

# ABSTRAKT

Prvním důležitým krokem buněčné migrace je ustavení buněčné polarity. Na procesu polarizace buněk se podílí řada signálních drah, jejichž regulace je v přední a zadní části buňky řízena různým způsobem. To buňce umožňuje zaujmout specifický tvar s typickou předozadní polaritou. Během polarizace buňka formuje vedoucí lamelipodii na přední části a váznoucí konec na zadní části buňky. Zároveň dochází k takovému přeuspořádání vnitrobuněčných organel, které je pro buněčnou migraci optimální. V migrujících buňkách, jako jsou fibroblasty, se buněčné jádro nachází v zadní části buňky a mikrotubuly organizující centrum relokalizuje mezi jádro a čelo buňky. Takové uspořádání uvnitř buňky je nezbytnou podmínkou pro efektivní směrovanou migraci. V této práci jsme ukázali, že pro polarizaci buněk je nezbytná také takzvaná reorientace jádra. Reorientace jádra je rotační pohyb, ke kterému dochází v prvních hodinách buněčné polarizace a umožňuje reorientaci delší osy jádra do směru migrace. Reorientace jádra pak napomáhá ustavení buněčné polarity a usnadňuje pohyb buněk.

Aby buňka mohla reorientovat své jádro do směru migrace, je nutné, aby bylo napojeno na buněčný cytoskelet. Připojení jádra k jednotlivým komponentám cytoskeletu zprostředkovává takzvaný LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) komplex. V této práci jsme ukázali, že aktinová vlákna táhnoucí se nad buněčným jádrem jsou pomocí LINC komplexu napojena na jaderný obal a indukují reorientaci jádra do směru migrace.

V migrujících buňkách se vyskytuje několik typů aktinových stresových vláken: ventrální vlákna, dorsální vlákna, aktinová vlákna ve tvaru oblouků (příčné arcs) a perinukleární aktinová vlákna. Zatímco ventrální vlákna se vyskytují pouze na bazální straně buňky, dorsální a perinukleární vlákna a arcs vyběhají z čela buňky na její dorsální stranu. Perinukleární aktinová vlákna, která se dále pnou nad buněčným jádrem, jsou pomocí LINC komplexu napojena na jaderný obal. Naše výsledky ukazují, že během procesu buněčné polarizace dochází k formování aktinové sítě, tvořené dorsálními vlákny, arcs a perinukleárními vlákny, která mechanicky propojuje fokální adheze na předním okraji buňky s buněčným jádrem. Při tvorbě této aktinové sítě je nezbytný aktin vazebný protein  $\alpha$ -actinin1, který propojuje jednotlivá vlákna v místech křížení aktinových vláken. Velmi důležitou roli hrají také dorsální vlákna a příčné arcs, které rekrutují aktinová vlákna z okraje buňky na dorsální stranu buňky a nad jádro a tak dávají vznik novým perinukleárním aktinovým vláknům. Pohyb aktinových vláken nad jádro buňky indukuje také reorientaci jádra do směru migrace. Překvapivě jsme také zjistili, že perinukleární vlákna zároveň vymezují lokalizaci

dorsálních vláken a arcs na přední okraj buňky. Z těchto výsledků vyplývá, že síť dorsálních a perinukleárních vláken a příčných arcs reguluje z předního okraje buňky jadernou reorientaci a zároveň fungují i opačným směrem, kdy jejich napojení na jádro reguluje organizaci lamelipodie na přední straně buňky.

Reorientace jádra je regulována dvěma signálními drahami: LPA a následnou stimulací malé GTPázy RhoA a aktivací integrínů a FAK/Src signalizačního komplexu, který aktivuje p190A-RhoGAP. LPA stimuluje receptory spřažené s trimerními G-proteiny, které následně aktivují RhoA v rámci celé buňky. K aktivaci integrínů dochází převážně na přední části migrující buňky. Tudiž integrínová signalizace představuje první signál vedoucí k ustavení buněčné polarity. Následná aktivace FAK/Src komplexu stimuluje RhoA inhibitor p190A-RhoGAP a rekrutuje ho na čelo polarizující buňky. Kooperace těchto dvou signálních drah dynamicky reguluje aktivitu RhoA na přední straně buňky, což umožňuje masivní přestavbu aktinového cytoskeletu, která dává vznik perinukleárním vláknům a reorientuje buněčné jádro do směru migrace.

Perinukleární aktinová vlákna a reorientace jádra také korelují s tvarem migrujících buněk a se způsobem jakým buňky migrují. Fibroblasty, které reorientují jádro do směru migrace, mají protáhlý tvar a perinukleární aktinová vlákna jsou zarovnána s delší osou jádra a směrem migrace. Takové buňky migrují „píd'alkovitým“ způsobem, kdy protruze je následována kontrakcí přitahující zadní část buňky k tělu buňky. Naproti tomu, buňky, které nevytváří perinukleární vlákna, jako například U2OS, mají širokou lamelu, jádro orientované kolmo k ose migrace a pro jejich pohyb je charakteristické trvalé vytvoření protruze a konstantní posouvání těla buňky vpřed bez přitahování konce k tělu buňky. Tyto výsledky naznačují, že perinukleární aktinová vlákna a reorientace jádra určují, jakým způsobem budou buňky migrovat.