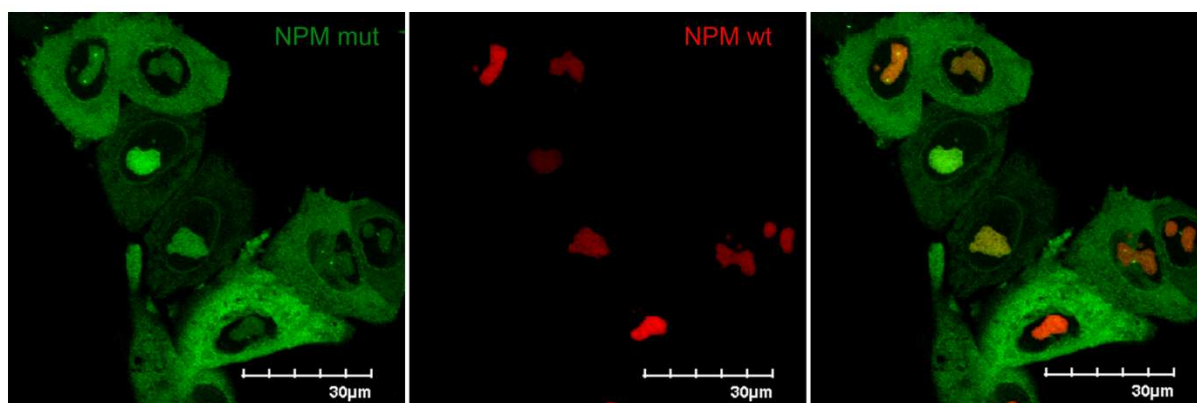


Studium významu C-terminálních mutací nukleofosminu v akutní myeloidní leukémii

Přibližně třetina pacientů s akutní myeloidní leukémií má mutovaný gen pro nukleofosmin (NPM), který hraje významnou úlohu při tvorbě ribozomů, dělení buňky a mnoha dalších buněčných procesech. Nemutovaný nukleofosmin je, díky dynamické vazbě s dalšími nukleolárními proteiny, přednostně lokalizován v jadérku. Mutace v C-koncové části genu pro NPM vyvolává nekorektní cytoplazmatickou lokalizaci mutovaného proteinu, který je tak vzdálen od místa svého působení. Nejčastějším typem mutace (mutace A) je zdvojení sekvence čtyř nukleotidů v C-terminální doméně genu pro NPM, která způsobí posunutí čtecího rámce a odlišnou koncovou sekvenci aminokyselin ve výsledném proteinu. Tato mutace se vyskytuje asi u 80% všech pacientů s mutovaným NPM. Do současnosti je ale známo již kolem 40 různých C-koncových mutací, jejichž mechanismus není dobře prostudován. Přítomnost genové předlohy pro mutovaný NPM je jedním z příznivých prognostických ukazatelů AML. Naším cílem je určit, jaký je význam jednotlivých typů C-terminálních mutací v onemocnění AML a jaký vliv na expresi a lokalizaci NPM má v buňkách leukemických linií s různými formami tohoto proteinu ošetření protinádorovými léčivy.

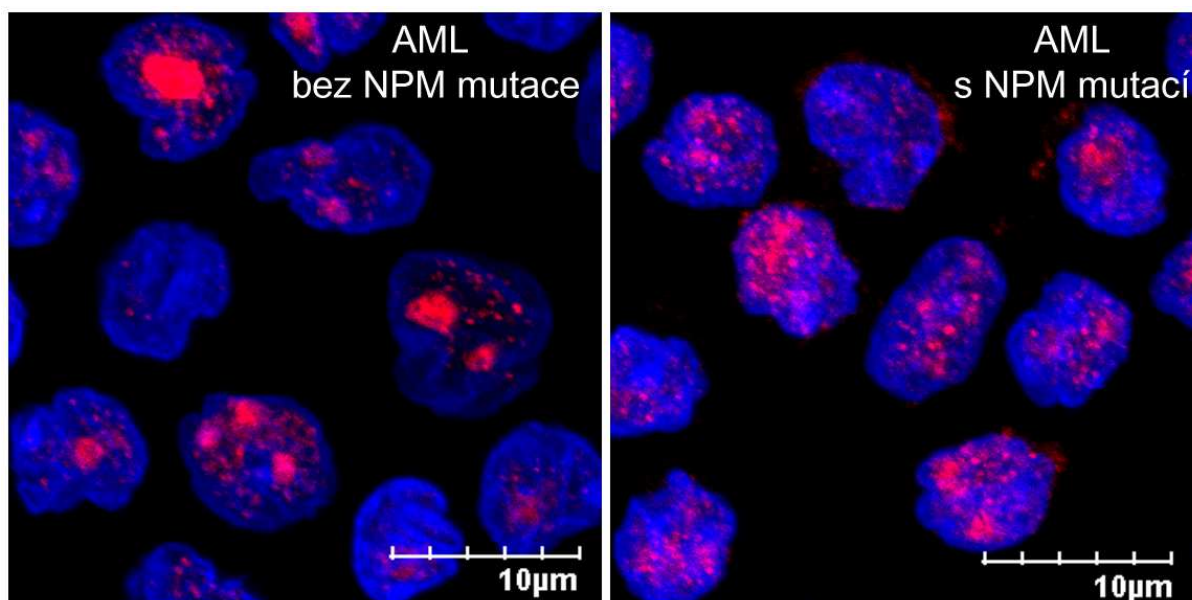
Lokalizaci a chování tohoto i dalších jadérkových proteinů sledujeme pomocí imunofluorescenčního značení fixovaných suspenzních buněk nebo pomocí GFP-fúzních proteinů vnesených do živých buněk. Díky značení živých buněk můžeme pozorovat i procesy probíhající v živých buňkách po ošetření příslušnými léčivy. Monitorujeme vlastnosti přirozené (wild-type, wt) a mutované formy nukleofosminu v buňkách linie HeLa transfekovaných plazmidy nesoucími geny pro fluorescenčně značené varianty NPM na úrovni nukleových kyselin i proteinů. Zjistili jsme, že odlišná lokalizace mutované formy NPM se vyskytuje zhruba v 70% transfekovaných buněk, u většiny z těchto buněk je ale část mutovaného NPM přítomna i v jadérku společně s wt formou (obr. 1), pravděpodobně díky tvorbě hetero-pentamerů mutované a wt formy. Místem vysoké koncentrace mutovaného NPM v transfekovaných buňkách je překvapivě také jaderná membrána. Po ošetření actinomycinem D (actD) dochází ke kondenzaci jadérkových struktur a vyplavení části přirozeného NPM do nukleoplazmy. Mutovaný NPM přítomný po ošetření actD v jádře je distribuován stejně jako NPMwt, zatímco NPMmut přítomný v cytoplazmě je lokalizován u okrajů cytoplazmy. Výsledky studie vlivu actD na expresi a lokalizaci mutované formy NPM jsou předmětem aktuálně připravované publikace.



Obr. 1: Lokalizace mutované (NPMmut\_eGFP, zelená) a přirozené (NPMwt\_mRFP1, červená) formy nukleofosminu v HeLa buňkách transfekovaných plazmidy nesoucími geny pro fluorescenčně značené varianty NPM.

K monitorování molekulární dynamiky jadérekových proteinů fúzovaných s fluorescenčními proteiny využíváme fluorescenční korelační spektroskopii (RICS), při které sledujeme místní korelaci fluorescenčního signálu ve dvou barevně odlišených kanálech. Vyvinuli jsme metodu potenciálně vhodnou pro sledování stupně oligomerizace jadérekových fosfoproteinů přímo v živých buňkách. Sledování oligomerizace nucleofosminu metodami založenými na fluorescenční korelační spektroskopii kombinujeme ve spolupráci s Fyzikálním ústavem MFF UK s použitím konfokální mikroskopie zobrazující časy dohasínání fluorescence uvnitř buňky (FLIM).

Testujeme také vlastnosti buněčné linie OCI-AML3, která nese NPM mutaci typu A a je proto nejvhodnějším modelem pro studium AML s mutovaným NPM. Pomocí této linie jsme zavedli imunofluorescenční metodu pro zjištění přítomnosti mutace NPM u pacientů s AML, založenou na detekci NPM v cytoplazmě (obr. 2), kterou koreluje s výsledky genetické analýzy.



Obr. 2: Imunofluorescenční značení nukleofosminu (AlexaFluor555, červená) v buňkách izolovaných z periferní krve AML pacientů bez mutace (vlevo) nebo s mutací (vpravo) v C-terminální části NPM. Modře (Hoechst 33342) jsou značena jádra.