTPáz na mikrofilamenta. (dle Draber et al, 2012)

4.1 Regulace buněčné polarity

Vytvoření polarity buněk je proces, při kterém buňka ovlivňuje uspořádání proteinů a organel v odpovědi na vnější podněty. Buněčná polarita je nutná pro mnoho procesů, jako jsou migrace buněk, diferenciacce a změny buněčného tvaru. Vrstvy polarizovaných buněk v tkáních zajišťují směrovaný transport látek, sekreci a mechanickou odolnost.

GIT-PIX komplex se podílí na těchto dějích ovlivňováním několika mechanismů. Jedním z nich je regulace pohybu buňky v reakci na signály od $\alpha 4$ -integrinů. $\alpha 4$ -integriny, jako jediné z integrinů, váží paxillin přímou vazbou. Slouží také jako substrát pro PKA (Protein kinase A) a zároveň jí mohou ukotvovat u membrány. Stimulované $\alpha 4$ -integriny, jsou nejprve fosforylovány na serinu 988 v jejich cytoplazmatické části. Tato fosforylace zabrání navázání paxillinu a následná aktivace Arf6 vede k aktivaci Rac a spuštění přestavby aktinového cytoskeletu

a tvorby lamellipodií. V zadní části buňky nedochází k fosforylaci $\alpha 4$ integrinů a váže se na ně paxillin, který svou LD4 doménou váže PBS doménu GIT1 a dochází k navázání GIT-PIX komplexu. GIT1 pomocí své ARF-GAP domény inaktivuje Arf6 a zabraňuje tak aktivaci Rac a jeho ovlivnění aktinového cytoskeletu (Nishiya et al, 2005). Role β PIX v tomto procesu není zatím plně objasněna.



Obr. 8 Určování směru pohybu buňky pomocí inhibice tvorby membránových výběžků. (Frank & Hansen, 2008)

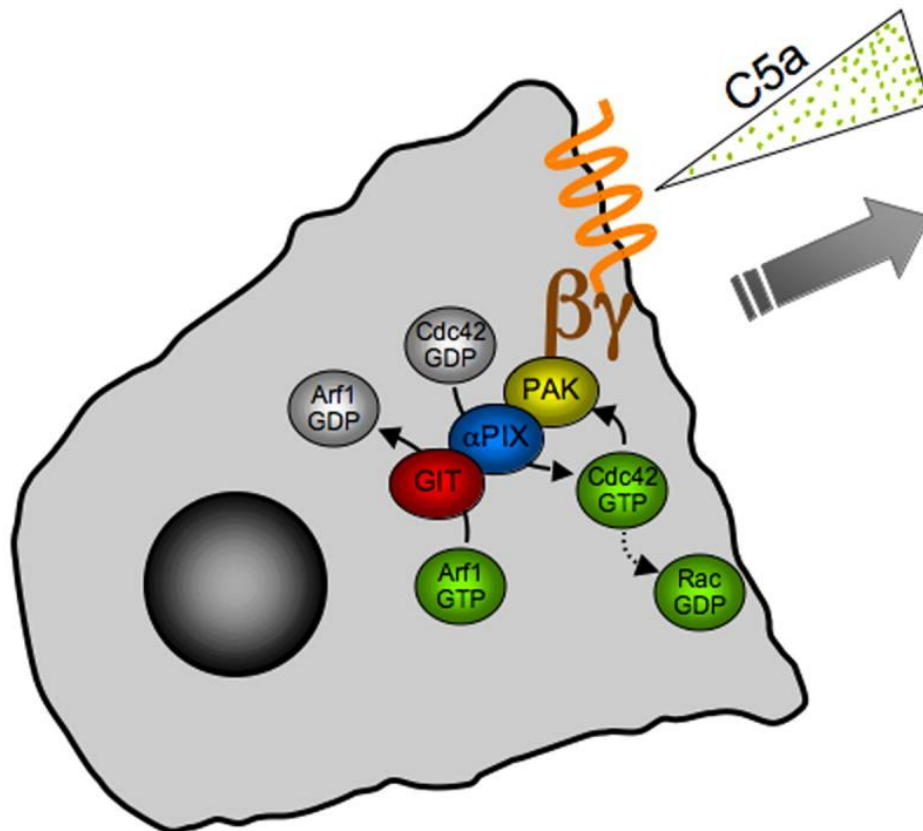
Další proces, na kterém se GIT-PIX komplex podílí, je opravování poškozených vrstev buněk, kde reguluje tvorbu membránových výběžků směrem k poškozenému místu. Nejprve dojde k navázání Cdc42 na PAK a následně navázání PAK na SH3 doménu β PIX. GIT-PIX-PAK komplex je poté směřován k místu poškození, kde Cdc42 reguluje orientaci nově tvořených lamellipodií (Nobes & Hall, 1999). Důležitost β PIX pro tvorbu orientovaných lamellipodií byla prokázána při experimentech s overexprimovaným β PIX, kdy docházelo k tvorbě membránových výběžků rovnoměrně po celém povrchu buňky. Oproti tomu u buněk se sníženou hladinou

β PIX docházelo ke snížení počtu membránových výběžků v místě poškození vrstvy buněk (Cau & Hall, 2005; Osmani et al, 2006).

Další možností, jak se GIT-PIX dostane k membráně u poškozeného místa, je pomocí přímé vazby β PIX k proteinu Scribble. Protein Scribble je ukotven v membráně pomocí svých LRRs (Leucin rich repeats) a svou PDZ doménou se váže na PDZ vazebnou doménu na β PIX (Zeitler et al, 2004). β PIX navázaný na Scribble pak aktivuje Cdc42 a ta spustí tvorbu membránových výběžků (Osmani et al, 2006). Role GIT proteinů v tomto mechanismu není zatím objasněna.

4.2 Regulace chemotaxe

Chemotaxe je proces, při kterém dochází k pohybu buňky ve směru gradientu chemoatraktantů. Tento pohyb je uskutečňován pomocí membránových výběžků v přední části buňky a zároveň změnami v adhezi k povrchu. V těchto dějích hraje klíčovou roli přestavba aktinových vláken. GIT-PIX komplex je důležitý při chemotaxi u neutrofilních granulocytů. Po navázání chemoatraktantu C5a (Podjednotka A z Complement component 5) na serpentinový receptor dojde k aktivaci G-proteinu a uvolní se jeho $\beta\gamma$ podjednotky, které se naváží na PAK (Xu et al, 2003). PAK se poté váže na dimer α PIX, který se následně rozpadne na monomery α PIX a aktivuje Cdc42 a následně i Rac. To vede k přestavbě aktinového cytoskeletu a k pohybu buňky ve směru signálu (Xu et al, 2003). GIT2 v tomto komplexu inhibuje pomocí své ARF-GAP domény aktivitu Arf1. Role GIT-PIX byla také potvrzena při reakci na chemoatraktant fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) u krysích bazofilů. Chemoatraktant fMLP se váže na receptor HA-tagged (Haemagglutinin-tagged receptor). Přesný mechanismus funkce GIT-PIX v tomto procesu není znám, avšak snížení množství GIT1 v buňkách vedlo k potlačení reakce na fMLP chemoatraktant. Potlačení GIT1 a zároveň GIT2 však nemělo žádný vliv na reakci na fMLP (Gavina et al, 2009). Také dodání exogenního GIT2 do buněk vedlo k inhibici pohybu a rozrůstání buněk (Frank et al, 2006). Tyto výsledky naznačují, že GIT1 a GIT2 mají odlišné funkce při chemotaxi a GIT2 nejspíše složí jako inhibitor pohybu buněk.



Obr. 9 Role GIT-PIX v regulaci pohybu buňky ve směru gradientu chemoatraktantu.
(Frank & Hansen, 2008)

4.3 Regulace tvorby fokálních kontaktů

Fokální komplexy jsou uskupení proteinů a fosfoinositidů na vnitřní vrstvě plazmatické membrány, které zajišťují propojení mezi integriny navázanými na extracelulární matrix a cytoskeletem. Fokální komplexy tak zajišťují ukotvení buňky k podkladu a kontakt s jejím okolím. Důležitou roli zde hrají proteiny asociované s aktinem; paxillin, zyxin, vinculin a α -actinin. Také tvoří lešení pro signální kaskády reagující na podněty z okolních buněk. U rozrůstajících se a pohybujících se buněk se tvoří fokální komplexy na periferii a ve směru růstu buňky. Později se fokální komplexy zvětšují, stahují do míst kontaktu s podkladem a tvoří velké stabilní komplexy, nazývané fokální adheze, které zajišťují ukotvení buňky v okolním prostředí. Při dalším pohybu se pak komplexy ve fokálních adhezích rozpadají

a proteiny těchto komplexů jsou přesouvány do míst ve směru pohybu, kde tvoří nové fokální komplexy (Webb et al, 2003).

GIT-PIX komplex se zapojuje do fokálních komplexů pomocí vazby PBS domény na GIT proteinu na LD4 motiv na Paxillinu (Turner et al, 1999). Tato vazba je pozitivně regulována pomocí fosforylací uvnitř LD4 motivu na Paxillin proteinu a pomocí kináz Src a FAK. Inhibice FAK kinázy tak vede k zabránění navázání GIT-PIX komplexu do oblasti fokálních adhezí (Brown et al, 2005). Další úroveň regulace GIT-PIX komplexu je ovlivňování GEF funkce β PIX proteinu. Ta je blokována přítomností T1 inzertu a je aktivována až po fosforylaci β PIX proteinu Src kinázou na tyrosinu 442 (Feng et al, 2006). Aktivovaný β PIX má poté GEF aktivitu specifickou k GTPáze Cdc42, která spouští signální kaskádu ovlivňující dynamiku aktinových vláken.

5. Úloha GIT-PIX signální kazety v regulaci mikrotubulů

Přímý vliv GIT-PIX komplexu na regulaci mikrotubulů zatím nebyl prokázán, avšak některé výsledky naznačují, že by komponenty GIT-PIX komplexu mohly ovlivňovat organizaci mikrotubulů.

Jedním z prvních nálezů, naznačujících, že by GIT-PIX komplex mohl mít vliv na organizaci mikrotubulů, byla identifikace komplexu GIT-PIX-PAK v centrozomu. GIT-PIX komplex se k centrozomu váže pomocí ARF-GAP domény na GIT proteinu. GIT protein je vázán na centrozom trvale, během všech fází buněčného cyklu. Navázaný GIT1 pak slouží jako lešení pro β PIX. Na β PIX se poté váže PAK1 a dochází k jeho aktivaci. Aktivace PAK1 probíhá zatím neznámým způsobem nezávislým na Rho GTPázách. Předpokládá se, že dochází k autofosforylaci PAK1. Pro aktivaci je však nezbytná přítomnost centrozomu. Aktivovaný PAK1 se následně odpojí od GIT-PIX komplexu, váže se na centrozomální kinázu Aurora A a fosforyluje jí na serinu 342 a treoninu 288. Tyto dvě fosforylační místa jsou klíčová pro aktivaci Aurora A při mitóze. Centrozomální kináza Aurora A reguluje duplikaci

centrozomu během pozdní S-fáze buněčného cyklu. Při inhibici PAK1 kinázové funkce, nebo při snížení množství β PIX v buňce, docházelo k pozastavení zrání centrozomu (Zhao et al, 2005). Potencionální úloha GIT-PIX komplexu při regulaci organizace mikrotubulů vyplývá i z jeho asociace s γ -tubulinem, která byla nedávno nalezena v Laboratoři biologie cytoskeletu Ústavu molekulární biologie Akademie věd České republiky (Cernohorska et al, 2012).

Další možný mechanismus ovlivňování mikrotubulů pomocí GIT-PIX komplexu nastiňuje objev TCoB (tubulin cofactor B), který je substrátem pro PAK1. TCoB se váže na $\alpha\beta$ -tubulinový dimer mikrotubulů. Na čerstvě polymerizovaných mikrotubulech a v centrozomu fosforyluje PAK1 TCoB na serinu 65 a serinu 128 *in vitro* a také *in vivo*. U buněk s TCoB, mutovaným v místech serinu 65 a serinu 128, byl pozorován omezený růst mikrotubulů. Taktéž byl pozorován při sníženém množství PAK1 v buňce (Vadlamudi et al, 2005). Z těchto výsledků vyplývá nezbytnost fosforylace TCoB pomocí PAK1 pro správný růst mikrotubulů.

Hypotézu o vlivu GIT-PIX komplexu na regulaci mikrotubulů podporuje také objev signálních drah, v kterých Rho GTPázy Rac a Cdc42 aktivují PAK1. Ten fosforyluje protein stathmin na serinu 16 (Daub et al, 2001). Stathmin je protein, který se váže na volné cytosolické dimery $\alpha\beta$ -tubulinu, vytváří s nimi trimer a zabraňuje jim v polymerizaci. Tím snižuje množství dostupných $\alpha\beta$ -tubulinových dimerů v cytoplazmě a omezuje polymeraci mikrotubulů (Jourdain et al, 1997). Poté co aktivovaný PAK1 nafosforyluje stathmin na serinu 16, ztrácí stathmin schopnost vazby k $\alpha\beta$ -tubulinovým dimerům a dochází k uvolnění těchto dimerů a zrychlení polymerace mikrotubulů. Zvýšením množství dostupných tubulinových dimerů pro polymeraci, může docházet k regulaci dynamiky mikrotubulů nezávisle na proteinech lokalizovaných na (+) konci mikrotubulů.

Aktivované Rac1 a Cdc42 také ovlivňují aktivitu proteinu IQGAP (IQ motif containing GTPase activating protein), který asociuje s proteinem CLIP170, jenž je na (+) konci mikrotubulů (Fukata et al, 2002). IQGAP vyvazuje calmodulin a Rac1. Zvednutí hladiny Ca^{2+} v buňce vede k uvolnění calmodulinu z IQGAP. IQGAP se následně váže na AKAP220 (A-kinase anchoring protein 220). To vede k asociaci

IQGAP s faktory ovlivňujícími dynamiku mikrotubulů (Logue et al, 2011).

GIT-PIX komplex může však také regulovat dynamiku mikrotubulů s pomocí proteinů asociovaných s jejich (+) konci. Jedním z efektorů RhoA je protein mDia, který se váže na (+) konec mikrotubulů a podporuje jejich stabilitu a růst. Protein mDia slouží také jako lešení pro proteiny (+) konce EB1 a APC (Adenomatous polyposis coli) (Wen et al, 2004). Protein EB1 také přímo interaguje s GEF proteinem RhoGEF2, který využívá EB1 pro svůj transport do submembránových komplexů pomocí mikrotubulů (Rogers et al, 2004).

GEF proteiny mohou být vázané i podél mikrotubulů. Jedním z nich je GEF protein GEF-H1, který je po vazbě na mikrotubuly neaktivní. Při depolymeraci mikrotubulu se pak uvolní a má GEF aktivitu k Rho A GTPázám (Chang et al, 2008). Takto může buňka spouštět signální dráhy, reagující na rozpad mikrotubulů. Tento mechanismus vázání GEF podél mikrotubulů by mohl být uplatněn i pro regulaci β PIX. Tomu napovídá nedávno zjištěná vazba sestřihové varianty β PIX na tubulin (Lee et al, 2011).

Zajímavý je také nedávný objev vazby β PIX na Calmodulin vážící Ca^{2+} (Singh et al, 2012). To by mohlo naznačovat úlohu β PIX při vnitrobuněčné signalizaci pomocí Ca^{2+} . Bylo popsáno, že CaMK (Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase) ovlivňuje organizaci mikrotubulů fosforylací proteinů vázaných s mikrotubuly (Adamikova et al, 2004).

6. Závěr

I přes poměrně dlouhou dobu, od objevu funkce GIT-PIX komplexu jako „signální kazety“, pro celou řadu signálních drah, přesná struktura GIT-PIX komplexu je doposud neznámá. Výsledky *in vitro* pokusů, které nasvědčovaly, že GIT-PIX komplex může být tvořen z trimeru PIX a z dimeru GIT1 se zatím nepodařilo potvrdit *in vivo*. Popsání přesné struktury GIT-PIX komplexů bude nutné pro pochopení mechanismů jejich působení v buňce. Doposud publikované práce jasně dokazují, že se GIT-PIX signální kazeta účastní regulace aktinového cytoskeletu přes GEF aktivitu PIX proteinu na GTPázy Cdc42 a Rac. Podstanou roli v těchto procesech hraje efektor Rho GTPáz, kináza PAK. Otevřenou otázkou zůstává, jaké jsou molekulární mechanismy, kterými tato signální kazeta ovlivňuje organizaci mikrotubulů. Nález lokalizace GIT-PIX komplexu v centrozomu by mohl naznačovat regulaci na (-) konci mikrotubulů. Této hypotéze také nasvědčují zatím nepublikované výsledky z naší laboratoře, kde jsme prokázali vazbu γ -tubulinu s jednotlivými proteiny signální kazety i PAK kinázy. Probíhající studie by měly určit klíčové domény pro vazbu γ -tubulinu v tomto komplexu. Nelze vyloučit, že by se GIT-PIX signální kazeta mohla uplatnit i při regulaci dynamiky mikrotubulů na jejich (+) koncích, prostřednictvím GEF aktivity PIX proteinu na Rho GTPázy. Pokud se potvrdí vliv komplexu GIT-PIX na organizaci a regulaci mikrotubulů, bude nalezen další z regulačních mechanismů, které ovlivňují jak mikrofilamenta, tak mikrotubuly. V posledních letech, zejména s rozvojem kvantifikace dynamických změn těchto dvou cytoskeletálních systémů v živých buňkách a RNAi technik, dochází k velkému nárůstu poznatků, které ukazují, že tyto dva systémy spolu interagují a mohou mít i společné regulační proteiny.

Závěrem je možné říci, že v blízké budoucnosti lze očekávat prudký rozvoj poznatků o integrační úloze GIT-PIX signální kazety při přenosu signálů v diferencovaných buňkách a o její roli při regulaci cytoskeletu.

Literatura:

- Adamikova L, Straube A, Schulz I, Steinberg G (2004) Calcium signaling is involved in dynein-dependent microtubule organization. *Mol Biol Cell* **15**(4): 1969-1980
- Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4): 309-322
- Albertinazzi C, Za L, Paris S, de Curtis I (2003) ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Mol Biol Cell* **14**(4): 1295-1307
- Arkowitz RA, Lowe N (1997) A small conserved domain in the yeast Spa2p is necessary and sufficient for its polarized localization. *J Cell Biol* **138**(1): 17-36
- Audebert S, Navarro C, Nourry C, Chasserot-Golaz S, Lecine P, Bellaiche Y, Dupont JL, Premont RT, Sempere C, Strub JM, Van Dorsselaer A, Vitale N, Borg JP (2004) Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor. *Curr Biol* **14**(11): 987-995
- Bagrodia S, Bailey D, Lenard Z, Hart M, Guan JL, Premont RT, Taylor SJ, Cerione RA (1999) A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem* **274**(32): 22393-22400
- Bagrodia S, Taylor SJ, Jordon KA, Van Aelst L, Cerione RA (1998) A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem* **273**(37): 23633-23636
- Baird D, Feng Q, Cerione RA (2005) The Cool-2/alpha-Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol* **15**(1): 1-10
- Brown MC, Cary LA, Jamieson JS, Cooper JA, Turner CE (2005) Src and FAK kinases cooperate to phosphorylate paxillin kinase linker, stimulate its focal adhesion localization, and regulate cell spreading and protrusiveness. *Mol Biol Cell* **16**(9): 4316-4328
- Brown MC, West KA, Turner CE (2002) Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway. *Mol Biol Cell* **13**(5): 1550-1565
- Cau J, Hall A (2005) Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci* **118**(Pt 12): 2579-2587
- Cernohorska M, Vinopal S, Sulimenko T, Draber P (2012) Regulation of microtubule dynamics by the GIT-PIX-PAK signaling complex. *Cytoskeletal Club, Vranovska ves, 2012*
- Claing A, Chen W, Miller WE, Vitale N, Moss J, Premont RT, Lefkowitz RJ (2001) beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**(45): 42509-42513
- Claing A, Perry SJ, Achiriloaie M, Walker JK, Albanesi JP, Lefkowitz RJ, Premont RT (2000) Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1119-1124

- Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A (2001) Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* **276**(3): 1677-1680
- Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 83-117
- Di Cesare A, Paris S, Albertinazzi C, Dariozzi S, Andersen J, Mann M, Longhi R, de Curtis I (2000) p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat Cell Biol* **2**(8): 521-530
- Draber P, Sulimenko V, Draberova E (2012) Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front Immunol* **3**: 130
- Feng Q, Albeck JG, Cerione RA, Yang W (2002) Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *J Biol Chem* **277**(7): 5644-5650
- Feng Q, Baird D, Cerione RA (2004) Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/alpha-Pix. *EMBO J* **23**(17): 3492-3504
- Feng Q, Baird D, Peng X, Wang J, Ly T, Guan JL, Cerione RA (2006) Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat Cell Biol* **8**(9): 945-956
- Flanders JA, Feng Q, Bagrodia S, Laux MT, Singavarapu A, Cerione RA (2003) The Cbl proteins are binding partners for the Cool/Pix family of p21-activated kinase-binding proteins. *FEBS Lett* **550**(1-3): 119-123
- Frank SR, Adelstein MR, Hansen SH (2006) GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *EMBO J* **25**(9): 1848-1859
- Frank SR, Hansen SH (2008) The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape. *Semin Cell Dev Biol* **19**(3): 234-244
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F, Kaibuchi K (2002) Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**(7): 873-885
- Gavina M, Za L, Molteni R, Pardi R, de Curtis I (2009) The GIT-PIX complexes regulate the chemotactic response of rat basophilic leukaemia cells. *Biol Cell* **102**(4): 231-244
- Goehler H, Lalowski M, Stelzl U, Waelter S, Stroedicke M, Worm U, Droege A, Lindenberg KS, Knoblich M, Haenig C, Herbst M, Suopanki J, Scherzinger E, Abraham C, Bauer B, Hasenbank R, Fritzsche A, Ludewig AH, Bussow K, Coleman SH, Gutekunst CA, Landwehrmeyer BG, Lehrach H, Wanker EE (2004) A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell* **15**(6): 853-865
- Haendeler J, Yin G, Hojo Y, Saito Y, Melaragno M, Yan C, Sharma VK, Heller M, Aebersold R, Berk BC (2003) GIT1 mediates Src-dependent activation of phospholipase Cgamma by angiotensin II and epidermal growth factor. *J Biol Chem* **278**(50): 49936-49944
- Hoefen RJ, Berk BC (2006) The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci* **119**(Pt 8): 1469-1475

Chang YC, Nalbant P, Birkenfeld J, Chang ZF, Bokoch GM (2008) GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell* **19**(5): 2147-2153

Jourdain L, Curmi P, Sobel A, Pantaloni D, Carlier MF (1997) Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry* **36**(36): 10817-10821

Kawachi H, Fujikawa A, Maeda N, Noda M (2001) Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase zeta /beta by the yeast substrate-trapping system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6593-6598

Kim S, Lee SH, Park D (2001) Leucine zipper-mediated homodimerization of the p21-activated kinase-interacting factor, beta Pix. Implication for a role in cytoskeletal reorganization. *J Biol Chem* **276**(14): 10581-10584

Koh CG, Manser E, Zhao ZS, Ng CP, Lim L (2001) Beta1PIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. *J Cell Sci* **114**(Pt 23): 4239-4251

Koh CG, Tan EJ, Manser E, Lim L (2002) The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr Biol* **12**(4): 317-321

Lee SJ, Yang SJ, Kim DH, Pak JH, Lee KH, Choi KH, Park D, Rhee S (2011) Interaction of microtubules and actin with the N-terminus of betaPix-b(L) directs cellular pinocytosis. *Mol Cell Biochem* **351**(1-2): 207-215

Logue JS, Whiting JL, Tunquist B, Sacks DB, Langeberg LK, Wordeman L, Scott JD (2011) AKAP220 protein organizes signaling elements that impact cell migration. *J Biol Chem* **286**(45): 39269-39281

Loo TH, Ng YW, Lim L, Manser E (2004) GIT1 activates p21-activated kinase through a mechanism independent of p21 binding. *Mol Cell Biol* **24**(9): 3849-3859

Manabe R, Kovalenko M, Webb DJ, Horwitz AR (2002) GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J Cell Sci* **115**(Pt 7): 1497-1510

Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, Tan L, Tan I, Leung T, Lim L (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* **1**(2): 183-192

Matafora V, Paris S, Dariozzi S, de Curtis I (2001) Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and sites of actin organization at the cell surface. *J Cell Sci* **114**(Pt 24): 4509-4520

Nishiya N, Kiosses WB, Han J, Ginsberg MH (2005) An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol* **7**(4): 343-352

Nobes CD, Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**(6): 1235-1244

- Oh WK, Yoo JC, Jo D, Song YH, Kim MG, Park D (1997) Cloning of a SH3 domain-containing proline-rich protein, p85SPR, and its localization in focal adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* **235**(3): 794-798
- Ohara O, Nagase T, Ishikawa K, Nakajima D, Ohira M, Seki N, Nomura N (1997) Construction and characterization of human brain cDNA libraries suitable for analysis of cDNA clones encoding relatively large proteins. *DNA Res* **4**(1): 53-59
- Osmani N, Vitale N, Borg JP, Etienne-Manneville S (2006) Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol* **16**(24): 2395-2405
- Paris S, Longhi R, Santambrogio P, de Curtis I (2003) Leucine-zipper-mediated homo- and hetero-dimerization of GIT family p95-ARF GTPase-activating protein, PIX-, paxillin-interacting proteins 1 and 2. *Biochem J* **372**(Pt 2): 391-398
- Paris S, Za L, Sporchia B, de Curtis I (2002) Analysis of the subcellular distribution of avian p95-APP2, an ARF-GAP orthologous to mammalian paxillin kinase linker. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(7): 826-837
- Park E, Na M, Choi J, Kim S, Lee JR, Yoon J, Park D, Sheng M, Kim E (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* **278**(21): 19220-19229
- Pollard TD (2008) *Cell Biology*. 906
- Premont RT, Claing A, Vitale N, Freeman JL, Pitcher JA, Patton WA, Moss J, Vaughan M, Lefkowitz RJ (1998) beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14082-14087
- Premont RT, Claing A, Vitale N, Perry SJ, Lefkowitz RJ (2000) The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J Biol Chem* **275**(29): 22373-22380
- Premont RT, Perry SJ, Schmalzigaug R, Roseman JT, Xing Y, Claing A (2004) The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal* **16**(9): 1001-1011
- Rogers SL, Wiedemann U, Hacker U, Turck C, Vale RD (2004) Drosophila RhoGEF2 associates with microtubule plus ends in an EB1-dependent manner. *Curr Biol* **14**(20): 1827-1833
- Rosenberger G, Gal A, Kutsche K (2005) AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *J Biol Chem* **280**(8): 6879-6889
- Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR (2008) Activity-dependent synaptogenesis: Regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/beta PIX signaling complex. *Neuron* **57**(1): 94-107
- Sheu YJ, Santos B, Fortin N, Costigan C, Snyder M (1998) Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* **18**(7): 4053-4069

- Schlenker O, Rittinger K (2009) Structures of dimeric GIT1 and trimeric beta-PIX and implications for GIT-PIX complex assembly. *J Mol Biol* **386**(2): 280-289
- Singh VK, Munro K, Jia Z (2012) A novel calmodulin-beta-PIX interaction and its implication in receptor tyrosine kinase regulation. *Cell Signal* **24**(9): 1790-1796
- ten Klooster JP, Jaffer ZM, Chernoff J, Hordijk PL (2006) Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* **172**(5): 759-769
- Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, Riedy MC, Nikolopoulos SN, McDonald AR, Bagrodia S, Thomas S, Leventhal PS (1999) Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* **145**(4): 851-863
- Vadlamudi RK, Barnes CJ, Rayala S, Li F, Balasenthil S, Marcus S, Goodson HV, Sahin AA, Kumar R (2005) p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B. *Mol Cell Biol* **25**(9): 3726-3736
- Vitale N, Patton WA, Moss J, Vaughan M, Lefkowitz RJ, Premont RT (2000) GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6. *J Biol Chem* **275**(18): 13901-13906
- Webb DJ, Brown CM, Horwitz AF (2003) Illuminating adhesion complexes in migrating cells: moving toward a bright future. *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 614-620
- Wen Y, Eng CH, Schmoranzler J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG (2004) EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* **6**(9): 820-830
- Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T, Bourne HR (2003) Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**(2): 201-214
- Yao L, Kawakami Y, Kawakami T (1994) The pleckstrin homology domain of Bruton tyrosine kinase interacts with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 9175-9179
- Yin G, Haendeler J, Yan C, Berk BC (2004) GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **24**(2): 875-885
- Yin G, Zheng Q, Yan C, Berk BC (2005) GIT1 is a scaffold for ERK1/2 activation in focal adhesions. *J Biol Chem* **280**(30): 27705-27712
- Zeitler J, Hsu CP, Dionne H, Bilder D (2004) Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol* **167**(6): 1137-1146
- Zhao ZS, Lim JP, Ng YW, Lim L, Manser E (2005) The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell* **20**(2): 237-249
- Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L (2000) Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* **20**(17): 6354-6363