

Diplomová práce

Pátrání po vnitřních proteinech mikrotubulů

Bc. Václav Bočan

Abstrakt

Mikrotubuly – válcovité polymery α - a β -tubulinu – vykonávají v eukaryotických buňkách řadu nezastupitelných funkcí. Jelikož jsou zapojeny do mnoha buněčných dějů, jejich posttranslační modifikace, rychlost polymerizace a interakce musí být pečlivě regulovány. V nedávné době byl objeven nový způsob interakce proteinů s mikrotubuly, a to v podobě vnitřních mikrotubulárních proteinů, které vstupují přímo do lumen mikrotubulů.

O vnitřních proteinech dynamických mikrotubulů v cytoplasmě je známo velmi málo. Zatím byly objeveny pouze dva: α TAT1 a MAP6. Stabilizované mikrotubuly, jako například ty v axonemě bičíku, obsahují desítky pravidelně uspořádaných vnitřních mikrotubulárních proteinů, přičemž jsou stále objevovány nové. Pravděpodobně hrají úlohu pro výstavbu axonemy a její zpevnění, což je nezbytné pro odolávání mechanickým silám vytvářeným v bičíku při pohybu.

Tato diplomová práce přispívá k poznání vnitřních mikrotubulárních proteinů, a to jak v dynamických, tak v axonemálních mikrotubulech. Ve své první části se práce věnuje hledání nových vnitřních proteinů uvnitř dynamických mikrotubulů. K dosažení tohoto cíle jsou využity dva nezávislé přístupy – značení souseďících proteinů pomocí nespecifické biotin ligázy, navedené do lumen mikrotubulu fúzí s proteinem α TAT1 nebo MAP6, a přímá izolace mikrotubulů z buněčné kultury, z jejichž povrchu byly odmyty vnější proteiny. Izolované proteiny jsou následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Druhá část práce se věnuje identifikaci kandidátů na členy nově objeveného helikálního komplexu jménem TAILS, který má podobu spirály uvnitř mikrotubulů bičíku spermíí. Kandidátní proteiny jsou identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy vzorků nabohacených o fragmenty bičíku spermíí pomocí třídící průtokové cytometrie.

Klíčová slova

mikrotubuly, vnitřní mikrotubulární proteiny, α -tubulin acetyltransferáza 1 (α TAT1), protein asociovaný s mikrotubuly 6 (MAP6), tail axoneme intra-lumenal spiral (TAILS)