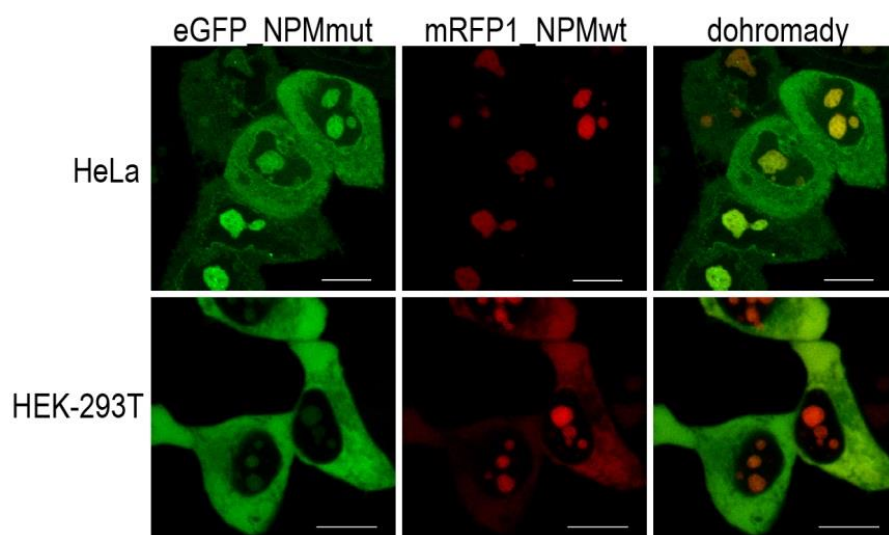


Ústav hematologie a krevní transfuze: Oddělení proteomiky

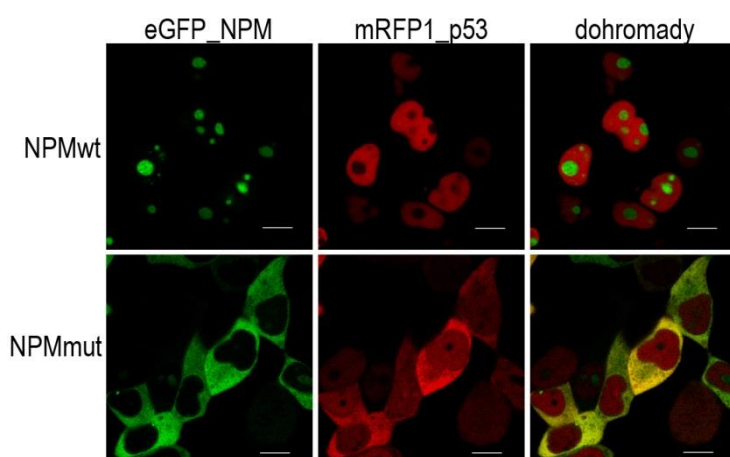
Význam C-terminálních mutací nukleofosminu v akutní myeloidní leukémii

Přibližně třetina pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) má mutovaný gen pro nukleofosmin (NPM), který hraje významnou úlohu při tvorbě ribozomů, dělení buňky nebo opravách poškozené DNA a má velké množství interakčních partnerů. Nemutovaný nukleofosmin je díky dynamické vazbě s dalšími nukleolárními proteiny a ribozomální RNA přednostně lokalizován v jadérku, bezmembránovém komplexu bohatém na proteiny uvnitř buněčného jádra. Mutace v C-koncové části genu pro NPM vyvolává nekorektní cytoplazmatickou lokalizaci mutovaného proteinu. Nejčastějším typem mutace (mutace A) je zdvojení sekvence čtyř nukleotidů v C-terminální doméně genu pro NPM (*NPM1*), která způsobí posunutí čtecího rámce a odlišnou koncovou sekvenci aminokyselin ve výsledném proteinu. Tato mutace se vyskytuje asi u 80% všech pacientů s mutovaným *NPM1*. Do současnosti je známo již přes 100 různých C-koncových mutací. Jejich následky zatím nejsou dobře prostudovány, společným rysem všech je ale právě lokalizace mutovaného proteinu v cytoplazmě. Přítomnost genové předlohy pro mutovaný NPM (NPMmut) je jedním z příznivých prognostických ukazatelů AML. Naším cílem je určit, jaký je význam cytoplazmatické lokalizace NPM v onemocnění AML a jaký vliv na expresi a lokalizaci NPM má v buňkách leukemických linií s různými formami tohoto proteinu ošetření protinádorovými léčivými. Lokalizaci a chování tohoto i dalších jadérkových proteinů, nukleolinu (NCL) a fibrillarinu (FBL), sledujeme pomocí imunofluorescenčního značení fixovaných suspenzních buněk nebo pomocí fluorescenčně značených proteinů vnesených do živých buněk [1]. Díky značení živých buněk můžeme pozorovat i procesy probíhající po ošetření léčivými. Zjistili jsme, že cytoplazmatická lokalizace mutované formy NPM se vyskytuje u většiny buněk exprimujících značený mutovaný protein, v závislosti na linii může být ale část NPMmut přítomna i v jadérku společně s přirozenou (wild-type, wt) formou (obr. 1) [2]. To pozorujeme zejména v buněčné linii HeLa, která má vysokou endogenní expresi NPM a zároveň tvoří méně exogenního proteinu než linie HEK-293T. Díky tvorbě hetero-oligomerů mutované a wt formy je pak určitá frakce NPMmut lokalizována v jadérku.



Obr. 1: Lokalizace mutované (eGFP_NPMmut, zelená) a přirozené (mRFP1_NPMwt, červená) formy nukleofosminu v buňkách transfekovaných plazmidy nesoucími geny pro fluorescenčně značené varianty NPM. Nahoře: linie HeLa, dole: linie HEK-293T. Měřítko představuje 10 μ m.

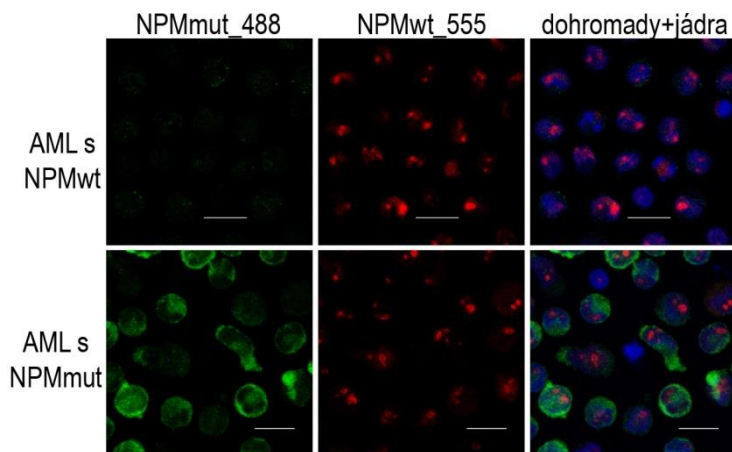
Prokázali jsme, že přítomnost mutace zabraňuje tvorbě přirozených komplexů NPM s ostatními jadérovými proteiny [3]. Zjistili jsme také, že zatímco oligomerizační doména NPM je nezbytná pro interakci s mnoha dalšími proteiny, NPM zkrácený o oligomerizační doménu některé jadérové proteiny váže s vyšší afinitou [4]. Naše nedávné výsledky ukázaly, že interakce NPM s tumor supresorem p53 není ovlivněna mutací NPM a má za následek delokalizaci p53 do cytoplazmy (obr.2) [5]. Důsledkem přítomnosti p53 v cytoplazmě je pravděpodobně snížená hladina p53 v buňkách obsahujících NPMmut, zároveň však může být ovlivněna mitochondriální apoptotická dráha díky snadnější dostupnosti p53 pro navázání na apoptotické proteiny v mitochondriální membráně. V současné době studujeme chování proteinu Mdm2, ubikvitin ligázy, která významně reguluje hladinu a aktivitu p53 a zároveň má být za určitých podmínek interakčním partnerem NPM. Dosavadní experimenty naznačují, že neobvyklá cytoplazmatická lokalizace Mdm2 v buňkách exprimujících NPMmut je zprostředkována právě interakcí obou proteinů, Mdm2 i NPMmut, s p53.



Obr. 2: Lokalizace mRFP1-značené formy tumorsupresoru p53 (červená) v buňkách linie HEK-293T kotransfekovaných eGFP_NPMwt nebo eGFP_NPMmut (zelená). Měřítka představuje 10 μ m.

Vyvinuli jsme metodu potenciálně vhodnou pro sledování stupně oligomerizace a interakce NPM s dalšími proteiny přímo v živých buňkách [6]. Ve spolupráci s Fyzikálním ústavem MFF UK používáme konfokální mikroskopii zobrazující časy dohasínání fluorescence uvnitř buňky (FLIM) k pozorování interakce proteinů pomocí přenosu fluorescence (FRET) mezi dvěma fluorofory, eGFP a mRFP1. Dále jsme objevili unikátní vlastnost fluoroforu eGFP – zkrácení času dohasínání fluorescence po definovaném ozáření excitačním světlem [7]. Tuto fotokonverzi používáme pro sledování dynamiky proteinů v buňkách ošetřených léčivý. V současné době jsme díky této metodě prokázali, že návrat delokalizovaných molekul NPMmut a p53 do jádra vyvolaný inhibicí jejich exportu je oddělený, přestože by se vzhledem k jejich interakci očekávalo, že přesun bude probíhat současně [5]. Naší nejnovější aplikací metody FRET je sledování komplexu tří různě značených proteinů a jejich současné vzájemné interakce. Díky tomuto přístupu jsme schopni sledovat například vliv inhibitorů interakce mezi p53 a Mdm2 (Nutlin-3a, RITA) na lokalizaci Mdm2 v buňkách obsahujících NPMmut. V kombinaci s výsledky získanými z buněčných lysátů analyzujeme úlohu specifických fosforylací NPM, zejména na Serinu 4 a Threoninu 199, v mechanismu účinku těchto inhibitorů.

Zavedli jsme také imunofluorescenční metodu pro zjištění přítomnosti mutace NPM u pacientů s AML, založenou na detekci NPMmut v cytoplasmě (obr. 3), kterou korelujeme s výsledky genetické analýzy.



Obr. 3: Imunofluorescenční značení NPMwt (AlexaFluor555, červená) a NPMmut (AlexaFluor488, zelená) v buňkách izolovaných z periferní krve AML pacientů bez mutace (nahore) nebo s mutací (dole) v C-terminální části NPM. Modře (Hoechst 33342) jsou značena jádra. Měřítka představuje 10 μ m.

Publikace k tématu:

- [1] Brodská B, Holoubek A, Otevřelová P, Kuzelová K (2016) Low-Dose Actinomycin-D Induces Redistribution of Wild-Type and Mutated Nucleophosmin Followed by Cell Death in Leukemic Cells. *J.Cell.Biochem.* 117(6):1319-29
- [2] Brodská B, Kracmarová M, Holoubek A, Kuzelová K (2017) Localization of AML-related nucleophosmin mutant depends on its subtype and is highly affected by its interaction with wild-type NPM. *PLoS One* 12(4):e0175175
- [3] Šašínková M, Holoubek A, Otevřelová P, Kuželová K, et al. (2018) AML-associated mutation of nucleophosmin compromises its interaction with nucleolin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 103:65-73
- [4] Šašínková M, Heřman P, Holoubek A, Strachotová D, et al. (2021) NSC348884 cytotoxicity is not mediated by inhibition of nucleophosmin oligomerization. *Sci Rep* 11(1):1084
- [5] Holoubek A, Strachotová D, Otevřelová P, Roselová P, et al. (2021) AML-Related NPM Mutations Drive p53 Delocalization into the Cytoplasm with Possible Impact on p53-Dependent Stress Response. *Cancers (Basel)* 13(13):33266
- [6] Holoubek A, Herman P, Sýkora J, Brodská B, et al. (2018) Monitoring of nucleophosmin oligomerization in live cells. *Methods Appl Fluoresc* 6(3):035016
- [7] Herman P, Holoubek A, Brodská B (2019) Lifetime-based photoconversion of EGFP as a tool for FLIM. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1863(1):266-77