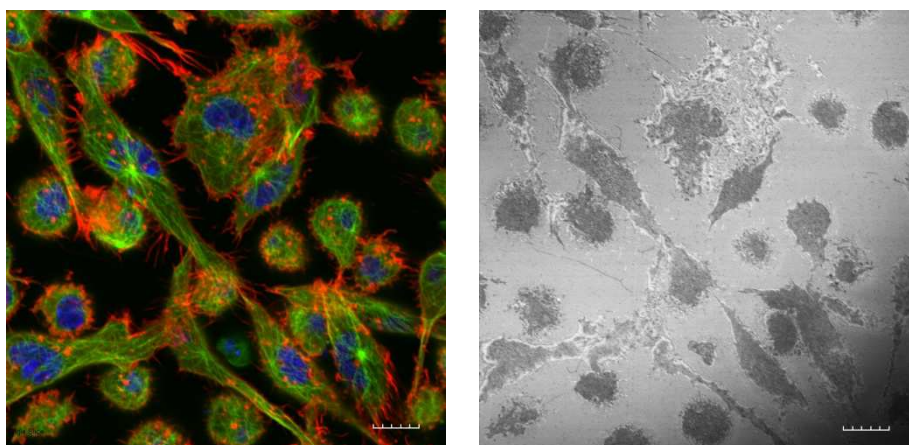


Interakce hematopoietických buněk s proteiny extracelulární matrice

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 hematopoietických buněk s mikroprostředím kostní dřeně i zralejších 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 adhezivních interakcí u adherentních typů buněk, studií zaměřených na hematopoietické buňky je však velmi 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 mikroimpedance¹. 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 nacházejících se v bezprostřední blízkosti (do 100 nm) pokrytého povrchu. 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.

Metodou IRM jsme studovali morfologii adhezních struktur u řady leukemických linií a hledali možný marker těchto struktur pro mikroskopická zobrazení. 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 nezralých hematopoietických 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)². Výzkum role kináz rodiny Src v regulaci adhezních struktur hematopoietických buněk je v současné době podpořen grantem GAUK č. 498214.

K důležitým regulátorům buněčných interakcí s ECM patří kinázy rodiny PAK, které jsou rovněž studovány převážně na adherentních buňkách. V naší studii zaměřené na buňky leukemických linií a normální hematopoietické buňky jsme zjistili, že inhibice kináz PAK1 a PAK2 pomocí látky IPA-3 výrazně omezuje schopnost buněk vázat se k proteinům extracelulární matrice (fibronektin, laminin, kolageny), což je v souladu s nedávno publikovaným pozorováním, že inhibice těchto kináz pomocí interagujícího peptidu snižuje schopnost kmenových a progenitorových buněk obnovit krvetvorbu ozářeného myšího příjemce. IPA-3 také spouští ve většině těchto buněk apoptózu, což naznačuje, že kinázy PAK se účastní i signálních drah, které hematopoietickým buňkám zajišťují základní životní funkce³.

Reference:

1. Obr, A., Röselová, P., Grebeňová, D., and Kuželová, K. (2013) Real-time monitoring of hematopoietic cell interaction with fibronectin fragment: The effect of histone deacetylase inhibitors. *Cell Adhesion and Migration*. 7, 275-282.
2. Obr, A., Röselová, P., Grebeňová, D., and Kuželová, K. (2014) Real-time analysis of imatinib- and dasatinib-induced effects on chronic myelogenous leukemia cell interaction with fibronectin. *PLoS One*. 9, e107367.
3. Kuželová, K., Grebeňová, D., Holoubek, A., Röselová, P., and Obr, A. (2014) Group I PAK inhibitor IPA-3 induces cell death and affects cell adhesivity to fibronectin in human hematopoietic cells. *PLoS ONE*. 9, e92560.