

ABSTRAKT

Nukleofosmin 1 (NPM1; nucleophosmin 1) se v buňce vyskytuje převážně v jadérku, ve formě oligomerů tvořených skrze N-koncovou doménu (NTD; N-terminal domain), a jako molekulární chaperon a transportní protein má široké spektrum interakčních partnerů včetně p53 či p14Arf. Mutace v C-koncové oblasti NPM1 je prokazována asi u 30 % pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML; acute myeloid leukemia) a projevuje se aberantní expresí mutovaného (mut; mutated) NPM1 v cytoplazmě. V důsledku toho dochází v leukemických buňkách s mutNPM1 k přesunu mnoha proteinů s ním interagujících, včetně jeho přirozené formy (wt; wild-type), do cytoplazmy. Pro detekci interakcí a oligomerních komplexů NPM1 jsme zavedli a optimalizovali jak *in vitro* techniky – nativní a seminativní gelovou elektroforézu a imunoprecipitaci, tak testování *in vivo* – konfokální mikroskopii a metody časově rozlišené fluorescence. Těmito metodami jsme prokázali, že v důsledku C-terminální mutace NPM1 dochází k narušení jeho interakce s jadérovým proteinem nukleolinem (NCL; nucleolin), která se tvoří mimo NTD, a že komplex mutNPM1-NCL nevzniká ani po ošetření buněk cytotoxickými léčivy navozujícími relokaci obou partnerů do stejného buněčného kompartmentu. V naší studii dále ukazujeme, že oligomery mutNPM1 jsou méně stabilní než oligomery wtNPM1, což je poznatek důležitý pro vývoj léčiv cílených na oligomerizaci NPM1. Interakční vlastnosti NPM1 totiž úzce souvisí s jeho oligomerizačním stavem a zásah do NTD NPM1 může zajistit zeslabení interakce mutNPM1 s interakčními partnery a v důsledku toho i obnovení jejich správné lokalizace a funkce. Zkonstruovali jsme proto několik forem NPM1 s pozměněnou či zkrácenou NTD a popsali jsme vliv těchto zásahů na schopnost takto mutovaných molekul oligomerizovat nebo interagovat s wtNPM1. Zjistili jsme, že zatímco bodové mutace oligomerizaci ovlivní jen málo, zkrácení NTD tvorbě komplexů účinně zabraňuje. Všechny mutované formy ale byly do jisté míry schopny koprecipitovat wtNPM1. Nakonec prezentujeme nové poznatky o vlastnostech léčiva NSC348884, které je deklarováno jako inhibitor oligomerizace NPM1. V doporučených koncentracích toto léčivo vyvolávalo u všech leukemických buněčných linií apoptózu, zároveň jsme však prokázali přítomnost neporušených NPM1 oligomerů. Naše experimenty dále odhalily schopnost NSC348884 zabránit přirozené adhezi buněk. Celkově tedy tato práce předkládá způsoby detekce oligomerů NPM1 a analyzuje vliv mutací v N- i C-koncové doméně NPM1 na jeho oligomerizační a interakční potenciál.

Klíčová slova: NPM1, oligomerizace, mutace, AML, NCL, NSC348884, detekce oligomerů