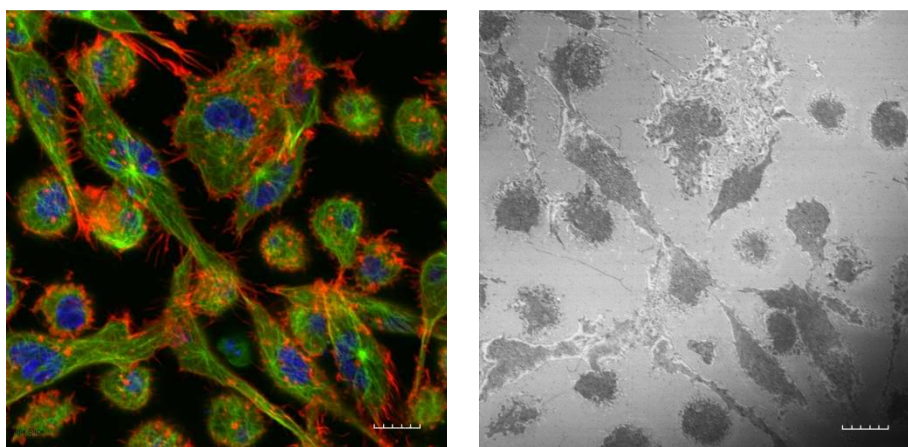


Interakce hematopoetických buněk s proteiny extracelulární matrice

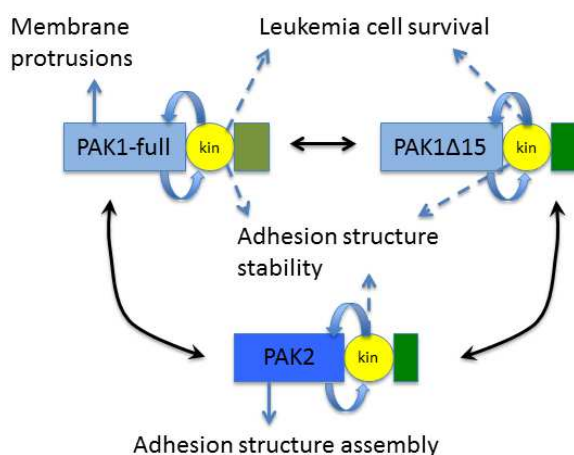
Interakce s extracelulární matricí (ECM) významným způsobem regulují chování buněk, jejich vývoj a reakci na vnější podněty. Ovlivňují zejména buněčnou proliferaci, diferenciaci kmenových a progenitorových buněk do zralých forem, odolnost vůči indukci buněčné smrti a buněčnou migraci. Leukemické transformace často zahrnují změny v adhezních interakcích nezralých hematopoetických buněk s mikroprostředím kostní dřeně i zralějších forem těchto buněk s tkáněmi, ve kterých tyto buňky působí. Uchycení leukemických buněk v kostní dřeni jim také poskytuje ochranu před působením léčiv a přispívá k udržení reziduální nemoci.

Byla již objasněna řada mechanismů podílejících se na řízení adhezních interakcí u adherentních typů buněk, studií zaměřených na hematopoetické buňky je však stále poměrně málo. Adhezi buněk k proteinům ECM sledujeme jak pomocí klasické metody (stanovení frakce buněk přichycených po určité době inkubace na povrchu pokrytém zvoleným proteinem), tak i originálním postupem umožňujícím sledovat interakci buněk s pokrytým povrchem v reálném čase pomocí měření elektrické mikroimpedance. Buněčnou morfologii a adhezní struktury analyzujeme zejména pomocí imunofluorescenčních technik na konfokálním mikroskopu (Obr.1). Metoda měření interference v odraženém světle (IRM) umožňuje selektivně sledovat části buněk nacházející se v bezprostřední blízkosti (do 100 nm) pokrytého povrchu (Obr. 1 vpravo). Změny v expresních hladinách nebo posttranslačních modifikacích vybraných proteinů sledujeme pomocí gelové elektroforézy a imunoblottingu nebo průtokové cytometrie.



Obr 1: Buňky linie MOLM-7 interagující s povrchem pokrytým fibronectinem. Vlevo: imunofluorescenční barvení, červená - polymerní aktin (barveno phalloidinem), zelená - tubulin, modrá - jádra. Vpravo: totéž zorné pole zobrazené v režimu interference v odraženém světle (IRM). Měřítko: 10 μ m.

Pro známé adhezní struktury adherentních buněk (fokální adheze, invadopodia) a některých zralých forem hematopoietických buněk (podozomy) byly již objeveny proteiny, které jsou pro danou strukturu charakteristické a dají se použít pro jejich vizualizaci. Žádný z doposud testovaných markerů (paxillin, vinkulin, Lyn, parvin alfa a gamma, HS-1) ovšem selektivně neznačí adhezní struktury leukemických buněk. Jediná protilátka vykazující v imunofluorescenčním značení poměrně specifickou lokalizaci v adhezních místech je namířena proti fosforylovanému tyrosinu 397 kináz rodiny Src (v hematopoietických buňkách převážně kináza Lyn) (1). Kinázy rodiny Src (SFK) řídí adhezi a migraci adherentních buněk a zakládající člen rodiny (c-Src) patří k významným onkogenům. Zvýšená aktivita c-Src je spojena s vyšší pohyblivostí nádorových buněk a větší invazivitou pevných nádorů. Aktivace SFK v buňkách chronické myeloidní leukémie může vést ke vzniku rezistence k terapii imatinibem a u rezistentních pacientů se k léčbě používá duální inhibitor BCR-ABL a SFK (dasatinib). Podle našich výsledků ovšem v leukemických buňkách, jejichž adhezní struktury nejsou propojeny s aktinovým cytoskeletem, nemají SFK žádný výrazný vliv na buněčnou adhezivitu (2).



Obr. 2: Schema znázorňující vzájemné ovlivnění různých izoform PAK a jejich kinázových a nekinázových funkcí.

K důležitým regulátorům buněčných interakcí s ECM patří také kinázy rodiny PAK, které byly doposud studovány převážně v adherentních buňkách. Bylo ovšem zjištěno, že inhibice těchto kináz pomocí interagujícího peptidu snižuje schopnost kmenových a progenitorových buněk obnovit krevetvorbu ozářeného myšího příjemce. Farmakologická inhibice PAK také v hematopoietických buňkách vyvolává apoptózu, což naznačuje, že kinázy PAK se účastní i signálních drah, které hematopoietickým buňkám zajišťují základní životní funkce. Možné využití PAK jako cíle léčby je prozatím komplikováno nedostatečnou charakterizací jednotlivých proteinů patřících do této kinázové rodiny. V rámci grantového projektu GAČR jsme blíže popsali rozdíly mezi funkcemi PAK1 a PAK2 a zjistili, že v buňkách obvykle převládá kratší sestřihová varianta PAK1, která je v některých směrech podobná

PAK2 (3). Ukázali jsme, že PAK1 a PAK2 spolu interagují a pravděpodobně se vzájemně ovlivňují (Obr. 2). Zjistili jsme také, že obě tyto kinázy regulují buněčný metabolismus: PAK2 stimuluje aerobní glykolýzu, zatímco aktivita PAK1 je spojena spíše s preferencí oxidativní fosforylace (4). Podrobně jsme studovali funkce PAK v leukemických buňkách (5) a ve spolupráci s univerzitami v Lausanne a v Ženevě jsme rovněž popsali funkční následek mutace v PAK2, která způsobuje vznik tzv. Knoblochova syndromu. Bodová záměna E435K vede k výraznému omezení kinázové aktivity PAK2, což se projeví snížením fosforylace na autofosforylačním místě Ser141 (6).

Mezi nejdůležitější adhezní receptory, které zprostředkují vazbu k proteinům extracelulární matrice, patří integriny. Zvýšená exprese některých typů integrinů byla spojena s horší prognózou pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Podle našich výsledků se kmenové leukemické buňky (charakterizované expresí znaku CD34) vyznačují zvýšeným povrchovým množstvím integrinu $\alpha V\beta 3$, a to specificky u pacientů s mutací v genu pro nukleofosmin 1 (7). Signalizace přes tento adhezní receptor může přispívat k udržení reziduální nemoci u této skupiny AML pacientů.

Publikace k tématu:

1. Obr A, Roselova P, Grebenova D, Kuzelova K. Real-time analysis of imatinib- and dasatinib-induced effects on chronic myelogenous leukemia cell interaction with fibronectin. *PLoS One* (2014) **9**:e107367 doi: 10.1371/journal.pone.0107367 [doi].
2. Roselova P, Obr A, Holoubek A, Grebenova D, Kuzelova K. Adhesion structures in leukemia cells and their regulation by Src family kinases. *Cell Adh Migr* (2018) **12**:286-98 doi: 10.1080/19336918.2017.1344796 [doi].
3. Grebenova D, Holoubek A, Roselova P, Obr A, Brodska B, Kuzelova K. PAK1, PAK1Delta15, and PAK2: similarities, differences and mutual interactions. *Sci Rep* (2019) **9**:17171-6 doi: 10.1038/s41598-019-53665-6 [doi].
4. Kořánová T, Dvořáček L, Grebeňová D, Röselová P, Obr A, Kuželová K. PAK1 and PAK2 in cell metabolism regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* (2022) **123**:375-89 doi: 10.1002/jcb.30175.
5. Kuželová K, Obr A, Röselová P, Grebeňová D, Otevřelová P, Brodská B, et al. Group I p21-activated kinases in leukemia cell adhesion to fibronectin. *Cell Adh Migr* (2021) **15**:18-36 doi: 10.1080/19336918.2021.1872760 [doi].
6. Antonarakis SE, Holoubek A, Rapti M, Rademaker J, Meylan J, Iwaszkiewicz J, et al. Dominant monoallelic variant in the PAK2 gene causes Knobloch syndrome type 2. *Hum Mol Genet* (2021) **31**:1-9 doi: 10.1093/hmg/ddab026 [doi].
7. Kuželová K, Obr A, Marková J, Gašová Z. Integrin expression and adhesivity to fibronectin in primary acute myeloid leukemia cells: Impact of NPM1 and FLT3 mutations. *Eur J Haematol* (2020) **105**:578-87 doi: 10.1111/ejh.13488 [doi].